



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105934253 A

(43)申请公布日 2016.09.07

(21)申请号 201480073552.3

(22)申请日 2014.12.17

(30)优先权数据

61/917,264 2013.12.17 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2016.07.19

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/070992 2014.12.17

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/095418 EN 2015.06.25

(71)申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 M·S·丹尼斯 A·埃本斯

B·欧文 T·T·云蒂拉 J·李

(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

代理人 岑晓东

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

权利要求书6页 说明书72页

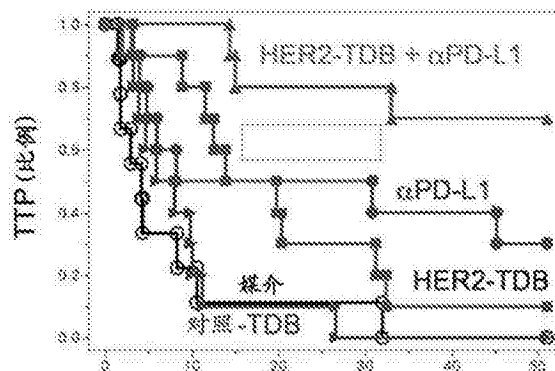
序列表17页 附图18页

(54)发明名称

使用PD-1轴结合拮抗剂和抗HER2抗体治疗
HER2阳性癌症的方法

(57)摘要

本发明提供用于治疗HER2阳性癌症的组合物和方法。该方法包括施用PD-1轴结合拮抗剂和靶向HER2的抗体。



对数秩检验:

HER2-TDB 对媒介 P=0.0149

PDL1 对媒介 P=0.0284

组合对媒介 P<0.0001

组合对 HER2-TDB P=0.0028

组合对 PDL1 P=0.0493

1. 一种用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的方法,其包括对该个体施用有效量的人PD-1轴结合拮抗剂和抗HER2抗体。

2. 权利要求1的方法,其中该PD-1轴结合拮抗剂选自下组:PD-1结合拮抗剂,PD-L1结合拮抗剂和PD-L2结合拮抗剂。

3. 权利要求2的方法,其中该PD-1轴结合拮抗剂是PD-1结合拮抗剂。

4. 权利要求3的方法,其中该PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与其配体结合配偶的结合。

5. 权利要求4的方法,其中该PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD-L1的结合。

6. 权利要求4的方法,其中该PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD-L2的结合。

7. 权利要求4的方法,其中该PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD-L1和PD-L2二者的结合。

8. 权利要求4的方法,其中该PD-1结合拮抗剂是抗体。

9. 权利要求4的方法,其中该PD-1结合拮抗剂选自下组:MDX-1106(nivolumab),MK-3475(lambrolizumab),CT-011(pidilizumab),和AMP-224。

10. 权利要求2的方法,其中该PD-1轴结合拮抗剂是PD-L1结合拮抗剂。

11. 权利要求10的方法,其中该PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与PD-1的结合。

12. 权利要求10的方法,其中该PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与B7-1的结合。

13. 权利要求10的方法,其中该PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与PD-1和B7-1二者的结合。

14. 权利要求11-13任一项的方法,其中该PD-L1结合拮抗剂是抗体。

15. 权利要求10的方法,其中该PD-L1结合拮抗剂选自下组:YW243.55.S70,MPDL3280A,MDX-1105,和MEDI4736。

16. 权利要求14的方法,其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。

17. 权利要求14的方法,其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或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:

18. 权利要求2的方法,其中该PD-1轴结合拮抗剂是PD-L2结合拮抗剂。

19. 权利要求18的方法,其中该PD-L2结合拮抗剂是抗体。

20. 权利要求18的方法,其中该PD-L2结合拮抗剂是免疫粘附素。

21. 权利要求1-20任一项的方法,其中该抗HER2抗体是曲妥珠单抗(trastuzumab)或帕妥珠单抗(pertuzumab)。

22. 权利要求1-20任一项的方法,其中该抗HER2抗体包含重链可变区和/或轻链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:38的HVR-H1序列,SEQ ID NO:50的HVR-H2序列,和SEQ ID NO:40的HVR-H3序列,该轻链可变区包含SEQ ID NO:41的HVR-L1序列,SEQ ID NO:42的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:43的HVR-L3序列。

23. 权利要求1-20任一项的方法,其中该抗HER2抗体包含重链可变区和/或轻链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列,该轻链可变区包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列。

24. 权利要求1-20任一项的方法,其中该抗HER2抗体是多特异性抗体。

25. 权利要求1-20任一项的方法,其中该抗HER2抗体是双特异性抗体。

26. 权利要求25的方法,其中该双特异性抗体包含结合HER2的第一抗原结合域和结合

CD3的第二抗原结合域。

27. 权利要求26的方法, 其中该第一抗原结合域包含重链可变区(V_HHER2)和轻链可变区(V_LHER2), 且该第二抗原结合域包含重链可变区(V_HCD3)和轻链可变区(V_LCD3)。

28. 权利要求27的方法, 其中该第一抗原结合域包含重链可变区(V_HHER2)和/或轻链可变区(V_LHER2), 该重链可变区(V_HHER2)包含SEQ ID NO:38的HVR-H1序列, SEQ ID NO:50的HVR-H2序列, 和SEQ ID NO:40的HVR-H3序列, 该轻链可变区(V_LHER2)包含SEQ ID NO:41的HVR-L1序列, SEQ ID NO:42的HVR-L2序列, 和SEQ ID NO:43的HVR-L3序列。

29. 权利要求28的方法, 其中该重链可变区(V_HHER2)包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列和/或该轻链可变区(V_LHER2)包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列。

30. 权利要求26-29任一项的方法, 其中该第二抗原结合域结合人CD3多肽。

31. 权利要求30的方法, 其中该CD3多肽是人CD3 ϵ 多肽或人CD3 γ 多肽。

32. 权利要求31的方法, 其中该第二抗原结合域结合天然T细胞受体(TCR)复合物中与其它TCR亚基联合的人CD3 ϵ 多肽或人CD3 γ 多肽。

33. 权利要求25-32任一项的方法, 其中该双特异性抗体是单链双特异性抗体, 其包含第一抗原结合域和第二抗原结合域。

34. 权利要求33的方法, 其中该单链双特异性抗体包含选自下组的可变区, 自N端至C端排列:

- (1) V_HHER2-V_LHER2-V_HCD3-V_LCD3,
- (2) V_HCD3-V_LCD3-V_HHER2-V_LHER2,
- (3) V_HCD3-V_LCD3-V_LHER2-V_HHER2,
- (4) V_HHER2-V_LHER2-V_LCD3-V_HCD3,
- (5) V_LHER2-V_HHER2-V_HCD3-V_LCD3, 或
- (6) V_LCD3-V_HCD3-V_HHER2-V_LHER2。

35. 权利要求25-32任一项的方法, 其中(a)该第一抗原结合域包含一个或多个重链恒定域, 其中该一个或多个重链恒定域选自第一CH1(CH₁₁)域, 第一CH2(CH₂₁)域, 和第一CH3(CH₃₁)域; 且(b)该第二抗原结合域包含一个或多个重链恒定域, 其中该一个或多个重链恒定域选自第二CH1(CH₁₂)域, 第二CH2(CH₂₂)域, 和第二CH3(CH₃₂)域。

36. 权利要求35的方法, 其中该第一抗原结合域的一个或多个重链恒定域中至少一个与该第二抗原结合域的另一重链恒定域配对。

37. 权利要求36的方法, 其中该CH₃₁和CH₃₂域各自包含隆起或空腔, 且其中该CH₃₁域中的隆起或空腔分别可位于该CH₃₂域中的空腔或隆起中。

38. 权利要求37的方法, 其中该CH₃₁和CH₃₂域在所述隆起和空腔之间的界面处相遇。

39. 权利要求35-38任一项的方法, 其中该CH₂₁和CH₂₂域各自包含隆起或空腔, 且其中该CH₂₁域中的隆起或空腔分别可位于该CH₂₂域中的空腔或隆起中。

40. 权利要求39的方法, 其中该CH₂₁和CH₂₂域在所述隆起和空腔之间的界面处相遇。

41. 权利要求1-40任一项的方法, 其中该抗HER2抗体包含无糖基化位点突变。

42. 权利要求41的方法, 其中该无糖基化位点突变是替代突变。

43. 权利要求42的方法, 其中该替代突变位于氨基酸残基N297, L234, L235, 和/或D265(EU编号方式)。

44. 权利要求43的方法,其中该替代突变选自下组:N297G,N297A,L234A,L235A,和D265A。

45. 权利要求43的方法,其中该替代突变是D265A突变和N297G突变。

46. 权利要求41-45任一项的方法,其中该无糖基化位点突变降低抗HER2抗体的效应器功能。

47. 权利要求1-46任一项的方法,其中该癌症是HER2阳性癌症。

48. 权利要求47的方法,其中该癌症是乳腺癌,肺癌,卵巢癌,胃癌,膀胱癌,胰腺癌,子宫内膜癌,结肠癌,肾癌,食道癌,或前列腺癌。

49. 权利要求1-48任一项的方法,其中该个体具有癌症或已经诊断有癌症。

50. 权利要求49的方法,其中该个体中的癌细胞表达PD-L1。

51. 权利要求49或50的方法,其中该个体具有对HER2靶向疗法有抗性的癌症。

52. 权利要求49或50的方法,其中该个体对HER2靶向疗法不应。

53. 权利要求51或52的方法,其中该HER2靶向疗法是用抗HER2抗体或HER2途径抑制剂治疗。

54. 权利要求53的方法,其中该HER2靶向疗法是用曲妥珠单抗,帕妥珠单抗,ado-trastuzumab emtansine,或拉帕替尼治疗。

55. 权利要求1-54任一项的方法,其中该治疗在该治疗停止后在该个体中导致持久响应。

56. 权利要求1-55任一项的方法,其中该抗HER2抗体在该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。

57. 一种在具有癌症的个体中增强免疫功能的方法,其包括施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和抗HER2抗体。

58. 权利要求57的方法,其中该个体中的CD8T细胞具有相对于施用该PD-1轴结合拮抗剂和该抗HER2抗体之前增强的引发,活化,增殖和/或溶胞活性。

59. 权利要求57的方法,其中CD8T细胞的数目相对于施用该组合之前升高。

60. 权利要求59的方法,其中该CD8T细胞是抗原特异性CD8T细胞。

61. 权利要求57的方法,其中Treg功能相对于施用该组合之前受到遏制。

62. 权利要求57的方法,其中T细胞耗尽相对于施用该组合之前降低。

63. 权利要求57-62任一项的方法,其中该PD-1轴结合拮抗剂选自下组:PD-1结合拮抗剂,PD-L1结合拮抗剂和PD-L2结合拮抗剂。

64. 权利要求63的方法,其中该PD-1轴结合拮抗剂是PD-1结合拮抗剂。

65. 权利要求64的方法,其中该PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与其配体结合配偶的结合。

66. 权利要求65的方法,其中该PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD-L1的结合。

67. 权利要求65的方法,其中该PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD-L2的结合。

68. 权利要求65的方法,其中该PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD-L1和PD-L2二者的结合。

69. 权利要求65的方法,其中该PD-1结合拮抗剂是抗体。

70. 权利要求65的方法,其中该PD-1结合拮抗剂选自下组:MDX-1106(nivolumab),MK-3475(lambrolizumab),CT-011(pidilizumab),和AMP-224。

71. 权利要求63的方法,其中该PD-1轴结合拮抗剂是PD-L1结合拮抗剂。

72. 权利要求71的方法,其中该PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与PD-1的结合。
73. 权利要求71的方法,其中该PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与B7-1的结合。
74. 权利要求71的方法,其中该PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与PD-1和B7-1二者的结合。
75. 权利要求71-74任一项的方法,其中该PD-L1结合拮抗剂是抗体。
76. 权利要求71的方法,其中该PD-L1结合拮抗剂选自下组:YW243.55.S70,MPDL3280A,MDX-1105,和MEDI4736。
77. 权利要求75的方法,其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。
78. 权利要求75的方法,其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或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。
79. 权利要求63的方法,其中该PD-1轴结合拮抗剂是PD-L2结合拮抗剂。
80. 权利要求79的方法,其中该PD-L2结合拮抗剂是抗体。
81. 权利要求79的方法,其中该PD-L2结合拮抗剂是免疫粘附素。
82. 权利要求57-81任一项的方法,其中该抗HER2抗体是曲妥珠单抗(trastuzumab)或帕妥珠单抗(pertuzumab)。
83. 权利要求57-81任一项的方法,其中该抗HER2抗体包含重链可变区和/或轻链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:38的HVR-H1序列,SEQ ID NO:50的HVR-H2序列,和SEQ ID NO:40的HVR-H3序列,该轻链可变区包含SEQ ID NO:41的HVR-L1序列,SEQ ID NO:42的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:43的HVR-L3序列。
84. 权利要求57-81任一项的方法,其中该抗HER2抗体包含重链可变区和/或轻链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列,该轻链可变区包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列。
85. 权利要求57-81任一项的方法,其中该抗HER2抗体是多特异性抗体。
86. 权利要求57-81任一项的方法,其中该抗HER2抗体是双特异性抗体。
87. 权利要求86的方法,其中该双特异性抗体包含结合HER2的第一抗原结合域和结合CD3的第二抗原结合域。
88. 权利要求87的方法,其中该第一抗原结合域包含重链可变区(V_HHER2)和轻链可变区(V_LHER2),且该第二抗原结合域包含重链可变区(V_HCD3)和轻链可变区(V_LCD3)。
89. 权利要求88的方法,其中该第一抗原结合域包含重链可变区(V_HHER2)和/或轻链可变区(V_LHER2),该重链可变区(V_HHER2)包含SEQ ID NO:38的HVR-H1序列,SEQ ID NO:50的HVR-H2序列,和SEQ ID NO:40的HVR-H3序列,该轻链可变区(V_LHER2)包含SEQ ID NO:41的HVR-L1序列,SEQ ID NO:42的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:43的HVR-L3序列。
90. 权利要求88的方法,其中该重链可变区(V_HHER2)包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列和/或该轻链可变区(V_LHER2)包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列。
91. 权利要求87-90任一项的方法,其中该第二抗原结合域结合人CD3多肽。
92. 权利要求91的方法,其中该CD3多肽是人CD3 ϵ 多肽或人CD3 γ 多肽。
93. 权利要求91的方法,其中该第二抗原结合域结合天然T细胞受体(TCR)复合物中与其它TCR亚基联合的人CD3 ϵ 多肽或人CD3 γ 多肽。

94. 权利要求87-90任一项的方法, 其中该双特异性抗体是单链双特异性抗体, 其包含第一抗原结合域和第二抗原结合域。

95. 权利要求94的方法, 其中该单链双特异性抗体包含选自下组的可变区, 自N端至C端排列:

- (1) V_HHER2-V_LHER2-V_HCD3-V_LCD3,
- (2) V_HCD3-V_LCD3-V_HHER2-V_LHER2,
- (3) V_HCD3-V_LCD3-V_LHER2-V_HHER2,
- (4) V_HHER2-V_LHER2-V_LCD3-V_HCD3,
- (5) V_LHER2-V_HHER2-V_HCD3-V_LCD3, 或
- (6) V_LCD3-V_HCD3-V_HHER2-V_LHER2。

96. 权利要求87-93任一项的方法, 其中(a)该第一抗原结合域包含一个或多个重链恒定域, 其中该一个或多个重链恒定域选自第一CH1(CH₁₁)域, 第一CH2(CH₂₁)域, 和第一CH3(CH₃₁)域; 且(b)该第二抗原结合域包含一个或多个重链恒定域, 其中该一个或多个重链恒定域选自第二CH1(CH₁₂)域, 第二CH2(CH₂₂)域, 和第二CH3(CH₃₂)域。

97. 权利要求96的方法, 其中该第一抗原结合域的一个或多个重链恒定域中至少一个与该第二抗原结合域的另一重链恒定域配对。

98. 权利要求97的方法, 其中该CH₃₁和CH₃₂域各自包含隆起或空腔, 且其中该CH₃₁域中的隆起或空腔分别可位于该CH₃₂域中的空腔或隆起中。

99. 权利要求98的方法, 其中该CH₃₁和CH₃₂域在所述隆起和空腔之间的界面处相遇。

100. 权利要求96-99任一项的方法, 其中该CH₂₁和CH₂₂域各自包含隆起或空腔, 且其中该CH₂₁域中的隆起或空腔分别可位于该CH₂₂域中的空腔或隆起中。

101. 权利要求100的方法, 其中该CH₂₁和CH₂₂域在所述隆起和空腔之间的界面处相遇。

102. 权利要求57-101任一项的方法, 其中该抗HER2抗体包含无糖基化位点突变。

103. 权利要求102的方法, 其中该无糖基化位点突变是替代突变。

104. 权利要求103的方法, 其中该替代突变位于氨基酸残基N297, L234, L235, 和/或D265(EU编号方式)。

105. 权利要求104的方法, 其中该替代突变选自下组: N297G, N297A, L234A, L235A, 和D265A。

106. 权利要求104的方法, 其中该替代突变是D265A突变和N297G突变。

107. 权利要求102-106任一项的方法, 其中该无糖基化位点突变降低抗HER2抗体的效应器功能。

108. 权利要求57-107任一项的方法, 其中该癌症是HER2阳性癌症。

109. 权利要求108的方法, 其中该癌症是乳腺癌, 肺癌, 卵巢癌, 胃癌, 膀胱癌, 胰腺癌, 子宫内膜癌, 结肠癌, 肾癌, 食道癌, 或前列腺癌。

110. 权利要求57-109任一项的方法, 其中该个体中的癌细胞表达PD-L1。

111. 权利要求57-110任一项的方法, 其中该个体具有对HER2靶向疗法有抗性的癌症。

112. 权利要求57-110任一项的方法, 其中该个体对HER2靶向疗法不应。

113. 权利要求111或112的方法, 其中该HER2靶向疗法是用抗HER2抗体或HER2途径抑制剂治疗。

114. 权利要求113的方法, 其中该HER2靶向疗法是用曲妥珠单抗, 帕妥珠单抗, ado-trastuzumab emtansine, 或拉帕替尼治疗。

115. 权利要求1-114任一项的方法, 其中该PD-1轴结合拮抗剂和/或该抗HER2抗体静脉内, 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。

116. 权利要求1-115任一项的方法, 其进一步包括施用化疗剂来治疗癌症或延迟癌症进展。

117. 人PD-1轴结合拮抗剂在制备用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的药物中的用途, 其中该药物包含该人PD-1轴结合拮抗剂和任选的药学可接受载剂, 且其中该治疗包括与包含抗HER2抗体和任选的药学可接受载剂的组合物组合施用该药物。

118. 抗HER2抗体在制备用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的药物中的用途, 其中该药物包含该抗HER2抗体和任选的药学可接受载剂, 且其中该治疗包括与包含人PD-1轴结合拮抗剂和任选的药学可接受载剂的组合物组合施用该药物。

119. 包含人PD-1轴结合拮抗剂和任选的药学可接受载剂的组合物, 其用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展, 其中该治疗包括与第二组合物组合施用所述组合物, 其中该第二组合物包含抗HER2抗体和任选的药学可接受载剂。

120. 包含抗HER2抗体和任选的药学可接受载剂的组合物, 其用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展, 其中该治疗包括与第二组合物组合施用所述组合物, 其中该第二组合物包含人PD-1轴结合拮抗剂和任选的药学可接受载剂。

121. 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, 该说明书关于与包含抗HER2抗体和任选的药学可接受载剂的组合物组合施用该药物用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展。

122. 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第一药物, 和包含抗HER2抗体和任选的药学可接受载剂的第二药物。

123. 权利要求122的试剂盒, 其中该试剂盒进一步包含包含说明书的包装插页, 该说明书关于施用该第一药物和该第二药物用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展。

124. 一种试剂盒, 其包含包含抗HER2抗体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, 该说明书关于与包含PD-1轴结合拮抗剂和任选的药学可接受载剂的组合物组合施用该药物用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展。

使用PD-1轴结合拮抗剂和抗HER2抗体治疗HER2阳性癌症的方法

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2013年12月17日提交的美国临时申请No.61/917,264的优先权,据此通过援引将其完整收录。

[0003] ASCII文本文件上的序列表的提交

[0004] 通过援引将ASCII文本文件上的下述提交的内容完整收入本文:计算机可读形式(CRF)的序列表(文件名称:146392022840SeqList.txt,记录日期:2014年12月16日,大小:37KB)。

发明领域

[0005] 本发明涉及通过施用PD-1轴结合拮抗剂和抗HER2抗体来治疗HER2阳性癌症的方法。

[0006] 发明背景

[0007] 对T细胞提供两种截然不同的信号是一种关于抗原呈递细胞(APC)对静息T淋巴细胞的淋巴细胞活化的广泛接受的模型。Lafferty et al., Aust. J. Exp. Biol. Med. Sci 53: 27-42(1975)。此模型进一步提供了自身与非自身的辨别和免疫耐受。Bretscher et al., Science 169:1042-1049(1970); Bretscher, P.A., Proc. Nat. Acad. Sci. USA 96:185-190(1999); Jenkins et al., J. Exp. Med. 165:302-319(1987)。在主要组织相容性复合体(MHC)的背景中呈递的外来抗原肽的识别后,第一信号或抗原特异性信号经由T细胞受体(TCR)转导。第二或共刺激信号通过抗原呈递细胞(APC)上表达的共刺激分子投递至T细胞,诱导T细胞以促进克隆扩充,细胞因子分泌和效应器功能。Lenschow et al., Ann. Rev. Immunol. 14: 233(1996)。在共刺激缺失下,T细胞能对抗原刺激变得不应,不发起有效的免疫应答,并且进一步可以导致对外来抗原的耐受或耗尽。

[0008] 在两信号模型中,T细胞接受正和负第二共刺激信号二者。此类正和负信号的调节对于在维持免疫耐受和防止自身免疫的同时使宿主的保护性免疫应答最大化是至关重要的。负第二信号对于诱导T细胞耐受似乎是必需的,而正信号促进T细胞活化。虽然简单的两信号模型仍然为幼稚淋巴细胞提供有效解释,但是宿主的免疫应答是一个动态过程,并且也可以对抗原暴露的T细胞提供共刺激信号。共刺激的机制是治疗学方面感兴趣的,因为已经显示了共刺激信号的操作提供一种增强或终止基于细胞的免疫应答的手段。最近,已经发现了T细胞功能障碍或无反应性与抑制性受体(编程性死亡1多肽(PD-1))的诱导且持续的表达并行发生。因此,靶向PD-1和经由与PD-1的相互作用发信号的其它分子,诸如编程性死亡配体1(PD-L1)和编程性死亡配体2(PD-L2)的治疗剂是一个强烈感兴趣的领域。

[0009] PD-L1在许多癌症中过表达,而且常常与不良预后有关(Okazaki T et al., Intern. Immun. 2007, 19(7):813)(Thompson RH et al., Cancer Res 2006, 66(7):3381)。有趣的是,与正常组织中的T淋巴细胞和外周血T淋巴细胞形成对比,大多数肿瘤浸润性T淋巴细胞主要表达PD-1,这指示肿瘤反应性T细胞上PD-1的上调可以促成受损的抗肿瘤免疫

应答(Blood 2009 114(8):1537)。这可以是由于利用由与PD-1表达T细胞相互作用的PD-L1表达肿瘤细胞介导的PD-L1信号传导导致T细胞活化的减弱及逃避免疫监视(Sharpe et al., Nat Rev 2002)(Keir ME et al., 2008 Annu. Rev. Immunol. 26:677)。因此,对PD-L1/PD-1相互作用的抑制可以增强CD8+T细胞介导的肿瘤杀伤。

[0010] 靶向PD-1和经由与PD-1的相互作用发信号的其它分子,诸如编程性死亡配体1(PD-L1)和编程性死亡配体2(PD-L2)的治疗剂是一个强烈感兴趣的领域。已经提出抑制PD-L1信号传导作为一种增强T细胞免疫以治疗癌症(例如肿瘤免疫)和感染(包括急性和慢性(例如持久的)感染二者)的手段。一种最佳的治疗性处理可组合PD-1受体/配体相互作用的阻断与直接抑制肿瘤生长的药剂。仍然需要用于治疗各种癌症,稳定各种癌症,预防各种癌症,和/或延迟各种癌症形成的最佳疗法。

