



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 105899535 A

(43)申请公布日 2016.08.24

(21)申请号 201480068499.8

(22)申请日 2014.12.17

(30)优先权数据

61/917,264 2013.12.17 US

62/034,766 2014.08.07 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.06.16

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/070983 2014.12.17

(87)PCT国际申请的公布数据

W02015/095410 EN 2015.06.25

(71)申请人 豪夫迈·罗氏有限公司

地址 瑞士巴塞尔

(72)发明人 J·金姆

(74)专利代理机构 北京市中咨律师事务所
11247

代理人 凌立 黄革生

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/02(2006.01)

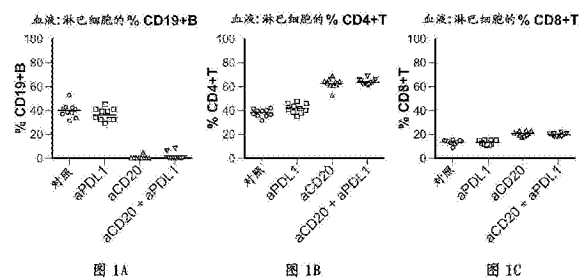
权利要求书4页 说明书77页
序列表31页 附图7页

(54)发明名称

用PD-1轴结合拮抗剂和抗CD20抗体治疗癌症的方法

(57)摘要

本发明描述包含PD-1轴结合拮抗剂和抗CD20抗体的联合治疗及其使用方法,包括治疗其中希望得到增强的免疫原性的病症的方法,该增强的免疫原性如提高用于治疗癌症的肿瘤免疫原性。



1. 用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的方法,其包括对所述个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和抗CD20抗体。

2. 权利要求1的方法,其中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。

3. 权利要求2的方法,其中PD-1轴结合拮抗剂是PD-1结合拮抗剂。

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

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

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

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

8. 权利要求4的方法,其中PD-1结合拮抗剂是抗体。

9. 权利要求8的方法,其中PD-1结合拮抗剂是MDX-1106。

10. 权利要求8的方法,其中PD-1结合拮抗剂是Merck 3745。

11. 权利要求8的方法,其中PD-1结合拮抗剂是CT-011。

12. 权利要求4的方法,其中PD-1结合拮抗剂是AMP-224。

13. 权利要求2的方法,其中PD-1轴结合拮抗剂是PD-L1结合拮抗剂。

14. 权利要求13的方法,其中PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与PD-1的结合。

15. 权利要求13的方法,其中PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与B7-1的结合。

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

17. 权利要求13的方法,其中PD-L1结合拮抗剂是抗PD-L1抗体。

18. 权利要求17的方法,其中抗PD-L1抗体是单克隆抗体。

19. 权利要求17的方法,其中抗PD-L1抗体是选自Fab、Fab'-SH、Fv、scFv和(Fab')₂片段的抗体片段。

20. 权利要求17-19中任一项的方法,其中抗PD-L1抗体是人源化抗体或人抗体。

21. 权利要求13的方法,其中PD-L1结合拮抗剂选自YW243.55.S70、MPDL3280A、MDX-1105和MEDI4736。

22. 权利要求17的方法,其中抗PD-L1抗体包含含有HVR-H1序列SEQ ID NO:15、HVR-H2序列SEQ ID NO:16和HVR-H3序列SEQ ID NO:3的重链,及含有HVR-L1序列SEQ ID NO:17、HVR-L2序列SEQ ID NO:18和HVR-L3序列SEQ ID NO:19的轻链。

23. 权利要求17的方法,其中抗PD-L1抗体包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:24的重链可变区和含有氨基酸序列SEQ ID NO:21的轻链可变区。

24. 权利要求2的方法,其中PD-1轴结合拮抗剂是PD-L2结合拮抗剂。

25. 权利要求24的方法,其中PD-L2结合拮抗剂是抗体。

26. 权利要求24的方法,其中PD-L2结合拮抗剂是免疫黏附素。

27. 权利要求8、17-23和25中任一项的方法,其中抗体是在EU编号的297位上具有Asn至Ala取代的人IgG1。

28. 权利要求1-27中任一项的方法,其中抗CD20抗体是人源化B-Ly1抗体。

29. 权利要求1-27中任一项的方法,其中抗CD20抗体是GA101抗体。

30. 权利要求29的方法,其中GA101是抗人CD20抗体,所述抗人CD20抗体包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:50的HVR-H1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:51的HVR-H2、含有氨基酸序列

SEQ ID NO:52的HVR-H3、含有氨基酸序列SEQ ID NO:53的HVR-L1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:54的HVR-L2和含有氨基酸序列SEQ ID NO:55的HVR-L3。

31.权利要求30的方法,其中GA101抗体包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:56的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:57的VL结构域。

32.权利要求30的方法,其中GA101抗体包含氨基酸序列SEQ ID NO:58和氨基酸序列SEQ ID NO:59。

33.权利要求30的方法,其中GA101抗体是obinutuzumab。

34.权利要求30的方法,其中GA101抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:58具有至少95%序列同一性的氨基酸序列,且包含与氨基酸序列SEQ ID NO:59具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

35.权利要求1-27中任一项的方法,其中抗CD20抗体是多特异性抗体。

36.权利要求1-27中任一项的方法,其中抗CD20抗体是双特异性抗体。

37.权利要求1-36中任一项的方法,其中个体是人。

38.权利要求1-37中任一项的方法,其中个体患有癌症或已诊断患有癌症。

39.权利要求1-38中任一项的方法,其中癌症是表达CD20的癌症。

40.权利要求1-39中任一项的方法,其中癌症是非实体瘤。

41.权利要求40的方法,其中癌症是淋巴瘤或白血病。

42.权利要求41的方法,其中白血病是慢性淋巴细胞性白血病(CLL)或急性髓性白血病(AML)。

43.权利要求41的方法,其中淋巴瘤是非霍奇金淋巴瘤(NHL)。

44.权利要求39或40的方法,其中个体患有复发性或难治性或之前未治疗过的慢性淋巴细胞性白血病。

45.权利要求44的方法,其中个体患有难治性或复发性滤泡型淋巴瘤或弥漫型大B细胞淋巴瘤(DLBCL)。

46.权利要求1-45中任一项的方法,其中治疗在停止所述治疗后在所述个体中产生持续反应。

47.权利要求1-46中任一项的方法,其中抗CD20抗体或PD-1轴结合拮抗剂连续或间隔施用。

48.权利要求1-47中任一项的方法,其中抗CD20抗体在PD-1轴结合拮抗剂之前施用。

49.权利要求1-47中任一项的方法,其中抗CD20抗体与PD-1轴结合拮抗剂同时施用。

50.权利要求1-47中任一项的方法,其中抗CD20抗体在PD-1轴结合拮抗剂之后施用。

51.在患有癌症的个体中增强免疫功能的方法,其包括施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和抗CD20抗体的组合。

52.权利要求51的方法,其中相对于施用所述组合之前,个体中CD8T细胞具有增强的引发、激活、增殖和/或溶细胞活性。

53.权利要求51的方法,其中相对于施用所述组合之前,CD8T细胞激活表征为提高的 γ -IFN⁺CD8T细胞频度和/或增强的溶细胞活性。

54.权利要求51的方法,其中相对于施用所述组合之前,CD8T细胞的数目提高。

55.权利要求51-54中任一项的方法,其中CD8T细胞是抗原特异性CD8T细胞。

56. 权利要求51-55中任一项的方法,其中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。

57. 权利要求56的方法,其中PD-1轴结合拮抗剂是PD-1结合拮抗剂。

58. 权利要求57的方法,其中PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与其配体结合配偶体的结合。

59. 权利要求57的方法,其中PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD-L1的结合。

60. 权利要求57的方法,其中PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD-L2的结合。

61. 权利要求57的方法,其中PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD-L1和PD-L2二者的结合。

62. 权利要求57的方法,其中PD-1结合拮抗剂是抗PD-1抗体。

63. 权利要求62的方法,其中PD-1结合拮抗剂是MDX-1106、Merck3745或CT-011。

64. 权利要求57的方法,其中PD-1结合拮抗剂是AMP-224。

65. 权利要求56的方法,其中PD-1轴结合拮抗剂是PD-L1结合拮抗剂。

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

67. 权利要求65的方法,其中PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与B7-1的结合。

68. 权利要求65的方法,其中PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与PD-1和B7-1二者的结合。

69. 权利要求65的方法,其中PD-L1结合拮抗剂是抗PD-L1抗体。

70. 权利要求69的方法,其中抗PD-L1抗体是单克隆抗体。

71. 权利要求69的方法,其中抗PD-L1抗体是选自Fab、Fab'-SH、Fv、scFv和(Fab')₂片段的抗体片段。

72. 权利要求69-71中任一项的方法,其中抗PD-L1抗体是人源化抗体或人抗体。

73. 权利要求65的方法,其中PD-L1结合拮抗剂选自YW243.55.S70、MPDL3280A、MDX-1105和MEDI4736。

74. 权利要求69-72中任一项的方法,其中抗PD-L1抗体包含含有HVR-H1序列SEQ ID NO:15、HVR-H2序列SEQ ID NO:16和HVR-H3序列SEQ ID NO:3的重链,及含有HVR-L1序列SEQ ID NO:17、HVR-L2序列SEQ ID NO:18和HVR-L3序列SEQ ID NO:19的轻链。

