



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 105828837 B

(45) 授权公告日 2020.10.27

(21) 申请号 201480068837.8

(72) 发明人 J·金姆 J·张

(22) 申请日 2014.12.17

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 105828837 A

11247

(43) 申请公布日 2016.08.03

代理人 凌立 黄革生

(30) 优先权数据

61/917,264 2013.12.17 US

(51) Int.CI.

A61K 45/06 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

A61K 31/337 (2006.01)

2016.06.16

A61K 39/395 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

A61P 35/00 (2006.01)

PCT/US2014/070974 2014.12.17

A61P 37/04 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

C07K 16/28 (2006.01)

W02015/095404 EN 2015.06.25

(56) 对比文件

CN 102245640 A, 2011.11.16

(73) 专利权人 豪夫迈·罗氏有限公司

审查员 陈卫星

地址 瑞士巴塞尔

权利要求书4页 说明书62页

序列表14页 附图10页

(54) 发明名称

用PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷治疗癌症的方法

(57) 摘要

本发明提供用于在患有癌症的个体中治疗癌症和增强免疫功能的方法和组合物。该方法包括施用PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷。

1. PD-L1结合拮抗剂在制备用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的药物中的用途，其中PD-L1结合拮抗剂与紫杉烷和卡铂一起施用，其中紫杉烷是纳米清蛋白结合紫杉醇或紫杉醇，并且其中所述PD-L1结合拮抗剂是抗体。

2. 权利要求1的用途，其中PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与PD-1的结合。

3. 权利要求1的用途，其中PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与B7-1的结合。

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

5. 权利要求1-4中任一项的用途，其中抗体选自MPDL3280A、MDX-1105和MEDI4736。

6. 权利要求1-4中任一项的用途，其中抗体包含含有HVR-H1序列SEQ ID NO:19、HVR-H2序列SEQ ID NO:20和HVR-H3序列SEQ ID NO:21的重链，及含有HVR-L1序列SEQ ID NO:22、HVR-L2序列SEQ ID NO:23和HVR-L3序列SEQ ID NO:24的轻链。

7. 权利要求1-4中任一项的用途，其中抗体包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:25的重链可变区和含有氨基酸序列SEQ ID NO:4的轻链可变区。

8. 权利要求1-4中任一项的用途，其中癌症是肺癌、膀胱癌、乳腺癌、肾细胞癌、黑素瘤、结肠癌、直肠癌、卵巢癌或血癌。

9. 权利要求8的用途，其中癌症是肺癌。

10. 权利要求9的用途，其中肺癌是非小细胞肺癌。

11. 权利要求10的用途，其中非小细胞肺癌是非鳞状非小细胞肺癌。

12. 权利要求10的用途，其中非小细胞肺癌是鳞状非小细胞肺癌。

13. 权利要求8的用途，其中癌症是卵巢癌。

14. 权利要求1-4中任一项的用途，其中个体患有癌症或诊断患有癌症。

15. 权利要求14的用途，其中个体中的癌细胞表达PD-L1。

16. 权利要求1-4中任一项的用途，其中治疗在所述个体中产生应答。

17. 权利要求16的用途，其中反应是完全应答。

18. 权利要求16的用途，其中反应是停止所述治疗后的持续应答。

19. 权利要求1-4中任一项的用途，其中紫杉烷和/或卡铂在所述PD-L1结合拮抗剂之前、与所述PD-L1结合拮抗剂同时或在所述PD-L1结合拮抗剂之后施用。

20. 权利要求19的用途，其中紫杉烷和/或卡铂在所述PD-L1结合拮抗剂之前施用。

21. 权利要求19的用途，其中紫杉烷和/或卡铂与所述PD-L1结合拮抗剂同时施用。

22. 权利要求19的用途，其中紫杉烷和/或卡铂在所述PD-L1结合拮抗剂之后施用。

23. 权利要求1-4中任一项的用途，其中紫杉烷是纳米清蛋白结合紫杉醇。

24. 权利要求1-4中任一项的用途，其中紫杉烷是紫杉醇。

25. PD-L1结合拮抗剂在制备用于在患有癌症的个体中增强免疫功能的药物中的用途，其中PD-L1结合拮抗剂与紫杉烷和卡铂组合施用，其中紫杉烷是纳米清蛋白结合紫杉醇或紫杉醇，并且其中所述PD-L1结合拮抗剂是抗体。

26. 权利要求25的用途，其中相对于施用所述PD-L1结合拮抗剂、紫杉烷和/或卡铂之前，个体中的CD8+T细胞具有增强的引发、激活、增殖和/或溶细胞活性。

27. 权利要求25的用途，其中CD8+T细胞的数目相对于施用所述组合之前提高。

28. 权利要求27的用途，其中CD8+T细胞是抗原特异性CD8+T细胞。

29. 权利要求25的用途，其中Treg功能相对于施用所述组合之前受到抑制。

30. 权利要求25的用途,其中T细胞衰竭相对于施用所述组合之前减少。
31. 权利要求25-30中任一项的用途,其中PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与PD-1的结合。
32. 权利要求25-30中任一项的用途,其中PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与B7-1的结合。
33. 权利要求25-30中任一项的用途,其中PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与PD-1和B7-1二者的结合。
34. 权利要求25-30中任一项的用途,其中抗体选自MPDL3280A、MDX-1105和MEDI4736。
35. 权利要求25-30中任一项的用途,其中抗体包含含有HVR-H1序列SEQ ID NO:19、HVR-H2序列SEQ ID NO:20和HVR-H3序列SEQ ID NO:21的重链,及含有HVR-L1序列SEQ ID NO:22、HVR-L2序列SEQ ID NO:23和HVR-L3序列SEQ ID NO:24的轻链。
36. 权利要求25-30中任一项的用途,其中抗体包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:25的重链可变区和含有氨基酸序列SEQ ID NO:4的轻链可变区。
37. 权利要求25-30中任一项的用途,其中癌症是肺癌、膀胱癌、乳腺癌、肾细胞癌、黑素瘤、结肠癌、直肠癌、卵巢癌或血癌。
38. 权利要求37的用途,其中癌症是肺癌。
39. 权利要求38的用途,其中肺癌是非小细胞肺癌。
40. 权利要求39的用途,其中非小细胞肺癌是非鳞状非小细胞肺癌。
41. 权利要求39的用途,其中非小细胞肺癌是鳞状非小细胞肺癌。
42. 权利要求37的用途,其中癌症是卵巢癌。
43. 权利要求25-30中任一项的用途,其中个体中的癌细胞表达PD-L1。
44. 权利要求25-30中任一项的用途,其中紫杉烷是纳米清蛋白结合紫杉醇。
45. 权利要求25-30中任一项的用途,其中紫杉烷是紫杉醇。
46. 权利要求1-4和25-30中任一项的用途,其中PD-L1结合拮抗剂、紫杉烷和/或卡铂静脉内、肌内、皮下、局部、口服、经皮、腹腔内、眼眶内、通过植入、通过吸入、鞘内、心室内或鼻内施用。
47. 权利要求1-4和25-30中任一项的用途,其中药物进一步与血管发生抑制剂组合施用。
48. 权利要求47的用途,其中血管发生抑制剂是抗VEGF抗体。
49. 权利要求48的用途,其中抗VEGF抗体是贝伐单抗。
50. PD-L1结合拮抗剂的用途,用于制备用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的药物,其中药物包含PD-L1结合拮抗剂和可药用载体,其中所述PD-L1结合拮抗剂是抗体,且其中治疗包括施用所述药物与(i)包含紫杉烷和可药用载体的组合物的组合,其中紫杉烷是纳米清蛋白结合紫杉醇或紫杉醇;和(ii)包含卡铂和可药用载体的组合物的组合。
51. 紫杉烷的用途,用于制备用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的药物,其中药物包含紫杉烷和可药用载体,其中紫杉烷是纳米清蛋白结合紫杉醇或紫杉醇,且其中治疗包括施用所述药物与(i)包含PD-L1结合拮抗剂和可药用载体的组合物的组合,其中所述PD-L1结合拮抗剂是抗体;和(ii)包含卡铂和可药用载体的组合物的组合。
52. 权利要求50或51的用途,其中紫杉烷是纳米清蛋白结合紫杉醇。
53. 权利要求50或51的用途,其中紫杉烷是紫杉醇。
54. 权利要求50或51的用途,其中癌症是肺癌、膀胱癌、乳腺癌、肾细胞癌、黑素瘤、结肠

癌、直肠癌、卵巢癌或血癌。

55. 权利要求54的用途,其中癌症是肺癌。
56. 权利要求55的用途,其中肺癌是非小细胞肺癌。
57. 权利要求56的用途,其中非小细胞肺癌是非鳞状非小细胞肺癌。
58. 权利要求56的用途,其中非小细胞肺癌是鳞状非小细胞肺癌。
59. 权利要求54的用途,其中癌症是卵巢癌。
60. 权利要求50或51的用途,其中药物与包含血管发生抑制剂和可药用载体的组合物组合施用。
 61. 权利要求60的用途,其中所述血管发生抑制剂是抗VEGF抗体。
 62. 权利要求61的用途,其中抗VEGF抗体是贝伐单抗。
 63. 包含PD-L1结合拮抗剂、紫杉烷和卡铂的组合物,用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展,其中紫杉烷是纳米清蛋白结合紫杉醇或紫杉醇,并且其中所述PD-L1结合拮抗剂是抗体。
 64. 权利要求63的组合物,进一步包含可药用载体。
 65. 权利要求63或64的组合物在制备用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的药物中的用途。
 66. 权利要求63或64的组合物,其中紫杉烷是纳米清蛋白结合紫杉醇。
 67. 权利要求63或64的组合物,其中紫杉烷是紫杉醇。
 68. 权利要求63或64的组合物,其中癌症是肺癌、膀胱癌、乳腺癌、肾细胞癌、黑素瘤、结肠癌、直肠癌、卵巢癌或血癌。
 69. 权利要求68的组合物,其中癌症是肺癌。
 70. 权利要求69的组合物,其中肺癌是非小细胞肺癌。
 71. 权利要求70的组合物,其中非小细胞肺癌是非鳞状非小细胞肺癌。
 72. 权利要求70的组合物,其中非小细胞肺癌是鳞状非小细胞肺癌。
 73. 权利要求68的组合物,其中癌症是卵巢癌。
 74. 权利要求63或64的组合物,还包含血管发生抑制剂。
 75. 权利要求74的组合物,其中所述血管发生抑制剂是抗VEGF抗体。
 76. 权利要求75的组合物,其中抗VEGF抗体是贝伐单抗。
 77. 药盒,其包含含有PD-L1结合拮抗剂的第一药物,含有紫杉烷的第二药物,及包含卡铂的第三药物,其中紫杉烷是纳米清蛋白结合紫杉醇或紫杉醇,并且其中所述PD-L1结合拮抗剂是抗体。
 78. 权利要求77的药盒,其中药盒进一步包含含有施用所述第一药物、所述第二药物和所述第三药物来在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的说明的包装说明书。
 79. 权利要求77或78的药盒,其中所述第一药物、所述第二药物或所述第三药物还包含可药用载体。
 80. 抗PD-L1抗体在制备用于治疗个体非小细胞肺癌或延迟个体非小细胞肺癌进展的药物中的用途,其中所述抗PD-L1抗体包含含有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区,并且其中所述抗PD-L1抗体与紫杉烷和卡铂组合施用,其中紫杉烷是纳米清蛋白结合紫杉醇或紫杉醇,并且其中非小细胞肺癌是非

鳞状非小细胞肺癌或鳞状非小细胞肺癌。

81. 权利要求80的用途,其中非小细胞肺癌是非鳞状非小细胞肺癌,紫杉烷是纳米清蛋白结合紫杉醇。

82. 权利要求80的用途,其中非小细胞肺癌是鳞状非小细胞肺癌。

83. 抗PD-L1抗体在制备用于治疗个体非小细胞肺癌或延迟个体非小细胞肺癌进展的药物中的用途,其中所述抗PD-L1抗体包含含有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区,并且其中抗PD-L1抗体与紫杉烷、卡铂和贝伐单抗组合施用,其中紫杉烷是纳米清蛋白结合紫杉醇或紫杉醇,并且其中非小细胞肺癌是非鳞状非小细胞肺癌。

84. 权利要求83的用途,其中紫杉烷是紫杉醇。

85. 抗PD-L1抗体在制备用于治疗个体卵巢癌或延迟个体卵巢癌进展的药物中的用途,其中所述抗PD-L1抗体包含含有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的轻链可变区,其中抗PD-L1抗体与紫杉烷、卡铂和贝伐单抗组合施用,并且其中紫杉烷是纳米清蛋白结合紫杉醇或紫杉醇。

86. 如权利要求85所述的用途,其中紫杉烷是紫杉醇。

87. 权利要求80-86中任一项的用途,其中所述抗PD-L1抗体包含含有氨基酸SEQ ID NO:32的重链和含有氨基酸序列SEQ ID NO:33的轻链。

88. 权利要求80-86中任一项的用途,其中所述抗PD-L1抗体以每三周1200mg的剂量静脉内施用。

用PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷治疗癌症的方法

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2013年12月17日提交的美国临时申请号61/917,264的优先权。

技术领域

[0003] 本发明涉及通过施用PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷(taxane)来在患有癌症的个体中治疗癌症和增强免疫功能的方法。

背景技术

[0004] 向T细胞提供两种不同信号是抗原呈递细胞(APC)对静息T淋巴细胞进行淋巴细胞激活的广为接受的模型。此模型进一步提供了自身与非自身和免疫耐受的区别。初级信号或抗原特异性信号在识别在主要组织相容性复合体(MHC)背景中呈递的外来抗原肽之后通过T细胞受体(TCR)转导。次级信号或共刺激信号由表达在APC上的共刺激分子传递至T细胞，并诱导T细胞促进克隆扩充、细胞因子分泌和效应子功能。在缺乏共刺激的情况下，T细胞可变得耐受抗原刺激，其导致对外来抗原或内源抗原的致耐受性反应。

[0005] 在两信号模型中，T细胞收到正和负次级共刺激信号二者。这类正和负信号的调节对最大化宿主保护性免疫反应同时维持免疫耐受和防止自身免疫至关重要。负次级信号对诱导T细胞耐受似乎是必要的，而正信号促进T细胞激活。虽然简单的两信号模型仍为幼稚淋巴细胞提供了有效解释，但宿主免疫反应是动态过程，共刺激信号也可以提供给抗原暴露的T细胞。

[0006] 共刺激的机制具有治疗意义，因为共刺激信号的操作提供了增强或终止细胞免疫反应的手段。T细胞功能异常或无反应性与抑制性受体(程序性死亡1多肽(PD-1)，其结合包括PD-L1和PD-L2的配体)的诱导和持续表达同时发生。PD-L1在许多癌症中过量表达，且通常与预后差相关。与正常组织中的T淋巴细胞和外周血T淋巴细胞不同，绝大多数肿瘤浸润T淋巴细胞显著表达PD-1，表明肿瘤反应性T细胞上PD-1的上调可以促成抗肿瘤免疫反应受损。这可以是由于利用了由表达PD-L1的肿瘤细胞与表达PD-1的T细胞相互作用介导的PD-L1信号发放，导致T细胞激活减弱和免疫监视逃避。因此，抑制PD-L1/PD-1相互作用可以增强CD8+T细胞介导的肿瘤杀伤。

[0007] 最佳治疗处理可以将PD-1受体/配体相互作用的阻断与直接抑制肿瘤生长的物质(agent)组合。仍存在对这种用于治疗、稳定、预防和/或延迟多种癌症的发展的最佳治疗的需要。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明涉及通过施用PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷来在患有癌症的个体中治疗癌症和增强免疫功能的方法。

[0010] 在一方面，本发明涉及用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的方法，其包括对该个体施用有效量的人PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷。在一些实施方案中，该PD-1轴结合拮抗剂选自PD-1结合拮抗剂、PD-L1结合拮抗剂和PD-L2结合拮抗剂。

[0011] 在以上方面的一些实施方案中,该PD-1轴结合拮抗剂是PD-1结合拮抗剂。在一些实施方案中,该PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与其配体结合配偶体的结合。在一些实施方案中,该PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD-L1的结合。在一些实施方案中,该PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD-L2的结合。在一些实施方案中,该PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD-L1和PD-L2二者的结合。在一些实施方案中,该PD-1结合拮抗剂是抗体。在一些实施方案中,该PD-1结合拮抗剂选自MDX-1106 (nivolumab)、MK-3475 (lambrolizumab)、CT-011 (pidilizumab) 和AMP-224。

[0012] 在以上方面的其他实施方案中,该PD-1轴结合拮抗剂是PD-L1结合拮抗剂。在一些实施方案中,该PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与PD-1的结合。在一些实施方案中,该PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与B7-1的结合。在一些实施方案中,该PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与PD-1和B7-1二者的结合。在一些实施方案中,该PD-L1结合拮抗剂是抗体。在一些实施方案中,该抗体选自YW243.55.S70、MPDL3280A、MDX-1105和MEDI4736。在一些实施方案中,该抗体包含含有HVR-H1序列SEQ ID NO:19、HVR-H2序列SEQ ID NO:20和HVR-H3序列SEQ ID NO:21的重链,及含有HVR-L1序列SEQ ID NO:22、HVR-L2序列SEQ ID NO:23和HVR-L3序列SEQ ID NO:24的轻链。在一些实施方案中,该抗体包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:26的重链可变区和含有氨基酸序列SEQ ID NO:4的轻链可变区。

[0013] 在以上方面的一些实施方案中,该PD-1轴结合拮抗剂是PD-L2结合拮抗剂。在一些实施方案中,该PD-L2结合拮抗剂是抗体。在一些实施方案中,该PD-L2结合拮抗剂是免疫黏附素。

[0014] 在以上方面的任意前述实施方案中,该癌症可以是但不限于:乳腺癌(包括三阴乳腺癌(TNBC))、膀胱癌(包括膀胱上皮性膀胱癌(UBC)、肌层浸润性膀胱癌和BCG难治性非肌层浸润性膀胱癌)、结肠直肠癌、直肠癌、肺癌(包括非小细胞肺癌,其可为鳞状或非鳞状)、成胶质细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、肾细胞癌(包括肾细胞癌)、前列腺癌、肝癌、胰腺癌、软组织肉瘤、卡波西肉瘤、类癌(carcinoid carcinoma)、头颈癌、胃癌、食管癌、前列腺癌、子宫内膜癌、肾癌、卵巢癌、间皮瘤和血癌(heme malignancy)(包括骨髓增生异常综合征(MDS)和多发性骨髓瘤)。在具体实施方案中,该癌症可以是肺癌(包括非小细胞肺癌,其可为鳞状或非鳞状)、膀胱癌(包括UBC)、乳腺癌(包括TNBC)、肾细胞癌、黑素瘤、结肠直肠癌和血癌(包括骨髓增生异常综合征(MDS)和多发性骨髓瘤)。在一些实施方案中,该肺癌是非小细胞肺癌,其可为鳞状或非鳞状。在一些实施方案中,该膀胱癌是UBC。在一些实施方案中,该乳腺癌是TNBC。在一些实施方案中,该血癌是MDS或多发性骨髓瘤。

[0015] 在以上方面的任意前述实施方案中,该个体患有癌症或诊断患有癌症。在一些实施方案中,该个体中的癌细胞表达PD-L1。

[0016] 在以上方面的任意前述实施方案中,该治疗可以在该个体中产生应答。在一些实施方案中,该反应是完全应答。在一些实施方案中,该反应是停止治疗后的持续应答。在一些实施方案中,该反应是停止治疗后仍持续的完全应答。

[0017] 在以上方面的任意前述实施方案中,该紫杉烷在该PD-1轴结合拮抗剂之前、与该PD-1轴结合拮抗剂同时或在该PD-1轴结合拮抗剂之后施用。在一些实施方案中,该紫杉烷是纳米清蛋白结合紫杉醇(nab-paclitaxel) (**ABRAXANE®**)、紫杉醇(paclitaxel)或多西紫杉醇(docetaxel)。在一些实施方案中,该紫杉烷是纳米清蛋白结合紫杉醇

(ABRAXANE®)。在一些实施方案中,该紫杉烷是紫杉醇。

[0018] 在另一方面,本发明涉及在患有癌症的个体中增强免疫功能的方法,该方法包括施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷。在一些实施方案中,该个体中的CD8+T细胞相对于施用PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷之前具有增强的引发、激活、增殖和/或溶细胞活性。在一些实施方案中,CD8+T细胞的数目相对于施用该组合之前提高。在一些实施方案中,该CD8+T细胞是抗原特异性CD8+T细胞。在一些实施方案中,Treg功能相对于施用该组合之前受抑制。在一些实施方案中,T细胞衰竭相对于施用该组合之前减少。在一些实施方案中,该PD-1轴结合拮抗剂选自PD-1结合拮抗剂、PD-L1结合拮抗剂和PD-L2结合拮抗剂。

[0019] 在以上方面的一些实施方案中,该PD-1轴结合拮抗剂是PD-1结合拮抗剂。在一些实施方案中,该PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与其配体结合配偶体的结合。在一些实施方案中,该PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD-L1的结合。在一些实施方案中,该PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD-L2的结合。在一些实施方案中,该PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD-L1和PD-L2二者的结合。在一些实施方案中,该PD-1结合拮抗剂是抗体。在一些实施方案中,该PD-1结合拮抗剂选自MDX-1106 (nivolumab)、MK-3475 (lambrolizumab)、CT-011 (pidilizumab) 和AMP-224。

[0020] 在以上方面的其他实施方案中,该PD-1轴结合拮抗剂是PD-L1结合拮抗剂。在一些实施方案中,该PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与PD-1的结合。在一些实施方案中,该PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与B7-1的结合。在一些实施方案中,该PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与PD-1和B7-1二者的结合。在一些实施方案中,该PD-L1结合拮抗剂是抗体。在一些实施方案中,该抗体选自YW243.55.S70、MPDL3280A、MDX-1105和MEDI4736。在一些实施方案中,该抗体包含含有HVR-H1序列SEQ ID NO:19、HVR-H2序列SEQ ID NO:20和HVR-H3序列SEQ ID NO:21的重链,及含有HVR-L1序列SEQ ID NO:22、HVR-L2序列SEQ ID NO:23和HVR-L3序列SEQ ID NO:24的轻链。在一些实施方案中,该抗体包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:26的重链可变区和含有氨基酸序列SEQ ID NO:4的轻链可变区。

[0021] 在以上方面的一些实施方案中,该PD-1轴结合拮抗剂是PD-L2结合拮抗剂。在一些实施方案中,该PD-L2结合拮抗剂是抗体。在一些实施方案中,该PD-L2结合拮抗剂是免疫黏附素。

[0022] 在以上方面的任意前述实施方案中,该癌症可以是乳腺癌(包括三阴乳腺癌(TNBC))、膀胱癌(包括膀胱上皮性膀胱癌(UBC)、肌层浸润性膀胱癌和BCG难治性非肌层浸润性膀胱癌)、结肠直肠癌、直肠癌、肺癌(包括非小细胞肺癌,其可为鳞状或非鳞状)、成胶质细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、肾细胞癌(包括肾细胞瘤)、前列腺癌、肝癌、胰腺癌、软组织肉瘤、卡波西肉瘤、类癌、头颈癌、胃癌、食管癌、前列腺癌、子宫内膜癌、肾癌、卵巢癌、间皮瘤和血癌(包括骨髓增生异常综合征和多发性骨髓瘤)。在具体实施方案中,该癌症可以是肺癌(包括非小细胞肺癌,其可为鳞状或非鳞状)、膀胱癌(包括UBC)、乳腺癌(包括TNBC)、肾细胞瘤、黑素瘤、结肠直肠癌和血癌(例如骨髓增生异常综合征(MDS)和多发性骨髓瘤)。在一些实施方案中,该肺癌是非小细胞肺癌,其可为鳞状或非鳞状。在一些实施方案中,该膀胱癌是UBC。在一些实施方案中,该乳腺癌是TNBC。在一些实施方案中,该血癌是MDS或多发性骨髓瘤。

[0023] 在一些实施方案中,该个体中的癌细胞表达PD-L1。在一些实施方案中,该紫杉烷

是纳米清蛋白结合紫杉醇(**ABRAXANE®**)、紫杉醇或多西紫杉醇。在一些实施方案中，该紫杉烷是纳米清蛋白结合紫杉醇(**ABRAXANE®**)。在一些实施方案中，该紫杉烷是紫杉醇。

[0024] 在以上方面中任一个的一些实施方案中，该PD-1轴结合拮抗剂和/或该紫杉烷静脉内、肌内、皮下、局部、口服、经皮、腹腔内、眼眶内、通过植入、通过吸入、鞘内、心室内或鼻内施用。

[0025] 在以上方面中任一个的一些实施方案中，该方法可以进一步包括施用有效量的化疗剂。在一些实施方案中，该化疗剂是基于铂的化疗剂。在一些实施方案中，该基于铂的化疗剂是卡铂(carboplatin)。

[0026] 在另一方面，本发明涉及人PD-1轴结合拮抗剂在制备用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的药物中的用途，其中该药物包含人PD-1轴结合拮抗剂和可选的可药用载体，其中该治疗包括施用该药物与包含紫杉烷和可选的可药用载体的组合物的组合。

[0027] 在另一方面，本发明涉及紫杉烷在制备用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的药物中的用途，其中该药物包含紫杉烷和可选的可药用载体，其中该治疗包括施用该药物与包含人PD-1轴结合拮抗剂和可选的可药用载体的组合物的组合。

[0028] 在另一方面，本发明涉及用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的包含人PD-1轴结合拮抗剂和可选的可药用载体的组合物，其中该治疗包括施用该组合物与第二组合物的组合，其中该第二组合物包含紫杉烷和可选的可药用载体。

[0029] 在另一方面，本发明涉及用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的包含紫杉烷和可选的可药用载体的组合物，其中该治疗包括施用该组合物与第二组合物的组合，其中该第二组合物包含人PD-1轴结合拮抗剂和可选的可药用载体。

[0030] 在另一方面，本发明涉及药盒，该药盒包含含有PD-1轴结合拮抗剂和可选的可药用载体的药物及包装说明书，该包装说明书包含与含有紫杉烷和可选的可药用载体的组合物组合施用该药物来在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的说明。

[0031] 在另一方面，本发明涉及药盒，该药盒包含含有PD-1轴结合拮抗剂和可选的可药用载体的第一药物，及含有紫杉烷和可选的可药用载体的第二药物。在一些实施方案中，该药盒进一步包含包装说明书，该包装说明书含有施用该第一药物和该第二药物来在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的说明。

[0032] 在另一方面，本发明涉及药盒，该药盒包含含有紫杉烷和可选的可药用载体的药物及包装说明书，该包装说明书包含与含有PD-1轴结合拮抗剂和可选的可药用载体的组合物组合施用该药物来在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的说明。

[0033] 在前述方面的任一个中，该PD-1轴结合拮抗剂选自PD-1结合拮抗剂、PD-L1结合拮抗剂和PD-L2结合拮抗剂。在一些实施方案中，该PD-1轴结合拮抗剂是PD-1结合拮抗剂。在一些实施方案中，该PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与其配体结合配偶体的结合。在一些实施方案中，该PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD-L1的结合。在一些实施方案中，该PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD-L2的结合。在一些实施方案中，该PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD-L1和PD-L2二者的结合。在一些实施方案中，该PD-1结合拮抗剂是抗体。在一些实施方案中，该PD-1结合拮抗剂选自MDX-1106(nivolumab)、MK-3475(lambrolizumab)、CT-011(pidilizumab)和

AMP-224。在一些实施方案中，该PD-1轴结合拮抗剂是PD-L1结合拮抗剂。在一些实施方案中，该PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与PD-1的结合。在一些实施方案中，该PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与B7-1的结合。在一些实施方案中，该PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与PD-1和B7-1二者的结合。在一些实施方案中，该PD-L1结合拮抗剂是抗体。在一些实施方案中，该抗体选自YW243.55.S70、MPDL3280A、MDX-1105和MEDI4736。在一些实施方案中，该抗体包含含有HVR-H1序列SEQ ID NO:19、HVR-H2序列SEQ ID NO:20和HVR-H3序列SEQ ID NO:21的重链，及含有HVR-L1序列SEQ ID NO:22、HVR-L2序列SEQ ID NO:23和HVR-L3序列SEQ ID NO:24的轻链。在一些实施方案中，该抗体包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:26的重链可变区和含有氨基酸序列SEQ ID NO:4的轻链可变区。

[0034] 在前述方面的任一个中，该紫杉烷可以是纳米清蛋白结合紫杉醇(**ABRAXANE®**)、紫杉醇或多西紫杉醇。在一些实施方案中，该紫杉烷是纳米清蛋白结合紫杉醇(**ABRAXANE®**)。在一些实施方案中，该紫杉烷是紫杉醇。

[0035] 应理解，本文所述多种实施方案的一种、一些或全部特性可以组合形成本发明的其他实施方案。本发明的这些及其他方面对本领域技术人员而言将变得显而易见。通过以下发明详述进一步描述本发明的这些及其他实施方案。

[0036] 附图简述

[0037] 图1是图表，显示与对照抗体或紫杉醇+卡铂单独相比，抗PD-L1抗体和紫杉醇+卡铂的联合治疗在C57BL/6小鼠同基因MC38结肠直肠肿瘤模型中显示协同抗肿瘤作用。图表显示各处理组肿瘤体积的三次样条拟合作为时间的函数。三次样条拟合是选择拟合每个处理组的所有数据的最佳平滑曲线的数学算法。用单剂腹腔内(IP)注射的80mg/kg卡铂加静脉内(IV)注射的10mg/kg紫杉醇和每周给药3次给药3周的10mg/kg抗gp120抗体或抗PD-L1(克隆25A1.mIgG2a.DANA)处理已建立了约100-200mm³的皮下MC38肿瘤的小鼠。N=10只小鼠/组。

[0038] 图2A和2B是图表，显示地塞米松(dexamethasone)(Dex)废除抗PD-L1抗体(α PD-L1)单一治疗在C57BL/6小鼠同基因MC38结肠直肠肿瘤模型中的功效。图2A显示各处理组肿瘤体积的三次样条拟合，而图2B显示单只小鼠的曲线(Trellis曲线)(黑色曲线显示各处理组肿瘤体积的三次样条拟合)。图2B中的各图表包含代表对照组的三次样条拟合的虚线。对于图2B，约300mm³处的水平虚线是进展体积的参考(2x起始肿瘤体积)。低于32mm³(在图2B中表示为水平虚线)的肿瘤体积可见，但太小而不能准确测量。用单剂盐水或4mg/kg IV的地塞米松处理已建立了约100-200mm³的皮下MC38肿瘤的小鼠，12小时后，用每周给药3次给药3周的10mg/kg IP对照抗gp120抗体或抗PD-L1(克隆25A1.mIgG2a.DANA)处理。N=10只小鼠/组。

[0039] 图3是图表，显示地塞米松抑制OTI过继T细胞转移和接种模型中的抗原特异性T细胞反应。从OTI Thy1.1小鼠纯化CD8+T细胞，并按 2.5×10^6 细胞/小鼠IV注射。次日用250ng与全长卵清蛋白融合的抗DEC205加单剂盐水或4mg/kg IV地塞米松接种受体小鼠。两天后，对小鼠实施安乐死，通过流式细胞术计数来自脾脏的总OTI CD8+细胞。N=5只小鼠/组，每个符号代表单只小鼠。通过双尾非配对t检验计算P值。

[0040] 图4A和4B是图表，显示抗PD-L1抗体和纳米清蛋白结合紫杉醇(

ABRAXANE®, Abx) +卡铂 (Carbo) 的联合治疗在C57BL/6小鼠同基因MC38结肠直肠肿瘤模型中产生强协同抗肿瘤作用,并达到持续大于90天的持续完全应答(4/8小鼠)。图表显示肿瘤体积作为时间的函数。图4A显示各处理组肿瘤体积的三次样条拟合,而图4B显示单只小鼠的Tre11is曲线(黑色曲线显示各处理组肿瘤体积的三次样条拟合)。图4B中的各图表包含代表对照组的三次样条拟合的虚线。对于图4B,约600mm³处的水平虚线是进展体积参考(2x起始肿瘤体积)。低于32mm³(在图4B中表示为水平虚线)的肿瘤体积可见,但大小而不能准确测量。按所示,用每周给药3次给药3周的IP注射施用的10mg/kg抗gp120对照抗体或抗PD-L1抗体(克隆YW243.55.S70mIgG2a.DANA),加每周给药一次给药三周的盐水或75mg/kg IP卡铂,加每周给药一次给药三周的15mg/kg iv **ABRAXANE®**,处理已建立了约300mm³的皮下MC38肿瘤的小鼠。N=8只小鼠/组。

[0041] 图5A和5B是图表,显示之前用抗PD-L1抗体和纳米清蛋白结合紫杉醇(**ABRAXANE®**)+卡铂处理治愈MC38原发性肿瘤(图1A中所述的达到完全应答的小鼠)的小鼠产生抗肿瘤T细胞记忆反应。在用新的MC38肿瘤细胞进行二次再攻击时,肿瘤未能在100%(4/4)的已治愈小鼠中生长。图5A显示,二次攻击后7天收集的脾细胞具有与初次攻击的首次用于实验的小鼠相当的CD4+和CD8+T细胞数。图5B显示流式细胞术分析的结果,显示在用PMA加离子霉素体外刺激时,如通过胞内细胞因子染色所评估,与初次攻击的小鼠相比,来自已治愈小鼠的T细胞具有增强的干扰素-γ(IFN-γ)产生。误差棒表示n=5(首次攻击的小鼠)或n=4(已治愈的小鼠,二次攻击)的标准差,流式细胞术点阵图代表来自每个组的一只小鼠。通过双尾非配对t检验计算P值。