[0011] 通过援引将本文中引用的所有参考文献(包括专利申请,专利公开文本,和UniProtKB/Swiss-Prot登录号)完整收入本文,就像明确且单独指出通过援引来收录每一篇个别参考文献。

[0012] 发明概述

[0013] 一方面,本文中提供的是一种用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的方法,其包括对该个体施用有效量的人PD-1轴结合拮抗剂和抗HER2抗体。

[0014] 另一方面,本文中提供的是一种在具有癌症的个体中增强免疫功能的方法,其包括施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和抗HER2抗体。

[0015] 另一方面,本文中提供的是人PD-1轴结合拮抗剂在制备用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的药物中的用途,其中该药物包含该人PD-1轴结合拮抗剂和任选的药学可接受载剂,且其中该治疗包括与包含抗HER2抗体和任选的药学可接受载剂的组合物组合施用该药物。

[0016] 另一方面,本文中提供的是抗HER2抗体在制备用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的药物中的用途,其中该药物包含该抗HER2抗体和任选的药学可接受载剂,且其中该治疗包括与包含人PD-1轴结合拮抗剂和任选的药学可接受载剂的组合物组合施用该药物。

[0017] 另一方面,本文中提供的是包含人PD-1轴结合拮抗剂和任选的药学可接受载剂的组合物,其用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展,其中该治疗包括与第二组合物组合施用所述组合物,其中该第二组合物包含抗HER2抗体和任选的药学可接受载剂。

[0018] 另一方面,本文中提供的是包含抗HER2抗体和任选的药学可接受载剂的组合物,其用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展,其中该治疗包括与第二组合物组合施用所述组合物,其中该第二组合物包含人PD-1轴结合拮抗剂和任选的药学可接受载剂。

[0019] 另一方面,本文中提供的是一种试剂盒,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,该说明书关于与包含抗HER2抗体和任选的药学可接受载剂的组合物组合施用该药物用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展。

[0020] 另一方面,本文中提供的是一种试剂盒,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第一药物,和包含抗HER2抗体和任选的药学可接受载剂的第二药物。在一些实施方案中,该试剂盒进一步包含包含说明书的包装插页,该说明书关于施用该第一药物和该第二药物用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展。

[0021] 另一方面,本文中提供的是一种试剂盒,其包含包含抗HER2抗体和任选的药学可

接受载剂的药物,和包含说明书的包装插页,该说明书关于与包含PD-1轴结合拮抗剂和任选的药学可接受载剂的组合物组合施用该药物用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展。

[0022] 在上文和本文中描述的方法,用途,组合物,和试剂盒的一些实施方案中,该PD-1轴结合拮抗剂选自下组: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轴结合拮抗剂是抗体。在一些实施方案中,该抗体是人源化抗体,嵌合抗体或人抗体。在一些实施方案中,该抗体是抗原结合片段。在一些实施方案中,该抗原结合片段选自下组:Fab,Fab',F(ab')₂,和Fv。

[0023] 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,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(nivolumab),MK-3475(pembrolizumab,lambrolizumab),CT-011(pidilizumab),和AMP-224。

[0024] 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,PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1结合B7-1。在一些实施方案中,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,PD-L1结合拮抗剂是抗体。在一些实施方案中,该PD-L1结合拮抗剂选自下组:YW243.55.S70,MPDL3280A,MDX-1105,和MEDI4736。在一些实施方案中,该抗PD-L1抗体包含重链和/或轻链,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PD-L1抗体包含重链可变区和/或轻链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:25或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PD-L1抗体包含WO 2010/077634和美国专利No.8,217,149中描述的抗体YW243.55.S70的三个重链HVR序列和/或抗体YW24355.S70的三个轻链HVR序列,其通过援引收入本文。在一些实施方案中,该抗PD-L1抗体包含抗体YW243.55.S70的重链可变区序列和/或抗体YW24355.S70的轻链可变区序列。

[0025] 在一些实施方案中,该PD-1轴结合拮抗剂是PD-L2结合拮抗剂。在一些实施方案中,该PD-L2结合拮抗剂是抗体。在一些实施方案中,该PD-L2结合拮抗剂是免疫粘附素。

[0026] 在上文和本文中描述的方法,用途,组合物,和试剂盒的一些实施方案中,该抗HER2抗体是曲妥珠单抗(trastuzumab)(**HERCEPTIN®**,Genentech)或帕妥珠单抗(pertuzumab)(**PERJETA®**,Genentech)。在一些实施方案中,该抗HER2抗体包含重链和/或轻链,该重链包含SEQ ID NO:38的HVR-H1序列,SEQ ID NO:50的HVR-H2序列,和SEQ ID NO:40的HVR-H3序列,该轻链包含SEQ ID NO:41的HVR-L1序列,SEQ ID NO:42的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:43的HVR-L3序列。在一些实施方案中,该抗HER2抗体包含重链可变区和/或轻链可变区,该重链可变区包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列,该轻链可变区包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列。在一些实施方案中,该抗HER2抗体包含重链和/或轻链,该重链包含SEQ ID NO:36的氨基酸序列,该轻链包含SEQ ID NO:37的氨基酸序列。在可以与任何其它实施方案组合的一些实施方案中,该抗HER2抗体不是曲妥珠单抗或帕妥珠单抗。

[0027] 在上文和本文中描述的方法,用途,组合物,和试剂盒的一些实施方案中,该抗HER2抗体是多特异性抗体。在一些实施方案中,该抗HER2抗体是双特异性抗体。在一些实施方案中,该双特异性抗体包含结合HER2的第一抗原结合域和结合CD3的第二抗原结合域。在一些实施方案中,该第二抗原结合域结合人CD3多肽。在一些实施方案中,该CD3多肽是人CD3 ϵ 多肽或人CD3 γ 多肽。在一些实施方案中,该第二抗原结合域结合天然T细胞受体(TCR)复合物中与其它TCR亚基联合的人CD3 ϵ 多肽或人CD3 γ 多肽。在一些实施方案中,该第一抗原结合域包含重链可变区(V_HHER2)和轻链可变区(V_LHER2),且该第二抗原结合域包含重链可变区(V_HCD3)和轻链可变区(V_LCD3)。在一些实施方案中,该第一抗原结合域包含重链可变区(V_HHER2)和/或轻链可变区(V_LHER2),该重链可变区(V_HHER2)包含SEQ ID NO:38的HVR-H1序列,SEQ ID NO:50的HVR-H2序列,和SEQ ID NO:40的HVR-H3序列,该轻链可变区(V_LHER2)包含SEQ ID NO:41的HVR-L1序列,SEQ ID NO:42的HVR-L2序列,和SEQ ID NO:43的HVR-L3序列。在一些实施方案中,该第一抗原结合域包含重链可变区(V_HHER2)和/或轻链可变区(V_LHER2),该重链可变区(V_HHER2)包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列,该轻链可变区(V_LHER2)包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列。在一些实施方案中,该双特异性抗体是单链双特异性抗体,其包含第一抗原结合域和第二抗原结合域。在一些实施方案中,该单链双特异性抗体包含选自下组的可变区,自N端至C端排列:

[0028] (1)V_HHER2-V_LHER2-V_HCD3-V_LCD3,

[0029] (2)V_HCD3-V_LCD3-V_HHER2-V_LHER2,

[0030] (3)V_HCD3-V_LCD3-V_LHER2-V_HHER2,

[0031] (4)V_HHER2-V_LHER2-V_LCD3-V_HCD3,

[0032] (5)V_LHER2-V_HHER2-V_HCD3-V_LCD3,或

[0033] (6)V_LCD3-V_HCD3-V_HHER2-V_LHER2。

[0034] 在一些实施方案中,该双特异性抗体包含结合HER2的第一抗原结合域和结合CD3的第二抗原结合域,其中该第一抗原结合域包含一个或多个重链恒定域,其中该一个或多个重链恒定域选自第一CH1(CH₁₁)域,第一CH2(CH₂₁)域,和第一CH3(CH₃₁)域;且其中该第二抗原结合域包含一个或多个重链恒定域,其中该一个或多个重链恒定域选自第二CH1(CH₁₂)域,第二CH2(CH₂₂)域,和第二CH3(CH₃₂)域。在一些实施方案中,该第一抗原结合域的一个或多个重链恒定域中至少一个与该第二抗原结合域的另一重链恒定域配对。在一些实施方案中,该CH₃₁和CH₃₂域各自包含隆起或空腔,且其中该CH₃₁域中的隆起或空腔分别可位于该CH₃₂域的空腔或隆起中。在一些实施方案中,该CH₃₁和CH₃₂域在所述隆起和空腔之间的界面处相遇。在一些实施方案中,该CH₂₁和CH₂₂域各自包含隆起或空腔,且其中该CH₂₁域中的隆起或空腔分别可位于该CH₂₂域的空腔或隆起中。在一些实施方案中,该CH₂₁和CH₂₂域在所述隆起和空腔之间的界面处相遇。

[0035] 在一些实施方案中,本文所述抗体(例如PD-1轴结合拮抗性抗体,抗HER2抗体,或结合HER2和CD3的双特异性抗体)包含无糖基化位点突变。在一些实施方案中,该无糖基化位点突变是替代突变。在一些实施方案中,该替代突变位于氨基酸残基N297, L234, L235, 和/或D265(EU编号方式)。在一些实施方案中,该替代突变选自下组:N297G, N297A, L234A, L235A, 和D265A。在一些实施方案中,该替代突变是D265A突变和N297G突变。在一些实施方案中,该无糖基化位点突变降低抗体的效应器功能。在一些实施方案中,该PD-1轴结合拮抗

剂(例如抗PD-1抗体,抗PD-L1抗体,或抗PD-L2抗体)是在依照EU编号方式的第297位处具有Asn至Ala替代的人IgG1。

[0036] 在上文和本文中描述的方法,用途,组合物,和试剂盒的一些实施方案中,该癌症是HER2阳性癌症。在一些实施方案中,该癌症是乳腺癌,肺癌,卵巢癌,胃癌,膀胱癌,胰腺癌,子宫内膜癌,结肠癌,肾癌,食道癌,前列腺癌,或本文所述其它癌症。在一些实施方案中,该个体具有癌症或已经诊断有癌症。在一些实施方案中,该个体中的癌细胞表达PD-L1。在一些实施方案中,该个体具有对HER2靶向疗法有抗性的癌症。在一些实施方案中,该个体对HER2靶向疗法不应。在一些实施方案中,该HER2靶向疗法是用抗HER2抗体或HER2途径抑制剂治疗。在一些实施方案中,该HER2靶向疗法是用曲妥珠单抗(HERCEPTIN®, Genentech),帕妥珠单抗(PERJETA®, Genentech),ado-trastuzumab emtansine(KADCYLA®, Genentech),或拉帕替尼治疗。

[0037] 在上文和本文中描述的方法,用途,组合物,和试剂盒的一些实施方案中,该治疗或施用该人PD-1轴结合拮抗剂和该抗HER2抗体在该治疗停止后在该个体中导致持久响应。在一些实施方案中,该抗HER2抗体在该PD-1轴结合拮抗剂之前,与该PD-1轴结合拮抗剂同时,或在PD-1轴结合拮抗剂之后施用。在一些实施方案中,该PD-1轴结合拮抗剂和该抗HER2抗体在同一组合物中。在一些实施方案中,该PD-1轴结合拮抗剂和该抗HER2抗体在分开的组合物中。

[0038] 在上文和本文中描述的方法,用途,组合物,和试剂盒的一些实施方案中,该PD-1轴结合拮抗剂和/或该抗HER2抗体静脉内,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。在上文和本文中描述的方法,用途,组合物,和试剂盒的一些实施方案中,该治疗进一步包括施用化疗剂用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展。在一些实施方案中,该个体在该PD-1轴结合拮抗剂和该抗HER2抗体的组合治疗之前已经用化疗剂治疗。在一些实施方案中,用该PD-1轴结合拮抗剂和/或该抗HER2抗体的组合治疗的个体对化疗剂治疗不应。贯穿本申请描述的方法,用途,组合物,和试剂盒的一些实施方案进一步包括施用化疗剂用于治疗癌症或延迟癌症进展。

[0039] 在上文和本文中描述的方法,用途,组合物和试剂盒的一些实施方案中,该个体中的CD8T细胞相对于施用该组合之前具有增强的引发,活化,增殖和/或溶胞活性。在一些实施方案中,CD8T细胞的数目相对于施用该组合之前升高。在一些实施方案中,该CD8T细胞是抗原特异性CD8T细胞。在一些实施方案中,Treg功能相对于施用该组合之前遏制。在一些实施方案中,T细胞耗尽相对于施用该组合之前降低。

[0040] 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。

[0041] 附图简述

[0042] 图1显示使用节-入-穴技术生成全长HER2-CD3双特异性抗体和HER2-TDB的T细胞不依赖性特性。(A)对'节'(α-HER2 4D5)和'穴'(α-CD3UCHT1.v9)重链的CH3域生成氨基酸替代,其选择性促进异二聚化以生成双特异性全长IgG1。(B)TDB纯化的概览。ProA=蛋白A亲和层析,HIC=疏水性相互作用层析,QC=质量控制,SEC=大小排阻层析。(C)大小排阻层析展现低水平的聚集体或单臂。(D)MS分析指示检测不到水平的同二聚体种类。(E)通过

^{125} I-曲妥珠单抗Fab与非标记的曲妥珠单抗(黑色),曲妥珠单抗-Fab(蓝色)或双特异性HER2-TDB(红色)的竞争结合来测定对SKBR-3的结合。所示数据点代表3项测量的均值。(F)使用CellTiter-Glo®发光细胞存活力测定法分析用抗体处理6天后对SKBR-3细胞增殖的直接影响。所示数据点代表3项测量的均值。(G)使用检测裂解细胞释放的LDH的测定法测量曲妥珠单抗,在大肠杆菌中生成的曲妥珠单抗,和HER2-TDB介导体外NK细胞ADCC的能力。时间点4小时。误差棒=S.D.。

[0043] 图2显示靶标依赖性T细胞介导的HER2-TDB的细胞毒性。(A)通过将细胞针对CD8/CD69/粒酶B染色,接着通过FACS分析来检测T细胞活化。效应CD8+T细胞,靶SKBR-3,E:T比率3:1,时间点48小时。以两次重复的均值呈现数据。(B)使用ELISA检测来自培养基的可溶性粒酶和穿孔蛋白,并使用LDH释放测定法检测细胞毒性。效应PBMC,靶SKBR-3,E:T比率30:1,时间点18小时,AB 10ng/ml。(C)用1ng/ml双特异性抗体处理后升高的胱天蛋白酶活性(胱天蛋白酶3/7glo测定法)和凋亡(细胞死亡检测ELISA^{plus}测定法)与LDH释放有关。在小图C-F中,效应PBMC,靶SKBR-3,E:T比率10:1,时间点24小时。误差棒=S.D.。(D)使用LDH释放测定法测量HER2-TDB诱导杀伤HER2(红色)或载体(蓝色)转染的3T3的能力。效应PBMC,E:T比率10:1,时间点19小时。(E)使用曲妥珠单抗Fab(1μg/ml,黑色)或可溶性HER2胞外域(1μg/ml,蓝色)封闭HER2臂结合有效抑制HER2-TDB的细胞毒性活性。效应CD8+T细胞,靶BT474,E:T比率5:1,时间点24小时。使用LDH释放测定法检测细胞毒性。(F)比较用CD3微珠消减CD3阳性细胞前后PBMC的杀伤活性。靶SKBR3,E:T比率20:1,时间点19小时。使用FACS测定法检测细胞毒性。

[0044] 图3显示由HER2-TDB诱导的T细胞活化和杀伤的特征。(A)通过将细胞针对CD8,CD69,和CD107a染色,接着通过FACS分析,在多个时间点检测T细胞活化。以两次重复的均值呈现T细胞活化数据。效应CD8+T细胞,靶SKBR-3,E:T比率3:1。使用FACS测定法检测细胞毒性。在所有小图中,效应CD8+,靶SKBR-3,E:T比率3:1,误差棒=S.D.。(B)使用LDH释放测定法检测细胞毒性。效应CD8+T细胞,靶BT474,E:T比率在图中指示,时间点19小时。如小图A中那样测量T细胞活化。

[0045] 图4证明了HER2-TDB对T细胞的活化诱导T细胞增殖。(A)以CFSE在CD8+/PI-细胞中随细胞分裂的稀释,在第3天测量T细胞增殖。(B-C)HER2-TDB诱导T细胞扩充。用CFSE依照制造商的方案(Invitrogen,#C34554)标记纯化后的CD8+T细胞。在TDB存在或缺失下将CFSE标记的CD8+T细胞与靶细胞一起温育19小时。收集T细胞,清洗,并温育2-7天(RPMI+10%FBS, +/-20ng/ml IL2)。通过FACS检测活的CD8+细胞数(CD8+/PI-)和CFSE_{dim}细胞的百分比。

[0046] 图5证明了HER2-TDB活性与靶细胞HER2表达水平有关。(A)通过Western印迹检测不同癌细胞中的HER2水平。(B)使用LDH释放测定法检测细胞毒性。效应PBMC,E:T 25:1,时间点26小时。(C)用CFSE标记MCF-7细胞,并与SKBR3和PBMC(E:T 20:1)混合,接着用HER2-TDB处理19小时。将细胞用抗HER2APC和PI染色。通过FACS分析活的SKBR3(HER2^高,PI⁻)和MCF7(CFSE⁺,PI⁻)细胞的数目,并针对荧光珠标准化。(D)用CFSE标记BJAB细胞,并与SKBR3和PBMC(E:T 20:1)混合,接着用HER2-TDB处理19小时。将细胞用抗HER2APC和PI染色。将活的SKBR3(HER2^高,PI⁻)和BJAB(CFSE⁺,PI⁻)细胞的数目针对荧光珠标准化。(E)先前报告了HER2拷贝数(Aguilar et al.,Oncogene,18:6050-62,1999)。自图6B中的剂量响应数据计算EC₅₀值。正文中描述了HER2占据的计算。

[0047] 图6显示针对对抗HER2疗法不应的HER2+癌细胞的有效杀伤,不管组织类型,PI3K途径突变状态,或对曲妥珠单抗或拉帕替尼的敏感性。(A)使用LDH释放测定法检测针对多种细胞系的细胞毒性。效应PBM, E:T 10:1, 时间点19小时。(B)用T-DM1处理亲本和T-DM1抗性BT474-M1克隆3天。使用Celltiter Glo测量细胞存活力。(C)用HER2-TDB处理亲本和T-DM1抗性BT474-M1克隆。使用FACS测定法检测细胞毒性。效应CD8+T细胞, E:T比率3:1, 时间点24小时。误差棒=S.D.

[0048] 图7显示HER2-TDB的药动学概况。将单剂静脉内10mg/kg曲妥珠单抗(空心符号)或HER2-TDB(黑色符号)注射入Sprague-Dawley大鼠中。通过ELISA对血清样品测定测试药剂。均值 $\pm$ SD。HER2-TDB, N=4, 曲妥珠单抗, N=3。

[0049] 图8证明了HER2-TDB抑制HER2+肿瘤生长。(A)在NOD-SCID小鼠中测试HER2-TDB的体内功效。与来自两名健康捐献者的 1×10^7 个未刺激的人PBM(1, 2)一起注射 5×10^6 个MCF7-neo/HER2细胞。在第0, 7和14天用0.5mg/kg i.v. HER2-TDB处理小鼠(N=5-10)。呈现来自各个小鼠的肿瘤体积和处理组的拟合肿瘤体积;在研究结束前终结的小鼠以红色迹线显示,而保持至研究结束的小鼠以灰色迹线显示。每个处理组的拟合肿瘤体积以黑色实线显示,而比较对照组的拟合肿瘤体积以蓝色虚线显示。(B)用0.5mpk4D5/2C11-TDB(红色; mCD3反应性2C11替代臂; qwk x 5, IV, 在第0天开始)或媒介(黑色)处理具有已建立的乳房肿瘤的MMTV-huHER2转基因动物。(C)显示HER2-TDB处理下MMTV-huHER2转基因肿瘤的进展和肿瘤收缩的最大百分比。(D)4D5/2C11-TDB(0.5mpk, qwk x 5, IV, 在第0天开始)有效治疗较大的($>1000\text{mm}^3$)MMTV-huHER2转基因肿瘤。(E)MMTV-huHER2转基因肿瘤的生长不受对照TDB影响,其中CD3臂转换成人CD3特异性的(4D5/SP34-TDB; 蓝色),或靶标臂转换成无关的(CTRL/2C11-TDB; 灰色)。(F)HER2-TDB在huCD3转基因小鼠中的体内功效。在第0天开始,用媒介或0.5mg/kg HER2-TDB(4D5/SP34-TDB)qwk x 3, IV处理已建立的CT26-HER2肿瘤。(G)在Balb/c小鼠中测试具有mCD3反应性2C11替代臂的HER2-TDB(4D5/2C11-TDB)的体内功效。剂量给药如上文所述那样施用。15mg/kg TDM-1的给药是qwk x 3, IV。对照TDB是与无关靶标臂配对的2C11。

[0050] 图9显示CD3-TG T细胞以各自Balb/c小鼠或人T细胞的大约50%水平表达小鼠和人CD3二者。(A-B)自CD3-TG(菱形), BALB/c小鼠(正方形)的脾或来自健康人捐献者(圆形)的外周血提取T细胞,并用小鼠或人CD8和人CD3(克隆UCHT1; A)或小鼠CD3(克隆2C11; B)染色。该图是对CD8+细胞门控的。

[0051] 图10显示TDB介导的CD3-TG脾T细胞进行的杀伤。(A-B)自CD3-TG(菱形), BALB/c小鼠(正方形)的脾或来自健康人捐献者的外周血(圆形)提取T细胞。使用人CD3特异性(UCHT1.v9)HER2-TDB(A)或小鼠CD3特异性(2C11)HER2-TDB(B)测试对CT26-HER2细胞的体外杀伤活性。E:T=20:1, 测定时间:40小时。通过流式细胞术监测体外细胞毒性。

[0052] 图11证明了HER2-TDB的抗肿瘤活性是T细胞依赖性的。将 0.1×10^6 个CT26-HER2抗体皮下注射入BALB/c小鼠中。用媒介或人CD3特异性HER2-TDB处理具有已建立的肿瘤的小鼠(0.5mg/kg, qwx3, IV, n=10)。

[0053] 图12显示CT26-HER2肿瘤中的T细胞展示CD69活化标志物。将 0.1×10^6 个CT26-HER2皮下注射入BALB/c小鼠中。用媒介, 人CD3特异性HER2-TDB, 或具有无关靶标臂的对照-TDB处理具有已建立的肿瘤的小鼠(0.5mg/kg, qwx3, IV)。细胞注射后11-35天收获肿瘤。将

组织切成小块,并转移入gentleMACS™C管(Miltenyi, #130-093-237)中。在旋转温箱中将样品用胶原酶D(1mg/ml)和DNA酶I(0.2mg/ml)消化15分钟,然后解离以实现单细胞悬浮液。抗CD16/CD32FcR封闭后,将细胞表面标志物的混合物染色(N=2/组,NT=非处理)。

[0054] 图13显示CT-26-HER2肿瘤浸润性T细胞和CT-26-HER2肿瘤细胞分别的PD-1和PD-L1表达。(A)FACS分析证明了CT-26-HER2肿瘤浸润性T细胞表达PD-1。(B)FACS分析证明了CT-26-HER2肿瘤细胞表达PD-L1。