75. 权利要求74的方法,其中抗PD-L1抗体包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:24的重链可变区和含有氨基酸序列SEQ ID NO:21的轻链可变区。

76. 权利要求56的方法,其中PD-1轴结合拮抗剂是PD-L2结合拮抗剂。

77. 权利要求76的方法,其中PD-L2结合拮抗剂是抗体。

78. 权利要求76的方法,其中PD-L2结合拮抗剂是免疫黏附素。

79. 权利要求62、69-75和77中任一项的方法,其中抗体是在EU编号的297位上具有Asn至Ala取代的人IgG1。

80. 权利要求51-79中任一项的方法,其中抗CD20抗体是人源化B-Ly1抗体。

81. 权利要求51-79中任一项的方法,其中抗CD20抗体是GA101抗体。

82. 权利要求81的方法,其中GA101是抗人CD20抗体,所述抗人CD20抗体包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:50的HVR-H1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:51的HVR-H2、含有氨基酸序列SEQ ID NO:52的HVR-H3、含有氨基酸序列SEQ ID NO:53的HVR-L1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:54的HVR-L2和含有氨基酸序列SEQ ID NO:55的HVR-L3。

83. 权利要求81的方法,其中GA101抗体包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:56的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:57的VL结构域。

84. 权利要求81的方法,其中GA101抗体包含氨基酸序列SEQ ID NO:58和氨基酸序列SEQ ID NO:59。

85. 权利要求81的方法,其中GA101抗体是obinutuzumab。

86. 权利要求81的方法,其中GA101抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:58具有至少95%序列同一性的氨基酸序列,且包含与氨基酸序列SEQ ID NO:59具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

87. 权利要求51-79中任一项的方法,其中抗CD20抗体是多特异性抗体。

88. 权利要求51-79中任一项的方法,其中抗CD20抗体是双特异性抗体。

89. 权利要求51-88中任一项的方法,其中个体是人。

90. 权利要求51-89中任一项的方法,其中个体患有癌症或已诊断患有癌症。

91. 权利要求51-90中任一项的方法,其中癌症是表达CD20的癌症。

92. 权利要求51-91中任一项的方法,其中癌症是非实体瘤。

93. 权利要求92的方法,其中癌症是淋巴瘤或白血病。

94. 权利要求93的方法,其中白血病是慢性淋巴细胞性白血病(CLL)或急性髓性白血病(AML)。

95. 权利要求93的方法,其中淋巴瘤是非霍奇金淋巴瘤(NHL)。

96. 权利要求91的方法,其中个体患有复发性或难治性或之前未治疗过的慢性淋巴细胞性白血病。

97. 权利要求96的方法,其中个体患有难治性或复发性滤泡型淋巴瘤或弥漫型大B细胞淋巴瘤(DLBCL)。

98. 权利要求51-97中任一项的方法,其中抗CD20抗体或PD-1轴结合拮抗剂连续或间隔施用。

99. 权利要求51-98中任一项的方法,其中抗CD20抗体在PD-1轴结合拮抗剂之前施用。

100. 权利要求51-98中任一项的方法,其中抗CD20抗体与PD-1轴结合拮抗剂同时施用。

101. 权利要求51-98中任一项的方法,其中抗CD20抗体在PD-1轴结合拮抗剂之后施用。

102. 权利要求1-101中任一项的方法,其中PD-1轴结合拮抗剂或抗CD20抗体静脉内、肌肉内、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。

103. 权利要求23、24、74和75中任一项的方法,其中抗PD-L1抗体按每三周一次1200mg的剂量对所述个体静脉内施用。

104. 权利要求30-34和82-85中任一项的方法,其中抗CD20抗体在循环1的第1、8和15天及循环2至8的第1天按一次1000mg的剂量对所述个体静脉内施用。

105. 药盒,其包含PD-1轴结合拮抗剂和包装说明书,所述包装说明书包含用所述PD-1轴结合拮抗剂与抗CD20抗体组合来在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的说明。

106. 药盒,其包含PD-1轴结合拮抗剂和抗CD20抗体。

107. 权利要求106的药盒,其中药盒进一步包含含有用所述PD-1轴结合拮抗剂和所述抗CD20抗体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。

108. 药盒,其包含抗CD20抗体和包装说明书,所述包装说明书包含用所述抗CD20抗体与PD-1轴结合拮抗剂组合来在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的说明。

用PD-1轴结合拮抗剂和抗CD20抗体治疗癌症的方法

[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和2014年8月7日提交的美国临时申请号62/034,766的优先权,这些美国临时申请中的每一个在此完整引入作为参考。

[0003] ASCII文本文件序列表的提交

[0004] 以下ASCII文本文件提交的内容在此完整引入引入作为参考:计算机可读形式(CRF)的序列表(文件名:146392027940SeqList.txt,记录日期:2014年12月16日,大小:57KB)。

背景技术

[0005] 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。Lafferty等,Aust.J.Exp.Biol.Med.Sci.53:27-42(1975)。此模型进一步提供了自身与非自身和免疫耐受的区分。Bretscher等,Science 169:1042-1049(1970);Bretscher,P.A.,P.N.A.S.USA 96:185-190(1999);Jenkins等,J.Exp.Med.165:302-319(1987)。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。次级或共刺激信号由表达在抗原呈递细胞(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。Lenschow等,Ann.Rev.Immunol.14:233(1996)。在缺乏共刺激的情况下,T细胞可变得耐受抗原刺激,不增加有效免疫反应,并可进一步导致对外来抗原疲劳(exhaustion)或耐受。

[0006] 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。共刺激的机制具有治疗意义,因为已显示共刺激信号的操作提供了增强或终止基于细胞的免疫反应的手段。最近,已发现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)的诱导和持续表达同时发生。因此,治疗性靶向PD-1和其他通过与PD-1相互作用来发信号的分子(如程序性死亡配体1(PD-L1)和程序性死亡配体2(PD-L2))是非常感兴趣的领域。

[0007] PD-L1在许多癌症中过量表达,且通常与预后差相关(Okazaki T等,Intern.Immun.2007 19(7):813)(Thompson RH等,Cancer Res 2006,66(7):3381)。有趣的是,与正常组织中的T淋巴细胞和外周血T淋巴细胞不同,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(Blood 2009 114(8):1537)。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(Sharpe等,Nat Rev 2002)(Keir ME等,2008 Annu.Rev.Immunol.26:677)。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。

[0008] 已提出将抑制PD-1轴通过其直接配体(例如PD-L1、PD-L2)的信号发放作为增强T细胞免疫的手段用于治疗癌症(例如肿瘤免疫)。此外,已通过抑制PD-L1与结合配偶体B7-1的结合观察到了相似的T细胞免疫增强。此外,PD-1信号发放与肿瘤细胞中失调的其他信号传导途径(例如MAPK途径,“MEK”)的组合抑制可以进一步增强治疗功效。但是,最佳治疗处理将组合PD-1受体/配体相互作用的阻断与直接抑制肿瘤生长的物质(agent),可选地进一步包括PD-1阻断单独所未提供的独特免疫增强特性。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。

[0009] 本文公开的所有参考文献、出版物和专利申请在此以其整体引入作为参考。

[0010] 发明概述

[0011] 在一方面,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轴结合拮抗剂和抗CD20抗体。

[0012] 在另一方面,本文提供在患有癌症的个体中增强免疫功能的方法,其包括施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和抗CD20抗体的组合。在一些实施方案中,相对于施用该组合之前,该个体中的CD8⁺T细胞具有增强的引发、激活、增殖和/或溶细胞活性。在一些实施方案中,该CD8⁺T细胞激活表征为相对于施用该组合之前,提高的 γ -IFN⁺ CD8⁺T细胞频度和/或增强的溶细胞活性。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。

[0013] 在另一方面,本文提供人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抗CD20抗体和可选的可药用载体的组合物的组合。

[0014] 在另一方面,本文提供抗CD20抗体在制备用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的药物中的用途,其中该药物包含抗CD20抗体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。

[0015] 在另一方面,本文提供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抗CD20抗体和可选的可药用载体。

[0016] 在另一方面,本文提供用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的包含CD20抗体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。

[0017] 在另一方面,本文提供人PD-1轴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CD20抗体和可选的可药用载体的组合物的组合。在一些实施方案中,相对于施用该组合之前,该个体中的CD8⁺T细胞具有增强的引发、激活、增殖和/或溶细胞活性。在一些实施方案中,该CD8⁺T细胞激活表征为相对于施用该组合之前,提高的 γ -IFN⁺ CD8⁺T细胞频度和/或增强的溶细胞活性。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。