[0042] 图6A和6B是图表,显示来自测试抗PD-L1抗体(MPDL3280A)与紫杉烷和卡铂的联合治疗的有效性的1b期临床试验的结果。图6A是显示用MPDL3280A、纳米清蛋白结合紫杉醇(**ABRAXANE®**)和卡铂治疗后肿瘤大小随时间的变化的图表。客观反应率(ORR)为9/14名患者,有3名完全应答(CR)和6名部分反应(PR)。图6B是显示用MPDL3280A和紫杉醇+卡铂治疗后肿瘤大小随时间的变化的图表。ORR为2/6名患者(33%),有2名部分反应。

[0043] 发明详述

[0044] I. 定义

[0045] 在详细描述本发明之前,应理解,本发明不限于特定的组合物或生物系统,其当然可以变动。还应理解,本文所用的术语仅是为了描述具体实施方案的目的,并非旨在限制。

[0046] 除非清楚地另有说明,本说明书及所附权利要求中所用的单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数指代物。因此,例如,提到“一个分子”可选地包括两个或多个这类分子的组合,及其他类似情况。

[0047] 本文所用的术语“约”指本技术领域技术人员容易知道的该值通常的误差范围。本文提到“约”某个值或参数包括(和描述)了指向该值或参数本身的实施方案。

[0048] 应理解,本文所述的本发明的方面和实施方案包括“含有该方面和实施方案”、“由该方面和实施方案组成”及“基本由该方面和实施方案组成”。

[0049] 术语“PD-1轴结合拮抗剂”指这样的分子,该分子抑制PD-1轴结合配偶体与其一种或多种结合配偶体的相互作用,以去除由PD-1信号发放轴上的信号发放引起的T细胞功能异常——结果恢复或增强T细胞功能(例如增殖、细胞因子产生和/或靶细胞杀伤)。本文所

用的PD-1轴结合拮抗剂包括PD-1结合拮抗剂、PD-L1结合拮抗剂和PD-L2结合拮抗剂。

[0050] 术语“PD-1结合拮抗剂”指这样的分子，该分子减少、阻断、抑制、废除或干扰由PD-1与其一种或多种结合配偶体如PD-L1和/或PD-L2的相互作用引起的信号转导。在一些实施方案中，该PD-1结合拮抗剂是抑制PD-1与其一种或多种结合配偶体的结合的分子。在具体方面，该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、其抗原结合片段、免疫黏附素、融合蛋白质、寡肽及其他减少、阻断、抑制、废除或干扰由PD-1与PD-L1和/或PD-L2的相互作用引起的信号转导的分子。在一个实施方案中，PD-1结合拮抗剂减少由或通过表达在通过PD-1介导信号发放的T淋巴细胞上的细胞表面蛋白质介导的负共刺激信号，从而使功能异常的T细胞的功能异常程度减弱(例如增强对抗原识别的效应子反应)。在一些实施方案中，该PD-1结合拮抗剂是抗PD-1抗体。在具体方面，PD-1结合拮抗剂是本文所述MDX-1106 (nivolumab)。在另一具体方面，PD-1结合拮抗剂是本文所述MK-3475 (lambrolizumab)。在另一具体方面，PD-1结合拮抗剂是本文所述CT-011 (pidilizumab)。在另一具体方面，PD-1结合拮抗剂是本文所述AMP-224。

[0051] 术语“PD-L1结合拮抗剂”指这样的分子，该分子减少、阻断、抑制、废除或干扰由PD-L1与其一种或多种结合配偶体如PD-1和/或B7-1的相互作用引起的信号转导。在一些实施方案中，PD-L1结合拮抗剂是抑制PD-L1与其结合配偶体的结合的分子。在具体方面，该PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与PD-1和/或B7-1的结合。在一些实施方案中，该PD-L1结合拮抗剂包括抗PD-L1抗体、其抗原结合片段、免疫黏附素、融合蛋白质、寡肽及其他减少、阻断、抑制、废除或干扰由PD-L1与其一种或多种结合配偶体如PD-1和/或B7-1的相互作用引起的信号转导的分子。在一个实施方案中，PD-L1结合拮抗剂减少由或通过表达在通过PD-L1介导信号发放的T淋巴细胞上的细胞表面蛋白质介导的负共刺激信号，从而使功能异常的T细胞的功能异常程度减弱(例如增强对抗原识别的效应子反应)。在一些实施方案中，PD-L1结合拮抗剂是抗PD-L1抗体。在具体方面，抗PD-L1抗体是本文所述YW243.55.S70。在另一具体方面，抗PD-L1抗体是本文所述MDX-1105。还在另一具体方面，抗PD-L1抗体是本文所述MPDL3280A。还在另一具体方面，抗PD-L1抗体是本文所述MEDI4736。

[0052] 术语“PD-L2结合拮抗剂”指这样的分子，该分子减少、阻断、抑制、废除或干扰由PD-L2与其一种或多种结合配偶体如PD-1的相互作用引起的信号转导。在一些实施方案中，PD-L2结合拮抗剂是抑制PD-L2与其一种或多种结合配偶体的结合的分子。在具体方面，该PD-L2结合拮抗剂抑制PD-L2与PD-1的结合。在一些实施方案中，该PD-L2拮抗剂包括抗PD-L2抗体、其抗原结合片段、免疫黏附素、融合蛋白质、寡肽及其他减少、阻断、抑制、废除或干扰由PD-L2与其一种或多种结合配偶体如PD-1的相互作用引起的信号转导的分子。在一个实施方案中，PD-L2结合拮抗剂减少由或通过表达在通过PD-L2介导信号发放的T淋巴细胞上的细胞表面蛋白质介导的负共刺激信号，从而使功能异常的T细胞的功能异常程度减弱(例如增强对抗原识别的效应子反应)。在一些实施方案中，PD-L2结合拮抗剂是免疫黏附素。

[0053] 本文所用的“紫杉烷”是可以结合微管蛋白、促进微管组装和稳定化和/或防止微管解聚的双萜。本文中所包括的紫杉烷包括紫杉烷(taxoid) 10-脱乙酰基巴卡丁III和/或其衍生物。示例性紫杉烷包括但不限于紫杉醇(即 **TAXOL®**, CAS#33069-62-4)、多西紫杉醇(即 **TAXOTERE®**, CAS#114977-28-5)、larotaxel、cabazitaxel、milataxel、

tesetaxel和/或orataxel。在一些实施方案中,该紫杉烷是清蛋白包被的纳米颗粒(例如纳米清蛋白结合(nab)紫杉醇(即**ABRAXANE®**)和/或纳米清蛋白结合多西紫杉醇ABI-008)。在一些实施方案中,该紫杉烷是纳米清蛋白结合紫杉醇(**ABRAXANE®**)。在一些实施方案中,该紫杉烷配制在**CREMAPHOR®**中(例如**TAXOL®**)和/或吐温如聚山梨酸酯80中(例如**TAXOTERE®**)。在一些实施方案中,该紫杉烷是脂质体包封的紫杉烷。在一些实施方案中,该紫杉烷是紫杉烷的前体药物形式和/或缀合形式(例如DHA共价缀合至紫杉醇、聚谷紫杉醇和/或碳酸亚油醇酯紫杉醇)。在一些实施方案中,该紫杉醇配制为基本不含表面活性剂(例如,在缺乏CREMAPHOR和/或吐温的情况下,如**TOCOSOL®**紫杉醇)。

[0054] 免疫功能异常背景中的术语“功能异常”指对抗原刺激的免疫反应性降低。该术语包括“衰竭”和/或“无反应性”二者的共同要素,其中可以发生抗原识别,但随后的免疫反应对控制感染或肿瘤生长无效。

[0055] 本文所用的术语“功能异常的”还包括对抗原识别耐受或无反应,具体而言,将抗原识别转化为下游T细胞效应子功能如增殖、细胞因子产生(例如IL-2)和/或靶细胞杀伤的能力受损。

[0056] 术语“无反应性”指由通过T细胞受体传递的信号不全或不足(例如胞内Ca⁺²在缺乏ras激活的情况下增加)引起的对抗原刺激无反应性的状态。T细胞无反应性也可以在缺乏共刺激的情况下用抗原刺激产生,导致细胞甚至在共刺激的背景下耐受随后的抗原激活。无反应性状态通常可以通过白介素-2的存在来推翻。无反应性T细胞不进行克隆扩充和/或获得效应子功能。

[0057] 术语“衰竭”指产生自许多慢性感染和癌症期间发生的持续TCR信号发放的作为T细胞功能异常状态的T细胞衰竭。它与无反应性的区别在于,它不是通过不全或不足的信号发放产生,而是产生自持续信号发放。它定义为弱效应子功能、抑制性受体的持续表达和不同于功能性效应或记忆T细胞的转录状态。衰竭阻止了感染和肿瘤的最佳控制。衰竭可以由外在负调节途径(例如免疫调节细胞因子)以及细胞内在负调节(共刺激)途径(PD-1、B7-H3、B7-H4等)二者引起。

[0058] “增强T细胞功能”意指诱导、引起或刺激T细胞具有持续的或放大的生物学功能,或再生或再激活衰竭或失活的T细胞。增强T细胞功能的实例包括:相对于干预之前的这类水平增加来自CD8+T细胞的γ-干扰素分泌、增加增殖、提高抗原反应性(例如病毒、病原体或肿瘤清除)。在一个实施方案中,增强的水平为至少50%、备选地60%、70%、80%、90%、100%、120%、150%或200%增强。测量此增强的方式为本领域普通技术人员已知。

[0059] “T细胞功能异常性障碍”是表征为对抗原刺激的反应性降低的T细胞障碍或病症。在具体实施方案中,T细胞功能异常性障碍是与通过PD-1的信号发放的不适当增加明确相关的障碍。在另一实施方案中,T细胞功能异常性障碍是这样的障碍,其中T细胞无反应性或分泌细胞因子、增殖或发挥溶细胞活性的能力降低。在具体方面,反应性降低导致表达免疫原的病原体或肿瘤的无效控制。表征为T细胞功能异常的T细胞功能异常性障碍的实例包括未解决的急性感染、慢性感染和肿瘤免疫。

[0060] “肿瘤免疫”指肿瘤逃避免疫识别和清除的过程。因此,在减弱这种逃避且免疫系

统识别和攻击肿瘤时,肿瘤免疫得到“治疗”。肿瘤识别的实例包括肿瘤结合、肿瘤收缩和肿瘤清除。

[0061] “免疫原性”指具体物质引起免疫反应的能力。肿瘤具有免疫原性,增强肿瘤免疫原性帮助通过免疫反应清除肿瘤细胞。增强肿瘤免疫原性的实例包括用PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷治疗。

[0062] “持续应答”指停止治疗后对减少肿瘤生长的持续效应。例如,与施用期开始时的大小相比,肿瘤大小可以保持相同或更小。在一些实施方案中,持续应答具有至少与治疗持续时间相同、治疗持续时间长度的至少1.5X、2.0X、2.5X或3.0X的持续时间。

[0063] 本文所用的“减少或抑制癌症复发”意指减少或抑制肿瘤或癌症复发或肿瘤或癌症进展。如本文所公开,癌症复发和/或癌症进展包括但不限于癌症转移。

[0064] 本文所用的“完全应答”或“CR”指所有靶病灶的消失。

[0065] 本文所用的“部分反应”或“PR”指靶病灶的最长径总和(SLD)减少至少30%,取基线SLD作为参考。

[0066] 本文所用的“稳定疾病”或“SD”指靶病灶既未充分收缩至符合PR的条件,也未充分增加至符合PD的条件,取自治疗开始以来的最小SLD作为参考。

[0067] 本文所用的“进行性疾病”或“PD”指靶病灶的SLD增加至少20% (取自治疗开始以来记录到的最小SLD作为参考),或存在一个或多个新病灶。

[0068] 本文所用的“无进展存活期”(PFS)指治疗期间及之后所治疗的疾病(例如癌症)未恶化的时长。无进展存活期可以包括患者经历完全应答或部分反应的时间量,以及患者经历稳定疾病的时间量。

[0069] 本文所用的“总反应率”或“客观反应率”(ORR)指完全应答(CR)率和部分反应(PR)率的总和。

[0070] 本文所用的“总存活率”(OS)指一个组中可能在特定时期后存活的个体的百分比。

[0071] 术语“药物制剂”指这样的制备物,其处于这样的形式,使得活性成分的生物活性有效,且不包含对将要施用该制剂的个体具有不可接受的毒性的附加成分。“可药用”赋形剂(载体、添加剂)是可以合理地对个体哺乳动物施用以提供所利用的活性成分的有效剂量的那些。

[0072] 本文所用的术语“处理/治疗(treatment)”指设计用于改变所处理的个体或细胞在临床病理过程中的自然过程的临床干预。希望得到的处理作用包括减慢疾病进展速率、改善或缓和疾病状态及缓解或改善的预后。例如,如果与癌症相关的一种或多种症状缓和或消除,则个体得到成功“处理”,该症状缓和或消除包括但不限于减少癌细胞的增殖或(破坏癌细胞)、减少疾病引起的症状、提高患有疾病的个体的生活质量、减少治疗疾病所需的其他药物的剂量、和/或延长个体存活。

[0073] 本文所用的“延迟疾病的进展”意指推迟、阻碍、减缓、减慢、稳定和/或延缓疾病(如癌症)的发展。取决于所治疗的疾病和/或个体的历史,此延迟可以具有不同的时长。如对本领域技术人员而言显而易见,充分或显著的延迟实际上可以涵盖预防,因为个体不发展该疾病。例如,可以延迟晚期癌症,如转移的发展。

[0074] “有效量”至少是达到具体障碍的可测量的改善或预防所需的最小量。本文的有效量可以根据诸如疾病状态、年龄、性别、患者体重和药物在个体中引出希望得到的反应的能

力的因素而变。有效量还是其中治疗有益作用超过治疗的任何毒性作用或有害作用的量。对于预防用途,有益的或希望得到的结果包括诸如消除或降低风险、减轻严重度、或延迟疾病发病的结果,包括疾病的生物化学、组织学和/或行为症状、其并发症及疾病发展过程中存在的中间病理表型。对于治疗用途,有益的或希望得到的结果包括诸如减少疾病引起的一种或多种症状、提高患有疾病的个体的生活质量、减少治疗疾病所需的其他药物的剂量、增强另一药物的作用(如通过靶向)、延迟疾病的进展和/或延长存活的临床结果。在癌症或肿瘤的情况下,药物的有效量可以具有以下作用:减少癌细胞的数目、减少肿瘤大小、抑制(即在某种程度上减慢或希望阻止)癌细胞浸润入外周器官、抑制(即在某种程度上减慢或希望阻止)肿瘤转移、在某种程度上抑制肿瘤生长、和/或在某种程度上减轻与障碍相关的一种或多种症状。有效量可以在一次或多次施用中施用。为了本发明的目的,药物、化合物或药物组合物的有效量是足以直接或间接实现预防或治疗处理的量。如临床背景中所理解,药物、化合物或药物组合物的有效量可以与另一药物、化合物或药物组合物结合或不结合来达到。因此,在施用一种或多种治疗剂的背景中可以考虑“有效量”,如果与一种或多种其他治疗剂结合可以达到希望得到的结果,则可以考虑以有效量提供单一治疗剂。

[0075] 本文所用的“与…结合”指施用除另一种治疗方式外的一种治疗方式。因此,“与…结合”指在对个体施用另一治疗方式之前、期间或之后施用一种治疗方式。

[0076] “障碍”是可从治疗受益的任意病症,包括但不限于慢性和急性障碍或疾病,包括使哺乳动物易感所讨论的障碍的那些病理状态。

[0077] 术语“细胞增生性障碍”和“增生性障碍”指与某种程度的异常细胞增殖相关的障碍。在一个实施方案中,该细胞增生性障碍是癌症。在一个实施方案中,该细胞增生性障碍是肿瘤。

[0078] 本文所用的术语“肿瘤”指所有恶性的或良性的赘生性细胞生长和增殖,及所有癌变前细胞和组织及癌细胞和组织。本文提到的术语“癌症”、“癌性的”、“细胞增生性障碍”、“增生性障碍”和“肿瘤”不相互排斥。

[0079] 术语“癌症”和“癌性的”指或描述哺乳动物中通常表征为细胞生长失调的生理病症。癌症的实例包括但不限于癌、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤和白血病或恶性淋巴瘤。这类癌症更具体的实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、肺腺癌和肺鳞状细胞癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌(包括胃肠癌和胃肠间质癌)、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌(例如膀胱上皮性膀胱癌(UBC)、肌层浸润性膀胱癌(MIBC)和BCG难治性非肌层浸润性膀胱癌(NMIBC))、尿道癌、肝细胞瘤、乳腺癌(例如HER2+乳腺癌,及雌激素受体(ER-)、孕酮受体(PR-)和HER2(HER2-)阴性的三阴乳腺癌(TNBC))、结肠癌、直肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、涎腺癌、肾癌(例如肾细胞癌(RCC))、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌、肛门癌、阴茎癌、黑素瘤、浅表扩散性黑素瘤、恶性雀斑样痣黑素瘤、肢端雀斑样痣黑素瘤、结节性黑素瘤、多发性骨髓瘤,以及B细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL)、小淋巴细胞性(SL)NHL、中级/滤泡性NHL、中级弥漫性NHL、高级免疫母细胞性NHL、高级淋巴母细胞性NHL、高级小非裂细胞性NHL、巨块病性NHL、套细胞淋巴瘤、AIDS相关淋巴瘤和Waldenstrom巨球蛋白血症)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性髓性白血病(ALL)、acute myelogenous leukemia(AML)、多毛细胞白血病、慢性髓细胞性白血病(CML)、移植后淋巴增生性障碍(PTLD)、骨髓增生异常

综合征(MDS)、以及与瘢痕病相关的异常血管增生、水肿(如与脑肿瘤相关的水肿)、Meigs综合征、脑癌、以及头颈癌、及相关的转移。在某些实施方案中,可用本发明的方法和组合物治疗的癌症包括乳腺癌(例如三阴乳腺癌)、膀胱癌(例如UBC、MIBC和NMIBC)、结肠直肠癌、直肠癌、肺癌(例如非小细胞肺癌,其可为鳞状或非鳞状)、成胶质细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、肾细胞癌(例如RCC)、前列腺癌、肝癌、胰腺癌、软组织肉瘤、卡波西肉瘤、类癌、头颈癌、卵巢癌、间皮瘤和血癌(例如MDS和多发性骨髓瘤)。在一些实施方案中,该癌症选自:小细胞肺癌、成胶质细胞瘤、成神经细胞瘤、黑素瘤、乳腺癌、胃癌、结肠直肠癌(CRC)和肝细胞癌。在其他实施方案中,该癌症选自:非小细胞肺癌、结肠直肠癌、成胶质细胞瘤和乳腺癌,包括那些癌症的转移形式。在具体实施方案中,该癌症选自肺癌(例如非小细胞肺癌,其可为鳞状或非鳞状)、膀胱癌(例如UBC)、乳腺癌(例如TNBC)、RCC、黑素瘤、结肠直肠癌和血癌(例如MDS和多发性骨髓瘤)。在一些实施方案中,该肺癌是非小细胞肺癌,其可为鳞状或非鳞状。在一些实施方案中,该膀胱癌是UBC。在一些实施方案中,该乳腺癌是TNBC。在一些实施方案中,该血癌是MDS或多发性骨髓瘤。

[0080] 本文所用的术语“细胞毒剂”指对细胞有害(例如引起细胞死亡,抑制增殖,或以其他方式妨碍细胞功能)的任意物质。细胞毒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,如核溶解酶;毒素,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。示例性细胞毒剂可以选自抗微管剂、铂配位化合物、烷化剂、抗生素、拓扑异构酶II抑制剂、抗代谢物、拓扑异构酶I抑制剂、激素和激素类似物、信号转导途径抑制剂、非受体酪氨酸激酶血管发生抑制剂、免疫治疗剂、促凋亡剂、LDH-A抑制剂、脂肪酸生物合成抑制剂、细胞周期信号发放抑制、HDAC抑制剂蛋白酶体抑制剂和癌症代谢抑制剂。在一个实施方案中,该细胞毒剂是基于铂的化疗剂。在一个实施方案中,该细胞毒剂是EGFR的拮抗剂。在一个实施方案中,该细胞毒剂是N-(3-乙炔基苯基)-6,7-双(2-甲氧基乙氧基)喹唑啉-4-胺(例如埃罗替尼(erlotinib),TARCEVATM)。在一个实施方案中,该细胞毒剂是RAF抑制剂。在一个实施方案中,该RAF抑制剂是BRAF和/或CRAF抑制剂。在一个实施方案中,该RAF抑制剂是vemurafenib。在一个实施方案中,该细胞毒剂是PI3K抑制剂。

[0081] 本文所用的术语“化疗剂”包括用于治疗癌症的化合物。化疗剂的实例包括:埃罗替尼(**TARCEVA®**,Genentech/OSI Pharm.)、硼替佐米(bortezomib)(**VELCADE®**,Millennium Pharm.)、双硫仑(disulfiram)、表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin gallate)、salinosporamide A、carfilzomib、17-AAG(格列德霉素)、根赤壳菌素(radicicol)、乳酸脱氢酶A(LDH-A)、氟维司群(fulvestrant)(**FASLODEX®**,AstraZeneca),sunitib(**SUTENT®**,Pfizer/Sugen)、来曲唑(letrozole)(**FEMARA®**,Novartis)、甲磺酸伊马替尼(imatinib mesylate)(**GLEEVEC®**,Novartis)、finasunate(**VATALANIB®**,Novartis)、奥沙利铂(oxaliplatin)(**ELOXATIN®**,Sanofi)、5-FU(5-氟尿嘧啶)、亚叶酸(leucovorin)、雷帕霉素(Sirolimus,**RAPAMUNE®**,Wyeth)、拉帕替尼(Lapatinib)(**TYKERB®**,GSK572016,Glaxo Smith Kline)、lonafamib(SCH 66336)、索拉非尼(sorafenib)(

NEXAVAR®,Bayer Labs)、吉非替尼(gefitinib) (**IRESSA®**,AstraZeneca)、AG1478;烷化剂,如噻替派(thiotepa)和**CYTOXAN®**环磷酰胺;烷基磺酸酯,如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶(aziridine),如benzodopa、卡波醌(carboquone)、meturedopa和uredopa;乙撑亚胺(ethylenimine)和methylamelamine,包括六甲蜜胺(altretamine)、三亚胺嗪(triethylenemelamine)、三亚乙基磷酰胺(triethyleneephosphoramide)、三亚乙基硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramide)和trimethylolmelamine;多聚乙酰(acetogenin)(尤其是番荔枝内酯(bullatacin)和布拉它辛酮(bullatacinone));喜树碱(camptothecin)(包括拓扑替康(topotecan)和伊立替康(irinotecan));苔藓虫素(bryostatin);callystatin;CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物);cryptophycin(尤其是cryptophycin 1和cryptophycin 8);肾上腺类固醇(包括强的松和强的松龙);环丙孕酮(cyproterone acetate);5 α -还原酶(包括非那雄胺(finasteride)和度他雄胺(dutasteride));伏立诺他(vorinostat),罗米地辛(romidepsin)、帕比司他(panobinostat)、丙戊酸、mocetinostat、多拉司他汀(dolastatin);阿地白介素(aldesleukin)、滑石粉、多卡霉素(包括合成类似物KW-2189和CB1-TM1);eleutherobin;pancratistatin;sarcodictyin;spongistatin;氮芥(nitrogen mustard),如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlomaphazine)、chlorophosphamide、磷雌氮芥(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、氮芥(mechlorethamine)、盐酸氮芥(mechlorethamine oxide hydrochloride)、苯丙氨酸氮芥(melphalan)、新氮芥(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、松龙苯芥(prednimustine)、氯乙环磷酰胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard);亚硝基脲(nitrosourea),如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)和ranimustine;抗生素,如烯二炔类抗生素(例如加利车霉素,尤其是加利车霉素 γ 1和加利车霉素 ω 1(Angew.Chem Int1.Ed. Engl.,33:183-186(1994));dynemicin,包括dynemicin A;二膦酸盐,如氯膦酸二钠(clodronate);esperamicin;以及新制癌菌素色基和相关色蛋白烯二炔类抗生素色基)、阿克拉霉素(aclacinomycin)、放线菌素(actinomycin)、安曲霉素(authramycin)、重氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素(bleomycin)、放线菌素C(cactinomycin)、carabacin、洋红霉素(carminomycin)、嗜癌素(carzinophilin)、chromomycinis、更生霉素(dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、**ADRIAMYCIN®**(多柔比星(doxorubicin))、吗啉基-多柔比星、氰基吗啉基-多柔比星、2-吡咯啉基-多柔比星和脱氧多柔比星、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素(mitomycin)(如丝裂霉素C)、霉酚酸、诺加霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycins)、派来霉素(peplomycin)、泊非霉素(porfiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑菌素(streptonigrin)、链脲霉素(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、新制癌菌素(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin);代谢剂,如氨甲喋呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类

似物,如二甲叶酸(denopterin)、氨甲喋呤、蝶酰三谷氨酸(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate);嘌呤类似物,如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤、硫咪嘌呤(thiamiprime)、硫鸟嘌呤(thioguanine);嘧啶类似物,如安西他滨

[0082] <PN 161874>(ancitabine)、氮杂胞昔(azacitidine)、6-氮尿昔(6-azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞昔(cytarabine)、双脱氧尿昔(dideoxyuridine)、去氧氟脲昔(doxifluridine)、依诺他宾(enocitabine)、氟尿昔(floxuridine);雄激素,如卡鲁睾酮(calusterone)、丙酸曲他雄酮(dromostanolone propionate)、环硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、睾内酯(testolactone);抗肾上腺素(anti-adrenal),如氨鲁米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane);叶酸补充剂,如亚叶酸;醋葡内酯(aceglatone);醛磷酰胺糖昔(aldophosphamide glycoside);氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid);恩尿嘧啶(eniluracil);安吖啶(amsacrine);bestrabucil;比生群(bisantrene);依达曲沙(edatraxate);地磷酰胺(defofamine);秋水仙胺(demecolcine);地吖醌(diaziquone);elfomithine;醋酸羟吡呋唑(elliptinium acetate);埃坡霉素(epothilone);乙环氧啶(etoglucid);硝酸镓;羟基脲;香菇多糖(lentinan);氯尼达明(lonidainine);美登木素生物碱(maytansinoid),如美登素(maytansine)和美坦西醇(ansamitocin);米托胍腙(mitoguazone);米托蒽醌(mitoxantrone);mopidamnol;nitraerine;喷司他丁(pentostatin);蛋氨氮芥(phemamet);吡柔比星(pirarubicin);洛索蒽醌(losoxantrone);鬼臼酸(podophyllinic acid);2-乙肼;丙卡巴肼(procarbazine);**PSK®**多糖复合物(JHS Natural Products, Eugene, Oreg.);丙亚胺(razoxane);根霉素(rhizoxin);西佐喃(sizofuran);螺旋锗(spirogermanium);细格孢氮杂酸(tenuazonic acid);三亚胺醌(triaziqone);2,2',2"-三氯三乙胺;单端孢霉烯(trichothecene)(尤其是T-2毒素、verracurin A、杆孢菌素(roridin)A和anguidine);乌拉坦(urethan);脱乙酰长春花碱;达卡巴嗪(dacarbazine);甘露莫司汀(mannomustine);二溴甘露醇(mitobronitol);二溴卫矛醇(mitolactol);溴丙哌嗪(pipobroman);gacytosine;阿糖胞昔(arabinoside)(“Ara-C”);环磷酰胺(cyclophosphamide);噻替派(thiotepa);紫杉烷(taxane);chlorambucil;**GEMZAR®**(吉西他滨(gemcitabine));6-巯鸟嘌呤;巯基嘌呤;氨甲喋呤;长春花碱(vinblastine);依托泊昔(etoposide)(VP-16);异环磷酰胺(ifosfamide);米托蒽醌(mitoxantrone);长春花新碱(vincristine);**NAVELBINE®**(长春烯碱(vinorelbine));二羟蒽二酮(novantrone);替尼泊昔(teniposide);依达曲沙(edatrexate);柔红霉素(daunomycin);氨基喋呤(aminopterin);卡培他滨(capecitabine);**XELODA®**;伊班磷酸(ibandronate);CPT-11;拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);类视黄醛,如视黄酸;及以上任一种的可药用盐、酸和衍生物。

[0083] 化疗剂还包括“基于铂的”化疗剂,其包含含有铂的有机化合物作为分子的有机部分。通常,基于铂的化疗剂是铂的配位化合物。基于铂的化疗剂有时在本领域中称为“platin”。基于铂的化疗剂的实例包括但不限于卡铂、顺式铂氨和奥沙利铂。

[0084] 化疗剂还包括:(i)发挥作用来调节或抑制激素对肿瘤的作用的抗激素剂,如抗雌

激素和选择性雌激素受体调节剂 (SERM) , 包括例如他莫昔芬 (tamoxifen) (包括 **NOLVADEX®**; 柚缘酸他莫昔芬 (tamoxifen citrate))、雷洛昔芬 (raloxifene)、屈洛昔芬 (droloxifene)、4-羟基他莫昔芬 (4-hydroxytamoxifen)、曲沃昔芬 (trioxifene)、雷洛昔芬盐酸盐 (keoxifene)、LY117018、奥那司酮 (onapristone) 和 **FARESTON®** (枸缘酸托瑞米芬 (toremifene citrate)) ; (ii) 抑制芳香酶 (其调节肾上腺中的雌激素产生) 的芳香酶抑制剂, 例如, 4 (5)-咪唑、氨鲁米特 (aminoglutethimide)、**MEGASE®** (醋酸甲地孕酮 (megestrol acetate))、**AROMASIN®** (依西美坦 (exemestane), 辉瑞)、formestanone、法洛唑 (fadrozole)、**RIVISOR®** (伏氯唑 (vorozole))、**FEMARA®** (来曲唑 (letrozole), 诺华) 和 **ARIMIDEX®** (阿那曲唑 (anastrozole), 阿斯利康) ; (iii) 抗雄激素, 如氟他胺 (flutamide)、尼鲁米特 (nilutamide)、比卡米特 (bicalutamide)、醋酸亮丙瑞林 (leuprolide) 和戈舍瑞林 (goserelin)、布舍瑞林 (buserelin)、triputerelin、醋酸甲羟孕酮 (medroxyprogesterone acetate)、己烯雌酚 (diethylstilbestrol)、结合型雌激素 (premarin)、氟羟甲基睾丸素 (fluoxymesterone)、全反式维甲酸、维甲酰酚胺 (fenretinide)、以及曲沙他滨 (troxacitabine) (1,3-二氧戊环胞嘧啶核昔类似物) ; (iv) 蛋白激酶抑制剂; (v) 脂质激酶抑制剂; (vi) 反义寡核苷酸, 尤其是抑制涉及异常细胞增殖的信号传导途径中的基因 (例如PKC- α 、Raf、H-Ras和) 表达的那些; (vii) 核酶, 如VEGF表达抑制剂 (例如**ANGIOZYME®**) 和HER2表达抑制剂; (viii) 疫苗, 如基因治疗疫苗, 例如, **ALLOVECTIN®**、**LEUVECTIN®** 和 **VAXID®**、**PROLEUKIN®**、rIL-2, 拓扑异构酶1抑制剂如 **LURTOTECAN®**、**ABARELIX®** rmRH; 及 (ix) 以上任一种的可药用盐、酸和衍生物。

[0085] 化疗剂还包括抗体, 如阿伦单抗 (alemtuzumab) (Campath)、贝伐单抗 (bevacizumab) (**AVASTIN®**, Genentech)、西妥昔单抗 (cetuximab) (**ERBITUX®**, Imclone)、帕尼单抗 (panitumumab) (**VECTIBIX®**, Amgen)、利妥昔单抗 (rituximab) (**RITUXAN®**, Genentech/Biogen Idec)、帕妥珠单抗 (pertuzumab) (**OMNITARG®**, 2C4, Genentech)、曲妥珠单抗 (trastuzumab) (**HERCEPTIN®**, Genentech)、托西莫单抗 (tositumomab) (Bexxar, Corixa) 及抗体药物缀合物吉妥珠单抗奥唑米星 (gemtuzumab ozogamicin) (**MYLOTARG®**, Wyeth)。作为药物与本发明的化合物组合具有治疗潜能的其他人源化抗体包括: 阿泊珠单抗 (apolizumab)、aselizumab、at利珠单抗 (bapinezumab)、bivatuzumab mertansine、cantuzumab mertansine、西利珠单抗 (cedelizumab)、赛妥珠单抗 (certolizumab pegol)、cidfusituzumab、cidtuzumab、达利珠单抗 (daclizumab)、艾库单抗 (eculizumab)、依法利珠单抗 (efalizumab)、依帕珠单抗 (epratuzumab)、厄利珠单抗 (erlizumab)、非维珠单抗 (felizumab)、芳妥珠单抗 (fontolizumab)、妥珠单抗奥唑米星 (inotuzumab ozogamicin)、伊匹单抗 (ipilimumab)、labetuzumab、林妥珠单抗 (lintuzumab)、matuzumab、美泊利单抗 (mepolizumab)、莫维珠单

抗(motavizumab)、motovizumab、那他珠单抗(natalizumab)、尼妥珠单抗(nimotuzumab)、nolovizumab、numavizumab、ocrelizumab、奥马珠单抗(omalizumab)、帕利珠单抗(palivizumab)、pascolizumab、pecfusituzumab、pectuzumab、pexelizumab、ralivizumab、兰尼单抗(ranibizumab)、reslivizumab、reslizumab、resyvizumab、罗维珠单抗(rovelizumab)、ruplizumab、西罗珠单抗

[0086] <PN 161874>(sibrotuzumab)、siplizumab、sontuzumab、tacatuzumab tetraxetan、tadocizumab、talizumab、tefibazumab、托珠单抗(tocilizumab)、toralizumab、tucotuzumab celmoleukin、tucusituzumab、umavizumab、乌珠单抗(urtoxazumab)、优特克单抗(ustekinumab)、visilizumab和抗白介素12(ABT-874/J695, Wyeth Research和Abbott Laboratories),抗白介素12是遗传修饰为识别白介素-12p40蛋白的重组全人序列全长IgG₁λ抗体。

