



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112585166 A

(43) 申请公布日 2021. 03. 30

(21) 申请号 201980048426.5

D • A • 沃特坎普

(22) 申请日 2019.06.21

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

(30) 优先权数据

代理人 岑晓东

62/689,105 2018.06.23 US

62/719,461 2018.08.17 US

62/736,326 2018.09.25 US

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 31/282 (2006.01)

A61K 31/495 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

C07K 16/32 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.01.19

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/038534 2019.06.21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02019/246557 EN 2019.12.26

(71) 申请人 豪夫迈 • 罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

权利要求书3页 说明书82页

(72) 发明人 A • 洛佩兹-查韦斯

序列表19页 附图23页

(54) 发明名称

用PD-1轴结合拮抗剂、铂剂和拓扑异构酶II抑制剂治疗肺癌的方法

(57) 摘要

本公开提供了用于治疗个体的肺癌(诸如小细胞肺癌,例如广泛期小细胞肺癌)的方法。所述方法包括向所述个体施用PD-1轴结合拮抗剂(诸如抗PD-L1抗体,例如阿特珠单抗)、铂剂(例如,顺铂或卡铂)和拓扑异构酶II抑制剂(例如,依托泊苷)。



1. 一种治疗患有肺癌的个体的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的抗PD-L1抗体、铂剂和拓扑异构酶II抑制剂,其中所述治疗延长所述个体的无进展生存期(PFS)。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述治疗延长所述个体的总生存期(OS)。

3. 一种治疗患有肺癌的个体的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的抗PD-L1抗体、铂剂和拓扑异构酶II抑制剂,其中所述治疗延长所述个体的总生存期(OS)。

4. 根据权利要求1所述的方法,其中所述治疗使所述个体的PFS延长至少约5个月。

5. 根据权利要求2或3所述的方法,其中所述治疗使所述个体的OS延长至少约11个月。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的方法,其中所述抗PD-L1抗体包含:

(a) 重链可变区(V_H),所述重链可变区包含:含有GFTFSDSWIH(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列的HVR-H1、含有AWISPYGGSTYYADSVKG(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列的HVR-2和含有RHWPGGFDY(SEQ ID NO:3)的氨基酸序列的HVR-3;以及

(b) 轻链可变区(V_L),所述轻链可变区包含:含有RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列的HVR-L1、含有SASFLYS(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列的HVR-L2和含有QQYLYHPAT(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列的HVR-L3。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的方法,其中所述抗PD-L1抗体包含重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L),所述重链可变区包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其中所述抗PD-L1抗体为阿特殊单抗。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的方法,其中所述铂剂为卡铂或顺铂。

10. 根据权利要求9所述的方法,其中所述铂剂为卡铂。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的方法,其中所述拓扑异构酶II抑制剂为依托泊苷、替尼泊苷、阿霉素、道诺霉素、米托蒽醌、安吡啶、玫瑰树碱、金精三羧酸或HU-331。

12. 根据权利要求11所述的方法,其中所述拓扑异构酶抑制剂为依托泊苷。

13. 根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中施用1200mg剂量的所述抗PD-L1抗体,施用足以达到 $AUC=5\text{mg/ml/min}$ 的剂量的所述铂剂,并且施用 100mg/m^2 剂量的所述拓扑异构酶II抑制剂。

14. 根据权利要求1-13中任一项所述的方法,其中所述抗PD-L1抗体、所述铂剂和所述拓扑异构酶II抑制剂施用四个21天周期,并且其中在第1至第4周期的每个21天周期,在第1天施用1200mg剂量的所述抗PD-L1抗体,在第1天施用足以达到 $AUC=5\text{mg/ml/min}$ 的剂量的所述铂剂,并且在第1天、第2天和第3天中的每一天施用 100mg/m^2 剂量的所述拓扑异构酶II抑制剂。

15. 根据权利要求14所述的方法,其中在第4周期后进一步施用所述抗PD-L1抗体,并且其中在第4周期后每个周期的每个21天周期的第1天施用1200mg剂量的所述抗PD-L1抗体。

16. 根据权利要求13-15中任一项所述的方法,其中在第1至第4周期的第1天按顺序施用所述抗PD-L1抗体、所述铂剂和所述拓扑异构酶II抑制剂。

17. 根据权利要求16所述的方法,其中在第1至第4周期的第1天,在所述铂剂之前施用所述抗PD-L1抗体,并且其中在所述拓扑异构酶II抑制剂之前施用所述铂剂。

18. 根据权利要求1-17中任一项所述的方法,其中所述肺癌为小细胞肺癌(SCLC)。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中所述SCLC为广泛期SCLC(ES-SCLC)。

20. 根据权利要求19所述的方法, 其中所述个体从未接受过对ES-SCLC的治疗。
21. 根据权利要求1-20中任一项所述的方法, 其中所述个体的血液肿瘤突变负荷(bTMB)为至少约10。
22. 根据权利要求21所述的方法, 其中所述个体的bTMB为至少约16。
23. 根据权利要求1-22中任一项所述的方法, 其中所述肺癌已转移至脑部。
24. 根据权利要求1-23中任一项所述的方法, 其中所述肺癌已转移至肝脏。
25. 根据权利要求1-24中任一项所述的方法, 其中所述肺癌已转移至淋巴结。
26. 根据权利要求1-25中任一项所述的方法, 其中所述肺癌已转移至肾上腺。
27. 根据权利要求1-26中任一项所述的方法, 其中所述个体为至少65岁。
28. 根据权利要求1-27中任一项所述的方法, 其中所述个体为PD-L1阴性。
29. 根据权利要求28所述的方法, 其中如果来自所述患者的样本中小于1%的肿瘤细胞或肿瘤浸润免疫细胞表达PD-L1, 则所述患者为PD-L1阴性。
30. 根据权利要求1-29中任一项所述的方法, 其中所述抗PD-L1抗体、所述铂剂和所述拓扑异构酶II抑制剂各自经静脉内施用。
31. 一种治疗患有广泛期小细胞肺癌(ES-SCLC)的个体的方法, 所述方法包括向所述个体施用有效量的阿特珠单抗、卡铂和依托泊苷, 其中施用1200mg剂量的所述阿特珠单抗, 施用足以达到 $AUC=5\text{mg/ml/min}$ 的剂量的所述卡铂, 并且施用 100mg/m^2 剂量的所述依托泊苷, 并且其中所述治疗延长所述个体的无进展生存期(PFS)和总生存期(OS)。
32. 根据权利要求31所述的方法, 其中阿特珠单抗、卡铂和依托泊苷施用四个21天周期, 并且在第4周期后进一步施用阿特珠单抗, 其中在第1至第4周期的每个21天周期的第1天施用1200mg剂量的阿特珠单抗, 在第1至第4周期的每个21天周期的第1天施用足以达到 $AUC=5\text{mg/ml/min}$ 的剂量的卡铂, 并且在第1至第4周期的每个21天周期的第1天、第2天和第3天中的每一天施用 100mg/m^2 剂量的依托泊苷; 并且其中在第4周期后每个周期的每个21天周期的第1天进一步施用1200mg剂量的阿特珠单抗。
33. 根据权利要求31或32所述的方法, 其中所述个体从未接受过对ES-SCLC的治疗。
34. 根据权利要求31-33中任一项所述的方法, 其中所述治疗使所述个体的所述PFS延长至少约5个月。
35. 根据权利要求31-34中任一项所述的方法, 其中所述治疗使所述个体的所述OS延长至少约11个月。
36. 根据权利要求31-35中任一项所述的方法, 其中所述个体的血液肿瘤突变负荷(bTMB)为至少约10。
37. 根据权利要求36所述的方法, 其中所述个体的bTMB为至少约16。
38. 根据权利要求31-37中任一项所述的方法, 其中所述ES-SCLC已转移至脑部。
39. 根据权利要求31-38中任一项所述的方法, 其中所述ES-SCLC已转移至肝脏。
40. 根据权利要求31-39中任一项所述的方法, 其中所述肺癌已转移至淋巴结。
41. 根据权利要求31-40中任一项所述的方法, 其中所述肺癌已转移至肾上腺。
42. 根据权利要求31-41中任一项所述的方法, 其中所述个体为至少65岁。
43. 根据权利要求31-42中任一项所述的方法, 其中所述个体为PD-L1阴性。
44. 根据权利要求43所述的方法, 其中如果来自所述患者的样本中小于1%的肿瘤细胞

或肿瘤浸润免疫细胞表达PD-L1,则所述患者为PD-L1阴性。

45.根据权利要求31-44中任一项所述的方法,其中在第1至第4周期的每个21天周期的第1天按顺序施用所述阿特殊单抗、所述卡铂和所述依托泊苷。

46.根据权利要求45所述的方法,其中在第1至第4周期的每个21天周期的第1天,在所述卡铂之前施用所述阿特殊单抗,并且其中在所述依托泊苷之前施用所述卡铂。

47.根据权利要求31-46中任一项所述的方法,其中所述阿特殊单抗、所述卡铂和所述依托泊苷各自经静脉内施用。

48.根据权利要求1-47中任一项所述的方法,其中述个体为人。

49.一种试剂盒,其包含用于与铂剂和拓扑异构酶II抑制剂联合使用的抗PD-L1抗体,所述试剂盒用于根据权利要求1-30和48中任一项所述的方法治疗患有肺癌的个体。

50.一种试剂盒,其包含用于与卡铂和依托泊苷联合使用的阿特殊单抗,所述试剂盒用于根据权利要求31-48中任一项所述的方法治疗患有肺癌的个体。

51.一种抗PD-L1抗体,其用于在治疗个体中的肺癌的方法中使用,所述方法包括向所述个体施用有效量的抗PD-L1抗体、铂剂和拓扑异构酶II抑制剂,其中所述治疗延长所述个体的无进展生存期(PFS)和/或总生存期(OS)。

52.根据权利要求51所述的抗PD-L1抗体,其用于在根据权利要求2-30和48中任一项所述的方法中使用。

53.一种组合物,其包含阿特殊单抗,所述组合物用于在治疗广泛期小细胞肺癌(ES-SCLC)的方法中使用,所述方法包括向所述个体施用有效量的阿特殊单抗、卡铂和依托泊苷,其中施用1200mg剂量的所述阿特殊单抗,施用足以达到 $AUC=5\text{mg/ml/min}$ 的剂量的所述卡铂,并且施用 100mg/m^2 剂量的所述依托泊苷,并且其中所述治疗延长所述个体的无进展生存期(PFS)和总生存期(OS)。

54.根据权利要求53所述的组合物,其用于在根据权利要求31-48中任一项所述的方法中使用。

用PD-1轴结合拮抗剂、铂剂和拓扑异构酶II抑制剂治疗肺癌的方法

[0001] 相关专利申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年6月23日提交的美国临时申请号62/689,105、2018年8月17日提交的美国临时申请号62/719,461和2018年9月25日提交的美国临时申请号62/736,326的权益,这些临时申请各自的内容借此以引用的方式将其全文并入。

[0003] 以ASCII文本文件提交序列列表

[0004] 以下提交的ASCII文本文件的内容全文以引用方式并入本文:序列列表的计算机可读格式(CRF)(文件名:146392044940SEQLIST.TXT,记录日期为2019年6月18日,大小:37KB)。

技术领域

[0005] 本公开涉及通过与铂剂(例如卡铂)和拓扑异构酶II的抑制剂(例如依托泊苷)组合施用PD-1轴结合拮抗剂(例如阿特珠单抗)来治疗癌症的方法。

背景技术

[0006] 肺癌仍然是全球癌症死亡的主要原因;它是男性中最常见的癌症,约占2008年所有新癌症的13%(Jemal等人(2011)CA Cancer J.Clin 61:69-90)。据估计,2012年欧洲有313,000例新肺癌病例和268,000例肺癌死亡(GLOBOCAN(2012))。2012年全球的估计癌症发病率:死亡率和患病率。可从以下网站获取:globocan(dot)iarc(dot)fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx.)。来自美国的类似数据估计,2015年将有221,200例肺癌新病例和158,040例肺癌死亡(Siegel等人(2015)CA Cancer J Clin.65:5-29)。

[0007] 小细胞肺癌(SCLC)约占所有肺癌病例的13%,与非小细胞肺癌(NSCLC)的区别在于它的快速生长时间和转移性疾病的早期发展(Govindan等人(2006)J Clin Oncol.24:4539-44)。几乎所有SCLC病例都归因于吸烟(Pesch等人(2012)Int J Cancer.131:1210-9)。SCLC患者经常表现出广泛转移性疾病症状,并且可能会经历快速的临床恶化;因此,需要对这些患者进行快速治疗。SCLC患者生存的不良预后因素包括广泛期疾病、较差的体能状态、体重减轻以及与疾病过多相关的标记物(例如乳酸脱氢酶)(Yip等人(2000)Lung Cancer.28:173-85;Foster等人(2009)Cancer.115:2721-31)。

[0008] 患有局限期SCLC的患者可以进行化疗和放疗,具有长生存期的潜力(Stinchcombe等人(2010)Oncologist.15:187-95)。然而,大多数(约70%)SCLC患者被诊断为广泛期疾病(ES-SCLC),其生存期前景不佳(中位总生存期[OS]约为10个月)(Socinski等人(2009).J Clin Oncol.27:4787-92)。胸痛、呼吸困难和咳嗽是肺癌患者最常经历的疾病相关症状。单独化疗可以减轻ES-SCLC患者的症状并延长其生存期,然而长生存期是罕见的(Johnson等人(2004)Hematol Oncol Clin North Am.18:309-22;Demedts等人(2010)Eur Respir J.35:202-15)。

[0009] I期SCLC患者的五年相对生存率约为31%,但是IV期的五年相对生存率下降至约

2% (美国癌症协会; 小细胞肺癌生存率, 按阶段划分: [www\(dot\) cancer\(dot\) org/cancer/small-cell-lung-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates\(dot\) html](http://www(dot) cancer(dot) org/cancer/small-cell-lung-cancer/detection-diagnosis-staging/survival-rates(dot) html)。2018年6月访问)。因此, 本领域中需要治疗肺癌的方法, 例如提高生存率的方法。

[0010] 本文所引用的所有参考文献, 包括专利申请、专利公布和UniProtKB/Swiss-Prot登录号以引用的方式将其整体并入本文中, 如同每个个别参考文献特定地和个别地指示为以引用的方式并入一样。

发明内容

[0011] 本文提供了抗PD-L1抗体用于治疗肺癌患者的方法和用途。特别地, 这些方法和用途是基于来自在之前未经治疗的患有广泛期小细胞肺癌 (ES-SCLC) 个体中阿特珠单抗 (TECETRIQ®) 与卡铂和依托泊苷联合治疗的随机III期临床研究的数据。该研究表明, 与单独化疗相比, 以 TECENTRIQ® (阿特珠单抗) 加化疗 (卡铂和依托泊苷) 的联合疗法进行的初始 (一线) 治疗帮助患有广泛期小细胞肺癌 (ES-SCLC) 的人显著延长生命。与单独化疗相比, 基于TECENTRIQ的联合疗法还降低了疾病恶化或死亡 (PFS) 的风险。TECENTRIQ和化学疗法联合疗法的安全性似乎与个别药物的已知安全性特征谱相一致, 并且对于联合疗法未发现新的安全性信号。

[0012] 一方面, 本文提供治疗患有肺癌的个体的方法, 包括向所述个体施用有效量的抗PD-L1抗体、铂剂和拓扑异构酶II抑制剂, 其中所述治疗延长了所述个体的无进展生存期 (PFS)。在一些实施例中, 治疗延长了个体的总生存期 (OS)。

[0013] 在另一方面, 本文提供了治疗患有肺癌的个体的方法, 包括向所述个体施用有效量的抗PD-L1抗体、铂剂和拓扑异构酶II抑制剂, 与接受铂剂和拓扑异构酶II抑制剂治疗的患有肺癌的个体相比, 所述治疗延长了个体的总生存期 (OS) (例如, 延长了至少约0.5、1、1.25、1.5、1.75、2、2.25、2.5、2.75或3个月中的任一者)。在一些实施例中, 治疗使OS延长了例如至少约10.5、10.75、11、11.25、11.5、11.75、12、12.25、12.5、12.75、13、13.25、13.5、13.75或14个月中的任一者。在一些实施例中, 治疗使OS延长了超过14个月, 例如延长了约14.25、14.5、14.75、15、15.25、15.5、15.75或超过15.75个月中的任一者。在一些实施例中, 治疗使OS延长了约15.9个月。

[0014] 在一些实施例中, 治疗使个体的PFS延长了至少约5个月。在一些实施例中, 治疗使个体的PFS延长了至少约5.2个月。在一些实施例中, 治疗使个体的PFS延长了至少约5.5个月。在一些实施例中, 治疗使个体的PFS延长了至少约5.6个月。在一些实施例中, 治疗使个体的PFS延长了至少约6个月。在一些实施例中, 治疗使个体的OS延长了至少约11个月。在一些实施例中, 治疗使个体的OS延长了至少约11.5个月。在一些实施例中, 治疗使个体的OS延长了至少约12个月。在一些实施例中, 治疗使个体的OS延长了至少约12.3个月。

[0015] 在一些实施例中, 抗PD-L1抗体包含: (a) 重链可变区 (V_H), 其包含: 含有GFTFSDSWIH (SEQ ID NO:1) 的氨基酸序列的HVR-H1、含有AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:2) 的氨基酸序列的HVR-2和含有RHWPGGFDY (SEQ ID NO:3) 的氨基酸序列的HVR-3; 以及 (b) 轻链可变区 (V_L), 其包含: 含有RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:4) 的氨基酸序列的HVR-L1、含有SASFLYS (SEQ ID NO:5) 的氨基酸序列的HVR-L2和含有QQYLYHPAT (SEQ ID NO:6) 的氨基酸

序列的HVR-L3。在一些实施例中,抗PD-L1抗体包含重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L),所述重链可变区包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。在一些实施例中,抗PD-L1抗体为阿特殊单抗。

[0016] 在一些实施例中,铂剂为卡铂或顺铂。在一些实施例中,铂剂为卡铂。在一些实施例中,拓扑异构酶II抑制剂为依托泊苷、替尼泊苷、阿霉素、道诺霉素、米托蒽醌、安吡啶、玫瑰树碱、金精三羧酸或HU-331。在一些实施例中,拓扑异构酶抑制剂为依托泊苷。在一些实施例中,铂剂为卡铂,并且拓扑异构酶II抑制剂为依托泊苷。

[0017] 在一些实施例中,施用1200mg剂量的抗PD-L1抗体,施用足以达到 $AUC=5\text{mg/ml/min}$ 的剂量的铂剂,施用 100mg/m^2 剂量的拓扑异构酶II抑制剂。在一些实施例中,抗PD-L1抗体、铂剂和拓扑异构酶II抑制剂均施用四个21天周期,并且其中在第1至第4周期的每个21天周期中,第1天施用1200mg剂量的抗PD-L1抗体,在第1天施用足以达到 $AUC=5\text{mg/ml/min}$ 的剂量的铂剂,并且在第1天、第2天和第3天中的每一天施用 100mg/m^2 剂量的拓扑异构酶II抑制剂。在一些实施例中,在第4周期后进一步施用抗PD-L1抗体,其中,在第4周期后每个周期的每个21天周期的第1天施用1200mg剂量的抗PD-L1抗体。在一些实施例中,在第1至第4周期的第1天按顺序施用抗PD-L1抗体、铂剂和拓扑异构酶II抑制剂。在一些实施例中,在第1至第4周期的第1天,在铂剂之前施用抗PD-L1抗体,并且其中在拓扑异构酶II抑制剂之前施用铂剂。

[0018] 在一些实施例中,肺癌为小细胞肺癌(SCLC)。在一些实施例中,SCLC为广泛期SCLC(ES-SCLC)。在一些实施例中,个体从未接受过对ES-SCLC的治疗。在一些实施例中,个体的血液肿瘤突变负荷(bTMB)为至少约10。在一些实施例中,个体的bTMB为至少约16。在一些实施例中,肺癌已转移至脑部。在一些实施例中,肺癌已转移至肝脏。在一些实施例中,肺癌已转移至肾上腺。在一些实施例中,肺癌已转移至淋巴结。在一些实施例中,肺癌已在肺内转移(例如,在疾病的原始部位之外)或转移至另一肺。在一些实施例中,个体为至少65岁(例如,在约65至约74岁之间,在约75至约84岁之间或大于约85岁)。在一些实施例中,个体为PD-L1阴性。在一些实施例中,例如,根据本文所述的测定,如果来自个体的样本中小于1%的肿瘤细胞(TC)和/或肿瘤浸润免疫细胞(IC)表达PD-L1,则个体为PD-L1阴性。

[0019] 在一些实施例中,抗PD-L1抗体、铂剂和拓扑异构酶II抑制剂各自经静脉内施用。

[0020] 在另一方面,本文提供了治疗患有广泛期小细胞肺癌(ES-SCLC)的个体的方法,包括向所述个体施用有效量的阿特殊单抗、卡铂和依托泊苷,其中,施用1200mg剂量的阿特殊单抗,施用足以达到 $AUC=5\text{mg/ml/min}$ 的剂量的卡铂,施用 100mg/m^2 剂量的依托泊苷,其中所述治疗延长所述个体的无进展生存期(PFS)和总生存期(OS)。

[0021] 在一些实施例中,阿特殊单抗、卡铂和依托泊苷施用四个21天周期,并且在第4周期后进一步施用阿特殊单抗,其中在第1至第4周期的每个21天周期的第1天施用1200mg剂量的阿特殊单抗,在第1至第4周期的每个21天周期中的第1天施用足以达到 $AUC=5\text{mg/ml/min}$ 的剂量的卡铂,并且在第1至第4周期的每个21天周期的第1天、第2天和第3天中的每一天施用 100mg/m^2 剂量的依托泊苷;并且在第4周期后每个周期的每个21天周期的第1天进一步施用1200mg剂量的阿特殊单抗。

[0022] 在一些实施例中,治疗使个体的PFS延长了至少约5个月。在一些实施例中,治疗使个体的PFS延长了至少约5.2个月。在一些实施例中,治疗使个体的PFS延长了至少约5.5个

月。在一些实施例中,治疗使个体的PFS延长了至少约5.6个月。在一些实施例中,治疗使个体的PFS延长了至少约6个月。在一些实施例中,治疗使个体的OS延长了至少约11个月。在一些实施例中,治疗使个体的OS延长了至少约11.5个月。在一些实施例中,治疗使个体的OS延长了至少约12个月。在一些实施例中,治疗使个体的OS延长了至少约12.3个月。

[0023] 在一些实施例中,个体从未接受过对ES-SCLC的治疗。在一些实施例中,个体的血液肿瘤突变负荷(bTMB)为至少约10。在一些实施例中,个体的bTMB为至少约16。在一些实施例中,ES-SCLC已转移至脑部。在一些实施例中,ES-SCLC已转移至肝脏。在一些实施例中,个体为至少65岁。

[0024] 在一些实施例中,在第1至第4周期的每个21天周期的第1天按顺序施用阿特珠单抗、卡铂和依托泊苷。在一些实施例中,在第1至第4周期的每个21天周期的第1天,在卡铂之前施用阿特珠单抗,并且其中在依托泊苷之前施用卡铂。在一些实施例中,阿特珠单抗、卡铂和依托泊苷各自经静脉内施用。

[0025] 在一些实施例中,个体为人。

[0026] 在另一方面,本文提供了试剂盒,其包含用于与铂剂和拓扑异构酶II抑制剂结合使用的抗PD-L1抗体,所述试剂盒用于根据以上和本文所述的任何方法治疗患有肺癌的个体。本文也提供了试剂盒,包含用于与卡铂和依托泊苷结合使用的阿特珠单抗,所述试剂盒用于根据以上和本文所述的任何方法治疗患有肺癌的个体。

[0027] 在另一方面,本文提供了抗PD-L1抗体,其用于在治疗个体的肺癌的方法使用,该方法包括向个体施用有效量的抗PD-L1抗体、铂剂和拓扑异构酶II抑制剂,其中所述治疗延长了个体的无进展生存期(PFS)和/或总生存期(OS)。在一些实施例中,抗PD-L1抗体用于根据以上或本文描述的任何方法的方法中使用。

[0028] 在另一方面,本文提供了包含阿特珠单抗的组合物,所述组合物用于在治疗广泛期小细胞肺癌(ES-SCLC)的方法中使用,所述方法包括向个体施用有效量的阿特珠单抗、卡铂和依托泊苷,其中施用1200mg剂量的阿特珠单抗,施用足以达到AUC=5mg/ml/min的剂量的卡铂,施用100mg/m²剂量的依托泊苷,其中所述治疗延长所述个体的无进展生存期(PFS)和总生存期(OS)。在一些实施例中,该组合物用于根据以上或本文所述的任何一种方法的方法中使用。

[0029] 应了解,本文所述的各种实施例的一种、一些或所有特性可组合形成本发明的其他实施例。本发明的这些和其他方面对于本领域技术人员将变得显而易见。通过下面的详细描述进一步描述本发明的这些和其他实施例。

附图说明

[0030] 专利或申请文件含有至少一幅彩色绘图。在提出请求并支付必要的费用后,专利局将提供带有一幅或多幅彩图的本专利或专利申请公布的拷贝。

[0031] 图1提供了实例1中描述的临床试验研究设计的示意图。A分组包括201例患者。B分组包括202例患者。PCI=预防性颅脑辐照。PD=疾病进展。

[0032] 图2提供了A分组(阿特珠单抗+卡铂+依托泊苷)与对比B分组(安慰剂+卡铂+依托泊苷)中患者的总生存期(OS)的Kaplan-Meier图。

[0033] 图3提供了A分组(阿特珠单抗+卡铂+依托泊苷)与对比B分组(安慰剂+卡铂+依

托泊苷)中患者的无进展生存期(PFS)的Kaplan-Meier图。

[0034] 图4提供了A分组对比B分组中患者中总响应率(ORR)和响应持续时间(DOR)的比较。(CR=完全响应;CR/PR=完全响应/部分响应;SD=疾病稳定;PD=疾病进展。)根据RECIST v1.1标准评估了ORR和DOR。

[0035] 图5A提供了森林图,显示在A分组(阿特珠单抗+卡铂+依托泊苷)对比B分组(安慰剂+卡铂+依托泊苷)中具有各种基线危险因素的患者OS亚组分析。(P=安慰剂;A=阿特珠单抗。)中位数是根据KM方法估算的。相对于P+CE的危险比及相关的置信区间是使用未分层Cox回归估算的。肝脏转移仅基于靶病灶。

[0036] 图5B也提供了森林图,显示在A分组(阿特珠单抗+卡铂+依托泊苷)对比B分组(安慰剂+卡铂+依托泊苷)中具有各种基线危险因素的患者OS亚组分析。

[0037] 图6A提供了森林图,显示在A分组(阿特珠单抗+卡铂+依托泊苷)对比B分组(安慰剂+卡铂+依托泊苷)中具有各种基线危险因素的患者PFS亚组分析。(P=安慰剂;A=阿特珠单抗。)中位数是根据KM方法估算的。相对于P+CE的危险比及相关的置信区间是使用未分层Cox回归估算的。肝脏转移仅基于靶病灶。

[0038] 图6B也提供了森林图,显示在A分组(阿特珠单抗+卡铂+依托泊苷)对比B分组(安慰剂+卡铂+依托泊苷)中具有各种基线危险因素的患者PFS亚组分析。

[0039] 图7A提供了在A分组(阿特珠单抗+卡铂+依托泊苷)对比B分组(安慰剂+卡铂+依托泊苷)中具有bTMB ≥ 16 的患者的总生存期的Kaplan Meier图。

[0040] 图7B提供了在A分组(阿特珠单抗+卡铂+依托泊苷)对比B分组(安慰剂+卡铂+依托泊苷)中具有bTMB < 16 的患者的总生存期的Kaplan Meier图。

[0041] 图8A提供了在A分组(阿特珠单抗+卡铂+依托泊苷)对比B分组(安慰剂+卡铂+依托泊苷)中具有bTMB ≥ 10 的患者的总生存期的Kaplan Meier图。

[0042] 图8B提供了在A分组(阿特珠单抗+卡铂+依托泊苷)对比B分组(安慰剂+卡铂+依托泊苷)中具有bTMB < 10 的患者的总生存期的Kaplan Meier图。

[0043] 图9A提供了在A分组(阿特珠单抗+卡铂+依托泊苷)对比B分组(安慰剂+卡铂+依托泊苷)中具有bTMB ≥ 16 的患者的无进展生存期的Kaplan Meier图。

[0044] 图9B提供了在A分组(阿特珠单抗+卡铂+依托泊苷)对比B分组(安慰剂+卡铂+依托泊苷)中具有bTMB < 16 的患者的无进展生存期的Kaplan Meier图。

[0045] 图10A提供了在A分组(阿特珠单抗+卡铂+依托泊苷)对比B分组(安慰剂+卡铂+依托泊苷)中具有bTMB ≥ 10 的患者的无进展生存期的Kaplan Meier图。

[0046] 图10B提供了在A分组(阿特珠单抗+卡铂+依托泊苷)对比B分组(安慰剂+卡铂+依托泊苷)中具有bTMB < 10 的患者的无进展生存期的Kaplan Meier图。

[0047] 图11A提供了森林图,显示在A分组(阿特珠单抗+卡铂+依托泊苷)对比B分组(安慰剂+卡铂+依托泊苷)中具有各种基线危险因素的患者OS亚组分析。

[0048] 图11B提供了另一个森林图,显示在A分组(阿特珠单抗+卡铂+依托泊苷)对比B分组(安慰剂+卡铂+依托泊苷)中具有各种基线危险因素的患者OS亚组分析。

[0049] 图11C提供了另一个森林图,显示在A分组(阿特珠单抗+卡铂+依托泊苷)对比B分组(安慰剂+卡铂+依托泊苷)中具有各种基线危险因素的患者OS亚组分析。

[0050] 图12A提供了A分组(阿特珠单抗+卡铂+依托泊苷)对比B分组(安慰剂+卡铂+依托泊苷)中具有各种基线危险因素的患者OS亚组分析。

泊昔)的PD-L1表达水平<1%的BEP1(生物标志物可评价人群1)中患者的无进展生存期的Kaplan Meier图。

[0051] 图12B提供了A分组(阿特殊单抗+卡铂+依托泊昔)对比B分组(安慰剂+卡铂+依托泊昔)的PD-L1表达水平<1%的BEP2(生物标志物可评价人群2)中患者的无进展生存期的Kaplan Meier图。

[0052] 图13A提供了A分组(阿特殊单抗+卡铂+依托泊昔)对比B分组(安慰剂+卡铂+依托泊昔)的PD-L1表达水平<1%的BEP1(生物标志物可评价人群1)中患者的总生存期的Kaplan Meier图。

[0053] 图13B提供了A分组(阿特殊单抗+卡铂+依托泊昔)对比B分组(安慰剂+卡铂+依托泊昔)的PD-L1表达水平<1%的BEP2(生物标志物可评价人群2)中患者的总生存期的Kaplan Meier图。

具体实施方式

[0054] I. 定义

[0055] 在详细描述本发明之前,应当理解,本发明不限于特定的组合物或生物系统,这些组合物或生物系统当然可以变化。另外应当了解,本文使用的术语只是为了描述特定实施例的目的,并非旨在进行限制。

[0056] 如在本说明书和所附权利要求中所用,单数形式“一个”、“一种”、“该”和“所述”包括复数指代物,除非上下文另外明确规定。因此,例如,对“分子”的提及包括两个或更多此类分子的组合等。

[0057] 如本文所用的术语“约”是指为此技术领域中的技术人员容易知晓的相应值的常见误差范围。在本文中提及“约”值或参数包括(且描述)涉及该值或参数本身的实施例。

[0058] 应当理解,本文所述的发明的方面和实施例包括“包含”、“由以下组成”及“基本上由以下组成”所指的方面和实施例。

[0059] 术语“PD-1轴结合拮抗剂”是指抑制PD-1轴结合配偶体与其一个或多个结合配偶体的相互作用,以消除由PD-1信号传导轴上的信号传导引起的T细胞功能障碍,从而恢复或提高T细胞功能(例如,增殖、细胞因子产生、靶细胞杀伤)。如本文所用,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。

[0060] 术语“PD-1结合拮抗剂”是指减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-1与其一种或多种结合配偶体(诸如PD-L1、PD-L2)相互作用产生的信号传导的分子。在一些实施例中,PD-1结合拮抗剂为抑制PD-1与其一个或多个结合配偶体结合的分子。在具体方面,PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD-L1和/或PD-L2的结合。例如,PD-1结合拮抗剂包括抗PD-1抗体及其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白、寡肽和其他分子,这些分子减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-1与PD-L1和/或PD-L2相互作用产生的信号传导。在一个实施例中,PD-1结合拮抗剂可减少由T淋巴细胞上表达的细胞表面蛋白介导的或通过其介导的负共刺激信号,该表面蛋白通过PD-1介导的信号传导使功能障碍的T细胞功能障碍较少(例如,提高效应子对抗原识别的响应)。在一些实施例中,PD-1结合拮抗剂为抗PD-1抗体。下文提供了PD-1结合拮抗剂的具体实例。

[0061] 术语“PD-L1结合拮抗剂”是指减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-L1与其一种或多

种结合配偶体 (诸如PD-1、B7-1) 相互作用产生的信号传导的分子。在一些实施例中,PD-L1结合拮抗剂为抑制PD-L1与其结合配偶体结合的分子。在具体方面,PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1至PD-1和/或B7-1的结合。在一些实施例中,PD-L1结合拮抗剂包括抗PD-L1抗体及其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白、寡肽和其他分子,这些分子减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-L1与一种或多种其结合配偶体 (诸如PD-1、B7-1) 相互作用产生的信号传导。在一个实施例中,PD-L1结合拮抗剂可减少由T淋巴细胞上表达的细胞表面蛋白介导的或通过其介导的负共刺激信号,该表面蛋白通过PD-L1介导的信号传导使功能障碍的T细胞功能障碍较少 (例如,提高效应子对抗原识别的响应)。在一些实施例中,PD-L1结合拮抗剂为抗PD-L1抗体。下文提供了PD-L1结合拮抗剂的具体实例。

[0062] 术语“PD-L2结合拮抗剂”是指减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-L2与其一种或多种结合配偶体 (诸如PD-1) 的相互作用产生的信号传导的分子。在一些实施例中,PD-L2结合拮抗剂为抑制PD-L2与其一个或多个结合配偶体结合的分子。在具体方面,PD-L2结合拮抗剂抑制PD-L2与PD-1的结合。在一些实施例中,PD-L2拮抗剂包括抗PD-L2抗体及其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白、寡肽和其他分子,这些分子减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-L2与一种或多种其结合配偶体 (诸如PD-1) 相互作用产生的信号传导。在一个实施例中,PD-L2结合拮抗剂可减少由T淋巴细胞上表达的细胞表面蛋白介导的或通过其介导的负共刺激信号,该表面蛋白通过PD-L2介导的信号传导使功能障碍的T细胞功能障碍较少 (例如,提高效应子对抗原识别的响应)。在一些实施例中,PD-L2结合拮抗剂为免疫粘附素。

[0063] “持续响应”是指在停止治疗后对减少肿瘤生长的持续作用。例如,与施用阶段开始时的大小相比,肿瘤大小可以保持相同或较小。在一些实施例中,持续响应的持续时间至少与治疗持续时间相同,为治疗持续时间的至少1.5倍、2.0倍、2.5倍或3.0倍长度。

[0064] 术语“药物制剂”是指处于允许活性成分的生物活性有效的形式,并且不含对于将被施用制剂的受试者具有不可接受的毒性的另外组分的制备物。此类制剂为无菌制剂。“药学上可接受的”赋形剂 (载体、添加剂) 是指可合理地施用于哺乳动物以提供有效剂量的所用活性成分的赋形剂。

[0065] 如本文所用,术语“治疗”是指被设计为在临床病理过程中改变被治疗的个体或细胞的自然进程的临床干预。理想的治疗效果包括降低疾病进展速度、缓和或减轻疾病状态以及缓解或改善预后。例如,如果减轻或消除了与癌症有关的一种或多种症状,包括但不限于减少癌细胞的增殖 (或破坏)、减轻疾病所致的症状、提高患有该疾病的人的生活质量、减少治疗该疾病所需的其他药物的剂量和/或延长个体的生存期,则成功地“治疗”了个体。

[0066] 如本文所用,“延迟疾病的进展”意指延缓、阻碍、减缓、迟滞、稳定和/或推迟疾病 (诸如癌症) 的发展。这种延迟可以具有不同的时间长度,这取决于病史和/或待治疗的个体。对于本领域技术人员显而易见的是,充分或显著延迟实际上可以涵盖预防,因为个体不会患该病。例如,晚期癌症,诸如转移的发展,可能被延迟。

[0067] “有效量”至少是实现可测量的改善或预防特定病症所需的最小量。本文的有效量可以根据诸如患者的疾病状态、年龄、性别和体重以及抗体在个体中引起预期应答的能力等因素而变化。有效量也是治疗有益作用超过治疗的任何毒性或有害作用的量。对于预防用途、有益或预期结果包括诸如消除或降低风险、减轻严重程度或延迟疾病发作,包括疾病的生化、组织学和/或行为症状、其并发症以及在疾病发展过程中出现的中间病理表型。对

于治疗用途、有益或预期结果包括临床结果,诸如减少由疾病引起的一种或多种症状、提高患病者的生活质量、减少治疗该疾病所需的其他药物的剂量、增强其他药物的效果(诸如通过靶向、延迟疾病进展和/或延长生存期)。在癌症或肿瘤的情况下,有效量的药物可能减少癌细胞的数量;减小肿瘤大小;抑制(即在某种程度上减慢或预期停止)癌细胞浸润进入周围器官中;抑制(即在某种程度上减慢并预期停止)肿瘤转移;在某种程度上抑制肿瘤的生长;以及/或在某种程度上减轻与病症有关的一种或多种症状。有效量可以一次或多次施用。出于本发明的目的,药物、化合物或药物组合物的有效量为足以直接或间接地进行预防或治疗的量。如在临床背景中所理解的,与另一药物、化合物或药物组合物结合可以达到或不能达到有效量的药物、化合物或药物组合物。因此,可以在施用一种或多种治疗剂的情况下考虑“有效量”,并且如果与一种或多种其他试剂结合可以获得或实现预期结果,则可以考虑给予有效量的单一药剂。

[0068] 如本文所用,“与……结合”是指除一种治疗方式之外还施用另一种治疗方式。这样,“与……结合”是指在向个体施用一种治疗方式之前,之中或之后施用另一种治疗方式。

[0069] “病症”是将从治疗获益的任何病状,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述病症的病理性病状。

[0070] 术语“细胞增殖性疾病”和“增殖性疾病”是指与某种程度的异常细胞增殖相关的病症。在一个实施例中,所述细胞增殖性疾病为癌症。在一个实施例中,所述细胞增殖性疾病为肿瘤。

[0071] 如本文所用,术语“肿瘤”是指所有赘生性细胞生长和增殖,无论是恶性还是良性,以及所有前癌性和癌性细胞和组织。术语“癌症”、“癌性”、“细胞增生性疾病”、“增生性疾病”和“肿瘤”在本文中并不互相排斥。

[0072] 术语“癌症”和“癌性”是指或描述哺乳动物中通常以细胞生长不受控制为特征的生理状况。癌症的示例包括但不限于癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病或淋巴样恶性肿瘤。此类癌症的更具体示例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、肺腺癌和肺鳞癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌或胃部癌症(包括胃肠道癌和胃肠道间质癌)、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、泌尿道癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、直肠癌、结直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、唾液腺癌、肾脏癌症或肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝细胞癌、肛门癌、阴茎癌、黑色素瘤、浅表扩散性黑色素瘤、扁桃状恶性黑色素瘤、肢端雀斑样痣性黑色素瘤、结节性黑色素瘤、多发性骨髓瘤和B细胞淋巴瘤(包括低级别/滤泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL)、小淋巴细胞(SL) NHL、中高级别/滤泡性NHL、中高级别弥散性NHL、高级别免疫原性NHL、高级别淋巴母细胞性NHL、高级别小非裂解细胞性NHL、巨大肿块NHL、套细胞淋巴瘤、AIDS相关淋巴瘤和华氏巨球蛋白血症)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、毛细胞白血病、慢性粒细胞性白血病和移植后的淋巴增生性疾病(PTLD),以及与斑痣性错构瘤、水肿(诸如与脑肿瘤有关的)、Meigs综合征、脑部、以及头颈癌和相关转移相关的异常血管增生。在某些实施例中,适于通过本发明的抗体治疗的癌症包括乳腺癌、结直肠癌、直肠癌、非小细胞肺癌、胶质母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、肾细胞癌、前列腺癌、肝癌、胰腺癌、软组织肉瘤、卡波济肉瘤、类癌瘤、头颈癌、卵巢癌、间皮瘤和多发性骨髓瘤。在一些实施例中,癌症选自:小细胞肺癌、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、黑色素瘤、乳腺癌、胃癌、结直肠癌(CRC)和肝细胞癌。

[0073] 如本文所用,术语“细胞毒性剂”是指对细胞有害(例如,造成细胞死亡、抑制增殖或以其他方式阻碍细胞功能)的任何试剂。细胞毒性剂包括但不限于放射性同位素(例如,At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²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;以及毒素,诸如细菌、真菌、植物或动物来源的小分子毒素或酶活性毒素,包括其片段和/或变体。示例性的细胞毒性剂可以选自抗微管剂、铂配位络合物、烷基化剂、抗生素剂、拓扑异构酶II抑制剂、抗代谢剂、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生成抑制剂、免疫治疗剂、促凋亡剂、LDH-A抑制剂、脂肪酸生物合成抑制剂、细胞周期信号传导抑制剂、HDAC抑制剂、蛋白酶体抑制剂和癌症代谢抑制剂。在一个实施例中,细胞毒性剂是紫杉烷。在一个实施例中,紫杉烷是紫杉醇或多西他赛。在一些实施例中,细胞毒性剂是铂剂。在一个实施例中,细胞毒性剂是EGFR的拮抗剂。在一个实施例中,EGFR的拮抗剂是N-(3-乙炔基苯基)-6,7-双(2-甲氧基乙氧基)喹唑啉-4-胺(例如厄洛替尼)。在一个实施例中,细胞毒性剂是RAF抑制剂。在一个实施例中,RAF抑制剂是BRAF和/或CRAF抑制剂。在一个实施例中,RAF抑制剂是维罗非尼。在一个实施例中,细胞毒性剂是PI3K抑制剂。

[0074] “化疗剂”包括可用于治疗癌症的化合物。化疗剂的示例包括厄洛替尼(TARCEVA[®], Genentech/OSI Pharm.)、硼替佐米(VELCADE[®], Millennium Pharm.)、双硫仑、表没食子儿茶素没食子酸酯、盐孢子酰胺A、卡非佐米、17-AAG(格尔德霉素)、根赤壳菌素、乳酸脱氢酶A(LDH-A)、氟维司群(FASLODEX[®], 阿斯利康(AstraZeneca))、舒尼替布(SUTENT[®], 辉瑞(Pfizer)/Sugen)、来曲唑(FEMARA[®], 诺华(Novartis))、甲磺酸伊马替尼(GLEEVEC[®], 诺华)、非那沙酯(VATALANIB[®], 诺华)、奥沙利铂(ELOXATIN[®], 赛诺菲(Sanofi))、5-FU(5-氟尿嘧啶)、亚叶酸、雷帕霉素(西罗莫司, RAPAMUNE[®], 惠氏(Wyeth))、拉帕替尼(TYKERB[®], GSK572016, 葛兰素史克(Glaxo Smith Kline))、罗纳法米(Lonafamib)(SCH 66336)、索拉非尼(NEXAVAR[®], 拜耳实验室(Bayer Labs))、吉非替尼(IRESSA[®], 阿斯利康)、AG1478;烷基化剂诸如噻替派和CYTOXAN[®]环磷酰胺;烷基磺酸盐,诸如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮杂环丙烷类,诸如苯佐替派(benzodopa)、卡波醌、美妥替哌(meturedopa)和乌瑞替哌(uredopa);乙亚胺类和甲基蜜胺类,包括六甲蜜胺、三亚乙基蜜胺、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酰胺和三羟甲基蜜胺;番荔枝内酯类(尤其是布拉他辛(bullatacin)和布拉他辛酮(bullatacinone));喜树碱(包括拓扑替康和伊立替康);苔藓抑素;卡利他汀(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);念珠藻素(cryptophycin)(特别是念珠藻素1和念珠藻素8);肾上腺皮质类固醇(包括泼尼松和泼尼松龙);醋酸环丙孕酮;5 α -还原酶(包括非那雄胺和度他雄胺);伏立诺他、罗米地辛、泛比司他、丙戊酸、莫西司他(mocetinostat)、多拉他汀(dolastatin);阿地白介素、滑石、杜卡霉素(包括合成类似KW-2189和CB1-TM1);五加苷素(eleutherobin);水鬼蕉碱;匍枝珊瑚醇(sarcodictyin);海绵抑素;氮芥类,诸如苯丁酸氮芥、氯苯哌嗪、氯磷酰胺、雌莫司汀、异环磷酰胺、甲氮芥、盐酸甲氧氮芥、美法仑、新氮芥(novembichin)、苯芥胆甾醇、泼尼氮芥、曲洛磷胺(trofosfamide)、乌拉莫司汀(uracil mustard);亚硝基脲,诸如卡莫司汀、氯脲霉素、福莫司汀、洛莫斯汀、尼莫斯汀和拉尼莫斯汀;抗生素,诸如烯二炔抗生素(例如加利车霉素

(calicheamicin), 尤其是加利车霉素 γ 1 I 和加利车霉素 ω 1 I (Angew Chem.Intl.Ed.Engl.1994 33:183-186); 达内霉素(dynemicin), 包括达内霉素A; 双膦酸盐, 诸如氯膦酸盐; 艾司米星; 以及新抑癌菌素(neocarzinostatin) 发色团和相关的发色蛋白烯二炔类抗生素发色团; 阿克拉霉素(aclacinomycin)、放线菌素(actinomycin)、氨茴霉素(authramycin)、偶氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素、放线菌素(cactinomycin)、卡柔比星(carabycin)、洋红霉素(caminomycin)、嗜癌素(carzinophilin)、色霉素(chromomycinis)、更生霉素、道诺霉素、地托比星(detorubicin)、6-叠氮-5-氧代-L-正亮氨酸、**ADRIAMYCIN[®]** (阿霉素)、吗啉代-阿霉素、氰基吗啉代-阿霉素、2-吡咯啉合-阿霉素和脱氧阿霉素、表柔比星、伊索比星、伊达比星、马塞罗霉素(marcellomycin); 丝裂霉素, 诸如丝裂霉素C、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、甲基丝裂霉素、嘌呤霉素、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑菌素、链脲佐菌素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他汀、佐柔比星; 抗代谢物, 诸如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-Fu); 叶酸类似物, 诸如二甲叶酸(denopterin)、甲氨蝶呤、喋罗呤(pteropterin)、三甲蝶呤; 嘌呤类似物, 诸如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鸟嘌呤; 嘧啶类似物, 诸如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮杂尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、多西氟啶、依诺他滨、氟尿苷; 雄激素, 诸如卡普睾酮、丙酸屈他雄酮、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯; 抗肾上腺素类药物, 诸如氨鲁米特、米托坦、曲洛斯坦; 叶酸补充剂, 诸如亚叶酸; 醋葡醛内酯; 醛磷酰胺糖苷; 氨基乙酰丙酸; 恩尿嘧啶; 安吡啶; 倍曲布西(bestrabucil); 比生群; 依达曲沙(edatraxate); 地磷酰胺(defofamine); 秋水仙胺; 亚胺醌; 依洛尼塞(elfomithine); 依利醋铵; 埃博霉素; 乙环氧啶; 硝酸镓; 羟基脲; 香菇多糖; 氯尼达明(lonidainine); 美登木素生物碱, 诸如美登素和安丝菌素; 米托胍脲; 米托蒽醌; 莫派达醇(mopidamnol); 二胺硝吡啶(nitraerine); 喷司他丁; 蛋氨酸芥(phenamet); 吡柔比星; 洛索蒽醌(losoxantrone); 鬼臼酸; 2-乙基肼; 甲基苄肼; **PSK[®]** 多糖复合物(美国俄勒冈州尤金市的JHS天然产物公司(JHS Natural Products, Eugene, Oreg.)); 雷佐生; 根霉素(rhizoxin); 裂孢菌素(sizofuran); 锗螺胺; 细交链孢菌酮酸; 三亚胺醌; 2,2',2''-三氯三乙胺; 单端孢霉烯族毒素(尤其是T-2毒素、维拉库林A(verracurin A)、漆斑菌素A和蛇形菌素(anguidine)); 尿烷; 长春地辛; 达卡巴嗪; 甘露醇氮芥; 二溴甘露醇; 二溴卫矛醇; 哌泊溴烷; 加西托星(gacytosine); 阿拉伯糖苷("Ara-C"); 环磷酰胺; 噻替派; 紫杉烷类, 例如TAXOL(紫杉醇; 新泽西州普林斯顿的百时美施贵宝癌症专科(Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.))、**ABRAXANE[®]** (不含氢化蓖麻油(Cremophor))、紫杉醇的白蛋白工程化纳米颗粒制剂(伊利诺伊州邵伯克的美国制药伙伴公司(American Pharmaceutical Partners, Schaumburg, Ill.)) 和 **TAXOTERE[®]** (多西紫杉醇、多西他赛; 赛诺菲-安万特(Sanofi-Aventis)); 苯丁酸氮芥; **GEMZAR[®]** (吉西他滨); 6-硫鸟嘌呤; 巯基嘌呤; 甲氨蝶呤; 铂类似物, 诸如顺铂和卡铂; 长春碱; 依托泊苷(VP-16); 异环磷酰胺; 米托蒽醌; 长春新碱; **NAVELBINE[®]** (长春瑞滨); 诺万隆(novantrone); 替尼泊苷; 依达曲塞; 道诺霉素; 氨基蝶呤; 卡培他滨(**XELODA[®]**); 伊班膦酸盐; CPT-11; 拓扑异构酶抑制剂RFS 2000; 二氟甲基鸟氨酸(DMFO); 维甲酸类, 诸如视黄酸; 以及以上任一项的药理学上可接受的盐、酸和衍生物。