[0018] 在另一方面,本文提供抗CD20抗体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,其中该药物包含抗CD20抗体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。在一些实施方案中,相对于施用该组合之前,该个体中的CD8⁺ T细胞具有增强的引发、激活、增殖和/或溶细胞活性。在一些实施方案中,该CD8⁺ T细胞激活表征为相对于施用该组合之前,提高的 γ -IFN⁺ CD8⁺ T细胞频度和/或增强的溶细胞活性。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。

[0019] 在另一方面,本文提供用于在患有癌症的个体中增强免疫功能的包含人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抗CD20抗体和可选的可药用载体。在一些实施方案中,相对于施用该组合之前,该个体中的CD8⁺ T细胞具有增强的引发、激活、增殖和/或溶细胞活性。在一些实施方案中,该CD8⁺ T细胞激活表征为相对于施用该组合之前,提高的 γ -IFN⁺ CD8⁺ T细胞频度和/或增强的溶细胞活性。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。

[0020] 在另一方面,本文提供用于在患有癌症的个体中增强免疫功能的包含抗CD20抗体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。在一些实施方案中,相对于施用该组合之前,该个体中的CD8⁺ T细胞具有增强的引发、激活、增殖和/或溶细胞活性。在一些实施方案中,该CD8⁺ T细胞激活表征为相对于施用该组合之前,提高的 γ -IFN⁺ CD8⁺ T细胞频度和/或增强的溶细胞活性。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。

[0021] 在上文和本文所述的方法、用途、组合物和药盒(kit)的一些实施方案中,该癌症是非实体瘤。在一些实施方案中,该癌症是淋巴瘤或白血病。在一些实施方案中,该白血病是慢性淋巴细胞性白血病(CLL)或急性髓性白血病(AML)。在一些实施方案中,该淋巴瘤是滤泡型淋巴瘤(FL)、弥漫型大B细胞淋巴瘤(DLBCL)或非霍奇金淋巴瘤(NHL)。

[0022] 在上文和本文所述的方法、用途、组合物和药盒的一些实施方案中,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。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、PD-1与PD-L2或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结合拮抗剂是MDX-1106、Merck 3745、CT-011或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PD1、PD-L1与B7-1或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PD-L1抗体。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抗体是人源化抗体或人抗体。在一些实施方案中,该PD-L1结合拮抗剂选自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:15、HVR-H2序列SEQ ID NO:16和HVR-H3序列SEQ ID NO:3的重链,及含有HVR-L1序列SEQ ID NO:17、HVR-L2序列SEQ ID NO:18和HVR-L3序列SEQ ID NO:19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:24或28的重链可变区,及含有氨基酸序列SEQ ID NO:21的轻链可变区。在一些实施方案中,该抗

PD-L1抗体包含含有SEQ ID NO:26所示氨基酸序列的重链,及含有SEQ ID NO:27所示氨基酸序列的轻链。在一些实施方案中,该PD-L1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。在一些实施方案中,该PD-1轴结合拮抗剂是包含一个或多个无糖基化(aglycosylation)位点突变(例如取代)的抗体(例如抗PD-1抗体、抗PDL1抗体或抗PDL2抗体)。在一些实施方案中,该取代突变包括氨基酸位置N297、L234、L235和D265(EU编号)上的一个或多个取代。在一些实施方案中,该取代突变选自N297G、N297A、L234A、L235A和D265A(EU编号)。在一些实施方案中,该抗体是人IgG1。在一些实施方案中,该抗体(例如抗PD-1抗体、抗PDL1抗体或抗PDL2抗体)是在EU编号的297位上具有Asn至Ala取代的人IgG1。

[0023] 在上文和本文所述方法、用途、组合物和药盒的一些实施方案中,该抗CD20抗体是本文所述利妥昔单抗(rituximab)。在一些实施方案中,该抗CD20抗体是本文所述人源化B-Ly1抗体。在一些实施方案中,该抗CD20抗体是本文所述GA101抗体。在一些实施方案中,该GA101是抗人CD20抗体,所述抗人CD20抗体包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:50的HVR-H1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:51的HVR-H2、含有氨基酸序列SEQ ID NO:52的HVR-H3、含有氨基酸序列SEQ ID NO:53的HVR-L1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:54的HVR-L2和含有氨基酸序列SEQ ID NO:55的HVR-L3。在一些实施方案中,该GA101抗体包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:56的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:57的VL结构域。在一些实施方案中,该GA101抗体包含氨基酸序列SEQ ID NO:58和氨基酸序列SEQ ID NO:59。在一些实施方案中,该GA101抗体称为obinutuzumab。在一些实施方案中,上文所述GA101抗体不是obinutuzumab。在一些实施方案中,该GA101抗体包含与氨基酸序列SEQ ID NO:58具有至少95%序列同一性的氨基酸序列,且包含与氨基酸序列SEQ ID NO:59具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,该抗CD20抗体不是利妥昔单抗或obinutuzumab。

[0024] 在上文和本文所述方法、用途、组合物和药盒的一些实施方案中,该抗CD20抗体是多特异性抗体。在一些实施方案中,该抗CD20抗体是双特异性抗体。

[0025] 在上文和本文所述方法、用途、组合物和药盒的一些实施方案中,该抗CD20抗体或PD-1轴结合拮抗剂连续施用。在一些实施方案中,该抗CD20抗体或PD-1轴结合拮抗剂间隔施用。在一些实施方案中,该抗CD20抗体在该PD-1轴结合拮抗剂之前施用。在一些实施方案中,该抗CD20抗体与该PD-1轴结合拮抗剂同时施用。在一些实施方案中,该抗CD20抗体在该PD-1轴结合拮抗剂之后施用。在一些实施方案中,该PD-1轴结合拮抗剂和/或该抗CD20抗体静脉内、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,该抗PD-L1抗体按每三周一次1200mg的剂量对该个体静脉内施用。在一些实施方案中,该抗CD20抗体在循环1的第1、8和15天及循环2至8的第1天按一次1000mg的剂量对该个体静脉内施用。在一些实施方案中,该个体是人。

[0026] 在另一方面,本文提供包含PD-1轴结合拮抗剂和包装说明书的药盒,该包装说明书包含用该PD-1轴结合拮抗剂与抗CD20抗体组合来在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的说明。在另一方面,本文提供包含PD-1轴结合拮抗剂和抗CD20抗体的药盒。在一些实施方案中,该药盒进一步包含包装说明书,该包装说明书包含用该PD-1轴结合拮抗剂和该抗CD20抗体来在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的说明。在另一方面,本文提供包含抗CD20抗体和包装说明书的药盒,该包装说明书包含用该CD20抗体与PD-1轴结合拮抗剂组合来在个体

中治疗癌症或延迟癌症进展的说明。在另一方面,本文提供包含PD-1轴结合拮抗剂和包装说明书的药盒,该包装说明书包含用该PD-1轴结合拮抗剂与抗CD20抗体组合来在患有癌症的个体中增强免疫功能的说明。在另一方面,本文提供包含PD-1轴结合拮抗剂和抗CD20抗体及包装说明书的药盒,该包装说明书包含用该PD-1轴结合拮抗剂和该抗CD20抗体来在患有癌症的个体中增强免疫功能的说明。在另一方面,本文提供包含抗CD20抗体和包装说明书的药盒,该包装说明书包含用该抗CD20抗体与PD-1轴结合拮抗剂组合来在患有癌症的个体中增强免疫功能的说明。

[0027] 在上文和本文所述方法、用途、组合物和药盒的一些实施方案中,该个体是人。在一些实施方案中,该个体患有癌症或已诊断患有癌症。在一些实施方案中,该个体患有复发性(replaced)或难治性癌症(例如非实体瘤)。在一些实施方案中,该个体患有白血病(例如CLL、AML)或淋巴瘤(例如NHL)。在一些实施方案中,该个体患有复发性或难治性或之前未治疗过的CLL。在一些实施方案中,该个体患有难治性或复发性滤泡型淋巴瘤或弥漫型大B细胞淋巴瘤(DLBCL)。

[0028] 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。

[0029] 附图简述

[0030] 图1A-1C显示实验结果,进行该实验来测定抗PD-L1抗体与抗CD20抗体组合施用对B细胞耗竭(depletion)的影响。图1A显示CD19+B淋巴细胞的百分比(%)。图1B显示CD4+T淋巴细胞的百分比(%)。图1C显示CD8+T淋巴细胞的百分比(%)。

[0031] 图2显示实验结果,进行该实验来测定抗PD-L1抗体与抗CD20抗体组合施用对使用A20细胞的小鼠模型中肿瘤生长的影响。处理组1-4在实施例2中详细描述。图表显示个体曲线(Trellis曲线),并显示每种处理的肿瘤体积的“三次样条拟合(cubic spline fit)”随时间的变化。这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。