[0087] 化疗剂还包括“EGFR抑制剂”,EGFR抑制剂指结合EGFR或以其他方式与EGFR直接相互作用,并阻止或减少其信号发放活性的化合物,还称为“EGFR拮抗剂”。这类药物的实例包括结合EGFR的抗体和小分子。结合EGFR的抗体的实例包括: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)及其变体,如嵌合225(C225或西妥昔单抗; **ERBUTIX®**)和改造的人225(H225)(参见例如W096/40210,Imclone Systems Inc.) ;IMC-11F8全人EGFR靶向抗体(Imclone);结合II型EGFR突变体的抗体(美国专利号5,212,290);美国专利号中5,891,996所述的结合EGFR的人源化抗体和人抗体;结合EGFR的人抗体,如ABX-EGF帕尼单抗(参见W098/50433,Abgenix/Amgen);EMD 55900(Stragliotto等Eur.J.Cancer 32A:636-640(1996));与EGF和TGF-α二者竞争结合EGFR的抗EGFR人源化EGFR抗体EMD7200(matuzumab)(EMD/Merck);人EGFR抗体HuMax-EGFR(GenMab);US 6,235,883中所述的称为E1.1、E2.4、E2.5、E6.2、E6.4、E2.11、E6.3和E7.6.3的全人抗体;MDX-447(Medarex Inc);mAb 806或人源化mAb806(Johns等,J.Biol.Chem.279(29):30375-30384(2004))。抗EGFR抗体可以与细胞毒剂缀合,从而产生免疫缀合物(参见例如EP659439A2,Merck Patent GmbH)。EGFR拮抗剂包括小分子,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、

[0088] <PN 161874>6,344,459、6,602,863、6,391,874、6,344,455、5,760,041、6,002,008和5,747,498以及PCT公开W098/14451、W098/50038、W099/09016和W099/24037中所述的化合物。具体的小分子EGFR拮抗剂包括:OSI-774(CP-358774,埃罗替尼, **TARCEVA®** Genentech/OSI Pharmaceuticals);PD 183805(CI1033,2-propenamide,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,辉瑞);ZD1839,吉非替尼(**IRESSA®**)4-(3'-氯-4'-氟苯胺基)-7-甲氧基-6-(3-吗啉基丙氧基)喹唑啉基,阿斯利康);ZM105180((6-氨基-4-(3-甲基苯基-氨基)-喹唑啉,Zeneca);BIBX-1382(N8-(3-氯-4-氟-苯基)-N2-(1-甲基-派啶-4-基)-嘧啶并[5,4-d]嘧啶-2,8-二胺,勃林格殷格翰);PKI-166((R)-4-[4-[(1-苯基乙基)氨基]-1H-吡咯并[2,3-d]嘧啶-6-基]-苯酚);(R)-6-(4-羟基苯基)-4-[(1-苯基乙基)氨基]-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶);CL-387785(N-[4-[(3-溴苯基)

氨基]-6-喹唑啉基]-2-butynamide) ;EKB-569 (N-[4-[(3-氯-4-氟苯基) 氨基]-3-氰基-7-乙氧基-6-喹啉基]-4-(二甲氨基)-2-butenamide) (惠氏) ;AG1478 (辉瑞) ;AG1571 (SU 5271;辉瑞) ;双重EGFR/HER2酪氨酸激酶抑制剂,如拉帕替尼(**TYKERB®**、GSK572016或N-[3-氯-4-[(3-氟苯基) 甲氧基]苯基]-6[5[[2-甲磺酰基]乙基]氨基]甲基]-2-呋喃基]-4-quinazolinamine)。

[0089] 化疗剂还包括“酪氨酸激酶抑制剂”,包括:前一段落中指出的EGFR靶向药物;可从Takeda获得的小分子HER2酪氨酸激酶抑制剂如TAK165;ErbB2受体酪氨酸激酶的口服选择性抑制剂CP-724,714(辉瑞和OSI);优先结合EGFR但抑制过量表达HER2的细胞和过量表达EGFR的细胞二者的双重HER抑制剂如EKB-569(可从惠氏获得);口服HER2和EGFR酪氨酸激酶抑制剂拉帕替尼(GSK572016,可从葛兰素史克获得);PKI-166(可从诺华获得);全HER抑制剂如卡奈替尼(CI-1033;Pharmacia);抑制Raf-1信号发放的Raf-1抑制剂,如可从ISIS Pharmaceuticals获得的反义剂ISIS-5132;非HER靶向酪氨酸激酶抑制剂,如甲磺酸伊马替尼(**GLEEVEC®**,可从葛兰素史克获得);多重靶向酪氨酸激酶抑制剂,如舒尼替尼(sunitinib) (**SUTENT®**,可从辉瑞获得);VEGF受体酪氨酸激酶抑制剂,如vatalanib(PTK787/ZK222584,可从诺华/Schering AG获得);MAPK胞外调节激酶I抑制剂CI-1040(可从Pharmacia获得);喹唑啉,如PD 153035,4-(3-氯苯胺基)喹唑啉;吡啶并嘧啶;嘧啶并嘧啶;吡咯并嘧啶,如CGP 59326、CGP 60261和CGP 62706;吡唑并嘧啶,4-(苯基氨基)-7H-吡咯并[2,3-d]嘧啶;姜黄素(二阿魏酰甲烷,4,5-双(4-氟苯胺基)邻苯二甲酰亚胺);含硝基噻吩部分的酪氨酸磷酸化抑制剂(tyrphostine);PD-0183805(Warner-Lamber);反义分子(例如与编码HER的核酸结合的反义分子);喹噁啉(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/Schering AG);全HER抑制剂如CI-1033(辉瑞);Affinitac(ISIS 3521;Isis/礼来);甲磺酸伊马替尼(**GLEEVEC®**);PKI 166(诺华);GW2016(葛兰素史克);CI-1033(辉瑞);EKB-569(惠氏);Semaxinib(辉瑞);ZD6474(阿斯利康);PTK-787(诺华/Schering AG);INC-1C11(Imclone);雷帕霉素(sirolimus, **RAPAMUNE®**);或以下专利申请的任一个中所述的酪氨酸激酶抑制剂:美国专利号5,804,396、W0 1999/09016(美国氰氨公司)、W0 1998/43960(美国氰氨公司)、W0 1997/38983(Warner Lambert)、W0 1999/06378(Warner Lambert)、W0 1999/06396(Warner Lambert)、W0 1996/30347(辉瑞)、W0 1996/33978(Zeneca)、W0 1996/3397(Zeneca)和W0 1996/33980(Zeneca)。

[0090] 化疗剂还包括地塞米松、干扰素、秋水仙素、氯苯安啶(metoprine)、环孢菌素(cyclosporine)、两性霉素(amphotericin)、甲硝唑(metronidazole)、阿伦单抗、阿利维A酸(alitretinoin)、别嘌醇(allopurinol)、阿米斯丁(amifostine)、三氧化二砷、天冬酰胺酶、BCG活体、贝伐单抗、贝沙罗汀(bexarotene)、克拉屈滨(cladribine)、氯法拉滨(clofarabine)、阿法达贝泊汀(darbepoetin alfa)、地尼白介素(denileukin)、右丙亚胺(dexrazoxane)、阿法依泊汀(epoetin alfa)、厄洛替尼(elotinib)、非格司亭(filgrastim)、乙酸希司曲林(histrelin acetate)、ibritumomab、干扰素α-2a、干扰素α-2b、来那度胺(lenalidomide)、左旋咪唑(levamisole)、美司钠(mesna)、甲氧补骨脂素

(methoxsalen)、诺龙(nandrolone)、奈拉滨(nelarabine)、nofetumomab、oprelvekin、palifermin、氨羟二磷酸二钠(pamidronate)、pegademase、聚乙二醇化天冬酰胺酶(pegaspargase)、聚乙二醇化非格司亭(pegfilgrastim)、培美曲塞二钠(pemetrexed disodium)、普卡霉素(plicamycin)、卟吩姆钠(porfimer sodium)、米帕林(quinacrine)、拉布立酶(rasburicase)、沙格司亭(sargramostim)、替莫唑胺(temozolomide)、VM-26、6-TG、托瑞米芬(toremifene)、维A酸、ATRA、戊柔比星(valrubicin)、唑来膦酸二钠(zoledronate)、唑来膦酸(zoledronic acid)及其可药用盐。

[0091] 化疗剂还包括氢化可的松(hydrocortisone)、醋酸氢化可的松(hydrocortisone acetate)、醋酸可的松(cortisone acetate)、tixocortol pivalate、醋酸曲安西龙(triamcinolone acetonide)、triamcinolone alcohol、莫米松(mometasone)、安西奈德(amcinonide)、布地奈德(budesonide)、地奈德(desonide)、氟西奈德(fluocinonide)、醋酸氟轻松(fluocinolone acetonide)、倍他米松(betamethasone)、倍他米松磷酸酯钠(betamethasone sodium phosphate)、地塞米松(dexamethasone)、地塞米松磷酸钠(dexamethasone sodium phosphate)、氟可龙(fluocortolone)、氢化可的松-17-丁酸酯(hydrocortisone-17-butyrate)、氢化可的松-17-戊酸酯(hydrocortisone-17-valerate)、二丙酸别氯地米松(aclometasone dipropionate)、戊酸倍他米松(betamethasone valerate)、二丙酸倍他米松(betamethasone dipropionate)、泼尼卡酯(prednicarbate)、氯倍他松-17-丁酸酯(clobetasone-17-butyrate)、氯倍他松-17-丙酸酯(clobetasol-17-propionate)、己酸氟可龙(fluocortolone caproate)、特戊酸氟可龙(fluocortolone pivalate)和醋酸氟甲叉龙(fluprednidene acetate)；免疫选择性抗炎肽(ImSAID)，如苯丙氨酸-谷氨酰胺-甘氨酸(FEG)及其D同分异构体形式(feG)(IMULAN BioThapeutics, LLC)；抗风湿药物，如硫唑嘌呤(azathioprine)、环孢霉素(ciclosporin)(环孢霉素A(cyclosporine A))、D-青霉胺(D-penicillamine)、金盐、羟氯喹林(hydroxychloroquine)、leflunomide/iminocycline、柳氮磺吡啶(sulfasalazine)；肿瘤坏死因子 α (TNF α)阻断剂，如依那西普(etanercept)(Enbrel)、英夫利昔单抗(infliximab)(Remicade)、阿达木单抗(adalimumab)(Humira)、赛妥珠单抗(Cimzia)、戈利木单抗(golimumab)(Simponi)；白介素1(IL-1)阻断剂，如阿那白滞素(anakinra)(Kineret)；T细胞共刺激阻断剂，如阿巴西普(abatacept)(Orencia)；白介素6(IL-6)阻断剂，如托珠单抗(**ACTEMERA®**)；白介素13(IL-13)阻断剂，如lebrikizumab；干扰素 α (IFN)阻断剂，如ronatalizumab； β 7整联蛋白阻断剂，如rhuMAb β 7；IgE途径阻断剂，如抗-M1 prime；分泌性同源三聚体LTa3和膜结合异源三聚体LTa1/ β 2阻断剂，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及Lu的放射性同位素)；多种研究性药物，如thioplatin、PS-341、丁酸苯酯、ET-18-0CH₃或法尼基转移酶抑制剂(L-739749、L-744832)；多酚，如栎精、白藜芦醇、白皮杉醇,epigallocatechine gallate、茶黄素(theaflavin)、黄烷醇(flavanol)、矢车菊苷配基(procyanidin)、白桦脂酸及其衍生物；自噬抑制剂，如氯喹啉(chloroquine)； δ -9-四氢大麻酚(屈大麻酚(dronabinol)，**MARINOL®**)； β -拉帕醌(β -lapachone)；拉帕醇(lapachol)；秋水仙素；白桦脂酸；乙酰喜树碱；莨菪亭和9-氨基喜树碱；鬼臼毒素(podophyllotoxin)；替加氟

(tegafur) (**UFTORAL®**)；贝沙罗汀 (bexarotene) (**TARGRETIN®**)；二膦酸盐, 如氯膦酸二钠 (clodronate) (例如 **BONEFOS®** 或 **OSTAC®**)、依替膦酸钠 (etidronate) (**DIDROCAL®**)、NE-58095、唑来膦酸 (zoledronic acid) / 增强的二膦酸二钠 (zoledronate) (**ZOMETA®**)、阿仑膦酸钠 (alendronate) (**FOSAMAX®**)、氨羟二磷酸二钠 (pamidronate) (**AREDIA®**)、替鲁膦酸钠 (tiludronate) (**SKELID®**) 或利塞膦酸钠 (risedronate) (**ACTONEL®**)；表皮生长因子受体 (EGF-R)；疫苗, 如 **THERATOPE®** 疫苗；哌立福辛 (perifosine)；COX-2 抑制剂 (例如塞来昔布 (celecoxib) 或依托考昔 (etoricoxib))；蛋白酶体抑制剂 (例如 PS341)；CCI-779；tipifarnib (R11577)；orafenib、ABT510；Bcl-2 抑制剂, 如 oblimersen sodium (**GENASENSE®**)；匹克生琼 (pixantrone)；法尼基转移酶抑制剂, 如 lonafarnib (SCH 6636, SARASARTM)；及上述任一种的可药用盐、酸或衍生物；以及以上两种或多种的组合, 如 CHOP (环磷酰胺、多柔比星、长春花新碱和强的松的联合治疗的缩写) 和 FOLFOX (奥沙利铂 (ELOXATINTM) 与 5-FU 和 leucovorin 组合的治疗方案的缩写)。

[0092] 化疗剂还包括具有镇痛、退热和抗炎作用的非类固醇抗炎药。NSAID 包括环加氧酶的非选择性抑制剂。NSAID 的具体实例包括阿司匹林；丙酸衍生物, 如布洛芬 (ibuprofen)、非诺洛芬 (fenoprofen)、酮洛芬 (ketoprofen)、氟比洛芬 (flurbiprofen)、奥沙普秦 (oxaprozin) 和萘普生 (naproxen)；醋酸衍生物, 如吲哚美辛 (indomethacin)、舒林酸 (sulindac)、依托度酸 (etodolac)、双氯芬酸 (diclofenac)；烯醇酸衍生物, 如吡罗昔康 (piroxicam)、美洛昔康 (meloxicam)、替诺昔康 (tenoxicam)、哚昔康 (droxicam)、氯诺昔康 (lornoxicam) 和伊索昔康 (isoxicam)；灭酸衍生物, 如甲灭酸 (mefenamic acid)、甲氯灭酸 (meclofenamic acid)、氟灭酸 (flufenamic acid)、邻甲氯灭酸 (tolfenamic acid)；COX-2 抑制剂, 如塞来昔布、依托考昔、罗美昔布 (lumiracoxib)、帕瑞考昔 (parecoxib)、罗非昔布 (rofecoxib)、罗非昔布 (rofecoxib) 和伐地考昔 (valdecoxib)。NSAID 可以标示用于减轻以下病症的症状: 类风湿性关节炎、骨关节炎、炎性关节病、关节强硬性脊椎病、银屑病关节炎、Reiter 综合征、急性痛风、痛经、转移性骨痛、头痛和偏头痛、术后痛、炎症和组织损伤引起的轻度至中度疼痛、发热、肠梗阻和肾绞痛。

[0093] 在本文中使用时, “生长抑制剂”指在体外或体内抑制细胞生长的化合物或组合物。在一个实施方案中, 生长抑制剂是阻止或减少细胞的增殖的生长抑制抗体, 该细胞表达该抗体所结合的抗原。在另一实施方案中, 该生长抑制剂可以是显著减少处于 S 期的细胞的百分比的物质。生长抑制剂的实例包括阻断细胞周期进程 (处于 S 期之外的地方) 的物质, 如诱导 G1 阻滞和 M 期阻滞的物质。经典的 M 期阻断剂包括 vincas (长春花新碱和长春花碱)、紫杉烷和拓扑异构酶 II 抑制剂, 如多柔比星、表柔比星、柔红霉素、依托泊苷和博来霉素。阻滞 G1 期的那些物质也波及到 S 期阻滞, 例如, DNA 烷化剂, 如他莫昔芬、强的松、达卡巴嗪、氮芥、顺式铂、氨甲蝶呤、5-氟尿嘧啶和 ara-C。其他信息可见于 Mendelsohn 和 Israel 编辑, The Molecular Basis of Cancer, 第 1 章, 标题 “Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs” by Murakami 等 (W.B. Saunders, Philadelphia, 1995), 例如第 13 页

中。

[0094] “放射治疗”意指用定向 γ 射线或 β 射线来诱发对细胞的足够损伤,使得限制其正常发挥功能的能力或彻底破坏细胞。应理解,本领域存在确定处理的剂量和持续时间的许多已知方式。典型的处理作为一次性施用提供,典型的剂量在每天10至200单位(戈瑞)的范围内。

[0095] 用于治疗目的的“对象”或“个体”指分类为哺乳动物的任意动物,包括人类,驯养动物和农场动物,及动物园动物、运动动物或宠物动物,如狗、马、猫、牛等。优选地,该哺乳动物是人。对象或个体可以是患者。

[0096] 术语“抗体”在本文中以最广泛的含义使用,且明确涵盖单克隆抗体(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,只要它们显示希望得到的生物学活性。

[0097] “分离的”抗体是已鉴定并从其天然环境的成分分开/取出的抗体。其天然环境的污染成分是干扰该抗体的研究、诊断或治疗用途的物质,且可以包括酶、激素和其他蛋白质或非蛋白质溶质。在一些实施方案中,将抗体纯化至:(1)通过例如Lowry法测定抗体高于95wt%,在一些实施方案中,高于99wt%;(2)足以通过使用例如旋杯式测序仪获得N端或内部氨基酸序列的至少15个残基的程度;或(3)例如考马斯蓝染色或银染的还原或非还原条件下的SDS-PAGE显示同质。分离的抗体包括重组细胞内的原位抗体,因为将不存在至少一种该抗体的天然环境的成分。但是,通常将通过至少一个纯化步骤纯化分离的抗体。

[0098] “天然抗体”通常是由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链组成的约150,000道尔顿的异源四聚体糖蛋白。每条轻链通过一个共价二硫键与重链连接,而二硫键的数目在不同免疫球蛋白同种型的重链之间不同。每条重链和轻链还具有规则间隔开的链内二硫键。每条重链在一端具有可变结构域(V_L),后面是许多恒定结构域。每条轻链在一端具有可变结构域(V_L),在其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,轻链可变结构域与重链可变结构域对齐。认为特定氨基酸残基形成轻链和重链可变结构域之间的界面。

[0099] 术语“恒定结构域”指免疫球蛋白分子的相对于免疫球蛋白的另一部分(可变结构域,其包含抗原结合部位)而言具有更保守的氨基酸序列的部分。恒定结构域包含重链的 C_H1 、 C_H2 和 C_H3 结构域(统称CH)及轻链的CHL(或CL)结构域。

[0100] 抗体的“可变区”或“可变结构域”指抗体的重链或轻链的氨基端结构域。重链可变区可称为“ V_H ”。轻链可变区可称为“ V_L ”。这些结构域通常是抗体的最可变部分,且包含抗原结合部位。

[0101] 术语“可变的”指这样的事实,可变结构域的某些部分在序列上在抗体间广泛不同,并用于各具体抗体对其具体抗原的结合和亲和力。但是,可变性并非在抗体的整个可变结构域内均匀分布。它在轻链和重链可变结构域中都集中在三个称为高变区(HVR)的区段中。可变结构域的更高度保守的部分称为构架区(FR)。天然重链和轻链的可变结构域各包含四个FR,其大致采用 β -折叠构型,通过三个HVR连接,该HVR形成连接该 β -折叠结构且在一些情况下形成该 β -折叠结构的部分的环。每条链中的HVR通过FR区近距离保持在一起,并与来自另一条链的HVR一起促成抗体的抗原结合部位的形成(参见Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,National Institute of Health,

Bethesda, Md (1991))。恒定结构域不直接涉及抗体与抗原的结合,但显示多种效应子功能,如抗体在抗体依赖性细胞毒作用中的参与。

[0102] 根据其恒定结构域的氨基酸序列,可以将来自任意哺乳动物物种的抗体(免疫球蛋白)的“轻链”分配至称为 κ 和 λ 的两个明显不同的类型之一。

[0103] 本文所用的术语IgG“同种型”或“亚类”指通过其恒定区的化学和抗原特征定义的免疫球蛋白的任意亚类。

[0104] 取决于其重链恒定结构域的氨基酸序列,可以将抗体(免疫球蛋白)分配至不同种类。存在五个主要种类的免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,这些中的几个可以进一步划分为亚类(同种型),例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂。对应于不同种类的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。不同种类的免疫球蛋白的亚基结构和三维构型众所周知,且通常描述于例如Abbas等Cellular and Mol. Immunology,第4版(W.B.Saunders, Co., 2000)中。抗体可以是通过该抗体与一种或多种其他蛋白质或多肽的共价或非共价结合形成的更大的融合分子的一部分。

[0105] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文中可互换使用,指处于其基本上完整的形式的抗体,不是下文定义的抗体片段。这些术语尤其指具有含Fc区的重链的抗体。

[0106] 为了本文的目的,“裸抗体”是不与细胞毒性部分或放射性标记缀合的抗体。

[0107] “抗体片段”包含完整抗体的部分,优选包含其抗原结合区。在一些实施方案中,本文所述的抗体片段是抗原结合片段。抗体片段的实例包括Fab、Fab'、F(ab')₂和Fv片段;双抗体;线性抗体;单链抗体分子;及从抗体片段形成的多特异性抗体。

[0108] 木瓜蛋白酶消化抗体产生两个相同的抗原结合片段(称为“Fab”片段,各具有单个抗原结合部位)和剩余的“Fc”片段(其名称反映其易结晶的能力)。胃蛋白酶处理产生F(ab')₂片段,其具有两个抗原结合部位且仍能够交联抗原。

[0109] “Fv”是包含完整抗原结合部位的最小抗体片段。在一个实施方案中,双链Fv种类由紧密非共价结合的一个重链可变区结构域和一个轻链可变区结构域的二聚体组成。在单链Fv(scFv)种类中,一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域可以通过柔性肽接头共价连接,使得轻链和重链可以以类似于双链Fv种类中的结构的“二聚体”结构结合。各可变结构域的三个HVR正是在此构型中相互作用来定义VH-VL二聚体表面上的抗原结合部位。六个HVR共同赋予抗体抗原结合特异性。但是,甚至单个可变结构域(或Fv的一半,其仅包含三个对抗原特异的HVR)也具有识别和结合抗原的能力,虽然亲和力低于整个结合部位。

[0110] Fab片段包含重链和轻链可变结构域,还包含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片段的不同在于,在重链CH1结构域的羧基端加入了几个残基,其包括一个或多个来自抗体铰链区的半胱氨酸。Fab'-SH是本文对其中恒定结构域的一个或多个半胱氨酸残基具有自由巯基的Fab'的命名。F(ab')₂抗体片段最初作为其间具有铰合部半胱氨酸的Fab'片段对产生。还已知抗体片段的其他化学偶联。

[0111] “单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的VH和VL结构域,其中这些结构域存在于单条多肽链中。通常,scFv多肽进一步在VH和VL结构域之间包含多肽接头,该多肽接头使得scFv能够形成希望的结构用于抗原结合。scFv的综述参见Plückthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 113卷, Rosenburg和Moore编辑, (Springer-Verlag, 纽约, 1994) 269-315页。

[0112] 术语“双抗体”指具有两个抗原结合部位的抗体片段,该片段包含在同一条多肽链中与轻链可变结构域(VL)连接的重链可变结构域(VH)(VH-VL)。通过使用太短而不允许同一条链上的两个结构域之间配对的接头,迫使结构域与另一条链上的互补结构域配对,并产生两个抗原结合部位。双抗体可以是二价的或双特异性的。双抗体更充分地描述于例如EP404,097;WO 1993/01161;Hudson等,Nat.Med.9:129-134(2003);及Hollinger等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993)中。三抗体和四抗体还描述于Hudson等,Nat.Med.9:129-134(2003)中。

[0113] 本文所用的术语“单克隆抗体”指获自基本同质的抗体群体的抗体,例如,除了可以以较小的量存在的可能的突变(例如天然存在的突变)外,包含该群体的单种抗体是相同的。因此,修饰词“单克隆的”指抗体不是无关联抗体的混合物的性状。在某些实施方案中,这种单克隆抗体通常包含含有结合靶标的多肽序列的抗体,其中结合靶标的多肽序列通过包括从多个多肽序列选择单个结合靶标的多肽序列的方法获得。例如,选择方法可以是从多个克隆(例如,一系列杂交瘤克隆、噬菌体克隆或重组DNA克隆)选择独特克隆。应理解,可以进一步改变所选择的靶标结合序列,例如以改善对靶标的亲和力,人源化靶标结合序列,改善其在细胞培养中的产生,降低体内免疫原性,产生多特异性抗体等,包含改变的靶标结合序列的抗体也是本发明的单克隆抗体。与通常包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物不同,单克隆抗体制备物的每种单克隆抗体针对抗原上的单个决定簇。除它们的特异性外,单克隆抗体制备物的优势在于,它们通常未受其他免疫球蛋白污染。

[0114] 修饰词“单克隆的”指抗体获自基本同质的抗体群体的特征,而不解释为需要通过任意具体方法来产生该抗体。例如,待按照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,杂交瘤法(例如Kohler和Milstein.,Nature,256:495-97(1975);Hongo等,Hybridoma,14(3):253-260(1995);Harlow等,Antibodies:A Laboratory Manual,(Cold Spring Harbor Laboratory出版社,第2版1988);Hammerling等,in:Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681(Elsevier,N.Y.,1981))、重组DNA法(参见例如美国专利号4,816,567)、噬菌体展示技术(参见例如Clackson等,Nature,352:624-628(1991);Marks等,J.Mol.Biol.222:581-597(1992);Sidhu等,J.Mol.Biol.338(2):299-310(2004);Lee等,J.Mol.Biol.340(5):1073-1093(2004);Fellouse,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101(34):12467-12472(2004);及Lee等,J.Immunol.Methods 284(1-2):119-132(2004))、及用于在具有部分或全部人免疫球蛋白基因座或编码人免疫球蛋白序列的基因的动物中产生人抗体或人样抗体的技术(参见例如WO1998/24893;WO 1996/34096;WO 1996/33735;WO 1991/10741;Jakobovits等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:2551(1993);Jakobovits等,Nature 362:255-258(1993);Bruggemann等,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;5,661,016;Marks等,Bio/Technology 10:779-783(1992);Lonberg等,Nature 368:856-859(1994);Morrison,Nature 368:812-813(1994);Fishwild等,Nature Biotechnol.14:845-851(1996);Neuberger,Nature Biotechnol.14:826(1996);及Lonberg和Huszar,Intern.Rev.Immunol.13:65-93(1995))。

[0115] 本文的单克隆抗体明确包括“嵌合”抗体,其中部分重链和/或轻链与源自特定物种或隶属于特定抗体种类或亚类的抗体中对应的序列相同或同源,而一条或多条链的其余

部分与源自另一物种或隶属于另一抗体种类或亚类的抗体中对应的序列相同或同源,以及这类抗体的片段,只要它们显示希望得到的生物学活性(参见例如美国专利号4,816,567;及Morrison等,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源自例如通过用目的抗原免疫猕猴而产生的抗体。

[0116] 非人(例如鼠)抗体的“人源化”形式是含有源自非人免疫球蛋白的最少序列的嵌合抗体。在一个实施方案中,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中用来自非人物种(如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类)的具有希望得到的特异性、亲和力和/或能力的HVR(供体抗体)的残基取代来自受体的HVR的残基。在一些情况下,用对应的非人残基取代人免疫球蛋白的FR残基。此外,人源化抗体可以包含见于受体抗体中或供体抗体中的残基。可以进行这些修饰来进一步改良抗体性能。通常,人源化抗体将包含至少一个(通常两个)可变结构域的基本上全部,其中全部或基本上全部高变环对应于非人免疫球蛋白的那些,且全部或基本上全部FR是具有人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体还将可选地包含至少部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的恒定区。进一步的细节参见Jones等,Nature 321:522-525(1986);Riechmann等,Nature 332:323-329(1988);及Presta,Curr.Op.Struct.Biol.2:593-596(1992)。还参见例如Vaswani和Hamilton,Ann.Allergy,Asthma&Immunol.1:105-115(1998);Harris,Biochem.Soc.Transactions 23:1035-1038(1995);Hurle和Gross,Curr.Op.Biotech.5:428-433(1994);及美国专利号6,982,321和7,087,409。

[0117] “人抗体”是具有这样的氨基酸序列的抗体,该氨基酸序列对应于由人产生和/或用本文公开的用于制备人抗体的任意技术制备的抗体的氨基酸序列。此人抗体定义明确排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。人抗体可以用本领域已知的多种技术产生,包括噬菌体展示文库。Hoogenboom和Winter,J.Mol.Biol.,227:381(1991);Marks等,J.Mol.Biol.,222:581(1991)。还可以用Cole等,Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,77页(1985);Boerner等,J.Immunol.,147(1):86-95(1991)中所述的方法制备人单克隆抗体。还参见van Dijk和van de Winkel,Curr.Opin.Pharmacol.,5:368-74(2001)。通过对转基因动物施用抗原来制备人抗体,该转基因动物已修饰为响应抗原攻击而产生这类抗体,但已使其内源基因座失能,例如免疫的xenomice(关于XENOMOUSE™技术,参见例如美国专利号6,075,181和6,150,584)。关于通过人B细胞杂交瘤技术产生人抗体,还参见Li等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,103:3557-3562(2006)。

[0118] “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的同源物强的结合亲和力的抗体。通常,物种特异性抗体“特异性结合”人抗原(例如,具有不超过约 1×10^{-7} M、优选不超过约 1×10^{-8} M和优选不超过约 1×10^{-9} M的结合亲和力(K_d)),但对来自第二非人哺乳动物的同源物的结合亲和力比其对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上文定义的多种抗体类型中的任一种,但优选人源化抗体或人抗体。

[0119] 在本文中使用时,术语“高变区”、“HVR”或“HV”指抗体可变结构域的序列上高变和/或形成结构确定的环的区域。通常,抗体包含六个HVR;三个在VH中(H1、H2、H3),三个在VL中(L1、L2、L3)。在天然抗体中,H3和L3显示六个HVR中最大的多样性,尤其认为H3在赋予

抗体良好的特异性中发挥独特作用。参见例如Xu等,Immunity 13:37-45 (2000);Johnson和Wu,in Methods in Molecular Biology 248:1-25 (Lo编辑,Human出版社,Totowa,N.J.,2003)。实际上,天然存在的仅由重链组成的骆驼抗体在缺乏轻链的情况下具有功能且稳定。参见例如Hamers-Casterman等,Nature 363:446-448 (1993);Sheriff等,Nature Struct.Biol.3:733-736 (1996)。

[0120] 许多HVR界定(delineation)在使用,并为本文所涵盖。Kabat互补决定区(CDR)基于序列可变性,且最常用((Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991))。而Chothia指结构环的位置(Chothia和Lesk J.Mol.Biol.196:901-917 (1987))。AbM HVR代表了Kabat HVR和Chothia结构环之间的折中,且为Oxford Molecular's AbM抗体建模软件所使用。“接触”HVR基于可用的复合物晶体结构的分析。下文指出了来自这些HVR中的每一个的残基。

环	Kabat	AbM	Chothia	Contact
[0121]	L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32
	L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52
	L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96
	H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32
	H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32
	H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55
	H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101
				H93-H101

[0122] HVR可以包含以下“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),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,按照Kabat等,上文编号可变结构域残基。

[0123] “构架”或“FR”残基是除本文定义的HVR残基外的那些可变结构域残基。

[0124] 术语“如Kabat中的可变结构域残基编号”或“如Kabat中的氨基酸位置编号”及其变通形式指用于Kabat等,上文中的一系列抗体的重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统。使用此编号系统,实际的线性氨基酸序列可以包含较少的或附加的氨基酸,对应于可变结构域的FR或HVR的缩短或插入。例如,重链可变结构域可以包含H2的残基52后的单氨基酸插入(按照Kabat的残基52a)和重链FR残基82后的插入残基(例如按照Kabat的残基82a、82b和82c等)。可以通过在具有同源性的区域将抗体序列与“标准”Kabat编号序列比对来给定的抗体确定残基的Kabat编号。

[0125] 在提到可变结构域中的残基(约轻链的残基1-107和重链的残基1-113)时通常使用Kabat编号系统(例如Kabat等,Sequences of Immunological Interest.第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991))。在提到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指数”(例如Kabat等,上文中报道的EU指数)。“如Kabat中的EU指数”指人IgG1EU抗体的残基编号。

[0126] 表述“线性抗体”指Zapata等(1995Protein Eng,8(10):1057-1062)中所述的抗

体。简言之,这些抗体包含一对串联Fd区段 (VH-CH1-VH-CH1),该对串联Fd区段与互补的轻链多肽一起形成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异性的或单特异性的。

[0127] 本文所用的术语“结合”、“特异性结合”或“对…特异”指可测量和可重现的相互作用,如靶标和抗体之间的结合,其决定靶标在包括生物分子的分子的异源群体存在下的存在。例如,结合或特异性结合靶标(其可以是表位)的抗体是以比它结合其他靶标更高的亲和力、抗体亲抗原性、更容易地和/或以更长的持续时间结合此靶标的抗体。在一个实施方案中,如通过例如放射免疫测定 (RIA) 测量,抗体与不相关靶标结合的程度小于该抗体与该靶标结合的约10%。在某些实施方案中,特异性结合靶标的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 或 $\leq 0.1\text{nM}$ 的解离常数 (Kd)。在某些实施方案中,抗体特异性结合蛋白质上的表位,该表位在来自不同物种的该蛋白质间保守。在另一实施方案中,特异性结合可以包括但不需要专一性结合。