[0075] 化疗剂还包括(i)起到调节或抑制激素作用于肿瘤作用的抗激素剂,诸如抗雌激素剂和选择性雌激素受体调节剂(SERM),包括例如他莫昔芬(包括 **NOLVADEX**[®]; 枸橼酸他莫昔芬)、雷洛昔芬、屈洛昔芬、碘氧芬(iodoxyfene)、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、雷洛昔芬(keoxifene)、LY117018、奥那司酮和 **FARESTON**[®] (枸橼酸托瑞米芬);(ii)抑制酶芳香化酶的芳香化酶抑制剂,其可调节肾上腺的雌激素产生,例如4(5)-咪唑类、氨基戊二酰亚胺、**MEGASE**[®] (醋酸甲地孕酮)、**AROMASIN**[®] (依西美坦;辉瑞)、福美他尼(formestanie)、法曲唑、**RIVISOR**[®] (伏罗唑)、**FEMARA**[®] (来曲唑;诺华)和 **ARIMIDEX**[®] (阿那曲唑;阿斯利康);(iii)抗雄激素类,诸如氟他米特、尼鲁米特、比卡鲁胺、亮丙瑞林和戈舍瑞林;布舍瑞林、曲普瑞林、醋酸甲羟孕酮、己烯雌酚、倍美力、氟甲睾酮、所有反式维甲酸、芬维A胺以及曲沙他滨(1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物);(iv)蛋白激酶抑制剂;(v)脂质激酶抑制剂;(vi)反义寡核苷酸,特别是那些抑制受异常细胞增殖牵连的信号传导途径中的基因表达的寡核苷酸,例如PKC- α 、Ralf和H-Ras;(vii)核酶,诸如VEGF表达抑制剂(例如 **ANGIOZYME**[®])和HER2表达抑制剂;(viii)疫苗,诸如基因疗法疫苗,例如 **ALLOVECTIN**[®]、**LEUVECTIN**[®] 和 **VAXID**[®]; **PROLEUKIN**[®]、rIL-2;拓扑异构酶1抑制剂,诸如 **LURTOTECAN**[®]; **ABARELIX**[®] rmRH;和(ix)以上任一项的药学上可接受的盐、酸和衍生物。

[0076] 化疗剂还包括抗体,诸如阿仑单抗(CamPATH)、贝伐单抗(**AVASTIN**[®], Genentech);西妥昔单抗(**ERBITUX**[®], Imclone);帕尼单抗(**VECTIBIX**[®], Amgen)、利妥昔单抗(**RITUXAN**[®], Genentech/Biogen Idec)、帕妥珠单抗(**OMNITARG**[®], 2C4, Genentech)、曲妥珠单抗(**HERCEPTIN**[®], Genentech)、托西妥单抗(Bexxar, Corixa)和抗体缀合物吉妥珠单抗奥唑米星(**MYLOTARG**[®], 惠氏)。与本发明的化合物联合的具有治疗潜力的其他人源化单克隆抗体包括:阿泊珠单抗(apolizumab)、阿塞珠单抗、阿利珠单抗、巴比妥珠单抗、莫比伐珠单抗(bivatuzumab mertansine)、莫坎妥珠单抗(cantuzumab mertansine)、西利珠单抗(cedelizumab)、塞妥珠单抗(certolizumab pegol)、西孚昔珠单抗(cidfusituzumab)、西土珠单抗(cidtuzumab)、达利珠单抗、依库珠单抗(eculizumab)、依法珠单抗(efalizumab)、依帕珠单抗(epratuzumab)、厄利珠单抗(erlizumab)、泛维珠单抗(felvizumab)、芳妥珠单抗(fontolizumab)、吉妥珠单抗奥唑米星、奥英妥珠单抗(inotuzumab ozogamicin)、伊匹单抗、拉贝珠单抗(labetuzumab)、林妥珠单抗、马妥珠单抗、美泊利单抗、莫维珠单抗、莫妥维珠单抗(motovizumab)、那他珠单抗、尼妥珠单抗、诺罗维珠单抗(nolovizumab)、奴马维珠单抗(numavizumab)、奥瑞珠单抗(ocrelizumab)、奥玛珠单抗、帕丽珠单抗、帕考珠单抗(pascolizumab)、培孚昔单抗(pecfusituzumab)、培土珠单抗(pectuzumab)、培克珠单抗(pexelizumab)、拉利维珠单抗(ralivizumab)、兰尼单抗、瑞丽维珠单抗(reslivizumab)、瑞利珠单抗(reslizumab)、瑞希维珠单抗(resyvizumab)、罗维珠单抗(rovelizumab)、卢丽珠单抗(ruplizumab)、西罗珠单抗、西利珠单抗、松妥珠单抗(Sontuzumab)、替珠单抗(tacatuzumab tetraxetan)、他度珠单抗(tadocizumab)、他利珠单抗、替非珠单抗(tefibazumab)、托珠单抗、托利珠单抗

(toralizumab)、西莫白介素单抗(tucotuzumab celmoleukin)、土库昔珠单抗(tucosituzumab)、乌马维珠单抗(umavizumab)、乌珠单抗、尤特克单抗(ustekinumab)、维西珠单抗和抗白介素-12(ABT-874/J695,惠氏研究和雅培实验室)(抗白介素-12是一种重组的人特有序列全长IgG₁抗体,经基因修饰以识别白介素-12p40蛋白)。

[0077] 化疗剂还包括“EGFR抑制剂”,是指与EGFR结合或直接相互作用并且阻止或降低其信号传导活性的化合物,并且替代地称为“EGFR拮抗剂”。此类试剂的实例包括与EGFR结合的抗体和小分子。与EGFR结合的抗体的示例包括MAb 579(ATCC CRL HB 8506)、MAb 455(ATCC CRL HB8507)、MAb 225(ATCC CRL 8508)、MAb 528(ATCC CRL 8509)(参见,美国专利号4,943,533,Mendelsohn等人)及其变体,例如嵌合的225(C225或西妥昔单抗;**ERBUTIX**[®])和重塑的人225(H225)(参见,WO 96/40210,Imclone Systems Inc.);IMC-11F8,一种靶向EGFR的完全人抗体(Imclone);结合II型突变EGFR的抗体(美国专利号5,212,290);如美国专利号5,891,996中所述结合EGFR的人源化和嵌合抗体;以及结合EGFR的人抗体,卡诸如ABX-EGF或帕尼单抗(参见W098/50433,安尼克斯(Abgenix)/Amgen);EMD 55900(Stragliotto等人Eur.J.Cancer 32A:636-640(1996));EMD7200(马妥珠单抗),一种针对EGFR的人源化EGFR抗体,与EGF和TGF- α 竞争而与EGFR结合(EMD/默克公司(Merck));人EGFR抗体,HuMax-EGFR(GenMab);完全人抗体,称为E1.1、E2.4、E2.5、E6.2、E6.4、E2.11、E6.3和E7.6.3,并在US 6,235,883中进行了描述;MDX-447(梅达雷克斯公司(Medarex Inc));以及mAb 806或人源化mAb 806(Johns等人,J.Biol.Chem.279(29):30375-30384(2004))。可以将抗EGFR抗体与细胞毒性剂缀合,从而产生免疫缀合物(参见,例如,EP659439A2,默克专利公司(Merck Patent GmbH))。EGFR拮抗剂包括小分子,诸如美国专利号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,以及以下PCT出版物:W098/14451、W098/50038、W099/09016和W099/24037中所述的化合物。特定的小分子EGFR拮抗剂包括OSI-774(CP-358774,厄洛替尼,**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]-,二盐酸盐,辉瑞公司);ZD1839,吉非替尼(**IRESSA**[®],4-(3'-氯-4'-氟苯胺基)-7-甲氧基-6-(3-吗啉代丙氧基)喹唑啉,阿斯利康);ZM105180((6-氨基-4-(3-甲基苯基-氨基)-喹唑啉,捷利康公司(Zeneca));BIBX-1382(N8-(3-氯-4-氟-苯基)-N2-(1-甲基-哌啶-4-基)-嘧啶基[5,4-d]嘧啶-2,8-二胺,勃林格殷格翰(Boehringer Ingelheim));PKI-166((R)-4-[4-[(1-苯乙基)氨基]-1H-吡咯烷酮[2,3-d]嘧啶-6-基]-苯酚);(R)-6-(4-羟苯基)-4-[(1-苯乙基)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-喹唑啉基]-4-(二甲基氨基)-2-丁烯酰胺(惠氏));AG1478(辉瑞);AG1571(SU 5271;辉瑞);双重EGFR/HER2酪氨酸激酶抑制剂,诸如拉帕替尼(**TYKERB**[®],GSK572016或N-[3-氯-4-[(3氟苯基)甲氧基]苯基]-6[[[2(甲基磺酰基)乙基]氨基]甲基]-2-呋喃基]-4-喹唑啉基)。

[0078] 化疗剂还包括“酪氨酸激酶抑制剂”,包括上段所述的EGFR靶向药物;小分子HER2

酪氨酸激酶抑制剂,诸如可从武田制药公司 (Takeda) 获得的TAK165;CP-724714,一种ErbB2受体酪氨酸激酶的口选择性地抑制剂(辉瑞和OSI);双重HER抑制剂,诸如EKB-569(可从惠氏获得),其可优先结合EGFR但同时抑制过表达HER2和EGFR的细胞;拉帕替尼(GSK572016;可从葛兰素史克公司获得),一种口服HER2和EGFR酪氨酸激酶抑制剂;PKI-166(可从诺华公司获得);泛HER抑制剂,诸如卡那替尼(CI-1033;法玛西亚公司(Pharmacia));Raf-1抑制剂,诸如可从ISIS制药公司获得的抑制Raf-1信号传导的反义剂ISIS-5132;非HER靶向的TK抑制剂,诸如甲磺酸伊马替尼(**GLEEVEC®**,可从葛兰素史克公司获得);多靶向酪氨酸激酶抑制剂,诸如舒尼替尼(**SUTENT®**,可从辉瑞获得);VEGF受体酪氨酸激酶抑制剂,诸如瓦他拉尼(PTK787/ZK222584,可从诺华/先灵公司(Schering AG)获得);MAPK细胞外调节的激酶I抑制剂CI-1040(可从法玛西亚公司获得);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-(苯氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶;姜黄素(二氟甲酰甲烷,4,5-双(4-氟苯胺基)邻苯二甲酰亚胺);含有硝基噻吩部分的酪氨酸酪氨酸;PD-0183805(华纳-兰伯特公司(Warner-Lamberg));反义分子(例如与HER编码核酸结合分子);喹唑啉类(美国专利号5,804,396);酪氨酸磷酸化抑制剂(美国专利号5,804,396);ZD6474(阿斯利康);PTK-787(诺华/先灵公司);泛HER抑制剂,诸如CI-1033(辉瑞);Affinitac(ISIS 3521; Isis/礼来制药公司(Lilly));甲磺酸伊马替尼(**GLEEVEC®**);PKI 166(诺华公司);GW2016(葛兰素史克公司);CI-1033(辉瑞);EKB-569(惠氏);塞马替尼(辉瑞);ZD6474(阿斯利康);PTK-787(诺华/先灵公司);INC-1C11(Imclone),雷帕霉素(西罗莫司,**RAPAMUNE®**);或以下任何专利出版物中所述:美国专利号5,804,396;WO 1999/09016(美国氰特公司(American Cyanamid));WO1998/43960(美国氰特公司);WO 1997/38983(华纳兰伯特);WO1999/06378(华纳兰伯特);WO 1999/06396(华纳兰伯特);WO1996/30347(辉瑞公司);WO 1996/33978(捷利康);WO 1996/3397(捷利康)和WO 1996/33980(捷利康)。

[0079] 化疗剂还包括地塞米松、干扰素、秋水仙碱、美托品、环孢素、两性霉素、甲硝唑、阿仑单抗、阿利维甲酸、别嘌呤醇、氨磷汀、三氧化二砷、天冬酰胺酶、卡介苗活菌、贝伐单抗、蓓萨罗丁、克拉屈滨、氯法拉滨、阿法达贝泊汀、地尼白介素、右雷佐生、阿法依泊汀、厄洛替尼、非格司亭、醋酸组氨瑞林、替伊莫单抗、干扰素 α -2a、干扰素 α -2b、来那度胺、左旋咪唑、美司钠、甲氧沙林、诺龙、奈拉滨、诺非妥莫单抗(nofetumomab)、奥普瑞白介素、帕利夫明、帕米磷酸二钠、聚乙二醇化腺苷脱氨酶、培门冬酶、聚乙二醇非格司亭、培美曲塞二钠、普卡霉素、吡吩姆钠、奎纳克林、拉布立酶、沙格司亭、替莫唑胺、VM-26、6-TG、托瑞米芬、维甲酸、ATRA、戊柔比星、唑来膦酸盐和唑来膦酸,及其药学上可接受的盐。

[0080] 化疗剂还包括氢化可的松、醋酸氢化可的松、醋酸可的松、特戊酸硫氢可的松、曲安奈德、曲安奈德醇、莫米松、安西奈德、布地奈德、地奈德、醋酸氟氢松、肤轻松、倍他米松、磷酸倍他米松钠、地塞米松、磷酸地塞米松钠、氟可龙、氢化可的松-17-丁酸酯、氢化可的松-17-戊酸酯、二丙酸阿氯米松(aclometasone dipropionate)、戊酸倍他米松、二丙酸倍他米松、泼尼卡酯、氯倍他松-17-丁酸酯、氯倍他松-17-丙酸酯、氟可龙己酸酯、氟可龙戊酸酯和醋酸氟泼尼定;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)(伊姆兰生物治疗剂有限公司(IMULAN BioTherapeutics,LLC));抗风湿药物,诸如硫唑嘌呤、环孢素(环孢霉素A)、D-青霉胺、金盐、羟氯喹、来氟米特、米诺环素、柳氮磺吡啶;肿瘤坏死因子 α (TNF α)阻断剂,诸如依那西普(Enbrel)、英夫利昔单抗(Remicade)、阿达木单抗(Humira)、赛妥珠单抗(Cimzia)、戈利木单抗(Simponi);白介素1(IL-1)阻断剂,诸如阿那白滞素(Kineret);T细胞共刺激阻断剂,诸如阿巴西普(Orencia);白介素6(IL-6)阻断剂,诸如托珠单抗(**ACTEMERA®**);白介素13(IL-13)阻断剂,诸如来瑞珠单抗(lebrikizumab);干扰素 α (IFN)阻断剂,诸如罗那珠单抗; β 7整联蛋白阻断剂,诸如rhuMAb β 7;IgE途径阻断剂,诸如抗M1引物;分泌的同源三聚体LTa3和膜结合异源三聚体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的放射性同位素);各种各样的试验药物,诸如硫铂、PS-341、苯基丁酸酯、ET-18-OCH₃或法呢基转移酶抑制剂(L-739749,L-744832);多酚类物质,诸如槲皮素、白藜芦醇、苦味酚、表没食子儿茶素没食子酸酯、茶黄素、黄烷醇、原花青素、桦木酸及其衍生物;自噬抑制剂,诸如氯喹; δ -9-四氢大麻酚(屈大麻酚,**MARINOL®**); β -拉帕酮;拉帕酚;秋水仙碱;桦木酸;乙酰喜树碱、莨菪亭(scopolectin)和9-氨基喜树碱;鬼臼毒素;替加氟(**UFTORAL®**);贝沙罗汀(**TARGRETIN®**);双膦酸盐,诸如氯膦酸盐(例如,**BONEFOS®**或**OSTAC®**)、依替膦酸盐(**DIDROCAL®**)、NE-58095、唑来膦酸/唑来膦酸盐(**ZOMETA®**)、阿仑膦酸盐(**FOSAMAX®**)、帕米膦酸盐(**AREDIA®**)、替罗膦酸盐(**SKELID®**)或利塞膦酸盐(**ACTONEL®**);和表皮生长因子受体(EGF-R);疫苗,诸如**THERATOPE®**疫苗;哌立福辛;COX-2抑制剂(例如塞来昔布或依托昔布);蛋白体抑制剂(例如PS341);CCI-779;替吡法尼(R11577);奥拉非尼,ABT510;Bcl-2抑制剂,诸如奥利美森钠(oblimersen sodium)(**GENASENSE®**);匹杉琼(pixantrone);法呢基转移酶抑制剂,诸如洛那法尼(lonafarnib)(SCH 6636,SARASAR™);以及以上任一项的药理学上可接受的盐、酸或衍生物;以及上述两种或多种的组合,例如CHOP(环磷酰胺、阿霉素、长春新碱和泼尼松龙的联合疗法的缩写);以及FOLFOX(奥沙利铂(ELOXATIN™)与5-FU和亚叶酸钙联合治疗方案的缩写)。

[0081] 化疗剂还包括具有镇痛、解热和抗炎作用的非甾体抗炎药。NSAID包括环氧化酶的非选择性抑制剂。NSAID的具体示例包括阿司匹林、丙酸衍生物(诸如布洛芬、芬诺洛芬、酮洛芬、氟比洛芬、奥沙普嗪和萘普生)、乙酸衍生物(诸如吲哚美辛、舒林酸、依托度酸、双氯芬酸)、烯醇酸衍生物(诸如吡罗昔康、美洛昔康、替诺昔康、屈昔康和氯诺昔康)、芬那酸衍生物(诸如甲芬那酸、甲氯芬那酸、氟苯那酸、甲苯磺那酸)和COX-2抑制剂(诸如塞来昔布、依托考昔、鲁美昔布、派瑞昔布、罗非考昔和伐地昔布)。NSAID可适用于减轻病症的症状,诸如类风湿性关节炎、骨关节炎、炎性关节炎、强直性脊柱炎、银屑病关节炎、莱特综合征、急性痛风、痛经、转移性骨痛、头痛和偏头痛、术后疼痛、由于炎症和组织损伤、发热、肠梗阻和肾绞痛引起的轻度至中度疼痛。

[0082] 当在本文中使用时,“生长抑制剂”是指在体外或体内抑制细胞生长的化合物或组合物。在一个实施例中,生长抑制剂是一种生长抑制性抗体,其防止或减少表达该抗体所结合的抗原的细胞的增殖。在另一个实施例中,生长抑制剂可以是显著降低S期细胞百分比的

抑制剂。生长抑制剂的示例包括阻断细胞周期进程(在S期以外处)的试剂,例如诱导G1阻滞和M期阻滞的药剂。经典的M期阻断剂包括长春花生物碱(长春新碱和长春碱)、紫杉烷类和拓扑异构酶II抑制剂,诸如阿霉素、表柔比星、道诺霉素、依托泊苷和博来霉素。那些阻滞G1的试剂也溢出到S期阻滞中,例如DNA烷基化剂,诸如他莫昔芬、泼尼松、达卡巴嗪、氮芥、顺铂、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶和ara-C。进一步的信息可见于Mendelsohn和Israel编辑的《癌症的分子基础》(The Molecular Basis of Cancer)中Murakami等人所著的第1章,标题为“细胞周期调节,癌基因和抗肿瘤药”(W.B.Saunders,Philadelphia,1995),例如,第13页。紫杉烷类(紫杉醇和多西他赛)都是抗癌药,均来源于紫杉。多西他赛(TAXOTERE®,罗纳普朗克乐安公司(Rhone-Poulenc Rorer))来源于欧洲紫杉,是紫杉醇的半合成类似物(TAXOL®,百时美施贵宝)。紫杉醇和多西他赛促进微管蛋白二聚体的微管组装,并通过防止解聚作用稳定微管,从而抑制细胞的有丝分裂。

[0083] “放射疗法”是指使用定向 γ 射线或 β 射线以诱导对细胞的足够损害,从而限制细胞正常发挥功能或完全破坏细胞的能力。应当了解的是,在本领域中将有许多方法可以确定治疗的剂量和持续时间。典型治疗作为一次施用而给出,典型剂量为每天10到200单位(戈瑞)。

[0084] 用于治疗目的的“受试者”或“个体”是指被分类为哺乳动物的任何动物,包括人、家畜和农场动物以及动物园动物、运动动物或宠物,诸如狗、马、猫、牛等。优选地,哺乳动物是人。

[0085] 本文的术语“抗体”以最广泛的含义使用,并且具体地覆盖单克隆抗体(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)和抗体片段,只要它们表现出所需的抗原结合活性即可。

[0086] “经分离的”抗体是已经鉴定并且自其自然环境的组分中分离和/或回收的抗体。其自然环境的污染物成分是会干扰抗体研究、诊断或治疗用途的材料,并且可能包括酶、激素和其他蛋白质或非蛋白质溶质。在一些实施例中,将抗体纯化(1)至例如通过Lowry方法测定的大于95%重量计的抗体,并且在一些实施例中,至大于99%重量计;(2)至例如通过使用旋转杯测序仪足以获得N末端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度,或(3)至在还原或非还原条件下使用例如考马斯蓝或银染色的SDS-PAGE检测的均质程度。经分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体,因为不会存在抗体天然环境的至少一种成分。然而,通常,经分离的抗体将通过至少一个纯化步骤来制备。

[0087] “天然抗体”通常是约150,000道尔顿的异源四聚体糖蛋白,由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链组成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连,而二硫键的数目在不同免疫球蛋白同种型的重链之间变化。每条重链和轻链还具有规则间隔的链内二硫键桥。每条重链在一端具有可变结构域(V_H),其后是多个恒定结构域。每条轻链的一端具有可变结构域(V_L),另一端具有恒定结构域;轻链的恒定结构域与重链的第一恒定结构域对齐,并且轻链的可变结构域与重链的可变结构域对齐。据信特定的氨基酸残基在轻链和重链可变结构域之间形成界面。

[0088] 术语“恒定结构域”是指免疫球蛋白分子的一部分,该部分相对于免疫球蛋白的另一部分(即可变结构域,其包含抗原结合位点)具有更保守的氨基酸序列。恒定结构域包含重链的 C_H1 、 C_H2 和 C_H3 结构域(统称为CH)和轻链的 CHL (或 CL)结构域。

[0089] 抗体的“可变区”或“可变结构域”是指抗体的重链或轻链的氨基末端结构域。重链的可变结构域可以称为“V_H”。轻链的可变结构域可以称为“V_L”。这些结构域通常是抗体中变化最大的部分,并且包含抗原结合位点。

[0090] 术语“可变的”是指以下事实:可变结构域的某些部分在抗体之间的序列差异很大,并用于每种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。但是,变异性并非均匀分布在抗体的可变结构域中。它集中在轻链和重链可变结构域两者中的三个称为高变区(HVR)的区段中。可变结构域中保守性更高的部分称为框架区(FR)。天然重链和轻链的可变结构域各自包含四个FR区,该四个FR区主要采用β折叠构型,由三个HVR连接,这三个HVR形成连接β折叠结构的环并且在一些情况下形成β折叠结构的一部分。每条链中的HVR通过FR区紧密保持在一起,并且与另一条链中的HVR一起,有助于抗体的抗原结合位点的形成(参见Kabat等人,《具有免疫学意义的蛋白质序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第五版,美国卫生与公众服务部,国立卫生研究院,马里兰州贝塞斯达(1991))。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合,但表现出各种效应子功能,诸如抗体参与抗体依赖性细胞毒性作用。

[0091] 来自任何哺乳动物物种抗体(免疫球蛋白)的“轻链”基于其恒定结构域的氨基酸序列,可以配属为两种明显不同的类型中的一种,这两种类型分别称为卡帕(“κ”)和兰姆达(“λ”)。

[0092] 如本文所用,术语IgG“同种型”或“亚类”是指由免疫球蛋白恒定区的化学和抗原特征定义的免疫球蛋白的任何亚类。

[0093] 抗体(免疫球蛋白)基于其重链恒定结构域的氨基酸序列,可以配属为不同的类别。存在五大类免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且它们中的一些可以进一步分为亚类(同种型),例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁,以及IgA₂。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为α、γ、ε、γ和μ。不同种类的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是众所周知的,并在例如以下文献中有一般描述:Abbas等人,《细胞和分子免疫学》(Cellular and Mol. Immunology),第四版(W.B. Saunders, Co., 2000)。抗体可以是较大融合分子的一部分,该融合分子是通过抗体与一种或多种其他蛋白质或肽的共价或非共价缔合形成的。

[0094] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文中可互换使用,是指其基本上完整形式的抗体而不是如下文定义的抗体片段。该术语特别是指具有包含Fc区的重链的抗体。

[0095] 出于本文目的的“裸抗体”是未与药物部分或放射性标记缀合的抗体。

[0096] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,优选包含其抗原结合区。在一些实施例中,本文所述的抗体片段是抗原结合片段。抗体片段的示例包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双体抗体;线性抗体;单链抗体分子;和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0097] 木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同抗原结合片段,称为“Fab”片段,每个片段都有单个抗原结合位点和残留的“Fc”片段,其名称反映其是否容易结晶的能力。胃蛋白酶处理产生的F(ab')₂片段具有两个抗原结合位点并且仍能与抗原交联。

[0098] “Fv”是包含完全的抗原结合位点的最小抗体片段。在一个实施例中,双链Fv物种由一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域的紧密、非共价缔合的二聚体组成。在单链Fv(scFv)物种中,一个重链可变区结构域和一个轻链可变区结构域可通过柔性肽接头共价

连接,使得轻链和重链可缔合成类似于在双链Fv物种中的“二聚体”结构。其构型是,每个可变结构域的三个HVR相互作用以将抗原结合位点限定在VH-VL二聚体的表面上。六个HVR共同赋予抗体以抗原结合的特异性。但是,即使单个可变结构域(或仅包含三个对抗原具有特异性的HVR的Fv的一半)也具有识别和结合抗原的能力,尽管其亲和力低于完整结合位点。

[0099] Fab片段含有重链可变结构域和轻链可变结构域且亦含有轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH1)。Fab'片段与Fab片段的不同之处在于Fab'片段在重链CH1结构域的羧基末端添加了一些残基,这些残基包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH是本文中关于其中恒定结构域的半胱氨酸残基带有游离硫醇基的Fab'的命名。F(ab')₂抗体片段最初是作为在其间具有铰链半胱氨酸的成对Fab'片段而产生的。抗体片段的其他化学偶合也是已知的。

[0100] “单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的VH和VL结构域,其中这些结构域存在于单个多肽链中。通常,scFv多肽在VH和VL结构域之间进一步包含多肽接头,使scFv形成所需的抗原结合结构。有关scFv的综述,参见例如Pluckthun的《单克隆抗体的药理学》(The Pharmacology of Monoclonal Antibodies),第113卷,Rosenburg和Moore主编,(Springer-Verlag,New York,1994),第269-315页。

[0101] 术语“双体抗体”是指具有两个抗原结合位点的抗体片段,其片段包含连接至与同一多肽链(VH-VL)中的轻链可变结构域(VL)的重链可变结构域(VH)。通过使用太短以至于不允许同一条链上两个结构域之间配对的接头,这些结构域被迫与另一条链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点。双体抗体可为二价抗体或双特异性抗体。双价抗体更全面地描述于例如:EP 404,097;WO 1993/01161;Hudson等人,Nat.Med.9:129-134(2003);以及Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA90:6444-6448(1993)。三体抗体和四体抗体也在Hudson等人,Nat.Med.9:129-134(2003)中进行了描述。

[0102] 本文所使用的术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群中获得的抗体,例如,除了可能存在的少量突变例如天然存在的突变,该抗体群包含的单个抗体是相同的。因此,修饰语“单克隆的”表明抗体的特征不是离散抗体的混合物。在某些实施例中,这样的单克隆抗体通常包括包含与靶结合的多肽序列的抗体,其中靶结合多肽序列通过包括从多个多肽序列中选择单个靶结合多肽序列的方法获得。例如,选择过程可以从多个克隆物诸如杂交瘤克隆物、噬菌体克隆物或重组DNA克隆物的集合中选择独特的克隆物。应当理解,可以进一步改变选择的靶结合序列,例如,以提高对靶的亲和力、使靶结合序列人源化、提高其在细胞培养物中的产生、降低其在体内的免疫原性、产生多特异性抗体等,并且包含改变的靶结合序列的抗体也是本发明的单克隆抗体。与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反,单克隆抗体制剂中的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。单克隆抗体制备物的优势除了其特异性以外,还在于它们通常不受其他抗体污染。

[0103] 修饰语“单克隆”表示抗体的特征是从基本上同质的抗体群体获得的,并且不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,根据本发明使用的单克隆抗体可以通过多种技术制备,包括例如杂交瘤方法(例如,Kohler and Milstein,Nature,256:495-97(1975);Hongo等人,Hybridoma,14(3):253-260(1995),Harlow等人,《抗体:实验室手册》(Antibodies:A Laboratory Manual),(冷泉港实验室出版社,第2版,1988年);Hammerling等人的《单克隆抗体和T细胞杂交瘤》(Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas)

563-681 (Elsevier, N.Y., 1981))、重组DNA方法(参见,例如,美国专利号4,816,567)、噬菌体展示技术(参见,例如,Clackson等人, *Nature*, 352:624-628 (1991); Marks等人, *J.Mol.Biol.* 222:581-597 (1992); Sidhu等人, *J.Mol.Biol.* 338 (2):299-310 (2004); Lee等人, *J.Mol.Biol.* 340 (5):1073-1093 (2004); Fellouse, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 101 (34):12467-12472 (2004); 和Lee等人, *J.Immunol.Methods* 284 (1-2):119-132 (2004))、和在动物中产生具有编码人免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因座或基因的部分或全部的人抗体或类人抗体的技术(参见,例如,WO 1998/24893; WO 1996/34096; WO 1996/33735; WO 1991/10741; Jakobovits等人, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 90:2551 (1993); Jakobovits等人, *Nature* 362:255-258 (1993); Bruggemann等人, *Year in Immunol.* 7:33 (1993); 美国专利号5,545,807、5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425和5,661,016; Marks等人, *Bio/Technology* 10:779-783 (1992); Lonberg等人, *Nature* 368:856-859 (1994); Morrison, *Nature* 368:812-813 (1994); Fishwild等人, *Nature Biotechnol.* 14:845-851 (1996); Neuberger, *Nature Biotechnol.* 14:826 (1996) 以及 Lonberg and Huszar, *Intern.Rev.Immunol.* 13:65-93 (1995))。

[0104] 本文中的单克隆抗体具体地包括“嵌合”抗体,其中重链和/或轻链的一部分与来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,而一条或多条链的其余部分与来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以及这些抗体的片段相同或同源,只要它们表现出所需的生物活性即可(参见,例如美国专利号4,816,567; 和Morrison等人, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 81:6851-6855 (1984))。嵌合抗体包括 **PRIMATTZED[®]** 抗体,其中抗体的抗原结合区来源于通过例如用目的抗原免疫猕猴而产生的抗体。

[0105] “人源化”形式的非人(例如,鼠)抗体为包含来源于非人免疫球蛋白的最小序列的嵌合抗体。在一个实施例中,人源化抗体为人免疫球蛋白(受者抗体),其中受者的HVR中的残基被来自非人物种(供者抗体)的HVR的残基取代,所述非人物种诸如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类动物,其具有所需的抗体特异性、亲和力和/或功能。在一些情况下,人免疫球蛋白的FR区残基被相应的非人残基取代。此外,人源化抗体可包含受者抗体或供者抗体中不存在的残基。可作出这些修饰以进一步完善抗体性能。通常,人源化抗体将包含基本上所有的至少一个可变结构域,通常是两个可变结构域,其中所有或基本上所有的高变环对应于非人免疫球蛋白的高变环,并且所有或基本上所有的FR为人免疫球蛋白序列的FR。人源化抗体还任选地包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,该免疫球蛋白通常为人免疫球蛋白。更多详情参见例如Jones等人, *Nature* 321:522-525 (1986); Riechmann等人, *Nature* 332:323-329 (1988); 以及Presta, *Curr.Op.Struct.Biol.* 2:593-596 (1992)。也参见例如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); 以及美国专利号6,982,321和7,087,409。

[0106] “人抗体”是具有对应于由人产生的抗体的氨基酸序列的抗体和/或使用本文所公开的用于制备人抗体的任何技术制得的抗体。人抗体的该定义特别地排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。可以使用本领域已知的各种技术产生人抗体,包括噬菌体展示文库。Hoogenboom and Winter, *J.Mol.Biol.*, 227:381 (1991); Marks等人, *J.Mol.Biol.*, 222:

581 (1991)。还可用于制备人单克隆抗体的方法如以下文献所述: Cole等人,《单克隆抗体与癌症治疗》(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy), Alan R. Liss, 第77页 (1985); Boerner等人, J. Immunol., 147 (1): 86-95 (1991)。也参见 van Dijk and van de Winkel, Curr. Opin. Pharmacol., 5: 368-74 (2001)。可以通过向转基因动物施用抗原来制备人抗体, 该转基因动物已经修饰以对抗原攻击产生应答而产生此类抗体, 但其内源基因座已失效, 例如, 免疫异种小鼠 (参见, 例如, U.S. Pat. Nos. 6,075,181 和 6,150,584 关于 XENOMOUSE™ 技术)。也参见例如 Li 等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 3557-3562 (2006) 关于通过人B细胞杂交瘤技术产生的人抗体。

[0107] “物种依赖性抗体”是对来自第一哺乳动物物种的抗原具有比对来自第二哺乳动物物种的该抗原同系物更强的结合亲和力的抗体。通常, 物种依赖性抗体与人抗原“特异性结合” (例如, 其结合亲和力 (Kd) 值不超过约 1×10^{-7} M, 优选不超过约 1×10^{-8} M, 优选不超过约 1×10^{-9} M), 但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其对该人抗原的结合亲和力弱至少约 50 倍, 或至少约 500 倍, 或至少约 1000 倍。物种依赖性抗体可以是如上定义的各种抗体中的任何一种, 但是优选人源化或人抗体。

[0108] 如本文所用的术语“高变区”、“HVR”或“HV”是指在序列上高变和/或形成结构上限制的环的抗体可变结构域的区域。通常, 抗体包含六个HVR; 三个在VH中 (H1、H2、H3), 并且三个在VL中的 (L1、L2、L3)。在天然抗体中, H3和L3在六个HVR中展示出最多的多样性, 尤其是H3被认为在赋予抗体精细特异性方面起着独特的作用。参见, 例如, Xu等人, Immunity 13: 37-45 (2000); Johnson和Wu,《分子生物学方法》(Methods in Molecular Biology), 248: 1-25 (Lo, ed., Human Press, Totowa, N.J., 2003)。实际上, 仅由重链组成的天然存在的骆驼科动物抗体在不存在轻链的情况下是功能性的且稳定的。参见, 例如, Hamers-Casterman等人, Nature 363: 446-448 (1993); Sheriff等人, Nature Struct. Biol. 3: 733-736 (1996)。

[0109] 许多HVR的描述得到应用, 并且涵盖于本文中。Kabat互补决定区 (CDR) 基于序列变异性并且是最常用的 (Kabat等人,《具有免疫学意义的蛋白质序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest), 第5版, 美国卫生与公众服务部, 国立卫生研究院, 马里兰州贝塞斯达 (1991))。相反, Chothia指的是结构环的位置 (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987))。AbM HVR表示Kabat HVR和Chothia结构环之间的折衷, 并且被牛津分子公司 (Oxford Molecular) 的AbM抗体建模软件采用。“接触”HVR基于可用的复杂晶体结构的分析结果。这些HVR中的每个残基如下文所述。

	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
[0110]	H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (Kabat 编号)
	H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (Chothia 编号)
	H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
	H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0111] HVR可以包括以下“扩展HVR”: VL中的24-36或24-34 (L1)、46-56或50-56 (L2) 和89-

97或89-96 (L3) 以及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,可变结构域残基均根据上述Kabat等人的方法进行编号。

[0112] HVR可以包括以下“扩展HVR”:VL中的24-36或24-34 (L1)、46-56或50-56 (L2) 和89-97或89-96 (L3) 以及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,可变结构域残基均根据上述Kabat等人的方法进行编号。

[0113] “框架”或“FR”残基是除本文定义的HVR残基以外的那些可变结构域残基。

[0114] 术语“Kabat所述的可变结构域残基编号”或“Kabat所述的氨基酸位置编号”及其变型是指在上述Kabat等人的文献中提出的用于重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统。使用该编号系统,实际线性氨基酸序列可能包含更少或附加的氨基酸,其对应于可变结构域的FR或HVR的缩短或插入。例如,重链可变结构域可在H2的残基52之后包括单个氨基酸插入片段(根据Kabat编号的残基52a)以及重链FR残基82之后的插入残基(例如,根据Kabat编号的残基82a、82b和82c等)。可通过将抗体序列与“标准”Kabat编号序列的同源性区域进行比对来确定给定抗体的残基的Kabat编号。

[0115] 当提及可变结构域中的残基(大约是轻链的残基1-107和重链的残基1-113)时,通常使用Kabat编号系统(例如,Kabat等人,《具有免疫学意义的蛋白质序列》(Sequences of Proteins of Immunological Interest),第5版,美国卫生与公众服务部,国立卫生研究院,Bethesda,MD. (1991))。当提及免疫球蛋白重链恒定区中的残基时,通常使用“EU编号系统”或“EU索引”(例如,上述Kabat等人所报道的EU索引)。“Kabat所述的EU索引”是指人IgG1EU抗体的残基编号。

[0116] 表述“线性抗体”是指Zapata等人(1995 Protein Eng, 8(10):1057-1062)中描述的抗体。简而言之,这些抗体包含一对串联的Fd区段(VH-CH1-VH-CH1),其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单特异性的。

[0117] 如本文所用,术语“结合”、“特异性结合”或“具有特异性”是指可测量和可再现的相互作用,诸如靶与抗体之间的结合,在存在分子(包括生物分子)的异质群体的存在下,其确定靶的存在。例如,与靶(其可以是表位)结合或特异性结合的抗体是与其结合其他靶相比具有更大亲和力、亲合力、更容易和/或持续时间更长的结合该靶的抗体。在一个实施例中,抗体与无关靶标的结合程度为该抗体与抗原结合的小于约10%,例如,通过放射免疫分析(RIA)所测量。在某些实施例中,与靶特异性结合的抗体的解离常数(Kd)为 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 或 $\leq 0.1\text{nM}$ 。在某些实施例中,抗体与蛋白上的表位特异性结合,该表位在不同物种的蛋白之间具有保守性。在另一实施例中,特异性结合可以包括但不要求排他结合。

[0118] 如本文所用,术语“样本”是指获自或衍生自目的受试者和/或个体的组合物,其包含例如待基于物理、生化、化学和/或生理特征进行表征和/或鉴定的细胞和/或其他分子实体。例如,短语“疾病样本”及其变型是指从目的受试者获得的任何样本,其预期或已知包含待表征的细胞和/或分子实体。样本包括但不限于,原代或培养的细胞或细胞系、细胞上清液、细胞裂解液、血小板、血清、血浆、玻璃体液、淋巴液、滑液、卵泡液、精液、羊水、乳汁、全血、血液来源的细胞、尿液、脑脊液、唾液、痰、眼泪、汗液、粘液、肿瘤溶解产物和组织培养基、组织提取物诸如均质化的组织、肿瘤组织、细胞提取物及其组合。

[0119] “组织样本”或“细胞样本”是指从受试者或个体的组织获得的相似细胞的集合。组

组织或细胞样本的来源可以是来自新鲜的、冷冻的和/或保存的器官、组织样本、活组织检查和/或抽吸的实体组织；血液或任何血液组分，诸如血浆；体液，诸如脑脊髓液、羊水、腹膜液或间质液；来自受试者妊娠或发育中任何时候的细胞。组织样本也可以是原代或培养的细胞或细胞系。任选地，组织或细胞样本获自疾病组织/器官。组织样本可以包含自然状态下不与组织自然混合的化合物，诸如防腐剂、抗凝剂、缓冲剂、固定剂、营养物、抗生素等。

[0120] 如本文所用，“参考样本”、“参考细胞”、“参考组织”、“对照样本”、“对照细胞”或“对照组织”是指用于比较目的的样本、细胞、组织、标准品或水平。在一个实施例中，参考样本、参考细胞、参考组织、对照样本、对照细胞或对照组织获自同一受试者或个体身体的健康和/或未患病的部位（例如，组织或细胞）。例如，邻近患病细胞或组织的健康和/或未患病的细胞或组织（例如，邻近肿瘤的细胞或组织）。在另一个实施例中，参考样本获自同一受试者或个体身体的未经治疗的组织和/或细胞。在又一个实施例中，参考样本、参考细胞、参考组织、对照样本、对照细胞或对照组织获自并非该受试者或个体的个体身体的健康和/或未患病的部位（例如，组织或细胞）。在又一个实施例中，参考样本、参考细胞、参考组织、对照样本、对照细胞或对照组织获自并非该受试者或个体的个体身体的未经处理的组织和/或细胞。

[0121] 患者对药物和治疗的“有效响应”或患者的“响应性”和类似措词是指赋予处于患疾病或病症诸如癌症的风险下或患有该疾病或病症的患者的临床或治疗有益效果。在一个实施例中，这种有益效果包括以下一项或多项：延长生存期（包括总生存期和无进展生存期）；导致客观响应（包括完全响应或部分响应）；或改善癌症的征兆或症状。

[0122] 对治疗“没有有效响应”的患者是指没有以下任一项的患者：延长生存期（包括总生存期和无进展生存期）；导致客观响应（包括完全响应或部分响应）；或改善癌症的征兆或症状。

[0123] “功能性Fc区”具有天然序列Fc区的“效应子功能”。示例性的“效应子功能”包括C1q结合；CDC；Fc受体结合；ADCC；吞噬作用；细胞表面受体（例如，B细胞受体；BCR）的下调等。此类效应子功能通常需要Fc区与结合域（例如，抗体可变结构域）组合，并且可使用例如本文定义中所公开的各种测定方法进行评估。

[0124] “人效应细胞”是指表达一种或多种FcR并且执行效应子功能的白细胞。在一些实施例中，这些细胞至少表达Fc γ RIII并且执行ADCC效应子功能。介导ADCC的人白细胞的示例包括外周血单核细胞（PBMC）、自然杀手（NK）细胞、单核细胞、细胞毒性T细胞和嗜中性粒细胞。效应子细胞可从天然来源（例如血液）中分离得到。

[0125] “具有人效应细胞”的癌症或生物样本是，在诊断测试中，样本中存在人效应细胞（例如，浸润的人效应细胞）的癌症或生物样本。

[0126] “具有表达FcR的细胞”的癌症或生物学样本是，在诊断测试中，样本中存在表达FcR的细胞（例如，浸润的表达FcR的细胞）的癌症或生物样本。在一些实施例中，FcR是Fc γ R。在一些实施例中，FcR是活化的Fc γ R。

[0127] II. 概述

[0128] 本文提供了一种在个体中治疗或延迟肺癌（诸如小细胞肺癌，例如，广泛期小细胞肺癌）进展的方法，该方法包括对该个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂（例如，抗PD-L1抗体，诸如阿特珠单抗）、铂剂（例如，卡铂或顺铂）和拓扑异构酶II的抑制剂（例如依托泊苷）。

本文还提供了一种增强患有肺癌(诸如小细胞肺癌,例如,广泛期小细胞肺癌)的个体的免疫功能的方法,该方法包括向该个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂(例如,抗PD-L1抗体,诸如阿特殊单抗)、铂剂(例如,卡铂或顺铂)和拓扑异构酶II的抑制剂(例如依托泊苷)。在一些实施例中,治疗延长了个体的无进展生存期(PFS)和/或总生存期(OS)。在一些实施例中,与包括施用铂剂(例如卡铂或顺铂)和拓扑异构酶II抑制剂(例如依托泊苷)的治疗相比,该治疗延长了个体的无进展生存期(PFS)和/或总生存期(OS)。

[0129] 在一些实施例中,该方法包括向患有广泛期小细胞肺癌(ES-SCLC)的个体施用阿特殊单抗并联合卡铂和依托泊苷来治疗该个体,其中所述施用包括诱导期和维持期,其中诱导期包括,在第1至第4周期的每个21天周期中,在第1天施用1200mg剂量的阿特殊单抗,在第1天施用足以达到AUC=5mg/ml/min的剂量的卡铂,并且在第1天、第2天和第3天中的每一天施用100mg/m²剂量的依托泊苷;并且其中维持期包括,在第4周期后的每个周期的每个21天周期中的第1天施用1200mg剂量的阿特殊单抗;其中该个体从未接受过对ES-SCLC的治疗;并且其中所述施用延长了该个体的无进展生存期(PFS)和总生存期(OS)。

[0130] III.PD-1轴结合拮抗剂

[0131] 例如,PD-1轴结合拮抗剂包括PD-1结合拮抗剂、PDL1结合拮抗剂和PDL2结合拮抗剂。“PD-1”的别名包括CD279和SLEB2。“PDL1”的别名包括B7-H1、B7-4、CD274和B7-H。“PDL2”的别名包括B7-DC、Btde和CD273。在一些实施例中,PD-1、PDL1和PDL2是人PD-1、PDL1和PDL2。

[0132] 在一些实施例中,PD-1结合拮抗剂是抑制PD-1与其配体结合配偶体结合的分子。在具体方面,PD-1配体结合配偶体是PDL1和/或PDL2。在另一个实施例中,PDL1结合拮抗剂是抑制PDL1与其结合配偶体结合的分子。在具体方面,PDL1结合配偶体是PD-1和/或B7-1。在另一个实施例中,PDL2结合拮抗剂是抑制PDL2与其结合配偶体结合的分子。在具体方面,PDL2结合配偶体是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。

[0133] 在一些实施例中,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)。

[0134] 在一些实施例中,抗PD-1抗体是纳武单抗(CAS注册号:946414-94-4)检测细胞结合抗体。纳武单抗(百时美施贵宝/小野制药公司(Ono)),也称为MDX-1106-04、MDX-1106、ONO-4538、BMS-936558和**OPDIVO®**,是W02006/121168中所述的抗PD-1抗体。在一些实施例中,抗PD-1抗体包含重链和轻链序列,其中:

[0135] (a) 重链包含以下氨基酸序列:

[0136] QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIYW

[0137] DGSKRYYADSVKGRFTISRDNKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDYWGQGTLLTVSS

[0138] ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY

[0139] SLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPK

[0140] KDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV

[0141] LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVK

[0142] GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO:11), 并且

[0143] (b) 轻链包含以下氨基酸序列:

[0144] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAT

[0145] GIPARFSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPS

[0146] DEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:12)。

[0147] 在一些实施例中,抗PD-1抗体包含来自SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12的六个HVR序列(例如,来自SEQ ID NO:11的三个重链HVR和来自SEQ ID NO:12的三个轻链HVR)。在一些实施例中,抗PD-1抗体包含来自SEQ ID NO:11的重链可变结构域和来自SEQ ID NO:12的轻链可变结构域。

[0148] 在一些实施例中,抗PD-1抗体是派姆单抗(CAS登记号:1374853-91-4)检测细胞结合抗体。派姆单抗(默克),也称为MK-3475、Merck 3475、lambrolizumab、**KEYTRUDA®**和SCH-900475,是W02009/114335中所述的抗PD-1抗体。在一些实施例中,抗PD-1抗体包含重链和轻链序列,其中:

[0149] (a) 重链包含以下氨基酸序列:

[0150] QVQLVQSGVEVKKPGASVKVSKASGYTFTNYYMYWVRQAPGQGLEWMGG

[0151] INPSNGGTNFNEKFKNRVLTITDSSTTTAYMELKSLQFDDTAVYYCARRDYRFDMGFDYW

[0152] GQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV

[0153] HTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPCCPPCP

[0154] APEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTK

[0155] PREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK (SEQ ID NO:13), 并且

[0156] (b) 轻链包含以下氨基酸序列:

[0157] EIVLTQSPAT

[0158] LSLSPGERATLSCRASKGVSTSGYSYLHWYQQKPGQAPRLLIYLASYLESQVGPARGSGSGSGTDFTLTITSSLEPEDFAVYYCQHSRDLPLTFGGGKTKVEIK

[0159] RTVAAPSVF

[0160] IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQ

[0161] DSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:14)。

[0162] 在一些实施例中,抗PD-1抗体包含来自SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:14的六个HVR序列(例如,来自SEQ ID NO:13的三个重链HVR和来自SEQ ID NO:14的三个轻链HVR)。在一些实施例中,抗PD-1抗体包含来自SEQ ID NO:13的重链可变结构域和来自SEQ ID NO:14的轻链可变结构域。

[0163] 在一些实施例中,抗PD-1抗体是MEDI-0680 (AMP-514,阿斯利康)。MEDI-0680是一种人源化IgG4抗PD-1抗体。

[0164] 在一些实施例中,抗PD-1抗体是PDR001 (CAS注册号1859072-53-9; 诺华)。PDR001是人源化IgG4抗PD1抗体,其阻断PDL1和PDL2与PD-1的结合。

[0165] 在一些实施例中,抗PD-1抗体是REGN2810 (再生元制药公司 (Regeneron))。REGN2810是人抗PD1抗体。

[0166] 在一些实施例中,抗PD-1抗体是BGB-108(百济神州公司科技有限公司(BeiGene))。在一些实施例中,抗PD-1抗体是BGB-A317(百济神州公司科技有限公司(BeiGene))。

[0167] 在一些实施例中,抗PD-1抗体是JS-001(上海君实)。JS-001是人源化的抗PD1抗体。

[0168] 在一些实施例中,抗PD-1抗体是STI-A1110(索伦托(Sorrento))。STI-A1110是人抗PD1抗体。

[0169] 在一些实施例中,抗PD-1抗体是INCSHR-1210(因赛特(Incyte))。INCSHR-1210是人IgG4抗PD1抗体。

[0170] 在一些实施例中,抗PD-1抗体是PF-06801591(辉瑞)。

[0171] 在一些实施例中,抗PD-1抗体是TSR-042(也称为ANB011;泰萨罗(Tesaro)/AnaptysBio)。

[0172] 在一些实施例中,抗PD-1抗体是AM0001(ARMO生物科学公司(ARMO Biosciences))。

[0173] 在一些实施例中,抗PD-1抗体是ENUM 244C8(Enumeral生物医学控股公司(Enumeral Biomedical Holdings))。ENUM 244C8是抗PD1抗体,其抑制PD-1的功能而不阻断PDL1与PD-1的结合。

[0174] 在一些实施例中,抗PD-1抗体是ENUM 388D4(Enumeral生物医学控股公司(Enumeral Biomedical Holdings))。ENUM 388D4是抗PD1抗体,其竞争性地抑制PDL1与PD-1的结合。

[0175] 在一些实施例中,PD-1抗体包含来自如下描述的PD-1抗体的六个HVR序列(例如,三个重链HVR和三个轻链HVR)和/或重链可变结构域和轻链可变结构域:W02015/112800(申请人:Regeneron)、W02015/112805(申请人:Regeneron)、W02015/112900(申请人:诺华)、US20150210769(转让给诺华)、W02016/089873(申请人:赛尔基因(Celgene))、W02015/035606(申请人:百济神州)、W02015/085847(申请人:上海恒瑞药业/江苏恒瑞药业)、W02014/206107(申请人:上海君实生物科学/君萌生物科学)、W02012/145493(申请人:Amplimmune)、US9205148(转让给MedImmune)、W02015/119930(申请人:辉瑞/默克)、W02015/119923(申请人:辉瑞/默克)、W02016/032927(申请人:辉瑞/默克)、W02014/179664(申请人:AnaptysBio)、W02016/106160(申请人:Enumeral)和W02014/194302(申请人:索伦托)。

[0176] 在一些实施例中,PD-1结合拮抗剂是免疫粘附素(例如,包含与恒定区(例如,免疫球蛋白序列的Fc区)融合的PDL1或PDL2的细胞外或PD-1结合部分的免疫粘附素)。在一些实施例中,PD-1结合拮抗剂是AMP-224。AMP-224(CAS注册号:1422184-00-6;葛兰素史克/MedImmune),也称为B7-DCIg,是W02010/027827和W02011/066342中所述的PDL2-Fc融合可溶性受体。

[0177] 在一些实施例中,PD-1结合拮抗剂是肽或小分子化合物。在一些实施例中,PD-1结合拮抗剂是AUNP-12(皮尔法伯公司(PierreFabre)/Aurigene)。参见,例如W02012/168944、W02015/036927、W02015/044900、W02015/033303、W02013/144704、W02013/132317和W02011/161699。

[0178] 在一些实施例中, PDL1结合拮抗剂是抑制PD-1的小分子。在一些实施例中, PDL1结合拮抗剂是抑制PDL1的小分子。在一些实施例中, PDL1结合拮抗剂是抑制PDL1和VISTA的小分子。在一些实施例中, PDL1结合拮抗剂是CA-170 (也称为AUPM-170)。在一些实施例中, PDL1结合拮抗剂是抑制PDL1和TIM3的小分子。在一些实施例中, 小分子是在W02015/033301和W02015/033299中描述的化合物。

[0179] 在一些实施例中, PD-1轴结合拮抗剂是抗PDL1抗体。本文考虑并描述了多种抗PDL1抗体。在本文的任何实施例中, 分离的抗PDL1抗体可以结合人PDL1, 例如UniProtKB/Swiss-Prot登录号Q9NZQ7.1中所示的人PDL1, 或其变体。在一些实施例中, 抗PDL1抗体能够抑制PDL1与PD-1之间和/或PDL1与B7-1之间的结合。在一些实施例中, 抗PDL1抗体是单克隆抗体。在一些实施例中, 抗PDL1抗体是选自Fab、Fab'-SH、Fv、scFv和(Fab')₂片段组成的组的抗体片段。在一些实施例中, 抗PDL1抗体是人源化抗体。在一些实施例中, 抗PDL1抗体是人抗体。可用于本发明方法的抗PDL1抗体的示例及其制备方法在PCT专利申请W0 2010/077634A1和美国专利号8,217,149中描述, 其通过引用并入本文。

[0180] 在一些实施例中, 抗PDL1抗体包含重链可变区和轻链可变区, 其中:

[0181] (a) 重链可变区分别包含GFTFSDSWIH (SEQ ID NO:1)、AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:2) 和RHWPGGFDY (SEQ ID No:3) 的HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3序列, 并且

[0182] (b) 轻链可变区分别包含RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:4)、SASFLYS (SEQ ID NO:5) 和QQYLYHPAT (SEQ ID NO:6) 的HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3序列。

[0183] 在一些实施例中, 抗PDL1抗体是MPDL3280A, 也称为阿特殊单抗和TECENTRIQ® (CAS注册号:1422185-06-5) 检测细胞结合抗体。在一些实施例中, 抗PDL1抗体包含重链和轻链序列, 其中:

[0184] (a) 重链可变区序列包含以下氨基酸序列:

[0185] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO:7), 并且

[0186] (b) 轻链可变区序列包含以下氨基酸序列:

[0187] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASF

[0188] LYSQVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:8)。

[0189] 在一些实施例中, 抗PDL1抗体包含重链和轻链序列, 其中:

[0190] (a) 重链包含以下氨基酸序列:

[0191] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:9), 并且

[0192] (b) 轻链包含以下氨基酸序列:

[0193] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSQVPSRFSGSGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA

KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:10)。

[0194] 在一些实施例中,抗PDL1抗体是阿维鲁单抗(avelumab)(CAS注册号:1537032-82-8)检测细胞结合抗体。阿维鲁单抗,也称为MSB0010718C,是人单克隆IgG1抗PDL1抗体(默克集团,辉瑞)。在一些实施例中,抗PDL1抗体包含重链和轻链序列,其中:

[0195] (a) 重链包含以下氨基酸序列:

[0196] EVQLLESGLLVQPGGSLRLSAAAGFTSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYPSGGITFYADTVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEP KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:15),并且

[0197] (b) 轻链包含以下氨基酸序列:

[0198] QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDVSNRPSGVSNRFGSGK SGNTASLTISGLQAEDADYYCSSYSSSTRVFGTGTQVTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFY PGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYAAASSYLSLTPEQWKSRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO:16)。

[0199] 在一些实施例中,抗PDL1抗体包含来自SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16的六个HVR序列(例如,来自SEQ ID NO:15的三个重链HVR和来自SEQ ID NO:16的三个轻链HVR)。在一些实施例中,抗PDL1抗体包含来自SEQ ID NO:15的重链可变结构域和来自SEQ ID NO:16的轻链可变结构域。

[0200] 在一些实施例中,抗PDL1抗体是德瓦鲁单抗(durvalumab)(CAS注册号:1428935-60-7)检测细胞结合抗体。德瓦鲁单抗,也称为MEDI4736,是W02011/066389和US2013/034559中所述的Fc优化的人单克隆IgG1 κ 抗PDL1抗体(MedImmune,阿斯利康)。在一些实施例中,抗PDL1抗体包含重链和轻链序列,其中:

[0201] (a) 重链包含以下氨基酸序列:

[0202] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSAAAGFTFSRYWMSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSVKGRF TISRDNKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGGWFGELAFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVE PKSCDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:17),并且

[0203] (b) 轻链包含以下氨基酸序列:

[0204] EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQRVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASSRATGIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSLPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE AKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYESTYLSSTLTLSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:18)。

[0205] 在一些实施例中,抗PDL1抗体包含来自SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的六个HVR序列(例如,来自SEQ ID NO:17的三个重链HVR和来自SEQ ID NO:18的三个轻链HVR)。在一些实施例中,抗PDL1抗体包含来自SEQ ID NO:17的重链可变结构域和来自SEQ ID NO:18的轻链可变结构域。

[0206] 在一些实施例中,抗PDL1抗体是MDX-1105(百时美施贵宝)。MDX-1105,也称为BMS-936559,是W02007/005874中所述的抗PDL1抗体。

[0207] 在一些实施例中,抗PDL1抗体是LY3300054(礼来公司)。

[0208] 在一些实施例中,抗PDL1抗体是STI-A1014(索伦托(Sorrento))。STI-A1014是人抗PDL1抗体。

[0209] 在一些实施例中,抗PDL1抗体是KN035(Suzhou Alphamab)。KN035是从骆驼噬菌体展示文库生成的单结构域抗体(dAb)。

[0210] 在一些实施例中,抗PDL1抗体包含可裂解的部分或接头,当被(例如,通过肿瘤微环境中的蛋白酶)裂解时,该部分或接头激活抗体抗原结合结构域以使其结合其抗原,例如,通过移除非结合空间部分进行。在一些实施例中,抗PDL1抗体是CX-072(CytomX Therapeutics)。

[0211] 在一些实施例中,PDL1抗体包含来自描述于以下的PDL1抗体的六个HVR序列(例如,三个重链HVR和三个轻链HVR)和/或重链可变结构域和轻链可变结构域:US20160108123(申请人:诺华)、W02016/000619(申请人:百济神州)、W02012/145493(申请人:Amplimmune)、US9205148(转让给MedImmune)、W02013/181634(申请人:索伦托)和W02016/061142(申请人:诺华)。

[0212] 在又一个具体方面,抗体进一步包含人或鼠恒定区。在另一方面,人恒定区选自由IgG1、IgG2、IgG2、IgG3、IgG4组成的组。在又一个具体方面,人恒定区是IgG1。在又一个方面,鼠恒定区选自由IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3组成的组。在另一方面,鼠恒定区为IgG2A。

[0213] 在又一个具体方面,抗体具有降低的或最小的效应子功能。在又一个具体方面,最小的效应子功能来自“无效应子的Fc突变”或无糖基化突变。在另一个实施例中,无效应子的Fc突变是恒定区中的N297A或D265A/N297A取代。在一些实施例中,分离的抗PDL1抗体是无糖基化的。抗体的糖基化通常是N-连接或O-连接的。N-连接是指碳水化合物部分附接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)是将碳水化合物部分酶促附接至天冬酰胺侧链的识别序列。因此,这些三肽序列中任一个的在多肽中的存在产生潜在的糖基化位点。O-连接的糖基化是指糖N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖中的一种附接至羟基氨基酸,该羟基氨基酸最通常为丝氨酸或苏氨酸,但也可以使用5-羟脯氨酸或5-羟基赖氨酸。通过改变氨基酸序列以移除上述三肽序列之一(对于N-连接的糖基化位点),可以方便地从抗体上移除糖基化位点。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取代为另一个氨基酸残基(例如,甘氨酸、丙氨酸或保守取代)来进行改变。

[0214] 在又一个实施例中,本公开提供了包含任何上述抗PDL1抗体与至少一种药学上可接受的运载体组合的组合物。

[0215] 在又一个实施例中,本公开提供了一种组合物,其包含如本文提供的抗PDL1、抗PD-1或抗PDL2抗体或其抗原结合片段以及至少一种药学上可接受的运载体。在一些实施例

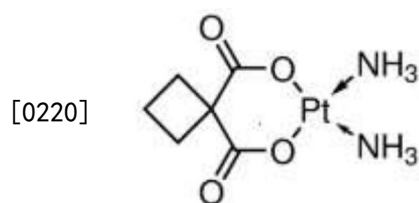
中,施用于个体的抗PDL1、抗PD-1或抗PDL2抗体或其抗原结合片段是包含一种或多种药学上可接受的运载体的组合物。可以使用本文所述或本领域已知的任何药学上可接受的运载体。

[0216] IV. 铂剂和拓扑异构酶II抑制剂

[0217] 铂剂

[0218] 铂剂(诸如顺铂、卡铂、奥沙利铂和沙铂(Staraplatin))是广泛使用的抗肿瘤药物,其引起DNA交联为单加合物、链间交联物、链内交联物或DNA蛋白交联物。铂剂通常作用于鸟嘌呤的相邻N-7位置,形成1,2链内交联(Poklar等人(1996).Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.93(15):7606-11;Rudd等人(1995).Cancer Chemother.Pharmacol.35(4):323-6)。所得的交联抑制癌细胞中的DNA修复和/或DNA合成。

[0219] 卡铂是用于本文所述方法中的示例性铂配位化合物。卡铂的化学名称[1,1-环丁烷二羧基(2-)-0,0']-二氨合铂(SP-4-2),并且卡铂具有以下结构式:



[0221] 卡铂是分子式为C₆H₁₂N₂O₄Pt的晶体粉末,分子量为371.25。它以约14mg/mL的速度溶于水,1%溶液的pH为5至7。它几乎不溶于乙醇、丙酮和二甲基乙酰胺。卡铂主要产生链间DNA交联物,这种作用是细胞周期非特异性的。卡铂可作为**PARAPLATIN®**、**BIOCARN**、**BLASTOCARB**、**BLASTOPLATIN**、**CARBOKEM**、**CARBOMAX**、**CARBOPA**、**CARBOPLAN**、**CARBOTEEN**、**CARBOTINAL**、**CYTOCARB**、**DUCARB**、**KARPLAT**、**KEMOCARB**、**NAPROPLAT**、**NEOPLATIN**、**NISCARBO**、**ONCOCARBIN**、**TEVACARB**、**WOMASTIN**等获得。

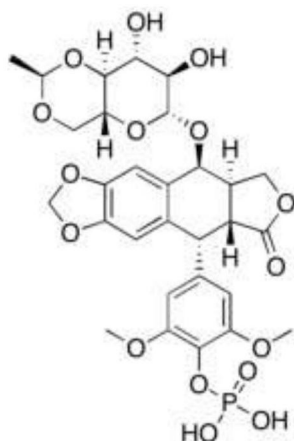
[0222] 拓扑异构酶II抑制剂

[0223] 拓扑异构酶II的抑制剂(例如依托泊苷(VP-16)、替尼泊苷、阿霉素、道诺霉素、米托蒽醌、安吡啶、玫瑰树碱、金精三羧酸和HU-331)也是广泛使用的抗肿瘤药物,其在形成酶介导的DNA断裂之后稳定化拓扑异构酶II:DNA共价复合物(即,“裂解复合物”)。这种裂解复合物的聚集诱导细胞死亡途径。

[0224] 依托泊苷是用于本文所述方法的示例性拓扑异构酶II抑制剂。依托泊苷通常作为前药依托泊苷磷酸酯施用,其化学名称为:4'-去甲基表鬼臼毒素9-[4,6-O-(R)-亚乙基-β-吡喃葡萄糖苷],4'(磷酸二氢酯)。

[0225] 依托泊苷磷酸酯具有以下结构:

[0226]



[0227] 依托泊苷磷酸酯,即依托泊苷的磷酸酯,是鬼臼毒素的半合成衍生物,通过去磷酸化转化为依托泊苷。依托泊苷通过与DNA拓扑异构酶II相互作用或形成自由基来诱导DNA链断裂,从而导致细胞周期阻滞(主要在细胞周期的G2阶段)和细胞死亡。依托泊苷可作为 **ETOPOPHOS®**、**TOPOSAR™**、VP-16、**VEPESID®**、ACTITOP、ASIDE、BIOPOSIDE、CTOP、CYTOP、EPOSED、ESIDE、ETHOPUL、ETOLON、ETONIS、ETOPLAST、ETOSID、ETOVEL、FYTOP、FYTOSID、LASTET、NZYTOP、ONCOSIDE、PLACID、POSID、RETOPSON、TEVASIDE、TOPOK、TOPOSIDE等获得。

[0228] V. 抗体制备

[0229] 本文所述的抗体是使用本领域可用于生成抗体的技术制备的,其示例性方法在以下章节中更详细地描述。

[0230] 该抗体针对目的抗原(例如,PD-L1,诸如人PD-L1)。优选地,抗原是生物学上重要的多肽,并且向患有病症的哺乳动物施用抗体可以在该哺乳动物中产生治疗性有益效果。

[0231] 在某些实施例中,本文提供的抗体的解离常数(Kd)为 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 150\text{nM}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 50\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如,10⁻⁸M或更低,例如10⁻⁸M至10⁻¹³M,例如,10⁻⁹M至10⁻¹³M)。

[0232] 在一个实施例中,通过放射性标记的抗原结合测定(RIA)来测量Kd,所述放射性标记的抗原结合测定用Fab形式的目的抗体及其抗原,如以下测定所述进行。通过在未标记的抗原滴定系列存在下用最小浓度(125I)标记的抗原平衡Fab,然后用抗Fab抗体包被的板捕获结合的抗原,来测量Fab对抗原的溶液结合亲和力(参见,例如,Chen等人, J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999))。为了确定用于测定的条件,用在50mM碳酸钠(pH 9.6)中5 $\mu\text{g/ml}$ 捕获抗Fab抗体(Cappel Labs)包被 **MICROTITER®** 微孔板(Thermo Scientific)过夜,随后在室温(大约23°C)下用在PBS中2% (w/v) 牛血清白蛋白阻断二至五小时。在非吸附板(Nunc#269620)中,将100pM或26pM[125I]-抗原与目的Fab的系列稀释液混合。然后将目的Fab孵育过夜;然而,孵育可以持续更长时间(例如,约65小时)以确保达到平衡。此后,将混合物转移至捕获板以在室温下孵育(例如,一小时)。随后移除溶液并且用在PBS中的0.1%聚山梨酯20(**TWEEN-20®**)洗涤该板八次。当板已干燥时,添加150 μl /孔的闪烁体(MICROSCINT-20™;Packard),并且在TOPCOUNT™ γ 计数器(Packard)上对板计数十分钟。选择给出小于或等于20%最大结合的各Fab的浓度以用于竞争性结合测定中。

[0233] 根据另一实施例,在25°C下,用经固定化的抗原CM5芯片,在大约10响应单位(RU)

下,使用 **BIACORE®-2000** 或 **BIACORE®-3000** (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ), 通过表面等离子体共振测定来测量 K_d 。简而言之,根据供应商说明书,用 N -乙基- N' -(3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺盐酸盐 (EDC) 及 N -羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 激活羧甲基化的葡聚糖生物传感器芯片 (CM5, BIAcore Inc.)。将抗原用 10mM 乙酸钠 pH 4.8 稀释至 $5\mu\text{g/ml}$ (约 $0.2\mu\text{M}$), 之后以 $5\mu\text{l/分钟}$ 的流速进行注射以获得大约 10 响应单位 (RU) 的偶联蛋白。注射抗原之后,注射 1M 乙醇胺以阻断未反应的基团。关于动力学测量,在 25°C 下,以大约 $25\mu\text{l/min}$ 的流速,注射在含有 0.05% 聚山梨酯 20 (TWEEN-20TM) 表面活性剂 (PBST) 的 PBS 中的 Fab 的两倍连续稀释液 (0.78nM 至 500nM)。使用简单的一对一朗格缪尔 (Langmuir) 结合模型 (**BIACORE®** 评价软件 3.2 版), 通过同时拟合缔合与解离传感器图来计算缔合速率 (k_{on}) 与解离速率 (k_{off})。解离常数 (K_d) 计算为比率 k_{off}/k_{on} 。参见例如 Chen 等人, J. Mol. Biol. 293:865-881 (1999)。若通过上述表面等离子体共振测定得出缔合速率超过 $106\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$, 则可通过使用荧光淬灭技术测定缔合速率, 即如在分光计诸如配备止流装置的分光光度计 (Aviv Instruments) 或 8000 系列 SLM-AMINCOTM 分光光度计 (ThermoSpectronic) 中用搅拌比色杯所测得的, 在浓度渐增的抗原存在下, 测量在 25°C 下 PBS pH 7.2 中的 20nM 抗抗原抗体 (Fab 形式) 的荧光发射强度 (激发 = 295nm ; 发射 = 340nm , 16nm 带通) 的增加或减少。

[0234] (i) 抗原制备

[0235] 任选地与其他分子缀合的可溶性抗原或其片段可以用作免疫原以用于生成抗体。对于跨膜分子诸如受体, 可以将其片段 (例如受体的细胞外结构域) 用作免疫原。替代地, 可以将表达跨膜分子的细胞用作免疫原。这样的细胞可以源自天然来源 (例如癌细胞系), 或者可以是已经通过重组技术转化以表达跨膜分子的细胞。可用于制备抗体的其他抗原及其形式对于本领域技术人员将是显而易见的。

[0236] (ii) 某些基于抗体的方法

[0237] 优选通过多次皮下 (sc) 或腹膜内 (ip) 注射相关抗原和佐剂在动物中产生多克隆抗体。使用双功能或衍生剂, 例如马来酰亚胺基苯甲酰磺基琥珀酰亚胺酯 (通过半胱氨酸残基)、 N -羟基琥珀酰亚胺 (通过赖氨酸残基缀合)、戊二醛、琥珀酸酐、SOC12 或 $\text{R}_1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$ (其中 R 和 R_1 是不同的烷基), 将相关抗原缀合至待免疫物种中具有免疫原性的蛋白质, 例如钥孔血蓝素、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂。

[0238] 通过将例如 $100\mu\text{g}$ 或 $5\mu\text{g}$ 的蛋白质或缀合物 (分别用于兔子或小鼠) 与 3 体积的弗氏完全佐剂混合并在多个部位皮内注射溶液, 使动物针对抗原、免疫原性缀合物或衍生物进行免疫。一个月后, 通过在多个部位进行皮下注射, 以弗氏完全佐剂中原始量的 $1/5$ 至 $1/10$ 的肽或缀合物对动物进行加强。7 至 14 天后, 给动物放血, 并测定血清的抗体滴度。对动物进行加强直至滴度稳定。优选地, 用相同抗原但缀合至不同蛋白质和/或通过不同交联剂缀合的缀合物对动物进行加强。缀合物也可以在重组细胞培养物中作为蛋白融合物制备。而且, 聚集剂诸如明矾适合用于增强免疫应答。

[0239] 可以使用杂交瘤方法制备本公开的单克隆抗体, 所述杂交瘤方法首先由 Kohler 等人, Nature, 256:495 (1975) 描述, 并且进一步描述于例如 Hongo 等人, Hybridoma, 14 (3): 253-260 (1995), Harlow 等人, 抗体: A Laboratory Manual, (冷泉港实验室出版社, 第 2 版, 1988 年); Hammerling 等人的《关于人-人杂交瘤的单克隆抗体和 T 细胞杂交瘤》(Monoclonal

Antibodies and T-Cell Hybridomas) 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) 以及倪健,《现代免疫学》,26(4):265-268(2006)中的关于人-人杂交瘤部分。另外的方法包括例如美国专利号 7,189,826 中描述的从杂交瘤细胞系生产单克隆人天然 IgM 抗体的方法。人类杂交瘤技术 (Trioma 技术) 也描述于 Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937(2005) 以及 Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91(2005) 中。

[0240] 对于各种其他杂交瘤技术,参见,例如,US 2006/258841;US 2006/183887(完全人抗体)、US 2006/059575;US 2005/287149;US 2005/100546;US 2005/026229 和美国专利号 7,078,492 和 7,153,507。使用杂交瘤方法产生单克隆抗体的示例性方案描述如下。在一个实施例中,对小鼠或其他适当的宿主动物(诸如仓鼠)进行免疫以引发产生或能够产生抗体的淋巴细胞,这些抗体将与蛋白质特异性结合以用于免疫。通过多次皮下(sc)或腹膜内(ip)注射本公开的多肽或其片段和佐剂诸如单磷酸脂质 A (MPL)/海藻糖二硬脂酸酯 (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, Mont.) 在动物中产生抗体。可以使用本领域众所周知的方法,诸如重组方法,来制备本公开的多肽(例如,抗原)或其片段,其中一些在本文中进一步描述。对来自免疫动物的血清测定抗抗原抗体,并且任选地进行加强免疫。从产生抗抗原抗体的动物中分离淋巴细胞。替代地,可在活体外免疫淋巴细胞。

[0241] 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,《单克隆抗体:原理与实践》(*Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*),第 59-103 页(美国学术出版社,1986 年)。可以使用能有效融合的骨髓瘤细胞,该骨髓瘤细胞支持所选择的产生抗体的细胞稳定且高水平地产生抗体,并对培养基诸如 HAT 培养基敏感。示例性的骨髓瘤细胞包括但不限于,鼠类骨髓瘤系,诸如来源于 MOPC-21 和 MPC-11 小鼠肿瘤(可获自美国加利福尼亚州圣地亚哥的 Salk Institute Cell Distribution Center 的那些,以及 SP-2 或 X63-Ag8-653 细胞(可获自美国弗吉尼亚州马纳萨斯的美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA))。人骨髓瘤及小鼠-人异骨髓瘤细胞系也已被描述用于产生人单克隆抗体(Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001(1984);及 Brodeur 等人,《单克隆抗体生产技术和应用》(*Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*),第 51-63 页(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

[0242] 将由此制备的杂交瘤细胞接种在合适的培养基中并使其生长,该培养基例如含有一种或多种抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞的生长或生存的物质。例如,若亲本骨髓瘤细胞缺乏酶次黄嘌呤鸟嘌呤转磷酸核糖基酶(HGPRT 或 HPRT),则用于杂交瘤的培养基通常将包括次黄嘌呤、氨嘌呤及胸苷(HAT 培养基),这些物质阻止缺乏 HGPRT 的细胞的生长。优选地,无血清的杂交瘤细胞培养方法用于减少动物来源的血清如胎牛血清的使用,如例如在 Even 等人, *Trends in Biotechnology*, 24(3), 105-108(2006) 中所述。

[0243] 寡肽作为用于提高杂交瘤细胞培养物生产率的工具在 Franek, *Trends in Monoclonal Antibody Research*, 111-122(2005) 中有所描述。具体而言,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)或蛋白质水解物级分,并且由三到六个氨基酸残基组成的合成寡肽可显著抑制细胞凋亡。肽以毫摩尔或更高浓度存在。

[0244] 可以测定杂交瘤细胞在其中生长的培养基中与本公开的抗体结合的单克隆抗体

的产生。由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性可通过免疫沉淀或通过体外结合测定诸如放射免疫测定 (RIA) 或酶联免疫吸附测定 (ELISA) 来确定。单克隆抗体的结合亲和力可以通过例如Scatchard分析来确定。参见,例如,Munson等人,Anal.Biochem.,107:220 (1980)。

[0245] 在鉴别出产生具有所需特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞之后,通过有限稀释法对该克隆进行亚克隆并通过标准方法使其生长。参见例如上文的Goding。用于此目的合适培养基包括例如D-MEM或RPMI-1640培养基。另外,杂交瘤细胞可以作为动物的腹水瘤在体内生长。通过常规免疫球蛋白纯化方法,例如蛋白A-琼脂糖凝胶、羟磷灰石色谱、凝胶电泳、透析或亲和色谱,适当地将亚克隆物分泌的单克隆抗体与培养基、腹水或血清分离。从杂交瘤细胞分离蛋白质的一种方法描述于US 2005/176122和美国专利号6,919,436中。该方法包括在结合过程中使用最少的盐,诸如溶致盐,并且优选在洗脱过程中也使用少量的有机溶剂。

[0246] (iii) 源自文库的抗体

[0247] 可以通过筛选组合文库中具有一种或多种所需活性的抗体来分离本公开的抗体。例如,本领域已知多种方法用于生成噬菌体展示文库并筛选此类文库以获得具备所需结合特征的抗体,诸如实例3中描述的方法。其他方法见例如Hoogenboom等人在Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien等人编撰,Human Press,Totowa,NJ,2001)中的综述并且进一步描述于,例如,McCafferty等人,Nature 348:552-554;Clackson等人,Nature 352:624-628 (1991);Marks等人,J.Mol.Biol.222:581-597 (1992);Marks和Bradbury在Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo编撰,Human Press,Totowa,NJ,2003)中的描述;Sidhu等人,J.Mol.Biol.338(2):299-310 (2004);Lee等人,J.Mol.Biol.340(5):1073-1093 (2004);Fellouse,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101(34):12467-12472 (2004);和Lee等人,J.Immunol.Methods 284(1-2):119-132 (2004)。

[0248] 在某些噬菌体展示方法中,将VH和VL基因的所有组成成分通过聚合酶链式反应(PCR)单独克隆,并在噬菌体文库中随机重组,然后可以从该噬菌体文库中筛选抗原结合噬菌体,如在Winter等人,Ann.Rev.Immunol.,12:433-455 (1994)中所描述的。噬菌体通常将抗体片段展示为单链Fv(scFv)片段或Fab片段。来自经免疫的来源的文库提供针对免疫原的高亲和力抗体,而无需构建杂交瘤。替代地,可以克隆初始组库(例如,来自人)以提供针对广泛的非自身抗原和自身抗原的抗体的单一来源,而无需任何免疫,如Griffiths等人,EMBO J,12:725-734 (1993)所描述的。最后,还可通过以下方式来制得初始文库:克隆来自干细胞的未重排的V基因区段;以及使用含有随机序列的PCR引物来编码高度可变的CDR3区域并完成体外重排,如由Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.,227:381-388 (1992)所述。描述人抗体噬菌体文库的专利出版物包括,例如:美国专利号5,750,373,以及美国专利公开号2005/0079574、2005/0119455、2005/0266000、2007/0117126、2007/0160598、2007/0237764、2007/0292936和2009/0002360。

[0249] 在本文中从人抗体文库分离出的抗体或抗体片段被认为是人抗体或人抗体片段。

[0250] (iv) 嵌合抗体、人源化抗体和人抗体

[0251] 在某些实施例中,本文提供的抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体描述于,例如,美国专利号4,816,567和Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855 (1984)中。在

一个示例中,嵌合抗体包含非人可变区(例如,源自小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人灵长类动物(诸如猴)的可变区)和人恒定区。在另一个实例中,嵌合抗体为其中类别或亚类已经与亲本抗体的类别或亚类改变的“类别转换”抗体。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0252] 在某些实施例中,嵌合抗体是人源化抗体。通常,将非人抗体人源化以减少对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。通常,人源化抗体包含一个或多个可变结构域,其中HVR,例如CDR(或其部分)源自非人抗体,而FR(或其部分)源自人抗体序列。人源化抗体任选地还将包含人恒定区的至少一部分。在一些实施例中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如,HVR残基所来源于的抗体)的相应残基取代,例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0253] 人源化抗体及其制备方法在例如Almagro and Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008)中综述,并且进一步描述于例如Riechmann等人,Nature 332:323-329(1988);Queen等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 86:10029-10033(1989);美国专利号5,821,337、7,527,791、6,982,321和7,087,409;Kashmiri等人,Methods 36:25-34(2005)(描述了SDR(a-CDR)移植);Padlan,Mol.Immunol.28:489-498(1991)(描述了“表面再塑”);Dall'Acqua等人,Methods 36:43-60(2005)(描述了“FR改组”);以及Osborn等人,Methods 36:61-68(2005)和Klimka等人,Br.J.Cancer,83:252-260(2000)(描述了用于FR改组的“指导选择”方法)中。

[0254] 可用于人源化的人框架区包括但不限于:使用“最佳拟合”方法选择的框架区(参见例如Sims等人J.Immunol.151:2296(1993));来源于轻链或重链可变区的特定亚组的人抗体的共有序列的框架区(参见,例如,Carter等人Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285(1992);以及Presta等人J.Immunol.,151:2623(1993));人成熟(体细胞突变)框架区或人种系框架区(参见,例如,Almagro and Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008));以及来源于筛选FR文库的框架区(参见,例如,Baca等人,J.Biol.Chem.272:10678-10684(1997)和Rosok等人,J.Biol.Chem.271:22611-22618(1996))。

[0255] 在某些实施例中,本文提供的抗体是人抗体。可以使用本领域已知的各种技术来产生人抗体。人抗体一般描述于van Dijk and van de Winkel,Curr Opin Pharmacol.5:368-74(2001)和Lonberg,Curr Opin Immunol.20:450-459(2008)中。

[0256] 可以通过以下方式来制备人抗体:将免疫原施用于转基因动物,所述转基因动物已被修饰以响应于抗原激发而产生具有人可变区的完整人抗体或完整抗体。此类动物通常含有全部或部分人免疫球蛋白基因座,所述全部或部分人免疫球蛋白基因座替代内源性免疫球蛋白基因座,或者在动物的染色体外存在或随机整合至动物的染色体中。在此类转基因小鼠中,内源性免疫球蛋白基因座通常已被灭活。关于从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)。另参见,例如,描述XENOMOUSE™技术的美国专利号6,075,181和6,150,584;描述HuMab®技术的美国专利号5,770,429;描述K-MOUSE®技术的美国专利号7,041,870,以及描述VelociMouse®技术的美国专利申请公开号US 2007/0061900。可以进一步修饰来自由此类动物产生的完整抗体的人可变区,例如通过与不同的人恒定区组合。

[0257] 人抗体也可以通过基于杂交瘤的方法制备。已经描述了用于产生人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人杂交骨髓瘤细胞系。(参见例如Kozbor J.Immunol.,133:3001(1984);

Brodeur等人,《单克隆抗体生产及应用》(Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications),第51-63页(Marcel Dekker, Inc., New York, 1987);以及Boerner等人, *J. Immunol.*, 147:86 (1991)。) 经由人B细胞杂交瘤技术产生的人抗体也如Li等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) 所述。另外的方法包括例如在美国专利号7,189,826 (描述了从杂交瘤细胞系产生单克隆人IgM抗体) 和Ni, Xiandai Mianyixue, 26 (4):265-268 (2006) (描述了人-人杂交瘤) 中描述的那些方法。人类杂交瘤技术(Trioma技术) 也描述于Vollmers和Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20 (3):927-937 (2005) 和Vollmers和Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27 (3):185-91 (2005) 中。

[0258] 人抗体还可以通过分离选自人源噬菌体展示文库的Fv克隆可变结构域序列产生。然后可以将此类可变结构域序列与预期的人恒定结构域结合。从抗体文库中选择人抗体的技术描述如下。

[0259] (v) 抗体片段

[0260] 抗体片段可以通过传统方式诸如酶消化, 或通过重组技术来产生。在某些情况下, 使用抗体片段而不是完整抗体具有优势。较小尺寸的片段允许快速清除, 并可以导致更好地接近实体瘤。关于某些抗体片段的综述, 参见Hudson等人 (2003) *Nat. Med.* 9:129-134。

[0261] 已经开发了用于产生抗体片段的各种技术。传统上, 这些片段通过完整抗体的蛋白水解消化而获得 (参见, 例如, Morimoto等人, *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 24:107-117 (1992) 和Brennan等人, *Science*, 229:81 (1985))。但是, 这些片段现在可以直接由重组宿主细胞产生。Fab、Fv和ScFv抗体片段均可在大肠杆菌中表达并从大肠杆菌中分泌出来, 因此可轻松生产大量这些片段。可以从上述抗体噬菌体文库中分离抗体片段。替代地, 可以直接从大肠杆菌中回收Fab'-SH片段并化学偶联以形成F(ab')₂片段 (Carter等人, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992))。根据另一种方法, 可以直接从重组宿主细胞培养物中分离F(ab')₂片段。具有增加的体内半衰期的包含挽救受体结合表位残基的Fab和F(ab')₂片段描述于美国专利号5,869,046中。产生抗体片段的其他技术对熟练技术人员将是显而易见的。在某些实施例中, 抗体是单链Fv片段(scFv)。参见WO 93/16185; 美国专利号5,571,894和5,587,458。Fv和scFv是具有完整结合位点没有恒定区的仅有的种类; 因此, 它们可能适合于在体内使用期间减少非特异性结合。可以构建scFv融合蛋白以在scFv的氨基末端或羧基末端产生效应蛋白的融合。参见Borrebaeck编撰的《抗体工程》(Antibody Engineering), 同上。例如, 该抗体片段也可以是“线性抗体”, 例如美国专利号5,641,870中所述。这样的线性抗体可以是单特异性的或双特异性的。

[0262] (vi) 多特异性抗体

[0263] 多特异性抗体对至少两个不同的表位具有结合特异性, 其中这些表位通常来自不同的抗原。尽管这样的分子在正常情况下仅结合两个不同的表位 (即双特异性抗体, BsAb), 但是当在本文中使用时, 这一表述涵盖具有其他特异性的抗体, 例如三特异性抗体。可以将双特异性抗体制备为全长抗体或抗体片段 (例如F(ab')₂双特异性抗体)。

[0264] 制备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是基于两个免疫球蛋白重链-轻链对的共表达, 其中两条链具有不同的特异性 (Millstein等人, *Nature*, 305:537-539 (1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分类, 这些杂交瘤 (四源

杂交瘤)可产生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。通常通过亲和色谱步骤完成的正确分子的纯化相当麻烦,并且产物产率低。在W0 93/08829和Traunecker等人,EMBO J.,10:3655-3659(1991)中公开了类似的过程。

[0265] 用于制备双特异性抗体的本领域已知的一种方法是“杵入臼”(knobs-into-holes)或“凸起入腔”(protuberance-into-cavity)法(参见,例如,美国专利号5,731,168)。在这种方法中,两个免疫球蛋白多肽(例如,重链多肽)各自包含界面。一种免疫球蛋白多肽的界面与另一种免疫球蛋白多肽上的相对对应界面相互作用,从而使两种免疫球蛋白多肽缔合。可以对这些界面进行工程化,使得位于一个免疫球蛋白多肽的界面上的“杵”(knob)或“凸起”(这些术语在本文中可以互换使用)与位于另一个免疫球蛋白多肽的界面上的“臼”(hole)或“腔”(这些术语在本文中可以互换使用)相对应。在一些实施例中,臼具有与杵相同或相似的尺寸,并且适当地定位使得当两个界面相互作用时,一个界面的杵可定位在另一界面的相对对应臼中。不希望受理论的束缚,认为这使异源多聚体稳定,并且与其他多聚体种类例如同质多聚体相比,这更有利于异源多聚体的形成。在一些实施例中,该方法可用于促进两个不同的免疫球蛋白多肽的异源多聚化,产生包含两个对不同表位具有结合特异性的免疫球蛋白多肽的双特异性抗体。

[0266] 在一些实施例中,可通过用较大的侧链替换小的氨基酸侧链来构建杵。在一些实施例中,可以通过将较大的氨基酸侧链替换为较小的侧链来构建臼。杵或臼可以存在于原始界面中,也可以合成引入。例如,可以通过改变编码该界面的核酸序列以用至少一个“导入”氨基酸残基替换至少一个“原始”氨基酸残基的方式合成地引入杵或臼。改变核酸序列的方法可以包括本领域众所周知的标准分子生物学技术。下表1中显示了各种氨基酸残基的侧链体积。在一些实施例中,原始残基具有小的侧链体积(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),并且形成杵的导入残基是天然存在的氨基酸且可以包括精氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸。在一些实施例中,原始残基具有大的侧链体积(例如,精氨酸、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸),并且用于形成臼的导入残基是天然存在的氨基酸且可以包括丙氨酸、丝氨酸、苏氨酸和缬氨酸。

[0267] 表1. 氨基酸残基的特性

[0268]

氨基酸	一字母缩写	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
蛋氨酸 (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

[0269] a氨基酸的分子量减去水的分子量。数值源自克利夫兰化学橡胶出版社1961年出版的《化学和物理手册》(Handbook of Chemistry and Physics) (第43版)。

[0270] b数值源自:A.A.Zamyatnin,Prog.Biophys.Mol.Biol.24:107-123,1972。

[0271] c数值源自C.Chothia,J.Mol.Biol.105:1-14,1975。可及表面积在该参考文献的图6-20中定义。

[0272] 在一些实施例中,基于异源多聚体的三维结构鉴定用于形成杵或臼的原始残基。用于获得三维结构的本领域已知技术可以包括X射线晶体学和NMR。在一些实施例中,界面是免疫球蛋白恒定结构域的CH3结构域。在这些实施例中,人IgG₁的CH3/CH3界面涉及位于四条反平行β链上的每个结构域的十六个残基。不希望受理论的束缚,突变的残基优选位于两条中心反平行β链上,使杵可能被周围溶剂而不是配偶体CH3结构域中的补偿性臼容纳的风险最小化。在一些实施例中,在两个免疫球蛋白多肽中形成相对应的杵和臼的突变对应于表2中提供的一对或多对。

[0273] 表2.形成相对应的杵和臼的突变的示例集*

[0274]	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

[0275] *突变表示为原始残基,然后是使用Kabat编号系统确定的位置,然后是导入残基(所有残基均以单字母氨基酸代码给出)。多个突变由冒号分隔。

[0276] 在一些实施例中,免疫球蛋白多肽包含CH3结构域,该CH3结构域包含上表2中列出的一处或多处氨基酸置换。在一些实施例中,双特异性抗体包含第一免疫球蛋白多肽和第二免疫球蛋白多肽,所述第一免疫球蛋白多肽包含在表2的左栏中列出的包含一处或多处氨基酸置换的CH3结构域,并且所述第二免疫球蛋白多肽包含在表2的右栏中列出的一处或多处相对应氨基酸置换的CH3结构域。

[0277] 在如上所述的DNA突变之后,可以使用本领域已知的标准重组技术和细胞系统表达和纯化编码具有一种或多种形成相对应杆或白的突变的修饰的免疫球蛋白多肽的多核苷酸。参见,例如,美国专利号5,731,168、5,807,706、5,821,333、7,642,228、7,695,936、8,216,805;美国专利公布号2013/0089553;以及Spiess等人,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细胞来产生修饰的免疫球蛋白多肽。带有相对应的杆和白的免疫球蛋白多肽可以在共培养的宿主细胞中表达,并作为异源多聚体一起纯化;或者它们可以在单一培养物中表达,分别纯化和体外组装。在一些实施例中,使用本领域已知的标准细菌培养技术共培养细菌宿主细胞的两种菌株(一种表达带有杆的免疫球蛋白多肽,另一种表达带有白的免疫球蛋白多肽)。在一些实施例中,可以以特定比例混合两种菌株,例如以便在培养物中达到相等的表达水平。在一些实施例中,两种菌株可以50:50、60:40或70:30的比例混合。多肽表达后,可将细胞裂解在一起,并提取蛋白质。本领域已知的允许测量同源多聚体与异源多聚体种类的丰度的标准技术可以包括尺寸排阻色谱法。在一些实施例中,使用标准重组技术分别表达每种修饰的免疫球蛋白多肽,并且它们可以在体外组装在一起。例如,可以通过纯化每种修饰的免疫球蛋白多肽,将它们以等质量混合并一起孵育,还原二硫化物(例如,通过用二硫苏糖醇处理),浓缩和再氧化多肽来实现组装。形成的双特异性抗体可以使用包括阳离子交换色谱法在内的标准技术进行纯化,并使用包括尺寸排阻色谱法在内的标准技术进行测量。有关这些方法的详细说明,参见Speiss等人,Nat Biotechnol 31:753-8,2013。在一些实施例中,修饰的免疫球蛋白多肽可以在CHO细胞中分别表达,并使用上述方法在体外组装。

[0278] 根据不同的方法,将具有所需结合特异性的抗体可变结构域(抗体-抗原结合位点)与免疫球蛋白恒定结构域序列融合。优选与免疫球蛋白重链恒定结构域融合,该结构域包含铰链区、CH2区和CH3区的至少一部分。通常,至少一种融合体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体和(如果需要)免疫球蛋白轻链的DNA插入单独的表达载体中,并共转染到合适的宿主生物体中。在当构建中使用的三个多肽链的不相等比例提供最佳产率时的实施例中,这为调节三个多肽片段的相互比例

提供了极大灵活性。然而,当至少两个多肽链以相等的比率表达导致高产率或当比率没有特别的意义时,有可能在一个表达载体中插入两条或全部三条多肽链的编码序列。

[0279] 在该方法的一个实施例中,双特异性抗体由一个臂中的具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链和另一臂中的杂合免疫球蛋白重链-轻链对(提供第二结合特异性)组成。已经发现,这种不对称结构促进了所需的双特异性化合物与不需要的免疫球蛋白链组合的分离,因为仅在双特异性分子的一半中存在免疫球蛋白轻链提供了一种简便的分离方式。该方法在WO 94/04690中公开。对于生成双特异性抗体的更多细节,参见例如Suresh等人,Methods in Enzymology,121:210(1986)。

[0280] 根据WO96/27011中描述的另一种方法,可以对一对抗体分子之间的界面进行工程化,使从重组细胞培养物中回收的异源二聚体的百分比最大化。一个界面包含抗体恒定结构域的CH3结构域的至少一部分。在该方法中,用较大的侧链(例如,酪氨酸或色氨酸)替换来自第一抗体分子的界面的一个或多个小氨基酸侧链。具有与大侧链相同或相似大小的补偿性“腔”是通过用较小的氨基酸侧链(例如丙氨酸或苏氨酸)替换大氨基酸侧链在第二抗体分子的界面上创建。这提供了一种提高异源二聚体产率的机制,使该产率优于其他不希望的同源二聚体等最终产物。