[0032] 图3显示实验结果,进行该实验来测定抗PD-L1抗体与抗CD20抗体组合施用对使用A20pRK-CD20-GFP细胞的小鼠模型中肿瘤生长的影响的。处理组1-6在实施例2中详细描述。图表显示个体曲线(Trellis曲线),并显示每种处理的肿瘤体积的“三次样条拟合”随时间的变化。这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。

[0033] 发明详述

[0034] I. 一般技术

[0035] 本文描述或参考的技术和流程为本领域技术人员公知,并常用常规方法利用,例如描述于以下中的广泛利用的方法: Sambrook等, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*第3版(2001) Cold Spring Harbor Laboratory出版社, Cold Spring Harbor, N.Y.; *Current Protocols in Molecular Biology*(F.M. Ausubel等编辑, (2003)); *the series Methods in Enzymology*(Academic出版社, Inc.): *PCR 2: A Practical Approach*(M.J. MacPherson, B.D. Hames和G.R. Taylor编辑(1995)); Harlow和Lane编辑(1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*; 和 *Animal Cell Culture*(R.I. Freshney编辑(1987)); *Oligonucleotide Synthesis*(M.J. Gait编辑, 1984); *Methods in Molecular Biology*, Humana出版社; *Cell Biology: A Laboratory Notebook*(J.E. Cellis编辑, 1998) Academic

出版社;Animal Cell Culture(R.I.Freshney)编辑,1987);Introduction to Cell and Tissue Culture(J.P.Mather和P.E.Roberts,1998)Plenum出版社;Cell and Tissue Culture:Laboratory Procedures(A.Doyle,J.B.Griffiths和D.G.Newell编辑,1993-8)J.Wiley和Sons;Handbook of Experimental Immunology(D.M.Weir和C.C.Blackwell编辑);Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells(J.M.Miller和M.P.Calos编辑,1987);PCR:The Polymerase Chain Reaction,(Mullis等编辑,1994);Current Protocols in Immunology(J.E.Coligan等编辑,1991);Short Protocols in Molecular Biology(Wiley和Sons,1999);Immunobiology(C.A.Janeway和P.Travers,1997);Antibodies(P.Finch,1997);Antibodies:A Practical Approach(D.Catty编辑,IRL出版社,1988-1989);Monoclonal Antibodies:A Practical Approach(P.Shepherd和C.Dean编辑,Oxford University出版社,2000);Using Antibodies:A Laboratory Manual(E.Harlow和D.Lane(Cold Spring Harbor Laboratory出版社,1999);The Antibodies(M.Zanetti和J.D.Capra编辑,Harwood Academic Publishers,1995);及Cancer:Principles and Practice of Oncology(V.T.DeVita等编辑,J.B.Lippincott Company,1993)。

[0036] II. 定义

[0037] 术语“拮抗剂”以最广泛的含义使用,包括部分或完全阻断、抑制或中和本文公开的天然多肽的生物活性的任意分子。以类似的方式,术语“激动剂”以最广泛的含义使用,包括模拟本文公开的天然多肽的生物活性的任意分子。适宜的激动剂或拮抗剂分子明确包括激动剂或拮抗剂抗体或抗体片段、天然多肽的片段或氨基酸序列变体、肽、反义寡核苷酸、无机小分子等。用于鉴定多肽的激动剂或拮抗剂的方法可以包括使多肽与候选激动剂或拮抗剂分子接触,并测量通常与该多肽相关的一种或多种生物活性的可检测的变化。

[0038] 术语“适配体”指能够结合靶分子如多肽的核酸分子。例如,本发明的适配体可以特异性结合B-raf多肽,或结合调节B-raf的表达或活性的信号传导途径中的分子。适配体的产生及治疗用途在本领域得到确认。参见例如美国专利号5,475,096,及**Macugen®**(Eyetechnology,纽约)在治疗年龄相关黄斑变性中的治疗功效。

[0039] 术语“PD-1轴结合拮抗剂”是这样的分子,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、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。

[0040] 术语“PD-1结合拮抗剂”是这样的分子,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、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。在另一具体方面,PD-1结合拮抗剂是本文所述Merck 3745。在另一具体

方面,PD-1结合拮抗剂是本文所述CT-011。

[0041] 术语“PD-L1结合拮抗剂”是这样的分子,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、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、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。

[0042] 术语“PD-L2结合拮抗剂”是这样的分子,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。

[0043] 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。

[0044] 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。

[0045] 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Ca²⁺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中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。

[0046] 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。

[0047] “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%。测量此增强的方式为本领域普通技术人员已知。

[0048] “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。

[0049] “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。

[0050] “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抗PDL抗体和抗CD20抗体治疗。

[0051] “持续反应”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，持续反应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。

[0052] 本文所用的“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。此定义包括良性和恶性癌症以及潜伏肿瘤或微小转移。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。这类癌症更具体的实例包括但不限于鳞状细胞癌、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)、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌或子宫癌、涎腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌和多种类型的头颈癌，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、高级淋巴瘤母细胞性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)、多毛细胞白血病、慢性骨髓细胞性白血病和移植后淋巴增生性障碍(PTLD)，以及与癰疽病、水肿(如与脑肿瘤相关的水肿)和Meigs综合征相关的异常血管增生。癌症的实例可以包括任意以上癌症类型的原发性肿瘤或源自任意以上癌症类型的第二部位处的转移性肿瘤。

[0053] 术语“抗体”包括单克隆抗体(包括具有免疫球蛋白Fc区的全长抗体)、具有多表位特异性的抗体组合物、多特异性抗体(例如双特异性抗体、双抗体和单链分子)，以及抗体片段(例如Fab、F(ab')₂和Fv)。术语“免疫球蛋白”(Ig)在本文中可与“抗体”互换使用。

[0054] 基本4链抗体单位是由两条相同的轻(L)链和两条相同的重(H)链组成的异源四聚体糖蛋白。IgM抗体由5个基本异源四聚体单位连同称为J链的附加多肽组成，且包含10个抗原结合部位，而IgA抗体包含可以多聚化形成多价聚集体的2-5个基本4链单位与J链的组合。在IgG的情况下，4链单位通常为约150,000道尔顿。每条L链通过一个共价二硫键与H链

连接,而取决于H链同种型,两条H链通过一个或多个二硫键相互连接。每条H和L链还具有规则间隔开的链内二硫键。每条H链在N端具有可变结构域(V_H),对于 α 和 γ 链中的每一种,后随三个恒定结构域(C_H),对于 μ 和 ϵ 同种型,后随四个 C_H 结构域。每条L链在N端具有可变结构域(V_L),后随其另一端的恒定结构域。 V_L 与 V_H 对齐,而 C_L 与重链的第一恒定结构域(C_{H1})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。 V_H 和 V_L 配对在一起形成单个抗原结合部位。对于不同种类抗体的结构和性质,参见例如Basic and Clinical Immunology,第8版,Daniel P.Stites,Abba I.Ter和Tristram G.Parslow(编辑),Appleton&Lange,Norwalk,CT,1994,第71页和第6章。根据其恒定结构域的氨基酸序列,可以将来自任意脊椎动物物种的L链分配至称为 κ 和 λ 的两个明显不同的类型之一。取决于其重链恒定结构域(CH)的氨基酸序列,可以将免疫球蛋白分配至不同的种类或同种型。存在五类免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,其分别具有称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 的重链。根据CH序列和功能相对小的差异,将 γ 和 α 种类进一步分为亚类,例如,人类表达以下亚类:IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。

[0055] 抗体的“可变区”或“可变结构域”指抗体重链或轻链的氨基端结构域。重链和轻链的可变结构域可以分别称为“ VH ”和“ VL ”。这些结构域一般是抗体最可变的部位(相对于同一种类的其他抗体),且包含抗原结合部位。

[0056] 术语“可变的”指可变结构域的某些区段的序列在抗体间广泛不同的事实。 V 结构域介导抗原结合,并限定特定抗体对其特定抗原的特异性。但是,可变性并非在可变结构域的整体跨度内均匀分布。相反,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 -折叠结构且在一种情况下形成该 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。

[0057] 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,即除了可以以较小量存在的可能的天然存在的突变和/或翻译后修饰(例如异构化、酰胺化)外,包含该群体的单种抗体是相同的。单克隆抗体高度特异,针对单个抗原部位。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,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,单克隆体的优势在于它们由杂交瘤培养物合成,未受其他免疫球蛋白污染。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WO 1998/24893; 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))。

[0058] 术语“裸抗体”指未与细胞毒性部分或放射性标记缀合的抗体。

[0059] 术语“全长抗体”、“完整抗体”或“全抗体”可互换使用,指处于其基本完整形式的抗体,与抗体片段相反。具体而言,全抗体包括含有Fc区的具有重链和轻链的那些抗体。恒定结构域可以是天然序列恒定结构域(例如人天然序列恒定结构域)或其氨基酸序列变体。在一些情况下,完整抗体具有一种或多种效应子功能。