[0128] II.PD-1轴结合拮抗剂

[0129] 本文提供用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的方法,其包括对该个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷。本文还提供在患有癌症的个体中增强免疫功能的方法,其包括对该个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷。例如,PD-1轴结合拮抗剂包括PD-1结合拮抗剂、PD-L1结合拮抗剂和PD-L2结合拮抗剂。PD-1(程序性死亡1)在本领域中也称为“程序性细胞死亡1”、“PDCD1”、“CD279”和“SLEB2”。UniProtKB/Swiss-Prot检索号Q15116中显示示例性人PD-1。PD-L1(程序性死亡配体1)在本领域中也称为“程序性细胞死亡1配体1”、“PDCD1LG1”、“CD274”、“B7-H”和“PDL1”。UniProtKB/Swiss-Prot检索号Q9NZQ7.1中显示示例性人PD-L1。PD-L1(程序性死亡配体2)在本领域中也称为“程序性细胞死亡1配体2”、“PDCD1LG2”、“CD273”、“B7-DC”、“Btdc”和“PDL2”。UniProtKB/Swiss-Prot检索号Q9BQ51中显示示例性人PD-L2。在一些实施方案中,PD-1、PD-L1和PD-L2是人PD-1、PD-L1和PD-L2。

[0130] 在一些实施方案中,该PD-1结合拮抗剂是抑制PD-1与其配体结合配偶体的结合的分子。在具体方面,该PD-1配体结合配偶体是PD-L1和/或PD-L2。在另一实施方案中,PD-L1结合拮抗剂是抑制PD-L1与其结合配偶体的结合的分子。在具体方面,PD-L1结合配偶体是PD-1和/B7-1。在另一实施方案中,该PD-L2结合拮抗剂是抑制PD-L2与其结合配偶体的结合的分子。在具体方面,PD-L2结合配偶体是PD-1。该拮抗剂可以是抗体、其抗原结合片段、免疫黏附素、融合蛋白质或寡肽。

[0131] 在一些实施方案中,该PD-1结合拮抗剂是抗PD-1抗体(例如人抗体、人源化抗体或嵌合抗体)。在一些实施方案中,该抗PD-1抗体选自MDX-1106 (nivolumab)、MK-3475 (lambrolizumab) 和CT-011 (pidilizumab)。在一些实施方案中,该PD-1结合拮抗剂是免疫黏附素(例如,包含与恒定区(例如免疫球蛋白序列的Fc区)融合的PD-L1或PD-L2的胞外或PD-1结合部分的免疫黏附素)。在一些实施方案中,该PD-1结合拮抗剂是AMP-224。在一些实施方案中,该PD-L1结合拮抗剂是抗PD-L1抗体。在一些实施方案中,该抗PD-L1抗体选自YW243.55.S70、MPDL3280A、MDX-1105和MEDI4736。抗体YW243.55.S70是W02010/077634中描述的抗PD-L1。MDX-1105(也称为BMS-936559)是W02007/005874中描述的抗PD-L1抗体。MEDI4736是W02011/066389和US2013/034559中描述的抗PD-L1单克隆抗体。MDX-1106(也称为MDX-1106-04、ONO-4538、BMS-936558或nivolumab)是W02006/121168中描述的抗PD-1抗

体。MK-3475(也称为lambrolizumab)是WO2009/114335中描述的抗PD-1抗体。CT-011(也称为hBAT、hBAT-1或pidilizumab)是WO2009/101611中描述的抗PD-1抗体。AMP-224(也称为B7-DC Ig)是WO2010/027827和WO2011/066342中描述的PD-L2-Fc融合可溶性受体。

[0132] 在一些实施方案中,该PD-1轴结合拮抗剂是抗PD-L1抗体。在一些实施方案中,该抗PD-L1抗体能够抑制PD-L1和PD-1之间和/或PD-L1和B7-1之间的结合。在一些实施方案中,该抗PD-L1抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中,该抗PD-L1抗体是选自Fab、Fab'-SH、Fv、scFv和(Fab')₂片段的抗体片段。在一些实施方案中,该抗PD-L1抗体是人源化抗体。在一些实施方案中,该抗PD-L1抗体是人抗体。

[0133] 用于本发明方法的抗PD-L1抗体及其制备方法的实例描述于PCT专利申请WO 2010/077634、WO 2007/005874、WO 2011/066389和US2013/034559中,该专利申请在此引入作为参考。用于本发明的抗PD-L1抗体(包括含有这类抗体的组合物)可以与紫杉烷组合使用来治疗癌症。

[0134] 抗PD-1抗体

[0135] 在一些实施方案中,该抗PD-1抗体是MDX-1106。用于“MDX-1106”的备选名称包括MDX-1106-04、ONO-4538、BMS-936558或Nivolumab。在一些实施方案中,该抗PD-1抗体是nivolumab(CAS登记号:946414-94-4)。还在另一实施方案中,提供分离的抗PD-1抗体,其包含含有来自SEQ ID NO:1的重链可变区氨基酸序列的重链可变区和/或含有来自SEQ ID NO:2的轻链可变区氨基酸序列的轻链可变区。还在另一实施方案中,提供分离的抗PD-1抗体,其包含重链和/或轻链序列,其中:

[0136] (a) 重链序列与以下重链序列具有至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性:

[0137] QVQLVESGGGVVQPGRLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDDYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAPLQSSGLYSLSSVTPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHTQKSLSLSLGK (SEQ ID NO:1);和

[0138] (b) 轻链序列与以下轻链序列具有至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性:

[0139] EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASN RATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPRFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYPREA KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFRGEC (SEQ ID NO:2)。

[0140] 抗PD-L1抗体

[0141] 在一些实施方案中,该制剂中的抗体在重链和/或轻链序列中包含至少一个色氨酸(例如至少两个、至少三个、或至少四个)。在一些实施方案中,氨基酸色氨酸在该抗体的HVR区、构架区和/或恒定区中。在一些实施方案中,该抗体在HVR区中包含两个或三个色氨酸残基。在一些实施方案中,该制剂中的抗体是抗PD-L1抗体。PD-L1(程序性死亡配体1)也

称为PDL1、B7-H1、B7-4、CD274和B7-H，是跨膜蛋白质，其与PD-1的相互作用抑制T细胞激活和细胞因子产生。在一些实施方案中，本文所述的抗PD-L1抗体结合人PD-L1。可以用于本文所述方法的抗PD-L1抗体的实例描述于PCT专利申请WO 2010/077634 A1和US 8,217,149中，该专利申请在此以其整体引入作为参考。

[0142] 在一些实施方案中，该抗PD-L1抗体能够抑制PD-L1和PD-1之间和/或PD-L1和B7-1之间的结合。在一些实施方案中，该抗PD-L1抗体是单克隆抗体。在一些实施方案中，该抗PD-L1抗体是选自Fab、Fab'-SH、Fv、scFv和(Fab')2片段的抗体片段。在一些实施方案中，该抗PD-L1抗体是人源化抗体。在一些实施方案中，该抗PD-L1抗体是人抗体。

[0143] WO 2010/077634 A1和US 8,217,149中所述的抗PD-L1抗体可以用于本文所述的方法。在一些实施方案中，该抗PD-L1抗体包含重链可变区序列SEQ ID NO:3和/或轻链可变区序列SEQ ID NO:4。还在另一实施方案中，提供分离的抗PD-L1抗体，其包含重链可变区和/或轻链可变区序列，其中：

[0144] (a) 该重链序列与以下重链序列具有至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性：

[0145] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLTVSA (SEQ ID NO:3)；和

[0146] (b) 该轻链序列与以下轻链序列具有至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性：

[0147] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTLVSA (SEQ ID NO:4)。

[0148] 在一个实施方案中，该抗PD-L1抗体包含含有HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3序列的重链可变区，其中：

[0149] (a) 该HVR-H1序列是GFTFSX₁SWIH (SEQ ID NO:5)；

[0150] (b) 该HVR-H2序列是AWIX₂PYGGSX₃YYADSVKG (SEQ ID NO:6)；

[0151] (c) 该HVR-H3序列是RHWPGGFDY (SEQ ID NO:7)；

[0152] 此外，其中：X₁是D或G；X₂是S或L；X₃是T或S。在一个具体方面，X₁是D；X₂是S；X₃是T。

[0153] 在另一方面，该多肽进一步包含按下式并置在HVR之间的可变区重链构架序列：(HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4)。还在另一方面，该构架区源自人共有构架序列。在另一方面，该构架序列是VH亚组III共有构架。还在另一方面，该构架序列中的至少一个以下：

[0154] HC-FR1是EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO:8)；

[0155] HC-FR2是WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO:9)；

[0156] HC-FR3是RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:10)；

[0157] HC-FR4是WGQGTLVTVSA (SEQ ID NO:11)。

[0158] 还在另一方面，该重链多肽进一步与包含HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3的可变区轻链组合，其中：

[0159] (a) 该HVR-L1序列是RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A (SEQ ID NO:12)；

- [0160] (b) 该HVR-L2序列是SASX₉LX₁₀S (SEQ ID NO:13)；
[0161] (c) 该HVR-L3序列是QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T (SEQ ID NO:14)；

[0162] 其中：X₄是D或V；X₅是V或I；X₆是S或N；X₇是A或F；X₈是V或L；X₉是F或T；X₁₀是Y或A；X₁₁是Y、G、F或S；X₁₂是L、Y、F或W；X₁₃是Y、N、A、T、G、F或I；X₁₄是H、V、P、T或I；X₁₅是A、W、R、P或T。还在另一方面，X₄是D；X₅是V；X₆是S；X₇是A；X₈是V；X₉是F；X₁₀是Y；X₁₁是Y；X₁₂是L；X₁₃是Y；X₁₄是H；X₁₅是A。

[0163] 还在另一方面，该轻链进一步包含按下式并置在HVR之间的可变区轻链构架序列：(LC-FR1) - (HVR-L1) - (LC-FR2) - (HVR-L2) - (LC-FR3) - (HVR-L3) - (LC-FR4)。还在另一方面，该构架序列源自人共有构架序列。还在另一方面，该构架序列是VL_kI共有构架。还在另一方面，该构架序列中的至少一个以下：

- [0164] LC-FR1是DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO:15)；
[0165] LC-FR2是WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO:16)；
[0166] LC-FR3是GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC (SEQ ID NO:17)；
[0167] LC-FR4是FGQQGTKVEIKR (SEQ ID NO:18)。

[0168] 在另一实施方案中，提供分离的抗PD-L1抗体或抗原结合片段，其包含重链和轻链可变区序列，其中：

- [0169] (a) 该重链包含HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3，此外，其中：
[0170] (i) 该HVR-H1序列是GFTFSX₁SWIH (SEQ ID NO:5)；
[0171] (ii) 该HVR-H2序列是AWIX₂PYGGSX₃YYADSVKG (SEQ ID NO:6)；
[0172] (iii) 该HVR-H3序列是RHWPFGFDY (SEQ ID NO:7)；和
[0173] (b) 该轻链包含HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3，此外，其中：
[0174] (i) 该HVR-L1序列是RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A (SEQ ID NO:12)；
[0175] (ii) 该HVR-L2序列是SASX₉LX₁₀S (SEQ ID NO:13)；和
[0176] (iii) 该HVR-L3序列是QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T (SEQ ID NO:14)；
[0177] 其中：X₁是D或G；X₂是S或L；X₃是T或S；X₄是D或V；X₅是V或I；X₆是S或N；X₇是A或F；X₈是V或L；X₉是F或T；X₁₀是Y或A；X₁₁是Y、G、F或S；X₁₂是L、Y、F或W；X₁₃是Y、N、A、T、G、F或I；X₁₄是H、V、P、T或I；X₁₅是A、W、R、P或T。在具体方面，X₁是D；X₂是S；X₃是T。在另一方面，X₄是D；X₅是V；X₆是S；X₇是A；X₈是V；X₉是F；X₁₀是Y；X₁₁是Y；X₁₂是L；X₁₃是Y；X₁₄是H；X₁₅是A。

[0178] 在另一方面，该重链可变区包含按以下并置在HVR之间的一个或多个构架序列：(HC-FR1) - (HVR-H1) - (HC-FR2) - (HVR-H2) - (HC-FR3) - (HVR-H3) - (HC-FR4)，且该轻链可变区包含按以下并置在HVR之间的一个或多个构架序列：(LC-FR1) - (HVR-L1) - (LC-FR2) - (HVR-L2) - (LC-FR3) - (HVR-L3) - (LC-FR4)。还在另一方面，该构架序列源自人共有构架序列。还在另一方面，该重链构架序列源自Kabat亚组I、II或III序列。还在另一方面，该重链构架序列是VH亚组III共有构架。还在另一方面，该重链构架序列中的一个或多个如SEQ ID NO:8、9、10和11所示。还在另一方面，该轻链构架序列源自Kabat_kI、II、III或IV亚组序列。还在另一方面，该轻链构架序列是VL_kI共有构架。还在另一方面，该轻链构架序列中的一个或多个如SEQ ID NO:15、16、17和18所示。

[0179] 还在另一具体方面,该抗体进一步包含人或鼠恒定区。还在另一方面,该人恒定区选自IgG1、IgG2、IgG2、IgG3、IgG4。还在另一具体方面,该人恒定区是IgG1。还在另一方面,该鼠恒定区选自IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3。还在另一方面,该鼠恒定区是IgG2A。还在另一具体方面,该抗体具有减少的或最小的效应子功能。还在另一具体方面,该最小的效应子功能源自“无效应子功能的Fc突变”或无岩藻糖基化。还在另一实施方案中,该无效应子功能的Fc突变是恒定区中的N297A或D265A/N297A取代。

[0180] 还在另一实施方案中,提供包含重链和轻链可变区序列的抗PD-L1抗体,其中:

[0181] (a) 该重链进一步包含分别与GFTFSDSWIH (SEQ ID NO:19)、AWISPYGGSTYYADSVKKG (SEQ ID NO:20) 和RHWPFGFDY (SEQ ID NO:21) 具有至少85%序列同一性的HVR-H1、HVR-H2 和HVR-H3序列;或

[0182] (b) 该轻链进一步包含分别与RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:22)、SASFYLS (SEQ ID NO:23) 和QQYLYHPAT (SEQ ID NO:24) 具有至少85%序列同一性的HVR-L1、HVR-L2 和HVR-L3序列。

[0183] 在具体方面,该序列同一性为86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

[0184] 在另一方面,该重链可变区包含按以下并置在HVR之间的一个或多个构架序列:(HC-FR1)-(HVR-H1)-(HC-FR2)-(HVR-H2)-(HC-FR3)-(HVR-H3)-(HC-FR4),且该轻链可变区包含按以下并置在HVR之间的一个或多个构架序列:(LC-FR1)-(HVR-L1)-(LC-FR2)-(HVR-L2)-(LC-FR3)-(HVR-L3)-(LC-FR4)。还在另一方面,该构架序列源自人共有构架序列。还在另一方面,该重链构架序列源自Kabat亚组I、II或III序列。还在另一方面,该重链构架序列是VH亚组III共有构架。还在另一方面,该重链构架序列中的一个或多个如SEQ ID NO:8、9、10和11所示。还在另一方面,该轻链构架序列源自Kabat I、II、II或IV亚组序列。还在另一方面,该轻链构架序列是VL κ I共有构架。还在另一方面,该轻链构架序列中的一个或多个如SEQ ID NO:15、16、17和18所示。

[0185] 还在另一具体方面,该抗体进一步包含人或鼠恒定区。还在另一方面,该人恒定区选自IgG1、IgG2、IgG2、IgG3、IgG4。还在另一具体方面,该人恒定区是IgG1。还在另一方面,该鼠恒定区选自IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3。还在另一方面,该鼠恒定区是IgG2A。还在另一具体方面,该抗体具有减少的或最小的效应子功能。还在另一具体方面,该最小的效应子功能源自“无效应子功能的Fc突变”或无岩藻糖基化。还在另一实施方案中,该无效应子功能的Fc突变是恒定区中的N297A或D265A/N297A取代。

[0186] 在另一实施方案中,提供分离的抗PD-L1抗体,其包含重链和轻链可变区序列,其中:

[0187] (a) 该重链序列与以下重链序列具有至少85%序列同一性:

[0188] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGFDYWGQGTLTVSS (SEQ ID NO:25);和/或

[0189] (b) 该轻链序列与以下轻链序列具有至少85%序列同一性:

[0190] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFLTLSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:4)。

[0191] 在具体方面,该序列同一性为86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、

94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。在另一方面,该重链可变区包含按以下并置在HVR之间的一个或多个构架序列: (HC-FR1) - (HVR-H1) - (HC-FR2) - (HVR-H2) - (HC-FR3) - (HVR-H3) - (HC-FR4), 且该轻链可变区包含按以下并置在HVR之间的一个或多个构架序列: (LC-FR1) - (HVR-L1) - (LC-FR2) - (HVR-L2) - (LC-FR3) - (HVR-L3) - (LC-FR4)。还在另一方面,该构架序列源自人共有构架序列。还在另一方面,该重链构架序列源自Kabat亚组I、II或III序列。还在另一方面,该重链构架序列是VH亚组III共有构架。还在另一方面,该重链构架序列中的一个或多个如SEQ ID NO:8、9、10和WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:27) 所示。

[0192] 还在另一方面,该轻链构架序列源自Kabat I、II、III或IV亚组序列。还在另一方面,该轻链构架序列是VL κ I共有构架。还在另一方面,该轻链构架序列中的一个或多个如SEQ ID NO:15、16、17和18所示。

[0193] 还在另一具体方面,该抗体进一步包含人或鼠恒定区。还在另一方面,该人恒定区选自IgG1、IgG2、IgG2、IgG3、IgG4。还在另一具体方面,该人恒定区是IgG1。还在另一方面,该鼠恒定区选自IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3。还在另一方面,该鼠恒定区是IgG2A。还在另一具体方面,该抗体具有减少的或最小的效应子功能。还在另一具体方面,该最小的效应子功能源自于在原核细胞中产生。还在另一具体方面,该最小的效应子功能源自于“无效应子功能的Fc突变”或无岩藻糖基化。还在另一实施方案中,该无效应子功能的Fc突变是恒定区中的N297A或D265A/N297A取代。

[0194] 在另一方面,该重链可变区包含按以下并置在HVR之间的一个或多个构架序列: (HC-FR1) - (HVR-H1) - (HC-FR2) - (HVR-H2) - (HC-FR3) - (HVR-H3) - (HC-FR4), 且该轻链可变区包含按以下并置在HVR之间的一个或多个构架序列: (LC-FR1) - (HVR-L1) - (LC-FR2) - (HVR-L2) - (LC-FR3) - (HVR-L3) - (LC-FR4)。还在另一方面,该构架序列源自人共有构架序列。还在另一方面,该重链构架序列源自Kabat亚组I、II或III序列。还在另一方面,该重链构架序列是VH亚组III共有构架。还在另一方面,该重链构架序列中的一个或多个是以下:

	HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS	(SEQ ID NO:29)
	HC-FR2	WVRQAPGKGLEWVA	(SEQ ID NO:30)
[0195]	HC-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO:10)
	HC-FR4	WGQGTLVTVSS	(SEQ ID NO:27)

[0196] 还在另一方面,该轻链构架序列源自Kabat I、II、III或IV亚组序列。还在另一方面,该轻链构架序列是VL κ I共有构架。还在另一方面,该轻链构架序列中的一个或多个是以下:

	LC-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	(SEQ ID NO:15)
	LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO:16)
[0197]	LC-FR3	GVPSRFGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO:17)
	LC-FR4	FGQGTTKVEIK	(SEQ ID NO:28)

[0198] 还在另一具体方面,该抗体进一步包含人或鼠恒定区。还在另一方面,该人恒定区选自IgG1、IgG2、IgG2、IgG3、IgG4。还在另一具体方面,该人恒定区是IgG1。还在另一方面,该鼠恒定区选自IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3。还在另一方面,该鼠恒定区是IgG2A。还在另一具体方面,该抗体具有减少的或最小的效应子功能。还在另一具体方面,该最小的效应子功能

源自“无效应子功能的Fc突变”或无岩藻糖基化。还在另一实施方案中,该无效应子功能的Fc突变是恒定区中的N297A或D265A/N297A取代。

[0199] 还在另一实施方案中,提供包含重链和轻链可变区序列的抗PD-L1抗体,其中:

[0200] (c) 该重链进一步包含分别与GFTFSDSWIH (SEQ ID NO:19)、AWISPYGGSTYYADSVKKG (SEQ ID NO:20) 和RHWPGGF DY (SEQ ID NO:21) 具有至少85%序列同一性的HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3序列;和/或

[0201] (d) 该轻链进一步包含分别与RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:22)、SASFYLS (SEQ ID NO:23) 和QQYLYHPAT (SEQ ID NO:24) 具有至少85%序列同一性的HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3序列。

[0202] 在具体方面,该序列同一性为86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%。

[0203] 在另一方面,该重链可变区包含按以下并置在HVR之间的一个或多个构架序列:(HC-FR1) - (HVR-H1) - (HC-FR2) - (HVR-H2) - (HC-FR3) - (HVR-H3) - (HC-FR4),且该轻链可变区包含按以下并置在HVR之间的一个或多个构架序列:(LC-FR1) - (HVR-L1) - (LC-FR2) - (HVR-L2) - (LC-FR3) - (HVR-L3) - (LC-FR4)。还在另一方面,该构架序列源自人共有构架序列。还在另一方面,该重链构架序列源自Kabat亚组I、II或III序列。还在另一方面,该重链构架序列是VH亚组III共有构架。还在另一方面,该重链构架序列中的一个或多个如SEQ ID NO:8、9、10和WGQGTLVTVSSASTK (SEQ ID NO:31) 所示。

[0204] 还在另一方面,该轻链构架序列源自Kabat I、II、III或IV亚组序列。还在另一方面,该轻链构架序列是VL κ I共有构架。还在另一方面,该轻链构架序列中的一个或多个如SEQ ID NO:15、16、17和18所示。还在另一具体方面,该抗体进一步包含人或鼠恒定区。还在另一方面,该人恒定区选自IgG1、IgG2、IgG2、IgG3、IgG4。还在另一具体方面,该人恒定区是IgG1。还在另一方面,该鼠恒定区选自IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3。还在另一方面,该鼠恒定区是IgG2A。还在另一具体方面,该抗体具有减少的或最小的效应子功能。还在另一具体方面,该最小的效应子功能源自“无效应子功能的Fc突变”或无岩藻糖基化。还在另一实施方案中,该无效应子功能的Fc突变是恒定区中的N297A或D265A/N297A取代。

[0205] 还在另一实施方案中,提供分离的抗PD-L1抗体,其包含重链和轻链可变区序列,其中:

[0206] (a) 该重链序列与以下重链序列具有至少85%序列同一性:

[0207] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIH WVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGF DYWGQGTLVTVSSASTK (SEQ ID NO:26);或

[0208] (b) 该轻链序列与以下轻链序列具有至少85%序列同一性:

[0209] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO:4)。

[0210] 在一些实施方案中,提供分离的抗PD-L1抗体,其包含重链和轻链可变区序列,其中该轻链可变区序列与氨基酸序列SEQ ID NO:4具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,提供分离的抗PD-L1抗体,其包含重链和轻链可变区序列,其中该重链可变区序列与氨基酸序列SEQ ID NO:

26具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,提供分离的抗PD-L1抗体,其包含重链和轻链可变区序列,其中该轻链可变区序列与氨基酸序列SEQ ID NO:4具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性,且该重链可变区序列与氨基酸序列SEQ ID NO:26具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%序列同一性。在一些实施方案中,可以缺失、取代或修饰重链和/或轻链N端的一个、两个、三个、四个或五个氨基酸残基。

[0211] 还在另一实施方案中,提供分离的抗PD-L1抗体,其包含重链和轻链序列,其中:

[0212] (a) 该重链序列与以下重链序列具有至少85%序列同一性:

[0213] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVEQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGF DYWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSWNSGALTSGVHTFPAPLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:32);和/或

[0214] (b) 该轻链序列与以下轻链序列具有至少85%序列同一性:

[0215] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFYSGVPSRFSGSGSTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLHPATFGQGKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:33)。

[0216] 在一些实施方案中,提供分离的抗PD-L1抗体,其包含重链和轻链序列,其中该轻链序列与氨基酸序列SEQ ID NO:33具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性。在一些实施方案中,提供分离的抗PD-L1抗体,其包含重链和轻链序列,其中该重链序列与氨基酸序列SEQ ID NO:32具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性。在一些实施方案中,提供分离的抗PD-L1抗体,其包含重链和轻链序列,其中该轻链序列与氨基酸序列SEQ ID NO:33具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性,且该重链序列与氨基酸序列SEQ ID NO:32具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性。

[0217] 在一些实施方案中,该分离的抗PD-L1抗体是无糖基化的。抗体的糖基化通常是N

连接的或O连接的。N连接指糖类部分附着于天冬酰胺残基侧链。三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸(其中X是除脯氨酸外的任意氨基酸)是酶促附着糖类部分至天冬酰胺侧链的识别序列。因此,这些三肽序列的任一个在多肽中的存在产生潜在的糖基化位点。O连接糖基化指糖N-乙酰半乳糖胺、半乳糖或木糖之一附着于羟基氨基酸,该羟基氨基酸最常是丝氨酸或苏氨酸,但也可以使用5-羟脯氨酸或5-羟赖氨酸。通过改变氨基酸序列,使得去除上述三肽序列之一(对于N连接糖基化位点)来方便地从抗体去除糖基化位点。该改变可以通过用另一氨基酸残基(例如甘氨酸、丙氨酸或保守取代)取代糖基化位点内的天冬酰胺、丝氨酸或苏氨酸残基来进行。

[0218] 在本文的任意实施方案中,该分离的抗PD-L1抗体可以结合人PD-L1,例如UniProtKB/Swiss-Prot检索号Q9NZQ7.1中所示的人PD-L1,或其变体。

[0219] 还在另一实施方案中,提供分离的编码本文所述任意抗体的核酸。在一些实施方案中,该核酸进一步包含适合用于表达编码之前所述的任意抗PD-L1抗体的核酸的载体。还在另一具体方面,该载体处于适合用于表达该核酸的宿主细胞中。还在另一具体方面,该宿主细胞是真核细胞或原核细胞。还在另一具体方面,该真核细胞是哺乳动物细胞,如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

[0220] 抗体或其抗原结合片段可以用本领域已知的方法制备,例如,通过包括以下的方法:在适于产生这种抗体或片段的条件下,培养包含适合用于表达的形式的编码之前所述任意抗PD-L1抗体或抗原结合片段的核酸的宿主细胞,并回收抗体或片段。

[0221] III. 抗体制备

[0222] 本文所述的抗体可以用本领域可用的用于产生抗体的技术制备,其示例性方法更详细地描述于以下章节中。

[0223] 该抗体针对目的抗原(例如PD-L1(如人PD-L1)、PD1(如人PD-L1)、PD-L2(如人PD-L2)等。优选地,该抗原是生物学上重要的多肽,对患有障碍的哺乳动物施用该抗体可以在该哺乳动物中产生治疗益处。

[0224] 在某些实施方案中,本文提供的抗体具有 $\leq 1\mu M$ 、 $\leq 150nM$ 、 $\leq 100nM$ 、 $\leq 50nM$ 、 $\leq 10nM$ 、 $\leq 1nM$ 、 $\leq 0.1nM$ 、 $\leq 0.01nM$ 或 $\leq 0.001nM$ (例如 $10^{-8}M$ 或更小,例如从 $10^{-8}M$ 至 $10^{-13}M$,例如从 $10^{-9}M$ 至 $10^{-13}M$)的解离常数(Kd)。

[0225] 在一个实施方案中,通过用以下测定所述的Fab形式的目的抗体及其抗原进行的放射性标记抗原结合测定(RIA)来测量Kd。通过在未标记抗原的滴定系列的存在下用最小浓度的(^{125}I)-标记抗原平衡Fab,然后用抗-Fab抗体包被的平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,J.Mol.Biol.293:865-881(1999))。为了确定用于测定的条件,用含 $5\mu g/ml$ 捕获抗-Fab抗体(Cappel Labs)的 $50mM$ 碳酸钠(pH 9.6)过夜包被**MICROTITER[®]**多孔板(Thermo Scientific),然后用含2% (w/v)牛血清白蛋白的PBS在室温(约 $23^{\circ}C$)封闭2至5小时。在非吸附平板(Nunc#269620)中,将 $100pM$ 或 $26pM$ $[^{125}I]$ -抗原与目的Fab的系列稀释液混合。然后过夜孵育目的Fab;但是,孵育可以持续更长时期(例如约65小时),以确保达到平衡。然后,将混合物转移至捕获平板进行室温孵育(例如孵育1小时)。然后去除溶液,用含0.1%聚山梨酸酯20(**TWEEN-20[®]**)的PBS洗涤平板8次。平板干燥后,加入 $150\mu l/孔$ 的闪烁体(MICROSCINT-20TM;Packard),在TOPCOUNTTM γ 计数

器 (Packard) 上计数平板10分钟。选择给出小于或等于最大结合的20%的每种Fab的浓度用于竞争结合测定。

[0226] 根据另一实施方案,用约10个响应单位 (RU) 的固定化抗原CM5芯片,在25℃下使用 **BIACORE®-2000**或 **BIACORE®-3000** (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ),用表面等离振子共振测定来测量Kd。简言之,按照厂家说明书用N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺盐酸盐 (EDC) 和N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 活化羧甲基化葡聚糖生物传感芯片 (CM5, BIACORE, Inc.)。用10mM醋酸钠pH 4.8将抗原稀释至5μg/ml (约0.2μM),然后按5μl/分钟的流速注入,以达到约10个响应单位 (RU) 的偶联蛋白质。注入抗原后,注入1M乙醇胺,以封闭未反应的基团。对于动力学测量,按约25μl/分钟的流速在25℃下注入两倍系列稀释于含0.05%聚山梨酸酯20 (TWEEN20™) 表面活性剂的PBS (PBST) 中的Fab (0.78nM至500nM)。通过同时拟合结合和解离传感图,用简单的1:1Langmuir结合模型 (**BIACORE® Evaluation Software** version 3.2) 计算结合速率 (k_{on}) 和解离速率 (k_{off})。将平衡解离常数 (Kd) 计算为比值 k_{off}/k_{on} 。参见例如Chen等, *J. Mol. Biol.* 293:865-881 (1999)。如果通过以上表面等离振子共振测定测量的结合速率超过 $10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$,则可以通过使用荧光淬灭技术来测定结合速率,如在分光计,如装配停流的分光光度计 (Aviv Instruments) 或具有搅拌杯的8000系列SLM-AMINCO™分光光度计 (ThermoSpectronic) 中测量,该技术在浓度递增的抗原存在下测量含20nM抗抗原的抗体 (Fab形式) 的PBS pH7.2在25℃下的荧光发射强度 (激发=295nm;发射=340nm, 16nm带通) 的提高或降低。

[0227] (i) 抗原制备

[0228] 可以用可选地与其他分子缀合的可溶性抗原或其片段作为免疫原来产生抗体。对于跨膜分子,如受体,可以用这些的片段 (例如受体的胞外域) 作为免疫原。备选地,可以用表达该跨膜分子的细胞作为免疫原。这类细胞可以源自天然来源 (例如癌细胞系) 或可以是通过重组技术转化来表达该跨膜分子的细胞。用于制备抗体的其他抗原及其形式对本领域技术人员而言将显而易见。

[0229] (ii) 某些基于抗体的方法

[0230] 多克隆抗体优选通过多次皮下 (sc) 或腹腔内 (ip) 注射相关抗原和佐剂来在动物中制备。用双功能剂或衍生剂 (例如马来酰亚胺基苯甲酰基碘基琥珀酰亚胺酯 (通过半胱氨酸残基缀合)、N-羟基琥珀酰亚胺 (通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酰、SOC1₂或R¹N=C=NR, 其中R和R¹是不同的烷基) 将相关抗原与在待免疫的物种中具有免疫原性的多肽 (例如匙孔血蓝蛋白、血清白蛋白、牛甲状腺球蛋白或大豆胰蛋白酶抑制剂) 缀合可以是有用的。

[0231] 通过将例如100μg或5μg的蛋白质或缀合物 (分别对于兔或小鼠) 与3体积的弗氏完全佐剂组合,并在多个部位皮内注射该溶液来针对抗原、免疫原性缀合物或衍生物免疫动物。一个月后,通过在多个部位皮下注射来用弗氏完全佐剂中的初始量的1/5至1/10的肽或缀合物加强免疫动物。7至14天后,对动物进行采血,并测定血清的抗体效价。加强免疫动物,直至效价平台期。优选地,用同一抗原的缀合物加强免疫动物,但该抗原与不同的蛋白质缀合和/或通过不同的交联剂缀合。缀合物还可以作为蛋白质融合在重组细胞培养物中制备。另外,适宜地用诸如明矾的聚集剂来增强免疫反应。

[0232] 本发明的单克隆抗体可以用杂交瘤法制备,该杂交瘤法最先由Kohler等, *Nature*,

256:495 (1975) 描述,并进一步描述于例如Hongo等,Hybridoma,14 (3) :253-260 (1995); Harlow等, *Antibodies:A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory出版社,第2版1988); Hammerling等,in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981); 及Ni, *Xiandai Mianyxue*, 26 (4) :265-268 (2006) (关于人-人杂交瘤) 中。其他方法包括描述于例如美国专利号7,189,826 (关于从杂交瘤细胞系产生单克隆人天然IgM抗体) 中的那些。人杂交瘤技术(三元杂交瘤技术) 描述于Vollmers和Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20 (3) :927-937 (2005) 及Vollmers和Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27 (3) :185-91 (2005) 中。