[0281] 双特异性抗体包括交联抗体或“异源缀合”抗体。例如,异源缀合物中的一种抗体可以与抗生物素蛋白偶联,另一种与生物素偶联。例如,已经提出了这样的抗体以将免疫系统细胞靶向不希望的细胞(美国专利号4,676,980),以及用于治疗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。合适的交联剂是本领域众所周知的,并在美国专利号4,676,980中与许多交联技术一起公开。

[0282] 从抗体片段生成双特异性抗体的技术也已在文献中描述。例如,可以使用化学连接来制备双特异性抗体。Brennan等人,Science,229:81(1985)描述了一种过程,其中完整的抗体被蛋白水解裂解以生成F(ab')₂片段。在二硫醇络合剂亚砷酸钠的存在下还原这些片段,以稳定邻位二硫醇并防止分子间二硫化物的形成。然后将生成的Fab'片段转化为硫代硝基苯甲酸酯(TNB)衍生物。然后通过用巯基乙胺还原将Fab'-TNB衍生物之一转化为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以用作选择性固定酶的试剂。

[0283] 最近的进展促进了从大肠杆菌中直接回收Fab'-SH片段,该片段可以化学偶联以形成双特异性抗体。Shalaby等人,J.Exp.Med.,175:217-225(1992)描述了完全人源化的双特异性抗体F(ab')₂分子的产生。每个Fab'片段分别从大肠杆菌中分泌出来,并在体外进行定向化学偶联以形成双特异性抗体。

[0284] 还已经描述了用于直接从重组细胞培养物中制备和分离双特异性抗体片段的各种技术。例如,已经使用亮氨酸拉链产生了双特异性抗体。Kostelny等人,J.Immunol.,148(5):1547-1553(1992)。通过基因融合,将来自Fos蛋白和Jun蛋白的亮氨酸拉链肽连接至两种不同抗体的Fab'部分。抗体同源二聚体在铰链区还原形成单体,然后再氧化形成抗体异源二聚体。该方法也可以用于抗体同源二聚体的生产。Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993)描述的“双体抗体”技术已经提供了制备双特异性抗体片段的替代机制。片段包含通过接头连接至轻链可变结构域(V_L)的重链可变结构域(V_H),该接头太短以至于不允许同一条链上的两个结构域之间配对。因此,一个片段的

V_H 和 V_L 结构域被迫与另一片段的互补 V_L 和 V_H 结构域配对,从而形成两个抗原结合位点。还已经报道了通过使用单链Fv (sFv) 二聚体制备双特异性抗体片段的另一种策略。参见Gruber等人, J. Immunol., 152:5368 (1994)。

[0285] 考虑了具有两个以上价态的抗体。例如,可以制备三特异性抗体。Tuft等人 J. Immunol. 147:60 (1991)。

[0286] (vii) 单结构域抗体

[0287] 在一些实施例中,本公开的抗体是单结构域抗体。单结构域抗体为包含抗体的重链可变结构域的全部或部分或轻链可变结构域的全部或部分的单多肽链。在某些实施例中,单结构域抗体是人单结构域抗体(马萨诸塞州沃尔瑟姆的多曼尼斯公司(Domantis, Inc., Waltham, Mass.);参见例如美国专利号6,248,516B1)。在一个实施例中,单结构域抗体由抗体的重链可变结构域的全部或部分组成。

[0288] (viii) 抗体变体

[0289] 在一些实施例中,设想了本文所述抗体的氨基酸序列修饰。例如,可能期望改善抗体的结合亲和力和/或其他生物特性。抗体的氨基酸序列变体可以通过向编码抗体的核苷酸序列中引入适当的变化或通过肽合成为来制备。此类修饰包括例如抗体氨基酸序列内残基的删除、和/或插入和/或取代。可以进行删除、插入和修饰的任何组合以获得最终构建体,前提条件是所述最终构建体具有所需特征。可以在制备序列时将氨基酸改变引入受试抗体的氨基酸序列中。

[0290] (ix) 取代、插入和删除性变体

[0291] 在某些实施例中,提供了具有一或多个氨基酸取代的抗体变体。取代突变的目的位点包括HVR和FR。保守取代如表3所示。更多实质性变化提供于表3中的“示例性取代”标题下,并且在下文中关于氨基酸侧链类别予以进一步描述。可以将氨基酸取代引入目的抗体中,并对产物进行所需活性(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)筛选。

[0292] 表3. 保守取代。

[0293]

原始残基	示例性取代	优选的取代
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
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

[0294] 可根据共同的侧链特性将氨基酸分组：

[0295] a. 疏水性的：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

[0296] b. 中性亲水性的：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

[0297] c. 酸性的：Asp、Glu；

[0298] d. 碱性的：His、Lys、Arg；

[0299] e. 影响

[0300] 链取向的残基：Gly、Pro；

[0301] f. 芳香族的：Trp、Tyr、Phe。

[0302] 非保守性置换将需要用这些类别中的一个的成员交换另一类别。

[0303] 一种类型的取代变体涉及取代亲本抗体(例如,人源化抗体或人抗体)的一个或多个高可变区残基。通常,为进一步研究而选择的一种或多种所得变体相对于亲本抗体将在某些生物特性(例如,提高的亲合力、降低的免疫原性)上具有修饰(例如,改善)和/或将具有亲本抗体的基本上保留的某些生物特性。示例性取代变体是亲合力成熟抗体,其可例如使用诸如本文所述的那些基于噬菌体展示的亲合力成熟技术方便地生成。简而言之,将一个或多个HVR残基突变并且将变体抗体展示在噬菌体上并针对特定生物活性(例如结合亲合力)进行筛选。

[0304] 可以在HVR中进行改变(例如取代),例如以改善抗体亲合力。可在HVR“热点”中作出此类改变,即,由在体细胞成熟过程期间经历高频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), 其中对所得变体VH或VL进行结合亲合力测试。通过构建并自二级文库重新选择而实现的亲合力成熟已被例如 Hoogenboom等人在Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien等人编, Human Press, Totowa, NJ, (2001)) 中进行描述。在亲合力成熟的一些实施例中,通过多种方法(例如,易错PCR、链改组或寡核苷酸定向突变)中的任一者将多样性引入出于成熟目的而挑选的可变基因中。接着创建二级文库。随后对该文库进行筛选以鉴别具有所需亲和力的任何抗体变体。引入多样性的另一种方法涉及HVR定向方法,其中将若干HVR残基(例如,每次4-6个残基)随机化。参与抗原结合的HVR残基可例如使用丙氨酸扫描突变或建模来特异性地鉴别。具体而言,常常靶向CDR-H3和CDR-L3。

[0305] 在某些实施例中,取代、插入或缺失可出现在一或多个HVR内,只要此类改变基本上不降低抗体结合抗原的能力。例如,可在HVR中进行基本上不降低结合亲和力的保守性改变(例如,如本文提供的保守性取代)。此类改变可在HVR“热点”或SDR之外。在以上提供的变体VH及VL序列的某些实施例中,各HVR未改变,或含有不超过一个、两个或三个氨基酸取代。

[0306] 可用于鉴别可被靶向突变的抗体残基或区域的方法称作“丙氨酸扫描突变”,如

Cunningham and Wells, (1989) Science, 244:1081-1085中所述。在此方法中,鉴别残基或一组靶残基(例如,带电残基,诸如arg、asp、his、lys和glu)并用中性或带负电的氨基酸(例如,丙氨酸或多丙氨酸)替换以确定抗体与抗原的相互作用是否受到影响。可在对初始取代展现功能敏感性的氨基酸位置引入其他取代。替代地或另外地,利用抗原-抗体复合物的晶体结构鉴别抗体与抗原之间的接触点。可靶向或消除作为取代的候选的此类接触残基和相邻残基。可筛选变体以确定它们是否具备期望的特性。

[0307] 氨基酸序列插入包括长度范围为一个残基至含有一百个或更多个残基的多肽的氨基和/或羧基末端融合,以及一个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的示例包括具有N-末端甲硫胺酰基残基的抗体。抗体分子的其他插入变体包括抗体的N末端或C末端与增加抗体的血清半衰期的酶(例如,对于ADEPT)或多肽的融合。

[0308] (x)糖基化变体

[0309] 在某些实施例中,改变本文提供的抗体以增加或降低抗体糖基化的程度。抗体糖基化位点的添加或删除可以通过改变氨基酸序列以创建或移除一个或多个糖基化位点来方便地实现。

[0310] 当抗体包含Fc区时,附接于其上的碳水化合物可以被改变。由哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含具有支链的双触角寡糖,所述双触角寡糖通常通过N-连接附接于Fc区的CH2结构域的Asn297。参见,例如,Wright等人TIBTECH 15:26-32 (1997)。寡糖可包括各种碳水化合物,例如,甘露糖、N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及附接于双触角寡糖结构的“主干”中的GlcNAc的岩藻糖。在一些实施例中,可对本公开的抗体中的寡糖进行修饰,以创建具有某些改善特性的抗体变体。

[0311] 在一个实施例中,提供了包含Fc区的抗体变体,其中附接至Fc区的碳水化合物结构具有减少的岩藻糖或缺乏岩藻糖,这可以改善ADCC功能。具体而言,本文考虑相对于在野生型CHO细胞中产生的相同抗体上的岩藻糖量具有减少的岩藻糖的抗体。也就是说,它们的特征在于其岩藻糖的量比如果它们通过天然CHO细胞(例如,产生天然糖基化模式的CHO细胞,诸如含有天然FUT8基因的CHO细胞)产生而具有的岩藻糖的量低。在某些实施例中,该抗体是一种抗体,其中其上的N-连接聚糖中有少于约50%、40%、30%、20%、10%或5%包含岩藻糖。例如,此类抗体中的岩藻糖的量可以为1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。在某些实施例中,该抗体是一种抗体,其中其上的N-连接聚糖均不包含岩藻糖,即,其中该抗体完全不具有岩藻糖,或没有岩藻糖或没有被岩藻糖基化。岩藻糖的量为通过计算相对于通过MALDI-TOF质谱测得的与Asn 297附接的所有糖结构(例如,复合、杂合和高甘露糖结构)的总和,糖链中在Asn297处的岩藻糖的平均量,确定,如W0 2008/077546中所述。Asn297是指位于Fc区中约297位(Fc区残基的EU编号)处的天冬酰胺残基;然而,由于抗体中的微小序列变化,Asn297也可以位于位置297上游或下游大约 ± 3 个氨基酸,即在位置294和300之间。此类岩藻糖基化变体可以具有改善的ADCC功能。参见,例如,美国专利公布号US 2003/0157108 (Presta, L.) 和US 2004/0093621 (日本协和发酵工业株式会社 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd))。与“去岩藻糖基化”或“岩藻糖缺陷型”抗体变体有关的出版物的实例包括:US 2003/0157108;W0 2000/61739;W0 2001/29246;US 2003/0115614;US 2002/0164328;US 2004/0093621;US 2004/0132140;US 2004/0110704;US 2004/0110282;US 2004/0109865;W0 2003/085119;W0 2003/084570;W0 2005/035586;W0 2005/035778;

W02005/053742; W02002/031140; Okazaki等人, J. Mol. Biol. 336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki等人, Biotech. Bioeng. 87:614 (2004)。能够产生去岩藻糖基化抗体的细胞系的示例包括蛋白岩藻糖基化缺陷的 Lec13 CHO 细胞 (Ripka等人 Arch. Biochem. Biophys. 249:533-545 (1986); 美国专利申请号 US 2003/0157108A1, Presta, L; 和 W0 2004/056312 A1, Adams等人, 特别是实例11), 和敲除细胞系, 诸如 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因 (FUT8) 敲除的 CHO 细胞 (参见, 例如, Yamane-Ohnuki等人 Biotech. Bioeng. 87:614 (2004); Kanda, Y.等人, Biotechnol. Bioeng., 94 (4):680-688 (2006); 和 W02003/085107)。

[0312] 抗体变体进一步提供有二等分的寡糖, 例如, 其中附接于抗体的 Fc 区的双触角寡糖被 GlcNAc 二等分。此类抗体变体可以具有减少的岩藻糖基化和/或改善的 ADCC 功能。此类抗体变体的示例描述于例如 W02003/011878 (Jean-Mairet 等人); 美国专利号 6,602,684 (Umana 等人); US 2005/0123546 (Umana 等人); 和 Ferrara 等人, Biotechnology and Bioengineering, 93 (5):851-861 (2006) 中。还提供了在附接于 Fc 区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。此类抗体变体可以具有改善的 CDC 功能。此类抗体变体描述于例如 W0 1997/30087 (Patel 等人); W0 1998/58964 (Raju, S.); 以及 W0 1999/22764 (Raju, S.) 中。

[0313] 在某些实施例中, 本文描述的包含 Fc 区的抗体变体能够与 Fc γ RIII 结合。在某些实施例中, 与包含人野生型 IgG1Fc 区的其他相同抗体相比, 本文所述的包含 Fc 区的抗体变体在人效应细胞的存在下具有 ADCC 活性, 或在人效应细胞的存在下具有增加的 ADCC 活性。

[0314] (xi) Fc 区变体

[0315] 在某些实施例中, 一个或多个氨基酸修饰可引入本文提供的抗体的 Fc 区中, 从而生成 Fc 区变体。Fc 区变体可包含人 Fc 区序列 (例如人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4Fc 区), 其在一个或多个氨基酸位置上包含氨基酸修饰 (例如取代)。

[0316] 在某些实施例中, 本公开考虑了具有一些但不是全部效应子功能的抗体变体, 这使其成为应用的期望候选物, 其中体内的抗体的半衰期为重要的而某些效应子功能 (诸如补体和 ADCC) 为不必要的或有害的。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定, 以确认 CDC 和/或 ADCC 活性的降低/消耗。例如, 可以进行 Fc 受体 (FcR) 结合测定以确保抗体缺乏 Fc γ R 结合 (因此可能缺乏 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 (RIII), 而单核细胞表达 Fc (RI、Fc (RII 和 Fc (RIII)。造血细胞上的 FcR 表达总结在 Ravetch 和 Kinet, 《免疫学年评》(Annu. Rev. Immunol.) 9:457-492 (1991) 的第 464 页的表 3 中。用于评估目的分子的 ADCC 活性的体外测定的非限制性示例描述于美国专利号 5,500,362 (参见, 例如, Hellstrom, I. 等人 Proc. Nat' l. Acad. Sci. USA 83:7059-7063 (1986)) 和 Hellstrom, I 等人, Proc. Nat' l. Acad. Sci. USA 82:1499-1502 (1985); 5,821,337 (参见 Bruggemann, M. 等人, J. Exp. Med. 166:1351-1361 (1987)) 中。替代地, 可以采用非放射性测定方法 (参见, 例如, 用于流式细胞术的 ACTI™ 非放射性细胞毒性测定 (Cell Technology, Inc. Mountain View, CA); 以及 CytoTox96® 非放射性细胞毒性测定 (Promega, Madison, WI))。用于此类测定的有用效应细胞包括外周血单核细胞 (PBMC) 和自然杀伤 (NK) 细胞。替代地或另外地, 目的分子的 ADCC 活性可以在体内评估, 例如, 在动物模型 (诸如在 Clynes 等人 Proc. Nat' l. Acad. Sci. USA 95:652-656 (1998) 中所公开的) 中评估。还可以进行 C1q 结合测定以确认抗体无法结合 C1q, 因此缺乏 CDC 活性。参见, 例如, W0 2006/029879 和 W0 2005/100402 中的

C1q和C3c结合ELISA。为了评估补体活化,可以执行CDC测定(参见例如Gazzano-Santoro等人, *J. Immunol. Methods* 202:163 (1996); Cragg, M.S. 等人, *Blood* 101:1045-1052 (2003); 以及Cragg, M.S. and M.J. Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004))。FcRn结合和体内清除/半衰期测定也可以使用本领域已知的方法执行(参见例如Petkova, S.B. 等人, *Int'l. Immunol.* 18 (12):1759-1769 (2006))。

[0317] 具有降低的效应子功能的抗体包括具有一个或多个Fc区残基238、265、269、270、297、327和329的取代的那些(美国专利No. 6,737,056)。此类Fc突变体包括在两个或多个第265、269、270、297和327位氨基酸处具有取代的Fc突变体,包括所谓的“DANA”Fc突变体,其残基265和297被取代为丙氨酸(美国专利No. 7,332,581)。

[0318] 描述了具有改善的或降低的与FcR的结合的某些抗体变体。(参见,例如,美国专利号6,737,056; WO 2004/056312, 以及Shields等人, *J. Biol. Chem.* 9 (2):6591-6604 (2001)。

[0319] 在某些实施例中,抗体变体包含具有一个或多个氨基酸取代的Fc区,取代改善ADCC,例如,在Fc区的298、333和/或334位(残基的EU编号)处的取代。在一个示例性的实施例中,该抗体在其Fc区中包含以下氨基酸取代:S298A、E333A和K334A。

[0320] 在一些实施例中,例如,如美国专利号6,194,551、WO 99/51642和Idusogie等人 *J. Immunol.* 164:4178-4184 (2000) 中所述,在Fc区中进行改变,导致改变(即,改善或减少)的C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)。

[0321] 具有延长的半衰期和改善的新生儿Fc受体(FcRn)结合的抗体描述于US2005/0014934A1 (Hinton等人)中,该新生儿Fc受体负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer等人, *J. Immunol.* 117:587 (1976) 和Kim等人, *J. Immunol.* 24:249 (1994))。那些抗体包含Fc区,该Fc区中具有改善Fc区与FcRn的结合的一个或多个取代。此类Fc变体包括在以下Fc区残基中的一处或多处具有置换的Fc变体:238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434,例如对Fc区残基434的取代(美国专利号7,371,826)。另参见Duncan&Winter, *Nature* 322:738-40 (1988); 美国专利号5,648,260; 美国专利号5,624,821; 和WO 94/29351关于Fc区变体的其他实例。

[0322] (xii) 抗体衍生物

[0323] 在某些方面,可进一步修饰本公开的抗体以使其含有本领域已知且易于获得的另外的非蛋白质部分。在某些实施例中,适合于抗体衍生的部分是水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性示例包括但不限于聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇的共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三氧杂环己烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或随机共聚物)和葡聚糖或聚(N-乙烯吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇以及它们的混合物。由于其在水中的稳定性,聚乙二醇丙醛在制造中可具有优势。聚合物可具有任何分子量,并且可以具有支链或不具有支链。附接至抗体的聚合物的数目可变,并且如果附接了多于一个聚合物,那么它们可以为相同或不同的分子。通常,可基于以下考虑因素确定用于衍生化的聚合物的数目和/或类型,包括但不限于抗体待改善的特定特性或功能、抗体衍生物是否将用于限定条件下的疗法等。

[0324] (xiii) 载体、宿主细胞和重组方法

[0325] 抗体也可以使用重组方法生产。对于抗抗原抗体的重组生产,将编码抗体的核酸

分离并插入可复制的载体中以进行进一步克隆 (DNA的扩增) 或表达。编码抗体的DNA可以使用常规过程容易地进行分离和测序 (例如, 通过使用能够与编码抗体的重链和轻链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。许多载体可用。载体组分通常包括但不限于以下一种或多种: 信号序列、复制起点、一种或多种标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列。

[0326] 在又一方面, 本文提供了编码本文所述的任何抗体的核酸。在一些实施例中, 核酸进一步包含适用于表达编码前述抗PDL1抗体、抗PD-1抗体或抗PDL2抗体中的任一种的核酸的载体。在又一个具体方面, 载体进一步包含适用于表达核酸的宿主细胞。在又一个具体方面, 宿主细胞是真核细胞或原核细胞。在又一个具体方面, 所述真核细胞是哺乳动物细胞, 例如中国仓鼠卵巢 (CHO)。

[0327] 在又一个实施例中, 提供了编码抗PDL1抗体的轻链或重链可变区序列的分离的核酸, 其中:

[0328] (a) 所述重链进一步包含分别与GFTFSDSWIH (SEQ ID NO:1)、AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:2) 和RHWPGGFDY (SEQ ID No:3) 具有至少85%序列一致性的HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3, 和/或

[0329] (b) 所述轻链进一步包含分别与RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:4)、SASFLYS (SEQ ID NO:5) 和QQYLYHPAT (SEQ ID NO:6) 具有至少85%序列一致性的HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3。

[0330] 在具体方面, 序列一致性是86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

[0331] 抗体或其抗原结合片段可以使用本领域已知的方法来制备; 例如, 通过包括以下步骤的方法制备: 在适用于产生前述抗PDL1抗体、抗PD-1抗体或抗PDL2抗体或片段的条件下, 培养适用于表达的形式的含有编码此类抗体或其抗原结合片段中任一种的核酸的宿主细胞, 并回收抗体或片段。本文描述了其他示例性技术和方法。

[0332] (a) 信号序列组分

[0333] 本公开的抗体不仅可以直接重组产生, 而且可以作为与异源多肽的融合多肽重组产生, 所述异源多肽优选为信号序列或在成熟蛋白或多肽的N末端具有特定裂解位点的其他多肽。优选地, 所选择的异源信号序列是被宿主细胞识别和加工 (例如, 被信号肽酶裂解) 的异源信号序列。对于不识别和加工天然抗体信号序列的原核宿主细胞, 该信号序列被原核信号序列取代, 该原核信号序列例如选自碱性磷酸酶、青霉素酶、lpp或热稳定肠毒素II前导序列组成的组。对于酵母分泌而言, 天然信号序列可以被例如酵母转化酶前导序列、因子前导序列 (包括酿酒酵母和克鲁维酵母 α -因子前导序列) 或酸性磷酸酶前导序列、白色念珠菌葡糖淀粉酶前导序列或WO 90/13646中描述的信号序列取代。在哺乳动物细胞表达中, 可获得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。

[0334] (b) 复制起点

[0335] 表达载体和克隆载体都包含使载体能够在一个或多个所选宿主细胞中复制的核酸序列。通常, 在克隆载体中, 该序列是使载体能够独立于宿主染色体DNA复制的序列, 并包括复制起点或自主复制序列。用于多种细菌、酵母和病毒的此类序列是众所周知的。质粒pBR322的复制起点适用于大多数革兰氏阴性细菌, 2 μ 的质粒起点适用于酵母, 并且各种病毒起点 (SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV或BPV) 可用于在哺乳动物细胞中克隆载体。通常, 哺乳动物表达载体不需要复制起点组分 (通常仅可使用SV40起点, 因为它包含早期启动子)。

[0336] (c) 选择基因组分

[0337] 表达和克隆载体可以包含选择基因,也称为选择性标记物。典型的选择基因编码的蛋白质,该蛋白质(a)赋予对抗生素或其他毒素(例如氨苄青霉素、新霉素、氨甲蝶呤或四环素)的耐药性,(b)补足营养缺陷型缺陷,或(c)供应无法从复合培养基中获得的关键营养素,例如编码杆菌属D-丙氨酸消旋酶的基因。

[0338] 选择方案的一个实例利用一种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产生赋予药物耐药性的蛋白质,从而在选择方案中生存下来。这种显性选择的示例使用新霉素、霉酚酸和潮霉素。

[0339] 哺乳动物细胞的合适选择标记物的另一个示例是那些能够鉴定能够摄取编码抗体的核酸的细胞的标记物,诸如DHFR、谷氨酰胺合成酶(GS)、胸苷激酶、金属硫蛋白-I和金属硫蛋白-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)。

[0340] 例如,通过在含有氨甲蝶呤(Mtx)(DHFR的竞争性拮抗剂)的培养基中培养转化体来鉴定用DHFR基因转化的细胞。在这些条件下,DHFR基因与任何其他共转化的核酸一起扩增。可以使用缺乏内源DHFR活性的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系(例如,ATCC CRL-9096)。

[0341] 替代地,通过在含有L-蛋氨酸硫代亚胺(Msx)(GS抑制剂)的培养基中培养转化体来鉴定用GS基因转化的细胞。在这些条件下,GS基因与任何其他共转化的核酸一起扩增。GS选择/扩增系统可以与上述DHFR选择/扩增系统联合使用。

[0342] 替代地,可以通过在含有用于选择性标记物的选择剂(诸如氨基糖苷类抗生素,例如卡那霉素、新霉素或G418)的培养基中进行细胞生长,来选择用编码目的抗体、野生型DHFR基因和另一种选择性标记物诸如氨基糖苷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)。参见例如美国专利号4,965,199。

[0343] 用于酵母的合适选择基因是存在于酵母质粒YRp7中的trp1基因(Stinchcomb等人,Nature,282:39(1979))。trp1基因为缺乏在色氨酸中生长能力的酵母突变株(例如ATCC号44076或PEP4-1)提供选择标记物。Jones,Genetics,85:12(1977)。然后,酵母宿主细胞基因组中trp1病灶的存在为通过在色氨酸不存在下生长来检测转化提供了有效的环境。类似地,Leu2缺陷型酵母菌株(ATCC 20,622或38,626)由带有Leu2基因的已知质粒补足。

[0344] 此外,源自1.6 μ m环状质粒pKD1的载体可用于转化克鲁维酵母。替代地,报道了采用乳酸克鲁维酵母来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)。还公开了用于通过克鲁维酵母工业菌株分泌成熟的重组人血清白蛋白的稳定的多拷贝表达载体。Fleer等人,Bio/Technology,9:968-975(1991)。

[0345] (d) 宿主细胞的选择和转化

[0346] 用于在本文的载体中克隆或表达DNA的合适宿主细胞是上述原核生物、酵母或更高等的真核细胞。为此目的,合适的原核生物包括真细菌诸如例如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物,例如肠杆菌科,诸如埃希氏杆菌属例如大肠杆菌、肠杆菌属、欧文氏菌属、克雷伯氏杆菌属、变形杆菌属、沙门氏菌属例如鼠伤寒沙门氏菌、沙雷氏菌属例如粘质沙雷氏菌和志贺氏杆菌属,以及芽孢杆菌属诸如枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌(例如,1989年4月12日公布的DD 266,710中公开的地衣芽孢杆菌41P),假单胞菌属诸如绿脓假单胞菌,和链霉菌属。一种优选的大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌294(ATCC 31,446),但其他菌株例如大肠杆菌B、大肠杆菌X1776(ATCC 31,537)和大肠杆菌W3110(ATCC 27,325)也是合适的。这些示例是说

明性的而不是限制性的。

[0347] 全长抗体、抗体融合蛋白和抗体片段可在细菌中产生,尤其是在不需要糖基化和Fc效应子功能时,诸如当治疗性抗体与自身的细胞毒剂(例如毒素)偶联时显示出对肿瘤细胞破坏的有效性。全长抗体在循环中具有更长的半衰期。在大肠杆菌中的生产速度更快且更具成本效益。关于抗体片段和多肽在细菌中的表达,参见,例如,美国专利号5,648,237 (Carter等人)、美国专利号5,789,199 (Joly等人)、美国专利号5,840,523 (Simmons等人),这些专利描述了用于优化表达和分泌的翻译起始区(TIR)和信号序列。另请参见Charlton, *Methods in Molecular Biology*, 第248卷(B.K.C.Lo编, Humana Press, Totowa, N.J., 2003), 第245-254页,其描述抗体片段在大肠杆菌中的表达。表达后,可以将抗体以可溶级分的形式从大肠杆菌细胞糊中分离出来,并可以根据同种型通过例如蛋白A或G柱纯化。最终纯化可以类似于纯化例如在CHO细胞中表达的抗体的方法进行。

[0348] 除原核生物外,真核微生物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。酿酒酵母或普通面包酵母是低等真核宿主微生物中最常用的酵母。然而,许多其他属、种和菌株在本文中是普遍可获得的和有用的,例如粟酒裂殖酵母;克鲁维酵母属宿主例如乳酸克鲁维酵母、脆壁克鲁维酵母(ATCC 12,424)、保加利亚克鲁维酵母(ATCC 16,045)、维氏克鲁维酵母(*K.wickerhamii*) (ATCC 24,178)、沃氏克鲁维酵母(*K.waltii*) (ATCC 56,500)、果蝇克鲁维酵母(*K.drosophilum*) (ATCC 36,906)、耐热克鲁维酵母和马克斯克鲁维酵母;耶氏酵母(EP 402,226);巴斯德毕赤酵母(EP 183,070);假丝酵母;瑞氏木霉(*Trichoderma reesia*) (EP 244,234);粗糙脉孢菌;许旺酵母属诸如西方许旺酵母;以及丝状真菌诸如脉孢菌属、青霉属、弯颈霉属和曲霉菌宿主,诸如构巢曲霉和黑曲霉。有关讨论使用酵母和丝状真菌生产治疗性蛋白质的综述,参见例如Gerngross, *Nat.Biotech.* 22: 1409-1414 (2004)。

[0349] 可以选择某些其中糖基化途径已经被“人源化”的真菌和酵母菌株,从而产生具有部分或完全人糖基化模式的抗体。参见,例如,Li等人, *Nat.Biotech.* 24:210-215 (2006) (描述巴斯德毕赤酵母中糖基化途径的人源化);和Gerngross等人,同上。

[0350] 用于表达糖基化抗体的合适宿主细胞也来源于多细胞生物(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的示例包括植物细胞和昆虫细胞。已经鉴定出来自宿主的许多杆状病毒株和变体以及相应的昆虫宿主允许细胞,这些宿主诸如草地贪夜蛾(毛虫)、埃及伊蚊(蚊)、白纹伊蚊(蚊)、黑腹果蝇(果蝇)和家蚕。各种用于转染的病毒株是可公开获得的,例如,苜蓿银纹夜蛾NPV的L-1变体和家蚕NPV的Bm-5株,并且此类病毒可以用作本文中根据本发明的病毒,特别是用于转染草地贪夜蛾细胞。

[0351] 棉花、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛、番茄、浮萍(唇形科)、苜蓿(蒺藜苜蓿)和烟草的植物细胞培养物也可用作宿主。参见例如美国专利号5,959,177、6,040,498、6,420,548、7,125,978和6,417,429(描述了用于在转基因植物中产生抗体的PLANTIBODIESTM技术)。

[0352] 脊椎动物细胞可以用作宿主,并且脊椎动物细胞在培养(组织培养)中的繁殖已成为常规过程。有用的哺乳动物宿主细胞系的示例是通过SV40(COS-7, ATCC CRL 1651)转化的猴肾CV1系;人胚胎肾细胞系(亚克隆用于在悬浮培养中生长的293或293细胞, Graham等人, *J.Gen Viro.* 36:59 (1977));幼仓鼠肾细胞(BHK, ATCC CCL 10);小鼠支持细胞(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); 水牛大鼠肝细胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442); 人肺细胞 (W138, ATCC CCL 75); 人肝细胞 (Hep G2, HB 8065); 小鼠乳腺肿瘤 (MMT 060562, ATCC CCL51); TRI细胞 (Mather等人, *Annals N.Y.Acad.Sci.* 383:44-68 (1982)); MRC 5细胞; FS4细胞; 以及人肝癌细胞系 (Hep G2)。其他有用的哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞, 其包括DHFR-CHO细胞 (Urlaub等人, *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77:4216 (1980)); 以及骨髓瘤细胞系, 诸如NS0和Sp2/0。关于适用于抗体生产的某些哺乳动物宿主细胞系的综述, 参见例如Yazaki和Wu, *Methods in Molecular Biology*, 第248卷 (B.K.C.Lo编撰, Humana Press, Totowa, N.J., 2003), 第255-268页。

[0353] 用上述用于抗体生产的表达或克隆载体转化宿主细胞, 并在常规营养培养基中培养, 所述营养培养基经适当修饰以诱导启动子、选择转化子或扩增编码所需序列的基因。

[0354] (e) 培养宿主细胞

[0355] 用于产生本公开的抗体的宿主细胞可以在多种培养基中培养。市售培养基诸如Ham's F10 (Sigma)、基本必需培养基 (MEM, Sigma)、RPMI-1640 (Sigma) 和杜尔贝科改进伊格尔培养基 (DMEM, Sigma) 适用于培养宿主细胞。另外, 在Ham等人, *Meth.Enz.* 58:44 (1979); Barnes等人, *Anal.Biochem.* 102:255 (1980); 美国专利号4,767,704、4,657,866、4,927,762、4,560,655或5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195或美国再公告专利30,985中描述的任何培养基可用作宿主细胞的培养基。这些介质中的任何一种都可以根据需要补充激素和/或其他生长因子 (诸如胰岛素、转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)、微量元素 (定义为通常以微摩尔范围的最终浓度存在的无机化合物) 和葡萄糖或等效能源。也可以以本领域技术人员已知的适当浓度包括任何其他必要的补充剂。培养条件诸如温度、pH等, 是先前与选择用于表达的宿主细胞一起使用的条件, 对于普通技术人员而言是显而易见的。

[0356] (xiv) 抗体的纯化

[0357] 当使用重组技术时, 抗体可以在细胞内在周质间隙中产生, 或直接分泌到培养基中。如果抗体在细胞内产生, 则作为第一步, 例如通过离心或超滤移除宿主细胞或裂解片段的微粒碎片。Carter等人, *Bio/Technology* 10:163-167 (1992) 中描述了分离分泌到大肠杆菌周质间隙中的抗体的方法。简而言之, 将细胞糊状物在乙酸钠 (pH 3.5)、EDTA和苯甲基磺酰氟 (PMSF) 的存在下解冻约30分钟。可以通过离心移除细胞碎片。在抗体被分泌到培养基中的情况下, 通常首先使用可商购的蛋白质浓缩过滤器, 例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元, 浓缩来自此类表达系统的上清液。蛋白酶抑制剂诸如PMSF可以包含在前述任何步骤中以抑制蛋白水解作用; 而抗生素可以包含在内以防止外来污染物的生长。

[0358] 可以使用例如羟磷灰石色谱、疏水相互作用色谱、凝胶电泳、透析和亲和色谱纯化从细胞制备的抗体组合物, 其中亲和色谱是通常优选的纯化步骤之一。蛋白A作为亲和配体的适用性取决于抗体中存在的任何免疫球蛋白Fc结构域的种类和同种型。蛋白A可用于纯化基于人 γ 1、 γ 2或 γ 4重链的抗体 (Lindmark等人, *J.Immunol.Meth.* 62:1-13 (1983))。蛋白G被推荐用于所有小鼠同种型和人 γ 3 (Guss等人, *EMBO J.* 5:1567-1575 (1986))。亲和配体所附接的基质大多是琼脂糖, 但也可以使用其他基质。机械稳定的基质, 诸如可控孔度玻璃

或聚(苯乙烯二乙烯基),具有比琼脂糖更快的流速和更短的处理时间。当抗体包含CH3结构域时,Bakerbond ABXTM树脂(J.T.Baker,Phillipsburg,N.J.)可用于纯化。也可使用其他蛋白质纯化技术,诸如在离子交换柱上进行分级、乙醇沉淀、反相HPLC、硅胶色谱、肝素色谱、在阴离子或阳离子交换树脂(诸如聚天冬氨酸柱)上进行SEPHAROSE™色谱、色谱聚焦、SDS-PAGE和硫酸铵沉淀,取决于待回收的抗体。

[0359] 通常,与上述方法一致和/或被本领域技术人员认为适合于特定目的抗体的制备用于研究、测试和临床的抗体的各种方法是已本领域中建立的。

[0360] VI. 选择生物活性抗体

[0361] 可以对如上所述产生的抗体进行一种或多种“生物活性”测定,以从治疗角度选择具有有益特性的抗体,或选择保留抗体生物活性的制剂和条件。可以测试抗体与它所针对的抗原结合的能力。例如,可以使用本领域已知的方法(例如ELISA、蛋白质印迹法等)。

[0362] 例如,对于抗PDL1抗体,可以在检测与PDL1结合能力的测定法中评价抗体的抗原结合特性。在一些实施例中,抗体的结合可以通过例如饱和结合、ELISA和/或竞争分析(例如RIA)确定。而且,可以对抗体进行其他生物活性测定,例如,以评价其作为治疗剂的有效性。此类测定是本领域已知的,并且取决于靶抗原和抗体的预期用途。例如,可以在CD8+T细胞、淋巴细胞性脉络膜脑膜炎病毒(LCMV)小鼠模型和/或同基因肿瘤模型中,例如在美国专利8,217,149中描述的,评估抗体对PD-L1阻断的生物学作用。

[0363] 为了筛选与目的抗原上特定表位结合的抗体(例如,阻断本实例的抗PDL1抗体与PD-L1结合的抗体),需要进行常规的交叉阻断测定,例如《抗体——实验室手册》(Antibodies, A Laboratory Manual, 冷泉港实验室, Harlow和David Lane编撰(1988))中所述。替代地,表位作图,例如,如在Champe等人, J. Biol. Chem. 270:1388-1394 (1995)中所述,可以用来确定抗体是否结合目的表位。

[0364] VII. 药物组合物和制剂

[0365] 本文还提供了药物组合物和制剂,例如,用于治疗肺癌(诸如小细胞肺癌,例如,广泛期小细胞肺癌)的药物组合物和制剂,其包含PD-1轴结合拮抗剂(诸如阿特殊单抗)、铂剂(诸如卡铂)和拓扑异构酶II抑制剂(诸如依托泊苷)。在一些实施例中,药物组合物和制剂进一步包含药学上可接受的运载体。

[0366] 在一些实施例中,本文所述的抗PDL1抗体(诸如阿特殊单抗)处于制剂中,该制剂包含约60mg/mL量的抗体、约20mM浓度的乙酸组氨酸、约120mM浓度的蔗糖和0.04% (w/v)浓度的聚山梨酸酯(例如聚山梨酸酯20),且制剂的pH为约5.8。在一些实施例中,本文所述的抗PDL1抗体(诸如阿特殊单抗)处于制剂中,该制剂包含约125mg/mL量的抗体、约20mM浓度的乙酸组氨酸、约240mM浓度的蔗糖和0.02% (w/v)浓度的聚山梨酸酯(例如聚山梨酸酯20),且制剂的pH为约5.5。

[0367] 在制备目的抗体后(例如,生产可以如本文所公开地配制的抗体的技术在本文中阐述并且是本领域已知的),制备了包含它的药物制剂。在某些实施例中,待配制的抗体未经先前冻干,并且本文中目的制剂是水性制剂。在某些实施例中,抗体是全长抗体。在一个实施例中,制剂中的抗体是抗体片段,诸如F(ab')₂,在这种情况下,可能需要解决使用全长抗体时可能不会发生的问题(诸如将抗体剪接到Fab)。例如,通过考虑所需的剂量体积和施用方式来确定制剂中存在的抗体的治疗有效量。约25mg/mL至约150mg/mL、或约30mg/mL至

约140mg/mL、或约35mg/mL至约130mg/mL、或约40mg/mL至约120mg/mL、或约50mg/mL至约130mg/mL、或约50mg/mL至约125mg/mL、或约50mg/mL至约120mg/mL、或约50mg/mL至约110mg/mL、或约50mg/mL至约100mg/mL、或约50mg/mL至约90mg/mL、或约50mg/mL至约80mg/mL、或约54mg/mL至约66mg/mL是制剂中的示例性抗体浓度。

[0368] 制备在pH缓冲溶液中包含抗体的水性制剂。在一些实施例中，本公开的缓冲液的pH在约5.0至约7.0的范围内。在某些实施例中，pH在约5.0至约6.5的范围内，pH在约5.0至约6.4的范围内，在约5.0至约6.3的范围内，pH在约5.0至约6.2的范围内，pH在约5.0至约6.1的范围内，pH在约5.5至约6.1的范围内，pH在约5.0至约6.0的范围内，pH在约5.0至约5.9的范围内，pH在约5.0至约5.8的范围内，pH在约5.1至约6.0的范围内，pH在约5.2至约6.0的范围内，pH在约5.3至约6.0的范围内，pH在约5.4至约6.0的范围内，pH在约5.5至约6.0的范围内，pH在约5.6至约6.0的范围内，pH在约5.7至约6.0的范围内，或pH在约5.8至约6.0的范围内。在一些实施例中，所述制剂的pH为6.0或约6.0。在一些实施例中，所述制剂的pH为5.9或约5.9。在一些实施例中，所述制剂的pH为5.8或约5.8。在一些实施例中，所述制剂的pH为5.7或约5.7。在一些实施例中，所述制剂的pH为5.6或约5.6。在一些实施例中，所述制剂的pH为5.5或约5.5。在一些实施例中，所述制剂的pH为5.4或约5.4。在一些实施例中，所述制剂的pH为5.3或约5.3。在一些实施例中，所述制剂的pH为5.2或约5.2。将pH控制在该范围内的缓冲剂的示例包括组氨酸（例如L-组氨酸）或乙酸钠。在某些实施例中，缓冲液包含浓度为约15mM至约25mM的乙酸组氨酸或乙酸钠。在一些实施例中，缓冲液包含浓度为约15mM至约25mM、约16mM至约25mM、约17mM至约25mM、约18mM至约25mM、约19mM至约25mM、约20mM至约25mM、约21mM至约25mM、约22mM至约25mM、约15mM、约16mM、约17mM、约18mM、约19mM、约20mM、约21mM、约22mM、约23mM、约24mM或约25mM的乙酸组氨酸或乙酸钠。在一个实施例中，缓冲剂是乙酸组氨酸或乙酸钠，其量为约20mM，pH 5.0。在一个实施例中，缓冲剂是乙酸组氨酸或乙酸钠，其量为约20mM，pH 5.1。在一个实施例中，缓冲剂是乙酸组氨酸或乙酸钠，其量为约20mM，pH 5.2。在一个实施例中，缓冲剂是乙酸组氨酸或乙酸钠，其量为约20mM，pH 5.3。在一个实施例中，缓冲剂是乙酸组氨酸或乙酸钠，其量为约20mM，pH 5.4。在一个实施例中，缓冲剂是乙酸组氨酸或乙酸钠，其量为约20mM，pH 5.5。在一个实施例中，缓冲剂是乙酸组氨酸或乙酸钠，其量为约20mM，pH 5.6。在一个实施例中，缓冲剂是乙酸组氨酸或乙酸钠，其量为约20mM，pH 5.7。在一个实施例中，缓冲剂是乙酸组氨酸或乙酸钠，其量为约20mM，pH 5.8。在一个实施例中，缓冲剂是乙酸组氨酸或乙酸钠，其量为约20mM，pH 5.9。在一个实施例中，缓冲剂是乙酸组氨酸或乙酸钠，其量为约20mM，pH 6.0。在一个实施例中，缓冲剂是乙酸组氨酸或乙酸钠，其量为约20mM，pH 6.1。在一个实施例中，缓冲剂是乙酸组氨酸或乙酸钠，其量为约20mM，pH 6.2。在一个实施例中，缓冲剂是乙酸组氨酸或乙酸钠，其量为约20mM，pH 6.3。在一个实施例中，缓冲剂是乙酸组氨酸或乙酸钠，其量为约25mM，pH 5.2。在一个实施例中，缓冲剂是乙酸组氨酸或乙酸钠，其量为约25mM，pH 5.3。在一个实施例中，缓冲剂是乙酸组氨酸或乙酸钠，其量为约25mM，pH 5.4。在一个实施例中，缓冲剂是乙酸组氨酸或乙酸钠，其量为约25mM，pH 5.5。在一个实施例中，缓冲剂是乙酸组氨酸或乙酸钠，其量为约25mM，pH 5.6。在一个实施例中，缓冲剂是乙酸组氨酸或乙酸钠，其量为约25mM，pH 5.7。在一个实施例中，缓冲剂是乙酸组氨酸或乙酸钠，其量为约25mM，pH 5.8。在一个实施例中，缓冲剂是乙酸组氨酸或乙酸钠，其量为约25mM，pH 5.9。在一个实施

例中,缓冲剂是乙酸组氨酸或乙酸钠,其量为约25mM,pH 6.0。在一个实施例中,缓冲剂是乙酸组氨酸或乙酸钠,其量为约25mM,pH 6.1。在一个实施例中,缓冲剂是乙酸组氨酸或乙酸钠,其量为约25mM,pH 6.2。在一个实施例中,缓冲剂是乙酸组氨酸或乙酸钠,其量为约25mM,pH 6.3。

[0369] 在一些实施例中,制剂进一步包含其量为约60mM至约240mM的蔗糖。在一些实施例中,制剂中的蔗糖为约60mM至约230mM、约60mM至约220mM、约60mM至约210mM、约60mM至约200mM、约60mM至约190mM、约60mM至约180mM、约60mM至约170mM、约60mM至约160mM、约60mM至约150mM、约60mM至约140mM、约80mM至约240mM、约90mM至约240mM、约100mM至约240mM、约110mM至约240mM、约120mM至约240mM、约130mM至约240mM、约140mM至约240mM、约150mM至约240mM、约160mM至约240mM、约170mM至约240mM、约180mM至约240mM、约190mM至约240mM、约200mM至约240mM、约80mM至约160mM、约100mM至约140mM或约110mM至约130mM。在一些实施例中,制剂中的蔗糖为约60mM、约70mM、约80mM、约90mM、约100mM、约110mM、约120mM、约130mM、约140mM、约150mM、约160mM、约170mM、约180mM、约190mM、约200mM、约210mM、约220mM、约230mM或约240mM。

[0370] 在一些实施例中,制剂中的抗体浓度为约40mg/ml至约125mg/ml。在一些实施例中,制剂中的抗体浓度为约40mg/ml至约120mg/ml、约40mg/ml至约110mg/ml、约40mg/ml至约100mg/ml、约40mg/ml至约90mg/ml、约40mg/ml至约80mg/ml、约40mg/ml至约70mg/ml、约50mg/ml至约120mg/ml、约60mg/ml至约120mg/ml、约70mg/ml至约120mg/ml、约80mg/ml至约120mg/ml、约90mg/ml至约120mg/ml或约100mg/ml至约120mg/ml。在一些实施例中,制剂中的抗体浓度为约60mg/ml。在一些实施例中,制剂中的抗体浓度为约65mg/ml。在一些实施例中,制剂中的抗体浓度为约70mg/ml。在一些实施例中,制剂中的抗体浓度为约75mg/ml。在一些实施例中,制剂中的抗体浓度为约80mg/ml。在一些实施例中,制剂中的抗体浓度为约85mg/ml。在一些实施例中,制剂中的抗体浓度为约90mg/ml。在一些实施例中,制剂中的抗体浓度为约95mg/ml。在一些实施例中,制剂中的抗体浓度为约100mg/ml。在一些实施例中,制剂中的抗体浓度为约110mg/ml。在一些实施例中,制剂中的抗体浓度为约125mg/ml。

[0371] 在一些实施例中,将表面活性剂添加至抗体制剂。示例性的表面活性剂包括非离子表面活性剂,诸如聚山梨酯(例如聚山梨酯20、80等)或泊洛沙姆(例如泊洛沙姆188等)。添加的表面活性剂的量应使得其减少配制的抗体的聚集和/或将制剂中颗粒的形成最小化和/或减少吸附。例如,表面活性剂可以约0.001%至约0.5% (w/v) 的量存在于制剂中。在一些实施例中,表面活性剂(例如聚山梨酯20)为约0.005%至约0.2%、约0.005%至约0.1%、约0.005%至约0.09%、约0.005%至约0.08%、约0.005%至约0.07%、约0.005%至约0.06%、约0.005%至约0.05%、约0.005%至约0.04%、约0.008%至约0.06%、约0.01%至约0.06%、约0.02%至约0.06%、约0.01%至约0.05%或约0.02%至约0.04%。在某些实施例中,表面活性剂(例如聚山梨酯20)以0.005%或约0.005%的量存在于制剂中。在某些实施例中,表面活性剂(例如聚山梨酯20)以0.006%或约0.006%的量存在于制剂中。在某些实施例中,表面活性剂(例如聚山梨酯20)以0.007%或约0.007%的量存在于制剂中。在某些实施例中,表面活性剂(例如聚山梨酯20)以0.008%或约0.008%的量存在于制剂中。在某些实施例中,表面活性剂(例如聚山梨酯20)以0.009%或约0.009%的量存在于制剂中。在某些实施例中,表面活性剂(例如聚山梨酯20)以0.01%或约0.01%的量存在于制剂中。