[0055] 图14显示PD1/PD-L1信号传导限制对HER2-TDB的响应。(A)流式细胞术分析揭示了TDB和靶细胞对人T细胞的刺激诱导PD-1表达。(B)靶细胞(293)中PD-L1的表达足以抑制TDB介导的T细胞杀伤活性。对表达PD-L1的293细胞(三角形),在抗PD-L1抗体存在下处理的表达PD-L1的293细胞(圆形),或载体转染的对照293细胞(正方形)添加引发后的T细胞后测量对靶细胞的细胞毒性。(C)HER2-TDB(4D5/SP34-TDB)和抗PD-L1抗体的组合显著抑制huCD3转基因小鼠中已建立的CT26-HER2肿瘤生长。TDB剂量给药如图8F中那样施用,而抗PD-L1抗体(25A1)的剂量给药是10mg/kg tiw x 3, IP。对照TDB结合huCD3但具有无关靶标臂。TTP=肿瘤进展(2倍第0天体积)前时间。(D)HER2-TDB(4D5/SP34-TDB)和抗PD-L1抗体的组合处理huCD3转基因小鼠中的CT26-HER2肿瘤导致完全,长期响应。剂量给药如上文所述那样施用。CR=无检测得到的肿瘤,PR=至少50%肿瘤相对于第0天收缩。

[0056] 图15显示HER2-TDB在NOD-SCID小鼠中的活性依赖于人PBMC。(A)在没有人PBMC的情况下将 5×10^6 个MCF7-neo/HER2细胞注射入小鼠中。在第0, 7, 和14天用0.5mg/kg i.v. HER2-TDB处理小鼠(n=7)。呈现来自各个小鼠的肿瘤体积和处理组的拟合肿瘤体积;在研究结束前终结的小鼠以红色迹线显示,而保持至研究结束的小鼠以灰色迹线显示。每个处理组的拟合肿瘤体积以黑色实线显示,而比较对照组的拟合肿瘤体积以蓝色虚线显示。(B)与HER2-TDB分享相同CD3臂但具有无关非结合靶标臂的对照TDB对肿瘤生长没有影响。与 1×10^7 个未刺激的人PBMC一起注射 5×10^6 个MCF7-neo/HER2细胞。如小图(A)中那样处理小鼠。

[0057] 发明详述

[0058] 本申请的发明人证明,由癌细胞表达的PD-L1能抑制T细胞募集性抗体的活性,而且这种抑制能通过抗PD-L1抗体来逆转。本申请中的数据显示,HER2T细胞依赖性双特异性抗体(HER2-TDB)与抗PD-L1免疫疗法的组合导致增强的对肿瘤生长的抑制,升高的响应率及持久的响应。发明人证明了组合两种免疫疗法的好处:T细胞活性的直接多克隆募集与抑制T细胞遏制性PD-1/PD-L1信号传导一起导致增强的且持久的长期响应。

[0059] 一方面,本文中提供的是用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的方法,组合物和用途,其包括施用有效量的人PD-1轴结合拮抗剂和抗HER2抗体。

[0060] 另一方面,本文中提供的是用于在具有癌症的个体中增强免疫功能的方法,组合物和用途,其包括施用有效量的人PD-1轴结合拮抗剂和抗HER2抗体。

[0061] I. 定义

[0062] 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。

[0063] 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。

[0064] 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。本文中提到的“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。

[0065] 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。

[0066] 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,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。

[0067] 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,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。在一个具体实施方案中,PD-1结合拮抗剂是本文所述MDX-1106(nivolumab)。在另一个具体实施方案中,PD-1结合拮抗剂是本文所述MK-3475(lambrolizumab)。在另一个具体实施方案中,PD-1结合拮抗剂是本文所述CT-011(pidilizumab)。在另一个具体方面,PD-1结合拮抗剂是本文所述AMP-224。

[0068] 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,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,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YW243.55.S70。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MPDL3280A。在仍有另一个具体方面,抗PD-L1抗体是本文所述MEDI4736。

[0069] 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。

[0070] 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。

[0071] 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。

[0072] 术语“无反应性”指源自经由T细胞受体投递的不完全或不充分信号(例如在缺乏ras活化的情况中胞内Ca⁺²增加)的对抗原刺激的无响应性状态。T细胞无反应性也可以在缺乏共刺激的情况中在用抗原刺激后发生,生成即使在共刺激的背景中对抗原的随后活化变得不感受的细胞。无响应性状态经常可以被白介素-2的存在超越。无反应性T细胞不经历克隆扩充和/或获得效应器功能。

[0073] 术语“耗竭”指作为源自在许多慢性感染和癌症期间发生的持续TCR信号传导的T细胞功能障碍状态的T细胞耗竭。它与无反应性的区别在于它不经由不完全或缺乏的信号传导,而是由于持续信号传导而发生。它以较差的效应器功能,持续的抑制性受体表达和与功能性效应或记忆T细胞的转录状态不同的转录状态限定。耗竭阻止感染和肿瘤的最佳控制。耗竭可以源自外在负调节途径(例如免疫调节细胞因子)及细胞固有负调节(共刺激)途径(PD-1,B7-H3,B7-H4,等等)二者。

[0074] “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%,200%。测量此增强的方式是本领域普通技术人员已知的。

[0075] “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。

[0076] “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。

[0077] “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轴结合拮抗剂和抗HER2抗体处理。

[0078] “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。

[0079] 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,且不含别的会对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。“药理学可接受”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。

[0080] 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”。

[0081] 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。

[0082] “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,和抗体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,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。

[0083] 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。

[0084] “病症”会为会受益于治疗/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。

[0085] 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。

[0086] “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”在本文中提到时并不互相排斥。

[0087] 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。癌症的例子包括但不限于癌，淋巴瘤，母细胞瘤，肉瘤和白血病或淋巴样恶性肿瘤。此类癌症的更具体例子包括但不限于鳞状细胞癌(例如上皮鳞状细胞癌)，肺癌(包括小细胞肺癌，非小细胞肺癌，肺的腺癌，和肺的鳞癌)，腹膜癌，肝细胞癌，胃癌(包括胃肠癌和胃肠基质癌)，胰腺癌，成胶质细胞瘤，宫颈癌，卵巢癌，肝癌，膀胱癌，尿道癌，肝瘤，乳腺癌，结肠癌，直肠癌，结肠直肠癌，子宫内膜癌或子宫癌，唾液腺癌，肾癌，前列腺癌，外阴癌，甲状腺癌，肝癌，肛门癌，阴茎癌，黑素瘤，浅表扩散性黑素瘤，恶性雀斑样痣黑素瘤，肢端黑素瘤，结节性黑素瘤，多发性骨髓瘤和B细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡性非何杰金氏淋巴瘤(NHL)，小淋巴细胞性(SL)NHL，中级/滤泡性NHL，中级弥漫性NHL，高级成免疫细胞性NHL，高级成淋巴细胞性NHL，高级小无核裂细胞性NHL，贮积病(bulky disease)NHL，套细胞淋巴瘤，AIDS相关淋巴瘤，和瓦尔登斯特伦氏(Waldenstrom)巨球蛋白血症)，慢性淋巴细胞性白血病(CLL)，急性成淋巴细胞性白血病(ALL)，毛细胞性白血病，慢性成髓细胞性白血病，和移植后淋巴增殖性病症(PTLD)，以及与癭痣病(phakomatoses)，水肿(诸如与脑瘤有关的)和梅格斯氏(Meigs)综合征有关的异常血管增殖，脑瘤和脑癌，以及头颈癌，及相关转移。在某些实施方案中，适合于通过本发明的抗体来治疗的癌症包括乳腺癌，结肠直肠癌，直肠癌，非小细胞肺癌，成胶质细胞瘤，非何杰金氏淋巴瘤(NHL)，肾细胞癌，前列腺癌，肝癌，胰腺癌，软组织肉瘤，卡波西(Kaposi)氏肉瘤，类癌(carcinoid carcinoma)，头颈癌，卵巢癌，间皮瘤，和多发性骨髓瘤。在一些实施方案中，癌症选自：小细胞肺癌，成胶质细胞瘤，成神经细胞瘤，黑素瘤，乳腺癌，胃癌，结肠直肠癌(CRC)，和肝细胞癌。还有，在一些实施方案中，癌症选自：非小细胞肺癌，结肠直肠癌，成胶质细胞瘤和乳腺癌，包括那些癌症的转移性形式。

[0088] 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，细胞毒剂是紫杉烷(taxane)。在一个实施方案中，紫杉烷是帕利他赛(paclitaxel)或多西他赛(docetaxel)。在一个实施方案中，细胞毒剂是铂剂。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，EGFR的拮抗剂是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))。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抑制剂维罗非尼(vemurafenib)。在一个实施方案中,细胞毒剂是PI3K抑制剂。

[0089] “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), Lonaframib(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(piposulfan); 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); callystatin; 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 1I 和加利车霉素 ω 1I (Angew Chem.Intl.Ed.Engl.1994,33:183-186); 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(epitiostanol), 美雄烷(mepitiothane), 睾内酯(testolactone); 抗肾上腺类, 诸如氨基葡萄糖(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(edatraxate); 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(mitoguanzone); 米托蒽醌(mitoxantrone); 莫哌达醇(mopidamnol); 二胺硝吡啶(nitraerine); 喷司他丁(pentostatin); 蛋氨酸芥(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(procarbazine); **PSK®** 多糖复合物(JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); 雷

佐生(razoxane);根霉素(rhizoxin);西索菲兰(sizofuran);螺旋锳(spirogermanium);细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid);三亚胺醌(triaziqune);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(verracurin)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");环磷酰胺(cyclophosphamide);塞替派(thiotepa);类紫杉醇(taxoids),例如泰素(TAXOL)(帕利他塞(paclitaxel);Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), **ABRAXANE®**(无克列莫佛(Cremophor)的),帕利他塞的清蛋白改造的纳米颗粒剂型(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.)和泰索帝(**TAXOTERE®**)(多西他塞(docetaxel, doxetaxel); Sanofi-Aventis);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);铂类似物,诸如顺铂(cisplatin)和卡铂(carboplatin);长春碱(vinblastine);依托泊苷(etoposide)(VP-16);异环磷酰胺(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。

[0090] 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),法偈唑(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I抑制剂,诸如LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH;和(ix)及任何上述药剂的药学可接受盐,酸和衍生物。

[0091] 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),tucusituzumab,umavizumab,乌珠单抗(urtoxazumab),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IgG λ 抗体。

[0092] 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,Mendelsohn等人)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 659,439A2,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)。

[0093] 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TK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-Lambers);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(WarnerLambert);W01996/30347(Pfizer, Inc);W01996/33978(Zeneca);W01996/3397(Zeneca)和W01996/33980(Zeneca)。

[0094] 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。

[0095] 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M1prime;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,P³²,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(querccetin),白藜芦醇(resveratrol),piceatannol,没食子酸表没食子儿茶精(epigallocatechine 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)。

[0096] 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。

[0097] “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。紫杉烷类(帕利他赛(paclitaxel)和多西他赛(docetaxel))是衍生自紫杉树的抗癌药。衍生自欧洲紫杉的多西他赛(**TAXOTERE®**, Rhone-Poulenc Rorer)是帕利他赛(**TAXOL®**, Bristol-Myers Squibb)的半合成类似物。帕利他赛和多西他赛促进由微管蛋白二聚体装配成微管并通过防止解聚使微管稳定,导致对细胞中有丝分裂的抑制。

[0098] “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))。

[0099] 用于治疗目的的“受试者”或“个体”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。优选地,哺乳动物为人。

[0100] 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。

[0101] “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。

[0102] “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。

[0103] 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 C_{L1} (或CL)域。

[0104] 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。

[0105] 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的细胞毒性中的参与。

[0106] 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 ”)。

[0107] 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。

[0108] 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。

[0109] 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。

[0110] “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。

[0111] “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。

[0112] 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。

[0113] “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,非共价结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”结构中相结合。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。

[0114] 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。

[0115] “单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的V_H和V_L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V_H与V_L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。

[0116] 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(V_H-V_L)中包含相连的重链可变域(V_H)和轻链可变域(V_L)。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)。

[0117] 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,选择过程可以是

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。

[0118] 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; WO1991/10741; 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 and Huszar, *Intern. Rev. Immunol.* 13:65-93(1995))。

[0119] 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。

[0120] 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。

[0121] “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刺激而生成抗体但其内源基因组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。

[0122] “物种依赖性抗体”指对来自第一哺乳动物物种的抗原的结合亲和力强于对来自第二哺乳动物物种的该抗原同系物的亲和力的抗体。通常,物种依赖性抗体“特异性结合”人抗原(例如结合亲和力(K_d)数值不超过大约 1×10^{-7} M,优选不超过大约 1×10^{-8} M,且优选不超过大约 1×10^{-9} M),但是对来自第二非人哺乳动物物种的该抗原同系物的结合亲和力比对人抗原的结合亲和力弱至少大约50倍,或至少大约500倍,或至少大约1000倍。物种依赖性抗体可以是上文所定义的各种类型抗体中的任一种,但是优选人源化抗体或人抗体。

[0123] 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)。

[0124] 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。

[0125]

环	Kabat	AbM	Chothia	接触
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (Kabat编号)

[0126]

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

[0127] 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。

[0128] “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。

[0129] 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编号序列对比同源区来确定。

[0130] 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IgG1EU抗体的残基编号方式。

[0131] 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。

[0132] 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。

[0133] II.PD-1轴结合拮抗剂

[0134] 本文中提供了用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的方法,其包括对个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和抗HER2抗体。本文中还提供了用于在具有癌症的个体中增强免疫功能的方法,其包括对个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和抗HER2抗体。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。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。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,Btdc,和PDL2。在一些实施方案中,PD-1,PD-L1,和PD-L2是人PD-1,PD-L1和PD-L2。

[0135] 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。

[0136] 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(nivolumab),MK-3475(lambrolizumab),和CT-011(pidilizumab)。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结合拮抗剂选自下组:YW243.55.S70,MPDL3280A,MDX-1105,和MEDI4736。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。Nivolumab,也称作MDX-1106-04,MDX-1106,ONO-4538,BMS-936558,和**OPDIVO®**,是一种在WO2006/121168中描述的抗PD-1抗体。Pembrolizumab,也称作MK-3475,Merck 3475,lambrolizumab,**KEYTRUDA®**,和SCH-900475,是一种在WO2009/114335中描述的抗PD-1抗体。CT-011,也称作hBAT,hBAT-1或pidilizumab,是一种在WO2009/101611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。

[0137] 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。

[0138] 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,WO2007/005874,WO2011/066389,和US2013/034559,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,可以与抗HER2抗体组合使用来治疗癌症。

[0139] 抗PD1抗体

[0140] 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-1106-04,0N0-4538,BMS-936558或Nivolumab。在一些实施方案中,抗PD-1抗体是Nivolumab(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:

[0141] (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:

[0142]

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWIYDGSKRYYADSVKGRFTISRDN SKN
TLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW
NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCPAPEFLGGP
SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLT VLVHQDWLN
GKEYKCKVSNKGLPSSIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK
TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL SLGK(SEQ ID NO:1),和

[0143] (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:

[0144]

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLT ISS
LEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:2)。

[0145] 抗PDL1抗体

[0146] 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CDR区,框架区和/或恒定区中。在一些实施方案中,抗体在CDR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PDL1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PDL1抗体结合人PD-L1。可用于本文所述方法的抗PDL1抗体的例子记载于PCT专利申请W02010/077634A1和US 8,217,149,其通过援引收入本文。

[0147] 在一些实施方案中,抗PDL1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PDL1抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,抗PDL1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PDL1抗体是人源化抗体。在一些实施方案中,抗PDL1抗体是人抗体。

[0148] W02010/077634A1和US 8,217,149中描述的抗PDL1抗体可用于本文所述方法。在一些实施方案中,抗PDL1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PDL1抗体,其包含重链和/或轻链序列,其中:

[0149] (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:

[0150]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKN
TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSA(SEQ ID NO:3),和

[0151] (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:

[0152]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAWAWYQQKPGKAPKLLIYSASFVSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
LQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR(SEQ ID NO:4)。

[0153] 在一个实施方案中,抗PDL1抗体含有重链可变区多肽,其包含HVR-H1,HVR-H2和HVR-H3序列,其中:

[0154] (a)HVR-H1序列是GFTFSX₁SWIH(SEQ ID NO:5);

[0155] (b)HVR-H2序列是AWIX₂PYGGSX₃YYADSVKG(SEQ ID NO:6);

[0156] (c)HVR-H3序列是RHWPGGFDY(SEQ ID NO:7);

[0157] 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。

[0158] 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:

[0159] HC-FR1是EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS(SEQ ID NO:8)

[0160] HC-FR2是WVRQAPGKGLEWV(SEQ ID NO:9)

[0161] HC-FR3是RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR(SEQ ID NO:10)HC-FR4是WGQGTLVTVSA(SEQ ID NO:11)。

[0162] 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:

[0163] (a)HVR-L1序列是RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A(SEQ ID NO:12);

[0164] (b)HVR-L2序列是SASX₉LX₁₀S(SEQ ID NO:13);

[0165] (c)HVR-L3序列是QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T(SEQ ID NO:14);

[0166] 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。

[0167] 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VL κ I共有框架。在又一个方面,至少一个框架序列如下:

[0168] LC-FR1是DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC(SEQ ID NO:15)

[0169] LC-FR2是WYQQKPGKAPKLLIY(SEQ ID NO:16)

[0170] LC-FR3是GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC(SEQ ID NO:17)

[0171] LC-FR4是FGQGTKVEIKR(SEQ ID NO:18)。

[0172] 在另一个实施方案中,提供了分离的抗PDL1抗体或抗原结合片段,其包含重链和轻链可变区序列,其中:

[0173] (a)重链包含HVR-H1,HVR-H2和HVR-H3,其中进一步:

[0174] (i)HVR-H1序列是GFTFSX₁SWIH(SEQ ID NO:5),

[0175] (ii)HVR-H2序列是AWIX₂PYGGSX₃YYADSVKG(SEQ ID NO:6)

[0176] (iii)HVR-H3序列是RHWPGGFDY(SEQ ID NO:7),且

[0177] (b)轻链包含HVR-L1,HVR-L2和HVR-L3,其中进一步:

[0178] (i)HVR-L1序列是RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A(SEQ ID NO:12),

[0179] (ii)HVR-L2序列是SASX₉LX₁₀S(SEQ ID NO:13),和

[0180] (iii)HVR-L3序列是QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T(SEQ ID NO:14)

[0181] 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。

[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),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,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

[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(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。

[0184] 在又一个实施方案中,提供了抗PDL1抗体,其包含重链和轻链可变区序列,其中:

[0185] (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

[0186] (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。

[0187] 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%。

[0188] 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,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。

[0189] 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。

[0190] 在又一个实施方案中,提供了分离的抗PDL1抗体,其包含重链和轻链可变区序列,其中:

[0191] (a)重链序列与下述重链序列具有至少85%序列同一性:

[0192]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRTISADTSKN
TAYLQMNSLR AEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGGTLTVTVSS(SEQ ID NO:25),和/或

[0193] (b)轻链序列与下述轻链序列具有至少85%序列同一性:

[0194]

DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFLTIS
LQPEDFATYYCQQYLYHPATFGGQTKVEIKR(SEQ ID NO:4)。

[0195] 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WGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:27)所列。

[0196] 在又一个方面,轻链框架序列自KabatκI,II,II或IV亚组序列衍生。在又一个方面,轻链框架序列是VLκI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。

[0197] 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。

[0198] 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:

[0199]

HC-FR1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS (SEQ ID NO:29)

HC-FR2 WVRQAPGKGGLEWVA (SEQ ID NO:30)

HC-FR3 RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:10)

HC-FR4 WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:27)。

[0200] 在又一个方面,轻链框架序列自KabatκI,II,II或IV亚组序列衍生。在又一个方面,轻链框架序列是VLκI共有框架。在又一个方面,一个或多个轻链框架序列如下:

[0201]

LC-FR1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:15)

LC-FR2 WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:16)

LC-FR3 GVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:17)

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PDL1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WGQGLTVTVSSASTK(SEQ ID NO:31)所列。

[0208] 在又一个方面,轻链框架序列自KabatκI,II,III或IV亚组序列衍生。在又一个方面,轻链框架序列是VLκI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PDL1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]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKN
TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSSASTK(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]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFRSGSGSGTDFTLTIS
LQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR(SEQ ID NO:4)。

[0214] 在一些实施方案中,提供分离的抗PDL1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PDL1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PDL1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PDL1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]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKN
TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(SEQ IDNO: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]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS
LQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVEIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:33)。

[0220] 在仍有又一个实施方案中，提供分离的抗PDL1抗体，其包含重链和轻链序列，其中：

[0221] (a)该重链序列与下述重链序列具有至少85%序列同一性：

[0222]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKN
TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK(SEQID NO:54)，
和/或

[0223] (b)该轻链序列与下述轻链序列具有至少85%序列同一性：

[0224]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS

LQPEDFATYYCQQYLYHPATFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:33)。

[0225] 在一些实施方案中,提供分离的抗PDL1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PDL1抗体,其包含重链和轻链序列,其中该重链序列与SEQ ID NO:32或54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PDL1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或54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。

[0226] 在一些实施方案中,分离的抗PDL1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。

[0227] 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。

[0228] 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PDL1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。

[0229] 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PDL1抗体或抗原结合片段。

[0230] III. 抗HER2抗体

[0231] 本文中提供的是一种用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的方法,其包括对该个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和抗HER2抗体。本文中还提供的一种在具有癌症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轴结合拮抗剂和抗HER2抗

体。

[0232] 本文中提供结合人表皮生长因子受体2(HER2)的抗体。“HER2”的备选名称包括ERBB2, Neu, CD340, 和p185。如本文中使用的, 术语“HER2”指来自任何人来源的任何天然HER2。该术语还涵盖“全长”和未加工的HER2以及源自细胞中加工的任何形式的HER2(例如成熟蛋白)。该术语还涵盖HER2的天然发生变体和同等型, 例如剪接变体或等位变体。例如, www.uniprot.org/uniprot/P04626提供了HER2和序列的描述。

[0233] 在一些实施方案中, 抗HER抗体结合HER2并抑制HER2+癌细胞的细胞增殖或生长。在一些实施方案中, 抗HER2抗体结合HER2并抑制HER2与其它HER受体的二聚化。在一些实施方案中, 抗HER2抗体是曲妥珠单抗或帕妥珠单抗。

[0234] 在一些实施方案中, 结合HER2的抗体的抗原结合域包含重链可变区(V_HHER2)和/或轻链可变区(V_LHER2), 该重链可变区(V_HHER2)包含下述氨基酸序列:

[0235]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN
TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSS(SEQ ID NO:34), 和/或

[0236] 该轻链可变区(V_LHER2)包含下述氨基酸序列:

[0237]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISS
LQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK(SEQ ID NO:35)。

[0238] 在一些实施方案中, 抗HER2抗体的重链包含下述氨基酸序列:

[0239]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRYADSVKGRFTISADTSKN
TAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPP
EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPP
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG(SEQ ID NO:
36), 和/或

[0240] 抗HER2抗体的轻链包含下述氨基酸序列:

[0241]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGRSGTDFTLTISS
LQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:37)。

[0242] 在一些实施方案中, 抗HER2抗体包含重链可变区和轻链可变区, 该重链可变区包含DTYIH(SEQ ID NO:38)的HVR-H1序列, RIYPTNGYTRYADSVKG(SEQ ID NO:50)的HVR-H2序列, 和WGGDGFYAMDY(SEQ ID NO:40)的HVR-H3序列, 该轻链可变区包含RASQDVNTAVA(SEQ ID NO:41)的HVR-L1序列, SASFLYS(SEQ ID NO:42)的HVR-L2序列, 和QQHYTTPPT(SEQ ID NO:43)的HVR-L3序列。