[0233] 对于多种其他杂交瘤技术,参见例如美国专利公开号2006/258841、2006/183887 (全人抗体)、2006/059575、2005/287149、2005/100546和2005/026229; 及美国专利号7,078,492和7,153,507。用于用杂交瘤法产生单克隆抗体的示例性流程描述如下。在一个实施方案中,免疫小鼠或其他适宜的宿主动物(如仓鼠),以引出产生或能够产生将特异性结合用于免疫的蛋白质的抗体的淋巴细胞。通过多次皮下(SC)或腹腔内(IP)注射本发明的多肽或其片段和佐剂(如单磷酰脂质A (MPL) / trehalose dicrynomycolate (TDM) (Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, MT)) 来在动物中制备抗体。本发明的多肽(例如抗原)或其片段可以用本领域公知的方法制备,如重组方法,其中一些在本文中进一步描述。针对对抗原的抗体测定来自免疫动物的血清,可选地施用加强免疫。分离来自产生抗抗原的抗体的动物的淋巴细胞。备选地,可以体外免疫淋巴细胞。

[0234] 然后用适宜的融合剂(如聚乙二醇)使淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合形成杂交瘤细胞。参见例如Goding, *Monoclonal Antibodies:Principles and Practice*, 59-103页 (Academic出版社, 1986)。可以使用高效融合、通过所选择的产抗体细胞支持抗体的稳定高水平产生、且对诸如HAT培养基的培养基敏感的骨髓瘤细胞。示例性骨髓瘤细胞包括但不限于鼠骨髓瘤细胞系,如可从Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA获得的衍生自MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤的那些,及可从American Type Culture Collection, Rockville, Md. USA获得的SP-2或X63-Ag8-653细胞。还针对人单克隆抗体的产生描述了人骨髓瘤和小鼠-人杂骨髓瘤(heteromyeloma)细胞系(Kozbor, *J. Immunol.* 133:3001 (1984); Brodeur等, *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, 51-63页 (Marcel Dekker, Inc., 纽约, 1987))。

[0235] 将这样制备的杂交瘤细胞接种和培养在适宜的培养基中,例如包含一种或多种抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞生长或存活的物质的培养基。例如,如果亲本骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT或HPRT),则用于杂交瘤的培养基通常将包含次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷(HAT培养基),这些物质阻止缺乏HGPRT的细胞生长。优选地,按例如Even等, *Trends in Biotechnology*, 24 (3) , 105-108 (2006) 中所述,使用无血清杂交瘤细胞培养法,以减少动物来源的血清如胎牛血清的使用。

[0236] Franek, *Trends in Monoclonal Antibody Research*, 111-122 (2005) 中描述了寡肽作为用于提高杂交瘤细胞培养物的生产力的工具。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),或富含蛋白质水解产物级分,由三至六个氨基酸残基组成的合成寡肽可以显著抑制凋亡。该肽以毫摩尔或更高浓度存在。

[0237] 可以针对结合本发明的抗体的单克隆抗体的产生测定杂交瘤细胞在其中生长的培养基。由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性可以通过免疫沉淀或通过体外结合测定如放射免疫测定 (RIA) 或酶联免疫吸附测定 (ELISA) 来测定。单克隆抗体的结合亲和力可以例如通过Scatchard分析来测定。参见例如Munson等,Anal.Biochem., 107:220 (1980)。

[0238] 鉴定出产生具有希望得到的特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后, 可以通过有限稀释法亚克隆该克隆, 并通过标准方法培养。参见例如Goding, 上文。适合用于此目的的培养基包括例如D-MEM或RPMI-1640培养基。此外, 可以在动物中作为腹水肿瘤体内培养杂交瘤细胞。通过常规免疫球蛋白纯化方法(例如蛋白A-Sepharose、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析或亲和层析)适宜地从培养基、腹水或血清分离由亚克隆分泌的单克隆抗体。US 2005/176122和美国专利号6,919,436中描述了一种用于从杂交瘤细胞分离蛋白质的方法。该方法包括在结合过程中使用最少的盐如易溶性盐, 且优选还在洗脱过程中使用小量有机溶剂。

[0239] (iii) 文库衍生的抗体

[0240] 可以针对具有一种或多种希望得到的活性的抗体筛选组合文库来分离本发明的抗体。例如, 本领域已知用于产生噬菌体展示文库并针对具有希望得到的结合特征的抗体筛选这类文库的多种方法。其他方法综述于例如Hoogenboom等 in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O' Brien等, 编辑, Human出版社, Totowa, NJ, 2001) 中, 并进一步描述于例如McCafferty等, Nature 348:552-554; Clackson等, Nature 352:624-628 (1991); Marks等, J.Mol.Biol.222:581-597 (1992); Marks和Bradbury, in Methods in Molecular Biology 248:161-175 (Lo, 编辑, Human出版社, Totowa, NJ, 2003); Sidhu等, J.Mol.Biol.338 (2):299-310 (2004); Lee等, J.Mol.Biol.340 (5):1073-1093 (2004); Fellouse, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 101 (34):12467-12472 (2004); 及Lee等, J.Immunol.Methods 284 (1-2):119-132 (2004) 中。

[0241] 在某些噬菌体展示法中, 通过聚合酶链反应 (PCR) 分别克隆VH和VL基因库, 并在噬菌体文库中随机组合, 然后按Winter等, Ann.Rev.Immunol., 12:433-455 (1994) 中所述针对抗原结合噬菌体筛选该文库。噬菌体通常将抗体片段展示为单链Fv (scFv) 片段或Fab片段。来自免疫来源的文库提供抗免疫原的高亲和力抗体而无需构建杂交瘤。备选地, 可以按Griffiths等, EMBO J, 12:725-734 (1993) 所述克隆(例如从人)首次用于实验的库来提供抗广范围的非自身以及自身抗原的抗体的单一来源而无需任何免疫。最后, 还可以按Hoogenboom和Winter, J.Mol.Biol., 227:381-388 (1992) 所述, 通过以下来合成制备首次用于实验的文库: 从干细胞克隆未重排的V基因区段, 用包含随机序列的PCR引物来编码高变的CDR3区, 并实现体外重排。描述人抗体噬菌体文库的专利公开包括例如美国专利号5,750,373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。

[0242] 本文将从人抗体文库分离的抗体或抗体片段视为人抗体或人抗体片段。

[0243] (iv) 嵌合抗体、人源化抗体和人抗体

[0244] 在某些实施方案中, 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及Morrison等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 81:6851-6855 (1984) 中。在一个实例中, 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(如猴)

的可变区)和人恒定区。在另一实例中,嵌合抗体是“种类转换”抗体,其中种类或亚类已从亲本抗体的种类或亚类改变。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0245] 在某些实施方案中,嵌合抗体是人源化抗体。通常,人源化非人抗体来降低对人类的免疫原性,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,FR(或其部分)源自人抗体序列。人源化抗体还将可选地包含至少部分人恒定区。在一些实施方案中,用来自非人抗体(例如从其衍生HVR残基的抗体)的相应残基取代人源化抗体中的一些FR残基,例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0246] 人源化抗体和制备它们的方法综述于例如Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008)中,并进一步描述于例如Riechmann等,Nature332:323-329(1988);Queen等,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,Methods 36:25-34(2005)(描述SDR(a-CDR)移植);Padlan,Mol.Immunol.28:489-498(1991)(描述“表面重建”);Dall'Acqua等,Methods36:43-60(2005)(描述“FR改组”);Osbourne等,Methods 36:61-68(2005);及Klimka等,Br.J.Cancer,83:252-260(2000)(描述FR改组的“指导选择”法)中。

[0247] 可以用于人源化的人构架区包括但不限于:用“最适”法选择的构架区(参见例如Sims等J.Immunol.151:2296(1993));源自具体亚组的轻链或重链可变区的人抗体的共有序列的构架区(参见例如Carter等Proc.Nat'l Acad.Sci.USA,89:4285(1992);及Presta等J.Immunol.,151:2623(1993));人成熟(体细胞突变)构架区或人种系构架区(参见例如Almagro和Fransson,Front.Biosci.13:1619-1633(2008));和源自筛选FR文库的构架区(参见例如Baca等,J.Biol.Chem.272:10678-10684(1997)和Rosok等,J.Biol.Chem.271:22611-22618(1996))。

[0248] 在某些实施方案中,本文提供的抗体是人抗体。可以用本领域已知的多种技术产生人抗体。人抗体一般地描述于van Dijk和van de Winkel,Curr.Opin.Pharmacol.5:368-74(2001)及Lonberg,Curr.Opin.Immunol.20:450-459(2008)中。

[0249] 可以通过对转基因动物施用免疫原来制备人抗体,该转基因动物已修饰为响应抗原攻击而产生完整人抗体或具有人可变区的完整抗体。这类动物通常包含全部或部分人免疫球蛋白基因座,其取代内源免疫球蛋白基因座,或其存在于染色体外,或随机整合入动物的染色体。在这类转基因小鼠中,内源免疫球蛋白基因座通常已失活。用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)。还参见例如描述XENOMOUSETM技术的美国专利号6,075,181和US 6,150,584;描述**HUMAB**®技术的美国专利号5,770,429;描述**K-M MOUSE**®技术的美国专利号7,041,870;描述**VELOCIMOUSE**®技术的美国专利申请公开号2007/0061900。可以例如通过与不同的人恒定区组合来进一步修饰来自这类动物所产生的完整抗体的人可变区。

[0250] 还可以通过基于杂交瘤的方法来制备人抗体。已描述了用于产生单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人杂骨髓瘤细胞系。(参见例如Kozbor J.Immunol.,133:3001(1984);Brodeur等,Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications,51-63页(Marcel Dekker,Inc.,New York,1987);和Boerner等,J.Immunol.,147:86(1991))。通过

人B细胞杂交瘤技术产生的人抗体也描述于Li等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,103:3557-3562 (2006) 中。其他方法包括描述于例如美国专利号7,189,826 (描述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) (描述人-人杂交瘤) 中的那些。人杂交瘤技术(三元杂交瘤技术) 还描述于Vollmers和Brandlein,Histology and Histopathology,20 (3) :927-937 (2005) 及Vollmers和Brandlein,Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology,27 (3) :185-91 (2005) 中。

[0251] 还可以通过分离选自人衍生噬菌体展示文库的Fv克隆可变结构域序列来产生人抗体。然后可以将这类可变结构域序列与希望的人恒定结构域组合。下文描述用于从抗体文库选择人抗体的技术。

[0252] (v) 抗体片段

[0253] 抗体片段可以通过传统手段(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全抗体有优势。片段较小的尺寸允许快速清除,且可以导致对实体瘤的接近性改善。某些抗体片段的综述参见Hudson等(2003) Nat.Med.9:129-134。

[0254] 已发展了多种技术来产生抗体片段。通常,通过完整抗体的蛋白水解消化来衍生这些片段(参见例如Morimoto等,Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992);及Brennan等,Science 229:81 (1985))。但是,现在可以通过重组宿主细胞直接产生这些片段。Fab、Fv和ScFv抗体片段全都可以在大肠杆菌(E.coli)中表达并从大肠杆菌分泌,从而允许轻易产生大量这些片段。可以从上文讨论的抗体噬菌体文库分离抗体片段。备选地,可以从大肠杆菌直接回收Fab'-SH片段,并化学偶联形成F(ab')₂片段(Carter等,Bio/Technology 10:163-167 (1992))。根据另一种方法,可以从重组宿主细胞培养物直接分离F(ab')₂片段。美国专利号5,869,046中描述了包含挽救受体结合表位残基的具有增加的体内半衰期的Fab和F(ab')₂片段。用于产生抗体片段的其他技术对熟练的从业者而言显而易见。在某些实施方案中,抗体是单链Fv片段(scFv)。参见例如W0 93/16185、美国专利号5,571,894和美国专利号5,587,458。Fv和scFv是缺乏恒定区的具有完整结合部位的仅有的种类;因此,它们可适合用于减少体内使用期间的非特异性结合。可以构建scFv融合蛋白质来在scFv的氨基端或羧基端产生效应蛋白质的融合。参见Antibody Engineering,Borrebaeck编辑,上文。抗体片段还可以是例如描述于例如美国专利号5,641,870中的“线性抗体”。这类线性抗体可以是单特异性的或双特异性的。

[0255] (vi) 多特异性抗体

[0256] 多特异性抗体对至少两个不同表位具有结合特异性,其中该表位通常来自不同抗原。虽然这类分子通常将仅结合两个不同表位(即双特异性抗体BsAb),但在本文中使用时,具有附加特异性的抗体如三特异性抗体也为表述所涵盖。双特异性抗体可以作为全长抗体或抗体片段(例如F(ab')₂双特异性抗体)制备。

[0257] 用于制备双特异性抗体的方法为本领域已知。全长双特异性抗体的传统产生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(参见例如Millstein等,Nature 305:537-539 (1983))。由于免疫球蛋白重链和轻链的随机分配,这些杂交瘤(四价体杂交瘤(quadromas))产生10种不同抗体分子的可能的混合物,其中只有一种具有正确的双特异性结构。正确分子的纯化(通常通过亲和层析步骤进行)非常麻烦,且产物产率低。W0 93/08829和Traunecker等,EMBO J.,10:3655-3659 (1991) 中公开了类似的

方法。

[0258] 本领域已知的一种用于制备双特异性抗体的方法是“杵入臼”或“凸起进入凹陷”法(参见美国专利号5,731,168)。在此方法中,两条免疫球蛋白多肽(例如重链多肽)各包含界面。一条免疫球蛋白多肽的界面与另一条免疫球蛋白多肽上对应的界面相互作用,从而允许两条免疫球蛋白多肽结合。可以这样改造这些界面,使得定位在一条免疫球蛋白多肽的界面中的“杵”或“凸起”(这些术语在本文中可互换使用)对于定位在另一条免疫球蛋白多肽的界面中的“臼”或“凹陷”(这些术语在本文中可互换使用)。在一些实施方案中,该臼与该杵具有相同或相似的大小,适宜地放置,使得在两个界面相互作用时,一个界面的杵可定位在另一个界面对应的臼中。不希望受限于理论,认为这稳定了异源多聚体,偏向形成异源多聚体而不是其他种类例如同源多聚体。在一些实施方案中,此方法可用于促进两条不同免疫球蛋白多肽的异源多聚化,产生对不同表位具有结合特异性的包含两条免疫球蛋白多肽的双特异性抗体。

[0259] 在一些实施方案中,杵可以通过用较大的侧链取代小的氨基酸侧链来构建。在一些实施方案中,臼可以通过用较小的侧链取代大的氨基酸侧链来构建。杵或臼可以存在于原始界面中,或者它们可以合成引入。例如,通过改变编码界面的核酸序列以用至少一个“输入”氨基酸残基取代至少一个“原始”氨基酸残基,可以合成引入杵或臼。用于改变核酸序列的方法可以包括本领域公知的标准分子生物学技术。下表中显示多种氨基酸残基的侧链体积。在一些实施方案中,原始残基具有小的侧链体积(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),用于形成杵的输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。在一些实施方案中,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),用于形成臼的输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。

[0260] 表1:氨基酸残基的特性

氨基酸	单字母缩写	质量 ^a (道尔顿)	体积 ^b (\AA^3)	可接近的表面积 ^c (\AA^2)
丙氨酸(Ala)	A	71.08	88.6	115
精氨酸(Arg)	R	156.20	173.4	225
天冬酰胺(Asn)	N	114.11	117.7	160
天冬氨酸(Asp)	D	115.09	111.1	150
半胱氨酸(Cys)	C	103.14	108.5	135
谷氨酰胺(Gln)	Q	128.14	143.9	180
谷氨酸(Glu)	E	129.12	138.4	190
甘氨酸(Gly)	G	57.06	60.1	75
组氨酸(His)	H	137.15	153.2	195
异亮氨酸(Ile)	I	113.17	166.7	175
亮氨酸(Leu)	L	113.17	166.7	170
赖氨酸(Lys)	K	128.18	168.6	200
甲硫氨酸(Met)	M	131.21	162.9	185
苯丙氨酸(Phe)	F	147.18	189.9	210

[0261]

氨基酸	单字母缩写	质量 ^a (道尔顿)	体积 ^b (\AA^3)	可接近的表面积 ^c (\AA^2)
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

[0262] [0263] ^a氨基酸分子量减去水的分子量。来自Handbook of Chemistry and Physics, 第43版Cleveland, Chemical Rubber Publishing Co., 1961的值。

[0264] ^b来自A.A.Zamyatnin, Prog. Biophys. Mol. Biol. 24:107-123, 1972的值。

[0265] ^c来自C.Chothia, J. Mol. Biol. 105:1-14, 1975的值。可接近的表面积在此参考文献的图6-20中定义。

[0266] 在一些实施方案中,根据异源多聚体的三维结构鉴定用于形成杵或臼的原始残基。本领域已知的用于获得三维结构的技术可以包括X射线晶体分析法和NMR。在一些实施方案中,该界面是免疫球蛋白恒定结构域的CH3结构域。在这些实施方案中,人IgG1的CH3/CH3界面涉及定位在四个反向平行 β -链上的每个结构域上的16个残基。不希望受限于理论,突变的残基优选定位在两个中央反向平行 β -链上,以最小化杵可被周围溶剂而不是配偶CH3结构域中的补偿臼容纳的风险。在一些实施方案中,形成两条免疫球蛋白多肽中对应的杵和臼的突变对应于下表中提供的一对或多对。

[0267] 表2:形成对应的杵和臼的突变的示例性组

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

[0268] [0269] 突变表示为:原始残基,后随使用Kabat编号系统的位置,然后是输入残基(所有残基都以单字母氨基酸密码给出)。多个突变通过冒号分开。

[0270] 在一些实施方案中,免疫球蛋白多肽包含含有以上表2中所列的一个或多个氨基酸取代的CH3结构域。在一些实施方案中,双特异性抗体包含含有以上表2的左列中所列的一个或多个氨基酸取代的CH3结构域的第一免疫球蛋白多肽,及含有表2的右列中所列的一个或多个对应的氨基酸取代的CH3结构域的第二免疫球蛋白多肽。

[0271] 按上文所讨论突变DNA后,可以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个或多个形成对应的杵或臼的突变的修饰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;美国专利号2013/0089553;及Spiess等,Nature Biotechnology 31:753-758,2013。修饰的

免疫球蛋白多肽可以用原核宿主细胞如大肠杆菌或真核宿主细胞如CHO细胞产生。具有对应的杵和臼的免疫球蛋白多肽可以在共培养的宿主细胞中表达，并一起纯化为异源多聚体，或者它们可以在单种培养物中表达，分别纯化，并体外组装。在一些实施方案中，用本领域已知的标准细菌培养技术共培养两株细菌宿主细胞（一株表达具有杵的免疫球蛋白多肽，另一株表达具有臼的免疫球蛋白多肽）。在一些实施方案中，两个菌株可以按特定比值混合，例如以在培养物中达到等同的表达水平。在一些实施方案中，两个菌株可以按50:50、60:40或70:30的比值混合。多肽表达后，可以一起裂解细胞，并可以提取蛋白质。本领域已知的允许测量同源多聚体对异源多聚体种类的丰度的标准技术可以包括大小排阻层析。在一些实施方案中，用标准重组技术分别表达各修饰免疫球蛋白多肽，并可以在体外将它们组装在一起。可以例如通过以下达到组装：纯化各修饰免疫球蛋白多肽，按相等质量一起混合和孵育它们，还原二硫键（例如通过用二硫苏糖醇处理），浓缩，并再氧化多肽。所形成的双特异性抗体可以用包括阳离子交换层析的标准技术纯化，并用包括大小排阻层析的标准技术测量。对于这些方法的更详细描述，参见Speiss等，*Nat Biotechnol* 31:753-8, 2013。在一些实施方案中，修饰的免疫球蛋白多肽可以分别在CHO细胞中表达，并用上述方法体外组装。

[0272] 根据不同的方法，将具有希望得到的结合特异性（抗体-抗原结合部位）的抗体可变结构域与免疫球蛋白恒定结构域序列融合。该融合优选是与包含至少部分铰合部、CH2和CH3区的免疫球蛋白重链恒定结构域融合。通常使包含轻链结合所必需的部位的第一重链恒定区（CH1）存在于至少融合之一中。将编码免疫球蛋白重链融合和（如果希望）免疫球蛋白轻链的DNA插入分开的表达载体，并共转染入适宜的宿主生物。在将不等比值的三种多肽链用于构建可提供最佳产率的实施方案中，这提供了调整三种多肽片段的相互比例的极大灵活性。但是，在等比值表达至少两种多肽链产生高产率时或该比值没有具体意义时，可能将两种或全部三种多肽链的编码序列插入一个表达载体中。

[0273] 在此方法的一个实施方案中，该双特异性抗体由一条臂中具有第一结合特异性的杂合免疫球蛋白重链和另一条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。发现此不对称结构便于从不想要的免疫球蛋白链组合分离希望得到的双特异性化合物，因为免疫球蛋白轻链仅存在于该双特异性分子的一半中提供了容易的分离方式。此方法公开于W094/04690中。产生双特异性抗体的进一步详情参见例如Suresh等，*Methods in Enzymology* 121:210 (1986)。

[0274] 根据W096/27011中所述的另一种方法，可以改造一对抗体分子间的界面来最大化从重组细胞培养物回收的异二聚体的百分比。一个界面包含抗体恒定结构域的至少一部分CH3结构域。在此方法中，用较大的侧链（例如酪氨酸或色氨酸）取代来自第一抗体分子的界面的一个或多个小的氨基酸侧链。通过用较小的氨基酸侧链（例如丙氨酸或苏氨酸）取代大的氨基酸侧链来在第二抗体分子的界面上产生大小与该一个或多个大的侧链相同或相似的补偿“凹陷”。这提供了增加异二聚体的产率超过其他不想要的终产物（如同二聚体）的机制。

[0275] 双特异性抗体包括交联抗体或“异缀合物”抗体。例如，异缀合物中的抗体之一可以与抗生素蛋白偶联，另一种与生物素偶联。例如，已提出这类抗体将免疫系统细胞靶向至不需要的细胞（美国专利号4,676,980），并用于治疗HIV感染（WO 91/00360、WO 92/

200373和EP 03089)。可以用任意方便的交联方法产生异缀合物抗体。适宜的交联剂为本领域公知，并连同许多交联技术一起公开于美国专利号4,676,980中。

[0276] 文献中还描述了用于从抗体片段产生双特异性抗体的技术。例如，可以用化学连接制备双特异性抗体。Brennan等, *Science* 229:81 (1985) 描述了其中用蛋白酶解切割完整抗体来产生 $F(ab')_2$ 片段的方法。在二巯基络合剂亚砷酸钠的存在下还原这些片段，以稳定邻位二巯基并阻止分子间二硫键形成。然后将产生的 Fab' 片段转化为硫代硝基苯甲酸盐(TNB)衍生物。然后通过用巯基乙胺还原将 Fab' -TNB衍生物之一再转化为 Fab' -巯基，并与等摩尔量另一 Fab' -TNB衍生物混合形成双特异性抗体。可以将产生的双特异性抗体用作用于选择性固定酶的试剂。

[0277] 最近的进展便于从大肠杆菌直接回收 Fab' -SH片段，该 Fab' -SH片段可以化学偶联形成双特异性抗体。Shalaby等, *J. Exp. Med.* , 175:217-225 (1992) 描述了全人源化双特异性抗体 $F(ab')_2$ 分子的产生。各 Fab' 片段分别从大肠杆菌分泌，并在体外进行定向化学偶联来形成双特异性抗体。

[0278] 还已描述了用于直接从重组细胞培养物制备和分离双特异性抗体片段的多种技术。例如，已用亮氨酸拉链产生了双特异性抗体。Kostelny等, *J. Immunol.* 148 (5) :1547-1553 (1992)。通过基因融合将来自Fos和Jun蛋白质的亮氨酸拉链肽与两种不同抗体的 Fab' 部分连接。在铰链区还原抗体同二聚体形成单体，然后再氧化形成抗体异二聚体。还可以利用此方法来产生抗体同二聚体。Hollinger等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448 (1993) 所述的“双抗体”技术提供了用于产生双特异性抗体片段的备选机制。片段包含通过接头与轻链可变结构域(V_L)连接的重链可变结构域(V_H)，该接头太短而不允许同一条链上的两个结构域间配对。因此，迫使一个片段的 V_H 和 V_L 结构域与另一片段的互补 V_L 和 V_H 结构域配对，从而形成两个抗原结合部位。还已报道了通过使用单链Fv(sFv)二聚体来制备双特异性抗体片段的另一策略。参见Gruber等, *J. Immunol.* 152:5368 (1994)。

[0279] 另一种用于制备双特异性抗体片段的技术是“双特异性T细胞衔接物”或**BiTE®**法(参见例如WO2004/106381、WO2005/061547、WO2007/042261和WO2008/119567)。此方法利用排列在单条多肽上的两个抗体可变结构域。例如，单条多肽链包含两个单链Fv(scFv)片段，每个片段具有通过多肽接头分开的可变重链(V_H)和可变轻链(V_L)，该多肽接头长度足以允许两个结构域间的分子内结合。此单条多肽进一步包含两个scFv片段间的多肽间隔序列。每个scFv识别不同表位，这些表位可以为不同细胞类型所特有，使得在各scFv与其关联表位衔接时使两种不同细胞类型的细胞紧密靠近或系在一起。此方法的一个具体实施方案包括识别由免疫细胞表达的细胞表面抗原(例如T细胞上的CD3多肽)的scFv，其与识别由靶细胞如恶性或肿瘤细胞表达的细胞表面抗原的另一scFv连接。

[0280] 由于它是单条多肽，双特异性T细胞衔接物可以用本领域已知的任意原核或真核细胞表达系统(例如CHO细胞系)表达。但是，可能需要具体纯化技术(参见例如EP1691833)来将单体双特异性T细胞衔接物从其他多聚体种类分开，该其他多聚体种类可以具有单体的预期活性之外的生物学活性。在一个示例性纯化方案中，包含分泌性多肽的溶液首先进行金属亲和层析，并用咪唑浓度梯度洗脱多肽。此洗脱物进一步用阴离子交换层析纯化，并用氯化钠浓度梯度洗脱多肽。最后，对此洗脱物进行大小排阻层析，以将单体从多聚体种类分开。

[0281] 考虑具有两价以上的抗体。例如，可以制备三特异性抗体。Tuf t 等. J. Immunol. 147:60 (1991)

[0282] (vii) 单结构域抗体

[0283] 在一些实施方案中，本发明的抗体是单结构域抗体。单结构域抗体是包含抗体的全部或部分重链可变结构域或全部或部分轻链可变结构域的单条多肽链。在某些实施方案中，单结构域抗体是人单结构域抗体 (Domantis, Inc., Waltham, MA; 参见例如美国专利号6,248,516B1)。在一个实施方案中，单结构域抗体由抗体重链可变结构域的全部或部分组成。

[0284] (viii) 抗体变体

[0285] 在一些实施方案中，考虑本文所述抗体的氨基酸序列修饰。例如，可以希望改善抗体的结合亲和力和/或其他生物学特性。可以通过在编码抗体的核苷酸序列中引入适当的改变或通过肽合成来制备抗体的氨基酸序列变体。这类修饰包括例如从抗体的氨基酸序列缺失残基和/或在抗体的氨基酸序列内插入残基和/或取代抗体的氨基酸序列内的残基。可以进行缺失、插入和取代的任意组合来达到最终构建体，只要最终构建体具有希望得到的特征。可以在制备该序列时在主题抗体氨基酸序列中引入氨基酸序列改变。

[0286] (ix) 取代、插入和缺失变体

[0287] 在某些实施方案中，提供具有一个或多个氨基酸取代的抗体变体。进行取代诱变的目的位点包括HVR和FR。表1中在“保守取代”的表头下显示保守取代。表1中在“示例性取代”的表头下显示更实质性的改变，如下文参考氨基酸侧链种类进一步描述。可以在目的抗体中引入氨基酸取代，并针对希望得到的活性(例如保留/改善抗原结合、降低免疫原性或改善ADCC或CDC)筛选产物。

[0288] 表3:示例性取代

原残基	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

[0290] 氨基酸可以按照共同的侧链性质分组：

[0291] a. 疏水性: 正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile;

[0292] b. 中性亲水性: Cys、Ser、Thr、Asn、Gln;

[0293] c. 酸性: Asp、Glu;

[0294] d. 碱性: His、Lys、Arg;

[0295] e. 影响链取向的残基: Gly、Pro;

[0296] f. 芳香族: Trp、Tyr、Phe。

[0297] 非保守取代将需要将这些种类之一的成员换为另一种类。

[0298] 一类取代变体涉及取代亲本抗体(例如人源化抗体或人抗体)的一个或多个高变区残基。通常,所得到的选择用于进一步研究的一种或多种变体将相对于亲本抗体具有某些生物学特性(例如提高的亲和力、降低的免疫原性)的修饰(例如改善),和/或将具有基本上保留的亲本抗体的某些生物学特性。示例性取代变体是亲和力成熟的抗体,其可以例如用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术(如本文所述的那些)方便地产生。简言之,突变一个或多个HVR残基,将变体抗体展示在噬菌体上,并针对具体生物学活性(例如结合亲和力)进行筛选。

[0299] 可以在HVR中进行改变(例如取代),例如以改善抗体亲和力。可以在HVR“热点”(即由在体细胞成熟过程中以高频率发生突变的密码子编码的残基)(参见例如Chowdhury, Methods Mol. Biol. 207:179-196 (2008))和/或SDR(a-CDR)中进行这类改变,针对结合亲和力测试所得到的变体VH或VL。通过构建二级文库并从二级文库重新选择的亲和力成熟已描述于例如Hoogenboom等 in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O' Brien等,编辑, Human出版社, Totowa, NJ, (2001))中。在亲和力成熟的一些实施方案中,通过多种方法(例如易错PCR、链改组或寡核苷酸定点诱变)中的任一种来在选择用于成熟的可变基因中引入多样性。然后产生二级文库。然后筛选该文库来鉴定具有希望得到的亲和力的任意抗体变体。引入多样性的另一种方法涉及HVR定点途径,其中随机化几个HVR残基(例如每次4-6个残基)。可以例如用丙氨酸扫描诱变或模拟来明确地鉴定出涉及抗原结合的HVR残基。尤其是通常靶向CDR-H3和CDR-L3。

[0300] 在某些实施方案中,取代、插入或缺失可以发生在一个或多个HVR内,只要这类改变不实质性降低抗体结合抗原的能力。例如,可以在HVR中进行不实质性降低结合亲和力的保守改变(例如本文提供的保守取代)。这类改变可以在HVR“热点”或SDR之外。在上文提供的变体VH和VL序列的某些实施方案中,各HVR未改变,或包含不超过一个、两个或三个氨基酸取代。

[0301] 如Cunningham和Wells (1989) Science, 244:1081-1085所述,用于鉴定可以靶向进行诱变的抗体残基或区域的方法称为“丙氨酸扫描诱变”。在此方法中,鉴定残基或靶残基组(例如带电荷残基,如Arg、Asp、His、Lys和Glu),并用中性或带负电荷氨基酸(例如丙氨酸或多聚丙氨酸)取代,以确定抗体与抗原的相互作用是否受到影响。可以在证明对最初取代的功能敏感性的氨基酸位置引入其他取代。备选地或此外,用抗原-抗体复合物的晶体结构

来鉴定抗体和抗原之间的接触点。这类接触残基和邻近残基可以作为取代的候选残基来靶向或消除。可以筛选变体来确定它们是否包含希望得到的特性。

[0302] 氨基酸序列插入包括长度在一个残基至含有一百或更多个残基的多肽的范围内的氨基端和/或羧基端融合,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的实例包括具有N端蛋氨酰残基的抗体。抗体分子的其他插入变体包括抗体的N或C端与酶(例如,对于ADEPT)或增加抗体血清半衰期的多肽融合。

[0303] (x) 糖基化变体

[0304] 在某些实施方案中,改变本文提供的抗体以提高或降低该抗体的糖基化程度。通过改变氨基酸序列,使得产生或去除一个或多个糖基化位点,可以方便地实现抗体糖基化位点的加入或缺失。

[0305] 在抗体包含Fc区时,可以改变附着于其上的糖类。哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含分枝的双触角寡糖,其一般通过N连接附着于Fc区CH2结构域的Asn297。参见例如Wright等TIBTECH 15:26-32 (1997)。寡糖可以包括多种糖类,例如甘露糖、N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及在双触角寡糖结构的“茎”中附着于GlcNAc的岩藻糖。在一些实施方案中,可以进行本发明的抗体中的寡糖的修饰来产生具有某些改善的特性的抗体变体。

[0306] 在一个实施方案中,提供包含Fc区的抗体变体,其中附着于Fc区的糖类结构具有减少的岩藻糖或缺乏岩藻糖,这可以改善ADCC功能。特别是,本文考虑相对于在野生型CHO细胞中产生的同一抗体上岩藻糖的量具有减少的岩藻糖的抗体。这就是说,它们的特征在于,具有比通过天然CHO细胞(例如,产生天然糖基化模式的CHO细胞,如包含天然FUT8基因的CHO细胞)产生时它们本该具有的岩藻糖量低的岩藻糖量。在某些实施方案中,该抗体是这样的抗体,其中其上N连接聚糖中的不到约50%、40%、30%、20%、10%或5%包含岩藻糖。例如,这种抗体中岩藻糖的量可以是1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。在某些实施方案中,该抗体是这样的抗体,其中其上N连接聚糖中没有一种包含岩藻糖,即其中该抗体完全不含岩藻糖、或无岩藻糖或是无岩藻糖基化的。相对于通过例如WO 2008/077546中所述的MALDI-TOF质谱法测量的附着于Asn 297的所有糖结构(例如复合、杂合和高甘露糖结构)的总和,通过计算Asn297处的糖链内岩藻糖的平均量来测定岩藻糖的量。Asn297指定位在Fc区中的约297位(Fc区残基的EU编号)的天冬酰胺残基;但是,由于抗体中小的序列变异,Asn297也可以定位在297位上游或下游约±3个氨基酸,即在294位和300位之间。这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开号US 2003/0157108 (Presta, L.) ; US2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd)。涉及“去岩藻糖基化”或“岩藻糖缺乏”的抗体变体的出版物的实例包括:US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki等J.Mol.Biol.336:1239-1249 (2004); Yamane-Ohnuki等Biotech.Bioeng.87:614 (2004)。能够产生去岩藻糖基化的抗体的细胞系的实例包括蛋白质岩藻糖基化缺陷的Lec13CHO细胞(Ripka等Arch.Biochem.Biophys.249:533-545 (1986);美国专利申请号US 2003/0157108 A1;及WO 2004/056312 A1,尤其是在实施例11处)和敲除细胞系,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Biotech.Bioeng.87:614(2004);Kanda,Y.等,Biotechnol.Bioeng.,94(4):680-688(2006);及WO2003/085107)。