[0060] “抗体片段”包含完整抗体的部分,优选完整抗体的抗原结合区或/或可变区。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(参见美国专利5,641,870,实施例2; Zapata等, Protein Eng. 8(10):1057-1062[1995]);单链抗体分子;及从抗体片段形成的多特异性抗体。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)和剩余的“Fc”片段(反映其易结晶的能力的命名)。Fab片段由整个L链连同H链的可变区结构域(V_H)和一条重链的第一恒定结构域(C_{H1})组成。每个Fab片段就抗原结合而言是单价的,即它具有单个抗原结合部位。胃蛋白酶处理抗体产生单个大F(ab')₂片段,其大致对应于具有不同抗原结合活性且仍能够交联抗原的两个二硫键连接的Fab片段。Fab'片段与Fab片段的区别在于,在C_{H1}结构域的羧基端具有几个附加的残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH是本文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。

[0061] Fc片段包含通过二硫键保持在一起的两条H链的羧基端部分。抗体的效应子功能由Fc区中的序列决定,该区域也是见于某些类型细胞上的Fc受体(FcR)所识别的部分。

[0062] “Fv”是包含完整的抗原识别和结合部位的最小抗体片段。此片段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。从这两个结构域的折叠发射出贡献用于抗原结合的氨基酸残基并赋予抗体抗原结合特异性的六个高变环(各来自H链和L链的三个环)。但是,甚至单个可变结构域(或仅包含对抗原特异性的三个CDR的半个Fv)也具有识别和结合抗原的能力,虽然亲和力常低于整个结合部位。

[0063] “单链Fv”(也缩写为“sFv”或“scFv”)是包含连接为单条多肽链的V_H和V_L抗体结构域的抗体片段。优选地,sFv多肽进一步在V_H和V_L结构域之间包含多肽接头,其使得sFv能够形成希望得到的用于抗原结合的结构。sFv的综述参见Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, 113卷, Rosenberg and Moore编辑, Springer-Verlag, 纽约,

269-315页(1994)。

[0064] 本发明的抗体的“功能性片段”包含完整抗体的部分,通常包括完整抗体的抗原结合区或可变区,或保留FcR结合能力或具有经修饰的FcR结合能力的抗体Fc区。抗体片段的实例包括线性抗体、单链抗体分子及从抗体片段形成的多特异性抗体。

[0065] 术语“双抗体”指通过以下制备的小抗体片段:构建在V_H和V_L结构域之间具有短接头(约5-10个残基)的sFv片段(见前一段落),使得达到V结构域的链间配对而不是链内配对,从而产生二价片段,即具有两个抗原结合部位的片段。双特异性双抗体是两个“交换”sFv片段的异二聚体,其中两种抗体的V_H和V_L结构域存在于不同多肽链上。双抗体更详细地描述于例如EP 404,097;WO 93/11161;和Hollinger等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993)中。

[0066] 本文的单克隆抗体明确包括“嵌合”抗体(免疫球蛋白),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(美国专利号4,816,567;Morrison等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984))。本文的目的嵌合抗体包括**PRIMATIZED**[®]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。本文所用的“人源化抗体”作为“嵌合抗体”的亚组使用。

[0067] 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(后文定义)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构架(“FR”)残基。此外,人源化抗体可以包含不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,如结合亲和力。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序列的那些,且全部或基本上全部FR残基是具有人免疫球蛋白序列的那些,虽然FR区可以包含一个或多个改善抗体性能(如结合亲和力、异构化、免疫原性等)的单FR残基取代。FR中这些氨基酸取代的数目通常在H链中不超过6个,在L链中不超过3个。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。

[0068] “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)。可以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)。

[0069] 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, NJ, 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)。

[0070] 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
[0071]	L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
	L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
	L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
[0072]	H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (Kabat 编号)
	H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (Chothia 编号)
	H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
	H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

[0073] 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。

[0074] 表述“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

来为给定的抗体确定残基的Kabat编号。

[0075] “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。

[0076] “人共有构架”或“受体人构架”是代表一系列人免疫球蛋白VL或VH构架序列中最常出现的氨基酸残基的构架。通常,该系列人免疫球蛋白VL或VH序列来自可变结构域序列亚组。通常,该序列亚组是如Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD (1991)中的亚组。实例包括,对于VL,该亚组可以是如Kabat等,上文中的 κ I、 κ II、 κ III或 κ IV。此外,对于VH,该亚组可以是如Kabat等,上文中的亚组I、亚组II或亚组III。备选地,人共有构架可以源自以上,其中特定残基,如在通过将供体构架序列与一系列多种人构架序列比对来根据其同源性选择人构架残基时。“源自”人免疫球蛋白构架或人共有构架的受体人构架可以包含其相同氨基酸序列,或者它可以包含已存在的氨基酸序列改变。在一些实施方案中,已存在的氨基酸序列改变的数目为10或更少、9或更少、8或更少、7或更少、6或更少、5或更少、4或更少、3或更少、或2或更少。

[0077] “VH亚组III共有构架”包含获自Kabat等,上文的可变重链亚组III中的氨基酸序列的共有序列。在一个实施方案中,该VH亚组III共有构架氨基酸序列包含以下序列中每一种的至少一部分或全部:EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS(HC-FR1)(SEQ ID NO:4)、WVRQAPGKGLEWV(HC-FR2)(SEQ ID NO:5)、RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR(HC-FR3)(SEQ ID NO:6)、WGQGTLLTVSA(HC-FR4)(SEQ ID NO:7)。

[0078] “VL κ I共有构架”包含获自Kabat等,上文的可变轻链 κ 亚组I中的氨基酸序列的共有序列。在一个实施方案中,该VH亚组I共有构架氨基酸序列包含以下序列中每一种的至少一部分或全部:DIQMTQSPSSLSASVGDRTITC(LC-FR1)(SEQ ID NO:11)、WYQQKPGKAPKLLIY(LC-FR2)(SEQ ID NO:12)、GVPSRFSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYC(LC-FR3)(SEQ ID NO:13)、FGQGTKVEIKR(LC-FR4)(SEQ ID NO:14)。

[0079] 例如Fc区的特定位置上的“氨基酸修饰”指取代或缺失该特定残基,或邻近该特定残基插入至少一个氨基酸残基。“邻近”特定残基的插入意指其1至2个残基内的插入。该插入可以在该特定残基的N端或C端。本文优选的氨基酸修饰是取代。

[0080] “亲和力成熟的”抗体是在其一个或多个HVR中具有一个或多个改变的抗体,与不具有那些改变的亲本抗体相比,该改变导致抗体对抗原的亲和力改善。在一个实施方案中,亲和力成熟的抗体对靶抗原具有纳摩尔或甚至皮摩尔的亲和力。通过本领域已知的方法产生亲和力成熟的抗体。例如,Marks等Bio/Technology 10:779-783(1992)描述了通过VH和VL结构域改组进行亲和力成熟。Barbas等Proc Natl Acad Sci, USA 91:3809-3813(1994); Schier等Gene 169:147-155(1996); Yelton等J. Immunol. 155:1994-2004(1995); Jackson等, J. Immunol. 154(7):3310-9(1995);及Hawkins等J. Mol. Biol. 226:889-896(1992)描述了HVR和/或构架残基的随机诱变。

[0081] 本文所用的术语“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,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。

[0082] 本文所用的术语“免疫黏附素”指抗体样分子，其将异源蛋白质(“黏附素”)的结合特异性与免疫球蛋白恒定结构域的效应子功能组合。在结构上，免疫黏附素包含不同于抗体的抗原识别和结合部位(即是“异源的”)的具有希望得到的结合特异性的氨基酸序列与免疫球蛋白恒定结构域序列的融合。免疫黏附素分子的黏附素部分通常是至少包含受体或配体的结合部位的连续氨基酸序列。免疫黏附素中的免疫球蛋白恒定结构域序列可以获自任意免疫球蛋白，如IgG-1、IgG-2(包括IgG2A和IgG2B)、IgG-3或IgG-4亚型、IgA(包括IgA-1和IgA-2)、IgE、IgD或IgM。Ig融合优选包含本文所述多肽或抗体的结构域对Ig分子内至少一个可变区的取代。在尤其优选的实施方案中，该免疫球蛋白融合包含IgG1分子的铰合部、CH2和CH3，或铰合部、CH1、CH2和CH3区。免疫球蛋白融合的产生还参见1995年6月27日授权的美国专利号5,428,130。例如，用作用于本文的联合治疗的第二药物的免疫黏附素包含含有PD-L1或PD-L2的胞外部分或PD-1结合部分、或PD-1的胞外部分或PD-L1或PD-L2结合部分的多肽，该多肽与免疫球蛋白序列的恒定结构域融合，如分别为PD-L1 ECD-Fc、PD-L2 ECD-Fc和PD-1 ECD-Fc。Ig Fc和细胞表面受体ECD的免疫黏附素组合有时称为可溶性受体。

[0083] “融合蛋白质”和“融合多肽”指具有共价连接在一起的两个部分的多肽，其中各个部分时具有不同特性的多肽。该特性可以是生物学特性，如体外或体内活性。该特性还可以是简单的化学或物理特性，如结合靶分子、催化反应等。两个部分可以通过单个肽键直接连接，或通过肽接头但相互符合读框地连接。