[0243] 双特异性抗体

[0244] 在一些实施方案中, 抗HER2是多特异性抗体或双特异性抗体。在一些实施方案中,

双特异性抗体包含结合HER2的第一抗原结合域和结合人CD3多肽的第二抗原结合域。

[0245] CD3(cluster of differentiation 3) T细胞共同受体是一种蛋白质复合物,而且由四条独特链构成。在哺乳动物中,该复合物含有一条CD3 γ 链,一条CD3 δ 链,和两条CD3 ϵ 链。这些链与T细胞受体(TCR)和 ζ -链联合以在T淋巴细胞中生成活化信号。TCR, ζ -链,和CD3分子一些形成TCR复合物。如本文中使用的,术语“CD3”指来自任何人来源的任何天然CD3。该术语还涵盖“全长”和未加工的蛋白质以及源自细胞中加工的任何形式的蛋白质或一种或多种CD3链(多肽)(例如成熟多肽)。该术语还涵盖CD3的天然发生变体和同等型,例如剪接变体或等位变体。例如, www.uniprot.org/uniprot/P04234, www.uniprot.org/uniprot/P07766, 和 www.uniprot.org/uniprot/P09693 提供了CD3 γ 链,CD3 δ 链,和CD3 ϵ 链和序列的描述。

[0246] 在一些实施方案中,双特异性抗体结合人CD3厄普西隆(CD3 ϵ)多肽。在一些实施方案中,双特异性抗体结合天然T细胞受体(TCR)复合物中与其它TCR亚基联合的人CD3厄普西隆多肽。在一些实施方案中,双特异性抗体结合人CD3伽马(CD3 γ)多肽。在一些实施方案中,双特异性抗体结合天然T细胞受体(TCR)复合物中与其它TCR亚基联合的人CD3伽马多肽。

[0247] 一方面,提供用于鉴定具有生物学活性的抗CD3抗体的测定法。生物学活性可以包括例如结合CD3多肽(例如T细胞表面上的CD3)或其肽片段,或是在体内,或是在体外,或是离体。在本发明的多特异性(例如双特异性)抗CD3抗体(例如具有一个抗HER2臂和另一个识别CD3多肽的臂的TDB抗体)的情况下,生物学活性还可以包括例如效应细胞活化(例如T细胞(例如CD8+和/或CD4+T细胞)活化),效应细胞群扩充(即T细胞计数升高),靶细胞群减少(即在它们的细胞表面上表达HER2的细胞群减少),和/或靶细胞杀伤。提供在体内和/或在体外具有此类生物学活性的抗体。在某些实施方案中,对本发明的抗体测试此类生物学活性。

[0248] 在一些实施方案中,双特异性抗体结合HER2的抗原结合域包含重链可变区(V_HHER2)和轻链可变区(V_LHER2),该重链可变区(V_HHER2)包含SEQ ID NO:34的氨基酸序列,该轻链可变区(V_LHER2)包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列。在一些实施方案中,结合HER2的抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含DTYIH(SEQ ID NO:38)的HVR-H1序列,RIYPTNGYTRYASDVKG(SEQ ID NO:39)的HVR-H2序列,和WGGDGFYAMDY(SEQ ID NO:40)的HVR-H3序列,该轻链可变区包含RASQDVNTAVA(SEQ ID NO:41)的HVR-L1序列,SASFLYS(SEQ ID NO:42)的HVR-L2序列,和QQHYTTPPT(SEQ ID NO:43)的HVR-L3序列。在一些实施方案中,结合HER2的抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含DTYIH(SEQ ID NO:38)的HVR-H1序列,RIYPTNGYTRYADSVKG(SEQ ID NO:50)的HVR-H2序列,和WGGDGFYAMDY(SEQ ID NO:40)的HVR-H3序列,该轻链可变区包含RASQDVNTAVA(SEQ ID NO:41)的HVR-L1序列,SASFLYS(SEQ ID NO:42)的HVR-L2序列,和QQHYTTPPT(SEQ ID NO:43)的HVR-L3序列。在一些实施方案中,结合HER2的抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含DTYIH(SEQ ID NO:38)的HVR-H1序列,RIYPTNGYTRYDPKFQD(SEQ ID NO:51)的HVR-H2序列,和WGGDGFYAMDY(SEQ ID NO:40)的HVR-H3序列,该轻链可变区包含KASQDVNTAVA(SEQ ID NO:52)的HVR-L1序列,SASFRYT(SEQ ID NO:53)的HVR-L2序列,和QQHYTTPPT(SEQ ID NO:43)的HVR-L3序列。

[0249] 在一些实施方案中,结合CD3的双特异性抗体的抗原结合域包含Zhu et al.,Int J Cancer 62:319-24,1995及Rodrigues et al.,Int J Cancer Suppl 7:45-50,1992中描述的重链可变区(V_HCD3)氨基酸序列和轻链可变区(V_LCD3)氨基酸序列。在一些实施方案中,结合CD3的抗原结合域包含重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包含GYTMN(SEQ ID NO:44)的HVR-H1序列,LINPYKGVSTYNQKFKD(SEQ ID NO:45)的HVR-H2序列,和SGYYGDSWYFDV(SEQ ID NO:46)的HVR-H3序列,该轻链可变区包含RASQDIRNYLN(SEQ ID NO:47)的HVR-L1序列,YTSRLES(SEQ ID NO:48)的HVR-L2序列,和QQGNTLPWT(SEQ ID NO:49)的HVR-L3序列。参见Rodrigues et al.,Int.J.Cancer:Supplement 7,45-50,1992中的抗体huxCD3v9的CDR序列。在一些实施方案中,结合人CD3多肽的抗原结合域包含W02004/106381,W02005/061547,W02007/042261,W02008/119567,及Rodrigues et al.,Int J Cancer Suppl 7:45-50,1992中描述的VH和VL序列。

[0250] 在一些实施方案中,双特异性抗体的第一抗原结合域包含一个或多个重链恒定域,其中该一个或多个重链恒定域选自第一CH1(CH₁₁)域,第一CH2(CH₂₁)域,和第一CH3(CH₃₁)域;且双特异性抗体的第二抗原结合域包含一个或多个重链恒定域,其中该一个或多个重链恒定域选自第二CH1(CH₁₂)域,第二CH2(CH₂₂)域,和第二CH3(CH₃₂)域。在一些实施方案中,该第一抗原结合域的一个或多个重链恒定域中至少一个与该第二抗原结合域的另一重链恒定域配对。在一些实施方案中,该CH₃₁和CH₃₂域各自包含隆起或空腔,且其中该CH₃₁域中的隆起或空腔分别可位于该CH₃₂域的空腔或隆起中。在一些实施方案中,该CH₃₁和CH₃₂域在所述隆起和空腔之间的界面处相遇。本文表2中显示了CH₃₁和CH₃₂域中的例示性氨基酸替代套组。在一些实施方案中,该CH₂₁和CH₂₂域各自包含隆起或空腔,且其中该CH₂₁域中的隆起或空腔分别可位于该CH₂₂域的空腔或隆起中。在一些实施方案中,该CH₂₁和CH₂₂域在所述隆起和空腔之间的界面处相遇。在一些实施方案中,IgG的CH₃₁和/或CH₃₂域含有一处或多处选自下组的残基处的氨基酸替代347,349,350,351,366,368,370,392,394,395,398,399,405,407,和409,依照美国专利No.8,216,805图5中所示氨基酸编号方式。在一些实施方案中,隆起包含一个或多个选自下组的引入残基:精氨酸(R)残基,苯丙氨酸(F)残基,酪氨酸(Y)残基,和色氨酸(W)残基。在一些实施方案中,空腔包含一个或多个选自下组的引入残基:丙氨酸(A)残基,丝氨酸(S)残基,苏氨酸(T)残基,和缬氨酸(V)残基。在一些实施方案中,CH3和/或CH2域来自IgG(例如IgG1亚型,IgG2亚型,IgG2A亚型,IgG2B亚型,IgG3亚型,或IgG4亚型)。在一些实施方案中,双特异性抗体的一个CH3域包含氨基酸替代T366Y,且另一个CH3域包含氨基酸替代Y407T。在一些实施方案中,一个CH3域包含氨基酸替代T366W,且另一个CH3域包含氨基酸替代Y407A。在一些实施方案中,一个CH3域包含氨基酸替代F405A,且另一个CH3域包含氨基酸替代T394W。在一些实施方案中,一个CH3域包含氨基酸替代T366Y和F405A,其另一个CH3域包含氨基酸替代T394W和Y407T。在一些实施方案中,一个CH3域包含氨基酸替代T366W和F405W,且另一个CH3域包含氨基酸替代T394S和Y407A。在一些实施方案中,一个CH3域包含氨基酸替代F405W和Y407A,且另一个CH3域包含氨基酸替代T366W和T394S。在一些实施方案中,一个CH3域包含氨基酸替代F405W,且另一个CH3域包含氨基酸替代T394S。突变通过原始残基,接着是使用Kabat编号系统的位置,然后是输入残基来表示。也参见美国专利No.8,216,805图5中的编号方式。

[0251] 在一些实施方案中,具有重链Fc区的双特异性抗体包含无糖基化位点突变。在一

些实施方案中,该无糖基化位点突变是替代突变。在一些实施方案中,该替代突变位于氨基酸残基N297,L234,L235,和/或D265(EU编号方式)。在一些实施方案中,该替代突变选自下组:N297G,N297A,L234A,L235A,和D265A。在一些实施方案中,该替代突变是D265A突变和N297G突变。在一些实施方案中,该无糖基化位点突变降低抗HER2抗体的效应器功能。

[0252] 在一些实施方案中,双特异性抗体是单链双特异性抗体,其包含第一抗原结合域和第二抗原结合域。在一些实施方案中,单链双特异性抗体包含选自下组的可变区,自N端至C端排列:

[0253] (1) V_HHER2-V_LHER2-V_HCD3-V_LCD3,

[0254] (2) V_HCD3-V_LCD3-V_HHER2-V_LHER2,

[0255] (3) V_HCD3-V_LCD3-V_LHER2-V_HHER2,

[0256] (4) V_HHER2-V_LHER2-V_LCD3-V_HCD3,

[0257] (5) V_LHER2-V_HHER2-V_HCD3-V_LCD3,或

[0258] (6) V_LCD3-V_HCD3-V_HHER2-V_LHER2。

[0259] IV. 抗体制备

[0260] 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。

[0261] 抗体针对感兴趣抗原(即PD-L1(诸如人PD-L1),HER2,或CD3(诸如人CD3))。优选地,该抗原是生物学上重要的多肽,而且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。

[0262] 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)。

[0263] 在一个实施方案中,Kd是通过如下述测定法所述用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 $^{\circ}\text{C}$)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 μl /孔闪烁液(MICROSCINT-20™;Packard),然后在TOPCOUNT™伽马计数仪(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。

[0264] 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 $^{\circ}\text{C}$ 使用固定化抗原CM5芯片在约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 (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 $^{\circ}$ C以大约25 μ l/分钟的流速注入在含0.05%聚山梨酯20(TWEEN-20TM)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(K_d)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-AMINCOTM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 $^{\circ}$ C的荧光发射强度(激发=295nm; 发射=340nm, 16nm带通)的升高或降低。

[0265] (i) 抗原制备

[0266] 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。

[0267] (ii) 某些基于抗体的方法

[0268] 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, 例如匙孔虫凝集素, 血清清蛋白, 牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂。

[0269] 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。

[0270] 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)。

[0271] 关于各种其它杂交瘤技术,参见例如US 2006/258841;US 2006/183887(完全人的抗体);US 2006/059575;US 2005/287149;US 2005/100546;US2005/026229;和U.S.Pat.Nos.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,Mont.),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。

[0272] 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))。

[0273] 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,氨基喋呤和胸苷(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)。

[0274] 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。

[0275] 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可通过例如Scatchard分析来测定。参见例如Munson et al.,Anal.Biochem.107:220(1980)。

[0276] 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US2005/176122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。

[0277] (iii)文库衍生的抗体

[0278] 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,诸如实施例3中描述的方法。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)。

[0279] 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下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。

[0280] 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。

[0281] (iv)嵌合抗体,人源化抗体和人抗体

[0282] 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。

[0283] 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。

[0284] 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.,Nature332:323-329(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.,Methods36:61-68(2005)及Klimka et al.,Br.J.Cancer 83:252-260(2000)(记载FR改组的“引导选择”办法)。

[0285] 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))。

[0286] 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)。

[0287] 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-MOUSE®技术,和美国专利申请公开文本No.US2007/0061900,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。

[0288] 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)。

[0289] 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人抗体的技术。

[0290] (v)抗体片段

[0291] 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。

[0292] 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W0 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。

[0293] (vi)多特异性抗体

[0294] 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)。

[0295] 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(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W093/08829及Traunecker et al.,EMBO J.,10:3655-3659(1991)。

[0296] 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。

[0297] 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。

[0298] 表1:氨基酸残基的特性

[0299]

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)
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
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

[0300] ^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。

[0301] ^b数值来自A.A.Zamyatnin, Prog. Biophys. Mol. Biol. 24:107-123, 1972。

[0302] ^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。

[0303] 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。

[0304] 表2:对应节和穴形成突变的例示性套组

[0305]

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

[0306] 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。

[0307] 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。

[0308] 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。

[0309] 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。

[0310] 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W094/04690。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)。

[0311] 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CH3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。

[0312] 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。

[0313] 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。

[0314] 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。

[0315] 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)。

[0316] 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。

[0317] 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。

[0318] 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。Tuft et al., J. Immunol., 147:60(1991)。

[0319] (vii)单域抗体

[0320] 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. 6,248,516B1)。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。

[0321] (viii)抗体变体

[0322] 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。

[0323] (ix)替代,插入,和删除变体

[0324] 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。保守替代在表1中在“保守的替代”的标题下显示。更实质的变化在表1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。

[0325] 表3:例示性替代

[0326]

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
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile

[0327]

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

[0328] 依照共同的侧链特性,氨基酸可以如下分组:

[0329] a.疏水性的:正亮氨酸, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0330] b.中性,亲水性的: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0331] c.酸性的: Asp, Glu;

[0332] d.碱性的: His, Lys, Arg;

[0333] e.影响链取向的残基: Gly, Pro;

[0334] f.芳香族的: Trp, Tyr, Phe。

[0335] 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。

[0336] 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和力成熟技术诸如本文中所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)。

[0337] 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。

[0338] 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。

[0339] 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。

[0340] 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。

[0341] (x)糖基化变体

[0342] 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。

[0343] 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。

[0344] 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;WO2001/29246;US 2003/0115614;US 2002/0164328;US 2004/0093621;US2004/0132140;US 2004/0110704;US 2004/0110282;US 2004/0109865;WO2003/085119;WO 2003/084570;WO 2005/035586;WO 2005/035778;WO2005/053742;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Lec13CHO细胞(Ripka et al.,Arch.Biochem.Biophys.249:533-545(1986);美国专利申请No US 2003/0157108A1,Presta,L;及WO 2004/056312A1,Adams等,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)。

[0345] 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(Jean-Mairet等);美国专利No.6,602,684(Umana等);US 2005/0123546(Umana等);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(Patel等);WO 1998/58964(Raju,S.);及WO 1999/22764(Raju,S.)。

[0346] 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。

[0347] (xi)Fc区变体

[0348] 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IgG4Fc区)。

[0349] 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,I.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,M.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CytoTox96[®]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WO 2006/029879和WO2005/100402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,M.S.et al.,Blood 101:1045-1052(2003);及Cragg,M.S.and M.J.Glennie,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,S.B.et al.,Int'l.Immunol.18(12):1759-1769(2006))。

[0350] 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)。

[0351] 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;WO 2004/056312;及Shields et al.,J.Biol.Chem.9(2):6591-6604(2001))。

[0352] 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。

[0353] 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;WO 99/51642;及Idusogie et al.,J.Immunol.164:4178-4184(2000)的。

[0354] 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 2005/0014934A1(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。

[0355] (xii)抗体衍生物

[0356] 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。

[0357] (xiii)载体,宿主细胞,和重组方法

[0358] 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。

[0359] (a)信号序列构件

[0360] 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。

[0361] (b)复制起点

[0362] 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)。

[0363] (c)选择基因构件

[0364] 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。

[0365] 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。

[0366] 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。

[0367] 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)。

[0368] 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。

[0369] 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。

[0370] 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)。

[0371] 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)。还披露了适用于通过克鲁维氏酵母属的工业菌株分

泌成熟重组人血清清蛋白的稳定多拷贝表达载体。Fleer et al., Bio/Technology 9:968-975(1991)。

[0372] (d) 启动子构件

[0373] 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。

[0374] 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。

[0375] 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。

[0376] 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。

[0377] 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。

[0378] 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。

[0379] (e) 增强子元件构件

[0380] 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。

[0381] (f)转录终止构件

[0382] 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。

[0383] (g)宿主细胞的选择和转化

[0384] 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 marcescens*),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(ATCC31,446),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。

[0385] 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。

[0386] 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 *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)。

[0387] 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。

[0388] 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。

[0389] 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)。

[0390] 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 CRL1442);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。

[0391] 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。

[0392] (h)培养宿主细胞

[0393] 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),和葡萄糖或等效能源。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。

[0394] (xiv)抗体的纯化

[0395] 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/Technology10:163-167(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。

[0396] 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CH3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。

[0397] 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。

[0398] C.选择生物学活性抗体

[0399] 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)。

[0400] 例如,对于抗PDL1抗体,可以在检测结合PDL1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。

[0401] 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。

[0402] D. 药物组合物和配制剂

[0403] 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-L1抗体,抗HER2抗体,或结合HER2和CD3的双特异性抗体)和药学可接受载剂的药物组合物和配制剂。

[0404] 可以通过混合具有期望纯度的活性组分(诸如抗体或多肽)和/或抗HER2抗体与一种或多种任选的药学可接受载体(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。

[0405] 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。在一些实施方案中,本文所述抗PDL1抗体在配制剂中,该配制剂包含浓度为约60mg/mL的抗体,浓度为约20mM的组氨酸乙酸酯,浓度为约120mM的蔗糖,和浓度为0.04%(w/v)的聚山梨酯(例如聚山梨酯20),而且该配制剂具有约5.8的pH。在一些实施方案中,本文所述抗PDL1抗体在配制剂中,该配制剂包含浓度为约125mg/mL的抗体,浓度为约20mM的组氨酸乙酸酯,浓度为约240mM的蔗糖,和浓度为0.02%(w/v)的聚山梨酯(例如聚山梨酯20),而且该配制剂具有约5.5的pH。在一些实施方案中,本文所述抗HER2抗体在配制剂中,该配制剂

包含抗体, α , α -海藻糖二水合物, L-组氨酸HCl缓冲液, L-组氨酸和聚山梨酯。在一些实施方案中, 本文所述抗HER2抗体在配制剂中, 该配制剂包含浓度为约 22 ± 2 mg/mL的抗体, 浓度为约4.4 mM的组氨酸, 浓度为约54 mM的海藻糖, 和浓度为约0.009%的聚山梨酯20, 而且该配制剂具有约6.0的pH。

[0406] 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。

[0407] 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)。

[0408] 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。

[0409] IV. 治疗方法

[0410] 本文中提供用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的方法, 其包括对该个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和抗HER2抗体。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。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癌症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轴结合拮抗剂和抗HER2抗体。方法中可以使用本领域已知的或本文中描述的任何PD-1轴结合拮抗剂和抗HER2抗体。

[0411] 在一些实施方案中, 个体是人。在一些实施方案中, 该个体具有HER-2阳性癌症。在一些实施方案中, HER-2阳性癌症是乳腺癌, 肺癌, 卵巢癌, 胃癌, 膀胱癌, 胰腺癌, 子宫内膜癌, 结肠癌, 肾癌, 食道癌, 或前列腺癌。在一些实施方案中, 该乳腺癌是乳腺癌瘤或乳腺腺癌。在一些实施方案中, 该乳腺癌瘤是侵入性导管癌。在一些实施方案中, 该肺癌是肺腺癌。在一些实施方案中, 该结肠癌是结直肠癌。在一些实施方案中, 该个体中的癌细胞表达PD-L1。在一些实施方案中, 该个体中的癌细胞以可检测的水平(例如使用本领域已知方法可检测)表达HER-2蛋白质。

[0412] 在一些实施方案中, 个体在PD-1轴结合拮抗剂和抗HER2抗体组合治疗之前已经用HER2靶向疗法治疗。在一些实施方案中, 该HER2靶向疗法包括用一种或多种抗体治疗, 例如曲妥珠单抗或帕妥珠单抗。在一些实施方案中, 该HER2靶向疗法包括用一种或多种抗体-药物缀合物治疗, 例如ado-trastuzumab emtansine(KADCYLA®, Genentech)。在一些实施方案中, 该HER2靶向疗法包括用一种或多种小分子治疗, 例如拉帕替尼。在一些实施方案中, 个体具有对一种或多种HER2靶向疗法有抗性的癌症。在一些实施方案中, 对HER2靶向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HER2靶向疗法的抗性包括用HER2靶向疗法治疗期间癌症的进展。在一些实施方案中, 对HER2靶向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。

[0413] 在一些实施方案中,本发明的组合疗法包括施用PD-1轴结合拮抗剂和抗HER2抗体。可以以本领域已知的任何合适方式施用PD-1轴结合拮抗剂和抗HER2抗体。例如,可以序贯(在不同时间)或并行(在相同时间)施用PD-1轴结合拮抗剂和抗HER2抗体。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂与抗HER2抗体在分开的组合物中。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂与抗HER2抗体在相同的组合物中。

[0414] 可以通过相同施用路径或通过不同施用路径来施用PD-1轴结合拮抗剂和抗HER2抗体。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,或鼻内施用抗HER2抗体。可以施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和抗HER2抗体来预防或治疗疾病。可以基于要治疗的疾病的类型,PD-1轴结合拮抗剂和抗HER2抗体的类型,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/或抗HER2抗体的适宜剂量。

[0415] 作为一般性建议,施用于人的抗体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,使用的抗体是例如每天施用约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。在一些实施方案中,以15mg/kg施用抗体。然而,其它剂量方案可能是有用的。在一个实施方案中,在21天周期的第1天以约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或约1400mg的剂量将本文所述抗PDL1抗体施用于人。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。此疗法的进展易于通过常规技术来监测。

[0416] 在一些实施方案中,方法可以进一步包括别的疗法。别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。别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,别的疗法是施用小分子酶抑制剂或抗代谢剂。在一些实施方案中,别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,别的疗法是放射疗法。在一些实施方案中,别的疗法是手术。在一些实施方案中,别的疗法是放射疗法和手术的组合。在一些实施方案中,别的疗法是 γ 照射。在一些实施方案中,别的疗法是靶向PI3K/AKT/mTOR途径的疗法,HSP90抑制剂,微管蛋白抑制剂,凋亡抑制剂,和/或化学预防剂。别的疗法可以是一种或多种本文所述化疗剂。

[0417] 其它组合疗法

[0418] 本文中还提供用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的方法,其包括与其它抗癌剂或癌症疗法联合对该个体施用人PD-1轴结合拮抗剂。在本文所述实施方案中,该方法可进一步包括施用本文所述抗HER2抗体来治疗HER2阳性癌症。

[0419] 在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂可以与化学疗法或化学治疗剂联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂可以与放射疗法或放射治疗剂联合施用。在一些实

施方案中,PD-1轴结合拮抗剂可以与靶向疗法或靶向治疗剂联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂可以与免疫疗法或免疫治疗剂(例如单克隆抗体)联合施用。

[0420] 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。

[0421] 在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂可以与针对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)(例如阻断性抗体)的拮抗剂联合施用。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。

[0422] 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。

[0423] 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轴结合拮抗剂可以与针对吡哆胺-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)。

[0424] 在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂可以与抗体-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轴结合拮抗剂可以与DMUC5754A联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂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。

[0425] 在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂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轴结合拮抗剂可以与MEDI3617联合施用。

[0426] 在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂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轴结合拮抗剂可以与GM-CSF(也称作重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子,rhu GM-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。

[0427] 在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂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轴结合拮抗剂可以与HMGB1联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂可以与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轴结合拮抗剂可以与选择蛋白激动剂联合施用。

[0428] 在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂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轴结合拮抗剂可以与BKM120联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂可以与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轴结合拮抗剂可以与MK2206联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂可以与GSK690693联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂可以与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轴结合拮抗剂可以与AZD8055联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂可以与INK128联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂可以与双重PI3K/mTOR抑制剂联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂可以与XL765联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂可以与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轴结合拮抗剂可以与BGT226联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂可以与GSK2126458联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂可以与PF-04691502联合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂可以与PF-05212384(也称作PKI-587)联合施用。