[0307] 还提供具有二等分寡糖的抗体变体,例如,其中附着于抗体Fc区的双触角寡糖被GlcNAc二等分。这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。这类抗体变体的实例描述于例如WO 2003/011878;美国专利号6,602,684;US 2005/0123546;及Ferrara等,Biotechnology and Bioengineering,93(5):851-861(2006)中。还提供在附着于Fc区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。这类抗体变体可以具有改善的CDC功能。这类抗体变体描述于例如WO 1997/30087;WO 1998/58964;及WO 1999/22764中。

[0308] 在某些实施方案中,包含本文所述Fc区的抗体变体能够结合Fc γ RIII。在某些实施方案中,与包含人野生型IgG1Fc区的同一抗体相比,包含本文所述Fc区的抗体变体在人效应细胞存在下具有ADCC活性,或在人效应细胞存在下具有提高的ADCC活性。

[0309] (xi) Fc区变体

[0310] 在某些实施方案中,可以在本文提供的抗体的Fc区中引入一个或多个氨基酸修饰,从而产生Fc区变体。Fc区变体可以包含在一个或多个氨基酸位置上含有氨基酸修饰(例如取代)的人Fc区序列(例如人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4Fc区)。

[0311] 在某些实施方案中,本发明考虑具有一些但不是全部效应子功能的抗体变体,这使得它成为其中抗体的体内半衰期很重要但某些效应子功能(如补体和ADCC)不必要或有害的应用所希望的候选者。可以进行体外和/或体内细胞毒性测定来确认CDC和/或ADCC活性的降低/减损。例如,可以进行Fc受体(FcR)结合测定来确保抗体缺乏Fc γ R结合(因此可能缺乏ADCC活性),但保留FcRn结合能力。介导ADCC的主要细胞NK细胞仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII。造血细胞上的FcR表达总结在Ravetch和Kinet,Annu.Rev.Immunol.9:457-492(1991)的第464页上的表3中。评估目的分子的ADCC活性的体外测定的非限制性实例描述于美国专利号5,500,362(参见例如Hellstrom,I.等Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 83:7059-7063(1986))和Hellstrom,I.等,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 82:1499-1502(1985);5,821,337(参见Bruggemann等,J.Exp.Med.166:1351-1361(1987))中。备选地,可以利用非放射性测定方法(参见例如用于流式细胞术的ACTITM非放射性细胞毒性测定(CellTechnology,Inc.Mountain View,CA);和CytoTox⁹⁶[®]非放射性细胞毒性测定(Promega,Madison,WI))。用于这类测定的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和天然杀伤(NK)细胞。备选地或此外,可以在体内,例如在诸如公开于Clynes等Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 95:652-656(1998)中的动物模型的动物模型中评估目的分子的ADCC活性。还可以进行C1q结合测定来确认抗体不能结合C1q,并因此缺乏CDC活性。参见例如WO 2006/029879和WO 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为了评估补体活化,可以进行CDC测定(参见例如Gazzano-Santoro等,J.Immunol.Methods 202:163(1996);Cragg等,Blood 101:1045-1052(2003);及Cragg等,Blood 103:2738-2743(2004))。还可以用本领域已知的方法进行FcRn结合和体内清除/半衰期测定(参见例如Petkova等,Int'l.Immunol.18(12):1759-1769(2006))。

[0312] 具有减少的效应子功能的抗体包括具有Fc区残基238、265、269、270、297、327和329中的一个或多个的取代的那些(美国专利号6,737,056)。这类Fc突变体包括在氨基酸位置265、269、270、297和327中的两个或多个处具有取代的Fc突变体,包括具有残基265和297

至丙氨酸的取代的所谓“DANA”Fc突变体(美国专利号7,332,581)。

[0313] 描述了某些具有改善或减少的FcR结合的抗体变体(参见例如美国专利号6,737,056;WO 2004/056312;及Shields等,J.Biol.Chem.9 (2) :6591-6604 (2001))。

[0314] 在某些实施方案中,抗体变体包含具有一个或多个改善ADCC的氨基酸取代(例如Fc区298、333和/或334位(残基的EU编号)的取代)的Fc区。在示例性实施方案中,该抗体在其Fc区中包含以下氨基酸取代:S298A、E333A和K334A。

[0315] 在一些实施方案中,例如,如美国专利号6,194,551、WO 99/51642及Idusogie等J. Immunol.164:4178-4184 (2000)中所述,在Fc区中进行改变,该改变导致改变(即改善或减少)的C1q结合和/或依赖补体的细胞毒性(CDC)。

[0316] 具有增加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)中,新生儿Fc受体负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer等,J. Immunol.117:587 (1976)和Kim等,J. Immunol.24:249 (1994))。那些抗体包含其中具有一个或多个取代的Fc区,该取代改善Fc区与FcRn的结合。这类Fc变体包括在Fc区残基238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434中的一个或多个处具有取代的那些,例如,Fc区残基434的取代(美国专利号7,371,826)。关于Fc区变体的其他实例,还参见Duncan&Winter,Nature 322:738-40 (1988);美国专利号5,648,260;美国专利号5,624,821;及WO 94/29351。

[0317] (xi) 抗体衍生物

[0318] 可以进一步修饰本发明的抗体,以包含本领域已知且易于得到的附加非蛋白质部分。在某些实施方案中,适合用于衍生化抗体的部分是水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实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、聚乙烯比咯烷酮、聚-1,3-二氧戊环、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚氨基酸(同聚物或随机共聚物)、葡聚糖或聚(n-乙烯吡咯烷酮)聚乙二醇、propylene glycol同聚物、propylene oxide/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。由于其在水中的稳定性,聚乙二醇丙醛可以在制备中具有优势。聚合物可以具有任意分子量,且可以分枝或不分枝。附着于抗体的聚合物的数目可以不同,且如果附着超过一个聚合物,则它们可以是相同或不同的分子。一般而言,可以根据包括但不限于抗体要改善的具体特性或功能、抗体衍生物是否将在确定的条件下用于治疗等的考虑来确定用于衍生化的聚合物的数目和/或类型。

[0319] (xii) 载体、宿主细胞和重组方法

[0320] 抗体也可以用重组方法产生。为了重组产生抗抗原的抗体,分离编码抗体的核酸,并插入复制载体进行进一步克隆(DNA的扩增)或进行表达。编码抗体的DNA可以用常规方法容易地分离(例如,通过使用能够特异性结合编码抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。许多载体可用。载体成分通常包括但不限于以下一种或多种:信号序列、复制起点、一个或多个标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列。

[0321] (a) 信号序列成分

[0322] 本发明的抗体不仅可以直接重组产生,还可以作为与异源多肽的融合多肽产生,该异源多肽优选在成熟蛋白质或多肽的N端具有特异性切割位点的信号序列或其他多肽。所选择的异源信号序列优选是宿主细胞识别和加工(例如通过信号肽酶切割)的信号序列。

对于不识别和加工天然抗体信号序列的原核宿主细胞,用原核信号序列取代该信号序列,该原核信号序列选自例如碱性磷酸酶、青霉素酶、lpp或热稳定肠毒素II基前导序列。对于酵母分泌,可以用例如酵母转变酶前导序列、因子前导序列(包括酵母属(*Saccharomyces*)和克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*) α -因子前导序列)或酸性磷酸酶前导序列、白假丝酵母(*C.albicans*)葡萄糖淀粉酶前导序列或W090/13646中所述的信号序列取代天然信号序列。在哺乳动物细胞表达中,可用哺乳动物信号序列以及病毒分泌前导序列(例如单纯疱疹病毒gD信号)。

[0323] (b) 复制起点

[0324] 表达载体和克隆载体都包含使得该载体能够在所选择的一种或多种宿主细胞中复制的核酸序列。通常,在克隆载体中,此序列是使得该载体能够独立于宿主染色体DNA复制的序列,且包括复制起点或自主复制序列。对多种细菌、酵母和病毒而言,这类序列是公知的。来自质粒pBR322的复制起点适合用于大多数革兰氏阴性菌,2 μ 质粒起点适合用于酵母,多种病毒起点(SV40、多瘤病毒、腺病毒、VSV或BPV)用于哺乳动物细胞中的克隆载体。通常,哺乳动物表达载体不需要复制起点成分(通常可以使用SV40起点,但只是因为它包含早期启动子)。

[0325] (c) 选择基因成分

[0326] 表达载体和克隆载体可以包含选择基因,也称为选择标记。典型的选择基因编码蛋白质,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、氨甲喋呤或四环素)的抗性;(b)弥补营养缺陷;或(c)提供不能从复合培养基获得的关键营养物,例如编码芽孢杆菌D-丙氨酸消旋酶的基因。

[0327] 选择方案的一个实例利用药物来阻断宿主细胞的生长。用异源基因成功转化的那些细胞产生赋予药物抗性的蛋白质,从而从该选择方案存活下来。这种显性选择的实例使用药物新霉素、霉酚酸和潮霉素。

[0328] 适合用于哺乳动物细胞的选择标记的另一实例是使得能够鉴定有能力摄取编码抗体的核酸的细胞的那些,如DHFR、谷氨酰胺合成酶(GS)、胸苷激酶、金属硫蛋白-I和-II(优选灵长类金属硫蛋白基因)、腺苷脱氨酶、鸟氨酸脱羧酶等。

[0329] 例如,通过在包含氨甲喋呤(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基因随同任意其他共转化的核酸扩增。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)。

[0330] 备选地,通过在包含L-蛋氨酸亚砜亚胺(Msx)(GS的抑制剂)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基因随同任意其他共转化的核酸扩增.GS选择/扩增系统可以与上述DHFR选择/扩增系统组合使用。

[0331] 备选地,可以通过在包含用于选择标记的选择剂(如氨基糖苷抗生素,例如卡那霉素、新霉素或G418)的培养基中培养细胞来选择用编码目的抗体的DNA序列、野生型DHFR基因和另一选择标记(如氨基糖苷3'-磷酸转移酶(APH))转化或共转化的宿主细胞(尤其是包含内源DHFR的野生型宿主)。参见美国专利号4,965,199。

[0332] 适合用于酵母的选择基因是存在于酵母质粒YRp7中的trp1基因(Stinchcomb等,Nature 282:39(1979))。trp1基因为缺乏在色氨酸中生长的能力的突变体酵母菌株(例如ATCC No.44076或PEP4-1)提供了选择标记。Jones,Genetics 85:12(1977)。然后,酵母宿主

细胞基因组中trp1损伤的存在为通过缺乏色氨酸情况下的生长来检测转化提供了有效的环境。类似地,通过已知的具有Leu2基因的质粒弥补了Leu2缺乏的酵母菌株(ATCC20,622或38,626)。

[0333] 此外,可以用衍生自1.6 μ m环状质粒pKD1的载体来转化克鲁维酵母属酵母。备选地,针对乳酸克鲁维酵母(*K.lactis*)报道了用于大规模产生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属的工业菌株分泌成熟重组人血清白蛋白的稳定的多拷贝表达载体。Fleer等, *Bio/Technology* 9: 968-975 (1991)。

[0334] (d) 启动子成分

[0335] 表达载体和克隆载体通常包含宿主生物可识别且与编码抗体的核酸有效连接的启动子。适合用于原核宿主的启动子包括phoA启动子、 β -内酰胺酶和乳糖启动子系统、碱性磷酸酶启动子、色氨酸(*trp*)启动子系统及杂合启动子(如tac启动子)。但是,其他已知的细菌启动子也是适宜的。用于细菌系统的启动子还将包含与编码抗体的DNA有效连接的Shine-Dalgarno (S.D.) 序列。

[0336] 对真核生物而言,启动子序列是已知的。基本上所有真核基因都具有定位在起始转录的位点上游约25至30个碱基的富含AT的区域。见于许多基因的转录起点上游70至80个碱基的另一序列是CNCAAT区,其中N可以是任意核苷酸。大多数真核基因的3' 端是AATAAA序列,其可以是在编码序列的3' 端加入poly A尾的信号。将所有这些序列适宜地插入真核表达载体中。

[0337] 适合用于酵母宿主的启动子序列的实例包括3-磷酸甘油酸激酶或其他糖醇解酶(如烯醇化酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、葡萄糖-6-磷酸异构酶、3-磷酸甘油酸变位酶、丙酮酸激酶、磷酸丙糖异构酶、磷酸葡萄糖异构酶和葡萄糖激酶)的启动子。

[0338] 其他酵母启动子(其是具有通过生长条件控制转录的附加优势的诱导型启动子)是醇脱氢酶2、异细胞色素(isocytochrome) C、酸性磷酸酶、氮代谢相关降解酶、金属硫蛋白、甘油醛-3-磷酸脱氢酶及负责麦芽糖和半乳糖利用的酶的启动子区。适合用于酵母表达的载体和启动子进一步描述于EP 73,657中。还有利地与酵母启动子一起使用酵母增强子。

[0339] 例如通过获自病毒(例如多瘤病毒、禽痘病毒、腺病毒(如腺病毒2)、牛乳头状病毒、禽肉瘤病毒、巨细胞病毒、反转录病毒、乙型肝炎病毒、猿猴病毒40(SV40)基因组、或获自异源哺乳动物启动子(例如肌动蛋白启动子或免疫球蛋白启动子)、或获自热休克启动子的启动子来控制哺乳动物宿主细胞中从载体转录抗体,只要这类启动子与宿主细胞系统相容。

[0340] 作为SV40限制片段方便地获得SV40病毒的早期和晚期启动子,该限制片段还包含SV40病毒复制起点。作为HindIII E限制片段方便地获得人巨细胞病毒的立即早期启动子。美国专利号4,419,446中公开了用牛乳头状病毒作为载体来在哺乳动物宿主中表达DNA的系统。美国专利号4,601,978中描述了此系统的改进。关于人 β -干扰素cDNA在来自单纯疱疹病毒的胸苷激酶激动子控制下在小鼠细胞中的表达,还参见Reyes等, *Nature* 297:598-601 (1982)。备选地,可以用劳斯肉瘤病毒长末端重复序列作为启动子。

[0341] (e) 增强子元件成分

[0342] 将增强子序列插入载体通常增加高等真核生物的编码本发明抗体的DNA的转录。现已知来自哺乳动物基因(珠蛋白、弹性蛋白酶、清蛋白、甲胎蛋白和胰岛素基因)的许多增强子序列。但是,通常将使用来自真核细胞病毒的增强子。实例包括复制起点晚期侧(bp 100-270)的SV40增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、复制起点晚期侧的多瘤增强子和腺病毒增强子。关于用于激活真核启动子的增强元件,还参见Yaniv, *Nature* 297: 17-18 (1982)。增强子可以在抗体编码序列5'或3'的位置剪接入载体,但优选定位在启动子5'的位点。

[0343] (f) 转录终止成分

[0344] 用于真核宿主细胞(酵母、真菌、昆虫、植物、动物、人或来自其他多细胞生物的有核细胞)的表达载体还将包含终止转录和稳定mRNA所必需的序列。通常可从真核或病毒DNA或cDNA的5'和(偶尔)3'非翻译区获得这类序列。这些区域包含转录为编码抗体的mRNA的非翻译区中的多腺苷酸化片段的核苷酸区段。一种有用的转录终止成分是牛生长激素多腺苷酸化区域。参见WO 94/11026及其中公开的表达载体。

[0345] (g) 宿主细胞的选择和转化

[0346] 适合用于克隆或表达本文载体中的DNA的宿主细胞是原核细胞、酵母细胞或高级真核细胞。适合用于此目的的原核生物包括真细菌,如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物,例如肠杆菌科(Enterobacteriaceae),如埃希氏菌属(*Escherichia*),例如大肠杆菌;肠杆菌属(*Enterobacter*);欧文氏菌属(*Erwinia*);克雷伯氏菌属(*Klebsiella*);变形杆菌属(*Proteus*);沙门氏菌属(*Salmonella*),例如鼠伤寒沙门氏菌(*Salmonella typhimurium*);沙雷氏菌属(*Serratia*),例如粘质沙雷氏菌(*Serratia marcescans*);和志贺氏菌属(*Shigella*);以及芽孢杆菌属(*Bacilli*),如枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)和地衣芽孢杆菌(*B. licheniformis*) (例如1989年4月12日公开的DD 266,710中所公开的地衣芽孢杆菌41P);假单胞菌属(*Pseudomonas*),如铜绿假单胞菌(*P. aeruginosa*);和链霉菌属(*Streptomyces*)。一种优选的大肠杆菌克隆宿主是大肠杆菌294(ATCC 31,446),但其他菌株如大肠杆菌B、大肠杆菌X1776(ATCC 31,537)和大肠杆菌W3110(ATCC 27,325)也是适宜的。这些实例是说明性的而不是限制性的。

[0347] 尤其是在不需要糖基化和Fc效应子功能时,如在治疗性抗体与本身在肿瘤细胞破坏中显示有效性的细胞毒性剂(例如毒素)缀合时,可以在细菌中产生全长抗体、抗体融合蛋白质和抗体片段。全长抗体具有更长的循环半衰期。大肠杆菌中的产生更快,且更节约成本。对于在细菌中表达抗体片段和多肽,参见例如美国专利号5,648,237(Carter等)、美国专利号5,789,199(Joly等)、美国专利号5,840,523(Simmons等),其描述了用于优化表达和分泌的翻译起始区(TIR)和信号序列。还参见Charlton, *Methods in Molecular Biology*, 248卷(B.K.C.Lo编辑, Humana出版社, Totowa, N.J., 2003), 245-254页,其描述在大肠杆菌中表达抗体片段。表达后,从可溶性分级中的大肠杆菌细胞糊分离抗体,且可以通过例如A蛋白柱或G蛋白柱(取决于同种型)来纯化。可以与用于纯化在例如CHO细胞中表达的抗体的方法类似地进行最终的纯化。

[0348] 除原核生物外,诸如丝状真菌或酵母的真核微生物也是适合用于编码抗体的载体的克隆或表达宿主。酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或常见的面包酵母是低等真核宿主微生物中最常用的。但是,许多其他属、种和菌株通常可得且在本文中使用,如粟酒裂

殖酵母 (*Schizosaccharomyces pombe*) ; 克鲁维酵母属宿主, 如乳酸克鲁维酵母 (*K. lactis*) 、脆壁克鲁维酵母 (*K. fragilis*) (ATCC 12,424) 、保加利亚克鲁维酵母 (*K. bulgaricus*) (ATCC16,045) 、威克克鲁维酵母 (*K. wickeramii*) (ATCC 24,178) 、瓦尔提克鲁维酵母 (*K. waltii*) (ATCC 56,500) 、果蝇克鲁维酵母 (*K. drosophilae*) (ATCC36,906) 、耐热克鲁维酵母 (*K. thermotolerans*) 和马克思克鲁维酵母 (*K. marxianus*) ; 耶氏酵母属 (*Yarrowia*) (EP 402,226) ; 巴斯德毕赤酵母 (*Pichia pastoris*) (EP 183,070) ; 假丝酵母属 (*Candida*) ; 里氏木霉 (*Trichoderma reesii*) (EP 244,234) ; 粗糙链孢霉 (*Neurospora crassa*) ; 许旺酵母属 (*Schwanniomyces*), 如许旺酵母 (*Schwanniomyces occidentalis*) ; 和丝状真菌, 如脉孢霉属 (*Neurospora*) 、青霉属 (*Penicillium*) 、弯颈霉属 (*Tolypocladium*) ; 和曲霉属 (*Aspergillus*) 宿主, 如构巢曲霉 (*A. nidulans*) 和黑曲霉 (*A. niger*) 。讨论酵母和丝状真菌在产生治疗性蛋白质中的用途的综述参见例如 Gerngross, *Nat. Biotech.* 22: 1409-1414 (2004) 。

[0349] 可以选择某些真菌和酵母菌株, 其中糖基化途径已“人源化”, 导致产生具有部分或完全人糖基化模式的抗体。参见例如 Li 等, *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); 及 Gerngross 等, 上文。

[0350] 适合用于表达糖基化抗体的宿主细胞源自多细胞生物 (无脊椎动物和脊椎动物) 。无脊椎动物细胞的实例包括植物细胞和昆虫细胞。已鉴定了来自诸如草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) (毛虫) 、埃及伊蚊 (*Aedes aegypti*) (蚊子) 、白纹伊蚊 (*Aedes albopictus*) (蚊子) 、黑腹果蝇 (*Drosophila melanogaster*) (果蝇) 和家蚕 (*Bombyx mori*) 的宿主的许多杆状病毒株和变体及对应的受纳昆虫宿主细胞。多种用于转染的病毒株是公开可得的, 例如苜蓿银纹夜蛾 (*Autographa californica*) NPV 的 L-1 变体和家蚕 NPV 的 Bm-5 病毒株, 可以将这类病毒用作本发明的病毒, 尤其是用于转染草地夜蛾细胞。

[0351] 也可以用棉花、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛、番茄、浮萍 (*Leninaceae*) 、苜蓿 (*M. truncatula*) 和烟草的植物细胞培养物作为宿主。参见例如美国专利号 5,959,177、6,040,498、6,420,548、7,125,978 和 6,417,429 (描述用于在转基因植物中产生抗体的 PLANTIBODIESTM 技术) 。

[0352] 可以用脊椎动物细胞作为宿主, 繁殖培养 (组织培养) 的脊椎动物细胞已成为常规方法。有用的哺乳动物宿主细胞系的实例是 SV40 转化的猴肾 CV1 细胞系 (COS-7, ATCC CRL 1651) ; 人胚肾细胞系 (293 或为在悬浮培养物中生长亚克隆的 293 细胞, Graham 等, *J. Gen. Virol.* 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) ; buffalo 大鼠肝细胞 (BRL 3A, ATCC CRL 1442) ; 人肺细胞 (W138, ATCC CCL 75) ; 人肝细胞 (Hep G2, HB8065) ; 小鼠乳腺肿瘤 (MMT 060562, ATCC CCL51) ; TRI 细胞 (Mather 等, *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383: 44-68 (1982)) ; MRC 5 细胞; FS4 细胞; 和人肝癌细胞系 (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, 包括 DHFR-CHO 细胞 (Urlaub 等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4216 (1980)) ; 骨髓瘤细胞系, 如 NS0 和 Sp2/0。某些适合用于抗体产生的哺乳动物宿主细胞系的综述参见例如 Yazaki 和 Wu, *Methods in Molecular Biology*, 248 卷 (B.K.C. Lo 编辑, Humana 出版社, Totowa, NJ, 2003) , 255-268 页。

[0353] 用上述用于抗体产生的表达载体或克隆载体转化宿主细胞，并在根据诱导启动子、选择转化体或扩增编码希望的序列的基因的需要改进的常规营养培养基中培养。

[0354] (h) 培养宿主细胞

[0355] 可在多种培养基中培养用来产生本发明的抗体的宿主细胞。诸如Ham's F10 (Sigma)、Minimal Essential Medium (MEM) (Sigma)、RPMI-1640 (Sigma) 和Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma) 的市售培养基适合用于培养宿主细胞。此外，可以用Ham等, Meth. Enz. 58: 44 (1979) ; Barnes等, 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; WO87/00195; 或美国专利Re. 30, 985中所述的任意培养基作为宿主细胞的培养基。可以根据需要向任意这些培养基中补充激素和/或其他生长因子(如胰岛素、转铁蛋白或表皮生长因子)、盐(如氯化钠、钙、镁和磷酸盐)、缓冲剂(如HEPES)、核苷酸(如腺苷和胸苷)、抗生素(如GENTAMYCINTM药物)、痕量元素(定义为通常以微摩尔范围内的终浓度存在的无机化合物)和葡萄糖或等同的能量来源。还可以按本领域技术人员已知的适当浓度包含任意其他必需的补充物。培养条件(如温度、pH等)是之前用于选择用于表达的宿主细胞的那些,且对普通技术人员而言将是显而易见的。

[0356] (xiv) 纯化抗体

[0357] 在使用重组技术时,抗体可以在胞内、在周质间隙中产生,或者直接分泌入培养基。如果抗体在胞内产生,作为第一步,例如通过离心或超滤去除颗粒碎片(宿主细胞或裂解的片段)。Carter等, Bio/Technology 10: 163-167 (1992) 描述了用于分离分泌至大肠杆菌的周质间隙的多肽的方法。简言之,在醋酸钠(pH 3.5)、EDTA和苯甲基磺酰氟(PMSF)的存在下融化细胞糊超过约30分钟。可以通过离心去除细胞碎片。在抗体分泌入培养基时,通常先用市售蛋白质浓缩滤器(例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元)浓缩来自这类表达系统的上清。可以在任意前述步骤中包含诸如PMSF的蛋白酶抑制剂来抑制蛋白水解,且可以包含抗生素来防止外来污染物的生长。

[0358] 可以用例如羟基磷灰石层析、疏水相互作用层析、凝胶电泳、透析和亲和层析来纯化从细胞制备的抗体组合物,亲和层析是通常优选的纯化步骤之一。A蛋白作为亲和配体的适宜性取决于存在于抗体中的任意免疫球蛋白Fc结构域的种类和同种型。A蛋白可以用于纯化基于人 γ 1、 γ 2或 γ 4重链的抗体(Lindmark等, J. Immunol. Meth. 62: 1-13 (1983))。G蛋白推荐用于所有小鼠同种型及用于人 γ 3(Guss等, EMBO J. 5: 1567-1575 (1986))。亲和配体所附着的基质最常见的是琼脂糖,但其他基质也可用。与用琼脂糖可以达到的流速和处理时间相比,机械稳定的基质(如可控孔度玻璃或聚(苯乙烯二乙烯)苯)允许更快的流速和更短的处理时间。在抗体包含CH3结构域时,用Bakerbond ABXTM树脂(J.T. Baker, Phillipsburg, NJ)进行纯化。取决于要回收的抗体,用于蛋白质纯化的其他技术也可用,如离子交换柱上的分级分离、乙醇沉淀、反相HPLC、二氧化硅上的层析、肝素SEPHAROSETM上的层析、阴离子或阳离子交换树脂(如聚天冬氨酸柱)上的层析、层析聚焦、SDS-PAGE和硫酸铵沉淀。

[0359] 通常,用于制备用于研究、测试和临床应用的抗体的多种方法在本领域中是完善的,与上述方法一致,和/或本领域技术人员认为适合用于具体的目的抗体。

[0360] (xv) 选择具有生物学活性的抗体

[0361] 可以对按上述产生的抗体进行一种或多种“生物学活性”测定,以选择从治疗角度看具有有益特性的抗体,或选择保持该抗体的生物学活性的制剂和条件。可以针对其结合抗原的能力测试抗体,该抗体针对该抗原制备。

[0362] 例如,对于抗PD-L1抗体,可以在检测结合PD-L1的能力的测定中评价抗体的抗原结合特性。在一些实施方案中,可以通过例如饱和结合、ELISA和/或竞争测定(例如RIA)来测定抗体的结合。另外,可以对抗体进行其他生物学活性测定,例如以评价其作为治疗剂的有效性。这类测定为本领域已知,且依赖于靶抗原及抗体的预期用途。例如,可以在CD8+T细胞、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)小鼠模型和/或同基因肿瘤模型中评估抗体阻断PD-L1的生物学效应,例如,如美国专利8,217,149中的所述。

[0363] 为了筛选结合目的抗原上的特定表位的抗体(例如,阻断实施例的抗PD-L1抗体与PD-L1的结合的抗体),可以进行常规交叉阻断测定,如Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988)中所述的交叉阻断测定。备选地,可以进行例如Champe等,J. Biol. Chem. 270:1388-1394 (1995)中所述的表位定位,以确定抗体是否结合目的表位。

[0364] IV. 药物组合物和制剂

[0365] 本文还提供包含本文所述的PD-1轴结合拮抗剂和/或抗体(如抗PD-L1抗体)和可药用载体的药物组合物和制剂。本发明还提供包含紫杉烷(例如纳米清蛋白结合紫杉醇(**ABRAXANE®**)、紫杉醇或多西紫杉醇)的药物组合物和制剂。

[0366] 可以通过将具有希望得到的纯度的活性成分(例如PD-1轴结合拮抗剂和/或紫杉烷)与一种或多种可选的可药用载体(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,0sol, A. 编辑 (1980))混合,以冻干制剂或水溶液的形式制备本文所述的药物组合物和制剂。可药用载体一般在所利用的剂量和浓度下对受体无毒性,且包括但不限于:缓冲剂,如磷酸、柠檬酸和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯己双铵;氯苄烷铵;苄索氯铵;苯酚;丁醇或苄醇;对羟基苯甲酸烷基酯,如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他糖类,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐抗衡离子,如钠;金属络合物(例如Zn-蛋白质络合物);和/或非离子型表面活性剂,如聚乙二醇(PEG)。本文的示例性可药用载体进一步包括间质药物分散剂,如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,如rHuPH20(**HYLENEX®**, Baxter International, Inc.)。包括rhuPH20的某些示例性sHASEGP和使用方法描述于美国专利公开号2005/0260186和2006/0104968中。在一方面,将sHASEGP与诸如软骨素酶的一种或多种附加的糖胺聚糖酶组合。

[0367] 示例性冻干抗体制剂描述于美国专利号6,267,958中。水性抗体制剂包括描述于美国专利号6,171,586和W0 2006/044908中的那些,后一种制剂包含组氨酸-乙酸缓冲液。

[0368] 本文的组合物和制剂还可以根据所治疗的具体适应症的需要包含一种以上活性成分,优选相互无不利影响的具有互补活性的那些。这类活性成分以对预期目的有效的量

适宜地组合存在。

[0369] 活性成分可以包载 (entrap) 在例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微囊 (例如, 分别为羟甲基纤维素微囊或明胶微囊和聚-(甲基丙烯酸甲酯) 微囊) 中、胶体药物递送系统 (例如脂质体、白蛋白微球、微乳、纳米颗粒和纳米囊 (nanocapsule)) 中或粗滴乳状液中。这类技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences第16版, Osol, A. 编辑 (1980) 中。

[0370] 可以制备缓释制剂。缓释制剂的适宜实例包括含有抗体的固体疏水聚合物的半透性基质, 该基质是成形物品的形式, 例如膜或微囊。待用于体内施用的制剂通常是无菌的。无菌可以容易地例如通过滤过无菌滤膜来达到。

[0371] IV. 治疗方法

[0372] 本文提供用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的方法, 其包括对该个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷 (例如纳米清蛋白结合紫杉醇 (**ABRAXANE®**) 或紫杉醇)。在一些实施方案中, 该治疗在该个体中产生治疗后的反应。在一些实施方案中, 该反应是完全应答。在一些实施方案中, 该治疗在该个体中产生停止治疗后的持续应答。本文所述的方法可用于治疗其中希望得到增强的免疫原性如提高肿瘤免疫原性用于治疗癌症的病症。本文还提供在患有癌症的个体中增强免疫功能的方法, 其包括对该个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷 (例如纳米清蛋白结合紫杉醇 (**ABRAXANE®**) 或紫杉醇)。本领域已知或本文描述的任意PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷都可用于该方法。在一些实施方案中, 该方法进一步包括施用基于铂的治疗剂。在一些实施方案中, 该基于铂的治疗剂是卡铂。

[0373] 在一些实施方案中, 该个体是人。在一些实施方案中, 该个体患有癌症。在一些实施方案中, 该癌症是乳腺癌 (例如三阴乳腺癌)、膀胱癌 (例如UBC、MIBC和NMIBC)、结肠直肠癌、直肠癌、肺癌 (例如非小细胞肺癌, 其可为鳞状或非鳞状)、成胶质细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤 (NHL)、肾细胞癌 (例如RCC)、前列腺癌、肝癌、胰腺癌、软组织肉瘤、卡波西肉瘤、类癌、头颈癌、胃癌、食管癌、前列腺癌、子宫内膜癌、肾癌、卵巢癌、间皮瘤和血癌 (例如MDS和多发性骨髓瘤)。在一些实施方案中, 该癌症选自: 小细胞肺癌、成胶质细胞瘤、成神经细胞瘤、黑素瘤、乳腺癌、胃癌、结肠直肠癌 (CRC) 或肝细胞癌。在具体实施方案中, 该癌症选自肺癌 (例如非小细胞肺癌, 其可为鳞状或非鳞状)、膀胱癌 (例如UBC)、乳腺癌 (例如TNBC)、RCC、黑素瘤、结肠直肠癌和血癌 (例如MDS和多发性骨髓瘤)。在一些实施方案中, 该肺癌是非小细胞肺癌, 其可为鳞状或非鳞状。在一些实施方案中, 该膀胱癌是UBC。在一些实施方案中, 该乳腺癌是TNBC。在一些实施方案中, 该血癌是MDS或多发性骨髓瘤。

[0374] 在一些实施方案中, 该个体在PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷联合治疗之前已用癌症疗法治疗。在一些实施方案中, 该个体患有对一种或多种癌症疗法有抗性的癌症。在一些实施方案中, 对癌症疗法的抗性包括癌症复发或难治性癌症。复发可以指治疗后癌症在原部位或新部位重新出现。在一些实施方案中, 对癌症疗法的抗性包括癌症在用抗癌疗法治疗期间进展。在一些实施方案中, 对癌症疗法的抗性包括对治疗无反应的癌症。癌症可以在治疗开始时有抗性, 或者它可以在治疗期间变得有抗性。在一些实施方案中, 该癌症处于早期或晚期。

[0375] 在一些实施方案中,本发明的联合治疗包括施用PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷。PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷(例如纳米清蛋白结合紫杉醇(**ABRAXANE®**)或紫杉醇)可以以本领域已知的任意适宜的方式施用。例如,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以顺次(在不同时间)或同时(在同一时间)施用。在一些实施方案,PD-1轴结合拮抗剂与紫杉烷处于分开的组合物中。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂与紫杉烷处于同一组合物中。