[0084] “PD-1寡肽”、“PD-L1寡肽”或“PD-L2寡肽”是优选分别特异性结合本文所述PD-1、PD-L1或PD-L2负共刺激多肽(分别包括受体、配体或信号发放成分)的寡肽。这类寡肽可以用已知的寡肽合成方法化学合成，或者可以用重组技术制备和纯化。这类寡肽长度通常为至少约5个氨基酸，备选地，长度为至少约6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100个氨基酸或更长。这类寡肽可以用公知的技术鉴定。在这方面，应指出，用于针对能够特异性结合多肽的寡肽筛选寡肽文库的技术为本领域公知(参见例如美国专利号5,556,762、5,750,373、4,708,871、4,833,092、5,223,409、5,403,484、5,571,689、5,663,143;PCT公开号WO 84/03506和W084/03564;Geysen等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 81:3998-4002(1984);Geysen等,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A., 82:178-182(1985);Geysen等,in Synthetic Peptides as Antigens,130-149(1986);Geysen等,J.Immunol.Meth., 102:259-274(1987);Schoofs等,J.Immunol., 140:611-616(1988);Cwirla,S.E.等Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 87:6378(1990);Lowman,H.B.等Biochemistry, 30:10832(1991);Clackson,T.等Nature, 352:624(1991);Marks,J.D.等,J.Mol.Biol., 222:581(1991);Kang,A.S.等Proc.Natl.Acad.Sci.USA, 88:8363(1991);及Smith,G.P.,Current Opin.Biotechnol., 2:668(1991))。

[0085] “阻断”抗体或“拮抗”抗体是抑制或降低它所结合的抗原的生物学活性的抗体。在一些实施方案中,阻断抗体或拮抗抗体实质性抑制或完全抑制抗原的生物学活性。本发明的抗PD-L1抗体阻断通过PD-1的信号发放,以从对抗原刺激的功能异常状态恢复T细胞的功能性反应(例如增殖、细胞因子产生、靶细胞杀伤)。

[0086] “激动”抗体或激活抗体是增强或起始通过它所结合的抗原的信号发放的抗体。在一些实施方案中,激动抗体在不存在天然配体的情况下引起或激活信号发放。

[0087] 本文用术语“Fc区”来定义免疫球蛋白重链的C端区域,包括天然序列Fc区和变体Fc区。虽然免疫球蛋白重链Fc区的边界可以不同,但人IgG重链Fc区通常定义为从Cys226位或从Pro230位的氨基酸残基延伸至其羧基端。Fc区C端赖氨酸(按照EU编号系统的残基447)可以例如在产生或纯化抗体期间去除,或通过重组改造编码抗体重链的核酸去除。因此,完整抗体的组合物可以包含去除了所有K447残基的抗体群体、未去除K447残基的抗体群体及具有含K447残基和不含K447残基的抗体的混合物的抗体群体。适合用于本发明抗体的天然序列Fc区包括人IgG1、IgG2(IgG2A、IgG2B)、IgG3和IgG4。

[0088] “Fc受体”或“FcR”描述结合抗体Fc区的受体。优选的FcR是天然序列人FcR。此外,优选的FcR是结合IgG抗体的FcR(γ 受体),且包括Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII亚类的受体,包括这些受体的等位基因变体和选择性剪接形式。Fc γ RII受体包括Fc γ RIIA(“激活受体”)和Fc γ RIIB(“抑制受体”),它们具有主要在其胞质结构域中不同的相似氨基酸序列。激活受体Fc γ RIIA在其胞质结构域中包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)。抑制受体Fc γ RIIB在其胞质结构域中包含基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)。(参见M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15:203-234(1997))。FcR综述于Ravetch和Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-92(1991);Cape1等, *Immunomethods* 4:25-34(1994);及de Haas等, *J. Lab. Clin. Med.* 126:330-41(1995)中。本文的术语“FcR”涵盖了其他FcR,包括有待在将来鉴定的那些。

[0089] 术语“Fc受体”或“FcR”还包括负责将母体IgG转移至胎儿的新生儿受体FcRn。Guyer等, *J. Immunol.* 117:587(1976);及Kim等, *J. Immunol.* 24:249(1994)。测量与FcRn的结合的方法已知(参见例如Ghetie和Ward, *Immunol. Today* 18:(12):592-8(1997);Ghetie等, *Nature Biotechnology* 15(7):637-40(1997);Hinton等, *J. Biol. Chem.* 279(8):6213-6(2004);WO 2004/92219(Hinton等))。可以例如在表达人FcRn的转基因小鼠或转染人细胞系中或在对其施用具有变体Fc区的多肽的灵长类中测定人FcRn高亲和力结合多肽在体内与FcRn的结合和血清半衰期。WO 2004/42072(Presta)描述了改善或减少与FcR的结合的抗体变体。还参见Shields等, *J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604(2001)。

[0090] 本文所用的短语“实质性减少的”或“实质性不同的”指两个数值(通常一个与分子相关,另一个与参考/比较分子相关)间的差异度足够高,使得本领域技术人员将认为这两个值间的差异在通过该值(例如Kd值)测量的生物学特征的背景内具有统计学意义。该两个值间的差异作为参考/比较分子的值的函数例如大于约10%、大于约20%、大于约30%、大于约40%和/或大于约50%。

[0091] 本文所用的术语“基本相似的”或“基本相同的”指两个数值(例如,一个与本发明的抗体相关,另一个与参考/比较抗体相关)间的相似度足够高,使得本领域技术人员将认为这两个值间的差异在通过该值(例如Kd值)测量的生物学特征的背景内几乎没有或没有

生物学和/或统计学意义。该两个值间的差异作为参考/比较值的函数例如小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约20%和/或小于约10%。

[0092] 本文所用的“载体”包括在所利用的剂量和浓度下对暴露于它的细胞或哺乳动物无毒性的可药用载体、赋形剂或稳定剂。通常,生理学上可接受的载体是水性pH缓冲液。生理学上可接受的载体的实例包括缓冲剂,如磷酸、柠檬酸和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸;低分子量(小于约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、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;糖醇,如甘露醇或山梨醇;成盐抗衡离子,如钠;和/或非离子型表面活性剂,如TWEENTM、聚乙二醇(PEG)和PLURONICSTM。

[0093] “包装说明书”指通常包含在药物的商业包装中的说明书,其包含关于适应症、用法、剂量、施用、禁忌症、待与所包装的产品组合的其他药物的信息,和/或有关这类药物的用途的警告等。

[0094] 本文所用的术语“处理”指旨在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”,该缓和或消除包括但不限于减少(或破坏)癌细胞的增殖、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、延缓疾病进展、和/或延长个体的存活。

[0095] 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。

[0096] 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。

[0097] “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浓度。本文的有效量可以根据诸如疾病状态、年龄、性别、患者体重和抗体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。

[0098] 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。

[0099] 本文所用的“完全反应”或“CR”指所有靶病灶的消失;“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;“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。

[0100] 本文所用的“进行性疾病”或“PD”指靶病灶的SLD增加至少20%(取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。

[0101] 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反应或部分反应的时间量,以及患者经历稳定疾病的时间量。