在某些实施例中,表面活性剂(例如聚山梨酯20)以0.02%或约0.02%的量存在于制剂中。在某些实施例中,表面活性剂(例如聚山梨酯20)以0.03%或约0.03%的量存在于制剂中。在某些实施例中,表面活性剂(例如聚山梨酯20)以0.04%或约0.04%的量存在于制剂中。在某些实施例中,表面活性剂(例如聚山梨酯20)以0.05%或约0.05%的量存在于制剂中。在某些实施例中,表面活性剂(例如聚山梨酯20)以0.06%或约0.06%的量存在于制剂中。在某些实施例中,表面活性剂(例如聚山梨酯20)以0.07%或约0.07%的量存在于制剂中。在某些实施例中,表面活性剂(例如聚山梨酯20)以0.08%或约0.08%的量存在于制剂中。在某些实施例中,表面活性剂(例如聚山梨酯20)以0.1%或约0.1%的量存在于制剂中。在某些实施例中,表面活性剂(例如聚山梨酯20)以0.2%或约0.2%的量存在于制剂中。在某些实施例中,表面活性剂(例如聚山梨酯20)以0.3%或约0.3%的量存在于制剂中。在某些实施例中,表面活性剂(例如聚山梨酯20)以0.4%或约0.4%的量存在于制剂中。在某些实施例中,表面活性剂(例如聚山梨酯20)以0.5%或约0.5%的量存在于制剂中。

[0372] 在一个实施例中,制剂包含上述试剂(例如抗体、缓冲液、蔗糖和/或表面活性剂),并且基本上不含一种或多种防腐剂诸如苯甲醇、苯酚、间甲酚、氯丁醇和苄索铵。在另一个实施例中,制剂中可以包含防腐剂,特别是当制剂是多剂量制剂时。防腐剂的浓度可以在约0.1%至约2%的范围内,优选约0.5%至约1%。制剂中可以包含一种或多种其他药学上可接受的运载体、赋形剂或稳定剂,诸如《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Osol, A. 编撰(1980))中描述的那些,只要它们不会不利地影响制剂的所需特征即可。可接受的运载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度下对受者无毒;并且包括:其他缓冲剂;助溶剂;抗氧化剂,包括抗坏血酸和蛋氨酸;螯合剂,诸如EDTA;金属络合物(例如锌-蛋白络合物);可生物降解的聚合物,诸如聚酯;和/或成盐抗衡离子。本文的示例性药学上可接受的运载体进一步包括间质药物分散剂,诸如可溶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.)。某些示例性sHASEGP和使用方法,包括rHuPH20,描述于美国专利公开No. 2005/0260186和2006/0104968中。在一个方面中,将sHASEGP与一种或多种另外的糖胺聚糖酶(诸如软骨素酶)组合。

[0373] 本文的制剂还可含有多于一种对于所治疗的特定适应症是必需的蛋白质,优选是具有不会不利地影响其他蛋白质的互补活性的蛋白质。例如,当抗体是抗PDL1(诸如阿特珠单抗)时,可以与另一种药物(例如化疗剂和抗肿瘤剂)联合组合使用。

[0374] 本文所述的药物组合物和制剂可通过将具有所需纯度的活性成分(诸如抗体或多肽)与一种或多种任选的药学上可接受的载体混合来制备(《雷明顿药学科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences),第16版,Osol, A. 编撰(1980)),以冻干制剂或水溶液的形式。可接受的运载体在所采用的剂量和浓度下对受者无毒;并且包括但不限于:缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和蛋氨酸;防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;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,诸如血清白蛋白、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、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸

如EDTA;糖,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子,诸如钠;金属络合物(例如锌-蛋白络合物);和/或非离子表面活性剂,诸如聚乙二醇(PEG)。本文的示例性药学上可接受的运载体进一步包括间质药物分散剂,诸如可溶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.)。某些示例性sHASEGP和使用方法,包括rHuPH20,描述于美国专利公开No.2005/0260186和2006/0104968中。在一个方面中,将sHASEGP与一种或多种另外的糖胺聚糖酶(诸如软骨素酶)组合。

[0375] 示例性的冻干抗体制剂描述于美国专利No.6,267,958中。水性抗体制剂包括在美国专利No.6,171,586和W02006/044908中描述的那些,后者中的制剂包含组氨酸-乙酸盐缓冲剂。

[0376] 本文的组合物和制剂还可含有多于一种对于所治疗的特定适应症是必需的活性成分,优选是具有不会彼此不利地影响的互补活性的活性成分。此类活性成分适当地以对预期目的有效的量组合存在。

[0377] 活性成分可以包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合而制备的微胶囊(例如分别为羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊)中;在胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白、微球、微乳液、纳米粒子和纳米胶囊)中;或在粗乳液中。此类技术公开于《雷明顿药物科学》(Remington's Pharmaceutical Sciences)第16版,Osol,A.编撰(1980)。

[0378] 可以制备缓释制备物。缓释制备物的合适示例包括含有抗体的固态疏水聚合物的半透性基质,所述基质是例如膜或微胶囊等成型制品的形式。待用于体内施用的制剂通常是无菌的。例如,无菌可以通过无菌过滤膜过滤而容易地实现。

[0379] 卡铂和/或依托泊苷的药物制剂是可商购的。例如,卡铂以多种商品名(如本文其他地方所述)而为人所知,包括PARAPLATIN®。依托泊苷以多种商品名(如本文其他地方所述)而为人所知,包括VP-16、ETOPOPHOS®、TOPOSAR™和VEPESID®。在一些实施例中,卡铂和/或依托泊苷被提供在分开的容器中。在一些实施例中,如可从市售产品获得的处方信息中所述,卡铂和/或依托泊苷分别用于和/或制备用于施用至个体。

[0380] VIII. 治疗方法

[0381] 本文提供了用于治疗或延迟个体中癌症(诸如肺癌,例如小细胞肺癌,例如广泛期小细胞肺癌)的进展的方法,包括对个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂(例如抗PD-L1抗体)、铂剂(例如卡铂)和拓扑异构酶抑制剂(例如依托泊苷)。在一些实施例中,治疗导致个体在停止治疗后的持续响应。在一些实施例中,治疗延长了个体的无进展生存期(PFS)和/或总生存期(OS)。本文描述的方法可用于治疗需要增强免疫原性的病症,诸如增加用于治疗癌症的肿瘤免疫原性。本文还提供了增强患病(诸如肺癌,例如小细胞肺癌,例如广泛期小细胞肺癌)个体的个体免疫功能的方法,该方法包括向个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂(例如抗PD-L1抗体)、铂剂(例如卡铂)和拓扑异构酶抑制剂(例如依托泊苷)。

[0382] 在一些实施例中,肺癌为小细胞肺癌(SCLC)。在一些实施例中,SCLC是广泛期小细胞肺癌(ES-SCLC),也称为SCLC 4 (IV)期。在一些实施例中,SCLC是根据退伍军人管理局肺研究小组(VALG)分期系统或如其所定义的经组织学或细胞学证实的ES-SCLC(参见,例如,

Micke等人(2002)“Staging small cell lung cancer:Veterans Administration Lung Study Group versus International Association for the Study of Lung Cancer—what limits limited disease?”Lung Cancer 37:271-6)。在一些实施例中,如果个体不可手术并且不能被分类为患有局限性或局限期SCLC(L-SCLC或LS-SCLC),则SCLC被分类为ES-SCLC。在一些实施例中,ES-SCLC是可检测的和/或已扩散到最初累及的肺以外。在一些实施例中,ES-SCLC是可检测的和/或已进一步扩散到其他(例如,远端)器官诸如(但不限于)肝脏、肾上腺、淋巴结和/或脑部。在一些实施例中,ES-SCLC难以治疗。

[0383] 在一些实施例中,个体的预后不良。在一些实施例中,个体是从未接受过治疗的个体。在一些实施例中,从未接受过治疗的个体是尚未接受针对例如癌症、SCLC或ES-SCLC的先前治疗的个体。在一些实施例中,从未接受过治疗的个体是未接受针对ES-SCLC的先前治疗的个体。在一些实施例中,从未接受过治疗的个体是从未接受过化疗,例如,未接受过用于治疗例如癌症、SCLC和/或ES-SCLC的先前化疗的个体。在一些实施例中,个体尚未接受针对ES-SCLC的治疗。在一些实施例中,个体尚未接受针对ES-SCLC的先前的全身治疗。在一些实施例中,该个体已经接受了以治愈为目的的针对局限期SCLC(LS-SCLC)的放化疗,并且自从诊断出ES-SCLC以来的最后一次化疗、放疗或放化疗开始经历了至少6个月的无治疗周期。在一些实施例中,个体具有无症状的幕上或小脑中枢神经系统(CNS)转移。在一些实施例中,个体不具有至中脑、脑桥、延髓或脊髓的转移。在一些实施例中,个体患有CNS疾病并且不需要针对CNS疾病的皮质类固醇治疗。在一些实施例中,个体具有新的无症状转移,并且已经接受了针对CNS转移的放疗和/或手术。在一些实施例中,个体患有根据/如RECIST v1.1标准所定义的可测量的疾病(参见,例如,Eisenhauer等人(2009)“New response evaluation criteria in solid tumors:Revised RECIST guideline(version 1.1).”Eur.J.Cancer.45:228-247)。在一些实施例中,个体尚未接受CD137激动剂或免疫检查点阻断疗法的先前治疗,例如包括但不限于抗PD-1抗体或抗PD-L1抗体。

[0384] 本领域已知或本文所述的任何PD-1轴结合拮抗剂、铂剂和拓扑异构酶II抑制剂均可用于所述方法。在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂是阿特殊单抗,铂剂是卡铂或顺铂,以及/或拓扑异构酶II抑制剂是依托泊苷。

[0385] 在一些实施例中,治疗包括诱导期和维持期(或“维持疗法”)。在一些实施例中,诱导期包括,在第1至第4周期的每个21天周期中,在第1天施用1200mg剂量的PD-1轴结合拮抗剂(例如,抗PD-L1抗体诸如阿特殊单抗),在第1天施用足以达到5mg/mL/min初始目标曲线下面积(AUC)的剂量的铂剂(例如,卡铂或顺铂),并且第1天、第2天和第3天中的每一天施用100mg/m²剂量的拓扑异构酶II抑制剂(例如依托泊苷)。在一些实施例中,维持期包括在第4周期后每个21天周期的第1天施用1200mg剂量的PD-1轴结合拮抗剂(例如,抗PD-L1抗体诸如阿特殊单抗)。下表4中提供了示例性的给药和施用时间表,其中包括诱导周期和维护周期:

[0386] 表4:示例性给药和施用时间表

[0387]		诱导期			维持期
	药物	第 1 至第 4 周期*			> 第 4 周期*
	(按施用顺序列出)	第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 1 天
[0388]	1) 抗 PD-L1 抗体 (阿特珠单抗)	1200 mg			1200 mg
	2) 铂剂 (卡铂或顺铂)	AUC = 5 [†]			
	3) 拓扑异构酶 II 抑制剂 (依托泊苷)	100 mg/m ²	100 mg/m ²	100 mg/m ²	

[0389] *21天周期

[0390] ‡mg/ml/min

[0391] 在一些实施例中,1200mg剂量的阿特珠单抗相当于15mg/kg的基于平均体重的剂量。在一些实施例中,根据Calvert公式计算达到5mg/mL/min的AUC所需的卡铂剂量(参见,例如,Calvert等人(1989)“Carboplatin dosage:prospective evaluation of a simple formula based on renal function.”J.Clin.Oncol.7:1748-56;van Warmerdam等人(1995)J.Cancer Res.Clin.Oncol.121(8):478-486)。有关更多详细信息,请参见下面的实例1。

[0392] 在一些实施例中,根据RECIST v1.1标准测量个体的无进展生存期(PFS),如Eisenhauer等人(2009)“New response evaluation criteria in solid tumors:Revised RECIST guideline (Version 1.1).”Eur J Cancer.45:228-47中所述。在一些实施例中,将PFS测量为从治疗开始到如通过RECIST v1.1标准所确定的疾病进展首次出现的时间段。在一些实施例中,将PFS测量为从治疗开始到死亡时的时间。在一些实施例中,治疗使个体的无进展生存期(PFS)增加至少约4.5、4.75、5、5.25、5.5、5.75或6个月中的任一者(包括这些值之间的任何范围)。在一些实施例中,治疗使个体的无进展生存期(PFS)增加至少约5.6个月。在一些实施例中,治疗使个体的PFS比接受铂剂(例如卡铂或顺铂)和拓扑异构酶II抑制剂(例如依托泊苷)治疗的患有肺癌(诸如小细胞肺癌,例如,广泛期小细胞肺癌)的个体增加至少约0.5、1、1.25、1.5、1.75、2、2.25、2.5、2.75或3个月中的任一者(包括这些值之间的任何范围)。在一些实施例中,治疗使个体的PFS比接受铂剂(例如卡铂或顺铂)和拓扑异构酶II抑制剂(例如依托泊苷)治疗的患有肺癌(诸如小细胞肺癌,例如,广泛期小细胞肺癌)的个体增加至少约1.1个月。

[0393] 在一些实施例中,将总生存期(OS)测量为从治疗开始到死亡的时间段。在一些实施例中,治疗使个体的OS增加至少约10.5、10.75、11、11.25、11.5、11.75、12、12.25、12.5、

12.75、13、13.25、13.5、13.75或14个月中的任一者(包括这些值之间的任何范围)。在一些实施例中,治疗使OS延长超过14个月,例如延长14.25、14.5、14.75、15、15.25、15.5、15.75或大于15.75个月中的任一者(包括这些值之间的任何范围)。在一些实施例中,治疗使OS延长了约15.9个月。在一些实施例中,治疗使个体的OS比接受铂剂(例如卡铂或顺铂)和拓扑异构酶II抑制剂(例如依托泊苷)治疗的患有肺癌(诸如小细胞肺癌,例如,广泛期小细胞肺癌)的个体增加至少约0.5、1、1.25、1.5、1.75、2、2.25、2.5、2.75或3个月中的任一者(包括这些值之间的任何范围)。在一些实施例中,治疗使个体的OS比接受铂剂(例如卡铂或顺铂)和拓扑异构酶II抑制剂(例如依托泊苷)治疗的患有肺癌(诸如小细胞肺癌,例如,广泛期小细胞肺癌)的个体增加超过约3个月,例如至少约4、4.25、4.5、4.75、5、5.25、5.5、5.75、6、6.25、6.5或6.75个月中的任一者(包括这些值之间的任何范围)。在一些实施例中,治疗使个体的OS比接受铂剂(例如卡铂或顺铂)和拓扑异构酶II抑制剂(例如依托泊苷)治疗的患有肺癌(诸如小细胞肺癌,例如,广泛期小细胞肺癌)的个体增加约6.6个月。

[0394] 在一些实施例中,个体为65岁或更大年龄(例如,在约65至约74岁之间,在约75至约84岁之间或 ≥ 85 岁)。在一些实施例中,个体的血液肿瘤突变负荷(bTMB)为至少约10、11、12、13、14、15或16。在一些实施例中,个体的血液肿瘤突变负荷(bTMB)大于16。bTMB代表使用已知方法通过循环肿瘤DNA(ctDNA)的基因组测序计算的肿瘤基因组每个编码区域的突变总数。

[0395] 在一些实施例中,个体例如在治疗开始后12周报告一种或多种肺癌相关症状减轻。在一些实施例中,与肺癌相关的症状是臂痛、肩痛、胸痛、咳嗽和呼吸困难(即,难以呼吸或憋气)中的一种或多种。

[0396] 在一些实施例中,个体为人。

[0397] 在一些实施例中,个体患有对一种或多种PD-1轴拮抗剂具有耐药性的癌症(已证明是耐药性的)。在一些实施例中,对PD-1轴拮抗剂的耐药性包括癌症或难治性癌症的复发。复发可能是指治疗后在原始部位或新部位再次出现癌症。在一些实施例中,对PD-1轴拮抗剂的耐药性包括在用PD-1轴拮抗剂治疗期间癌症的进展。在一些实施例中,对PD-1轴拮抗剂的耐药性包括对治疗无响应的癌症。癌症可能在治疗开始时具有耐药性,或者在治疗期间变得耐药。在一些实施例中,癌症处于早期或晚期。

[0398] 在另一方面,个体患有表达(已显示出例如在诊断测试中表达)PD-L1生物标志物的癌症。在一些实施例中,此类个体是“PD-L1阳性的”或患有作为“PD-L1阳性癌症”的癌症。在一些实施例中,如果在来自个体的样本中的肿瘤细胞(TC)上(或内)检测到PD-L1表达(例如蛋白表达),或者如果在来自个体的肿瘤浸润免疫细胞(IC)上(或内)检测到PD-L1表达(例如蛋白质表达),则该个体是“PD-L1阳性的”或患有“PD-L1阳性的癌症”。在一些实施例中,个体的TC和/或IC表达低水平的PD-L1生物标志物。在一些实施例中,个体的TC和/或IC表达高水平的PD-L1生物标志物。在任何方法、测定和/或试剂盒的一些实施例中,如果PD-L1生物标志物存在于(例如经由IHC检测到)来自个体(例如,来自含有个体的TC和/或IC的个体的样本)的超过0%的样本中、至少1%的样本中、至少5%的样本中或至少10%的样本中,则该个体是“PD-L1阳性的”或患有“PD-L1阳性的癌症”。在任何方法、测定和/或试剂盒的一些实施例中,将PD-L1生物标志物在样本中(例如,在来自包含个体的TC和/或IC的个体的样本中)的存在检测为样本中任何水平的染色。

[0399] 在任何方法、测定和/或试剂盒的一些实施例中,使用选自由FACS、蛋白质印迹、ELISA、免疫沉淀、免疫组织化学、免疫荧光、放射免疫测定、斑点印迹、免疫检测法、HPLC、表面等离子体共振、光谱法、质谱法、HPLC、qPCR、RT-qPCR、多重qPCR或RT-qPCR、RNA-seq、微阵列分析、SAGE、MassARRAY技术和FISH及其组合组成的组的方法在样本中检测PD-L1生物标志物。

[0400] 在任何方法、测定和/或试剂盒的一些实施例中,通过蛋白质表达在样本中检测PD-L1生物标志物。在一些实施例中,通过免疫组织化学(IHC)确定蛋白质表达。在一些实施例中,使用抗PD-L1抗体检测PD-L1生物标志物。在一些实施例中,通过IHC将PD-L1生物标志物检测为弱染色强度。在一些实施例中,通过IHC将PD-L1生物标志物检测为中等染色强度。在一些实施例中,通过IHC将PD-L1生物标志物检测为强染色强度。在一些实施例中,在肿瘤细胞、肿瘤浸润的免疫细胞、基质细胞及其任何组合上检测PD-L1生物标志物。在一些实施例中,所述染色是膜染色、细胞质染色或其组合。

[0401] 在一些实施例中,使用抗PD-L1兔单克隆一抗检测PD-L1生物标志物。在一些实施例中,在福尔马林固定的石蜡包埋的样本中检测PD-L1。在一些实施例中,用包含可检测标记的二抗检测抗PD-L1兔单克隆一抗。在一些实施例中,用于检测PD-L1的测定法是VENTANA PD-L1 (SP142) 测定法(可商购自 VENTANTA®)。

[0402] 在另一方面,个体患有不表达PD-L1生物标志物或表达非常低水平的PD-L1生物标志物的癌症。在一些实施例中,此类个体被称为“PD-L1阴性的”或被称为患有“PD-L1阴性的癌症”。在一些实施例中,如果在来自个体的样本中的肿瘤细胞(TC)上(或内)没有检测到PD-L1表达(例如蛋白表达),或者如果在来自个体的肿瘤浸润免疫细胞(IC)上(或内)没有检测到PD-L1表达(例如蛋白质表达),或者如果在来自个体的TC和/或IC上(或内)检测到非常低水平的PD-L1表达(例如蛋白质表达),则该个体是“PD-L1阴性的”或患有“PD-L1阴性的癌症”。在任何方法、测定和/或试剂盒的一些实施例中,如果在来自个体的0%的TC和/或IC上(或内)检测(通过IHC或其他测定)到PD-L1(例如PD-L1表达),则该个体是“PD-L1阴性的”或患有“PD-L1阴性的癌症”。在任何方法、测定和/或试剂盒的一些实施例中,如果在来自个体的<1%的TC和/或IC上(或内)检测(通过IHC或其他测定)到PD-L1(例如PD-L1表达),则该个体是“PD-L1阴性的”或患有“PD-L1阴性的癌症”。在任何方法、测定和/或试剂盒的一些实施例中,“PD-L1阴性”是指样本(例如,来自包含个体的TC和/或IC的个体的样本)中没有染色。

[0403] PD-1轴结合拮抗剂(诸如阿特珠单抗)、铂剂(诸如卡铂)和拓扑异构酶II抑制剂(诸如依托泊苷)可以任何顺序施用。例如,PD-1轴结合拮抗剂(诸如阿特珠单抗)、铂剂(诸如卡铂)和拓扑异构酶II抑制剂(诸如依托泊苷)可以按顺序(在不同时间)或并行地(在同一时间)施用。在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂(诸如阿特珠单抗)、铂剂(诸如卡铂)和拓扑异构酶II抑制剂(诸如依托泊苷)处于独立的组合物中。在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂(诸如阿特珠单抗)、铂剂(诸如卡铂)和拓扑异构酶II抑制剂(诸如依托泊苷)中的一者或多者(或全部三者)在同一组合物中施用。

[0404] PD-1轴结合拮抗剂(诸如阿特珠单抗)、铂剂(诸如卡铂)和拓扑异构酶II抑制剂(诸如依托泊苷)可以通过相同施用途径或通过不同施用途径施用。在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂通过静脉内、肌肉内、皮下、局部、口服、经皮、腹膜内、眶内、植入、吸入、鞘内、

心室内或鼻内施用。在一些实施例中,铂剂(诸如卡铂)通过静脉内、肌肉内、皮下、局部、口服、经皮、腹膜内、眶内、植入、吸入、鞘内、心室内或鼻内施用。在一些实施例中,拓扑异构酶II抑制剂(诸如依托泊苷)通过静脉内、肌肉内、皮下、局部、口服、经皮、腹膜内、眶内、植入、吸入、鞘内、心室内或鼻内施用。在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂(诸如阿特殊单抗)、铂剂(诸如卡铂)和拓扑异构酶II抑制剂(诸如依托泊苷)经由静脉输注施用。可以施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂(诸如阿特殊单抗)、铂剂(诸如卡铂)和拓扑异构酶II抑制剂(诸如依托泊苷)以用于预防或治疗疾病。

[0405] 在一些实施例中,提供了用于治疗个体(例如,从未接受过对ES-SCLC治疗的个体)的广泛期小细胞肺癌(ES-SCLC)的方法,该方法包括向该个体施用有效量的阿特殊单抗、卡铂和依托泊苷,其中该施用包括诱导期和维持期,诱导期包括在第1至第4周期的每个21天周期中,在第1天施用1200mg剂量的阿特殊单抗,在第1天施用足以达到5mg/mL/min初始目标曲线下面积(AUC)的剂量的卡铂,以及在第1天、第2天和第3天中的每一天施用100mg/m²剂量的依托泊苷;其中维持期包括。在一些实施例中,维持期包括在第4周期后每个21天周期的第1天施用1200mg剂量的阿特殊单抗。在一些实施例中,该方法延长个体的PFS(例如,延长至少约4.5、4.75、5、5.25、5.5、5.75或6个月中的任一者,包括这些值之间的任何范围)和/或OS(例如,延长至少约10.5、10.75、11、11.25、11.5、11.75、12、12.25、12.5、12.75、13、13.25、13.5、13.75或14个月中的至少任一者,包括这些值之间的任何范围)。在一些实施例中,与接受铂剂(例如卡铂或顺铂)和拓扑异构酶II抑制剂(例如依托泊苷)治疗的患有肺癌(诸如小细胞肺癌,例如,广泛期小细胞肺癌)的个体相比,该方法使个体的PFS延长(例如,延长至少约0.5、1、1.25、1.5、1.75、2、2.25、2.5、2.75或3个月中的任一者,包括这些值之间的任何范围)和/或使个体的OS延长(例如,延长至少约0.5、1、1.25、1.5、1.75、2、2.25、2.5、2.75或3个月中的任一者,包括这些值之间的任何范围)。

[0406] 在一些实施例中,在第1至第4周期的每个21天周期的第1天,在施用阿特殊单抗之后施用卡铂,并且在施用卡铂之后施用依托泊苷,例如,如上表4中所示。

[0407] 在一些实施例中,在第一个21天周期(即,第1周期)中,在第1天在60(±15分钟)时间段内静脉内施用阿特殊单抗,在第1天在30至60分钟时间段内静脉内施用卡铂,并第1、2和3天在60分钟时间段内静脉内施用依托泊苷。在一些实施例中,在第2至第4周期的每个21天周期中,在第1天在30(±10分钟)时间段内静脉内施用阿特殊单抗,在第1天在30至60分钟时间段内静脉内施用卡铂,并第1、2和3天在60分钟时间段内静脉内施用依托泊苷。在一些实施例中,在第4周期后每个21天周期的第1天的30(±10分钟)时间段内静脉内施用阿特殊单抗。

[0408] 作为一般性提议,施用至人的抗体的治疗有效量将在约0.01至约50mg/kg患者体重的范围内,无论通过一次或多次施用。在一些实施例中,使用的抗体以,例如约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每日施用。在一些实施例中,以15mg/kg施用抗体。然而,其他剂量方案可能有用。在一个实施例中,将本文所述的抗PDL1抗体在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的剂量施用至人。该剂量可以以单剂量或多剂量(例如,2或3

个剂量) 诸如输注的形式施用。与单一治疗相比,可以减少在联合治疗中施用的抗体剂量。通过常规技术可以容易地监测该治疗的进展。

[0409] 在一些实施例中,所述方法可以进一步包括另外的疗法。另外的疗法可以是放射疗法、手术(例如,乳房肿瘤切除术和乳房切除术)、化学疗法、基因疗法、DNA疗法、病毒疗法、RNA疗法、免疫疗法、骨髓移植、纳米疗法、单克隆抗体疗法或前述的组合。另外的疗法可以是辅助疗法或新辅助疗法的形式。在一些实施例中,另外的疗法是施用小分子酶抑制剂或抗转移剂。在一些实施例中,另外的疗法是施用副作用限制剂(例如,旨在降低治疗副作用发生率和/或严重性的试剂,例如止吐剂等)。在一些实施例中,另外的疗法是放射疗法。在一些实施例中,另外的疗法是手术。在一些实施例中,另外的疗法是放射疗法和手术的联合。在一些实施例中,另外的疗法是伽马辐照。

[0410] 在一些实施例中,另外的疗法包括CT-011(也称为匹地珠单抗或MDV9300;CAS注册号1036730-42-3;CureTech/Medivation)。CT-011,也称为hBAT或hBAT-1,是WO2009/101611中描述的抗体。在一些实施例中,另外的治疗剂包含抗体,该抗体包含重链和轻链序列,其中:

[0411] (a) 重链包含以下氨基酸序列:

[0412] QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYFTFTNYGMNWVRQAPGQGLQWMGWINTDSGESTYAEFEKGRFVFSLDTSVNTAYLQITSLTAEDTGMVFCVRVGYDALDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSFCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:19), 并且

[0413] (b) 轻链包含以下氨基酸序列:

[0414] EIVLTQSPSSLSASVGRVTITCSARSSVSYMHWFQQKPGKAPKLWIYRTSNLASGVPSRFSGSGSGTSYCLTINSLQPEDFATYYCQQRSSFPLTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:20)。

[0415] 在一些实施例中,另外的治疗性抗体包含来自SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20的六个HVR序列(例如,来自SEQ ID NO:19的三个重链HVR和来自SEQ ID NO:20的三个轻链HVR)。在一些实施例中,另外的治疗性抗体包含来自SEQ ID NO:19的重链可变结构域和来自SEQ ID NO:20的轻链可变结构域。考虑用于本文中的其他另外的治疗性抗体包括而限于,阿伦单抗(CamPATH)、贝伐单抗(AVASTIN®, Genentech)、西妥昔单抗(ERBITUX®, Imclone)、帕尼单抗(VECTIBIX®, Amgen)、利妥昔单抗(RITUXAN®, Genentech/Biogen Idec)、帕妥珠单抗(OMNITARG®, 2C4, Genentech)、曲妥珠单抗(HERCEPTIN®, Genentech)、托西莫单抗(Bexxar, Corixa)、抗体药物缀合物吉妥珠单抗奥唑米星(MYLOTARG®, 惠氏)、阿泊珠单抗(apolizumab)、阿塞珠单抗、阿利珠单抗(atlizumab)、巴匹珠单抗(bapineuzumab)、莫比伐珠单抗(bivatuzumab mertansine)、莫坎妥珠单抗(cantuzumab Mertansine)、西利珠单抗(cedelizumab)、赛妥珠单抗、西孚昔

珠单抗(cidfusituzumab)、西土珠单抗(cidtuzumab)、达利珠单抗、依库珠单抗(eculizumab)、依法珠单抗(efalizumab)、依帕珠单抗(epratuzumab)、厄利珠单抗(erlizumab)、泛维珠单抗(felvizumab)、芳妥珠单抗(fontolizumab)、吉妥珠单抗奥唑米星、奥英妥珠单抗(inotuzumab ozogamicin)、伊匹单抗、拉贝珠单抗(labetuzumab)、林妥珠单抗、马妥珠单抗、美泊利单抗、莫维珠单抗、莫妥维珠单抗(motovizumab)、那他珠单抗、尼妥珠单抗、诺罗维珠单抗(nolovizumab)、奴马维珠单抗(numavizumab)、奥瑞珠单抗(ocrelizumab)、奥玛珠单抗、帕丽珠单抗、帕考珠单抗(pascolizumab)、培孚昔单抗(pecfusituzumab)、培土珠单抗(pectuzumab)、培克珠单抗(pexelizumab)、拉利维珠单抗(ralivizumab)、兰尼单抗、瑞丽维珠单抗(reslivizumab)、瑞利珠单抗(reslizumab)、瑞希维珠单抗(resyvizumab)、罗维珠单抗(rovelizumab)、卢丽珠单抗(ruplizumab)、西罗珠单抗、西利珠单抗、松妥珠单抗(sontuzumab)、替珠单抗(tacatuzumab tetraxetan)、他度珠单抗(tadocizumab)、他利珠单抗、替非珠单抗(tefibazumab)、托珠单抗、托利珠单抗(toralizumab)、西莫白介素单抗(tucotuzumab celmoleukin)、土库昔珠单抗(tucosituzumab)、乌马维珠单抗(umavizumab)、乌珠单抗、尤特克单抗(ustekinumab)、维西珠单抗和抗白介素-12 (ABT-874/J695, Wyeth Research and Abbott Laboratories)。

[0416] 在一些实施例中,另外的疗法是靶向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。在一些实施例中,另外的疗法是CTLA-4(也称为CD152),例如阻断性抗体,伊立木单抗(ipilimumab)(也称为MDX-010、MDX-101或Yervoy®)、曲美木单抗(tremelimumab)(也称为替西木单抗(tremelimumab)或CP-675,206);针对B7-H3(也称为CD276)的拮抗剂,例如阻断性抗体MGA271;针对TGFβ的拮抗剂,例如美替木单抗(metelimumab)(也称为CAT-192)、夫苏木单抗(fresolimumab)(也称为GC1008)或LY2157299;包括过继转移表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞(例如细胞毒T细胞或CTL)的治疗;包括过继转移包含显性阴性TGFβ受体(例如显性阴性TGFβ受体II型)的T细胞的治疗;包括HERCREEM方案的治疗(参见例如ClinicalTrials.gov标识符NCT00889954);针对CD137(也称为TNFRSF9、4-1BB或ILA)的激动剂,例如活化抗体乌瑞鲁单抗(urelumab)(也称为BMS-663513);针对CD40的激动剂,例如活化抗体CP-870893;针对OX40(也称为CD134)的激动剂,例如与不同的抗OX40抗体(例如AgonOX)结合施用的活化抗体;针对CD27的激动剂,例如活化抗体、CDX-1127、吡啶胺-2,3-双加氧酶(IDO)、1-甲基-D-色氨酸(也称为1-D-MT);抗体-药物缀合物(在一些实施例中,包含美登木素(mertansine)或单甲基瑞奥西汀E(MMAE)),抗NaPi2b抗体-MMAE缀合物(也称为DNIB0600A或RG7599)、曲妥珠单抗-美坦新(trastuzumab emtansine)(也称为T-DM1、ado-曲妥珠单抗美坦新或KADCYLA®, Genentech)、DMUC5754A;靶向内皮素B受体的抗体-药物缀合物(EDNBR),例如,针对EDNBR的抗体与MMAE(一种血管生成抑制剂)缀合;针对VEGF(例如VEGF-A)的抗体,贝伐单抗(也称为AVASTIN®, Genentech);针对血管生成素2(也称为Ang2)的抗体,MEDI3617;抗肿瘤药;靶向CSF-1R(也称为M-CSFR或CD115)的药物,抗CSF-1R(也称为IMC-CS4);干扰素,例如干扰素α或干扰素γ;Roferon-A;GM-CSF(也称为重组人粒细胞巨噬细胞集落刺激因子、rhu GM-CSF、沙格司亭或Leukine®);IL-2(也称为阿地白介素或Proleukin®);IL-12;靶向CD20的抗体(在某些实施例中,靶向CD20的抗体是奥滨尤妥珠单抗(obinutuzumab)(也称为

GA101或**Gazyva®**)或利妥昔单抗);靶向GITR的抗体(在某些实施例中,靶向GITR的抗体是TRX518);与癌症疫苗结合使用(在一些实施例中,癌症疫苗是肽癌症疫苗,其在一些实施例中是个性化的肽疫苗;在一些实施例中,肽癌症疫苗是多价长肽、多肽、肽混合物、杂合肽或肽脉冲树突细胞疫苗(参见例如Yamada等人,Cancer Sci,104:14-21,2013));与佐剂结合使用;TLR激动剂例如聚ICLC(也称为**Hiltonol®**)、LPS、MPL或CpG ODN;肿瘤坏死因子(TNF) α ;IL-1;HMGB1;IL-10拮抗剂;IL-4拮抗剂;IL-13拮抗剂;HVEM拮抗剂;ICOS激动剂(例如通过施用ICOS-L或针对ICOS的激动性抗体);靶向CX3CL1的治疗;靶向CXCL10的治疗;靶向CCL5的治疗;LFA-1或ICAM1激动剂;选择素激动剂;靶向疗法;B-Raf抑制剂,维莫非尼(也称为**Zelboraf®**)、达拉非尼(也称为**Tafinlar®**);厄洛替尼(也称为**Tarceva®**);MEK诸如MEK1(也称为MAP2K1)或MEK2(也称为MAP2K2)的抑制剂,考比替尼(也称为GDC-0973或XL-518)、曲美替尼(也称为**Mekinist®**);K-Ras抑制剂;c-Met抑制剂,奥纳妥珠单抗(onartuzumab)(也称为MetMab);Alk抑制剂,AF802(也称为CH5424802或艾乐替尼);磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)抑制剂,BKM120、依德利西布(idelalisib)(也称为GS-1101或CAL-101)、哌立福新(periposine)(也称为KRX-0401)、Akt、MK2206、GSK690693、GDC-0941;mTOR抑制剂,西罗莫司(也称为雷帕霉素)、替西罗莫司(也称为CCI-779或**Torisel®**)、依维莫司(也称为RAD001)、地磷莫司(也称为AP-23573、MK-8669或deforolimus)、OSI-027、AZD8055、INK128;PI3K/mTOR双重抑制剂,XL765、GDC-0980、BEZ235(也称为NVP-BEZ235)、BGT226、GSK2126458、PF-04691502、PF-05212384(也称为PKI-587)。另外的疗法可以是本文描述的一种或多种化疗剂。

[0417] IX. 检测和诊断方法

[0418] 在一些实施例中,在用PD-1轴结合拮抗剂(例如阿特殊单抗)、铂剂(例如卡铂)和拓扑异构酶II抑制剂(例如依托泊苷)治疗之前获得样本。在一些实施例中,组织样本是福尔马林固定且石蜡包埋的、存档的、新鲜的或冷冻的。

[0419] 在一些实施例中,样本是全血。在一些实施例中,全血包含免疫细胞、循环肿瘤细胞及其任何组合。

[0420] 可以基于本领域中已知的任何合适的标准来定性和/或定量地确定生物标志物(例如PD-L1)的存在和/或表达水平/量,该判据包括但不限于DNA、mRNA、cDNA、蛋白质、蛋白质片段和/或基因拷贝数。在某些实施例中,与第二样本中的存在/不存在和/或表达水平/量相比,第一样本中的生物标志物的存在和/或表达水平/量增加或升高。在某些实施例中,与第二样本中的存在和/或表达水平/量相比,第一样本中的生物标志物的存在/不存在和/或表达水平/量减少或降低。在某些实施例中,第二样本是参考样本、参考细胞、参考组织、对照样本、对照细胞或对照组织。本文描述了确定基因的存在/不存在和/或表达水平/量的另外的公开内容。

[0421] 在任何方法的一些实施例中,表达升高是指,采用标准技术已知方法(诸如本文所述方法)检测到的生物标志物(例如蛋白质或核酸(例如基因或mRNA))水平比参考样本、参考细胞、参考组织、对照样本、对照细胞或对照组织总体增加约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高中的任一者。在某些实施例中,表达升高是指样本中生物标志物的表达水平/数量增加,其中该增加为参考样本、参

考细胞、参考组织、对照样本、对照细胞或对照组织中相应生物标志物表达水平/量的至少约1.5倍、1.75倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、25倍、50倍、75倍或100倍中的任一者。在一些实施例中,表达升高是指,与参考样本、参考细胞、参考组织、对照样本、对照细胞、对照组织或内部对照物(例如管家基因)相比,总增加大于约1.5倍、约1.75倍、约2倍、约2.25倍、约2.5倍、约2.75倍、约3.0倍或约3.25倍。

[0422] 在任何方法的一些实施例中,表达降低是指,采用标准技术已知方法(诸如本文所述方法)检测到的生物标志物(例如蛋白质或核酸(例如基因或mRNA))水平比参考样本、参考细胞、参考组织、对照样本、对照细胞或对照组织总降低约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高中的任一者。在某些实施例中,表达降低是指样本中生物标志物的表达水平/量减少,其中该减少为参考样本、参考细胞、参考组织、对照样本、对照细胞或对照组织中相应生物标志物表达水平/量的至少约0.9倍、0.8倍、0.7倍、0.6倍、0.5倍、0.4倍、0.3倍、0.2倍、0.1倍、0.05倍或0.01倍中的任一者。

[0423] 样本中各种生物标志物的存在和/或表达水平/量可以通过多种方法进行分析,其中许多方法是本领域已知的并且是技术人员所理解的,包括但不限于免疫组织化学(“IHC”)、蛋白质印迹分析、免疫沉淀、分子结合测定、ELISA、ELIFA、荧光激活细胞分选(“FACS”)、MassARRAY、蛋白质组学、基于血液的定量测定(例如血清ELISA)、生化酶活性测定、原位杂交、DNA印迹分析、RNA印迹分析、全基因组测序、聚合酶链反应(“PCR”) (包括定量实时PCR(“qRT-PCR”)和其他扩增类型检测方法,例如分支DNA、SISBA、TMA等)、RNA-Seq、FISH、微阵列分析、基因表达谱分析和/或基因表达的系列分析(“SAGE”),以及可以通过蛋白质、基因和/或组织分析执行的多种测定中的任何一种。用于评价基因和基因产物的状态的典型方案可见于例如Ausubel等人编辑,1995,《分子生物学最新方案》(Current Protocols In Molecular Biology),第2单元(RNA印迹法)、第4单元(DNA印迹法)、第15单元(免疫印迹法)和第18单元(PCR分析)。也可以使用多重免疫测定,诸如可从Rules Based Medicine或Meso Scale Discovery(“MSD”)获得的那些。

[0424] 在一些实施例中,使用包括以下项的方法确定生物标志物的存在和/或表达水平/量:(a)对样本(诸如受试癌症样本)进行基因表达谱、PCR(诸如rtPCR或qRT-PCR)、RNA-seq、微阵列分析、SAGE、MassARRAY技术或FISH分析;以及b)确定样本中生物标志物的存在和/或表达水平/量。在一些实施例中,微阵列方法包括使用具有一种或多种核酸分子或具有一种或多种多肽(例如肽或抗体)的微阵列芯片,所述核酸分子可在严格条件下与编码上述基因的核酸分子杂交,而所述多肽可以与上述基因编码的一种或多种蛋白质结合。在一个实施例中,PCR方法是qRT-PCR。在一个实施例中,PCR方法是多重PCR。在一些实施例中,通过微阵列测量基因表达。在一些实施例中,通过qRT-PCR测量基因表达。在一些实施例中,通过多重PCR测量表达。

[0425] 评价细胞中mRNA的方法是众所周知的,并且包括例如使用互补DNA探针的杂交测定(诸如使用对一种或多种基因具有特异性的标记核糖核酸的原位杂交、RNA印迹法和相关技术)和各种核酸扩增测定(诸如使用对一种或多种基因具有特异性的互补引物的RT-PCR,以及其他扩增类型检测方法,例如分支DNA、SISBA、TMA等)。

[0426] 使用RNA印迹、斑点印迹或PCR分析可以方便地对哺乳动物样本进行mRNA检测。另外,此类方法可以包括一个或多个步骤,该步骤允许一个人确定生物样本中靶mRNA的水平

(例如,通过同时检查“管家”基因诸如肌动蛋白家族成员的比较性对照mRNA序列的水平)。任选地,可以确定扩增的靶cDNA的序列。

[0427] 任选的方法包括通过微阵列技术检查或检测组织或细胞样本中的mRNA诸如靶mRNA的方案。使用核酸微阵列,将来自测试和对照组织样本的测试和对照mRNA样本逆转录并标记以生成cDNA探针。然后将探针与固定在固体支持物上的核酸阵列杂交。配置该阵列,以便知道该阵列每个成员的顺序和位置。例如,可以将其表达与抗血管生成疗法的临床有益效果增加或减少相关的选择基因排列在固体支持物上。标记探针与特定阵列成员的杂交表明,探针所源自的样本表达该基因。

[0428] 根据一些实施例,通过观察前述基因的蛋白质表达水平来测量存在和/或表达水平/量。在某些实施例中,该方法包括在允许与生物标志物结合的条件下使生物样本与本文所述的针对生物标志物的抗体(例如,抗PD-L1抗体)接触,并检测抗体和生物标志物之间是否形成复合物。此类方法可以是体外或体内方法。在一个实施例中,抗体用于选择适合用PD-L1轴结合拮抗剂进行治疗的受试者,例如用于进行个体选择的生物标志物。

[0429] 在某些实施例中,使用IHC和染色方案检查样本中生物标志蛋白的存在和/或表达水平/量。组织切片的IHC染色已被证明是确定或检测样本中蛋白质存在的可靠方法。在任何方法、测定和/或试剂盒的一些实施例中,PD-L1生物标志物是PD-L1。在一些实施例中,通过免疫组织化学检测PD-L1。在一些实施例中,来自个体的样本中PD-L1生物标志物的表达升高是蛋白表达升高,并且在进一步的实施例中,使用IHC确定。在一个实施例中,使用包括以下项的方法确定生物标志物的表达水平:(a)用抗体对样本(诸如受试癌症样本)进行IHC分析;以及b)确定样本中生物标志物的表达水平。在一些实施例中,相对于参考物确定IHC染色强度。在另一实施例中,参考物是参考值。在一些实施例中,参考物是参考样本(例如,来自非癌患者的对照细胞系染色样本或组织样本)。

[0430] IHC可以与其他技术诸如形态学染色和/或荧光原位杂交组合进行。有两种通用的IHC方法:直接和间接测定。根据第一种测定,直接确定抗体与靶抗原的结合。这种直接测定使用标记的试剂诸如荧光标签或酶标记的一抗,无需进一步的抗体相互作用即可显示。在典型的间接测定中,未缀合的一抗与抗原结合,然后标记的二抗与一抗结合。当二抗与酶标记物缀合时,添加发色或发荧光底物以提供抗原的可视化。发生信号放大是因为几种二抗可能与一抗上的不同表位反应。

[0431] 用于IHC的一抗和/或二抗通常会用可检测的部分标记。许多标记是可获得的,其通常划分成以下类别:(a)放射性同位素,诸如³⁵S、¹⁴C、¹²⁵I、³H和¹³¹I;(b)胶体金颗粒;(c)荧光标记,包括但不限于稀土螯合物(钕螯合物)、德克萨斯红、若丹明、荧光素、丹酰、丽丝胺、伞形酮、藻红蛋白、藻青蛋白或市售荧光团诸如SPECTRUM ORANGE7和SPECTRUM GREEN7和/或以上任何一项或多项的衍生物;(d)可获得的各种酶-底物标记,并且美国专利号4,275,149提供了其中一些的综述。酶标记的示例包括荧光素酶(例如,荧光虫荧光素酶和细菌荧光素酶;美国专利号4,737,456)、荧光素、2,3-二氢双酮酞嗪(2,3-dihydrophthalazinediones)、苹果酸脱氢酶、尿素酶、过氧化酶诸如辣根过氧化物酶(HRPO)、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶(例如,葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶)、杂环氧化酶(诸如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶)、乳过氧化物酶、微过氧化物酶等。

[0432] 酶-底物组合的示例包括:例如,辣根过氧化物酶(HRPO)和作为底物的过氧化氢;碱性磷酸酶(AP)和作为生色底物的磷酸对硝基苯酯;以及 β -D-半乳糖苷酶(β -D-Gal)和生色底物(例如对硝基苯基- β -D-半乳糖苷酶)或荧光底物(例如4-甲基伞形酮基- β -D-半乳糖苷酶)。有关这些内容的一般评论,请参见美国专利号4,275,149和4,318,980。

[0433] 在任何方法的一些实施例中,使用抗PD-L1诊断性抗体(即,一抗)通过免疫组织化学检测PD-L1。在一些实施例中,PD-L1诊断性抗体与人PD-L1特异性地结合。在一些实施例中,PD-L1诊断性抗体是非人抗体。在一些实施例中,PD-L1诊断性抗体是大鼠抗体、小鼠抗体或兔抗体。在一些实施例中,PD-L1诊断性抗体是单克隆抗体。在一些实施例中,PD-L1诊断性抗体是直接标记的。

[0434] 如此制备的样本可以被封固并盖上盖玻片。然后例如使用显微镜确定载玻片估值,并且可以采用本领域常规使用的染色强度标准。在一个实施例中,应理解,当使用IHC检查来自肿瘤的细胞和/或组织时,通常在肿瘤细胞和/或组织中确定或评估染色(与样本中可能存在的基质组织或周围组织相反)。在一些实施例中,应理解,当使用IHC检查来自肿瘤的细胞和/或组织时,染色包括确定或评估肿瘤浸润的免疫细胞,包括肿瘤内或肿瘤周围的免疫细胞。

[0435] 在一些实施例中,在肿瘤或肿瘤样本上评价PDL1表达。如本文所用,肿瘤或肿瘤样本可涵盖被肿瘤细胞占据的部分或全部肿瘤区域。在一些实施例中,肿瘤或肿瘤样本可以进一步涵盖肿瘤相关的肿瘤内细胞和/或肿瘤相关的基质(例如,连续的肿瘤周围的增生基质)所占据的肿瘤区域。肿瘤相关的肿瘤内细胞和/或肿瘤相关的基质可包括紧邻主要肿瘤块和/或与其相邻的免疫浸润(例如,本文所述的肿瘤浸润免疫细胞)区域。在一些实施例中,在肿瘤细胞上评价PDL1表达。在一些实施例中,在如上所述的肿瘤区域内的免疫细胞(诸如肿瘤浸润的免疫细胞)上评价PDL1表达。

[0436] 在另选的方法中,可以在足以形成抗体-生物标志物复合物的条件下使样本与对所述生物标志物具有特异性的抗体接触,然后检测所述复合物。可以通过多种方式来检测生物标志物的存在,诸如通过用于测定多种组织和样本(包括血浆或血清)的蛋白质印迹和ELISA过程。可以使用这种测定形式的各种免疫测试技术,参见例如美国专利号4,016,043、4,424,279和4,018,653。这些技术包括非竞争性类型的单位点和双位点或“夹心”测定,以及传统的竞争性结合测定。这些测定还包括标记抗体与靶标生物标志物的直接结合。