[0376] PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以通过相同的给药途径或通过不同的给药途径施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂静脉内、肌内、皮下、局部、口服、经皮、腹腔内、眼眶内、通过植入、通过吸入、鞘内、心室内或鼻内施用。在一些实施方案中,紫杉烷静脉内、肌内、皮下、局部、口服、经皮、腹腔内、眼眶内、通过植入、通过吸入、鞘内、心室内或鼻内施用。可以施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷用于预防或治疗疾病。PD-1轴结合拮抗剂和/或紫杉烷的适当剂量可以根据待治疗的疾病类型、PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷的类型、疾病的严重度和病程、个体的临床病症、个体的临床病史和对治疗的反应及主治医生的判断来确定。

[0377] 一般而言,无论一次还是多次施用,对人施用的抗体(例如抗PD-L1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。在一些实施方案中,所使用的抗体是例如每天施用约0.01至约45mg/kg、约0.01至约40mg/kg、约0.01至约35mg/kg、约0.01至约30mg/kg、约0.01至约25mg/kg、约0.01至约20mg/kg、约0.01至约15mg/kg、约0.01至约10mg/kg、约0.01至约5mg/kg、或约0.01至约1mg/kg。在一些实施方案中,按15mg/kg施用抗体。但是,可以使用其他剂量方案。在一个实施方案中,本文所述抗PD-L1抗体在21天循环的第1天按约100mg、约200mg、约300mg、约400mg、约500mg、约600mg、约700mg、约800mg、约900mg、约1000mg、约1100mg、约1200mg、约1300mg、约1400mg或约1500mg的剂量对人施用。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体MPDL3280A每三周(q3w)按1200mg IV施用。剂量可以作为单个剂量或作为多个剂量(例如2或3个剂量)施用,如输注。与单一治疗相比,联合治疗中施用的抗体剂量可以降低。早期通过常规技术监测此疗法的进展。

[0378] 一般而言,无论一次还是多次施用,对人施用的紫杉烷(例如纳米清蛋白结合紫杉醇(**ABRAXANE®**)或紫杉醇)的治疗有效量将在约25至约300mg/m²的范围内(例如约25mg/m²、约50mg/m²、约75mg/m²、约100mg/m²、约125mg/m²、约150mg/m²、约175mg/m²、约200mg/m²、约225mg/m²、约250mg/m²、约275mg/m²、或约300mg/m²)。例如,在一些实施方案中,施用约100mg/m²的纳米清蛋白结合紫杉醇(**ABRAXANE®**)。在一些实施方案中,每周(q1w)按100mg/m²IV施用纳米清蛋白结合紫杉醇(**ABRAXANE®**)。在一些实施方案中,施用约200mg/m²的紫杉醇。在一些实施方案中,每3周按200mg/m²IV施用紫杉醇。在一些实施方案中,紫杉烷(例如纳米清蛋白结合紫杉醇(**ABRAXANE®**)或紫杉醇)可以每周、每2周、每3周、每4周、在每个21天循环的第1、8和15天、或在每个28天循环的第1、8和15天施用。

[0379] 在一些实施方案中,该方法可以进一步包括附加治疗。该附加治疗可以是放射治疗、手术(例如肿块切除术和乳房切除术)、化疗、基因治疗、DNA治疗、病毒治疗、RNA治疗、免疫治疗、骨髓移植、纳米治疗(nanothrapy)、单克隆抗体治疗或前面这些的组合。该附加治疗可以是辅助治疗或新辅助治疗的形式。在一些实施方案中,该附加治疗是施用小分子酶

抑制剂或抗转移剂。在一些实施方案中,该附加治疗是施用副作用限制剂(例如旨在减轻治疗副作用的发生和/或严重度的药物,如抗恶心剂等)。在一些实施方案中,该附加治疗是放射治疗。在一些实施方案中,该附加治疗是手术。在一些实施方案中,该附加治疗是放射治疗和手术的组合。在一些实施方案中,该附加治疗是 γ 照射。在一些实施方案中,该附加治疗是靶向PI3K/AKT/mTOR途径的治疗、HSP90抑制剂、微管蛋白抑制剂、凋亡抑制剂和/或化学预防剂。该附加治疗可以是上文所述的一种或多种化疗剂。

[0380] 在一些实施方案中,该方法进一步包括与PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷一起施用基于铂的化疗剂。在一些实施方案中,该基于铂的化疗剂是卡铂。卡铂的剂量和施用为本领域公知。按6mg/m²的目标曲线下面积(AUC)施用卡铂的示例性剂量。在一些实施方案中,每3周静脉内施用卡铂。

[0381] 在一些实施方案中,该方法包括施用以下:每3周(q3w)IV施用的1200mg抗PD-L1抗体MPDL3280A,每周(q1w)100mg/m²IV的纳米清蛋白结合紫杉醇(**ABRAXANE®**),及每3周(q3w)6mg/m²目标AUC的卡铂。在一些实施方案中,该方法包括施用以下:每3周(q3w)IV施用的1200mg抗PD-L1抗体MPDL3280A,每3周200mg/m²IV的紫杉醇,及每3周(q3w)6mg/m²目标AUC的卡铂。

[0382] V. 其他联合治疗

[0383] 本文还提供用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的方法,其包括与另一抗癌剂或癌症疗法结合(conjunction),对该个体施用人PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷。在一些实施方案中,该方法包括与另一抗癌剂或癌症疗法结合,对该个体施用人PD-1轴结合拮抗剂、紫杉烷和基于铂的化疗剂。

[0384] 在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与化疗或化疗剂结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与放疗或放疗剂结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与靶向治疗或靶向治疗剂结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与免疫治疗或免疫治疗剂(例如单克隆抗体)结合施用。

[0385] 不希望受限于理论,认为通过促进激活性共刺激分子或通过抑制负共刺激分子增强T细胞刺激可以促进肿瘤细胞死亡,从而治疗癌症或延迟癌症进展。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与针对激活性共刺激分子的激动剂结合施用。在一些实施方案中,激活性共刺激分子可以包括CD40、CD226、CD28、OX40、GITR、CD137、CD27、HVEM或CD127。在一些实施方案中,针对激活性共刺激分子的激动剂是结合CD40、CD226、CD28、OX40、GITR、CD137、CD27、HVEM或CD127的激动抗体。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与针对抑制性共刺激分子的拮抗剂结合施用。在一些实施方案中,抑制性共刺激分子可以包括CTLA-4(也称为CD152)、PD-1、TIM-3、BTLA、VISTA、LAG-3、B7-H3、B7-H4、IDO、TIGIT、MICA/B或精氨酸酶。在一些实施方案中,针对抑制性共刺激分子的拮抗剂是结合CTLA-4(也称为CD152)、PD-1、TIM-3、BTLA、VISTA、LAG-3、B7-H3、B7-H4、IDO、TIGIT、MICA/B或精氨酸酶的拮抗抗体。

[0386] 在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与针对CTLA-4(也称为CD152)的拮抗剂(例如,阻断抗体)结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉

烷可以与伊匹单抗(也称为MDX-010、MDX-101或**YERVOY®**)结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与tremelimumab(也称为ticilimumab或CP-675,206)结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与针对B7-H3(也称为CD276)的拮抗剂(例如,阻断抗体)结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与MGA271结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与针对TGF β 的拮抗剂(例如,metelimumab(也称为CAT-192)、fresolimumab(也称为GC1008)或LY2157299)结合施用。

[0387] 在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与包括表达嵌合抗原受体(CAR)的T细胞(例如,细胞毒性T细胞或CTL)的过继转移的治疗结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与包括含有显性阴性TGF β 受体(例如,显性阴性TGF β II型受体)的T细胞的过继转移的治疗结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与包括HERCREEM流程(参见例如ClinicalTrials.gov Identifier NCT00889954)的治疗结合施用。

[0388] 在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与针对CD137(也称为TNFRSF9、4-1BB或ILA)的激动剂(例如,激活抗体)结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与urelumab(也称为BMS-663513)结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与针对CD40的激动剂(例如,激活抗体)结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与CP-870893结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与针对OX40(也称为CD134)的激动剂(例如,激活抗体)结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与抗OX40抗体(例如AgonOX)结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与针对CD27的激动剂(例如,激活抗体)结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与CDX-1127结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与针对吲哚胺-2,3-双加氧酶(IDO)的拮抗剂结合施用。在一些实施方案中,该IDO拮抗剂是1-甲基-D-色氨酸(也称为1-D-MT)。

[0389] 在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与抗体-药物缀合物结合施用。在一些实施方案中,该抗体-药物缀合物包含mertansine或monomethyl auristatin E(MMAE)。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与抗NaPi2b抗体-MMAE缀合物(也称为DNIB0600A或RG7599)结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与trastuzumab emtansine(也称为T-DM1、ado-trastuzumab emtansine或**KADCYLA®**,Genentech)结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与DMUC5754A结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与靶向内皮素B受体(EDNBR)的抗体-药物缀合物(例如,与MMAE缀合的抗EDNBR抗体)结合施用。

[0390] 在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与血管发生抑制剂结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与抗VEGF抗体(例如,VEGF-A)结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与贝伐单抗(也称为**AVASTIN®**,Genentech)结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与抗血管生成素2(也称为Ang2)抗体结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和

紫杉烷可以与MEDI3617结合施用。

[0391] 在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与抗肿瘤剂结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与靶向CSF-1R(也称为M-CSFR或CD115)的药物结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与抗CSF-1R(也称为IMC-CS4)结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与干扰素(例如,干扰素 α 或干扰素 γ)结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与Roferon-A(也称为重组干扰素 α -2a)结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与GM-CSF(也称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®**)结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与IL-2(也称为阿地白介素或**PROLEUKIN®**)结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与IL-12结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与靶向CD20的抗体结合施用。在一些实施方案中,该靶向CD20的抗体是obinutuzumab(也称为GA101或**GAZYVA®**)或利妥昔单抗。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与靶向GITR的抗体结合施用。在一些实施方案中,该靶向GITR的抗体是TRX518。

[0392] 在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与癌症疫苗结合施用。在一些实施方案中,该癌症疫苗是肽癌症疫苗,其在一些实施方案中是个性化肽疫苗。在一些实施方案中,该肽癌症疫苗是多价长肽、多肽、肽混合物、杂合肽或肽脉冲处理的树突细胞疫苗(参见例如Yamada等,Cancer Sci,104:14-21,2013)。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与佐剂结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与包括TLR激动剂(例如,Poly-ICLC(也称为**HILTONOL®**)、LPS、MPL或CpG ODN)的治疗结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与肿瘤坏死因子(TNF) α 结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与IL-1结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与HMGB1结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与IL-10拮抗剂结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与IL-4拮抗剂结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与IL-13拮抗剂结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与HVEM拮抗剂结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与ICOS激动剂(例如,通过施用COS-L或抗ICOS的激动性抗体)结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与靶向CX3CL1的治疗结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与靶向CXCL9的治疗结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与靶向CXCL10的治疗结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与靶向CCL5的治疗结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与LFA-1或ICAM1激动剂结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与选择蛋白激动剂结合施用。

[0393] 在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与靶向治疗结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与B-Raf抑制剂结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与vemurafenib(也称为**ZELBORAF®**)结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与达拉非尼(dabrafenib)(也称为

TAFINLAR® 结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与埃罗替尼(也称为**TARCEVA®**)结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与MEK(如MEK1(也称为MAP2K1)或MEK2(也称为MAP2K2))抑制剂结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与cobimetinib(也称为GDC-0973或XL-518)结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与曲美替尼(trametinib)(也称为**MEKINIST®**)结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与K-Ras抑制剂结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与c-Met抑制剂结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与onartuzumab(也称为MetMab)结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与A1k抑制剂结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与AF802(也称为CH5424802或alectinib)结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)抑制剂结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与BKM120结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与idelalisib(也称为GS-1101或CAL-101)结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与哌立福辛(也称为KRX-0401)结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与Akt抑制剂结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与MK2206结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与GSK690693结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与mTOR抑制剂结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与sirolimus(也称为雷帕霉素)结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与西罗莫司(temsirolimus)(也称为CCI-779或**TORISEL®**)结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与依维莫司(everolimus)(也称为RAD001)结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与ridaforolimus(也称为AP-23573、MK-8669或deforolimus)结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与OSI-027结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与AZD8055结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与INK128结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与双重PI3K/mTOR抑制剂结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与XL765结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与GDC-0980结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与BEZ235(也称为NVP-BEZ235)结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与BGT226结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与GSK2126458结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与PF-04691502结合施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷可以与PF-05212384(也称为PKI-587)结合施用。

[0394] VI. 制成品或药盒

[0395] 在本发明的另一实施方案中,提供包含PD-1轴结合拮抗剂和/或紫杉烷的制成品或药盒。在一些实施方案中,该制成品或药盒进一步包含包装说明书,该包装说明书包含用该PD-1轴结合拮抗剂与紫杉烷结合来在个体中治疗癌症或延迟癌症进展或在患有癌症的

个体中增强免疫功能的说明。本文所述的任意PD-1轴结合拮抗剂和/或紫杉烷都可以包含在该制成品或药盒中。

[0396] 在一些实施方案中,该PD-1轴结合拮抗剂和该紫杉烷处于相同的容器或分开的容器中。适宜的容器包括例如瓶、小管、袋和注射器。容器可以形成自多种材料,如玻璃、塑料(如聚氯乙烯或聚烯烃)或合金(如不锈钢或哈斯特镍合金)。在一些实施方案中,该容器容纳制剂,容器上或与容器结合的标签可以指示使用说明。该制成品或药盒可以进一步包含商业和用户角度希望的其他材料,包括其他缓冲液、稀释液、滤器、针头、注射器,及含有使用说明的包装说明书。在一些实施方案中,该制成品可以进一步包含一种或多种其他活性剂(例如,化疗剂和抗肿瘤剂)。适合用于该一种或多种活性剂的容器包括例如瓶、小管、袋和注射器。

[0397] 认为本说明书足以使得本领域技术人员能够实施本发明。对本领域技术人员而言,除本文所显示和描述的那些之外,本发明的多种修改将从前面的描述变得显而易见,且落在所附权利要求的范围之内。

实施例

[0398] 本发明将通过参考以下实施例得到更充分理解。但是,它们不应解释为限制本发明的范围。应理解,本文所述的实施例和实施方案仅是为了说明的目的,将向本领域技术人员提示其多种修改或改变,这些修改或改变也包括在本申请的精神和范围及所附权利要求的范围之内。

[0399] 实施例1:抗PD-L1抗体和纳米清蛋白结合紫杉醇(**ABRAXANE®**)+卡铂联合治疗在MC38结肠直肠肿瘤模型中达到持续完全应答

[0400] 材料和方法

[0401] 体内肿瘤模型

[0402] MC38结肠直肠肿瘤细胞系维持在Genentech。用 0.1×10^6 MC38细胞在右单侧肋腹皮下接种7-10周龄C57BL/6雌性小鼠(Charles River Laboratories;Hollister,CA)。肿瘤达到约100-300mm³的平均肿瘤体积时,招募小鼠,随机分入治疗组,并在随后第1天开始抗体和/或化学治疗。

[0403] 用混合建模法分析来自相同动物的肿瘤体积重复测量结果随时间的变化(Pinheiro等nmle:Linear and Nonlinear Mixed Effects Models.R.package version 3.1-108 (2013))。此方法处理研究结束前的重复测量结果和适度丢失二者。用三次回归样条拟合非线性特征为不同处理下的log₂(肿瘤体积)的时程。使用nlme软件包3.1 108版(R Foundation for Statistical Computing;维也纳,奥地利),通过2.15.2版R内的线性混合效应模型进行拟合。

[0404] 对于图5A-5B中所示的MC38再攻击实验,用 0.1×10^6 MC38细胞在初次肿瘤攻击的对侧肋腹皮下接种之前用抗PD-L1+**ABRAXANE®**+卡铂组合处理治愈的小鼠。平行地,还用 0.1×10^6 MC38细胞接种首次用于实验的雌性C57BL/6小鼠。7天后,对所有小鼠实施安乐死,收集脾脏进行流式细胞术分析。所有动物研究都按照动物福利法、实验动物护理和使用指南及实验动物护理和使用委员会(IACUC)指南中所述的指南和规定进行。

[0405] 再攻击小鼠的脾细胞培养物的体外刺激

[0406] 用10ng/ml 12-豆蔻酸13-乙酸佛波酯(PMA)和1 μ g/ml离子霉素(Sigma-Alrich; St.Louis, MO)加GOLGIPLUGTM(布雷菲尔德菌素A)(BD Biosciences; San Jose, CA)将脾细胞按 1×10^6 细胞/孔一式三份地在96孔U形底平板中37℃培养4小时。收集细胞,用表面标记CD4FITC(异硫氰酸荧光素)、CD3PE(藻红蛋白)和CD8PerCp-Cy5.5(BD Biosciences)染色,用4%多聚甲醛冰上固定30分钟。用1x透化缓冲液(BD Biosciences)透化细胞,用大鼠抗小鼠抗干扰素- γ (IFN- γ)-别藻蓝蛋白(APC)缀合抗体或大鼠IgG1-APC同种型对照抗体(BD Biosciences)染色,用FACSDIVATM软件在BD Biosciences LSRII上运行。用FlowJo软件(TreeStar)进行流式细胞术分析。

[0407] 抗体和治疗

[0408] 所有治疗抗体都在Genentech产生。对照抗体是抗gp120鼠IgG1(mIgG1)克隆10E7.1D2。抗PD-L1为人/小鼠反向嵌合体克隆YW243.55.S70mIgG2a.DANA或全小鼠克隆25A1mIgG2a.DANA。**ABRAXANE®**获自Abraxis Bioscience, Inc. (Celgene所拥有; Summit, NJ)。卡铂获自Hospira, Inc. (Lake Forest, IL)。地塞米松获自West-Ward Pharmaceuticals (Eatontown, NJ)。给药时间表和给药途径如附图简述中所示。抗体稀释在PBS或20mM组氨酸醋酸盐、240mM蔗糖、0.02%聚山梨酸酯20、pH=5.5中。化疗剂和地塞米松稀释在盐水中。

[0409] 体内接种研究

[0410] 用MACS CD8分离药盒(Miltenyi Biotec)通过阴性选择从供体OTI Thy1.1雌性脾脏和肠系膜淋巴结(Genentech colony)分离OTI Thy1.1CD8+T细胞。纯化的CD8+细胞用CFSE(Life Technologies; Grand Island, NY)标记,并将 2.5×10^6 个细胞静脉内(IV)注入雌性C57BL/6雌性受体(Charles River Laboratories)。第二天,通过用250ng与全长卵清蛋白融合的抗DEC205(在Genentech产生)加盐水腹腔内注射(IP),或用250ng与全长卵清蛋白融合的抗DEC205(在Genentech产生)加4mg/kg的地塞米松IV注射来接种小鼠。接种两天后,对小鼠实施安乐死,收集脾脏进行分析。使用活细胞事件与已知浓度的固定量的荧光小球(目录号9003-53-6, Polysciences, Inc.; Warrington, PA)的比值,通过流式细胞术测定脾细胞悬液的总细胞计数。通过用Thy1.1PE-Cy7和CD8Pacific Blue(BD Biosciences)染色并用FACSDIVATM软件在BD Biosciences LSRII上运行,通过流式细胞术鉴定OTI CD8+T细胞。用FlowJo软件(TreeStar)进行流式细胞术分析。

[0411] 结果

[0412] 此研究在癌症治疗的背景中评价抗PD-L1抗体在临床前小鼠肿瘤模型中的功效。与对照抗体或紫杉醇+卡铂单独治疗相比,抗PD-L1抗体(克隆25A1mIgG2a.DANA)和紫杉醇+卡铂的联合治疗在同基因MC38结肠直肠肿瘤模型中产生协同抗肿瘤反应(图1)。与对照抗体或紫杉醇+卡铂单独治疗组中没有一只小鼠具有部分反应相比,10%的小鼠(1/10)对抗PD-L1和紫杉醇+卡铂联合治疗具有部分反应(图1)。导致肿瘤大小减小的强抗肿瘤反应记录为部分反应(FR),在此实施例中定义为从初始肿瘤体积减小>50%且<100%,或记录为完全应答,在此实施例中定义为肿瘤体积减小100%。抗PD-L1抗体和紫杉醇+卡铂的联合治疗还延迟进展时间。对照抗体的进展时间(TTP)(在此实施例中定义为5x初始肿瘤体积)为11天,紫杉醇+卡铂为15.5天,抗PD-L1抗体和紫杉醇+卡铂的联合治疗为25天。

[0413] 在临床背景中,紫杉醇(其配制在具有潜在毒性的溶剂中)治疗通常涉及用糖皮质激素如地塞米松预先给药,以降低过敏反应的可能性。但是,糖皮质激素如地塞米松具有免疫抑制作用,可以抑制T细胞反应,其转而可以降低PD-1轴结合拮抗剂如抗PD-L1剂的活性。一致地,地塞米松的施用废除了单一活性剂抗PD-L1治疗在同基因MC38结肠直肠肿瘤模型中的功效(图2A和2B)。此外,地塞米松抑制OTI过继T细胞转移和接种模型中的抗原特异性T细胞反应(图3)。因此,不希望受限于理论,诸如地塞米松的糖皮质激素治疗可以抑制或抵消PD-1轴结合拮抗剂如抗PD-L1治疗的一些益处,从而减少T细胞功能的增强及其促进抗肿瘤反应(如CD8+T细胞介导的肿瘤杀伤)的能力。

[0414] 与对照抗体、单一活性剂抗PD-L1抗体或**ABRAXANE®**+卡铂单独治疗相比,抗PD-L1抗体(嵌合YW243.55.S70.mIgG2a.DANA)和纳米清蛋白结合紫杉醇(**ABRAXANE®**)+卡铂的联合治疗在同基因MC38结肠直肠肿瘤模型中产生意料之外的强协同抗肿瘤功效(图4A和4B)。抗PD-L1抗体和**ABRAXANE®**+卡铂联合治疗在4/8小鼠中达到持续超过90天的持续完全应答(图4A和4B)。此协同作用比作为抗PD-L1和紫杉醇+卡铂联合治疗的结果观察到的协同作用更强。对照抗体单独的TTP(5x初始肿瘤体积)为11.5天,抗PD-L1抗体单独为9天,**ABRAXANE®**+卡铂单独为13.5天,不适用于抗PD-L1抗体和**ABRAXANE®**+卡铂的联合治疗,其中4/8小鼠显示完全消退。这表明,抗PD-L1抗体和**ABRAXANE®**+卡铂的联合治疗以比抗PD-L1抗体和紫杉醇+卡铂联合治疗更大的程度强烈推迟进展时间。此外,来自抗PD-L1和**ABRAXANE®**+卡铂联合治疗的所有治愈鼠(即显示完全应答的小鼠)都能够完全排斥同一MC38肿瘤细胞系的二次攻击,表明治疗产生了T细胞记忆反应(图5A-5B)。与首次用于实验的首次攻击的小鼠相比,如通过来自CD4+T和CD8+T细胞二者的增强的干扰素- γ (IFN- γ)产生所观察,来自这些治愈小鼠的脾细胞的体外再刺激显示增强的T细胞效应子功能(图5A-5B)。

[0415] 惊人的强抗肿瘤协同活性及意料之外的获得完全应答和产生T细胞记忆反应的能力代表了PD-1轴结合拮抗剂和紫杉烷(如纳米清蛋白结合紫杉醇(**ABRAXANE®**))联合治疗的重要治疗优势。此外,与紫杉醇治疗不同,纳米清蛋白结合紫杉醇(**ABRAXANE®**)治疗通常不涉及用糖皮质激素如地塞米松预先给药。本文提供的结果表明,PD-1轴结合拮抗剂(如抗PD-L1抗体)和纳米清蛋白结合紫杉醇(**ABRAXANE®**)联合治疗还使得能够实施更简单的治疗方案,该治疗方案可以避免使用糖皮质激素,从而降低潜在副作用的可能性。

[0416] 实施例2:抗PD-L1抗体与纳米清蛋白结合紫杉醇(**ABRAXANE®**)和卡铂联合治疗在非小细胞肺癌患者的1b期临床试验中达到完全应答

[0417] 进行1b期临床研究,以评价抗PD-L1抗体(MPDL3280A)与紫杉烷(纳米清蛋白结合紫杉醇(**ABRAXANE®**)或紫杉醇)和卡铂组合的联合治疗对非小细胞肺癌(NSCLC)患者的功效。

[0418] 此临床研究的给药方案如下:

[0419] 1) MPDL3280A/**ABRAXANE®**/卡铂联合治疗:(a) 每3周(q3w) IV施用1200mg

MPDL3280A; (b) 每周 (q1w) IV施用100mg/m² **ABRAXANE®**; 和 (c) 每3周 (q3w) IV施用目标曲线下面积为6mg/m1的卡铂。

[0420] 2) MPDL3280A/紫杉醇/卡铂联合治疗: (a) 每3周 (q3w) IV施用1200mg MPDL3280A; (b) 每3周 (q3w) IV施用200mg/m²紫杉醇; 和 (c) 每3周 (q3w) IV施用目标AUC为6mg/m1的卡铂。

[0421] 表4显示用MPDL3280A与 **ABRAXANE®**和卡铂联合治疗的14名患者的研究结果。表5显示用MPDL3280A与紫杉醇和卡铂联合治疗的6名患者的研究结果。

[0422] 表4:MPDL3280A/**ABRAXANE®**/卡铂联合治疗的功效

[0423]

结果	百分比 (n/N)
客观反应率 (ORR)	64.3% (9/14)
完全应答 (CR)	21.4% (3/14)
部分反应 (PR)	42.9% (6/14)
稳定疾病 (SD)	28.6% (4/14)
进行性疾病 (PD)	7.1% (1/14)

[0424] 表5:MPDL3280A/紫杉醇/卡铂联合治疗的功效

[0425]

结果	百分比 (n/N)
客观反应率 (ORR)	33.3% (2/6)
完全应答 (CR)	0
部分反应 (PR)	33.3% (2/6)
稳定疾病 (SD)	66.7% (4/6)
进行性疾病 (PD)	0

[0426] 如表4和图6A中所示,MPDL3280A和纳米清蛋白结合紫杉醇(**ABRAXANE®**)+卡铂联合治疗产生意料之外的强抗肿瘤功效,客观反应率 (ORR,CR+PR) 为64.3%。令人惊奇地,21.4% (3/14) 的用MPDL3280A和纳米清蛋白结合紫杉醇(**ABRAXANE®**)+卡铂联合治疗治疗的患者达到完全应答(即完全没有可检测到的瘤块)。42.9% (6/14) 的患者经历部分反应。

[0427] MPDL3280A和紫杉醇+卡铂联合治疗也产生抗肿瘤功效,但在所测试的相对小的样本量中,在某种程度上没有MPDL3280A/纳米清蛋白结合紫杉醇(**ABRAXANE®**)+卡铂联合治疗那么强健(robust)。MPDL3280A和紫杉醇+卡铂联合治疗的ORR为33.3%,两名反应者都经历部分反应(表5和图6B)。

[0428] 与实施例1中提供的临床前研究一致,惊人的强抗肿瘤活性和意料之外的获得持续完全应答的能力代表了PD-1轴结合拮抗剂(如抗PD-L1抗体)和紫杉烷(如纳米清蛋白结合紫杉醇(**ABRAXANE®**))联合治疗的重要治疗优势。

序 列 表

<110> 基因技术公司 (Genentech, Inc.)
 豪夫迈·罗氏有限公司 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG)
 <120> 用 PD-1 轴结合拮抗剂和紫杉烷治疗癌症的方法
 <130> 50474-103W02
 <150> US 61/917, 264
 <151> 2013-12-17
 <160> 33
 <170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1
 <211> 440
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 1
 Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0001] 35 40 45
 Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110
 Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
 115 120 125
 Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
 130 135 140
 Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
 145 150 155 160
 Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
 165 170 175
 Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
 180 185 190
 Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 195 200 205
 Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 210 215 220

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 225 230 235 240
 Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 245 250 255
 Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 260 265 270
 Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 275 280 285
 Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 290 295 300
 Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 305 310 315 320
 Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 325 330 335
 Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
 340 345 350
 Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
 355 360 365
 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
 370 375 380
 Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 385 390 395 400
 [0002] Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
 405 410 415
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 420 425 430
 Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435 440

 <210> 2
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 2
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro

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

<210> 3

<211> 118

[0003] <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 3

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser

20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

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

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 4

<211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 4
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 5
 [0004] <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa 是 D 或 G
 <400> 5
 Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Ser Trp Ile His
 1 5 10

<210> 6
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa 是 S 或 L

<220>

<221> Xaa

<222> (10)..(10)

<223> Xaa 是 T 或 S

<400> 6

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

1

5

10

15

Lys Gly

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 7

Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr

1

5

<210> 8

<211> 25

[0005]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 8

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser

20

25

<210> 9

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 9

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

1

5

10

<210> 10

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 10
 Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
 1 5 10 15
 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 20 25 30

<210> 11
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体

<400> 11
 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 1 5 10

<210> 12
 <211> 11
[0006] <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa 是 D 或 V
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa 是 V 或 I
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa 是 S 或 N
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (9)..(9)
 <223> Xaa 是 A 或 F
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (10)..(10)

<223> Xaa 是 V 或 L
 <400> 12
 Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Ala
 1 5 10

<210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa 是 F 或 T
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa 是 Y 或 A
 <400> 13
 Ser Ala Ser Xaa Leu Xaa Ser
 1 5

[0007]

<210> 14
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa 是 Y、G、F 或 S
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa 是 L、Y、F 或 W
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa 是 Y、N、A、T、G、F 或 I
 <220>
 <221> Xaa
 <222> (6)..(6)
 <223> Xaa 是 H、V、P、T 或 I

<220>
 <221> Xaa
 <222> (8)..(8)
 <223> Xaa 是 A、W、R、P 或 T
 <400> 14
 Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr
 1 5

<210> 15
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 15
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 20

<210> 16
 <211> 15
[0008] <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 16
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 1 5 10 15

<210> 17
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 17
 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 1 5 10 15
 Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
 20 25 30

<210> 18
 <211> 11
 <212> PRT

<213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 18
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 1 5 10

<210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 19
 Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His
 1 5 10

<210> 20
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 [0009] <223> 合成构建体
 <400> 20
 Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15
 Lys Gly

<210> 21
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 21
 Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr
 1 5

<210> 22
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体

<400> 22
 Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 23
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 23
 Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
 1 5

<210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 24
 Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr

[0010] 1 5

<210> 25
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 25
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
 20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 26
<211> 122
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 26

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser
20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

[0011] Ala Arg Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120

<210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 27

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

<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 28

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

1	5	10	
<210> 29			
<211> 30			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成构建体			
<400> 29			
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser			
20	25	30	
<210> 30			
<211> 14			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成构建体			
<400> 30			
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala			
[0012] 1	5	10	
<210> 31			
<211> 15			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成构建体			
<400> 31			
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys			
1	5	10	15
<210> 32			
<211> 447			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成构建体			
<400> 32			
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser 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
[0013] 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 Pro Ser
 225 230 235 240
 Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp

385	390	395	400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser			
405	410	415	
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala			
420	425	430	
Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
435	440	445	
<210> 33			
<211> 214			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成构建体			
<400> 33			
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala			
20	25	30	
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
35	40	45	
[0014] Tyr Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
50	55	60	
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
65	70	75	80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala			
85	90	95	
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala			
100	105	110	
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly			
115	120	125	
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala			
130	135	140	
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln			
145	150	155	160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser			
165	170	175	
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr			
180	185	190	
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser			
195	200	205	
Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
210			