[0429] V. 制品或试剂盒

[0430] 在本发明的另一个实施方案中,提供包含PD-1轴结合拮抗剂和/或抗HER2抗体的

制品或试剂盒。在一些实施方案中,该制品或试剂盒进一步包含包含说明书的包装插页,该说明书关于与抗HER2抗体联合使用该PD-1轴结合拮抗剂来在个体中治疗癌症或延迟癌症进展或增强具有癌症的个体的免疫功能。该制品或试剂盒中可以包括本文所述任何PD-1轴结合拮抗剂和/或抗HER抗体。

[0431] 在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和抗HER2抗体在同一容器中或在分开的容器中。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hastelloy)。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,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别的药剂(例如化疗剂和抗肿瘤剂)。对于所述一种或多种别的药剂合适的容器包括例如瓶,管形瓶,袋和注射器。

[0432] 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。通过述及将本文中引用的所有出版物,专利,和专利申请完整收入本文,用于所有目的。

实施例

[0433] 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。

[0434] 实施例1:用于治疗HER2阳性癌症的HER2T细胞依赖性双特异性抗体(HER2-TDB)

[0435] 基于阻断免疫遏制机制来恢复T细胞功能的肿瘤免疫疗法最近在临床上的成就,对T细胞靶向疗法的临床开发有着深远的兴趣。为了达到这项需求,本文中描述了基于曲妥单抗的HER2T细胞依赖性双特异性抗体(HER2-TDB)。这种全长人IgG型式双特异性抗体在低皮摩尔浓度条件性活化T细胞,导致表达HER2的癌细胞裂解。重要的是,HER2-TDB能够消除对当前批准的HER2疗法不应有的细胞。使用包括MMTV-huHER2和huCD3转基因小鼠在内的四种模型系统证明了HER2-TDB有力的抗肿瘤活性。这些结果证明了PD-L1表达对双特异性T细胞募集性抗体的活性的抑制效果。这种抗性机制通过抗PD-L1抗体治疗得到逆转,而且HER2-TDB和抗PD-L1免疫疗法的组合导致增强的肿瘤生长抑制,升高的响应率和持久的响应。

[0436] 材料和方法

[0437] 抗体表达和纯化

[0438] HER2huIgG1TDB的‘节’臂是人源化的抗HER2 4D5(曲妥单抗)(Carter et al., Proc Natl Acad Sci USA, 89:4285-9, 1992),而‘穴’臂是人源化的抗CD3UCHT1.v9(Zhu et al., Int J Cancer, 62:319-24, 1995)。huIgG1双特异性抗体是通过更早描述的两种不同办法生成的(Spiess et al., Nat Biotechnol., 2013):共培养表达两种抗体臂中每一种的细菌,或分开表达每一种臂,然后在体外将它们退火。

[0439] 为了避免针对TDB的免疫应答,在免疫胜任小鼠的实验中使用鼠IgG2a同种型HER2-TDB。为了作为muIgG2a的表达,在Fc区中导入等价的节-入-穴突变(Atwell et al., J Mol Biol., 270:26-35, 1997),以及D265A和N297G(EU编号方式)以消除效应器功能。在muIgG2a HER2-TDB中,“节”臂是鼠抗HER2 4D5,而“穴”是嵌合抗鼠CD3 2C11(Leo et al., Proc Natl Acad Sci USA, 84:1374-8, 1987)(4D5/2C11-TDB)或小鼠抗hu CD3SP34(Pessano et al., The EMBO journal, 4:337-44, 1985)(4D5/SP34-TDB)。在CHO细胞中表达muIgG2a双特异性抗体,并通过体外组装来组装。如别处所述(Speiss et al., Nat Biotechnol 31:753-8, 2013)通过疏水性相互作用层析(HIC)自污染物纯化双特异性抗体。使用Endosafe®便携式测试系统(Charles River, USA)对所得材料分析内毒素水平,而且在需要时,通过用0.1% Triton X-114清洗蛋白质来降低内毒素含量。

[0440] 抗体表征

[0441] 如之前所述(Jackman et al., The Journal of biological chemistry, 285: 20850-9, 2010)通过质谱术(LC-ESI/TOF)分析双特异性抗体的分子量。还使用Agilent 1, 100HPLC系统(Agilent Technologies, USA)在Zenix™ SEC-300柱(Sepax Technologies, USA)中通过分析性大小排阻层析分析抗体。通过电泳使用2100Bioanalyzer和Protein 230芯片(Agilent Technologies)量化残留抗体片段的存在。

[0442] HER2-TDB亲和力

[0443] 别处详细描述了竞争性Scatchard测定法(Ramirez-Carrozzi et al., Nature immunology, 12:1159-66, 2011)。

[0444] 乳腺癌细胞增殖

[0445] 使用CellTiter-Glo®发光细胞存活力测定法(Promega, Madison, WI)检测乳腺癌细胞增殖/存活力。为了测定法,在96孔板中分配 5×10^3 个细胞/孔,并温育过夜,从而在处理之前实现细胞贴壁。

[0446] 血细胞分级

[0447] 使用淋巴细胞分离介质(MP biomedical, Solon, OH)自健康志愿者的血液分出PBMC。使用人CD8+分离试剂盒(Miltenyi, #130-094-156)通过负选择自PBMC提取CD8+细胞。使用CD3+微珠(Miltenyi, #130-050-101)进行CD3+消减。

[0448] 体外细胞毒性测定法(体外ADCC, T细胞杀伤)

[0449] 如先前所述(Junttila et al., Cancer Res., 70:4481-9, 2010)实施体外细胞毒性测定法(细胞毒性检测试剂盒;LDH;Roche, Mannheim, Germany)。或者,通过流式细胞术监测体外细胞毒性。用CFSE(Invitrogen, #C34554)标记靶细胞。在有或无TDB的情况下混合已标记的靶细胞和CD8+细胞达4-26小时。在温育结束时,用胰蛋白酶提起细胞,并自板收集。在等体积的PBS+2% FBS+1mM EDTA+碘化丙啶(PI)中重悬浮细胞。以自动型式在FACSCalibur上进行流式细胞术分析。通过对CFSE+/PI阴性细胞的门控对活的靶细胞数目计数。如下计算细胞毒性百分比:%细胞毒性(没有TDB时活的靶细胞数目-有TDB时活的靶细胞数目)/(没有TDB时活的靶细胞数目) $\times 100$ 。

[0450] T细胞活化的分析

[0451] 用CD8-FITC(BD Bioscience, 555634), CD69-PE(BD Bioscience, 555531)和CD107a-Alexa-Fluor647(eBioscience, 51-1079)对细胞染色。或者,用Cytofix/CytoPerm™

溶液(BD Bioscience, 554722)固定并透化细胞,并用抗粒酶B-Alexa-Fluor647(BD Bioscience, 560212)染色。

[0452] 可溶性粒酶和穿孔蛋白的检测

[0453] 通过ELISA依照制造商的方案自生长培养基检测可溶性穿孔蛋白(Cell Sciences),粒酶A和粒酶B(eBioscience)。

[0454] PD-1诱导和PD-L1表达对TDB活性的影响

[0455] 将来自人外周血的纯化后的CD8+T细胞用100ug/ml HER2-TDB和SKBR3细胞(3:1比率)引发24小时。24小时温育后,将细胞团粒用非酶细胞解离溶液(Sigma, #C5789)于37℃消化10分钟,并使用人CD8+微珠(Miltenyi, #130-045-201)回收CD8+T细胞。使用引发后的CD8+T细胞进行体外细胞毒性测定法。在平底96孔板中,在HER2-TDB和抗PD-L1抗体(克隆6E11, mIgG2A, D265A和N297A)存在或缺失下将CFSE标记的293细胞或293-PDL1细胞与引发后的效应细胞以3:1比率混合。24小时后,通过流式细胞术对活的CFSE+靶细胞计数,由此测量细胞毒性。

[0456] 大鼠中的药动学(PK)研究

[0457] 将8只大鼠(n=4/组)随机化入2个剂量组,接受单次静脉内(IV)推注HER2-TDB或曲妥珠单抗(10mg/kg)。在直至给药后35天的时间点自每组4只大鼠采集样品。经由颈静脉收集大约0.2mL全血(在CO₂/O₂麻醉下)。容许样品凝结,并在冷藏下离心(5℃, 10分钟, 2000xg)以获得血清。通过ELISA对血清样品测定人IgG,其中使用包被至微量滴定板的驴抗huFc来捕捉循环中的人源化的抗HER2抗体,并使用山羊抗huFc-HRP(吸附了小鼠的)进行检测。使用WinNonlin®, 5.2.1版(Pharsight Corp., Mountain View, CA)用两隔室方法(模型7)确定PK参数。

[0458] 体内功效

[0459] 细胞接种前1至3天,在肿瘤接种的对侧,给NOD/SCID小鼠(NOD.CB17-Prkdcscid/J, Jackson Labs West)皮下植入0.36mg, 60天持续释放雌激素药丸(Innovative Research of America)。在第0天,在右侧2/3乳房脂肪垫中接种HBSS-matrigel中的5x 10⁶个MCF7neo/HER2和10x 10⁶个非活化的人PBMC。接种后2小时施用第一次处理。每周一次静脉内尾静脉注射施用所有处理,总共3剂。

[0460] MMTV-huHER2转基因小鼠先前已有描述(Finkle et al., Clinical Cancer Research 10:2499-511, 2004)。为了同基因肿瘤的实验,给Balb/c或人CD3ε转基因小鼠(de la Hera et al., J Exp Med., 173:7-17, 1991)皮下注射0.1x 10⁶个CT26-HER2细胞。图例中指示了具有已建立的肿瘤的小鼠的处理。为了避免针对TDB的免疫应答,在免疫胜任小鼠的实验中使用鼠IgG2A型式的HER2-TDB。使用抗PD-L1抗体克隆25A1(mIgG2A, D265A和N297A)进行PD-L1治疗性阻断。

[0461] 结果

[0462] 使用节-入-穴技术的全长HER2-CD3双特异性抗体(HER2-TDB)的生成和纯化

[0463] 使用节-入-穴策略(Jefferis, Trends in pharmacological sciences, 30:356-62, 2009)生成HER2-TDB(图1A)。在分开的大肠杆菌培养物中表达抗CD3臂(UCHT1.v9;穴)和抗HER2臂(4D5;曲妥珠单抗;节),或者共培养(图1B)。在蛋白A上分离完全组装的抗体,然后通过疏水性相互作用层析自抗体片段纯化。大小排阻层析显示出很低水平的聚集(图1C, <

0.2%至0.9%),而且质谱术分析显示出与异二聚体对应的主要质量解卷积峰和缺失显著量的两种同二聚体任一(图1D)。这些结果证明了使用标准表达和纯化方法能有效生成高质量HER2-TDB。

[0464] HER2-TDB的T细胞不依赖性特性

[0465] 与曲妥珠单抗不同,HER2-TDB是单价的,而且是在大肠杆菌中生成的。比较HER2-TDB的T细胞不依赖性特性与曲妥珠单抗和曲妥珠单抗-Fab片段(图1E-F)。根据Scatchard分析,HER2-TDB的靶标臂结合亲和力($K_D=5.4\text{nM}$,图1E)与单价曲妥珠单抗Fab($K_D=3.9\text{nM}$)相似切低于二价曲妥珠单抗对HER2的亲和力($K_D=0.7\text{nM}$)。CD3臂对Jurkat细胞的结合亲和力的 K_D 为4.7nM(未显示)。HER2-TDB直接抑制SKBR3增殖的能力与二价曲妥珠单抗相比降低(图1F)。在大肠杆菌中生成的抗体不是糖基化的,这导致Fc γ R结合受损,Fc γ R结合是介导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)所需要的(Jefferis,Trends in pharmacological sciences,30:356-62,2009;Simmons et al.,Journal of immunological methods,263:133-47,2002)。大肠杆菌生成的曲妥珠单抗和HER2TDB不能诱导NK细胞介导的ADCC(图1G)。

[0466] 靶标依赖性T细胞活化和细胞毒性

[0467] 当CD8+细胞与HER2-TDB或不表达人HER2的靶细胞(BJAB细胞)一起温育时,没有检测到T细胞活化(图2A)。当使用HER2+SKBR3细胞作为靶标时,看到稳健的T细胞活化,伴有细胞毒性颗粒的释放。通过ELISA在生长培养基中检测到可溶性穿孔蛋白,粒酶A和B(图2B),但是只在反应中包括所有关键成分(HER2-TDB,T细胞,表达HER2的细胞)时。颗粒胞吐与显著的HER2-TDB诱导的胱天蛋白酶3/7活性,凋亡和细胞毒性(乳酸脱氢酶(LDH)释放)升高重合(图2C)。

[0468] 没有检测到对载体转染的3T3细胞的杀伤(图2D);与之对比,HER2转染的3T3细胞受到非常有效的杀伤。对杀伤测定法添加HER2-ECD或曲妥珠单抗Fab有效抑制杀伤活性(图2E)。为了确认杀伤的T细胞依赖性,自PBMC消减CD3+细胞(图2F)。消减导致靶细胞杀伤活性丧失。

[0469] HER2-TDB诱导的T细胞活化和杀伤的动力学

[0470] T细胞活化的早期迹象(CD69)在HER2-TDB处理开始后4小时出现(图3A)。然而,稍后在24小时时间点检测到晚期活化标志物(细胞外CD107a)。T细胞活化反映为杀伤HER2+乳腺癌细胞(图3A)。在4-12小时没有检测到显著的杀伤活性。在24小时时检测到稳健的杀伤,而且杀伤活性随时间升高。

[0471] HER2-TDB诱导T细胞增殖

[0472] 细胞毒性通过效应细胞滴定而显著降低(图3B)。然而,甚至在 $\leq 1:1$ 的E:T比率,仍检测到弱的LDH信号和稳健的T细胞活化。为了调查HER2-TDB是否诱导T细胞增殖,共培养CD8+T细胞,靶细胞(SKBR3)和0.1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ HER2-TDB,接着是在靶细胞和HER2-TDB缺失下的T细胞培养。3天后,75%用TDB和靶细胞脉冲的T细胞经历了细胞分裂(图4),然而细胞数没有升高。给生长培养基补充IL-2(20ng/ml)对CD8+细胞提供存活信号,而且在T细胞中检测到稳健的T细胞增殖,但是只在它们暴露于HER2-TDB和靶细胞二者时(图4)。

[0473] HER2-TDB活性与靶细胞HER2表达水平有关

[0474] 为了调查靶标拷贝数和TDB活性之间的相关性,选择了具有的预测定的细胞膜上的HER2受体数目的一组癌细胞系(图5A和E,(Aguilar et al.,Oncogene,18:6050-62,

1999))。HER2扩增/过表达细胞系对TDB介导的杀伤显著更加敏感($p=0.015$, t检验),而且在飞(10^{-15})摩尔至低皮(10^{-12})摩尔浓度有效裂解($EC_{50}=0.8-3\text{pM}$;图5B)。表达低水平HER2的细胞系对HER2-TDB抗体显著不太敏感($EC_{50}=33-51\text{pM}$)。低至<1000拷贝的靶抗原足以支持T细胞杀伤。

[0475] 接着,在同一杀伤测定中共靶向MCF7(低HER2表达)或BJAB细胞(无HER2表达)与HER2扩增的SKBR3细胞。在SKBR3杀伤的 EC_{50} 检测不到MCF7细胞杀伤(图5C)。在任何HER2-TDB浓度检测不到显著的BJAB细胞杀伤(图5D)。

[0476] 很低的靶标占据对于TDB活性是足够的

[0477] 使用公式 $[D]/[D]+K_D$ (其中 D =药物且HER2-TDB的 K_D 为 5.4nM)计算HER2-TDB的 EC_{50} 时的HER2占据。在所有测试的细胞系中,不到1%靶标占据对于有效杀伤是足够的(图5E),而且在高HER2表达细胞系的情况中,所需要的占据甚至更低($0.01-0.05\%$)。在低表达细胞系中,在 EC_{50} 时结合至HER2的TDB的计算绝对数低至10-150。这些结果展示了HER2-TDB的极端效力,而且与TCR触发的研究一致,该研究提示触发T细胞应答需要卷入少至1-25个TCR(Irvine et al., Nature, 419:845-9, 2002; Purbhoo et al., Nature immunology, 5:524-30, 2004; Sykulev et al., Immunity, 4:565-71, 1996)。

[0478] HER2-TDB有效杀伤对抗HER2疗法不应有的HER2+癌细胞

[0479] 接着,检查先前已经显示表达高水平HER2但在体外对曲妥珠单抗和拉帕替尼的直接细胞效应不敏感的细胞系(Junttila et al., Cancer Cell, 15:429-40, 2009; Junttila et al., Breast Cancer Res Treat, 2010)。对于一些细胞系,PI3K催化亚基(KPL4, HCC202)中的获得性活化性突变或PTEN丧失(HCC1596)所致PI3K途径活化可引起抗性。细胞系对T-DM1的敏感性先前已有报告(Junttila et al., Breast Cancer Res Treat, 2010; Lewis Phillips et al., Cancer Res., 68:9280-90, 2008)。HER2-TDB介导的杀伤的 EC_{50} 在飞摩尔或低皮摩尔范围中(图6A)。另外,HER2-TDB有效杀伤HER2+肺癌细胞。使用两种独立细胞系模型(BT474, 图6B-C; KPL-4, 未显示),所获得的对T-DM1的抗性不影响对HER2-TDB的敏感性。

[0480] HER2-TDB在大鼠中的药理学

[0481] 为了评估HER2-TDB的药理学(PK)概况,对Sprague-Dawley大鼠施用单剂静脉内(IV)10mg/kg HER2-TDB或曲妥珠单抗。HER2-TDB不与大鼠CD3或大鼠HER2交叉反应,而且展现IgG1典型的两阶段部署,有较短的分布阶段和较慢的消除阶段(图7)。HER2-TDB的清除和半衰期二者与曲妥珠单抗相似,而且在典型的IgG1在大鼠中的预期范围内。

[0482] HER2-TDB在体内在免疫受损小鼠中抑制肿瘤生长

[0483] 在NOD-SCID小鼠中测试了HER2-TDB的体内功效,该小鼠缺乏内源功能性T和B细胞且具有降低水平的NK, DC和巨噬细胞细胞类型。与来自健康捐献者的非活化的人PBMC一起对小鼠的乳房脂肪垫移植MCF7-neo/HER2细胞。在肿瘤细胞接种那天开始,以每周一次进度表给小鼠静脉内服用0.5mg/kg HER2-TDB或对照-TDB。HER2-TDB阻止表达HER2的肿瘤生长(图8A)。正如预期的,当省略huPBMC时,在小鼠中没有检测到功效(图15A)。与HER2-TDB分享相同CD3臂(但具有不结合MCF7-neo/HER2, 人PBMC或小鼠细胞的无关靶标臂)的对照TDB对肿瘤生长没有影响(图15B)。

[0484] HER2-TDB在huHER2转基因小鼠中引起较大乳房肿瘤消退

[0485] 为了模拟HER2-TDB在免疫胜任小鼠中的活性,使用人MMTV-huHER2转基因小鼠(Finkle et al.;Clinical Cancer Research;10:2499-511;2004),并生成使用小鼠CD3反应性抗体克隆2C11(Leo et al.,Proc Natl Acad Sci USA,84:1374-8,1987)的替代TDB。4D5/2C11-TDB的体外活性与人CD3反应性HER2-TDB相似(图10)。除一个肿瘤以外,4D5/2C11-TDB导致消退(图8B-C)。在57%小鼠中检测到>50%肿瘤消退,而43%小鼠没有检测得到的肿瘤。响应者包括在处理开始时>1000mm³的肿瘤(图8D)。肿瘤生长不受对照TDB影响,其中CD3臂换成人CD3特异性的,或者靶标臂换成无关的(图8E)。

[0486] HER2-TDB在免疫胜任小鼠中抑制已建立的肿瘤生长

[0487] 使用人CD3 ϵ 转基因小鼠(CD3-TG,(de la Hera et al.,J Exp Med.,173:7-17,1991))来模拟HER2-TDB在免疫胜任小鼠中的活性。CD3-TG T细胞以各自Balb/c小鼠或人T细胞大约50%表达小鼠和人CD3二者(图9)。CD3-TG T细胞在体外杀伤表达人HER2的靶细胞(图10),尽管小鼠脾T细胞的杀伤活性与人外周T细胞相比一贯要低。人HER2转染的CT26肿瘤细胞在CD3-TG小鼠中皮下生长,并一周一剂用0.5mg/kg IV HER2-TDB处理已建立的肿瘤。HER2-TDB清楚地抑制已建立的肿瘤生长,但是效果是瞬时的且没有看到完全响应(图8F)。HER2-TDB的活性依赖于T细胞,因为HER2-TDB在非CD3转基因小鼠中没有效果(图11)。使用4D5/2C11TDB在Balb/c小鼠中检测到的体内响应与用基于人特异性CD3臂的TDB在CD3-TG小鼠中看到的响应相似(图8F-G)。尽管响应不完全,HER2-TDB显著延长肿瘤进展前时间(对数秩p值<0.0001)。具有无关肿瘤臂的对照TDB对肿瘤生长没有影响。另外,肿瘤对T-DM1不敏感(图8G)。

[0488] 靶细胞中的PD-L1表达抑制HER2-TDB活性

[0489] 进一步分析CT26-HER2肿瘤的细胞组成以表征不完全肿瘤响应。CT26-HER2肿瘤中10-30%的CD45+细胞是CD8+T细胞(图12-13)。几乎所有T细胞展现活化标志物且是PD-1阳性的(80-95%CD69+,95%PD-1+)。所有CD45-细胞是PD-L1阳性的。为了测试PD-1/PD-L1信号传导是否干扰HER2-TDB活性,使用人T细胞。与SKBR3细胞和HER2-TDB共培养过夜后检测到PD-1在T细胞中的上调(图14A)。然后将T细胞转移到PD-L1或载体转染的293细胞上。293细胞表达低水平的HER2,而且引发后的T细胞有效杀伤293细胞,但是只在添加HER2-TDB时(图14B)。293细胞中的PD-L1表达显著抑制杀伤活性,但是这种抑制被PD-L1阻断性抗体完全逆转。总之,这些结果证明了HER2-TDB和抗PD-L1组合治疗的治疗好处。

[0490] HER2-TDB+抗PDL1组合有效治疗已建立的CT26-HER2肿瘤

[0491] 在接下来使用CD3-TG小鼠的实验中,用HER2-TDB看到了相似的瞬时但显著的响应。与先前的研究形成对比,观察到2例完全响应(图14C)。两个单一药剂分组中的肿瘤生长与对照小鼠相比均显著要慢,而且HER2-TDB和PD-L1阻断的组合进一步改善响应(图14C)。组合导致持久的响应;直至研究在第一剂后80天终止,60%的小鼠在没有肿瘤的情况下活着(未显示)。在一项重复研究中(图14D),所有小鼠响应组合,其中82%显示完全响应,而且组合分组中除1只以外的所有小鼠中肿瘤生长通过处理受到控制。总之,HER2-TDB与抗PD-L1免疫疗法的组合导致增强的肿瘤生长抑制,升高的响应率和持久的响应。

[0492] 在此研究中表征HER2-TDB的活性,而且没有发现在没有HER2结合的情况下T细胞活化的证据。当存在表达靶标的细胞时,HER2-TDB处理导致稳健的T细胞活化,细胞毒性颗粒释放,和表达HER2的细胞死亡。重要的是,在相同培养物中的大多数HER2+细胞被杀死的

条件中没有检测到对表达非靶标的细胞的旁观者效应。HER2-TDB诱导对于肿瘤浸润性淋巴细胞扩增可能至关重要的T细胞的增殖和多克隆扩充。

[0493] HER2-TDB的效力在低皮摩尔至飞摩尔范围中是一致的。而且,少至10-500个HER2结合的TDB足以诱导显著的体外细胞毒性。质膜上少至约1000拷贝的HER2足以诱导杀伤。这些研究还证明了靶标表达水平和对HER2-TDB的体外敏感性之间的相关性。