[0437] 组织或细胞样本中所选生物标志物的存在和/或表达水平/量也可以通过基于功能或基于活性的测定法进行检查。例如,如果生物标志物是酶,则可以进行本领域已知的测定法以确定或检测组织或细胞样本中给定酶活性的存在。

[0438] 在某些实施例中,针对测定的生物标志物的量的差异和所使用的样本的质量可变性的差异以及测定运行之间可变性的差异,将样本归一化。可以通过检测和并入某些归一化的生物标志物的表达来实现这种归一化,所述归一化的生物标志物包括众所周知的管家基因。替代地,归一化可以基于所有被测定基因或其大子集的均值或中值信号(全局归一化方法)。在逐个基因的基础上,将测得的受试肿瘤mRNA或蛋白质的归一化的量与参考集中发现的量进行比较。每个受试者每个被测试肿瘤中每种mRNA或蛋白质的归一化表达水平可以表示为相对于在参考集中测量的表达水平的百分比。在待分析的特定受试样本中测量的存在和/或表达水平/量将落在该范围内的某个百分位处,这可以通过本领域众所周知的方法

来确定。

[0439] 在一个实施例中,样本是临床样本。在另一个实施例中,样本用于诊断测定。在一些实施例中,样本获自原发性肿瘤或转移性肿瘤。组织活检通常用于获得代表性的肿瘤组织碎片。替代地,可以以已知或认为含有目的肿瘤细胞的组织或体液形式间接获得肿瘤细胞。例如,可以通过切除术、支气管镜检查、细针抽吸、支气管刷洗或从痰液、胸膜液或血液中获得肺癌病灶的样本。可以从癌症或肿瘤组织或其他身体样本(诸如尿液、痰液、血清或血浆)中检测基因或基因产物。上面讨论的用于检测癌性样本中靶基因或基因产物的相同技术可以应用于其他身体样本。癌细胞可能会从癌症病灶中脱落下来,并出现在此类身体样本中。通过筛选这些身体样本,可以对这些癌症进行简单的早期诊断。另外,可以通过测试这些身体样本中的靶基因或基因产物来更容易地监测治疗的进展。

[0440] 在某些实施例中,参考样本、参考细胞、参考组织、对照样本、对照细胞或对照组织是来自同一受试者或个体的单个样本或组合的多个样本,所述样本是在与获得测试样本时间点不同的一个或多个时间点获得的。例如,在比获得测试样本时更早的时间点从同一受试者或个体获得参考样本、参考细胞、参考组织、对照样本、对照细胞或对照组织。如果参考样本、参考细胞、参考组织、对照样本、对照细胞或对照组织是在癌症的初步诊断期间获得的,而测试样本是后来在癌症转移时获得的,则这种参考样本可能是有用的。

[0441] 在某些实施例中,参考样本、参考细胞、参考组织、对照样本、对照细胞或对照组织是组合的多个样本,其来自不是所述受试者或个体的一个或多个健康个体。在某些实施例中,参考样本、参考细胞、参考组织、对照样本、对照细胞或对照组织是组合的多个样本,其来自不是所述受试者或个体的一个或多个患有疾病或病症(例如癌症)的个体。在某些实施例中,参考样本、参考细胞、参考组织、对照样本、对照细胞或对照组织是来自正常组织的混合RNA样本,或者是来自不是所述受试者或个体的一个或多个健康个体的混合血浆或血清样本。在某些实施例中,参考样本、参考细胞、参考组织、对照样本、对照细胞或对照组织是来自肿瘤组织的混合RNA样本,或者是来自不是所述受试者或个体的一个或多个患有疾病或病症(例如癌症)个体的混合血浆或血清样本。

[0442] 在一些实施例中,样本是来自所述个体的组织样本。在一些实施例中,组织样本是肿瘤组织样本(例如,活检组织)。在一些实施例中,组织样本是肺组织。在一些实施例中,组织样本是肾组织。在一些实施例中,组织样本是皮肤组织。在一些实施例中,组织样本是胰腺组织。在一些实施例中,组织样本是胃组织。在一些实施例中,组织样本是膀胱组织。在一些实施例中,组织样本是食道组织。在一些实施例中,组织样本是间皮组织。在一些实施例中,组织样本是乳腺组织。在一些实施例中,组织样本是甲状腺组织。在一些实施例中,组织样本是结直肠组织。在一些实施例中,组织样本是头颈组织。在一些实施例中,组织样本是骨肉瘤组织。在一些实施例中,组织样本是前列腺组织。在一些实施例中,组织样本是卵巢组织、HCC(肝脏)、血细胞、淋巴结和/或骨/骨髓组织。在一些实施例中,组织样本是结肠组织。在一些实施例中,组织样本是子宫内膜组织。在一些实施例中,组织样本是脑组织(例如,成胶质细胞瘤、神经母细胞瘤等)。

[0443] 在一些实施例中,肿瘤组织样本(在本文可与术语“肿瘤样本”互换使用)可涵盖被肿瘤细胞占据的部分或全部肿瘤区域。在一些实施例中,肿瘤或肿瘤样本可以进一步涵盖肿瘤相关的肿瘤内细胞和/或肿瘤相关的基质(例如,连续的肿瘤周围的增生基质)所占据

的肿瘤区域。肿瘤相关的肿瘤内细胞和/或肿瘤相关的基质可包括紧邻主要肿瘤块和/或与其相邻的免疫浸润(例如,本文所述的肿瘤浸润免疫细胞)区域。

[0444] 在任何方法的一些实施例中,所述疾病或病症是肿瘤。在一些实施例中,肿瘤是恶性癌性肿瘤(即,癌症)。在一些实施例中,肿瘤和/或癌症是实体瘤或者非实体或软组织肿瘤。软组织肿瘤的示例包括白血病(例如,慢性粒细胞性白血病、急性粒细胞性白血病、成人急性淋巴细胞性白血病、急性骨髓性白血病、成熟B细胞急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、多淋巴细胞性白血病或毛细胞白血病)或淋巴瘤(例如非霍奇金淋巴瘤、皮肤T细胞淋巴瘤或霍奇金氏病)。实体瘤包括除血液、骨髓或淋巴系统以外的任何身体组织的癌症。实体瘤可进一步分为上皮细胞源性和非上皮细胞源性。上皮细胞实体瘤的示例包括胃肠道肿瘤、结肠肿瘤、结直肠肿瘤(例如基底结直肠癌)、乳腺肿瘤、前列腺肿瘤、肺肿瘤、肾肿瘤、肝肿瘤、胰腺肿瘤、卵巢肿瘤(例如子宫内膜样卵巢癌)、头颈肿瘤、口腔肿瘤、胃肿瘤、十二指肠肿瘤、小肠肿瘤、大肠肿瘤、肛门肿瘤、胆囊肿瘤、阴唇肿瘤、鼻咽肿瘤、皮肤肿瘤、子宫肿瘤、雄性生殖器官肿瘤、泌尿器官肿瘤(例如,尿路上皮癌、增生性尿路上皮癌、移行细胞癌)、膀胱肿瘤和皮肤肿瘤。非上皮细胞源性实体瘤包括肉瘤、脑肿瘤和骨肿瘤。在一些实施例中,癌症是非小细胞肺癌(NSCLC)。在一些实施例中,所述癌症是二线或三线局部晚期或转移性非小细胞肺癌。在一些实施例中,癌症是肺腺癌。在一些实施例中,癌症是鳞状细胞癌。在一些实施例中,癌症是非小细胞肺癌(NSCLC)、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、黑素瘤、乳腺癌(例如三阴性乳腺癌)、胃癌、结直肠癌(CRC)或肝细胞癌。在一些实施例中,癌症是原发性肿瘤。在一些实施例中,癌症是在第二部位的转移性肿瘤,其源自上述任何类型的癌症。

[0445] 在任何方法的一些实施例中,癌症展示人效应细胞(例如,被人效应细胞浸润)。检测人效应细胞的方法是本领域众所周知的,包括例如通过IHC检测。在一些实施例中,癌症展示高水平的人效应细胞。在一些实施例中,人效应细胞是NK细胞、巨噬细胞、单核细胞中的一种或多种。在一些实施例中,癌症是本文所述的任何癌症。在一些实施例中,癌症是非小细胞肺癌(NSCLC)、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、黑素瘤、乳腺癌(例如三阴性乳腺癌)、胃癌、结直肠癌(CRC)或肝细胞癌。

[0446] 在任何方法的一些实施例中,癌症展示表达FcR的细胞(例如,被表达FcR的细胞浸润)。用于检测FcR的方法是本领域众所周知的,包括例如通过IHC检测。在一些实施例中,癌症展示高水平的表达FcR的细胞。在一些实施例中,FcR是Fc γ R。在一些实施例中,FcR是活化Fc γ R。在一些实施例中,癌症是非小细胞肺癌(NSCLC)、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、黑素瘤、乳腺癌(例如三阴性乳腺癌)、胃癌、结直肠癌(CRC)或肝细胞癌。

[0447] 在一些实施例中,使用选自由FACS、蛋白质印迹、ELISA、免疫沉淀、免疫组织化学、免疫荧光、放射免疫测定、斑点印迹、免疫检测法、HPLC、表面等离子体共振、光谱法、质谱法、HPLC、qPCR、RT-qPCR、多重qPCR或RT-qPCR、RNA-seq、微阵列分析、SAGE、MassARRAY技术和FISH及其组合组成的组的方法在样本中检测PD-L1生物标志物。在一些实施例中,使用FACS分析检测PD-L1生物标志物。在一些实施例中,PD-L1生物标记物是PD-L1。在一些实施例中,在血液样本中检测到PD-L1表达。在一些实施例中,在血液样本中的循环免疫细胞上检测到PD-L1表达。在一些实施例中,循环免疫细胞是CD3+/CD8+T细胞。在一些实施例中,在分析之前,从血液样本中分离免疫细胞。可以使用任何合适的方法来分离/富集这种细胞

群,所述方法包括但不限于细胞分选。在一些实施例中,在来自对用PD-L1/PD-1轴途径抑制剂诸如抗PD-L1抗体进行治疗产生响应的个体的样本中,PD-L1表达升高。在一些实施例中,在血液样本中的循环免疫细胞诸如CD3+/CD8+T细胞上,PD-L1表达升高。

[0448] 本公开的某些方面涉及对样本中一种或多种基因或一种或多种蛋白质的表达水平的测量。在一些实施例中,样本可以包括白细胞。在一些实施例中,样本可以是外周血样本(例如,来自患有肿瘤的患者)。在一些实施例中,样本是肿瘤样本。肿瘤样本可以包括癌细胞、淋巴细胞、白细胞、基质、血管、结缔组织、基底层以及与其他肿瘤相关的任何其他细胞类型。在一些实施例中,样本是含有肿瘤浸润白细胞的肿瘤组织样本。在一些实施例中,可以处理样本以分隔或分离一种或多种细胞类型(例如,白细胞)。在一些实施例中,可以在不分隔或分离细胞类型的情况下使用样本。

[0449] 肿瘤样本可以通过本领域已知的任何方法从受试者获得,该方法包括但不限于活检、内窥镜检查或外科手术。在一些实施例中,可以通过诸如冷冻、固定(例如,通过使用福尔马林或类似的固定剂)和/或包埋在石蜡中的方法来制备肿瘤样本。在一些实施例中,可以对肿瘤样本进行切片。在一些实施例中,可以使用新鲜的肿瘤样本(即,尚未通过上述方法制备的样本)在一些实施例中,可以通过在溶液中孵育以保留mRNA和/或蛋白质完整性来制备肿瘤样本。

[0450] 在一些实施例中,样本可以是外周血样本。外周血样本可以包括白细胞、PBMC等。可以使用本领域已知的从外周血样本中分离白细胞的任何技术。例如,可以抽取血液样本,可以裂解红血球,并且可以分离白血球团粒并将其用于样本。在另一个示例中,密度梯度分离可用于分隔白细胞(例如,PBMC)与红血球。在一些实施例中,可以使用新鲜的外周血样本(即,尚未通过上述方法制备的样本)。在一些实施例中,可以通过在溶液中孵育以保留mRNA和/或蛋白质完整性来制备外周血样本。

[0451] 在一些实施例中,对治疗的响应性可指以下任何一项或多项:延长生存期(包括总生存期和无进展生存期);导致客观响应(包括完全响应或部分响应);或改善癌症的征兆或症状。在一些实施例中,响应性可以指根据已公开的一套用于确定癌症患者中的肿瘤状态即响应、稳定或进展的RECIST指南中的一种或多种因素的改善。有关这些指南的更详细讨论,参见Eisenhauer等人,Eur J Cancer 2009;45:228-47;Topalian等人,N Engl J Med 2012;366:2443-54;Wolchok等人,Clin Can Res 2009;15:7412-20;和Therasse,P.,等人J.Natl.Cancer Inst.92:205-16(2000)。响应性受试者可以指其癌症例如根据基于RECIST标准的一种或多种因素显示出改善的受试者。非响应性受试者可以指其癌症例如根据基于RECIST标准的一种或多种因素没有显示出改善的受试者。

[0452] 常规的响应标准可能无法胜任对免疫治疗剂抗肿瘤活性的表征,免疫治疗剂抗肿瘤活性可以产生延迟的响应,之前可能有最初的明显放射学进展,包括新病灶的出现。因此,已开发出修改后的响应标准,新标准考虑了新病灶的可能出现,并在后续评估中确认放射学进展。因此,在一些实施例中,响应性可以指根据免疫相关响应标准2(irRC)的一种或多种因素的改善。参见例如Wolchok等人,Clin Can Res 2009;15:7412-20。在一些实施例中,将新病灶添加到定义的肿瘤负荷中,并随后例如在后续评估中用于放射学进展。在一些实施例中,非靶病灶的存在包括在完全响应的评估中,而不包括在放射学进展的评估中。在一些实施例中,放射学进展可以仅基于可测量的疾病来确定和/或可以通过自首次记录之

日起 ≥ 4 周的连续评估来确认。

[0453] 在一些实施例中,响应性可以包括免疫活化。在一些实施例中,响应性可以包括治疗功效。在一些实施例中,响应性可以包括免疫活化和治疗功效。

[0454] X制品和试剂盒

[0455] 在本发明的另一个实施例中,提供了一种制品或试剂盒,其包含PD-1轴结合拮抗剂(诸如阿特殊单抗)、铂剂(诸如卡铂)和/或拓扑异构酶II抑制剂(诸如依托泊苷)。在一些实施例中,制品或试剂盒进一步包括包装插页,该包装插页包含用于将PD-1轴结合拮抗剂与铂剂(诸如卡铂)和拓扑异构酶II抑制剂(诸如依托泊苷)结合使用以治疗或延迟癌症(例如肺癌,诸如小细胞肺癌(SCLC),包括广泛期小细胞肺癌(ES-SCLC))在个体中的进展或增强患有癌症(例如肺癌,诸如小细胞肺癌(SCLC),包括广泛期小细胞肺癌(ES-SCLC))的个体的免疫功能的说明书。本领域已知的任何PD-1轴结合拮抗剂、铂剂和拓扑异构酶II抑制剂均可包括在制品或试剂盒中。在一些实施例中,试剂盒包含阿特殊单抗、卡铂和依托泊苷。

[0456] 在一些实施例中,PD-1轴结合拮抗剂(诸如阿特殊单抗)、铂剂(诸如卡铂)和拓扑异构酶II抑制剂(诸如依托泊苷)处于同一容器中或独立的容器中。合适的容器包括例如瓶、小瓶、袋和注射器。容器可以由各种材料形成,例如玻璃、塑料(诸如聚氯乙烯或聚烯烃)或金属合金(诸如不锈钢或哈氏合金)。在一些实施例中,容器容纳制剂,并且位于容器上或与容器关联的标记可以指示使用方向。制品或试剂盒可以进一步包括在商业和用户角度期望的其他材料,包括其他缓冲液、稀释剂、过滤器、针头、注射器和带有使用说明的包装插页。在一些实施例中,制品还包括一种或多种其他试剂(例如化疗剂和抗肿瘤剂)。用于一种或多种试剂的合适容器包括,例如,瓶、小瓶、袋和注射器。

[0457] 说明书被认为足以使本领域技术人员能够实施本发明。根据前面的描述,除了本文中示出和描述的之外,本发明的各种修改对于本领域技术人员而言将变得显而易见,并且落入所附权利要求的范围内。本文引用的所有出版物、专利和专利申请出于所有目的通过引用整体并入本文。

[0458] 实例

[0459] 参考以下实例将更详细地理解本公开。但是,它们不应被解释为限制本发明的范围。应当理解,本文描述的实例和实施例仅用于说明目的,并且鉴于其的各种修改或改变将被建议给本领域技术人员,并且将被包括在本申请的精神和范围以及所附权利要求的范围之内。

[0460] 实例1:卡铂加依托泊苷加或不加阿特殊单抗(抗PD-L1抗体)在未经治疗的广泛期小细胞肺癌(ES-SCLC)患者中的I/III期、随机、双盲、安慰剂对照研究,

[0461] 这项研究旨在评价,与安慰剂、卡铂和依托泊苷相比,在从未接受过化疗的ES-SCLC患者中,当阿特殊单抗与卡铂和依托泊苷联用时,见于接受阿特殊单抗治疗的患者的抗肿瘤作用是否会转化为PFS和OS的统计学显著性和临床相关的改善。这项研究可以评价阿特殊单抗在ITT群体中的功效,并可以评价探索性免疫终点(诸如但不限于通过PD-L1表达进行回顾性评价)以及它们与患者结果的关系。

[0462] 研究目标

[0463] 这项研究的主要功效目标如下:

[0464] • 评价阿特殊单抗+卡铂+依托泊苷在意向治疗群体(ITT)中的功效并与安慰剂+

卡铂+依托泊苷比较,如通过研究人员根据RECIST v1.1评估的无进展生存期(PFS)所测(例如参见Eisenhauer等人,(2009)“New response evaluation criteria in solid tumors: Revised RECIST guideline (Version 1.1).”Eur J Cancer.45:228-47)。

[0465] • 评价阿特殊单抗+卡铂+依托泊苷在ITT群体中的功效并与安慰剂+卡铂+依托泊苷比较,如通过总生存期(OS)所测。

[0466] 这项研究的次要功效目标如下:

[0467] • 评价阿特殊单抗+卡铂+依托泊苷在ITT群体中的功效并与安慰剂+卡铂+依托泊苷比较,通过研究人员根据RECIST v1.1评估的总响应率(ORR)进行测量。

[0468] • 评价阿特殊单抗+卡铂+依托泊苷在ITT群体中的功效并与安慰剂+卡铂+依托泊苷比较,通过研究人员根据RECIST v1.1评估的响应持续时间(DOR)进行测量。

[0469] • 评价ITT群体每个治疗分组在6个月和1年时的PFS率。评价ITT群体每个治疗分组在1年和2年时的OS率。

[0470] • 确定阿特殊单抗在使用阿特殊单抗+卡铂+依托泊苷治疗的患者中的影响,并与接受安慰剂+卡铂+依托泊苷的ITT群体比较,根据使用欧洲癌症研究和治疗组织(EORTC)生活质量调查问卷核心-30(QLQ-C30)和增补的肺癌模块(QLQ-LC13)的患者报告肺癌症状(咳嗽、呼吸困难(单项和多项子量表)、胸痛、手臂/肩膀疼痛或疲劳)到恶化时间(TTD)进行测量。

[0471] 这项研究的安全性目标如下:

[0472] • 评价阿特殊单抗与卡铂+依托泊苷联合使用的安全性和耐受性,并与卡铂+依托泊苷进行比较。

[0473] • 评价抗阿特殊单抗的抗治疗性抗体(ATA)的发生率和滴度,并探讨免疫原性响应与药代动力学、安全性和功效之间的潜在关系。

[0474] 这项研究的药代动力学目标是表征阿特殊单抗、卡铂和依托泊苷在从未接受过化疗的ES-SCLC患者中的药代动力学。

[0475] 这项研究的探索性目标如下:

[0476] • 评价研究人员评估的ITT群体中含阿特殊单抗治疗分组的PFS、ORR和DOR改良的RECIST。

[0477] • 评价肿瘤生物标志物(包括但不限于PD-L1、PD-1、体细胞突变等)之间的关系,通过免疫组织化学(IHC)或定量逆转录酶-聚合酶链反应(qRT-PCR)、下一代测序(NGS)和/或其他方法和功效量度界定。

[0478] • 评估档案的和/或新鲜的肿瘤组织、血液、血浆和血清中的预测性、预后性和药效学探索性生物标志物,以及它们与疾病状态、耐药机制和/或对研究性治疗的响应的相关性。

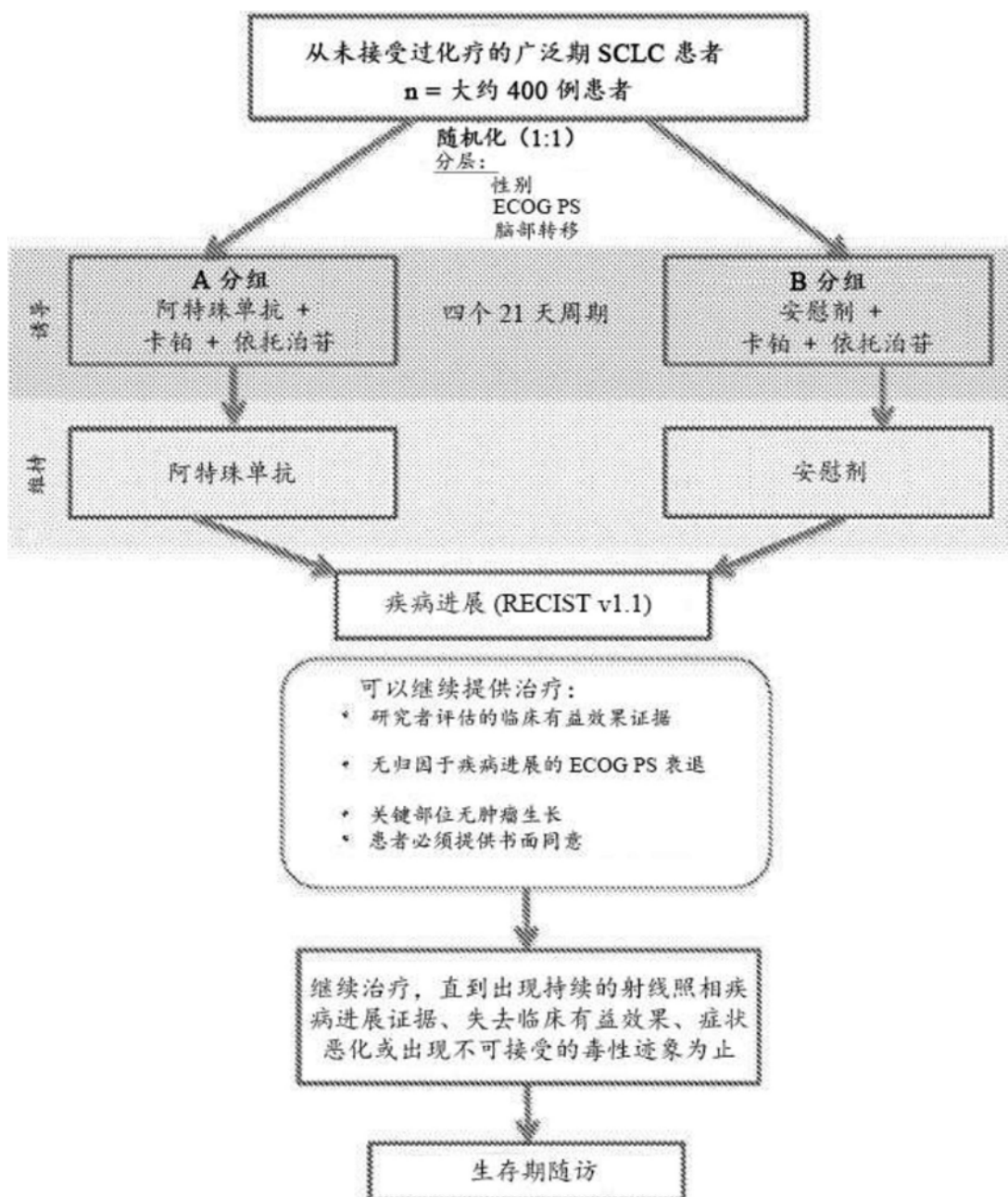
[0479] • 评价和比较患者的健康状态,通过EuroQoL 5维5级(EQ-5D-5L)调查问卷评估以生成用于偿付经济模型的效用分数。

[0480] • 确定阿特殊单抗+卡铂+依托泊苷的影响并与安慰剂+卡铂+依托泊苷比较,通过根据欧洲癌症研究和治疗组织的生活质量调查问卷EORTC QLQ-C30和LC13评估的健康相关生活质量、肺癌相关症状、身体功能性和健康状态的患者报告结果(PRO)与基线相比的变化进行测量。

[0481] • 评价化疗(卡铂和依托泊苷)对诱导疗法期间和之后对外周和肿瘤特异性T细胞群体的影响及其与功效和安全性结果的关系。

[0482] 研究设计

[0483] 下文描述了一项随机、I/III期、多中心、双盲、安慰剂对照研究的详细信息,旨在评价阿特殊单抗联合卡铂+依托泊苷对于患有ES-SCLC并且对于其广泛期疾病为从未接受过化疗的患者的安全性和有效性,并与使用安慰剂+卡铂+依托泊苷的治疗进行比较。图1说明了研究设计。以下方案提供了有关研究设计的另外的详细信息:



[0484]

[0485] ECOG PS=东部肿瘤协作组体能状态;SCLC=小细胞肺癌;RECIST=实体瘤疗效评价标准。

[0486] 符合条件的患者按性别(男性与女性)、ECOG(即东部肿瘤协作组(Eastern Cooperative Oncology Group))的表现状态(0与1)和脑部转移的存在(是与否)进行分层,

并按1:1的比例随机分组,以接受如表5中所示的以下治疗方案。关于ECOG表现状态的更多细节提供在以下文献中:Oken等人(1982) Am J Clin Oncol.5:649-655。

[0487] 表5:研究性治疗分组

[0488]	治疗分组	诱导期 (四个 21 天周期)	维持期 (第 4 周期后的所有 21 天周期)
	A (201 位患者)	阿特殊单抗 + 卡铂 + 依托泊苷	阿特殊单抗
	B (202 位患者)	安慰剂 + 卡铂 + 依托泊苷	安慰剂

[0489] 诱导治疗以21天为一个周期,进行四个周期。诱导期结束后,患者继续使用阿特殊单抗(A分组)或安慰剂(B分组)进行维持疗法。在维持期,根据当地护理标准允许进行预防性颅脑辐照,并在预防性颅脑辐照电子病例报告表(eCRF)中报告。禁止进行以治愈为目的或旨在消除残留疾病的胸部辐射。允许进行姑息性胸部辐射。下表6提供了表5中治疗方案的给药和施用时间表:

[0490] 表6:治疗方案的给药和施用时间表

[0491]	药物 (按施用顺序列出)	诱导期			维持期
		第 1 至第 4 周期*			> 第 4 周期*
		第 1 天	第 2 天	第 3 天	第 1 天
	1) 阿特殊单抗 (A 分组) 或安慰剂 (B 分组)	1200 mg			1200 mg
	2) 卡铂	AUC = 5 [†]			
	3) 依托泊苷	100 mg/m ²	100 mg/m ²	100 mg/m ²	

[0492] *21天周期

[0493] [†]mg/ml/min

[0494] 如果临床上可行,建议患者在射线照相疾病进展时进行肿瘤活检样本收集。这些数据用于探讨射线照相结果是否与肿瘤的存在一致。此外,分析了这些数据以评价肿瘤组织变化与临床结果之间的关联,并进一步了解进展和对阿特殊单抗的耐药性的潜在机制,与单独使用化疗治疗后的此类机制比较。这一探索性生物标志物评价未用于任何与治疗相关的决定。

[0495] 在第1周期第1天后的48周内,无论治疗剂量是否延迟,所有患者均在基线和每6周(±7天)接受肿瘤评估。完成第48周的肿瘤评估后,无论治疗剂量是否延迟,都需要每9周

(±7天) 进行肿瘤评估。对患者进行肿瘤评估,直到出现根据RECIST v1.1的射线照相疾病进展、患者撤回同意、赞助商终止研究或患者死亡为止,以先发生者为准。

[0496] 在出现根据RECIST v1.1的射线照相疾病进展之后继续治疗的患者继续每6周(±7天)或更早地(如果出现症状恶化)进行肿瘤评估。对于这些患者,无论研究时间如何,都会持续每6周(±7天)进行肿瘤评估,直到研究性治疗中断。

[0497] 无论患者是否开始新的抗癌疗法,因除根据RECIST v1.1的射线照相疾病进展以外的原因(例如,毒性、症状恶化)而中断治疗的患者,都继续进行规划的肿瘤评估,其频率与患者维持研究性治疗所遵循的频率相同(即,无论治疗剂量是否延迟,在第1周期的第1天后,每6周[±7天]一次,持续48周;然后每9周[±7天]一次),直到出现根据RECIST v1.1的射线照相疾病进展、患者撤回同意、主办方终止研究或患者死亡为止,以先发生者为准。

[0498] 在研究提前终止的情况下,根据研究人员的判断,允许从使用阿特殊单抗治疗中获得临床有益效果的患者继续使用阿特殊单抗治疗。

[0499] 结果量度

[0500] 这项研究的主要功效结果量度是:

[0501] • PFS,定义为从随机分组到首次发生研究人员使用RECIST v1.1确定的疾病进展或任何原因导致的死亡之间的时间,以先发生者为准。

[0502] • OS,定义为从随机分组到任何原因导致的死亡的时间。

[0503] 这项研究的次要功效结果量度是:

[0504] • 客观响应,定义为PR或CR,由研究人员根据RECIST v1.1确定。

[0505] • 响应持续时间(DOR),定义为从首次出现有记载的客观响应开始到出现研究人员使用RECIST v1.1确定的疾病进展时间或任何原因导致的死亡的时间间隔,以先发生者为准。

[0506] • 在6个月和1年时的PFS率。

[0507] • 在1年和2年时的OS率。

[0508] • 患者报告的肺癌症状到恶化时间(TTD)定义为从随机分组到根据EORTC QLQ-C30(欧洲癌症研究和治疗组织非生活质量调查问卷C30)和EORTC QLQ-LC13症状子量表(参见例如Berman等人(1994) Eur J Cancer. 30A(5):635-42)界定的恶化(10分变化)的时间,其中维持了两次评估,或维持了一次评估之后在3周内因任何原因死亡。

[0509] 这项研究的安全性结果量度是:

[0510] • 不良事件的发生率、属性和严重程度,根据美国国家癌症研究所不良事件通用术语标准(NCI CTCAE) v4.0进行分级。

[0511] • 在施用研究性治疗期间和之后,生命体征、体检结果和临床实验室结果的变化。

[0512] • 抗治疗性抗体(ATA)对阿特殊单抗的响应发生率以及与PK、药效、安全性和功效参数的潜在相关性。

[0513] 这项研究的药代动力学结果量度是:

[0514] • 输注后观察到的阿特殊单抗的最大血清浓度($C_{\max}$)。

[0515] • 在选定的周期进行输注之前、治疗中断时以及在最后一次给药阿特殊单抗后120天(30天),观察到的阿特殊单抗的最低血清浓度($C_{\min}$)。

[0516] • 卡铂的血浆浓度。

- [0517] • 依托泊苷的血浆浓度。
- [0518] 这项研究的探索性结果量度是：
- [0519] • 客观响应、PFS和DOR,由研究人员根据修改后的RECIST确定。
- [0520] • 在使用阿特珠单抗治疗之前、期间或之后或在进展时收集档案和/或新近获得的肿瘤组织和血液(或血液衍生物)中,与PD-L1、免疫和SCLC相关的以及其他探索性生物标志物的状态,及其与疾病状态和/或对阿特珠单抗的响应的关联。
- [0521] • EQ-5D-5L的效用分数(即用于衡量一般健康状况的标准化工具,参见The EuroQol Group(1990)Health Policy 16(3):199-208)。
- [0522] • 与健康相关的生活质量、与肺癌相关的症状、身体功能性和健康状态状况的PRO相对于基线的变化,根据EORTC QLQ-C30和QLQ-LC13进行评估。
- [0523] • 诱导治疗期间和之后外周和肿瘤特异性T细胞群体的水平和类型的变化,及其与功效和安全性结局的关系。
- [0524] 患者
- [0525] 如果患者从未接受过化疗并且患有ES-SCLC,则符合参加这项研究的条件。
- [0526] 入选标准
- [0527] 关键的入选标准为18岁或以上;ECOG表现状态为0或1;经组织学或细胞学证实的ES-SCLC(根据美国退伍军人肺癌研究组(VALG)分期系统(Micke等人(2002)“Staging small cell lung cancer:Veterans Administration Lung Study Group versus International Association for the Study of Lung Cancer—what limits limited disease?”Lung Cancer 37:271-6);之前没有进行对ES-SCLC的全身治疗;先前接受过局限期SCLC放疗的患者必须已经达到治愈的目的,并且自诊断为广泛期SCLC以来的最后一次化疗、放疗或放化疗周期开始,必须经历了至少6个月的无治疗间隔;具有无症状CNS转移病史的患者只有在以下情况下才合格:(a)转移是幕上和/或小脑转移(即无中脑、脑桥、延髓或脊髓转移);(b)患者无需持续接受作为CNS疾病疗法的皮质类固醇;(c)患者没有CNS治疗完成与随机分组之间的中期进展证据;和(d)在筛查扫描时检测到新的无症状CNS转移的患者接受放射治疗和/或针对CNS转移的手术;可测疾病,如通过RECIST v1.1定义的可测疾病(先前辐射的病灶仅在已经明确地记录了该部位的疾病进展的情况下才被视为可测疾病,因为辐射和先前辐射的病灶并不是唯一的疾病部位);足够的血液学和终末器官功能,由随机分组之前14天内获得的以下实验室测试结果定义:
- [0528] o无粒细胞集落刺激因子支持下,ANC $\geq$ 1500细胞/ μ L。
- [0529] o淋巴细胞计数 $\geq$ 500/ μ L。
- [0530] o不输血时血小板计数 $\geq$ 100,000/ μ L。
- [0531] o血红蛋白 $\geq$ 9.0g/dL。(允许患者输血以符合该标准。)
- [0532] oINR或aPTT $\leq$ 1.5 $\times$ 正常上限(ULN)。(这仅适用于未接受抗凝治疗的患者;接受抗凝治疗的患者要求保持在稳定剂量。)
- [0533] oAST、ALT和碱性磷酸酶 $\leq$ 2.5 $\times$ ULN,以下情况除外:
- [0534] • 记录有肝脏转移的患者:AST和/或ALT $\leq$ 5 $\times$ ULN。
- [0535] • 有已记录的肝脏转移或骨转移的患者:碱性磷酸酶 $\leq$ 5 $\times$ ULN。
- [0536] o血清胆红素 $\leq$ 1.25 $\times$ ULN。(纳入了患有吉尔伯特病且血清胆红素水平 $\leq$ 3 $\times$ ULN

的患者。)

[0537] o血清肌酐 $\leq 1.5 \times \text{ULN}$ 。

[0538] 要求患者在随机分组之前或在随机分组之后4周内提交治疗前的肿瘤组织样本。(任何可用的肿瘤组织样本均可提交。)

[0539] 排除标准

[0540] 关键排除标准包括:活动或未治疗的CNS转移,在筛查和先前的放射学评估期间通过计算机断层扫描(CT)或磁共振成像(MRI)评价确定;未通过手术和/或辐射决定性地治疗的脊髓压迫症,或先前经诊断和治疗的脊髓压迫症,没有证据表明在随机分组之前该疾病在临床上已经稳定 ≥ 1 周;柔脑膜疾病;不受控制的胸腔积液、心包积液或需要反复引流(每月一次或更频繁,但无论引流频率如何,使用留置导管(例如PleurX®)的患者是被允许的)的腹水;不受控制的或有症状的高钙血症(在随机分组之前接受地诺单抗的患者,如果符合条件,则在研究中应中止地诺单抗的使用并用双膦酸盐替代);在随机分组之前5年内患有除SCLC以外的其他恶性肿瘤,但转移或死亡风险可忽略不计(例如,预期5年OS $> 90\%$)的经治疗而具有预期治愈性结局(诸如经充分治疗的宫颈原位癌、基底或鳞状细胞皮肤癌、经以治愈为目的的手术治疗的局限性前列腺癌、经以治愈为目的的手术治疗的原位导管癌)的恶性肿瘤除外;在研究期间怀孕、哺乳或打算怀孕的女性;自身免疫性疾病的病史,包括但不限于重症肌无力、肌炎、自身免疫性肝炎、系统性红斑狼疮、类风湿性关节炎、炎症性肠病、与抗磷脂综合征有关的血管血栓形成、韦格纳肉芽肿病、Sjögren综合征、Guillain-Barré综合征、多发性硬化、血管炎或肾小球性肾炎(具有自身免疫相关甲状腺功能减退病史且接受甲状腺替代激素疗法的患者为合格;接受胰岛素方案的可控I型糖尿病患者为合格);特发性肺纤维化病史、组织性肺炎(例如闭塞性细支气管炎)病史、药源性肺炎病史、特发性肺炎病史或胸部CT扫描筛查为活动性肺炎的证据。(允许有放射场中放射性肺炎(纤维化)病史);HIV检测结果阳性;患有活动性乙型肝炎(慢性或急性;定义为筛查时乙型肝炎表面抗原[HBsAg]测试结果阳性)或具有丙型肝炎病毒(HCV)的患者;活动性肺结核;在随机分组时重度感染,包括但不限于,因感染、菌血症或重症肺炎并发症而住院;随机分组之前3个月内的重大心血管疾病,诸如纽约心脏协会心脏病(II级或更高)、心肌梗塞或脑血管意外,不稳定的心律不齐或不稳定的心绞痛。(患有已知冠状动脉疾病、不符合上述标准的充血性心力衰竭、或左心室射血分数50%的患者应采用稳定的治疗方案,根据治疗医师的意见进行优化,并且若需要,咨询心脏病专家);在随机分组之前28天内的除诊断之外的大型手术过程或预期在研究过程中需要进行大型手术过程;先前的同种异体骨髓移植或实体器官移植;给出对疾病和疾患的合理怀疑的任何其他疾病、新陈代谢功能障碍、身体检查发现或临床实验室发现,这些疾病或疾患均禁止使用研究药物或者可能影响结果的解释或使患者面临治疗并发症的高风险;患有妨碍其理解、遵循和/或依从研究程序的能力的疾病或疾患的患者;在随机分组之前28天内,使用具有治疗意图的任何其他研究药物进行治疗;在随机分组之前4周内施用减毒活疫苗,或者预期在研究过程中将会需要此类减毒活疫苗;使用CD137激动剂或免疫检查点阻断疗法、抗PD-1和抗PD-L1治疗性抗体进行的先前治疗;在随机分组之前1周内,使用全身性免疫抑制药物(包括但不限于皮质类固醇、环磷酰胺、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、沙利度胺和抗肿瘤坏死因子(抗TNF)药物)进行治疗;对嵌合抗体或人源化抗

体或融合蛋白的严重变态反应、过敏反应或其他超敏反应病史；对中国仓鼠卵巢细胞或阿特殊单抗制剂中任何成分产生的生物药物的已知超敏性或变应性；和对卡铂或依托泊苷的变态反应史。

[0541] 治疗方法

[0542] 将403位患者随机(1:1)分组接受阿特殊单抗+卡铂+依托泊苷(A分组)或安慰剂+卡铂+依托泊苷(B分组)治疗。(A治疗分组和B治疗分组的细节如上表5中所示)。下表7中示出了患者处置,下表8中示出了患者的人口统计学和基线特征。(在表7和表8中,PBO+CE=“安慰剂+卡铂+依托泊苷”。Atezo+CE=“阿特殊单抗+卡铂+依托泊苷”。

[0543] 表7:患者处置

ITT (N = 403)	PBO + CE (N = 202)	Atezo + CE (N = 201)
接受的治疗	197 (97.5%)	197 (98.0%)
研究中	60 (29.7%)	77 (38.3%)
活着: 在治疗	11 (5.4%)	23 (11.4%)
活着: 在随访	49 (24.3%)	54 (26.9%)
中断研究	142 (70.3%)	124 (61.7%)
死亡	132 (65.3%)	101 (50.2%)
失访	1 (0.5%)	3 (1.5%)
医师决定	0	2 (1.0%)
受试者撤回	9 (4.5%)	18 (9.0%)

[0545] 表8:患者人口统计学和基线特征

人口统计学/基线特征		PBO = CE (N = 202)	Atezo + CE (N = 201)
年龄 (岁)	<65	106 (52.5%)	111 (55.2%)
性别 (IxRS)	男	132 (65.3%)	130 (64.7%)
种族	白人	159 (78.7%)	163 (81.1%)
	亚裔	36 (17.8%)	33 (16.4%)
	其他	7 (3.5%)	5 (2.5%)
烟草使用史	从未	3 (1.5%)	9 (4.5%)
脑部转移 (IxRS)	是	16 (7.9%)	16 (8.0%)
基线 ECOG (IxRS)	1	130 (64.4%)	128 (63.7%)
bTMB	≥16	40 (22.5%)	40 (23.1%)
	≥10	110 (61.8%)	102 (59.0%)
基线 SLD	均值 (SD)	116.58 (58.28)	120.90 (58.88)
	中位数	105.5	113.0

[0547] 如果可能,患者在随机分组当天接受了第一剂量的研究药物。如果不可能,则在随机分组后的5天内给予第一剂量。阿特殊单抗和安慰剂由赞助商提供。卡铂和依托泊苷为背景治疗,被视为非研究性医药产品(NIMP)。卡铂和依托泊苷以市售制剂形式使用。

[0548] 该研究的诱导期包括四个周期的阿特殊单抗/安慰剂加化疗,每个周期持续21天。参见图1。在每个周期的第1天,按以下顺序向所有符合条件的患者施用研究药物输注:

[0549] A分组:阿特殊单抗→卡铂→依托泊苷

[0550] B分组:安慰剂→卡铂→依托泊苷

[0551] 在诱导期过程中,在第1天以以下方式施用研究性治疗:

[0552] 1 阿特殊单抗/安慰剂(1200mg,相当于15mg/kg的基于平均体重的剂量),在60(±15)分钟内经静脉内施用(第一次输注,并缩短至30[±10]分钟),之后是

[0553] 2 卡铂,在30-60分钟内经静脉内施用,以达到5mg/mL/min的初始目标浓度-时间曲线下面积(AUC)(Calvert公式给药),之后是

[0554] 3 依托泊苷(100mg/m²),在60分钟内经静脉内施用。

[0555] 使用Calvert公式(Calvert等人(1989) J Clin Oncol 7:1748-56)计算AUC 5的卡铂剂量:

[0556] Calvert公式:

[0557] 总剂量(mg) = (目标AUC) × (肾小球滤过率[GFR]+25)

[0558] Calvert公式中用于计算基于AUC的给药的GFR不得超过125mL/min。出于本方案的目的,GFR被视为等同于肌酐清除率(CRCL)。根据机构指南或Cockcroft和Gault(1976) Nephron 16:31-41中描述的方法,使用以下公式来计算CRCL:

$$[0559] \quad CRCL = \frac{(40 - \text{年龄}) (\text{体重})}{72 \times Scr} \quad (\times 0.85, \text{如果是女性})$$

[0560] 其中:CRCL=以mL/min为单位的肌酐清除率

[0561] 年龄=患者的年龄

[0562] Wt=以kg为单位的患者体重

[0563] Scr=以mg/dL为单位的血清肌酐

[0564] 对于血清肌酐水平异常低的患者,可以通过使用最低肌酐水平0.8mg/dL来估算GFR,或者将估算的GFR上限定为125mL/min。建议医师将卡铂的剂量上限定为所需的暴露量(AUC),以避免因过量给药而引起的潜在毒性。根据卡铂标签中描述的Calvert公式,最大剂量计算如下:

[0565] 卡铂最大剂量(mg) = 目标AUC(mg×min/mL) × (GFR+25mL/min)

[0566] 对于肾功能正常的患者,基于GFR估算值,最大剂量上限定为125mL/min。没有使用更高的估计GFR值。对于目标AUC=5,最大剂量为5×150=750mg。对于目标AUC=4,最大剂量为4×150=600mg。有关卡铂给药的其他细节提供在:www.fda.com/gov/aboutfda/centersoffices/officeofmedicalproductsandtobacco/cder/ucm228974.htm。

[0567] 在诱导期过程中,依托泊苷(100mg/m²)还在第2天和第3天在60分钟内经静脉内施用。未进行化疗的周期不计入诱导化疗周期的总数中。诱导期之后,患者开始使用阿特殊单抗/安慰剂进行维持治疗(即1200mg,如上所述,在后续的每个21天周期的第1天输注,参见图1和以上研究方案)。不允许对阿特殊单抗/安慰剂进行剂量调整。

[0568] 肿瘤和响应评价

[0569] 筛查评估包括胸部和腹部的计算机断层扫描(CT)扫描(除非有禁忌,应口服/静脉施用造影剂)或磁共振图像(MRI)。需要在筛查时进行骨盆的CT或MRI扫描,并在后续疗效评价时根据临床指示或当地的护理标准进行。如果可能,可以进行胸部的螺旋CT扫描,但这不是必需的。

[0570] 筛查时需要对头部进行CT(如果没有禁忌,则需使用造影剂)或MRI扫描,以评价所有患者的CNS转移情况。如果扫描结果模棱两可,则需要对脑部进行MRI扫描以确认或推翻

对基线状态下CNS转移的诊断。患有活动性或未经治疗的CNS转移的患者不符合该研究的条件(请参阅排除标准)。

[0571] 如果在正电子发射断层扫描(PET)/CT扫描仪中进行了用于肿瘤评估的CT扫描,则需要进行CT采集以符合全对比诊断性CT扫描的标准。

[0572] 如果有临床指示,还可以进行颈部的骨扫描和CT扫描。根据研究人员的判断,使用了根据RECIST v1.1的对可测疾病的其他评估方法。

[0573] 允许使用在获得知情同意前和第1周期第1天之前28天内根据护理标准执行的肿瘤评估,而不是进行重复测试。筛选时需要记录所有已知疾病部位,并在后续每次肿瘤评价中重新评估记录。整个研究过程中应使用与筛查时评估疾病部位相同的放射学过程(例如,与CT扫描相同的造影剂方案)。研究者使用RECIST v1.1评估了响应(参见Eisenhauer等人(2009)新版实体瘤疗效评价标准:修订的RECIST指南(1.1版)。Eur J Cancer.45:228-47)和修改的RECIST标准。修改的RECIST标准来源于RECIST v1.1(Eisenhauer等人;Topalian等人(2012)N Engl J Med.366:2443-54;和Wolchok等人(2009)Clin Can Res 15:7412-20)以及免疫相关响应标准(Wolchoik等人;Nishino等人(2014)J Immunother Can.2:17;和Nishino等人(2013)Clin Can Res.19:3936-43)。如有可能,由同一位评价人员进行评估,以确保每次访问的内部一致性。在下一个周期给药之前,研究人员审查结果。

[0574] 在第1周期第1天后的48周内,无论治疗剂量是否延迟,患者均在基线和每6周(±7天)接受肿瘤评估。完成第48周的肿瘤评估后,无论治疗剂量是否延迟,都需要每9周(±7天)进行肿瘤评估。对患者进行肿瘤评估,直到出现根据RECIST v1.1的射线照相疾病进展、患者撤回同意、赞助商终止研究或患者死亡为止,以先发生者为准。在出现根据RECIST v1.1的射线照相疾病进展之后继续治疗的患者继续每6周(±7天)或更早地(如果出现症状恶化)进行肿瘤评估。对于这些患者,无论研究时间如何,都会持续每6周(±7天)进行肿瘤评估,直到研究性治疗中断。

[0575] 无论患者是否开始新的抗癌疗法,因除根据RECIST v1.1的射线照相疾病进展以外的原因(例如,毒性、症状恶化)而中断治疗的患者,都继续进行规划的肿瘤评估,其频率与如果患者维持研究性治疗所遵循的频率相同(即,无论治疗剂量是否延迟,在第1周期的第1天后,每6周[±7天]一次,持续48周;然后每9周[±7天]一次),直到出现根据RECIST v1.1的射线照相疾病进展、患者撤回同意、主办方终止研究或患者死亡为止,以先发生者为准。