[0102] 本文所用的“总反应率”(ORR)指完全反应(CR)率和部分反应(PR)率的总和。

[0103] 本文所用的“总存活率”指一个组中可能在特定时期后存活的个体的百分比。

[0104] “化疗剂”是用于治疗癌症的化合物。化疗剂的实例包括:烷化剂,如噻替派(thiotepa)和环磷酰胺(**CYTOXAN®**);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methyldamelamine,包括六甲蜜胺(altretamine)、三亚胺嗪(triethylenemelamine)、三亚乙基磷酰胺(triethylenephosphoramidate)、三亚乙基硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和trimethylolomelamine;多聚乙酰(acetogenin)(尤其是番荔枝内酯(bullatacin)和布拉它辛酮(bullatacinone)); δ -9-四氢大麻酚(屈大麻酚(dronabinol), **MARINOL®**); β -拉帕醌(beta-lapachone);拉帕醇(lapachol);秋水仙碱(colchicine);白桦脂酸(betulinic acid);喜树碱(camptothecin)(包括合成类似物拓扑替康(topotecan) (**HYCAMTIN®**), CPT-11(伊立替康(irinotecan), **CAMPTOSAR®**)、乙酰喜树碱(acetylcamptothecin)、莨菪亭(scopolectin)和9-氨基喜树碱(9-aminocamptothecin));苔藓虫素(bryostatin);培美曲塞(pemetrexed);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);鬼臼毒素(podophyllotoxin);鬼臼酸(podophyllinic acid);替尼泊苷(teniposide);cryptophycin(尤其是cryptophycin 1和cryptophycin 8);多拉司他汀(dolastatin);多卡霉素(duocarmycin)(包括合成类似物KW-2189和CB1-TM1);eleutherobin;pancratistatin;TLK-286;CDP323,口服 α -4整联蛋白抑制剂;sarcodictyin; spongistatin;氮芥(nitrogen mustard),如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、cholophosphamide、磷雌氮芥(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、氮芥(mechlorethamine)、盐酸氧氮芥(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(参见例如Nicolaou等,Angew.Chem Intl.Ed.Engl.,33:183-186(1994));dynemicin,包括dynemicin A;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)、carabycin、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、多柔比星(doxorubicin)(包括**ADRIAMYCIN®**、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、盐酸多柔比星脂质体注射液(**DOXIL®**)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)、potfiromycin、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);抗代谢剂,如氨甲喋呤、吉西他滨(gemcitabine)(**GEMZAR®**)、替加氟(tegafur)(**UFTORAL®**)、卡培他滨(capecitabine)(**XELODA®**)、埃坡霉素(epothilone)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(thiamiprine)、硫鸟嘌呤(thioguanine);嘧啶类似物,如安西他滨(ancitabine)、氮杂胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷(6-azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、双脱氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他宾(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine)和伊马替尼(imatinib)(2-苯氨基嘧啶衍生物),以及其他c-Kit抑制剂;抗肾上腺素(anti-adrenal),如氨鲁米特(aminogluthetamide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane);叶酸补充剂,如亚叶酸;醋葡内酯(aceglatone);醛磷酰胺糖苷(aldophosphamide glycoside);氨基乙酰丙酸(aminolevulinic acid);恩尿嘧啶(eniluracil);安吡啶(amsacrine);bestrabucil;比生群(bisantrene);依达曲沙(edatraxate);地磷酰胺(defofamine);秋水仙胺(demecolcine);地吡醌(diaziquone);elfornithine;醋酸羟吡唑啉(elliptinium acetate);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);米托胍酮(mitoguazone);米托蒽醌(mitoxantrone);mopidanmol;nitraerine;喷司他丁(pentostatin);蛋氨酸芥(phenamet);吡柔比星(pirarubicin);洛索蒽醌(losoxantrone);2-乙肼;丙卡巴肼(procarbazine);**PSK®**多糖复合物(JHS Natural Products,Eugene,OR);丙亚胺(razoxane);根霉素(rhizoxin);西佐喃(sizofiran);螺旋锗(spirogermanium);细格孢氮杂酸(tenuazonic acid);三亚胺醌

(triaziquone); 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(**ELDISINE®**, **FILDESIN®**); 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; 阿糖胞苷(arabinoside)("Ara-C"); 噻替派(thiotepa); 紫杉烷(taxoid), 例如紫杉醇(paclitaxel)(**TAXOL®**)、紫杉醇的清蛋白改造纳米颗粒制剂(ABRAXANE™)和doxetaxel(**TAXOTERE®**); chloranbucil; 6-硫鸟嘌呤; 巯基嘌呤; 氨甲喋呤; 铂类似物, 如顺铂和卡铂; 长春花碱(vinblastine)(**VELBAN®**); 铂; 依托泊苷(etoposide)(VP-16); 异环磷酰胺(ifosfamide); 米托蒽醌(mitoxantrone); 长春花新碱(vincristine)(**ONCOVIN®**); 奥沙利铂(oxaliplatin); leucovorin; 长春烯碱(vinorelbine)(**NAVELBINE®**); 二羟蒽二酮(novantrone); 依达曲沙(edatrexate); 柔红霉素(daunomycin); 氨基喋呤(aminopterin); 伊班磷酸(ibandronate); 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; 以上任一种的可药用盐、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龙的联合治疗的缩写)和FOLFOX(奥沙利铂(ELOXATIN™)与5-FU和leucovorin组合的治疗方案的缩写)。

[0105] 化疗剂的其他实例包括抗激素剂, 其通常以系统治疗或全身治疗的形式发挥作用来调节、减少、阻断或抑制可促进癌症生长的激素的作用。它们可以是激素本身。实例包括: 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®**他莫昔芬)、雷洛昔芬(raloxifene)(**EVISTA®**)、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)和托瑞米芬(toremifene)(**FARESTON®**); 抗孕酮; 雌激素受体下调剂(ERD); 雌激素受体拮抗剂, 如氟维司群(fulvestrant)(**FASLODEX®**); 发挥作用来抑制或关闭卵巢的药物, 例如, 诸如醋酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)(**LUPRON®**和**ELIGARD®**)的促黄体生成激素释放激素(LHRH)激动剂、醋酸戈舍瑞林(goserelin acetate)、醋酸布舍瑞林(buserelin acetate)和tripterelin; 抗雄激素, 如氟他胺(flutamide)、尼鲁米特(nilutamide)和比卡米特(bicalutamide); 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)、醋酸甲地孕酮(megestrol acetate)(**MEGASE®**)、依西美坦(exemestane)(**AROMASIN®**)、formestane、法倔唑(fadrozole)、伏氯唑(vorozole)(**RIVISOR®**)、来曲唑(letrozole)(**FEMARA®**)和阿那曲唑(anastrozole)(**ARIMIDEX®**)。此外, 化疗剂的这种定义包括二膦酸盐, 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)/唑来膦酸二钠(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®**);以及曲沙他滨(troxacitabine)(1,3-二氧戊环胞嘧啶核苷类似物);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和表皮生长因子受体(EGF-R))表达的那些;疫苗,如**THERATOPE®**疫苗和基因治疗疫苗,例如**ALLOVECTIN®**疫苗、**LEUVECTIN®**疫苗和**VAXID®**疫苗;拓扑异构酶1抑制剂(例如**LURTOTECAN®**);抗雌激素,如氟维司群;Kit抑制剂,如伊马替尼或EXEL-0862(酪氨酸激酶抑制剂);EGFR抑制剂,如埃罗替尼(erlotinib)或西妥昔单抗(cetuximab);抗VEGF抑制剂,如贝伐单抗(bevacizumab);arinotecan;rmRH(例如**ABARELIX®**);拉帕替尼(lapatinib)和二甲苯磺酸拉帕替尼(lapatinib ditosylate)(ErbB-2和EGFR双酪氨酸激酶小分子抑制剂,也称为GW572016);17AAG(格尔德霉素衍生物,其是热休克蛋白(Hsp)90毒素);及以上任一种的可药用盐、酸或衍生物。

[0106] 本文所用的术语“细胞因子”泛指由一个细胞群体释放的蛋白质,其作为胞间介质作用于另一个细胞或对产生该蛋白质的细胞具有自分泌作用。这类细胞因子的实例包括淋巴因子、单核因子;白介素(“IL”),如IL-1、IL-1 α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17A-F、IL-18至IL-29(如IL-23)、IL-31,包括**PROLEUKIN®**rIL-2;肿瘤坏死因子,如TNF- α 或TNF- β ;及其他多肽因子,包括白血病抑制因子(“LIF”)、睫状神经营养因子(“CNTF”),CNTF样细胞因子(“CLC”)、心肌营养蛋白(“CT”)和kit配体(“KL”)。

[0107] 本文所用的术语“趋化因子”指具有选择性诱导趋化性和激活白细胞的能力的可溶性因子(例如细胞因子)。它们还触发血管发生、炎症、创伤愈合和肿瘤发生的过程。趋化因子的实例包括IL-8,其是鼠角质形成细胞化学引诱物的人同源物。

[0108] 本文所用的“CD20”指人B淋巴细胞抗原CD20(也称为CD20、B淋巴细胞表面抗原B1、Leu-16、Bp35、BM5和LF5;序列表征为SwissProt数据库检索号P11836),是定位在pre-B和成熟B淋巴细胞上的分子量约为35kD的疏水跨膜蛋白质(Valentine, M.A.等, J. Biol. Chem. 264(19)(1989)11282-11287; Tedder, T.F.等, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85(1988)208-12; Stamenkovic, I.等, J. Exp. Med. 167(1988)1975-80; Einfeld, D.A.等, EMBO J. 7(1988)711-7; Tedder, T.F.等, J. Immunol. 142(1989)2560-8)。对应的人基因是跨膜4结构域亚家族A成员1,也称为MS4A1。此基因编码跨膜4A基因家族的成员。此新生蛋白质家族的成员表征为共同的结构特征和相似的内含子/外显子剪接边界,并在造血细胞和非淋巴组织中显示独特表达模式。此基因编码B淋巴细胞表面分子,该表面分子在B细胞发育和分化为浆细胞中发挥作用。此家族成员定位于11q12,在一簇家族成员间。此基因的选择性剪接产生编码同一蛋白质的两个转录物变体。

[0109] 术语“CD20”和“CD20抗原”在本文中可互换使用,且包括由细胞天然表达或在用CD20基因转染的细胞上表达的人CD20的任意变体、同种型和物种同源物。本发明的抗体与CD20抗原的结合通过失活CD20来介导表达CD20的细胞(例如肿瘤细胞)的杀伤。表达CD20的细胞的杀伤可以通过一种或多种以下机制发生:细胞死亡/凋亡诱导、ADCC和CDC。