[0494] 最后,用HER2-TDB募集T细胞杀伤活性依赖于HER2表达,但是不依赖于HER2信号传导途径,这提示HER2-TDB可能有效治疗对当前抗HER2疗法不应的肿瘤。一致的是,数据证明了在治疗多种曲妥珠单抗/拉帕替尼抗性细胞系中与敏感性细胞相比相等的活性。这些细胞中的抗性是通过影响HER2途径的多种机制生成的。本文中呈现的数据提示通过使用HER2-TDB转换至备选作用机制可广泛实现克服对抗体-药物缀合物(例如T-DM1),靶向小分子抑制剂(例如拉帕替尼)和阻断发信号的途径的治疗性单克隆抗体(例如曲妥珠单抗)的抗性。该研究使用四种独立模型系统证明了HER2-TDB有力的体内活性,包括MMTV-huHER2转基因小鼠中显著的响应。可使用HuCD3转基因小鼠作为huCD3靶向分子的一种新颖功效模型。重要的是,这项研究发现了由肿瘤细胞表达的PD-L1能抑制T细胞募集性抗体的活性,而且这种抑制能通过抗PD-L1抗体来逆转。该发现为具有巨大诊断影响的T细胞募集性分子提示一种潜在的一般抗性机制。该发现还为导致显著的响应增强和持久的长期治愈的HER2-TDB与PD-L1阻断的组合提供一种机械原理。

[0495] 综上所述,这项研究为HER2+乳腺癌呈现一种新的免疫疗法,其具有一种备选的极其有力的作用机制,在对当前HER2靶向疗法有抗性的细胞中广泛有效。对双特异性T细胞募集性抗体提供数项重大进步:i)表征一种关键抗性机制,ii)发现一种潜在诊断剂,iii)引入一种新颖的huCD3转基因功效模型,和iv)显著改善药物样特性,这是通过使用基于具有天然构造的全长抗体的技术实现的。证明了组合两种免疫疗法的好处:T细胞活性的直接多克隆募集与抑制T细胞遏制性PD-1/PD-L1信号传导一起导致增强的且持久的长期响应。

[0496] 在实施例中使用的抗体的序列

[0497] α -PDL1轻链可变区:

[0498]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
LQPEDFATYYCQQYLYHPATFGGQTKVEIKR(SEQ ID NO:4)

[0499] α -PDL1重链可变区:

[0500]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSK
TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSSASTK(SEQ ID NO:26)

[0501] α -PDL1全长轻链:

[0502]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTIS
LQPEDFATYYCQQYLYHPATFGGQTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:33)

[0503] α -PDL1全长重链:

[0504]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKN
TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP
APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:32)

序列表

<110> 基因泰克公司 (GENENTECH, INC.)
 豪夫迈·罗氏有限公司 (F. HOFMANN-LA ROCHE AG)
 Mark S. DENNIS
 Allen EBENS
 Bryan IRVING
 Teemu T. JUNTILA

<120> 使用 PD-1 轴结合拮抗剂和抗 HER2 抗体治疗 HER2 阳性癌症的方法

<130> 146392022840

<140> 未指派
 <141> 随本文

<150> US 61/917,264
 <151> 2013-12-17

<160> 54

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
 <211> 440
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建物

<400> 1
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
 115 120 125
 Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 130 135 140
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 145 150 155 160
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 165 170 175
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
 180 185 190
 Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 195 200 205
 Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 210 215 220
 Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 225 230 235 240
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 245 250 255
 Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 260 265 270
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 275 280 285
 Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 290 295 300
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 305 310 315 320
 Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro

[0001]

```

      325      330      335
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
      340      345      350
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
      355      360      365
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
      370      375      380
Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
      385      390      395      400
Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
      405      410      415
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
      420      425      430
Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
      435      440

```

<210> 2
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建物

[0002]

```

<400> 2
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1          5          10          15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
      20      25      30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
      35      40      45
Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
      50      55      60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
      65      70      75      80
Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
      85      90      95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
      100      105      110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
      115      120      125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
      130      135      140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
      145      150      155      160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
      165      170      175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
      180      185      190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
      195      200      205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210

```

<210> 3
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建物

```

<400> 3
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
      20      25      30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45
Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
      50      55      60

```

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

<210> 4
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建物

<400> 4
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

[0003]

<210> 5
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建物

<220>
 <221> 变体
 <222> 6
 <223> Xaa = Asp 或 Gly

<400> 5
 Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Ser Trp Ile His
 1 5 10

<210> 6
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建物

<220>
 <221> 变体
 <222> 4
 <223> Xaa = Ser 或 Leu

<220>
 <221> 变体
 <222> 10
 <223> Xaa = Thr 或 Ser

<400> 6
 Ala Trp Ile Xaa Pro Tyr Gly Gly Ser Xaa Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

	1	5	10	15
	Lys Gly			
	<210> 7			
	<211> 9			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 合成构建物			
	<400> 7			
	Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr			
	1	5		
	<210> 8			
	<211> 25			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 合成构建物			
	<400> 8			
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
	1	5	10	15
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser			
		20	25	
[0004]	<210> 9			
	<211> 13			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 合成构建物			
	<400> 9			
	Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
	1	5	10	
	<210> 10			
	<211> 32			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 合成构建物			
	<400> 10			
	Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln			
	1	5	10	15
	Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg			
		20	25	30
	<210> 11			
	<211> 11			
	<212> PRT			
	<213> 人工序列			
	<220>			
	<223> 合成构建物			
	<400> 11			
	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala			
	1	5	10	

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<220>
<221> 变体
<222> 5
<223> Xaa = Asp 或 Val

<220>
<221> 变体
<222> 6
<223> Xaa = Val 或 Ile

<220>
<221> 变体
<222> 7
<223> Xaa = Ser 或 Asn

<220>
<221> 变体
<222> 9
<223> Xaa = Ala 或 Phe

<220>
<221> 变体
<222> 10
<223> Xaa = Val 或 Leu

<400> 12
Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Ala
1 5 10

[0005]

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<220>
<221> 变体
<222> 4
<223> Xaa = Phe 或 Thr

<220>
<221> 变体
<222> 6
<223> Xaa = Tyr 或 Ala

<400> 13
Ser Ala Ser Xaa Leu Xaa Ser
1 5

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<220>
<221> 变体
<222> 3

<223> Xaa = Tyr, Gly, Phe 或 Ser
 <220>
 <221> 变体
 <222> 4
 <223> Xaa = Leu, Tyr, Phe 或 Trp
 <220>
 <221> 变体
 <222> 5
 <223> Xaa = Tyr, Asn, Ala, Thr, Gly, Phe 或 Ile
 <220>
 <221> 变体
 <222> 6
 <223> Xaa = His, Val, Pro, Thr 或 Ile
 <220>
 <221> 变体
 <222> 8
 <223> Xaa = Ala, Trp, Arg, Pro 或 Thr
 <400> 14
 Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr
 1 5
 <210> 15
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建物
 [0006] <400> 15
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20
 <210> 16
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建物
 <400> 16
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15
 <210> 17
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建物
 <400> 17
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30
 <210> 18
 <211> 11
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<400> 18

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
1 5 10

<210> 19

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<400> 19

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His
1 5 10

<210> 20

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<400> 20

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15
Lys Gly

[0007]

<210> 21

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<400> 21

Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<400> 22

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<400> 23

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 24
Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr
1 5

<210> 25
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 25
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
20 25 30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

[0008]

<210> 26
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 26
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
20 25 30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120

<210> 27
<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<400> 27

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 28

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<400> 28

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 29

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<400> 29

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

[0009]

<210> 30

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<400> 30

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 31

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<400> 31

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
1 5 10 15

<210> 32

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

[0010]

```

<400> 32
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1          5          10          15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
 20          25          30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35          40          45
Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50          55          60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65          70          75          80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85          90          95
Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100          105          110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115          120          125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130          135          140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145          150          155          160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165          170          175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180          185          190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195          200          205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210          215          220
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225          230          235          240
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245          250          255
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260          265          270
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275          280          285
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
290          295          300
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305          310          315          320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325          330          335
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340          345          350
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355          360          365
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370          375          380
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385          390          395          400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405          410          415
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420          425          430
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435          440          445

```

<210> 33

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<400> 33

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1          5          10          15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20          25          30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

```

```

      35      40      45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50      55      60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
      65      70      75      80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
      85      90      95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
      100      105      110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
      115      120      125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
      130      135      140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
      145      150      155      160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
      165      170      175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
      180      185      190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
      195      200      205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
      210

```

<210> 34
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建物

[0011]

```

<400> 34
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
  1      5      10      15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
      20      25      30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
      35      40      45
Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
      50      55      60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
      65      70      75      80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
      85      90      95
Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
      100      105      110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
      115      120

```

<210> 35
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建物