[0576] 结果

[0577] 研究结果列于下表9中:

[0578] 表9:主要功效终点汇总

	ITT		PBO + CE (N = 202)	Atezo + CE (N = 201)
	中位数 (月)		10.3	12.3
[0579] OS	分层 HR (95% CI) 分层对数秩 p		0.7 (0.54, 0.91) p = 0.0069	
	中位数 (月)		4.3	5.2
PFS	分层 HR (95% CI) 分层对数秩 p		0.77 (0.62, 0.96) p = 0.017	
	中位数 (月)			

[0580] 表9示出,该研究符合RCECIST v1.1的总生存期(OS)和研究人員评估的无进展生

存期 (PFS) 的共同主要终点。总生存期改善具有统计学意义, 并且在临床上具有重要意义。

[0581] 与使用安慰剂+CE治疗的患者相比, 接受Atezo+CE治疗的患者具有延长的总生存期。参见图2。接受Atezo+CE的患者的6个月OS为85.8%、而接受安慰剂+CE的患者为82.8%。接受Atezo+CE的患者的12个月OS为51.7%, 而接受安慰剂+CE的患者为38.2%。与使用安慰剂+CE治疗的患者相比, 使用Atezo+CE治疗的患者还显示出延长的无进展生存期。参见图3。接受Atezo+CE的患者的6个月PFS为30.9%、而接受安慰剂+CE的患者为22.4%。接受Atezo+CE的患者的12个月PFS为12.6%、而接受安慰剂+CE的患者为5.4%。

[0582] Atezo+CE治疗的患者的一年总生存率为51.7%, 而接受安慰剂+CE的患者的一年总生存率为38.2%。

[0583] 此外, 两个治疗分组之间的总响应率 (ORR) 相似, 确认接受阿特殊单抗+卡铂+依托泊苷的患者的ORR为60%, 而接受安慰剂+卡铂+依托泊苷的患者的ORR为64% (CR: 阿特殊单抗+卡铂+依托泊苷分组为2.5%, 而安慰剂+卡铂+依托泊苷分组为1%)。参见图4 (CR=完全响应; CR/PR=完全响应/部分响应; SD=疾病稳定; PD=疾病进展)。另请参见下表10。两个治疗分组之间的响应持续时间 (DOR) 也相似, 阿特殊单抗+卡铂+依托泊苷分组的中位DOR为4.2个月, 而安慰剂+卡铂+依托泊苷分组的中位DOR为3.9个月。根据RECIST v1.1标准评估了ORR和DOR。

[0584] 表10: 确认的研究人员评估的客观响应率和响应持续时间 (基线时可测疾病的意向治疗群体)。

变量	阿特殊单抗组	安慰剂组
响应†		
可评估的患者数	201	202
确认客观响应——数量 (%)	121 (60.2 [53.1–67.0])	130 (64.4 [57.3–71.0])
完全	5 (2.5 [0.8–5.7])	2 (1.0 [0.1–3.5])
部分	116 (57.7 [50.6–64.6])	128 (63.4 [56.3–70.0])
[0585] 疾病稳定——数量 (%) [95% CI]	42 (20.9 [15.5–27.2])	43 (21.3 [15.9–27.6])
疾病进展——数量 (%) [95% CI]	22 (10.9 [7.0–16.1])	14 (6.9 [3.8–11.4])
数据丢失或无法评估的患者——数量 (%)	16 (8.0)	15 (7.4)
响应持续时间‡		
可评估的患者数	121	130
响应持续时间的中位数 (范围) ——mo	4.2 (1.4+–19.5)	3.9 (2.0–16.1+)
在数据截止日期有持续响应的患者——数量 (%)	18 (14.9)	7 (5.4)

[0586] †客观响应定义为研究人员根据RECIST v1.1标准确定的完全响应或部分响应。

[0587] ‡对有客观响应的患者评估响应持续时间, 定义为从首次出现有记载的客观响应开始到研究人员使用RECIST确定的疾病进展时间或因任何原因死亡的时间, 以先发生者为准。

[0588] +表示审查的观察; CI表示置信区间。

[0589] 在所有分析的亚组中均观察到OS有益效果和PFS有益效果。分别参见图5和6。无论血液肿瘤突变负荷 (bTMB) 如何, 均可观察到OS有益效果。参见图7A, 其示出了在每个治疗分组中bTMB ≥ 16 的患者的OS的Kaplan Meier图, 图7B则示出了每个治疗分组中bTMB < 16 的患者的OS的Kaplan Meier图。也参见图8A, 其示出了在每个治疗分组中bTMB ≥ 10 的患者的OS的Kaplan Meier图, 图8B则示出了每个治疗分组中bTMB < 10 的患者的OS的Kaplan Meier图。同样, 无论血液肿瘤突变负荷 (bTMB) 如何, 均可观察到PFS有益效果。参见图9A, 其示出了在每个治疗分组中bTMB ≥ 16 的患者的PFS的Kaplan Meier图, 图9B则示出了每个治疗分组中bTMB < 16 的患者的PFS的Kaplan Meier图。也参见图10A, 其示出了在每个治疗分组中bTMB ≥ 10 的患者的PFS的Kaplan Meier图, 图10B则示出了每个治疗分组中bTMB < 10 的患者的PFS的Kaplan Meier图。

[0590] 接受阿特殊单抗+卡铂+依托泊苷的患者的安全性谱与各个治疗成分的已知风险一致。没有发现新的安全信号。两个治疗分组的化学疗法暴露相似, 这表明在阿特殊单抗+卡铂+依托泊苷治疗方案中, 阿特殊单抗的施用不危害卡铂+依托泊苷的递送。在两个治疗分组之间, 与骨髓抑制相关的毒性 (如嗜中性白血球减少症和血小板减少症) 是一致的, 并且与化疗有关。

[0591] 这项研究表明, 与单用化疗相比, 以阿特殊单抗加化疗 (卡铂和依托泊苷) 联合疗法进行的初始 (一线) 治疗可帮助患有广泛期小细胞肺癌 (ES-SCLC) 的人显著延长生命。与单独化疗相比, 阿特殊单抗加化疗 (卡铂和依托泊苷) 的联合疗法还降低了疾病恶化或死亡 (PFS) 的风险。这些是在治疗广泛期小细胞肺癌 (一种特别难以治疗的疾病类型) 的初始治疗中, 使用基于免疫疗法的联合疗法进行并行治疗的首次阳性生存结果。此外, 这是二十多年来的首次有研究显示, 在ES-SCLC的初始治疗中, 总生存期比单纯化疗具有临床和统计学上的显著提高。阿特殊单抗组的1年生存率高出13%, 这表明在该致命疾病中具有长生存期的潜力。

[0592] 实例2: 来自实例1的患者报告结果 (PRO)

[0593] 参加实例1中所述研究的患者在基线时以及之后每三周完成欧洲癌症研究和治疗组织的生活质量调查问卷C30 (EORTC QLQ-C30) 和生活质量调查问卷LC13 (QLQ-LC13)。分析包括从基线的变化、到第12周的变化的累积分布函数曲线以及到恶化的时间 (TTD)。临床意义基于与基线相比的变化 ≥ 10 分 (得分范围0至100)。

[0594] 在研究的两个分组中, 完成率在基线时为 $\geq 85\%$, 在第75周时为 $\geq 70\%$ 。在两个分组之间, 基线患者报告的结果评分相当。两个分组的患者均报告早期的、显著的症状改善, 与安慰剂+CE相比, Atezo+CE改善的数字趋于更大。参见表11。到第12周时, 与接受安慰剂+CE的患者相比, 更高比例的接受Atezo+CE的患者报告其肺癌 (LC) 相关症状有所缓解 (见表11)。没有观察到咳嗽或胸痛的TTD出现明显差异, 但在接受Atezo+CE的患者中更多地观察到呼吸困难的TTD数字延迟 (HR 0.75 [95%CI 0.55-1.02]) Atezo+CE分组的患者报告说, 其身体/角色功能和与健康相关的生活质量得到改善 (HRQoL; ≥ 10 分的增加), 这种情况在第54周的大多数访问中均持续存在。在两个分组之间, 与治疗相关的症状 (例如腹泻、恶心/呕吐) 的变化相似。

[0595] 与安慰剂+CE相比, Atezo+CE的一线治疗不仅可显著改善患者报告的肺癌症状, 而且还提供OS和PFS有益效果。患者报告的结局表明功能和与健康相关的生活质量得到持续

改善,而受治疗毒性影响最小进一步支持了在一线ES-SCLC治疗中添加Atezo+CE的这一正向的效益风险比。

[0596] 表11:到第12周的平均变化范围(负变化表示症状改善)

	Atezo + CE (n=124)	安慰剂 + CE (n=131)
[0597] 手臂/肩膀疼痛	-7.0	-2.5
胸痛	-7.8	-4.1
咳嗽	-14.8	-15.5
呼吸困难	-6.5	-2.3

[0598] 实例3:以总生存期(OS)测量的关于阿特殊单抗+卡铂+依托泊苷与安慰剂+卡铂+依托泊苷相比在ITT群体中的功效的其他数据

[0599] 来自实例1的以总生存期(OS)测量的关于阿特殊单抗+卡铂+依托泊苷与安慰剂+卡铂+依托泊苷相比在ITT群体中的功效的其他数据,如下所述。

[0600] 6、12、18和24个月的总生存期

[0601] 如实例1中所讨论,与用安慰剂+CE治疗的患者相比,用Atezo+CE治疗的患者表现出延长的总生存期。参见图2。接受Atezo+CE的患者的6个月OS为85.8%、而接受安慰剂+CE的患者为82.8%。接受Atezo+CE的患者的12个月OS为51.7%、而接受安慰剂+CE的患者为38.2%。与使用安慰剂+CE治疗的患者相比,使用Atezo+CE治疗的患者还显示出延长的无进展生存期。参见图3。接受Atezo+CE的患者的6个月PFS为30.9%、而接受安慰剂+CE的患者为22.4%。接受Atezo+CE的患者的12个月PFS为12.6%、而接受安慰剂+CE的患者为5.4%。Atezo+CE治疗的患者的一年总生存率为51.7%,而接受安慰剂+CE的患者的一年总生存率为38.2%。

[0602] 在随机分组后22.9个月内进行的进一步分析中,Atezo+CE治疗的OS中位数约为23.3个月,而安慰剂+CE治疗的患者OS中位数约为10.3个月(分层HR(95%CI)=0.755(0.601,0.949);分层对数秩p值为0.0154)。以下表12提供了在为期22.9个月的随访中,使用Atezo+CE治疗的患者对比使用安慰剂+CE治疗的患者6个月、12个月、18个月和24个月的总生存率:

[0603] 表12:更新的总生存期分析

	PBO + CE (n = 202)	Atezo + CE (n = 201)
6 个月	82.8% (n = 160)	85.8% (n = 159)
12 个月	39.0% (n = 74)	51.9% (n = 93)
18 个月	21.0% (n = 39)	34.0% (n = 61)
24 个月	16.8% (n = 8)	22.0% (n = 21)

[0604] 如之前在实例1中所述,接受Atezo+CE的患者的6个月OS为85.8%,而接受安慰剂+CE的患者为82.8%。接受Atezo+CE的患者的12个月OS为51.9%,而接受安慰剂+CE的患者为39%,即与实例1中所述的结果非常相似。接受Atezo+CE的患者的18个月OS为34%,而接受

安慰剂+CE的患者为21%。接受Atezo+CE的患者的24个月OS为22%，而接受安慰剂+CE的患者为16.8%。

[0605] 亚组分析

[0606] 图11A至11C提供了另外的更新亚组分析数据。在所分析的所有亚组中都确认了在实例1中观察到的OS有益效果，该亚组包括例如<65岁、65至74岁之间、75至84岁和≥85岁的患者；在男性和女性患者中；在美洲原住民、阿拉斯加人、亚裔、黑人、非裔美国人和白人患者中；在从未使用过烟草、当前使用烟草以及以前使用过烟草的患者中；在有或没有脑部（在入组时）、肺部（在入组时）、肝脏（在入组时）、淋巴结（在入组时）和/或肾上腺（在入组时）转移的患者中；在所有患者中，无论bTMB如何。

[0607] 生物标志物亚组分析

[0608] 尚未针对PD-L1表达选择其疾病的ES-SCLC患者参加了实例1中所述的试验。如实例1中所述，在可能的情况下，从参加试验的患者获得治疗前的肿瘤组织样本进行分析，以评估肿瘤生物标志物（例如PD-L1）与治疗响应之间的关系。表13中示出了生物标志物可评价患者的PD-L1患病率。

[0609] 表13. 生物标志物可评价患者的PD-L1患病率

	PBO + CE (n = 202)	Atezo + CE (n = 201)	总计 (n = 403)
BEP1 (切片年龄 ≤1岁)	73 (36%)	64 (32%)	137 (34%)
TC ≥ 50% 或 IC ≥ 50%	0	0	0
TC ≥ 25% 或 IC ≥ 25%	0	1 (1.6%)	1 (0.7%)
TC ≥ 5% 或 IC ≥ 5%	14 (19.2%)	15 (23.4%)	29 (21.2%)
TC ≥ 1% 或 IC ≥ 1%	36 (49.3%)	36 (56.3%)	72 (52.6%)
TC <1% 和 IC <1%	37 (50.7%)	28 (43.8%)	65 (47.4%)
BEP2 (任何切片年龄)	93 (46%)	75 (37%)	168 (42%)
TC ≥ 50% 或 IC ≥ 50%	0	0	0
TC ≥ 25% 或 IC ≥ 25%	0	1 (1.3%)	1 (0.6%)
TC ≥ 5% 或 IC ≥ 5%	22 (23.7%)	17 (22.7%)	39 (23.2%)
TC ≥ 1% 或 IC ≥ 1%	51 (54.8%)	42 (56.0%)	93 (55.4%)
TC <1% 和 IC <1%	42 (45.2%)	33 (44.0%)	75 (44.6%)

[0611] TC=肿瘤细胞上的PD-L1表达

[0612] IC=肿瘤浸润免疫细胞上的PD-L1表达。

[0613] BEP1是指试验中生物标志物可评价的患者，具有来自IHC染色前≤1年切片的肿瘤组织切片的有效PD-L1免疫组织化学(IHC)。BEP2是指试验中生物标志物可评价的患者，具有来自肿瘤组织切片的有效PD-L1免疫组织化学(IHC)，无论IHC染色时的切片年龄如何。在各种截止值下PD-L1患病率的百分比基于BEP1/2。在治疗分组之间，BEP1和BEP2的人口统计学和基线特征通常保持平衡。参见表14A和14B。

[0614] 表14A. BEP1的人口统计学和基线特征

[0615]	人口统计学/基线		PBO + CE (n = 73)	Atezo + CE (n = 64)
	年龄 (岁)	<65	43 (58.9%)	41 (64.1%)
	性别 (eCRF)	男	46 (63.0%)	39 (60.9%)
	种族	白人	71 (97.3%)	64 (100.0%)
[0616]		亚裔	NA	NA
	烟草使用史	从未	1 (1.4%)	5 (7.8%)
	脑部转移 (eCRF)	是	4 (5.5%)	3 (4.7%)
	ECOG 得分 (eCRF)	0	24 (32.9%)	21 (32.8%)
	bTMB ≥ 16	是	13 (19.1%)	15 (25.9%)
	bTMB ≥ 10	是	38 (55.9%)	36 (62.1%)
	基线 SLD	中位数 最小-最大	123 (26.0 - 353.0)	125.5 (12.0 - 325.0)

[0617] 表14B.BEP2的人口统计学和基线特征

[0618]	人口统计学/基线		PBO + CE (n = 93)	Atezo + CE (n = 75)
	年龄 (岁)	<65	53 (57.0%)	46 (61.3%)
	性别 (eCRF)	男	60 (64.5%)	44 (58.7%)
	种族	白人	81 (87.1%)	73 (97.3%)
		亚裔	10 (10.8%)	2 (2.7%)
	烟草使用史	从未	1 (1.1%)	6 (8.0%)
	脑部转移 (eCRF)	是	5 (5.4%)	5 (6.7%)
	ECOG 得分 (eCRF)	0	32 (34.4%)	23 (30.7%)
	bTMB ≥ 16	是	20 (23.3%)	20 (29.4%)
	bTMB ≥ 10	是	52 (60.5%)	44 (64.7%)
	基线 SLD	中位数 最小-最大	116 (26.0 - 353.0)	122 (12.0 - 325.0)

[0619] SLD=靶病灶(肿瘤)最长直径的总和

[0620] 与使用安慰剂+CE治疗的BEP1和BEP2患者相比,使用Atezo+CE治疗的BEP1和BEP2所有患者均表现出PFS有益效果。如图12A和12B中所示,与接受安慰剂+CE的患者相比,在使用Atezo+CE治疗的BEP1和BEP2患者中也观察到PFS有益效果。此外,在PD-L1表达水平<1%的BEP1和BEP2患者中,接受Atezo+CE的患者的总响应率(ORR)高于接受安慰剂+CE的患者的ORR。参见表15。

[0621] 表15.PD-L1表达<1%的患者的总响应率

[0622]	BEP1	安慰剂 + CE (n = 73)	Atezo + CE (n = 64)
	确认的 ORR TC <1% 和 IC <1%	62.2%	75.0%
	确认的 ORR TC <1% 和 IC <1%	70.3%	82.1%

[0623]	BEP2	安慰剂 + CE (n = 73)	Atezo + CE (n = 64)
	确认的 ORR TC <1% 和 IC <1%	66.7%	78.8%
	确认的 ORR TC <1% 和 IC <1%	73.8%	84.8%

[0624] 与使用安慰剂+CE治疗的BEP1和BEP2患者相比,使用Atezo+CE治疗的BEP1和BEP2所有患者均表现出OS有益效果。如图13A和13B中所示,与接受安慰剂+CE的患者相比,在使用Atezo+CE治疗的BEP1和BEP患者中也观察到PFS有益效果。

[0625] 因此,与使用安慰剂+CE治疗的患者相比,PD-L1阴性亚组(即肿瘤细胞或肿瘤浸润免疫细胞上的PD-L1表达<1%的患者)可从Atezo+CE治疗中获得临床有益效果。这样的结果表明了全体参加者治疗(all-comer treatment)的有益效果。

[0626] 尽管为了清楚理解的目的先前已经通过说明和实例相当详细地描述了本公开,但是所述说明和实例不应解释为限制本公开的范围。本文引用的所有专利和科学文献的公开内容的全部内容以引用方式明确地并入。

<110> 基因泰克公司(Genentech, Inc.)

<120> 用PD-1轴结合拮抗剂、铂剂和拓扑异构酶II抑制剂治疗肺癌的方法

<130> 14639-20449.40

<140> 尚未分配

<141> 与此同时

<150> US 62/736,326

<151> 2018-09-25

<150> US 62/719,461

<151> 2018-08-17

<150> US 62/689,105

<151> 2018-06-23

<160> 20

<170> 用于 Windows 的 FastSEQ,4.0 版

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 1

Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His

1 5 10

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 2

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

1 5 10 15

Lys Gly

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 3

Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr

1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 5

Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 6

Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr

1 5

<210> 7

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 7

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			

<210> 8

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 8

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		

<210> 9

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 9

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
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
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> 10		
<211> 214		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成构建体		
<400> 10		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
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
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>	11																
<211>	440																
<212>	PRT																
<213>	人工序列																
<220>																	
<223>	合成构建体																
<400>	11																
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
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
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
Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
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
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> 12

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 12

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1

5

10

15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr

20

25

30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35

40

45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly

50

55

60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

65

70

75

80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln 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> 13

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 13

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Val	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asn	Tyr
			20					25						30	
Tyr	Met	Tyr	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
			35				40					45			
Gly	Gly	Ile	Asn	Pro	Ser	Asn	Gly	Gly	Thr	Asn	Phe	Asn	Glu	Lys	Phe
			50				55					60			
Lys	Asn	Arg	Val	Thr	Leu	Thr	Thr	Asp	Ser	Ser	Thr	Thr	Thr	Ala	Tyr
65					70				75					80	
Met	Glu	Leu	Lys	Ser	Leu	Gln	Phe	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Arg	Asp	Tyr	Arg	Phe	Asp	Met	Gly	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val
			115					120					125		
Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	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	
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	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys
			195				200					205			
Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro
			210				215					220			
Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
225					230					235				240	
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
				245					250					255	
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu
				260				265						270	

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

<210> 14

<211> 218

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 14

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

Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Arg
 85 90 95
 Asp Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105 110
 Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125
 Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
 130 135 140
 Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
 145 150 155 160
 Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
 165 170 175
 Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
 180 185 190
 His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
 195 200 205
 Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 15

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 15

Glu Val Gln Leu Leu 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 Ser Tyr
 20 25 30
 Ile Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu 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 Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val 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
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val		
	165	170
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro		
	180	185
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys		
	195	200
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp		
	210	215
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly		
225	230	235
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile		
	245	250
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu		
	260	265
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His		
	275	280
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg		
	290	295
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys		
305	310	315
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu		
	325	330
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr		
	340	345
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu		
	355	360
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp		
	370	375
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val		
385	390	395
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp		
	405	410
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>	16														
<211>	216														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	合成构建体														
<400>	16														
Gln	Ser	Ala	Leu	Thr	Gln	Pro	Ala	Ser	Val	Ser	Gly	Ser	Pro	Gly	Gln
1				5					10					15	
Ser	Ile	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Asp	Val	Gly	Gly	Tyr
	20					25					30				
Asn	Tyr	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	His	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu
	35					40					45				
Met	Ile	Tyr	Asp	Val	Ser	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Ser	Asn	Arg	Phe
	50					55					60				
Ser	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Ser	Leu	Thr	Ile	Ser	Gly	Leu
65					70					75					80
Gln	Ala	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ser	Ser	Tyr	Thr	Ser	Ser
	85					90					95				
Ser	Thr	Arg	Val	Phe	Gly	Thr	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu	Gly	Gln
	100					105					110				
Pro	Lys	Ala	Asn	Pro	Thr	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Glu
	115					120					125				
Leu	Gln	Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp	Phe	Tyr
	130					135					140				
Pro	Gly	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Gly	Ser	Pro	Val	Lys
145					150					155					160
Ala	Gly	Val	Glu	Thr	Thr	Lys	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn	Lys	Tyr
	165					170					175				
Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Lys	Ser	His
	180					185					190				
Arg	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	Glu	Lys
	195					200					205				
Thr	Val	Ala	Pro	Thr	Glu	Cys	Ser								
	210					215									

<210> 17

$\langle 211 \rangle$ 450

<212> PRT

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 合成构建体

<400> 17

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	Arg	Tyr
			20					25					30		
Trp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Asn	Ile	Lys	Gln	Asp	Gly	Ser	Glu	Lys	Tyr	Tyr	Val	Asp	Ser	Val
	50					55					60				
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	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	Glu	Gly	Gly	Trp	Phe	Gly	Glu	Leu	Ala	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly
			100					105					110		
Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser
		115						120					125		
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala
	130					135					140				
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val
145					150				155						160
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala
			165						170					175	
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val
			180					185					190		
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His
		195					200					205			
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
	210					215				220					
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly
225					230					235					240
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met
			245						250					255	

Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His																			
260																			
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val																			
275																			
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr																			
290																			
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly																			
305																			
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile																			
325																			
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val																			
340																			
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser																			
355																			
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu																			
370																			
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro																			
385																			
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val																			
405																			
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met																			
420																			
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser																			
435																			
Pro Gly																			
450																			
<210> 18																			
<211> 215																			
<212> PRT																			
<213> 人工序列																			
<220>																			
<223> 合成构建体																			
<400> 18																			
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly																			
1																			
5																			
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Arg Val Ser Ser Ser																			
20																			
25																			
30																			
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu																			
35																			
40																			
45																			

Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser		
50	55	60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu		
65	70	75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Leu Pro		
85	90	95
Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala		
100	105	110
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser		
115	120	125
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu		
130	135	140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser		
145	150	155 160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu		
165	170	175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val		
180	185	190
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys		
195	200	205
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210	215	

<210> 19

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 19

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

Leu	Gln	Ile	Thr	Ser	Leu	Thr	Ala	Glu	Asp	Thr	Gly	Met	Tyr	Phe	Cys
					85				90					95	
Val	Arg	Val	Gly	Tyr	Asp	Ala	Leu	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu
			100					105					110		
Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu
			115					120					125		
Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys
			130					135				140			
Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser
145					150					155					160
Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser
					165				170					175	
Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser
			180					185					190		
Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn
			195					200					205		
Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His
			210					215				220			
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val
225					230					235					240
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr
					245				250					255	
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu
			260					265					270		
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys
			275					280					285		
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser
			290					295				300			
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys
305					310					315					320
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile
					325				330					335	
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro
			340					345					350		
Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu
			355					360					365		
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn
			370					375				380			
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser

385	390	395	400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg			
	405	410	415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu			
	420	425	430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	435	440	445
<210> 20			
<211> 213			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成构建体			
<400> 20			
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Arg Ser Ser Val Ser Tyr Met			
	20	25	30
His Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Trp Ile Tyr			
	35	40	45
Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser			
	50	55	60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Cys Leu Thr Ile Asn Ser Leu Gln Pro Glu			
65	70	75	80
Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Ser Phe Pro Leu Thr			
	85	90	95
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro			
	100	105	110
Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr			
	115	120	125
Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys			
	130	135	140
Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu			
145	150	155	160
Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser			
	165	170	175
Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala			
	180	185	190
Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe			