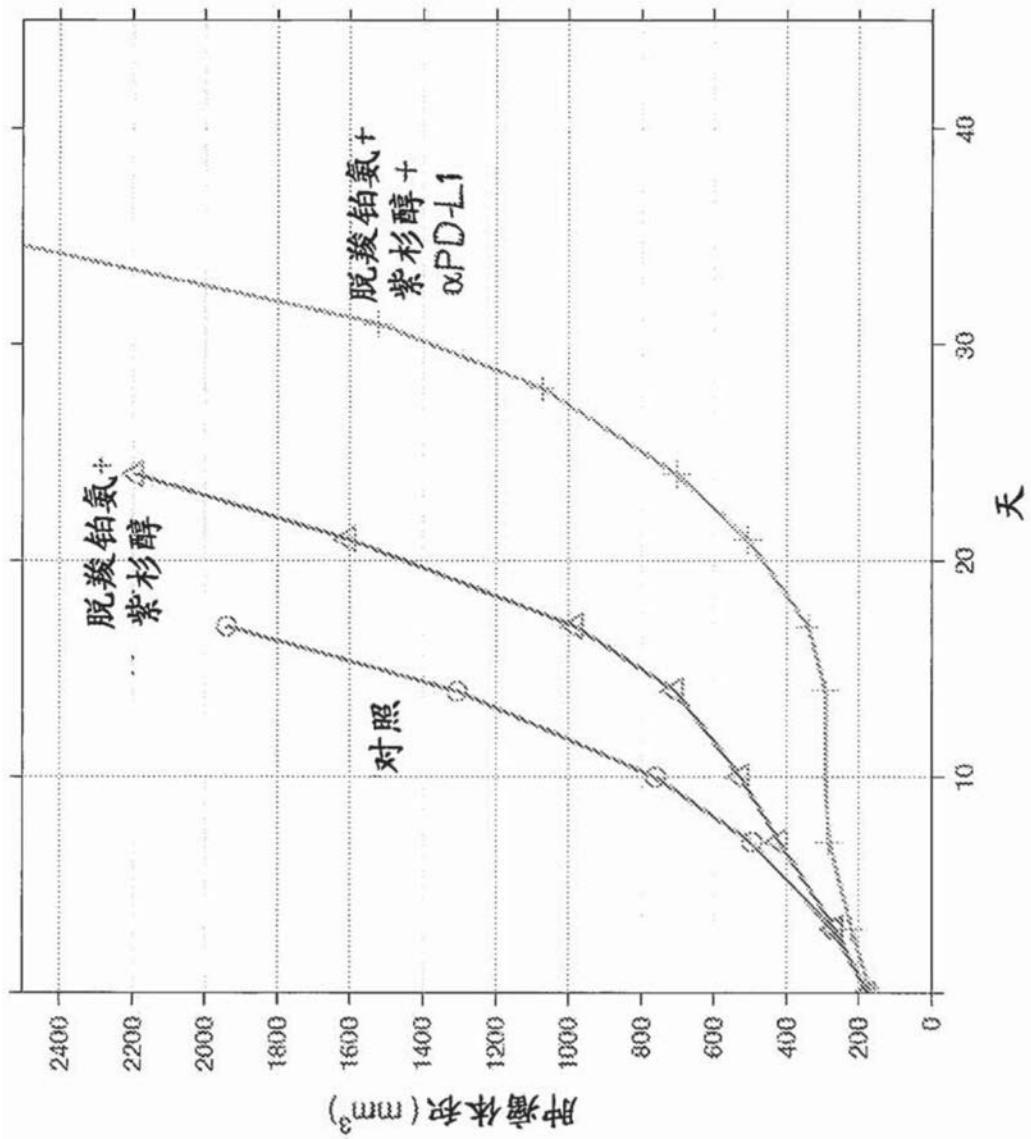


图1

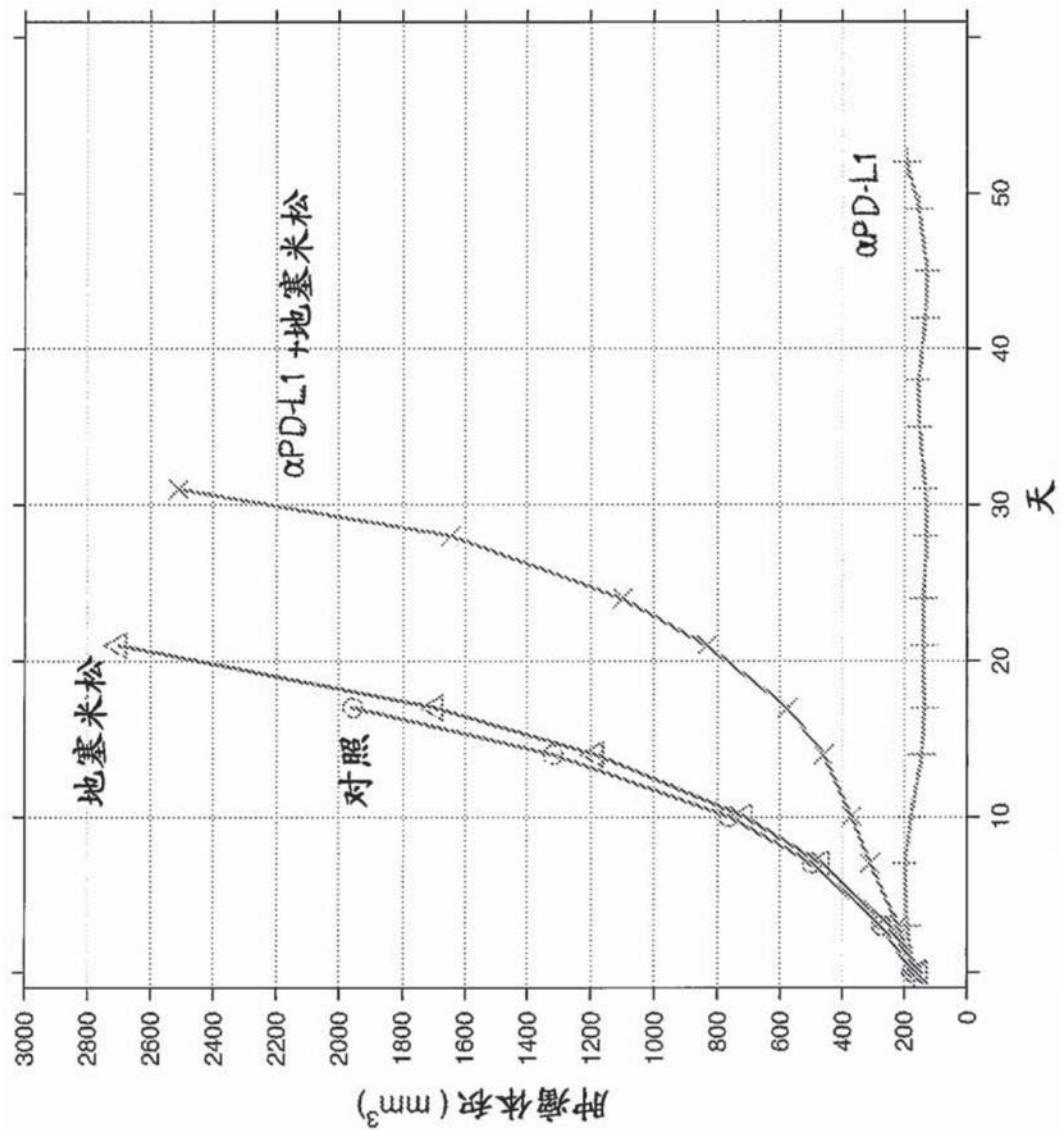


图2A

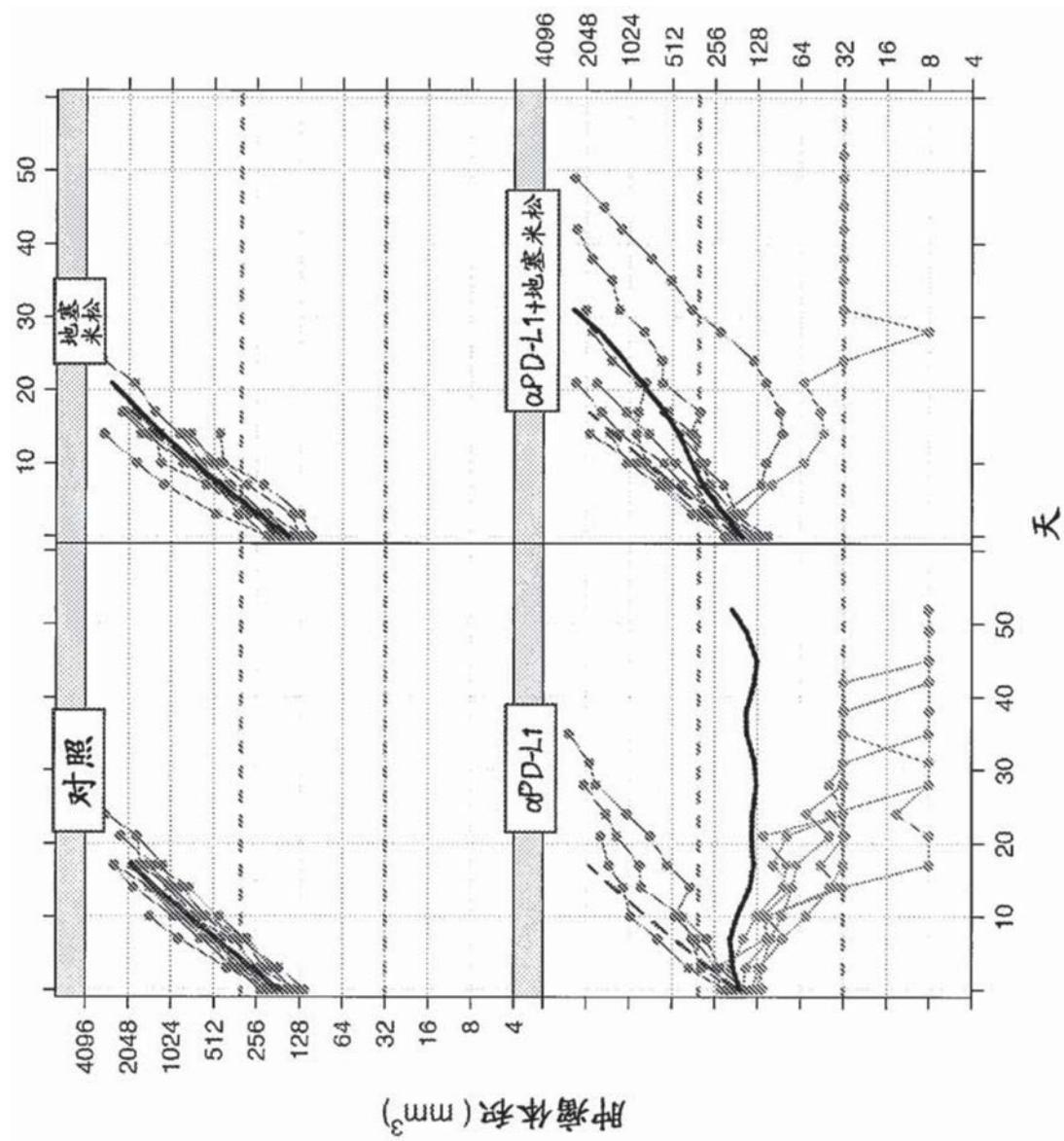


图2B

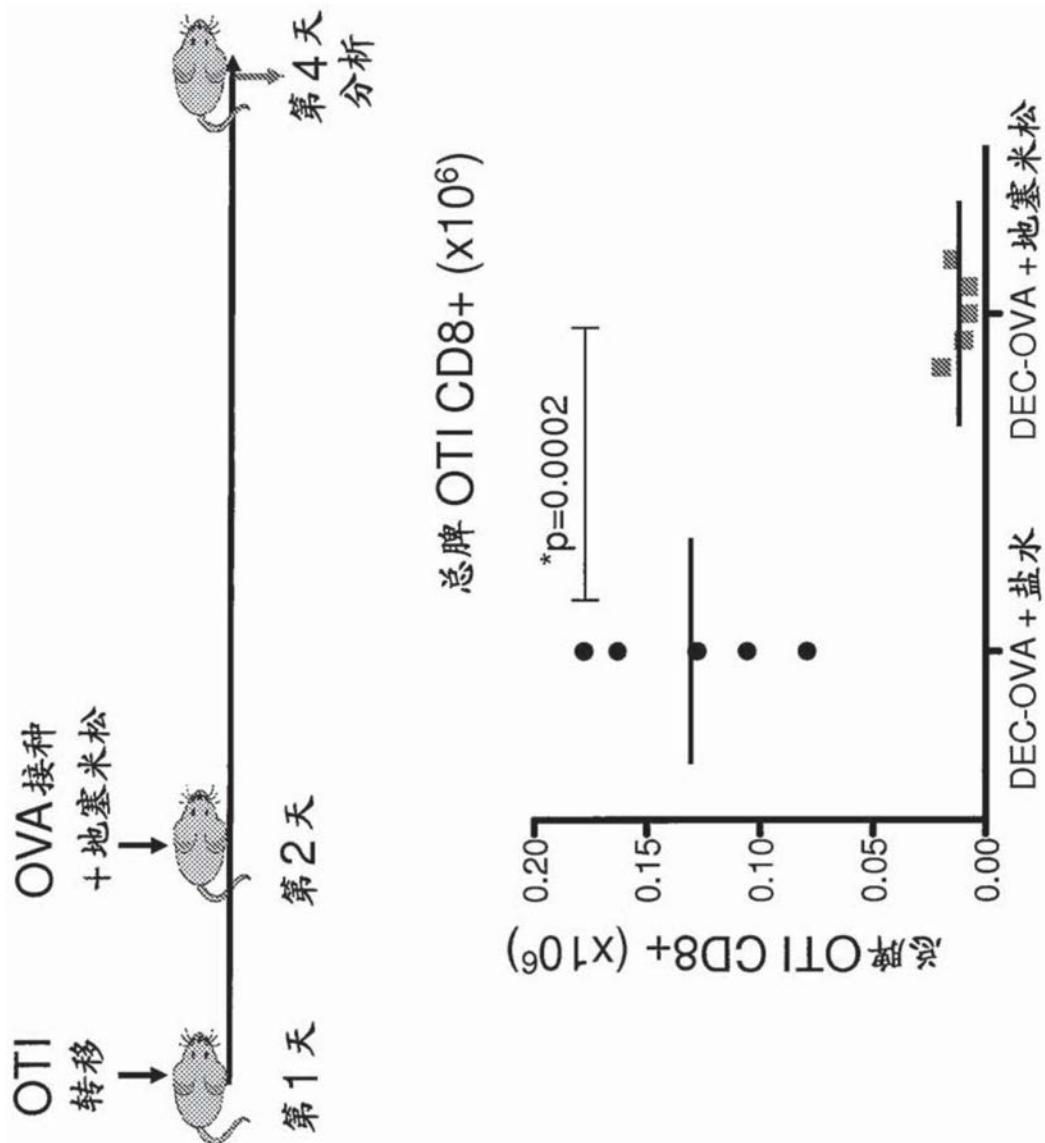
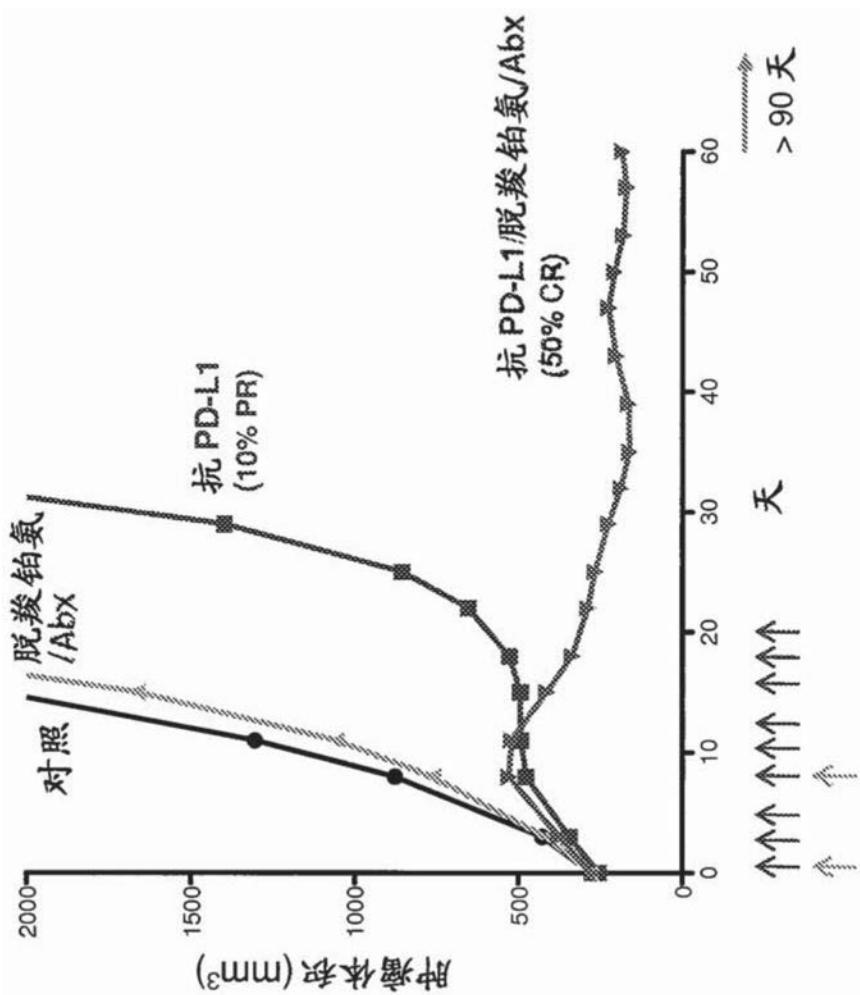


图3



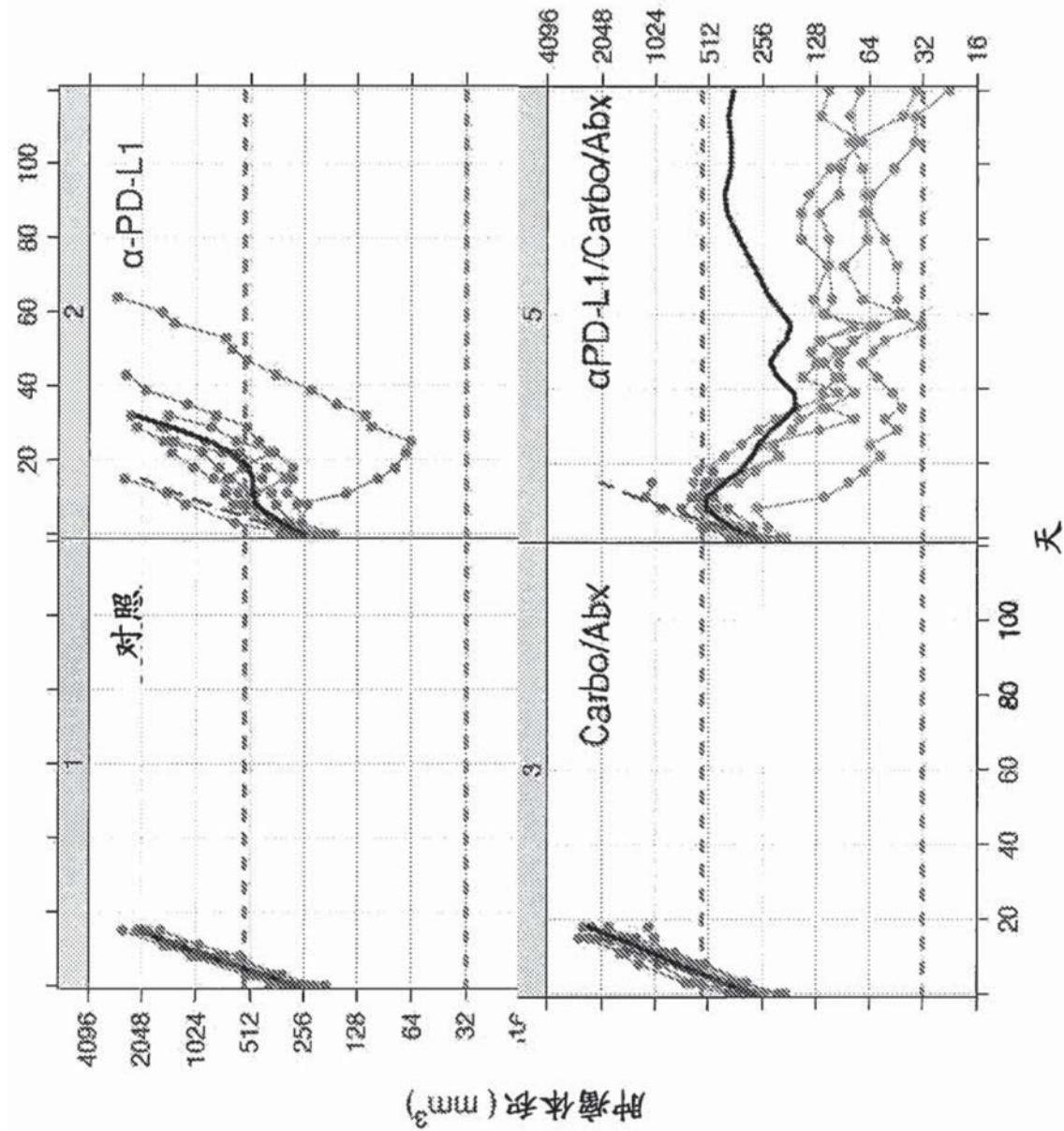


图4B

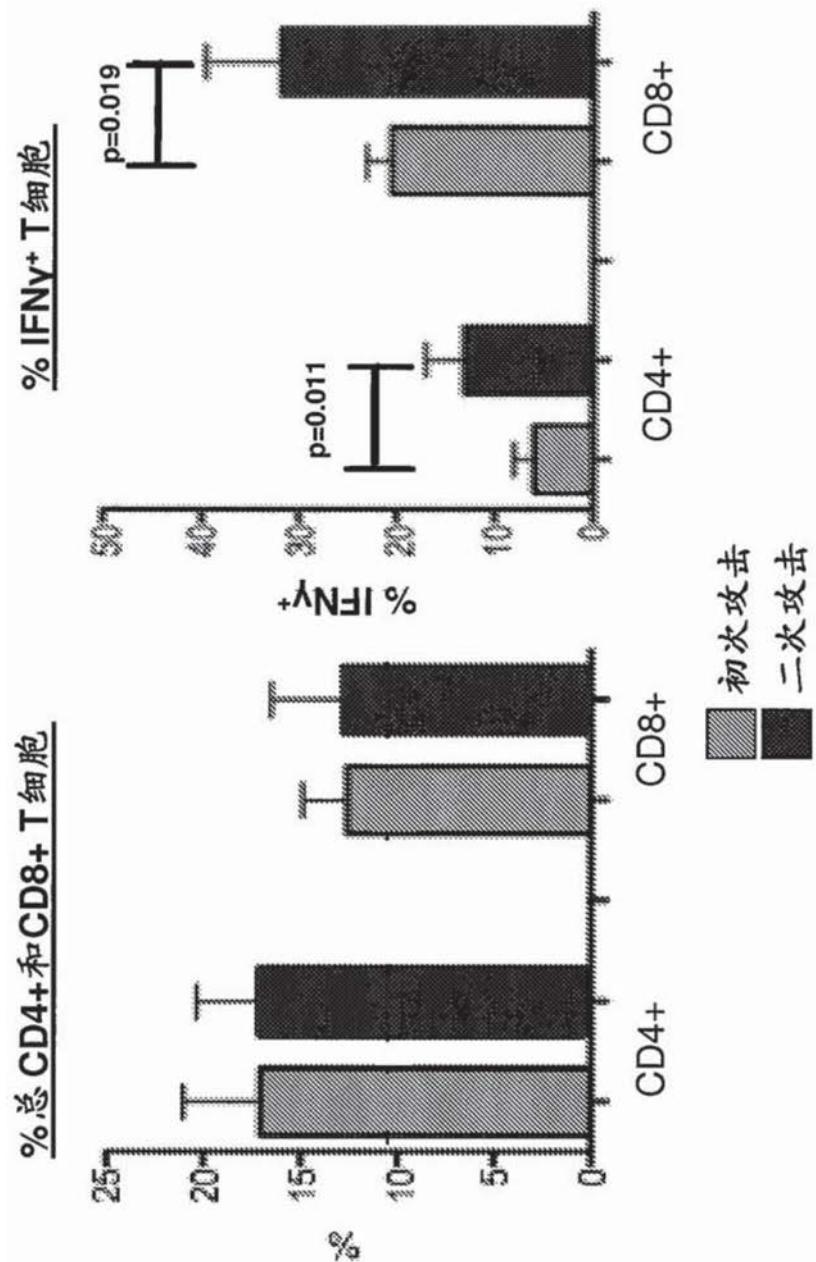


图5A

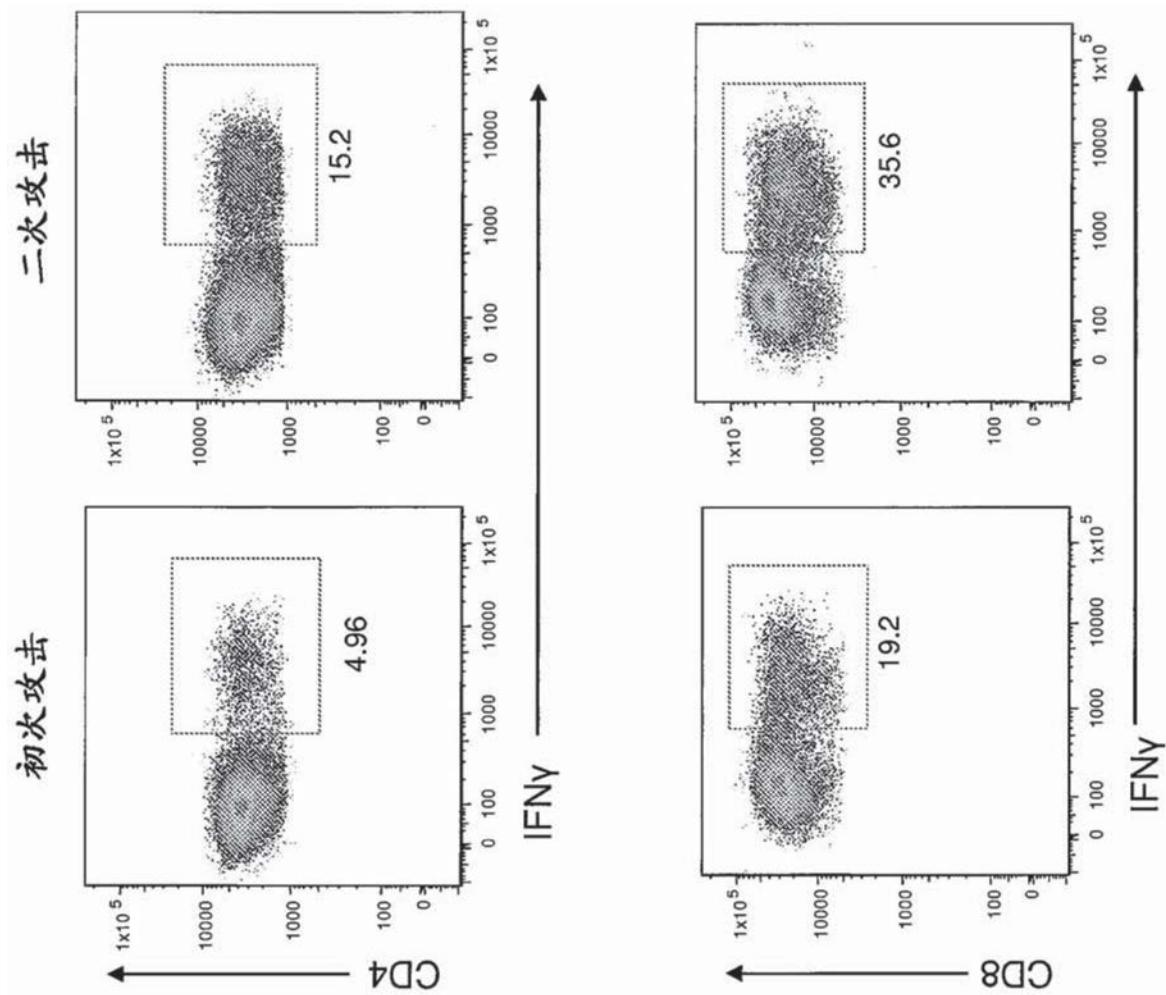


图5B

MPDL3280A/ABRAXANE®/脱羧铂氯

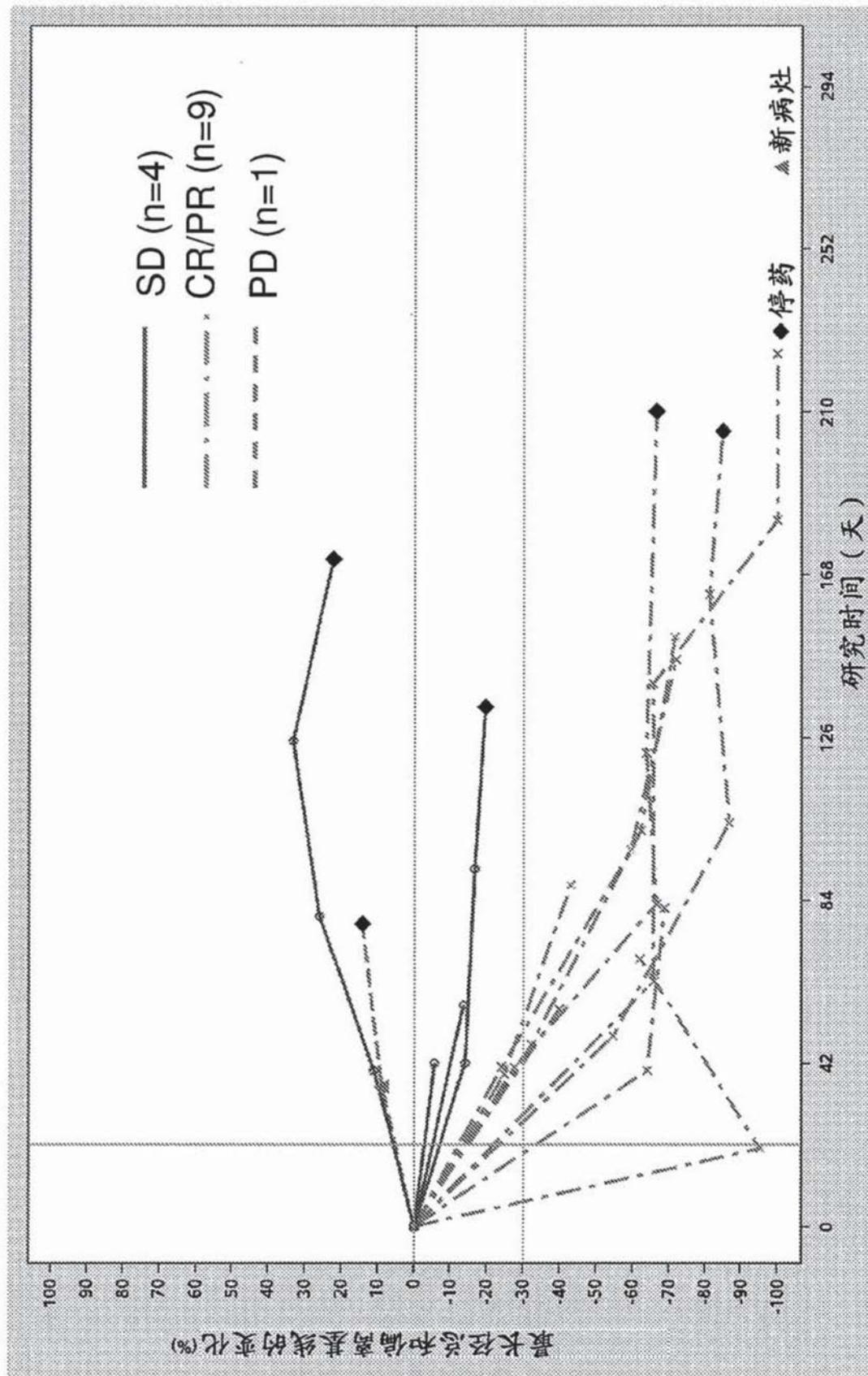


图6A

MPDL3280A/paclitaxel/脱羧铂氯

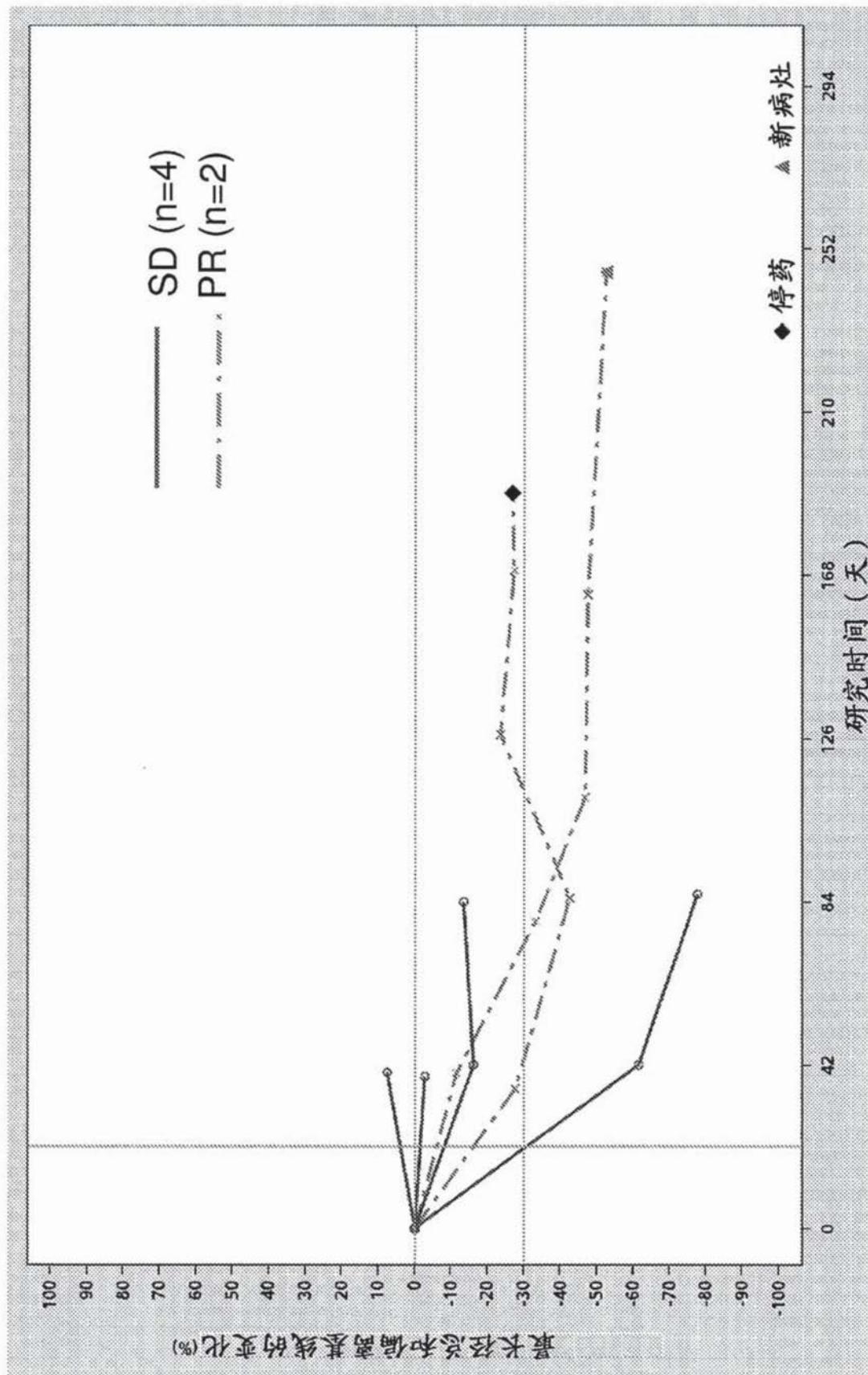


图6B