```

<400> 35
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
  1      5      10      15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
      20      25      30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
      35      40      45
Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
      50      55      60
Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
      65      70      75      80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
      85      90      95

```

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 36

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<400> 36

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
20 25 30
Tyr Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ser Arg Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175
[0012] Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
225 230 235 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly

<210> 37
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建物

<400> 37
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Arg Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
 100 105 110
 Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
 115 120 125
 Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
 130 135 140
 Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
 145 150 155 160
 Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
 165 170 175
 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
 180 185 190
 Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
 195 200 205
 Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

[0013]

<210> 38
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建物

<400> 38
 Asp Thr Tyr Ile His
 1 5

<210> 39
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建物

<400> 39
 Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Ser Asp Val Lys
 1 5 10 15
 Gly

<210> 40
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<400> 40

Trp Gly Gly Asp Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 41

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<400> 41

Arg Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<400> 42

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

[0014]

<210> 43

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<400> 43

Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Pro Thr
1 5

<210> 44

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<400> 44

Gly Tyr Thr Met Asn
1 5

<210> 45

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建物

<400> 45

Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
Asp

<210> 46
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 46
Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 47
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 47
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 48
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

[0015] <400> 48
Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser
1 5

<210> 49
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 49
Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 50
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 50
Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 51
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 51
Arg Ile Tyr Pro Thr Asn Gly Tyr Thr Arg Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15
Asp

<210> 52
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 52
Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 53
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 53
Ser Ala Ser Phe Arg Tyr Thr
1 5

[0016]

<210> 54
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 54
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
20 25 30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125
Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

[0017]

His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
225					230					235					240
Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
				245					250					255	
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
			260						265					270	
Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
		275						280					285		
Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
		290				295						300			
Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
305					310					315					320
Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
				325					330					335	
Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
			340					345					350		
Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
		355						360				365			
Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
		370				375					380				
Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp
385					390					395					400
Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser
				405					410				415		
Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala
		420					425						430		
Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys
		435					440					445			

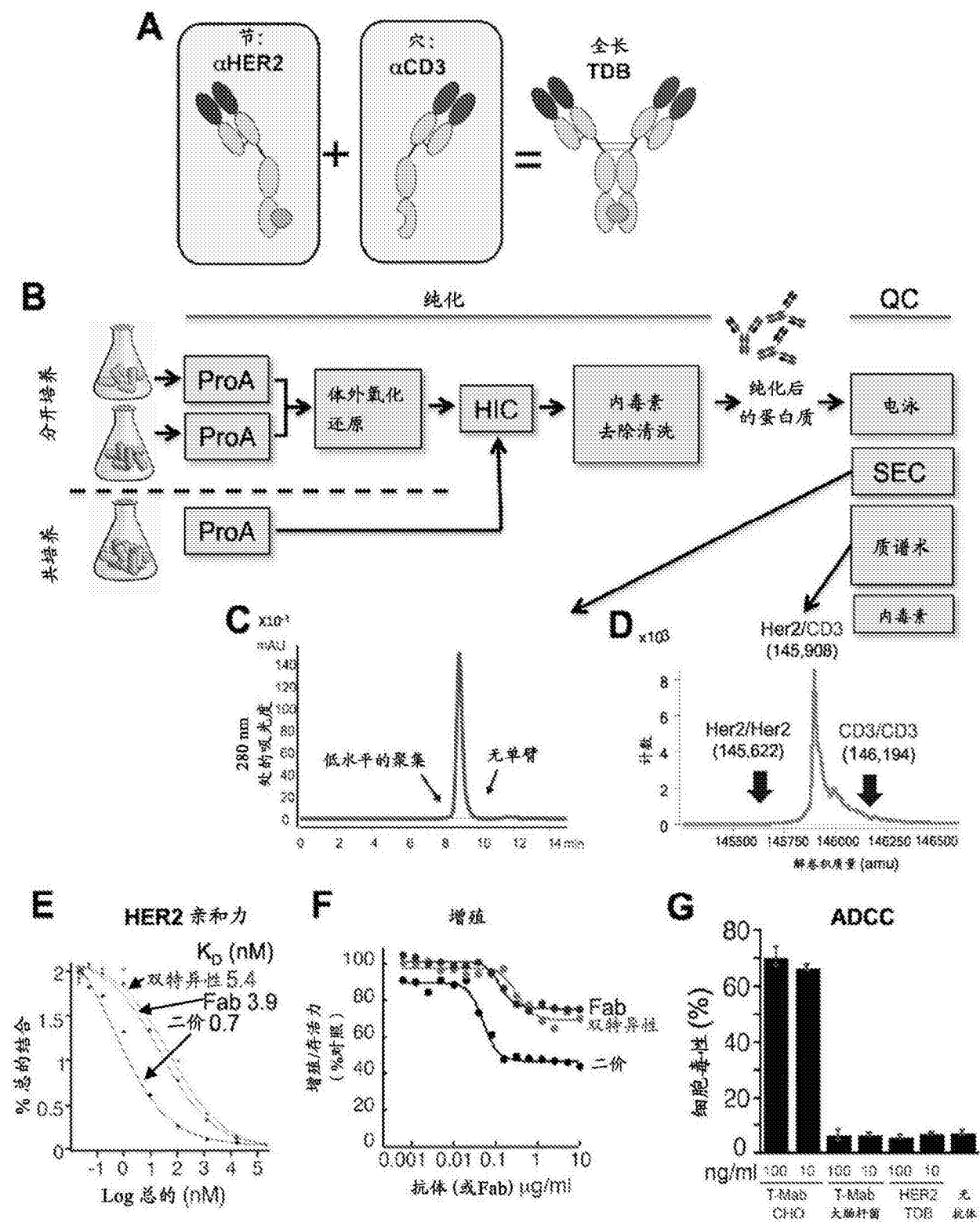


图1

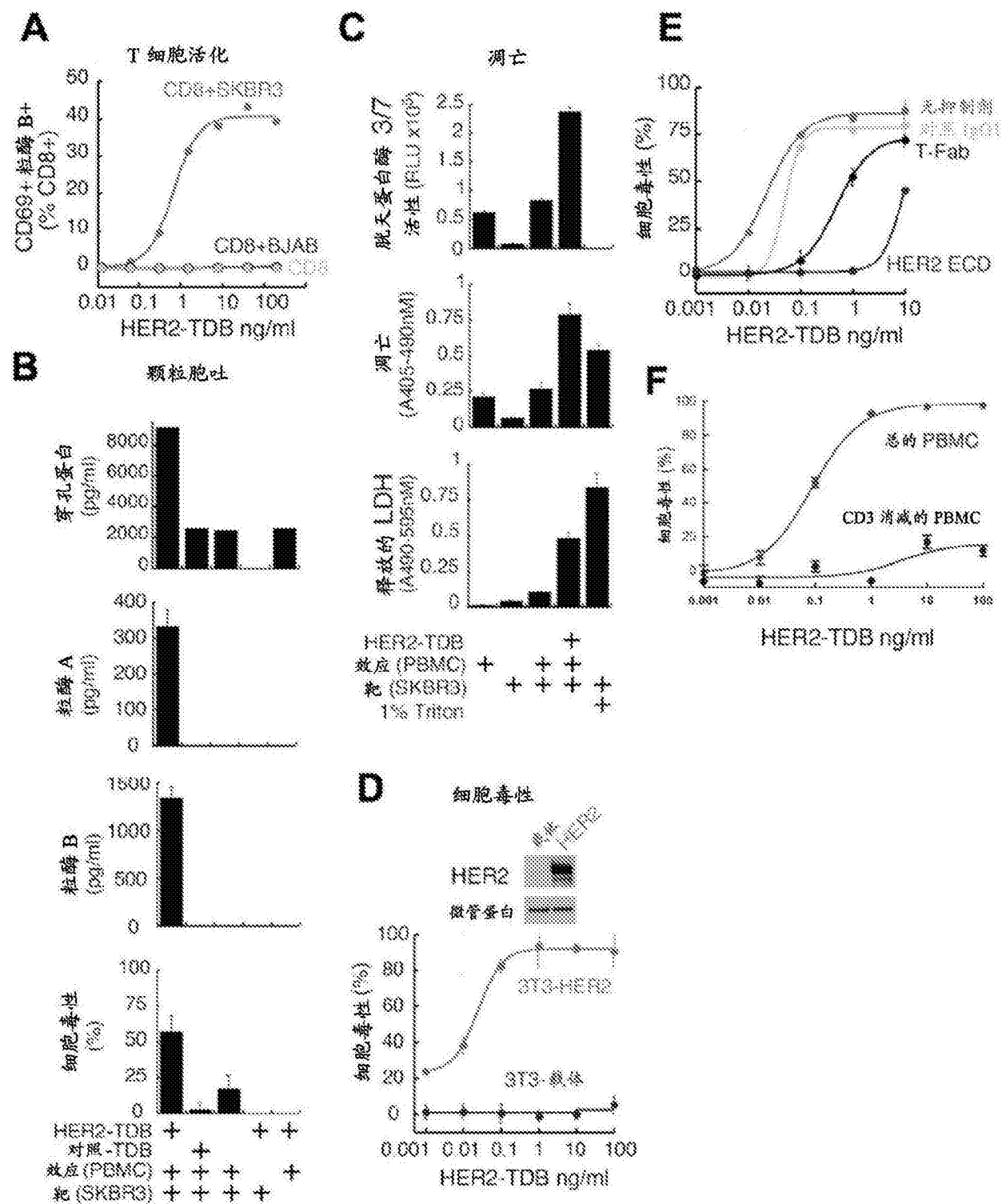


图2

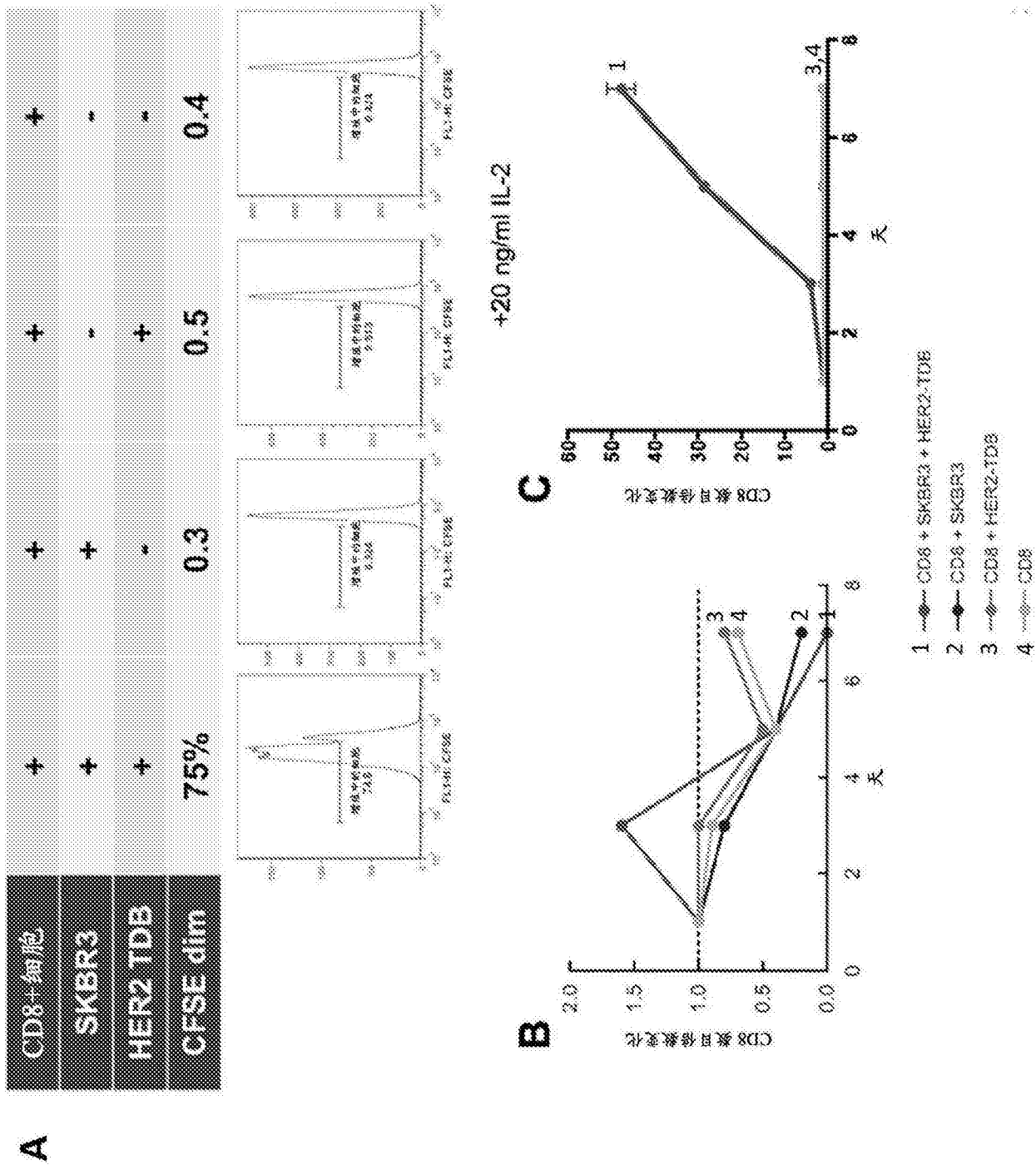


图4

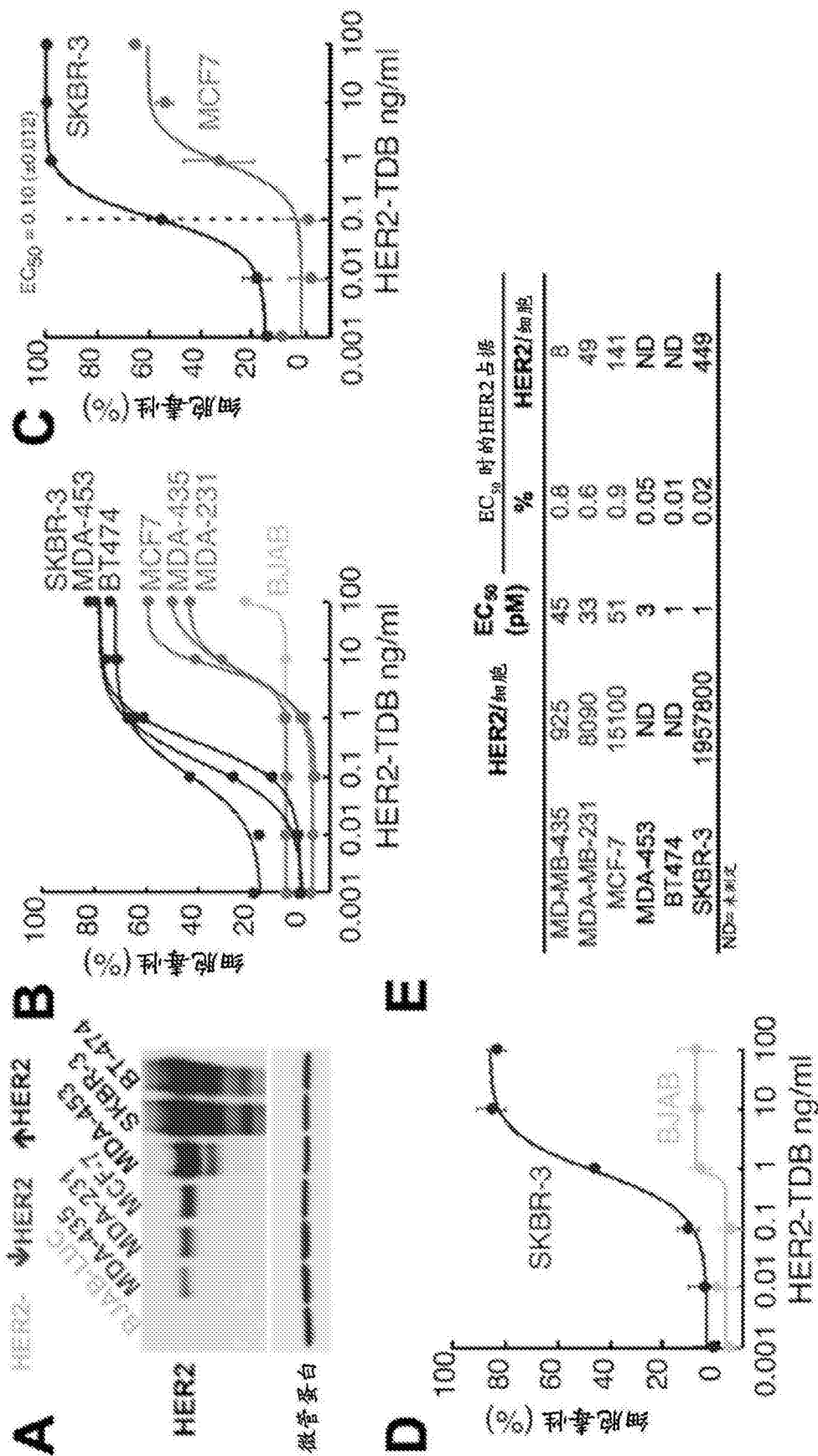


图5

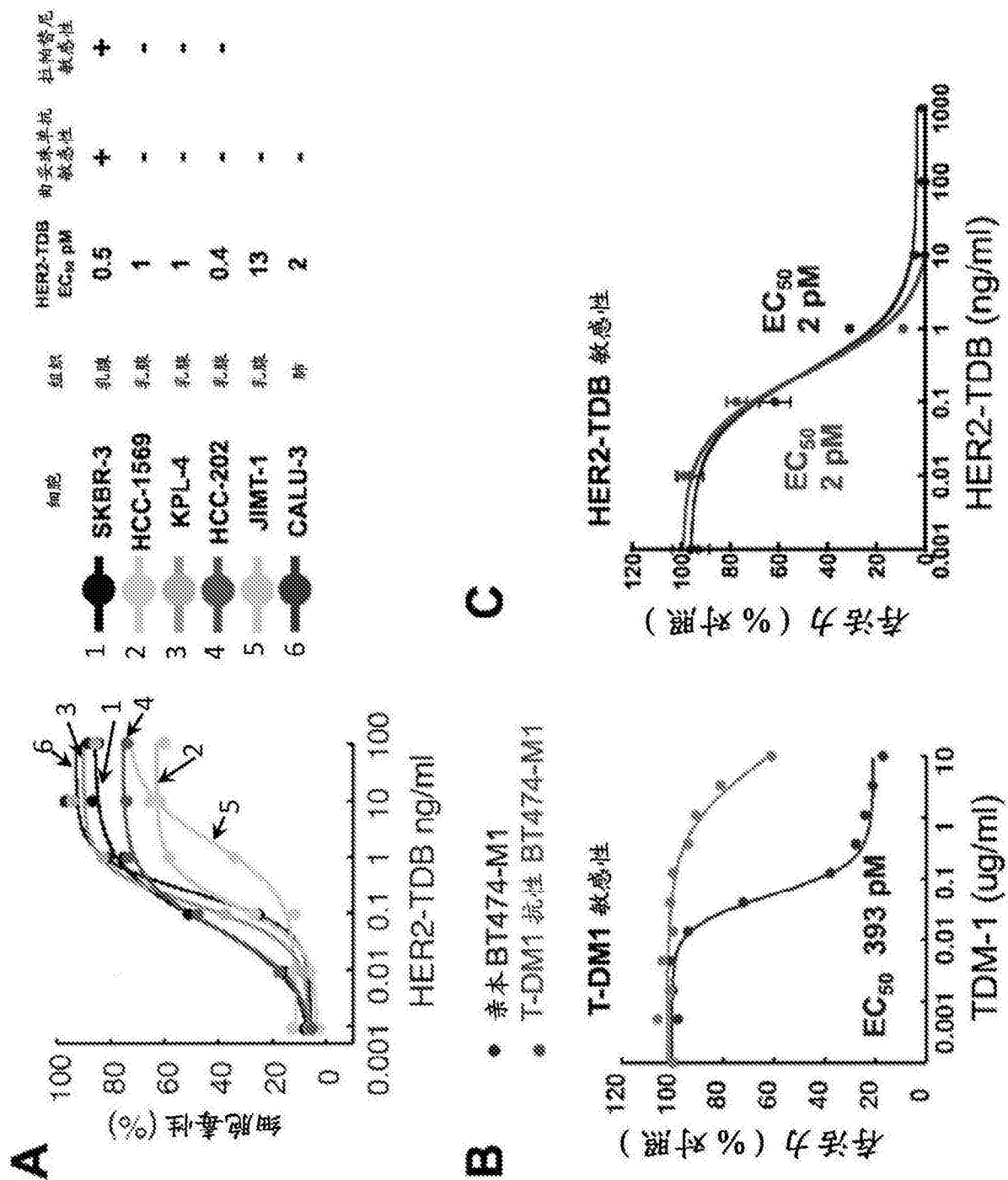


图6

HER2-TDB		曲妥珠单抗
CL	(mL/d/kg)	10 ± 2
		8 ± 1
AUC	(d*ug/mL)	1328 ± 247
		1553 ± 176
C _{max}	(ug/mL)	377 ± 31
		314 ± 41
V ₁	(mL/kg)	33 ± 3
		40 ± 5
HL _{beta}	(天)	7 ± 1
		10 ± 1

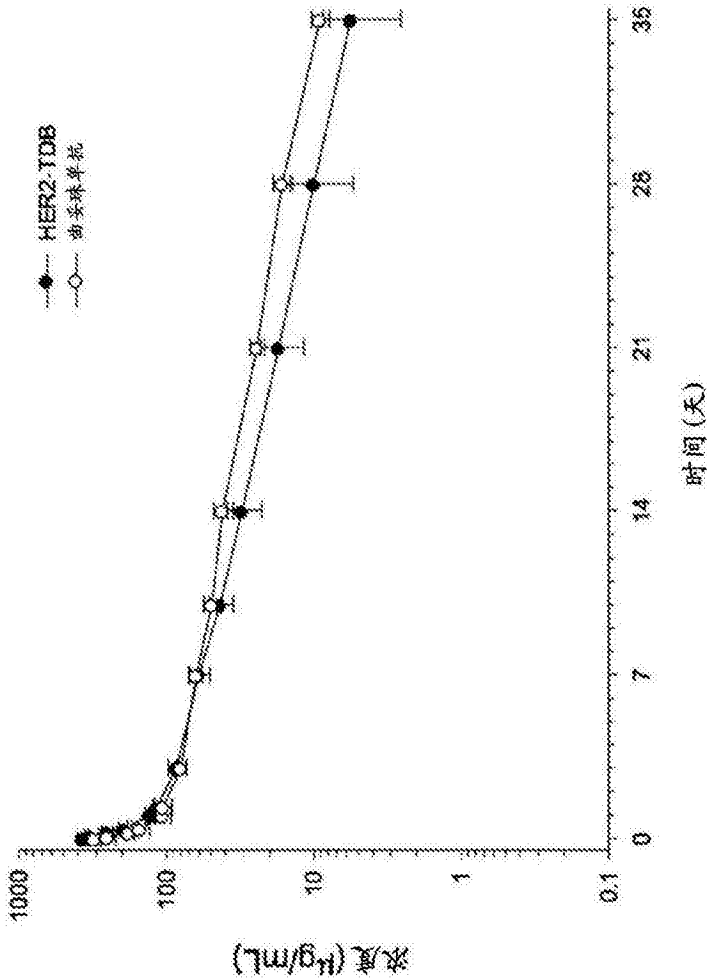


图7

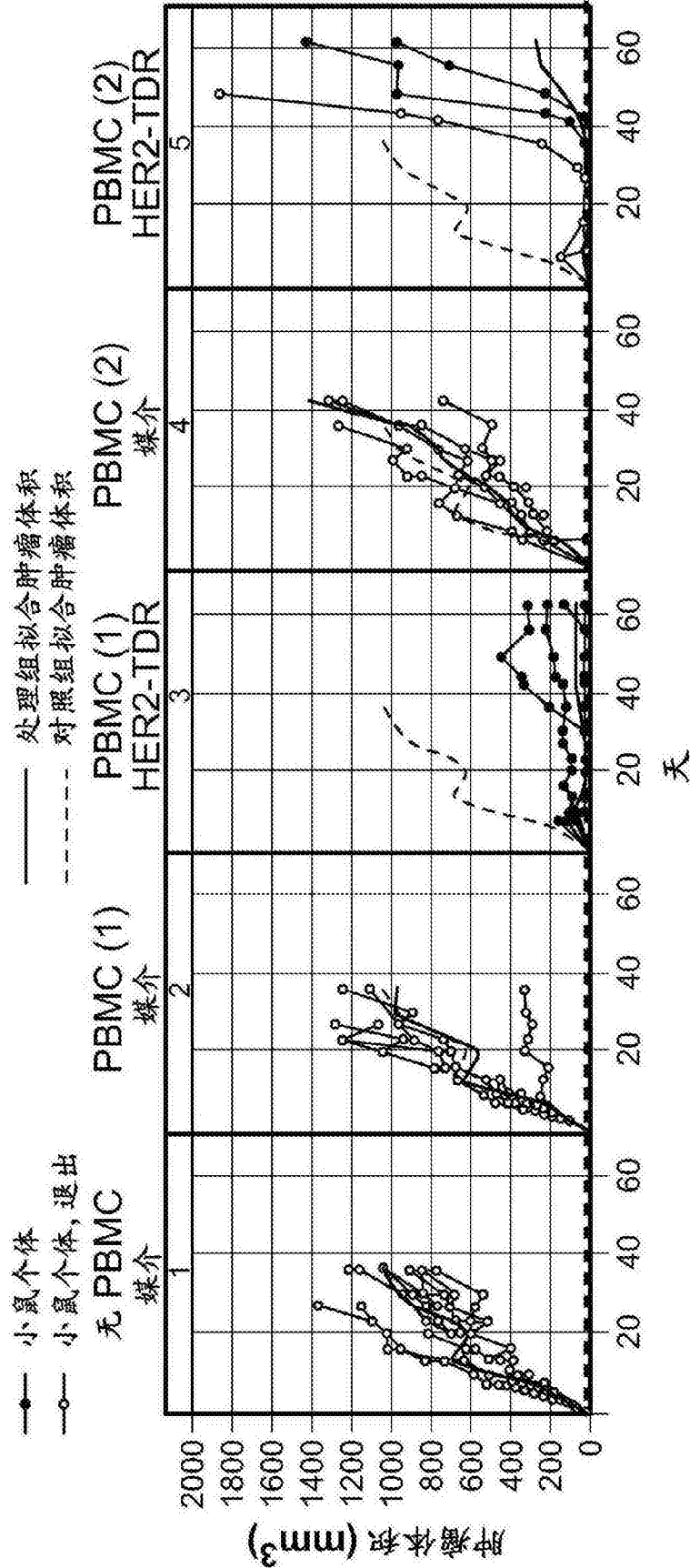


图8A

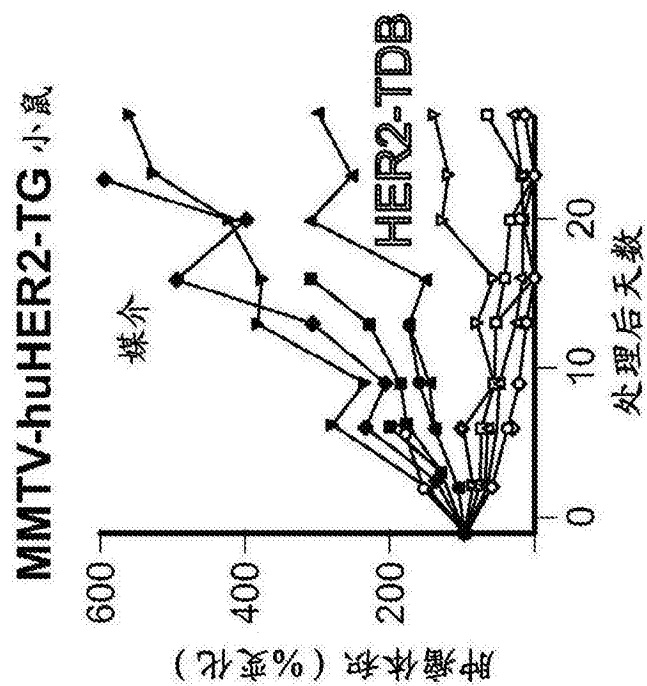


图8B

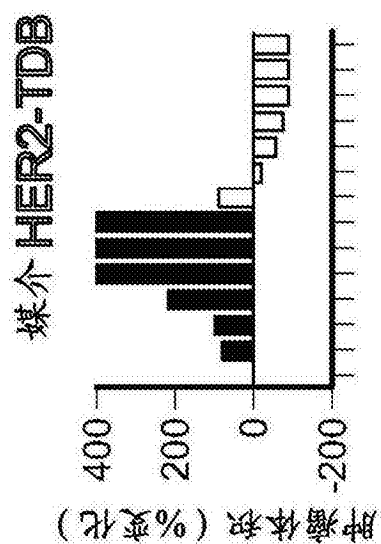


图8C

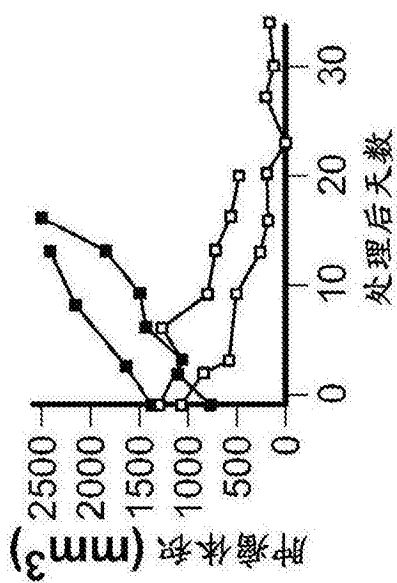


图8D

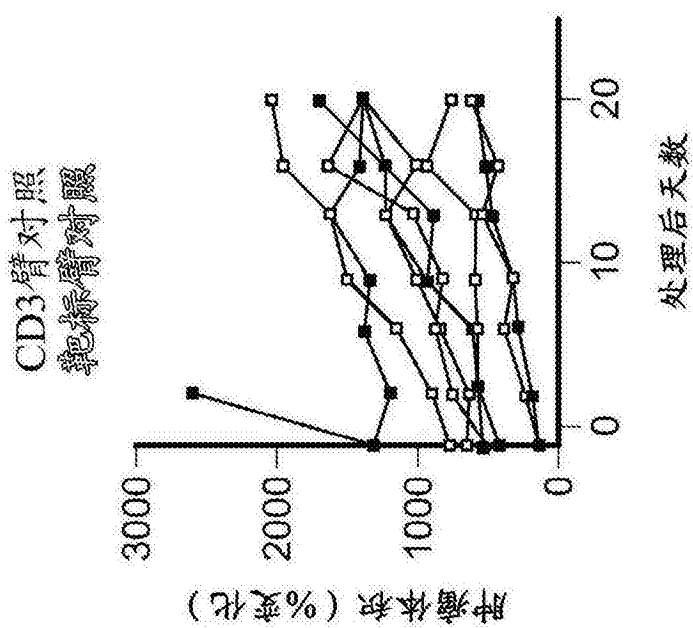


图8E

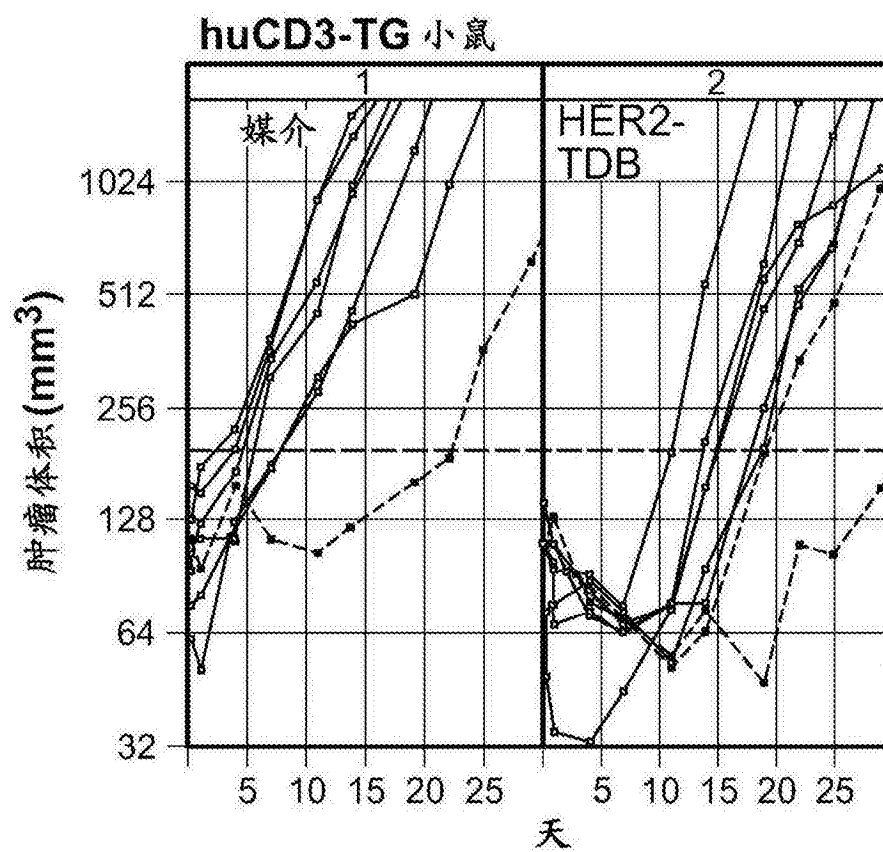


图8F

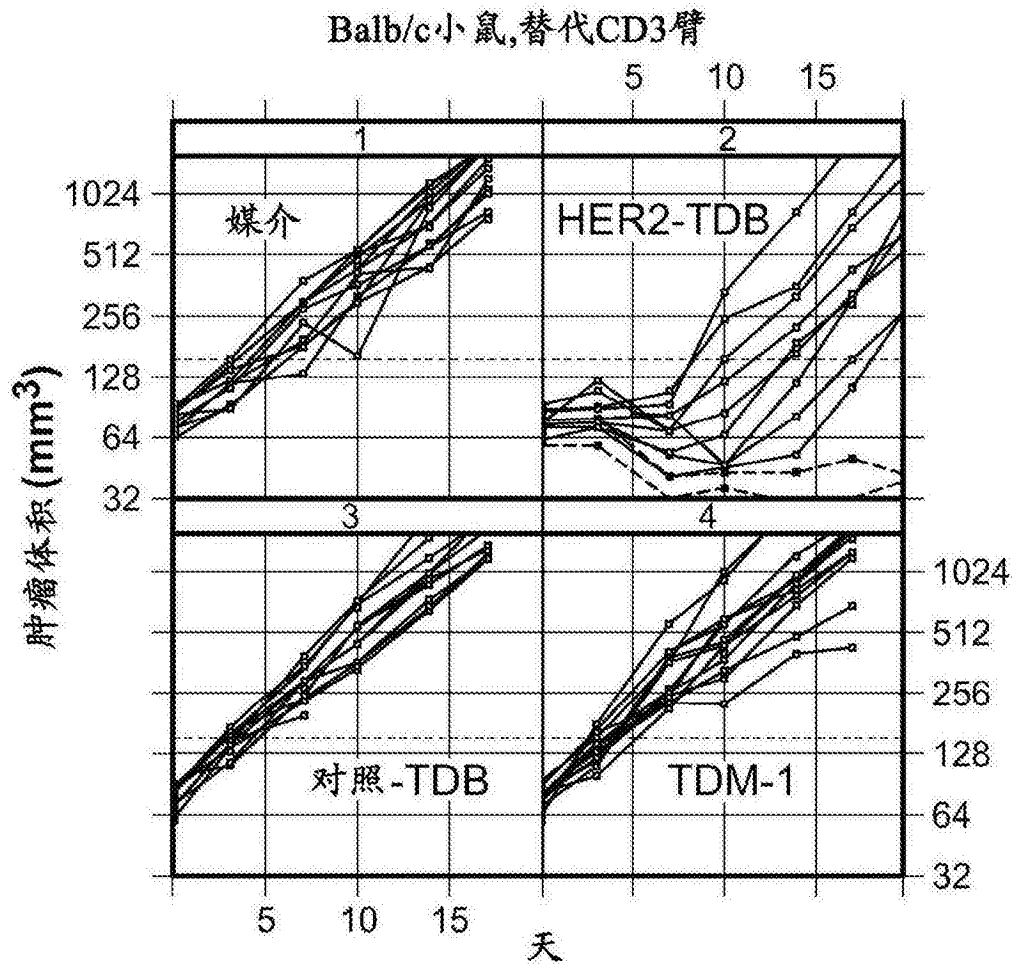


图8G

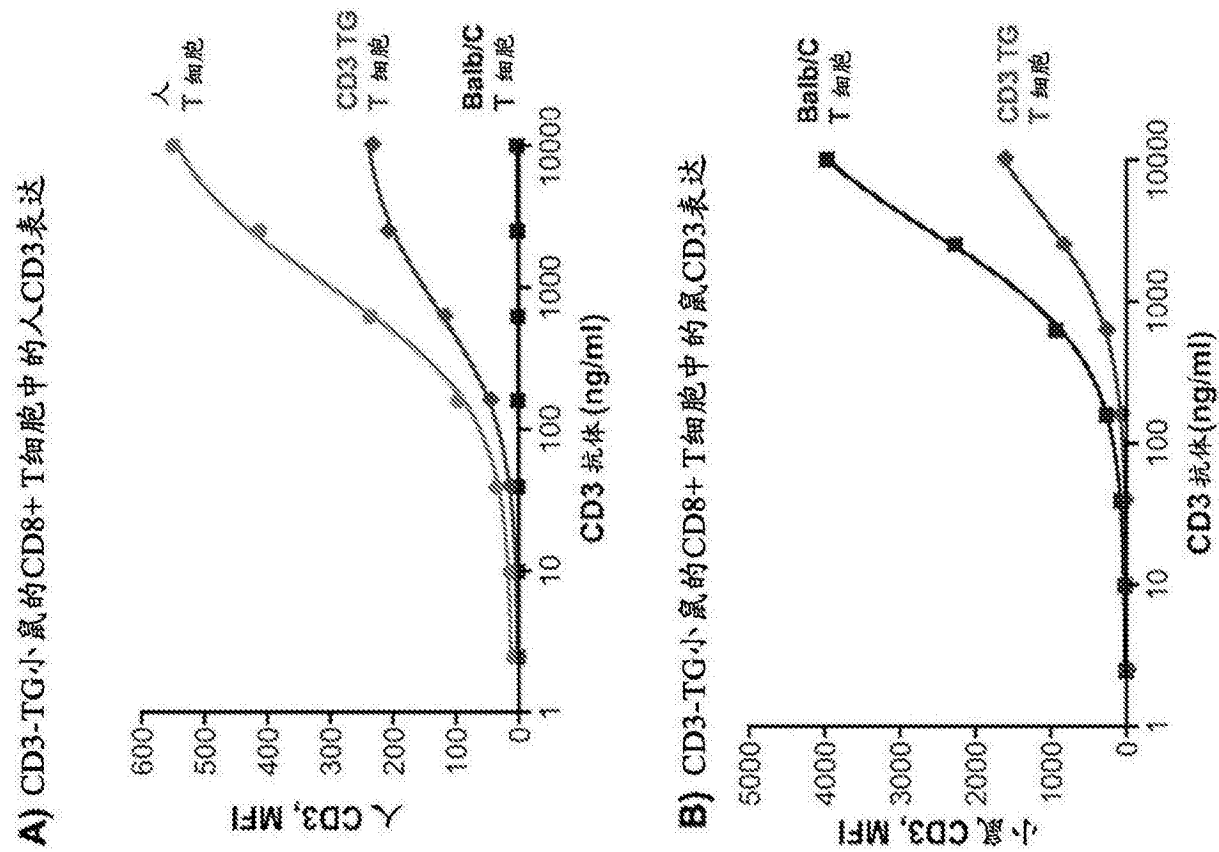


图9

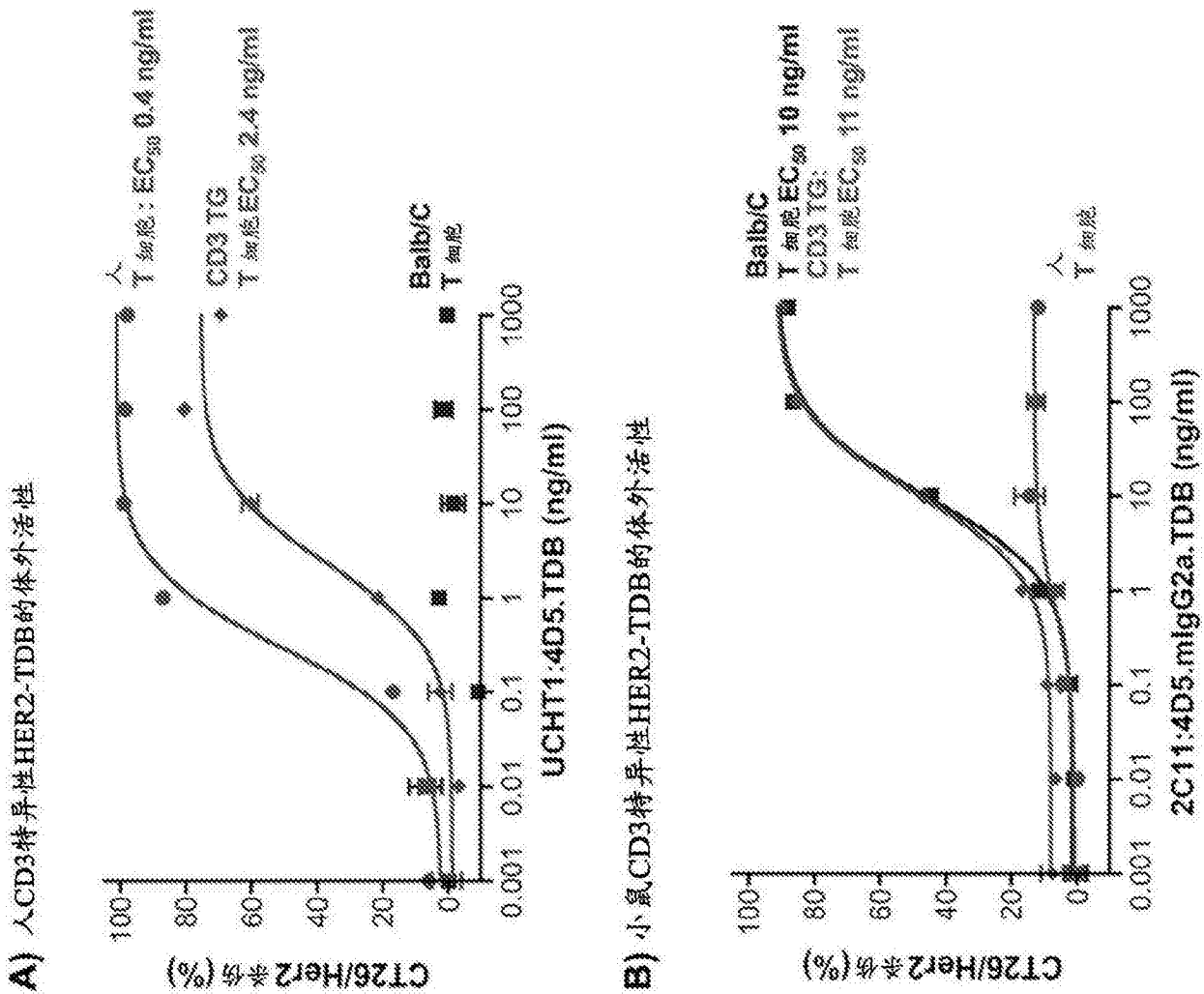


图10

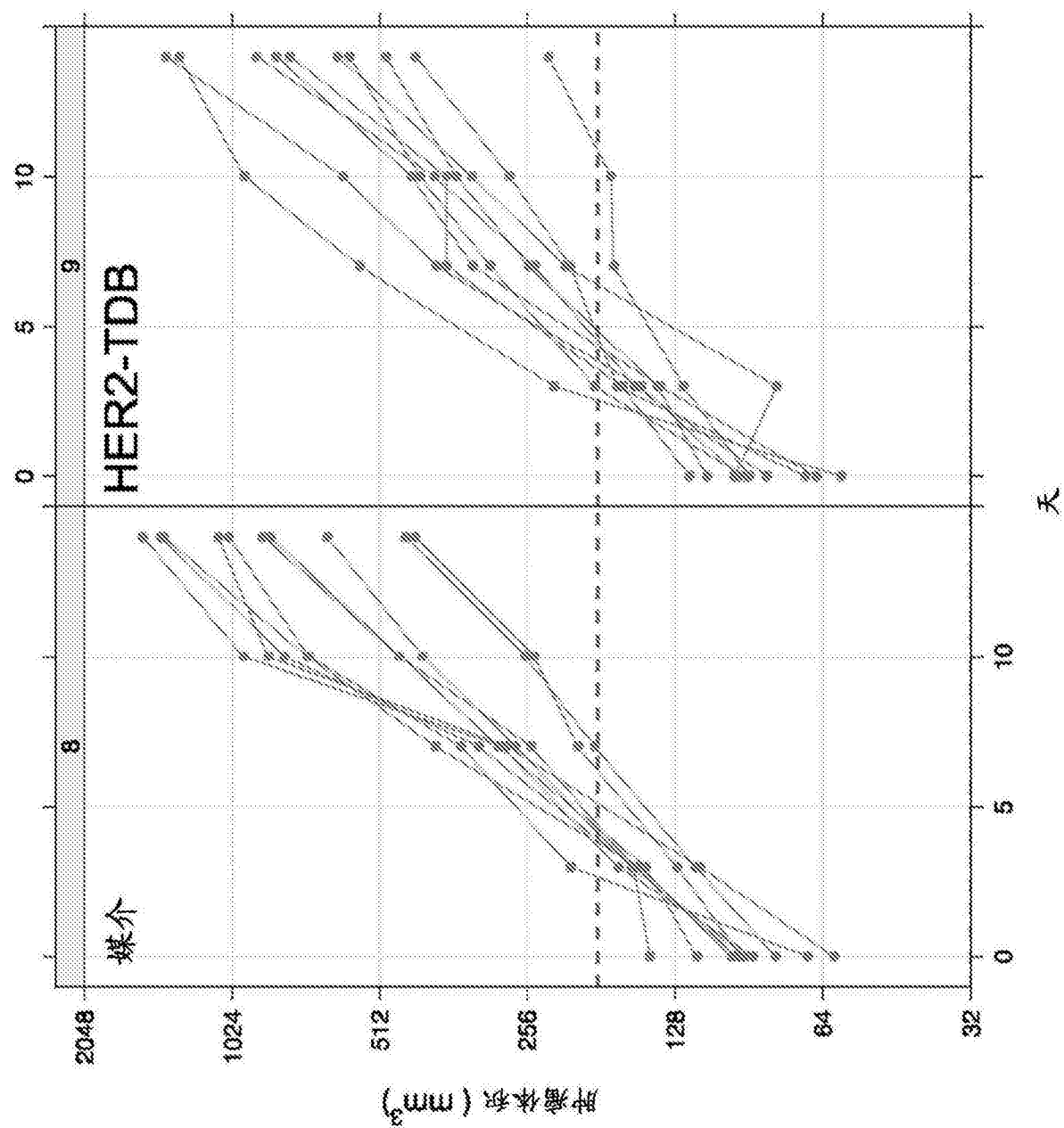


图11

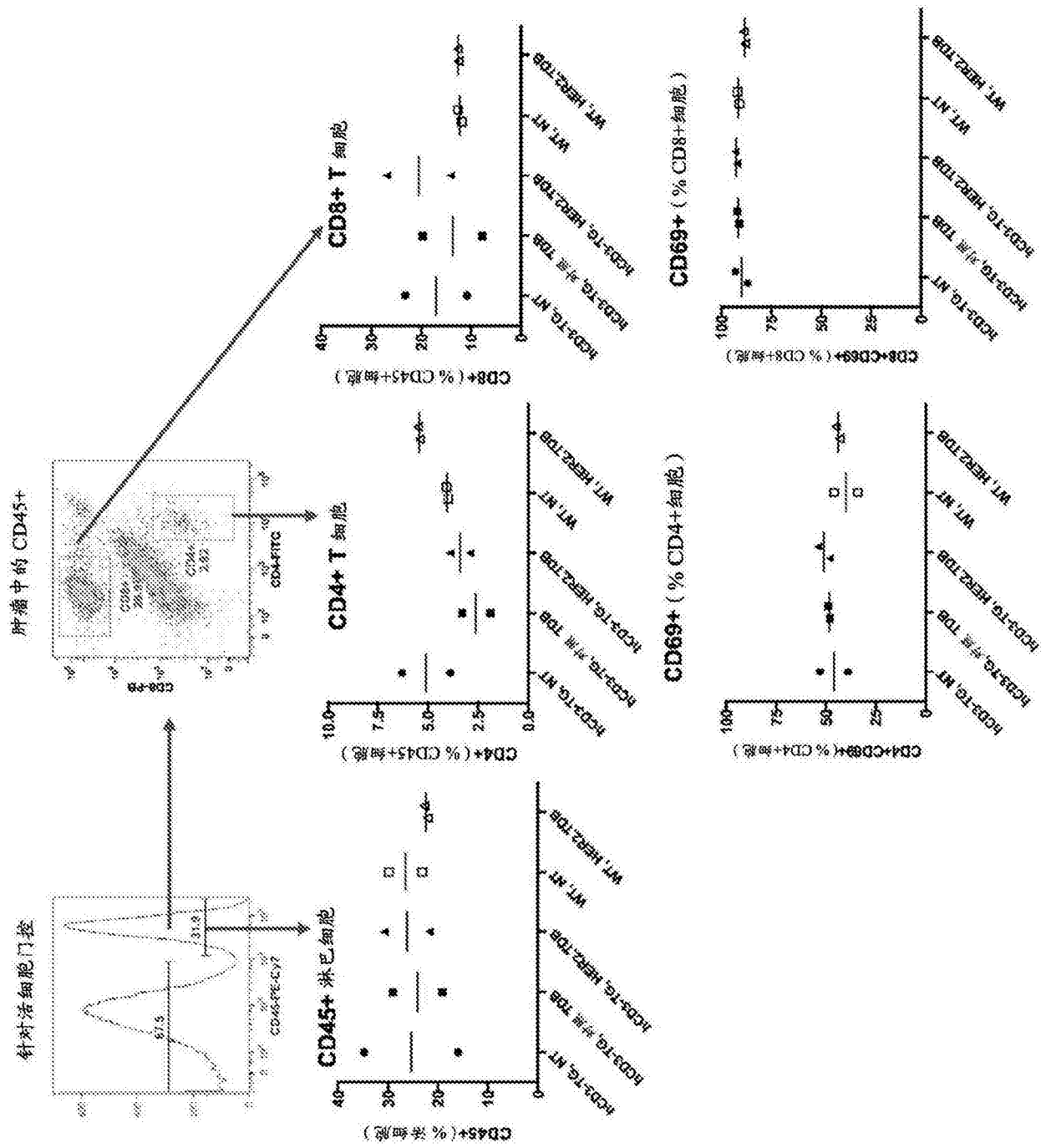
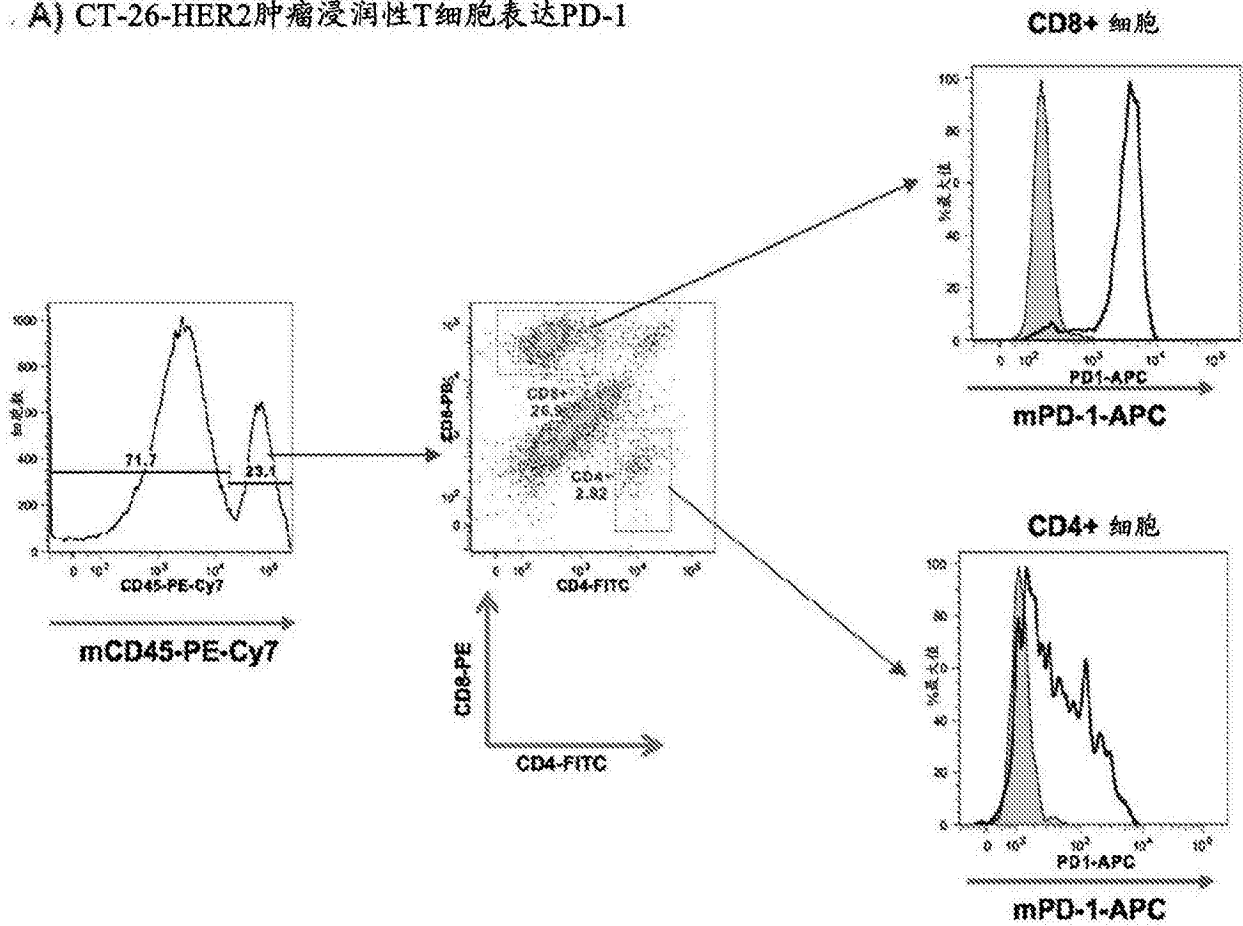


图12

A) CT-26-HER2肿瘤浸润性T细胞表达PD-1



B) CT-26-HER2肿瘤细胞表达PD-L1

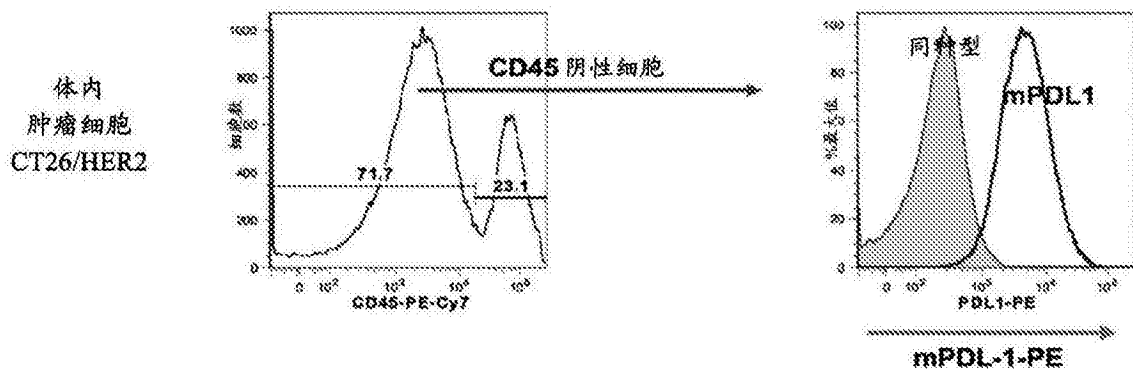


图13

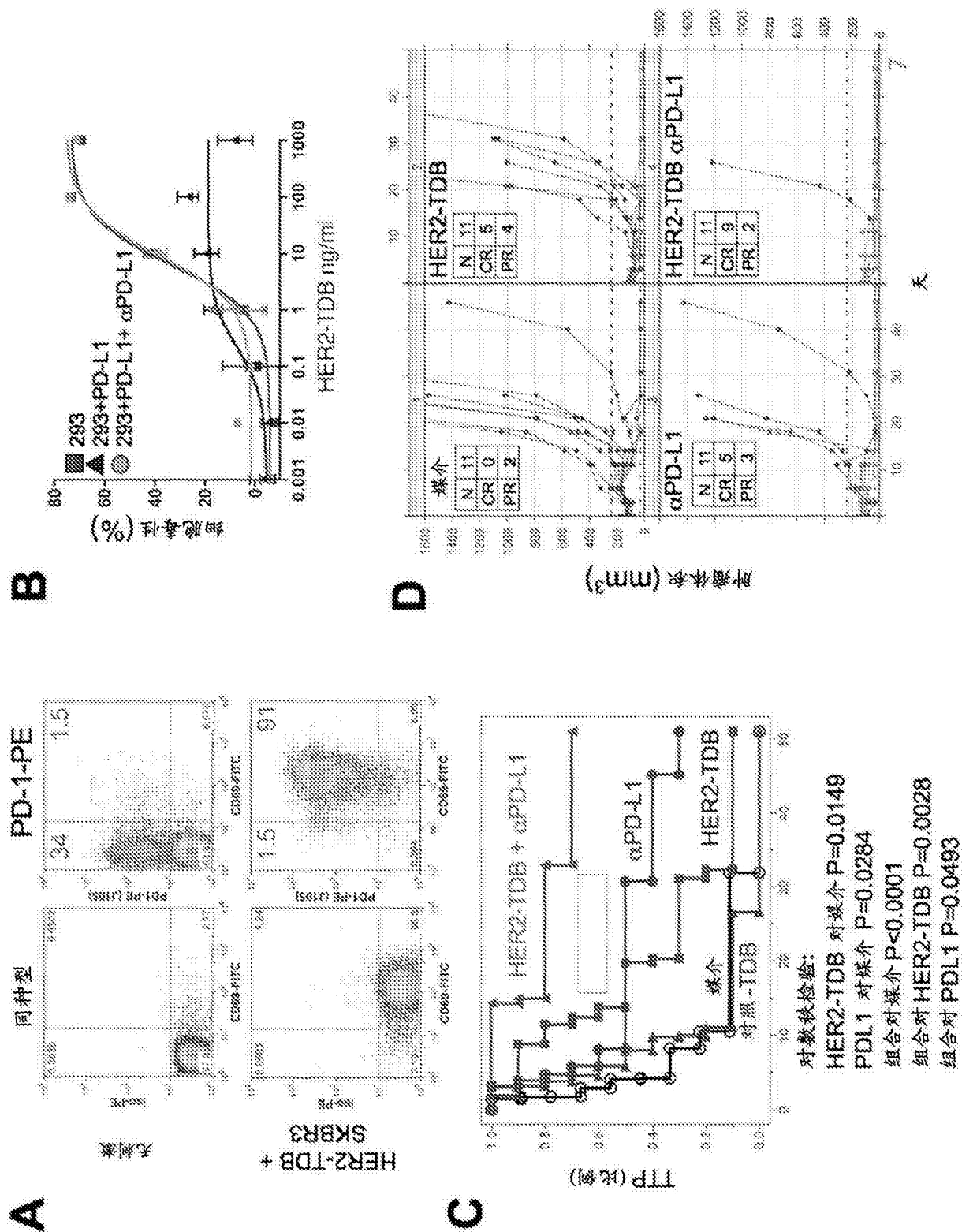


图14

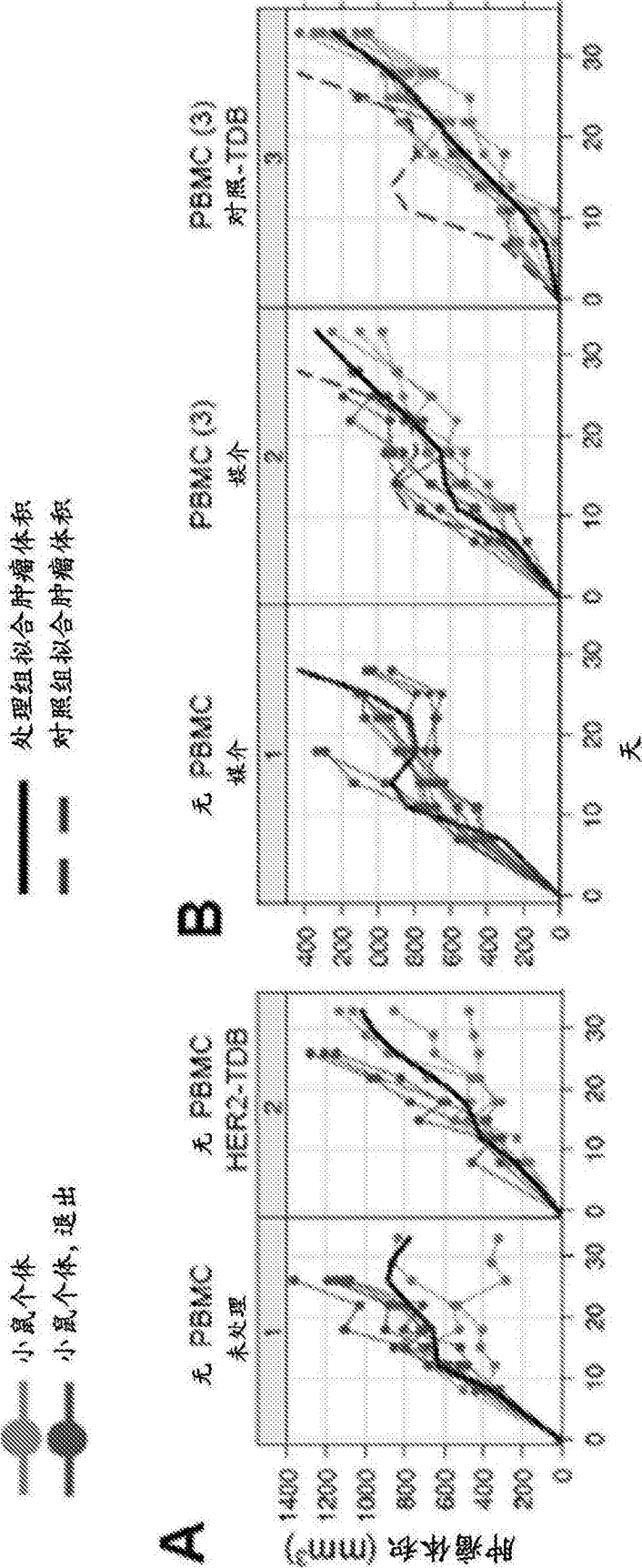


图15