195	200	205
Asn Arg Gly Glu Cys		
210		

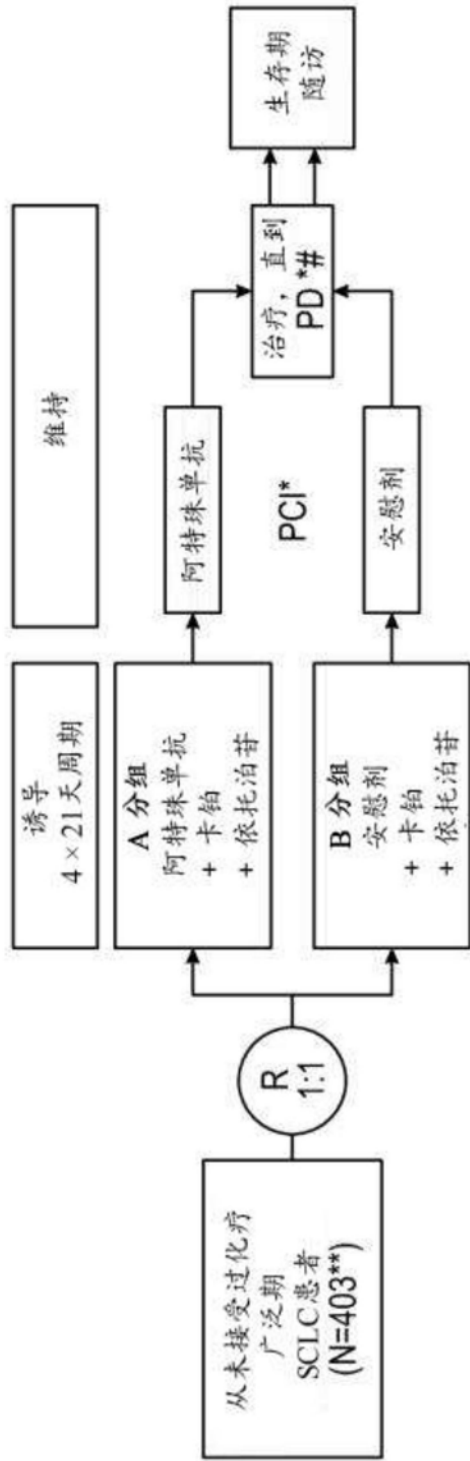


图1

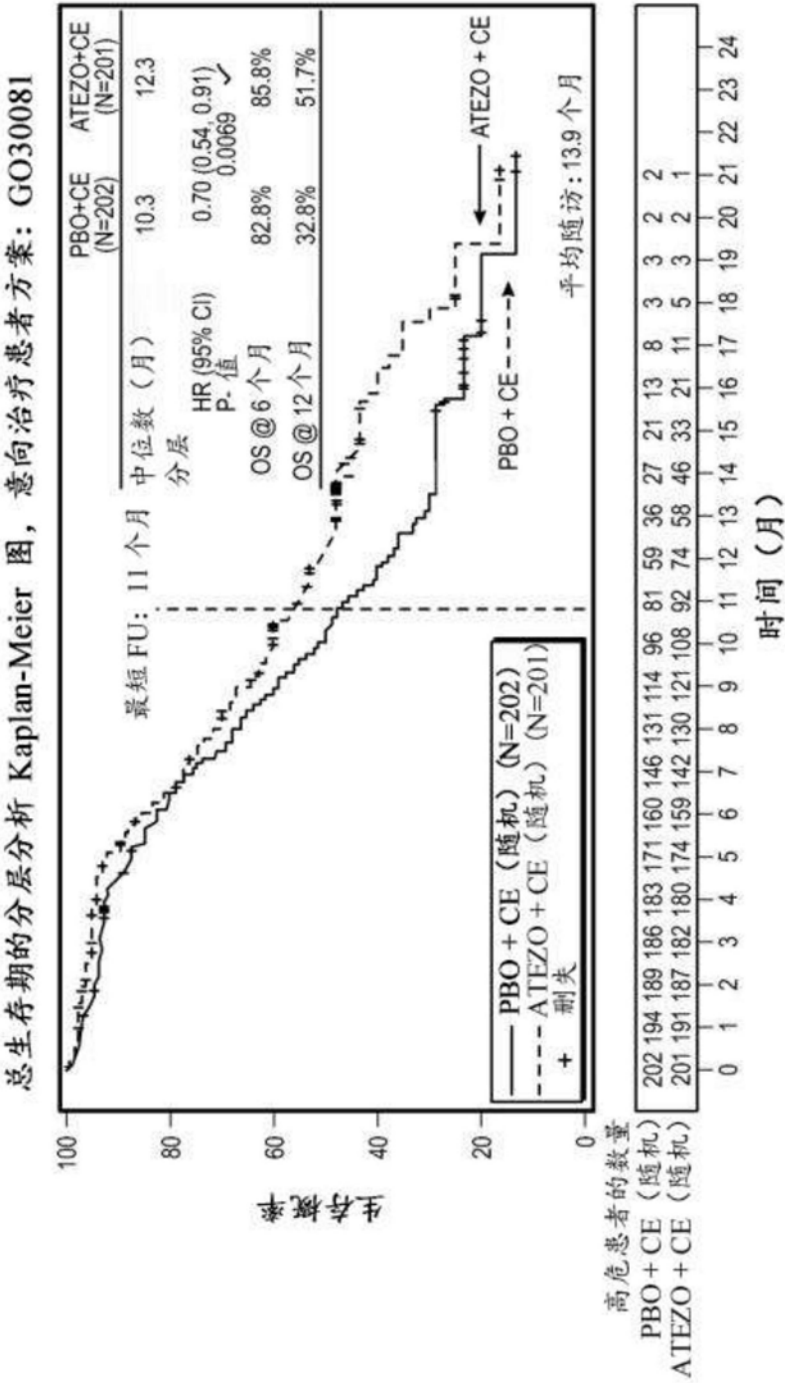


图2

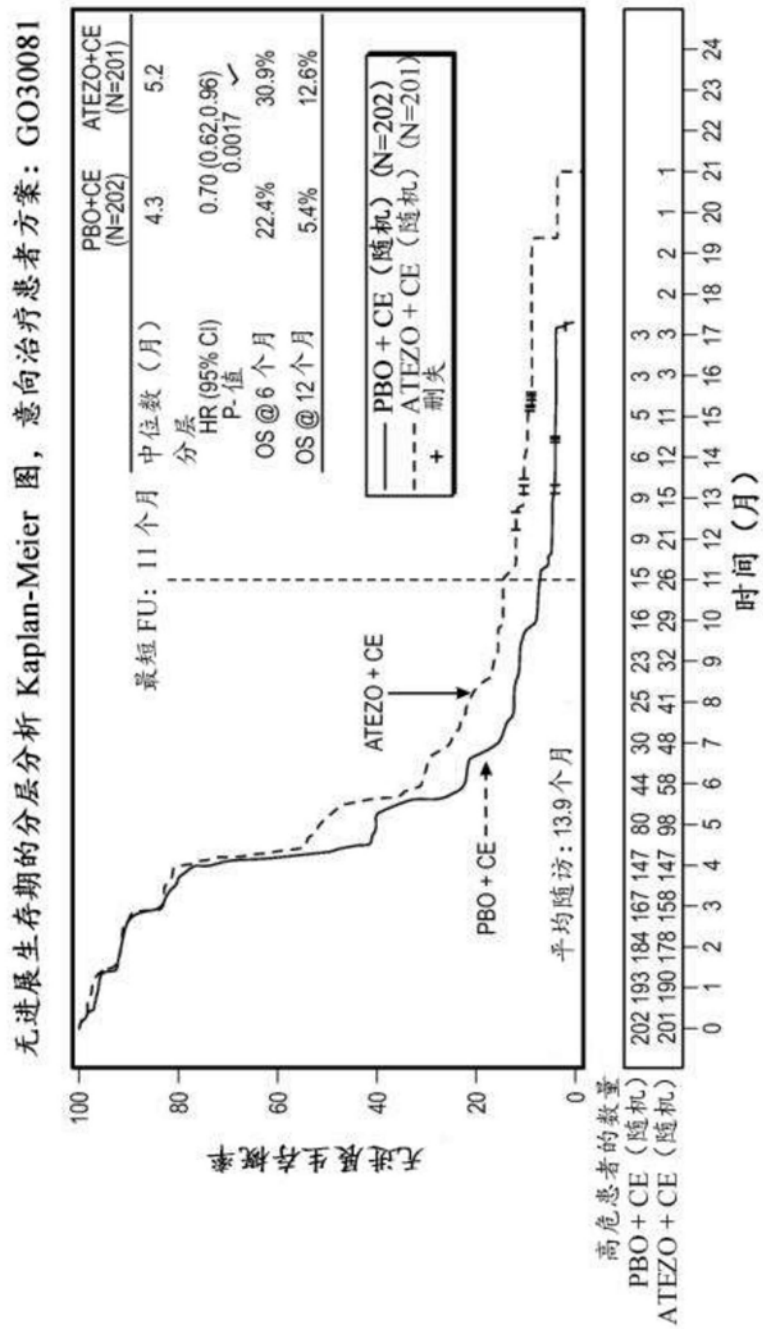


图3

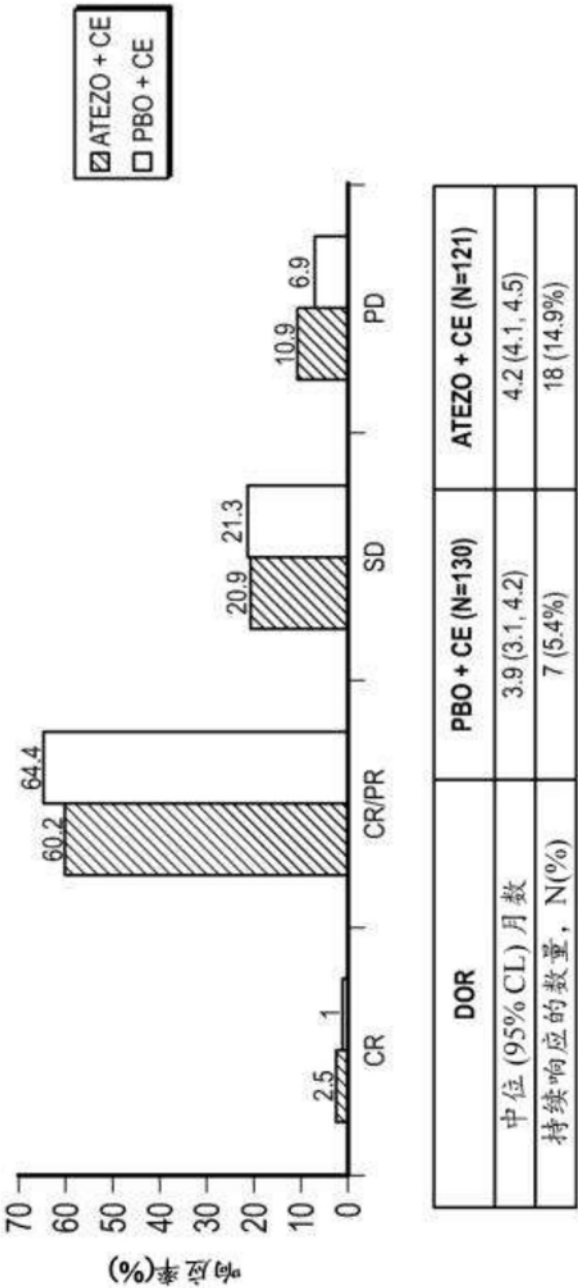


图4

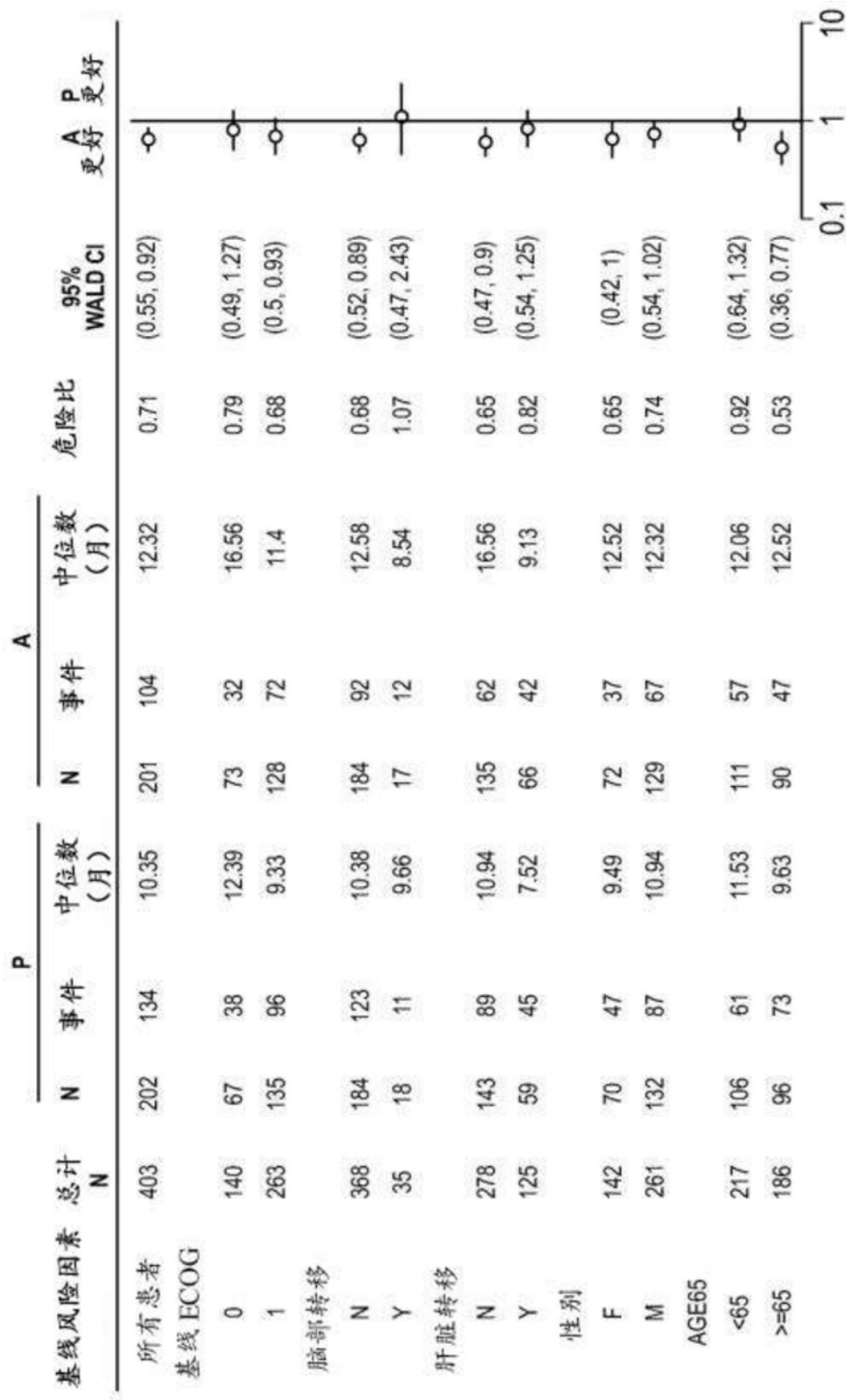


图5A

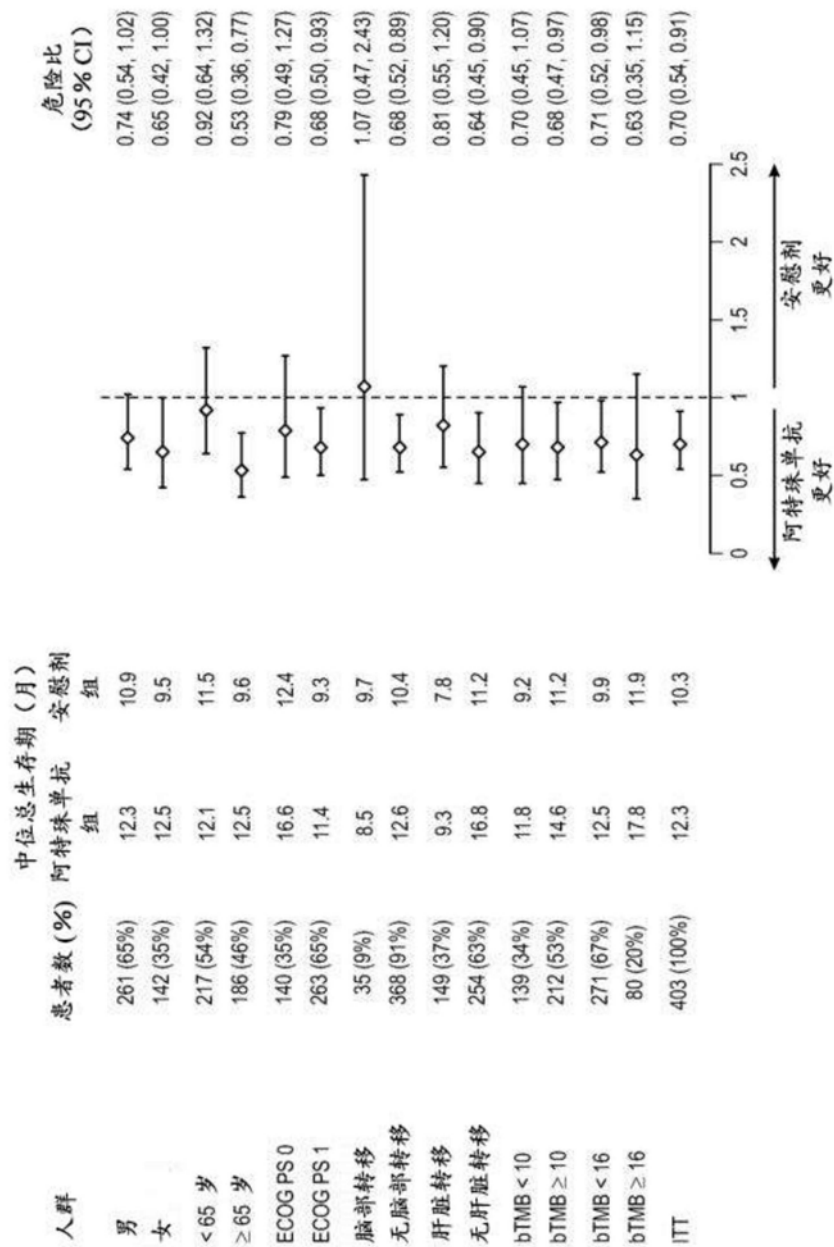


图5B

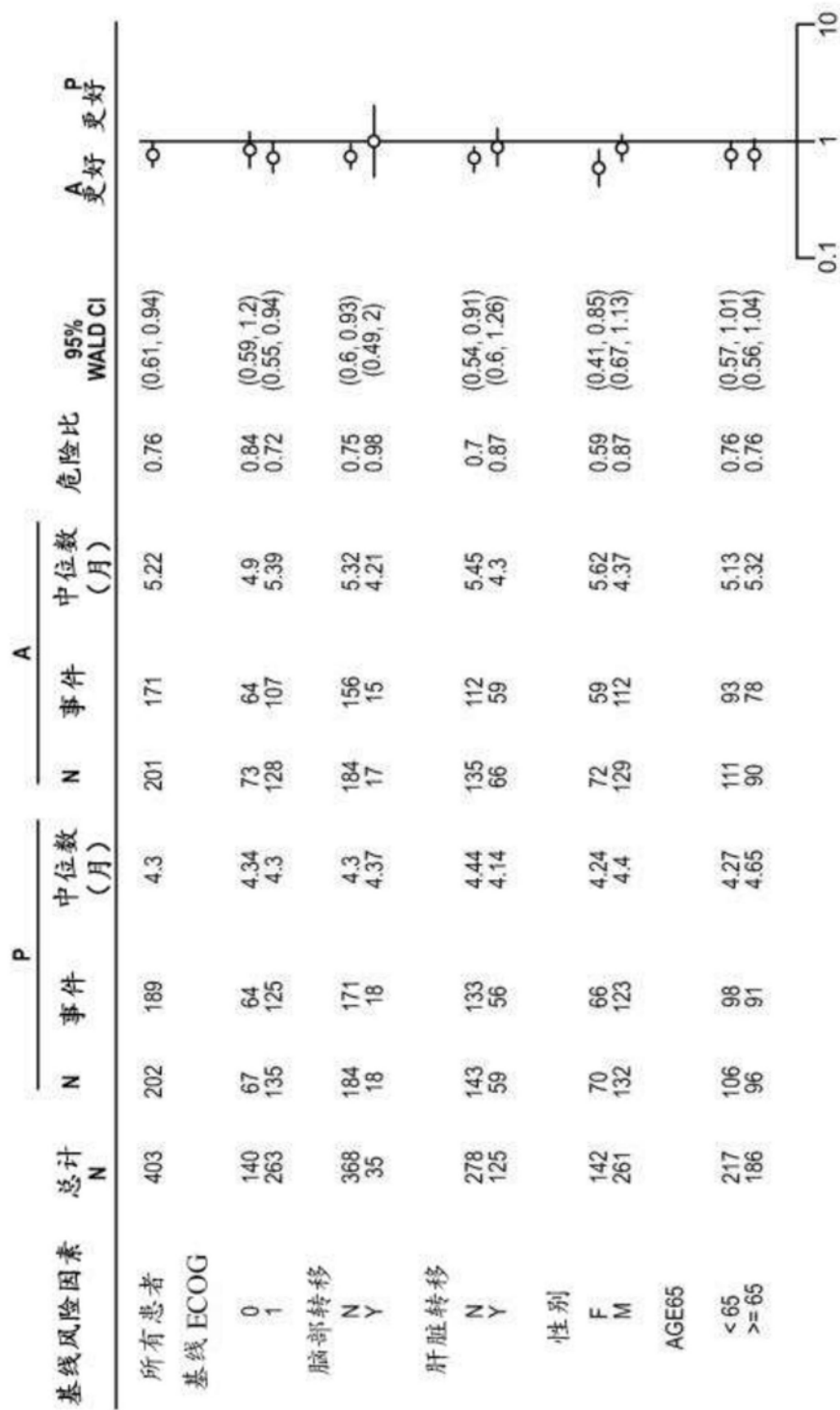


图6A

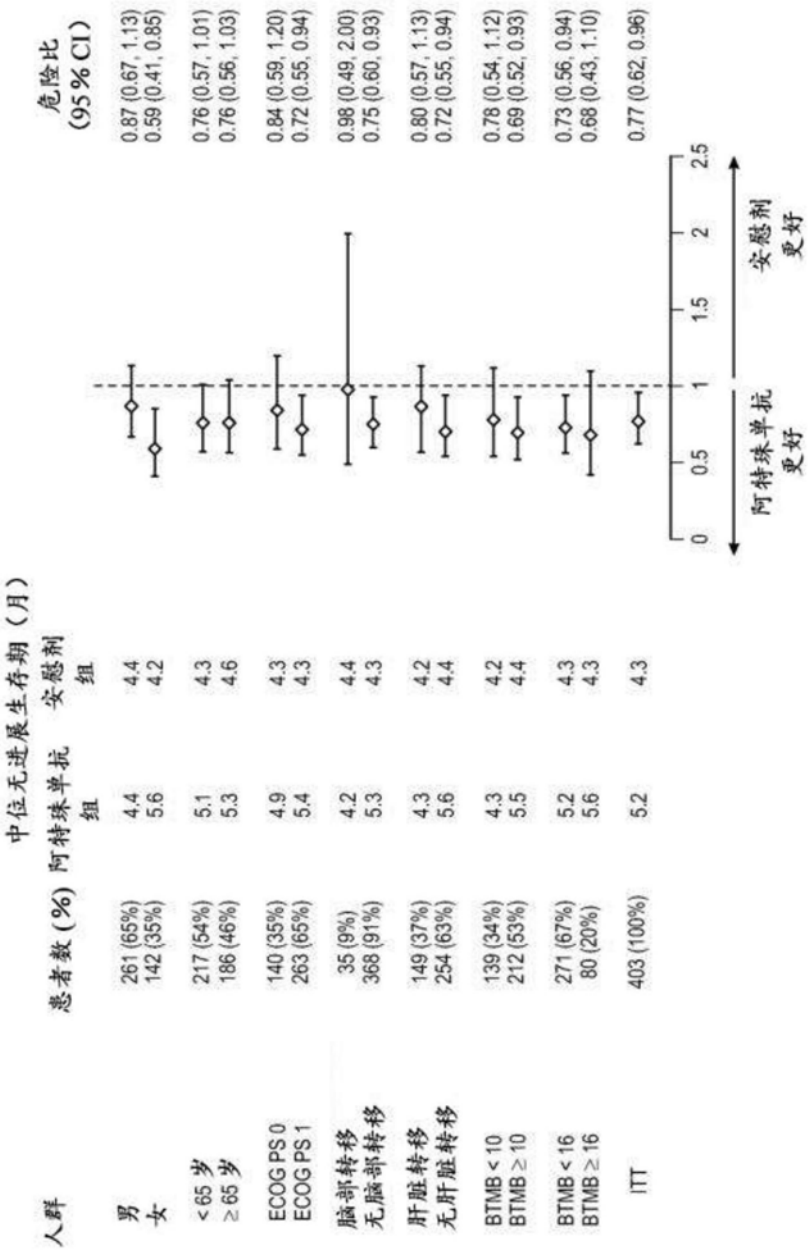


图6B

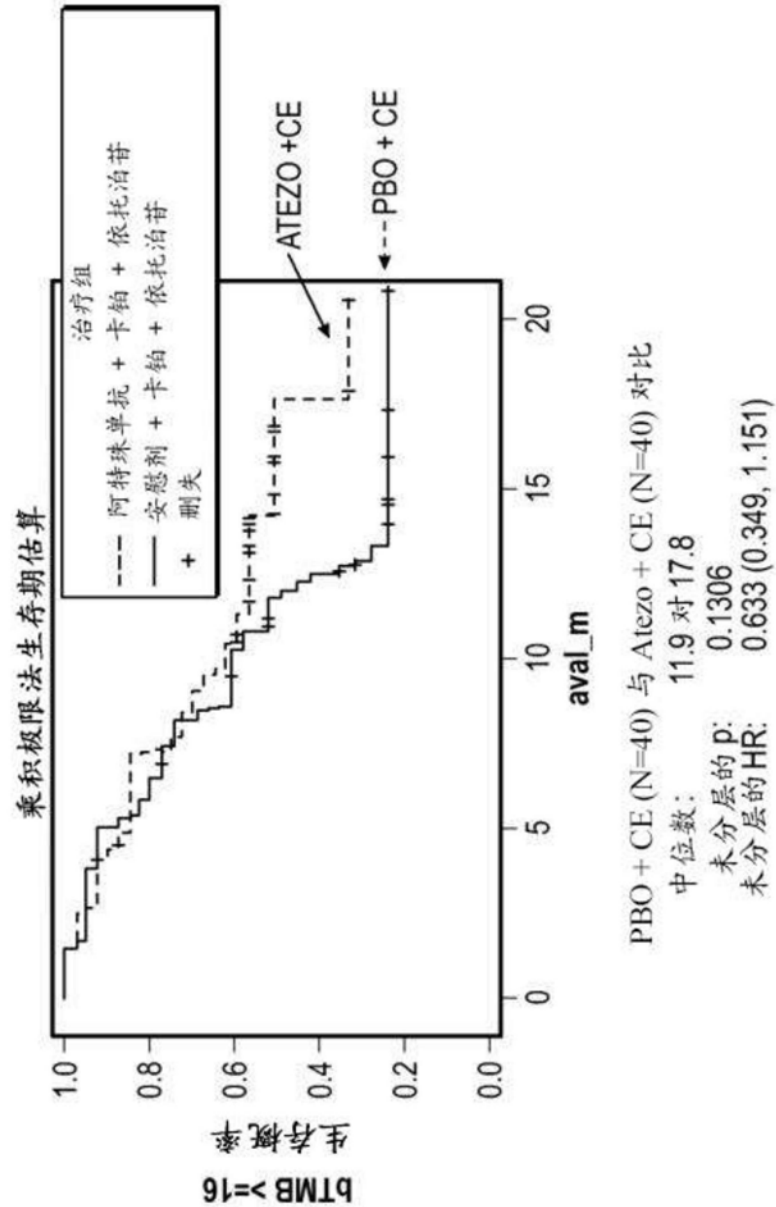


图7A

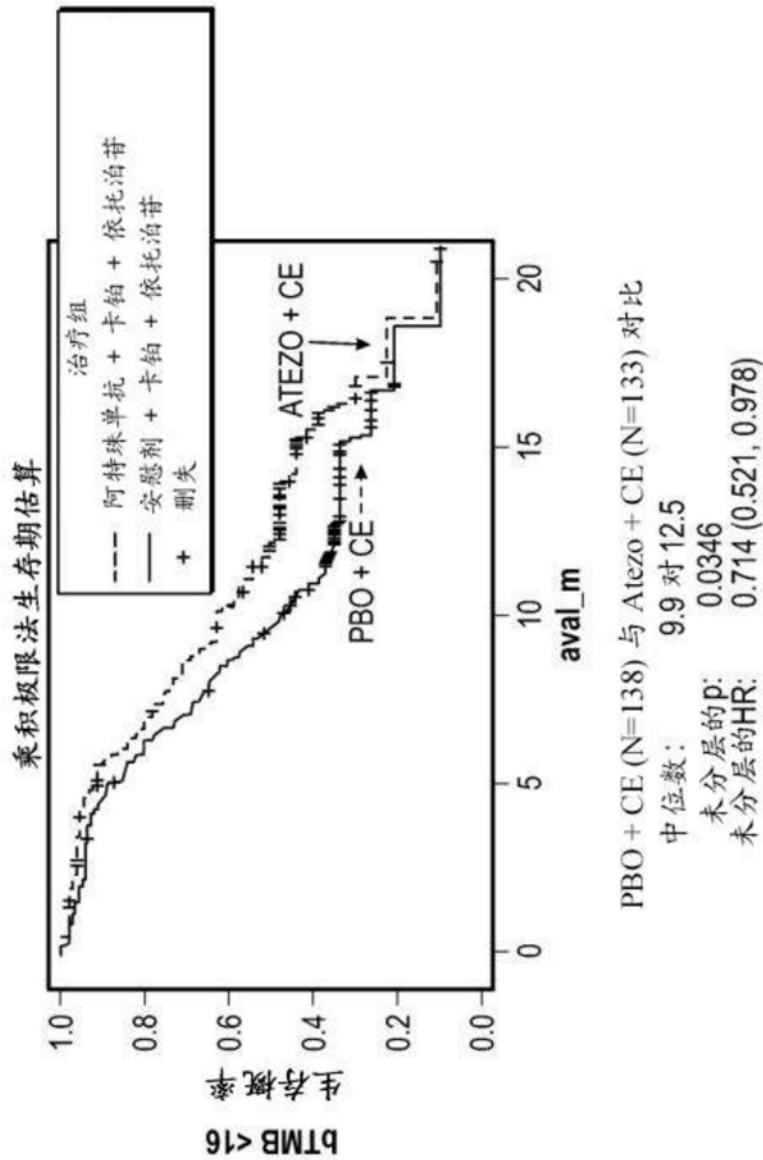


图7B

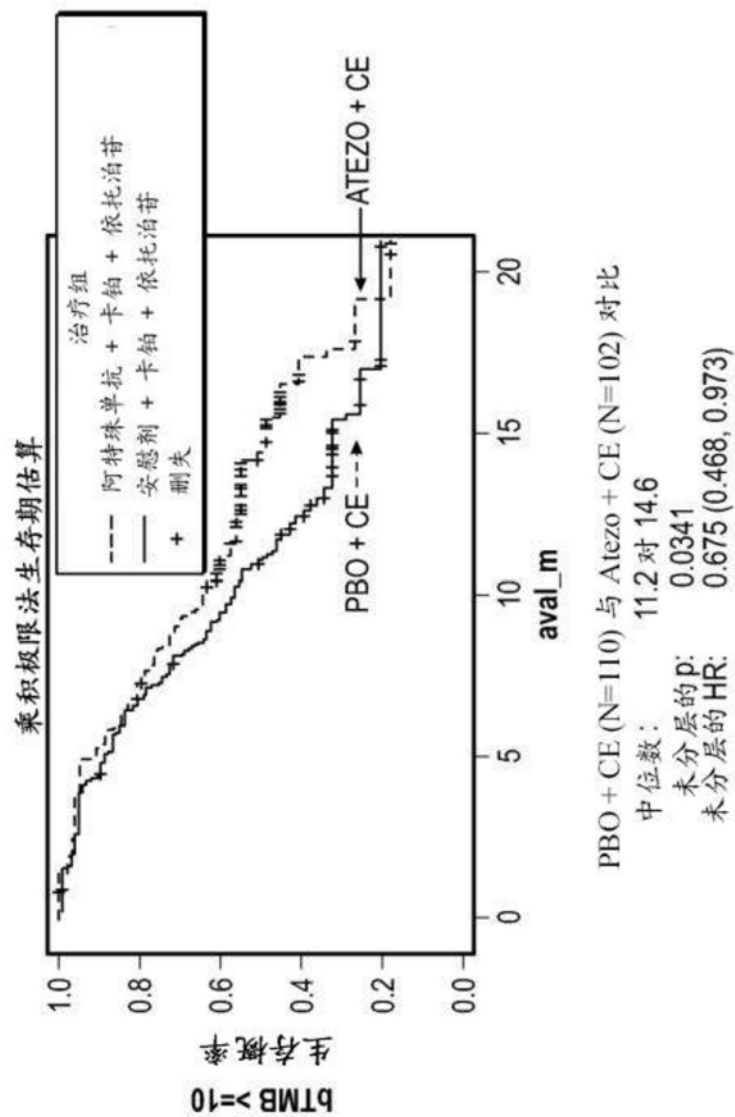


图8A

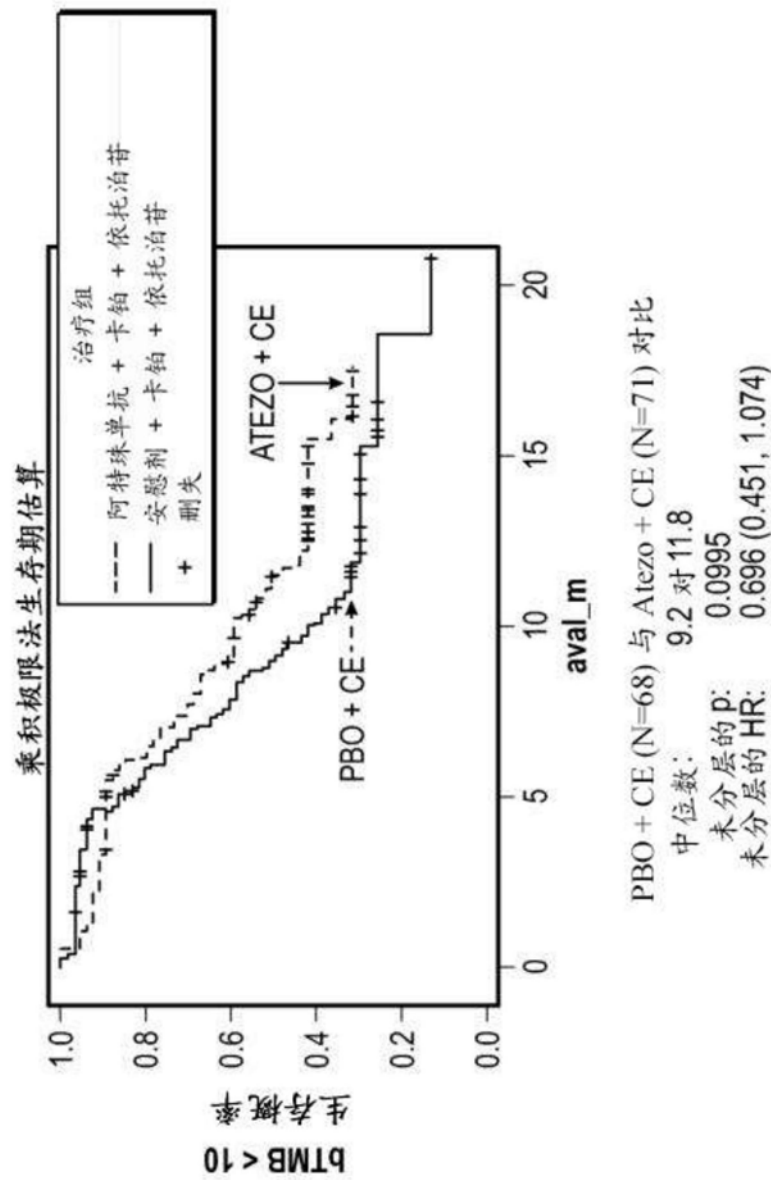


图8B

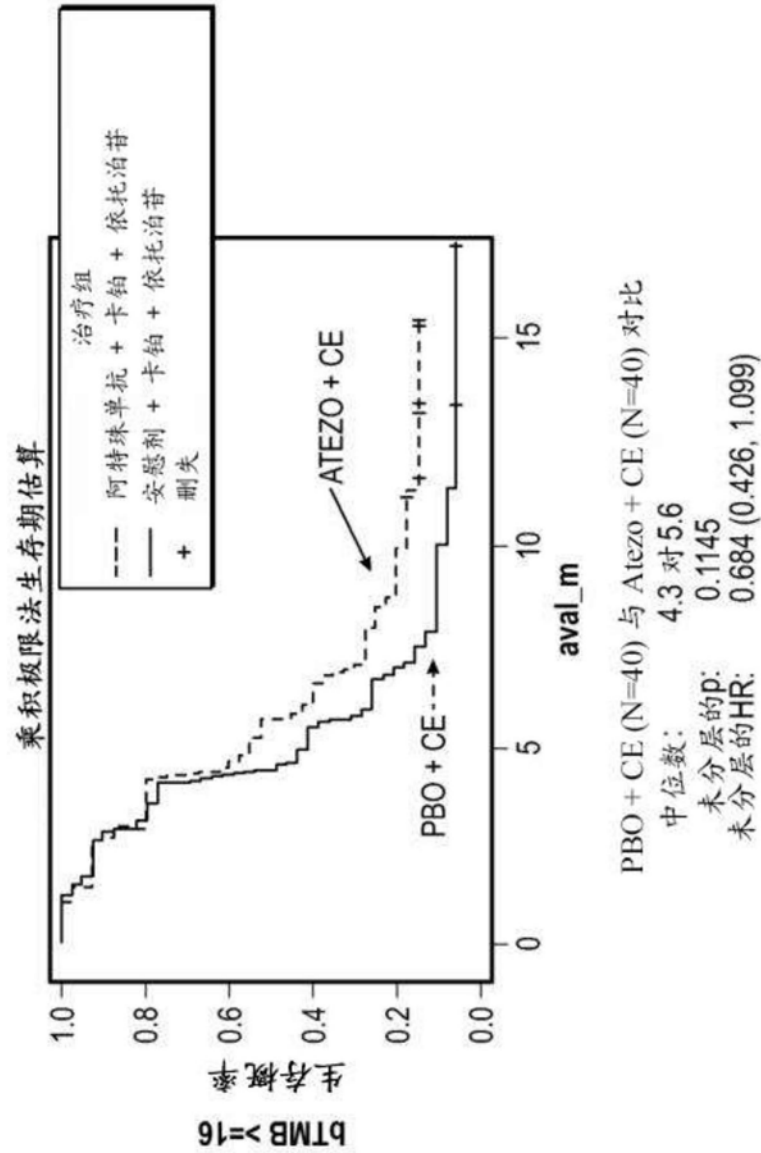


图9A

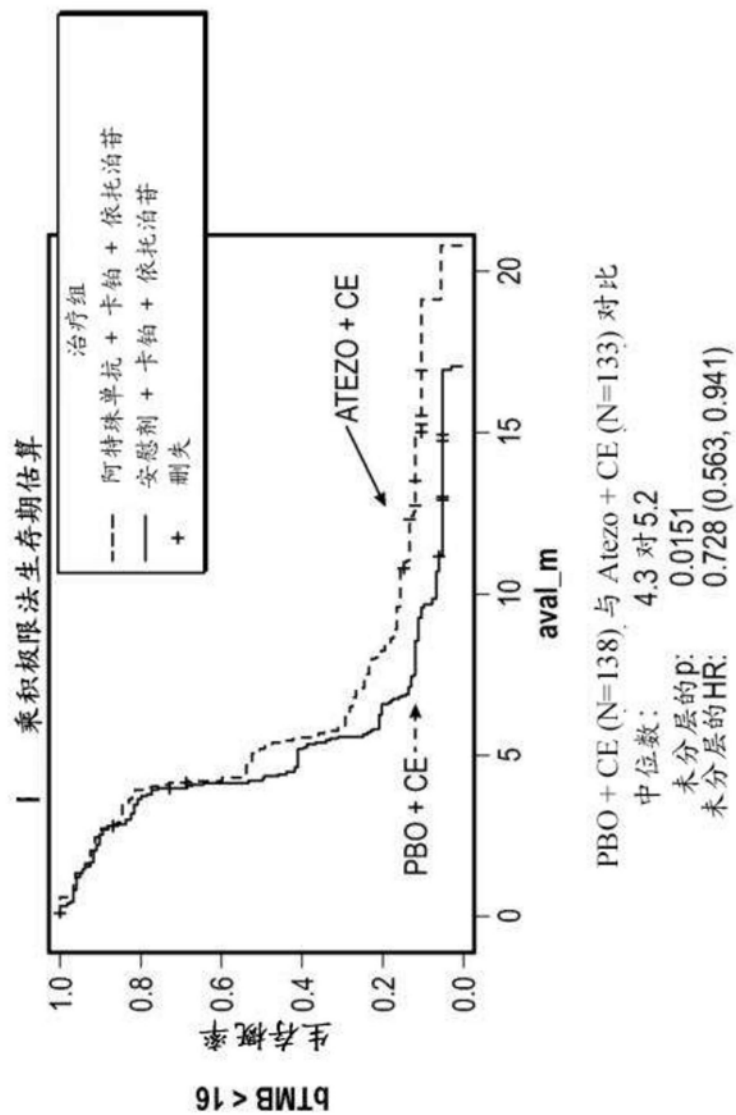


图9B

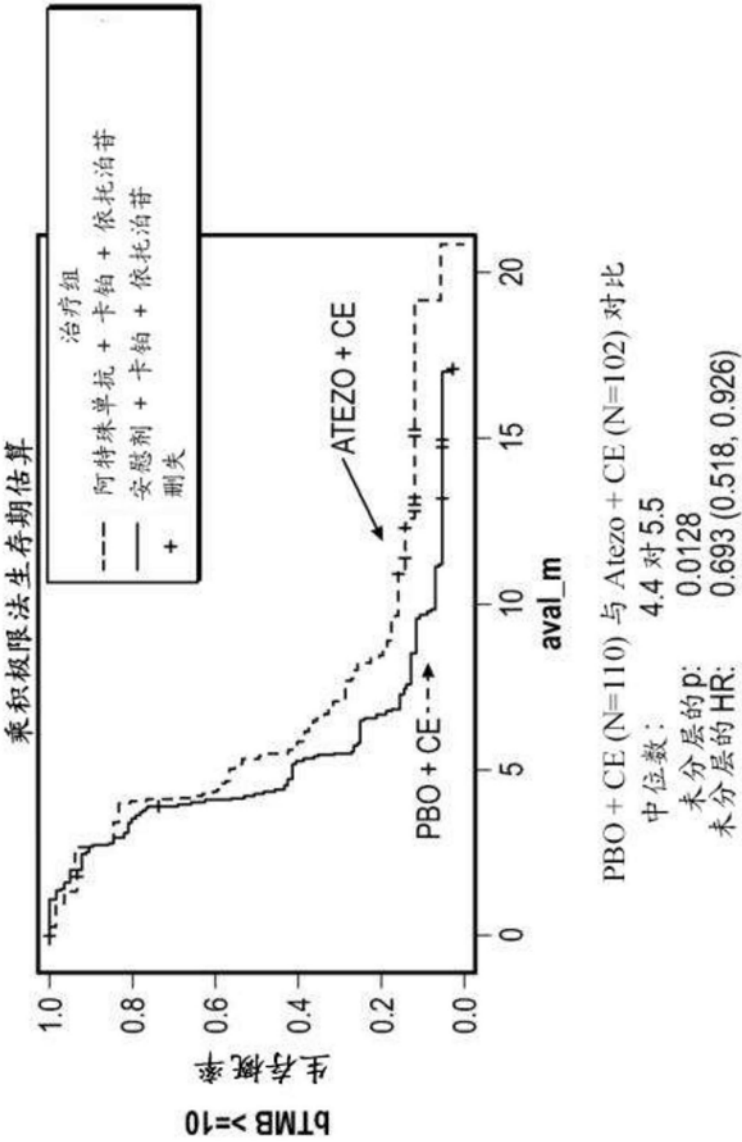


图10A

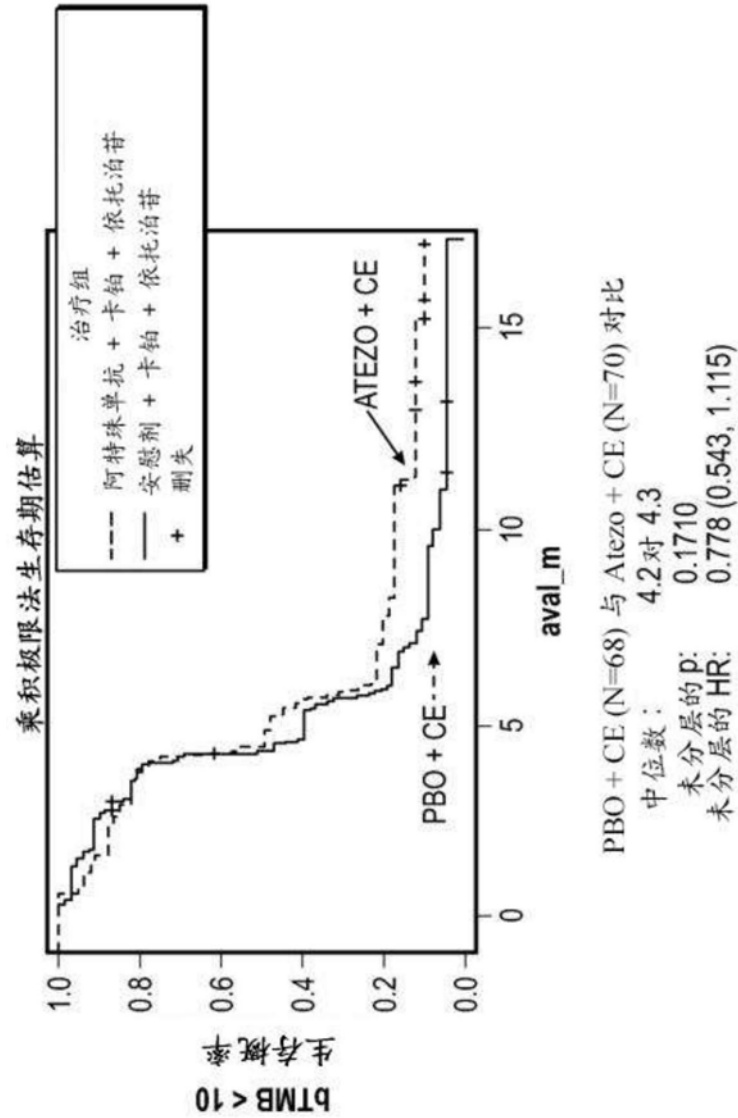


图10B

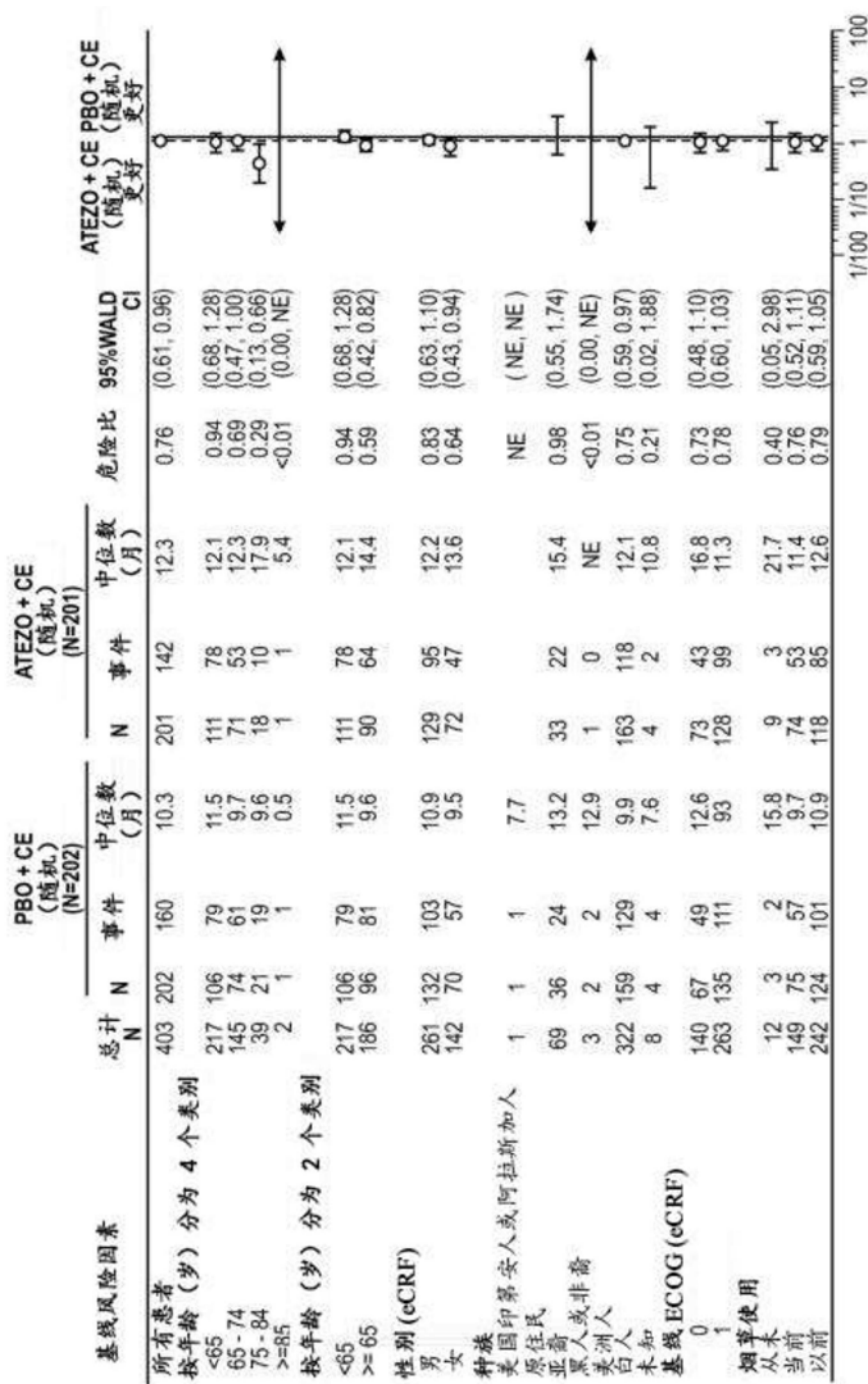


图11A

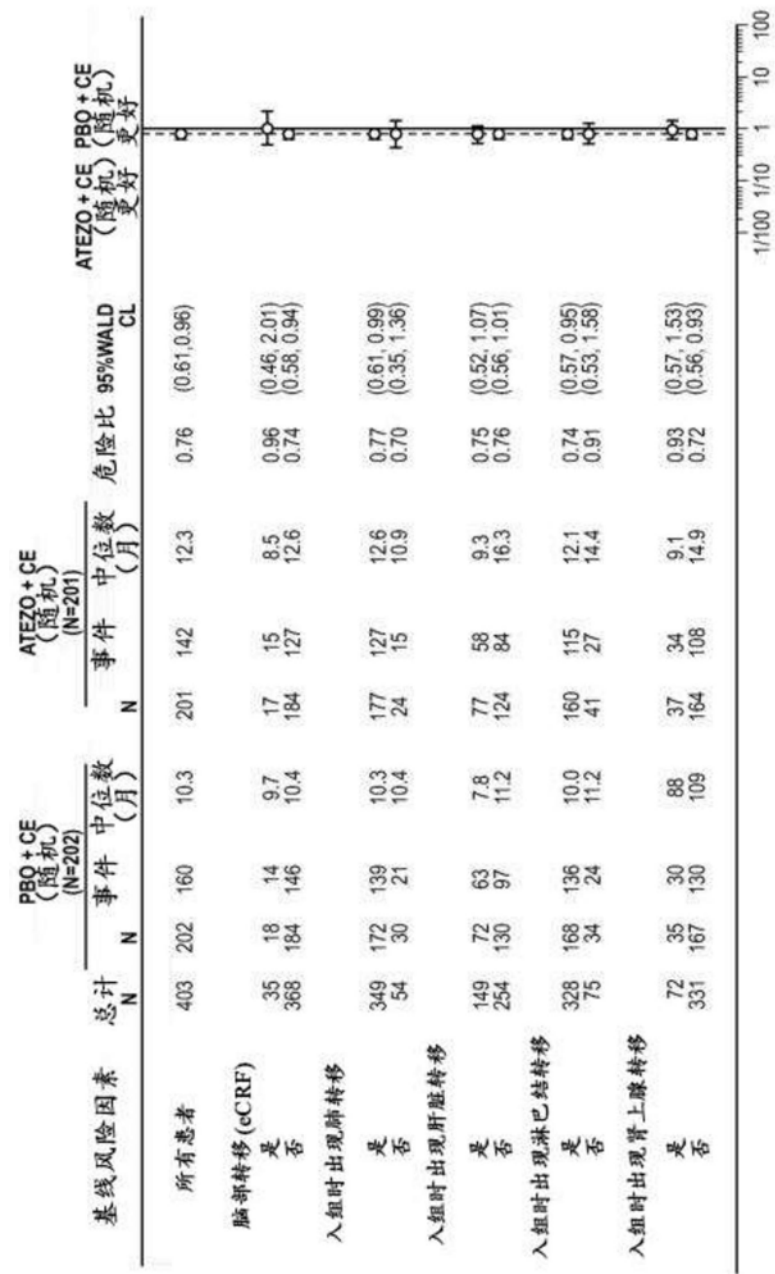


图11B

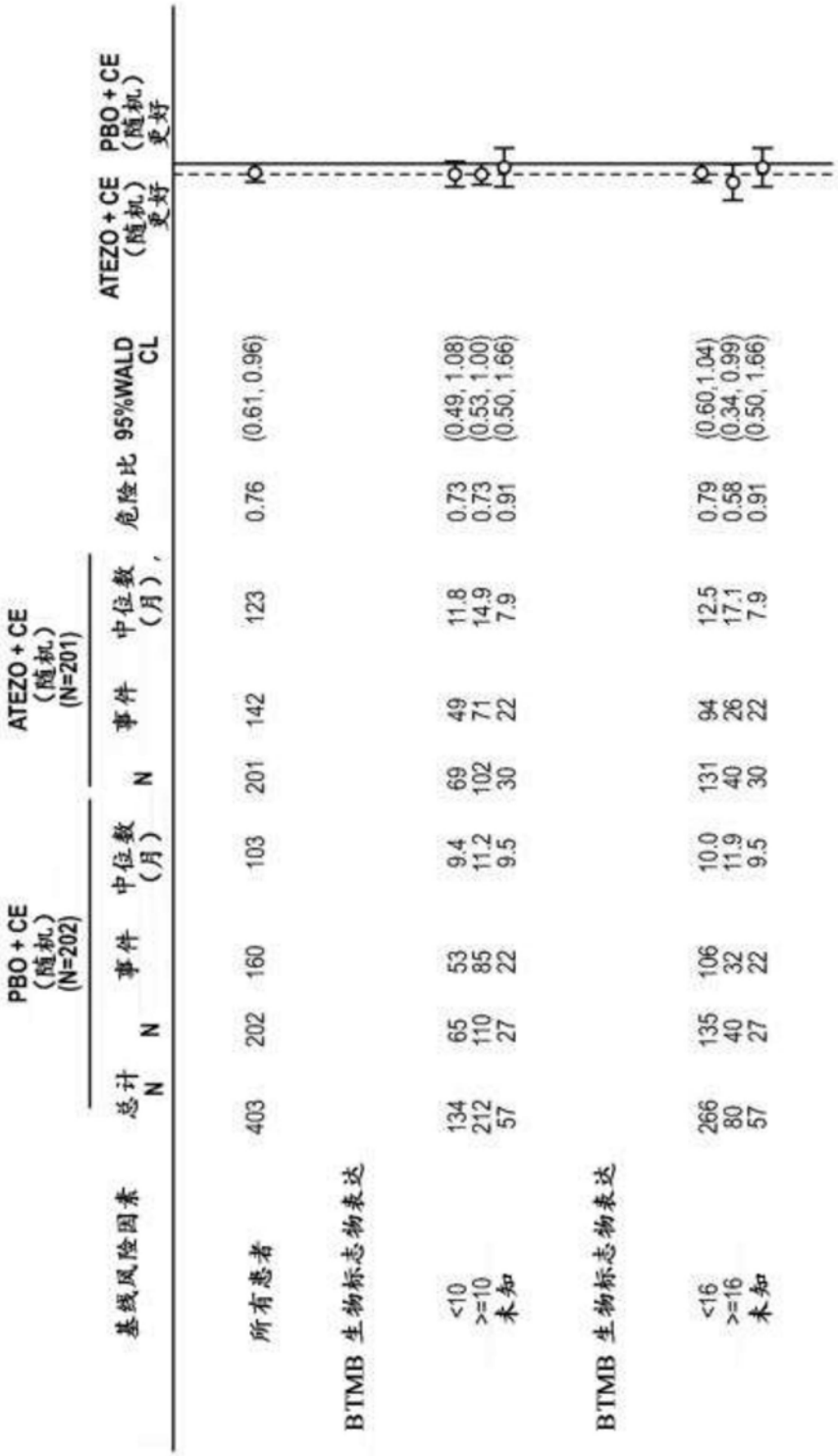


图11C

无进展生存期的分层分析 Kaplan-Meier 图，
PD-L1 状态 <1%、年龄差 ≤1 岁的意向治疗患者
方案：GO30081（数据剪切：24APR2018）

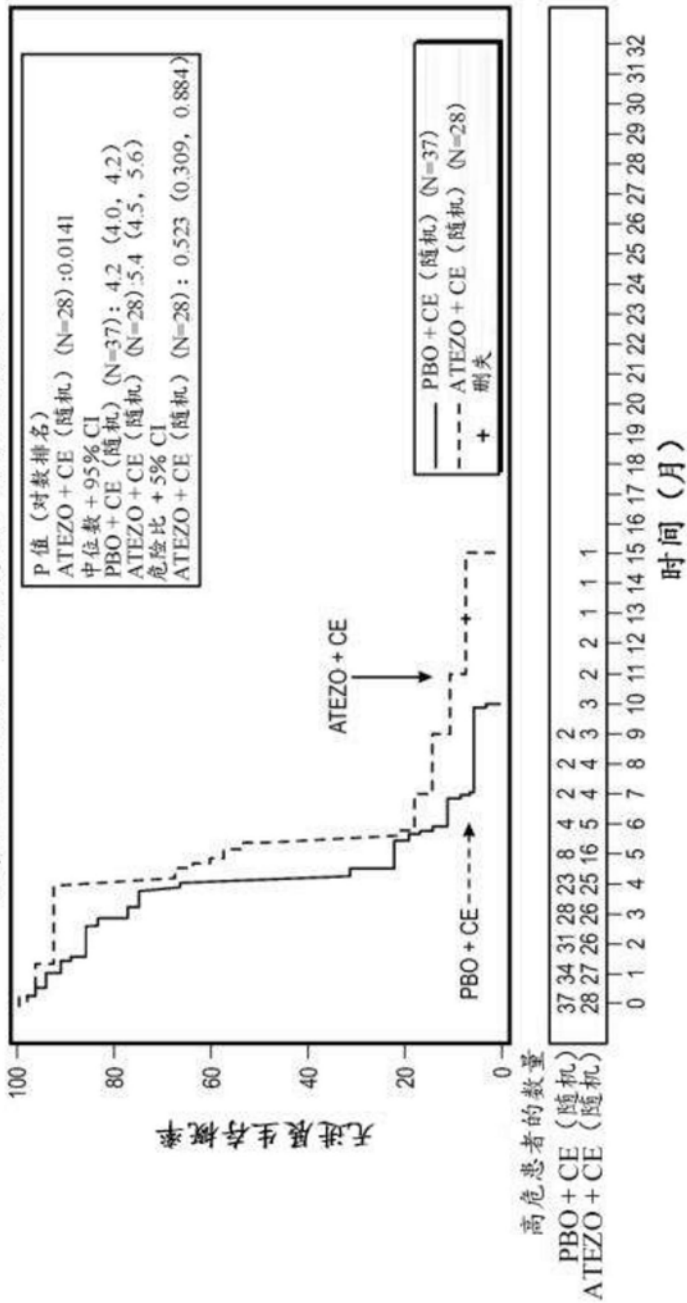


图12A

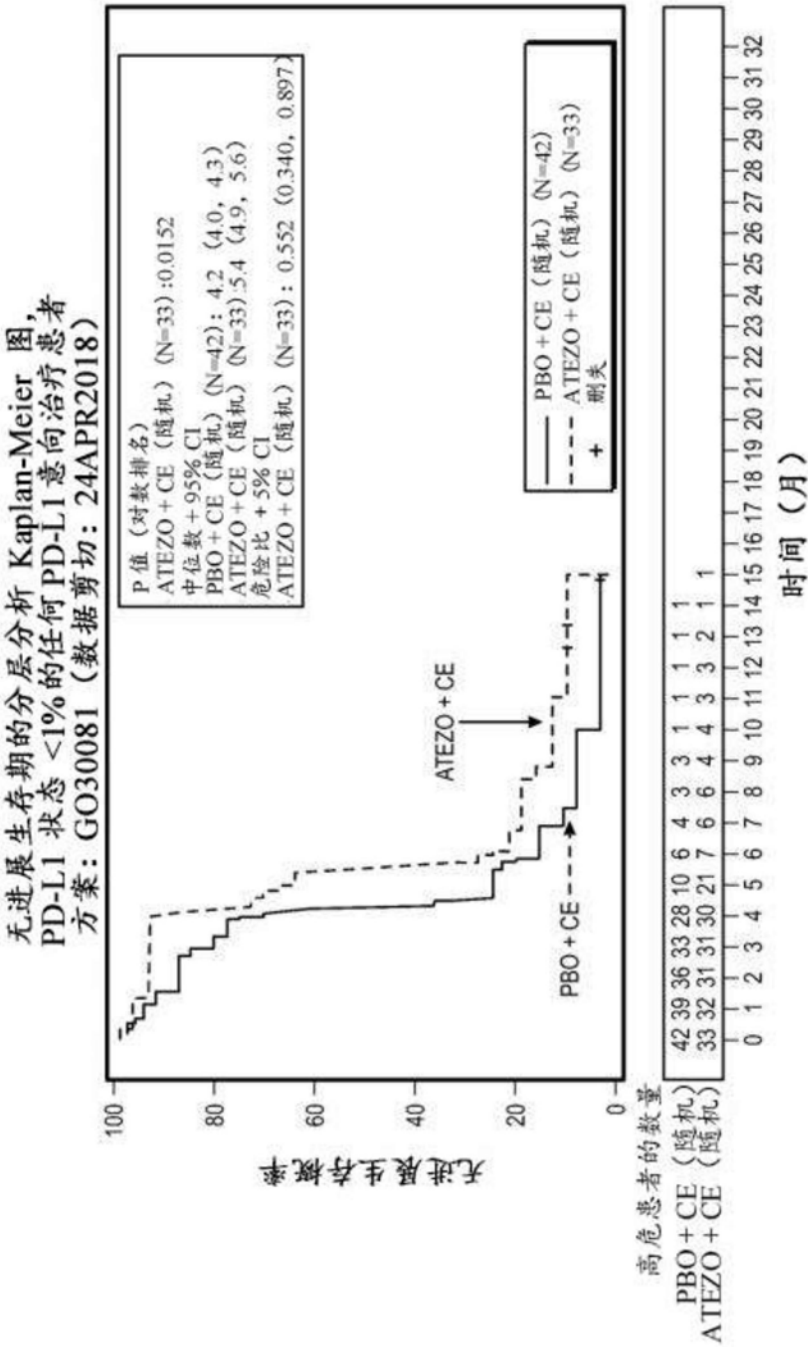


图12B

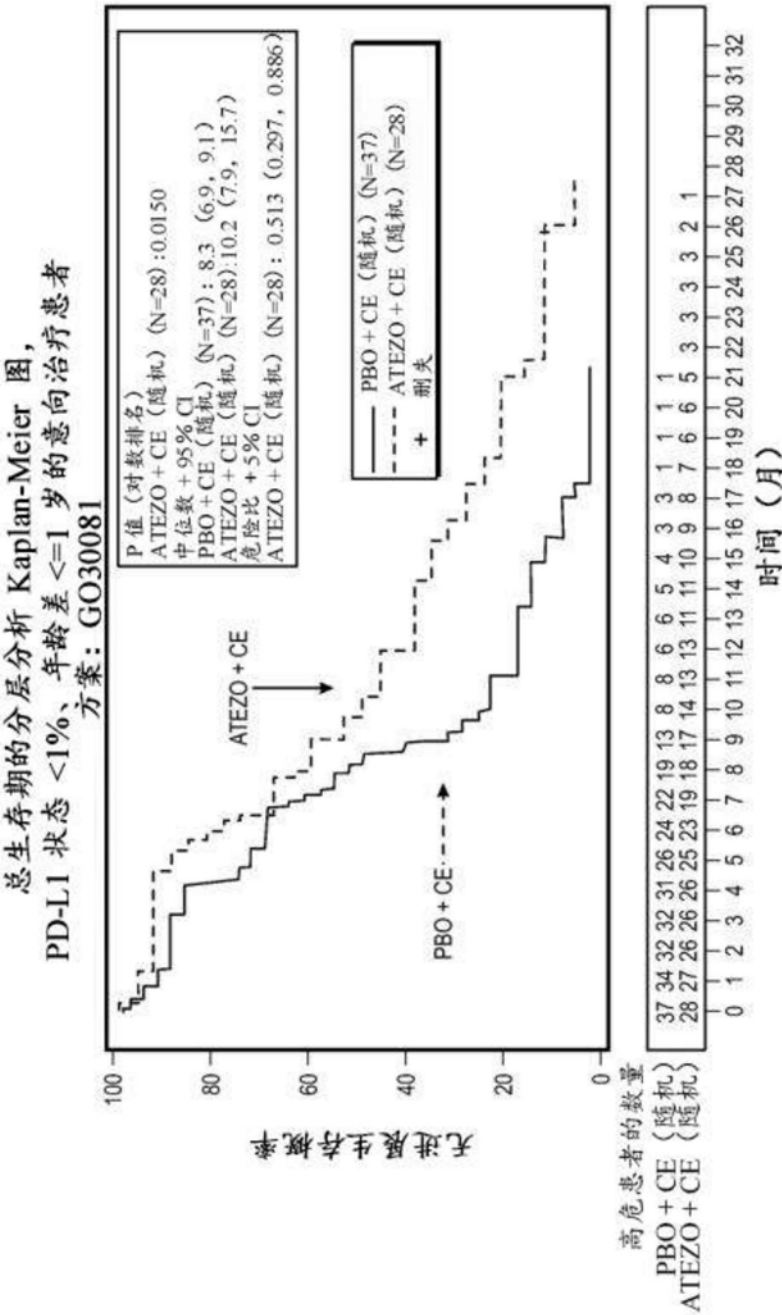


图13A

总生存期的分层分析 Kaplan-Meier 图，
PD-L1 状态 <1%的任何PD-L1意向治疗患者
方案：GO30081

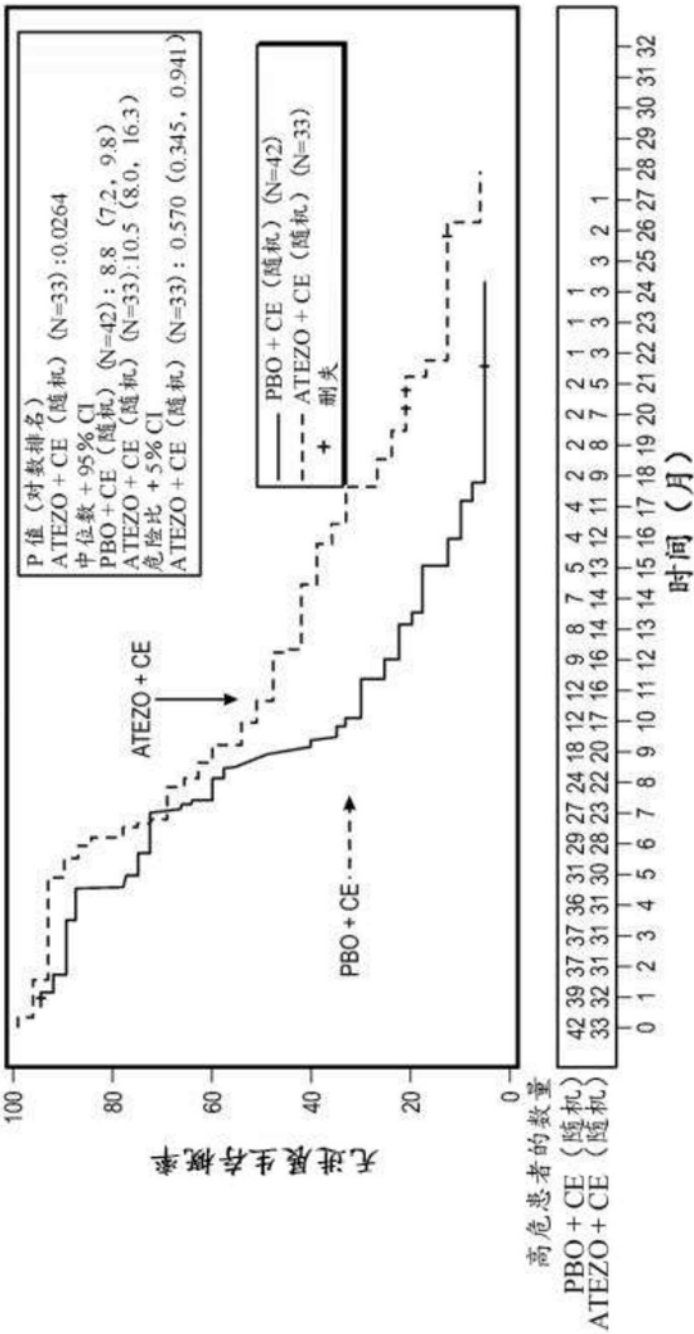


图13B