[0110] 本领域认可的CD20同义词包括B淋巴细胞抗原CD20、B淋巴细胞表面抗原B1、Leu-16、Bp35、BM5和LF5。

[0111] 本发明的术语“抗CD20抗体”是特异性结合CD20抗原的抗体。取决于抗CD20抗体对CD20抗原的结合特性和生物学活性,可以按照Cragg, M.S.等, Blood 103(2004)2738-2743和Cragg, M.S.等, Blood 101(2003)1045-1052区分两种类型的抗CD20抗体(I型和II型抗CD20抗体),参见表1。

[0112] 表1:I型和II型抗CD20抗体的特性

[0113]

I型抗CD20抗体	II型抗CD20抗体
I型CD20表位	II型CD20表位
将CD20定位于脂膜筏	不将CD20定位于脂膜筏
提高的CDC(若为IgG1同种型)	降低的CDC(若为IgG1同种型)
ADCC活性(若为IgG1同种型)	ADCC活性(若为IgG1同种型)
全结合能力	降低的结合能力
同型聚集	更强的同型聚集
交联时的凋亡诱导	不交联情况下的强死亡诱导

[0114] II型抗CD20抗体的实例包括例如人源化B-Ly1抗体IgG1(WO 2005/044859中公开的嵌合人源化IgG1抗体)、11B8 IgG1(如WO 2004/035607中所公开)和AT80 IgG1。通常, IgG1同种型的II型抗CD20抗体显示特征性CDC特性。与IgG1同种型的I型抗体相比, II型抗CD20抗体具有降低的CDC(若为IgG1同种型)。

[0115] I型抗CD20抗体的实例包括例如利妥昔单抗、HI47 IgG3(ECACC, 杂交瘤)、2C6 IgG1(如WO 2005/103081中所公开)、2F2 IgG1(如WO 2004/035607和WO 2005/103081中所公开)和2H7 IgG1(如WO 2004/056312中所公开)。

[0116] 本发明的无岩藻糖基化抗CD20抗体优选II型抗CD20抗体,更优选WO 2005/044859和WO 2007/031875中所述的无岩藻糖基化人源化B-Ly1抗体。

[0117] “利妥昔单抗”抗体(参考抗体;I型抗CD20抗体的实例)是针对人CD20抗原的包含遗传改造的嵌合人 γ 1鼠恒定结构域的单克隆抗体。但是,此抗体未进行糖改造,不是无岩藻糖基化的,因此具有至少85%的岩藻糖量。此嵌合抗体包含人 γ 1恒定结构域,在1998年4月17日授权给IDEC Pharmaceuticals Corporation的US 5,736,137(Andersen等)中标识名称为“C2B8”。利妥昔单抗获批用于治疗复发性或难治性低级或滤泡性CD20阳性B细胞非霍奇金淋巴瘤。体外作用机制研究显示,利妥昔单抗显示人依赖补体的细胞毒性(CDC)(Reff, M.E.等, Blood 83(2)(1994)435-445)。此外,它在测量抗体依赖性细胞毒作用(ADCC)的测定中显示活性。

[0118] 本文所用的术语“GA101抗体”指以下结合人CD20的抗体中的任一种:(1)包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:50的HVR-H1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:51的HVR-H2、含有氨基酸序列SEQ ID NO:52的HVR-H3、含有氨基酸序列SEQ ID NO:53的HVR-L1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:54的HVR-L2和含有氨基酸序列SEQ ID NO:55的HVR-L3的抗体;(2)包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:56的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:57的VL结构域的抗体;(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:58和氨基酸序列SEQ ID NO:59的抗体;(4)称为obinutuzumab的

抗体;或(5)包含与氨基酸序列SEQ ID NO:58具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列且包含与氨基酸序列SEQ ID NO:59具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列的抗体。在一个实施方案中,该GA101抗体是IgG1同种型抗体。在一些实施方案中,该抗CD20抗体是人源化B-Ly1抗体。

[0119] 术语“人源化B-Ly1抗体”指WO 2005/044859和WO 2007/031875中所公开的人源化B-Ly1抗体,其通过用来自IgG1的人恒定结构域嵌合化并在之后人源化(参见WO 2005/044859和WO 2007/031875)而获自鼠单克隆抗CD20抗体B-Ly1(v鼠重链可变区(VH):SEQ ID NO:30;鼠轻链可变区(VL):SEQ ID NO:31-参见Poppema, S.和Visser, L., Biotest Bulletin 3(1987)131-139)。这些“人源化B-Ly1抗体”详细公开于WO 2005/044859和WO 2007/031875中。

[0120] 在一个实施方案中,该“人源化B-Ly1抗体”具有选自SEQ ID No.32至SEQ ID No.48的重链可变区(VH)(对应于WO 2005/044859和WO 2007/031875的B-HH2至B-HH9和B-HL8至B-HL17)。在一个具体实施方案中,这种可变结构域选自SEQ ID No.32、33、36、38、40、42和44(对应于WO 2005/044859和WO 2007/031875的B-HH2、BHH-3、B-HH6、B-HH8、B-HL8、B-HL11和B-HL13)。在一个具体实施方案中,该“人源化B-Ly1抗体”具有SEQ ID No.49的轻链可变区(VL)(对应于WO 2005/044859和WO 2007/031875的B-KV1)。在一个具体实施方案中,该“人源化B-Ly1抗体”具有SEQ ID No.36的重链可变区(VH)(对应于WO 2005/044859和WO 2007/031875的B-HH6)和SEQ ID No.49的轻链可变区(VL)(对应于WO 2005/044859和WO 2007/031875的B-KV1)。此外,在一个实施方案中,该人源化B-Ly1抗体是IgG1抗体。根据本发明,这类无岩藻糖基化人源化B-Ly1抗体按照WO 2005/044859、WO 2004/065540、WO 2007/031875、Umana, P.等, Nature Biotechnol. 17(1999)176-180和WO 99/154342中所述的方法在Fc区中进行了糖改造(GE)。在一个实施方案中,该无岩藻糖基化糖改造人源化B-Ly1是B-HH6-B-KV1 GE。在一个实施方案中,该抗CD20抗体是obinutuzumab(推荐的INN, WHO Drug Information, 26卷, 第4期, 2012, 453页)。本文所用的obinutuzumab是GA101或R05072759的同义词。这替换所有之前的版本(例如25卷, 第1期, 2011, 75-76页), 之前称为afutuzumab(推荐的INN, WHO Drug Information, 23卷, 第2期, 2009, 176页; 22卷, 第2期, 2008, 124页)。在一些实施方案中,该人源化B-Ly1抗体是包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:60的重链和含有氨基酸序列SEQ ID NO:61的轻链的抗体,或其抗原结合片段。在一些实施方案中,该人源化B-Ly1抗体包含含有SEQ ID NO:60的三个重链CDR的重链可变区和含有SEQ ID NO:61的三个轻链CDR的轻链可变区。

[0121] 重链(SEQ ID NO:60)

[0122]

```
QVQLVQSGAE VKKPGSSVKV SCKASGYAFS YSWINWVRQA PGQGLEWMGR 50
IFPGDGD TDY NGKFKGRVTI TADKSTSTAY MELSSLRSED TAVYYCARNV 100
FDGYWL VYWG QGTLVTVSSA STKQPSVFPL APSSKSTSGG TAALGCLVKD 150
YFPEFVTVSW NSGALTSGVH TFAVLQSSG LYSLSVVTV PSSSLGTQTY 200
ICNVNHKPSN TKVDKKVEPK SCDKTHTCPP CPAPELLGCP SVFLFPPKPK 250
DTLMISRTPE VTCVVVDVSH EDPEVKFNWY VDGVEVHNAK TKFREEQYNS 300
TYRVSVLTIV LHQDWLNGKE YKCKVSNKAL PAPIEKTISK AKGQFPREFQV 350
YTLPPSRDEL TKNQVSLTCL VKGFYPSDIA VEWESNGQPE NNYKTTTPPVL 400
DSDGSEFLYS KLTVDKSRWQ QGNVFSCSVM HEALHNHYTQ KSLSLSPG 449
```

[0123] 轻链SEQ ID NO:61)

[0124]

```

DIVMTQTPLS LPVTPGEPAS ISCRSSKSLI HSNIGITYLYW YLQKPGQSPQ 50
LLIYQMSNLV SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDVGV YYCAQNLELP 100
YTFGGGTYVE IKRTVAAPSV FIFPPSDEQL KSGTASVVCL LNNFYFREAK 150
VQWKVDNALQ SGNSQESVTE QDSKDSSTYSL SSTLTLSKAD YEKHKVYACE 200
VTHQGLSSPV TKSFNRGEC                                     219

```

[0125] 在一些实施方案中,该人源化B-Ly1抗体是无岩藻糖基化的糖基化改造人源化B-Ly1。这种糖改造人源化B-Ly1抗体在其Fc区中具有改变的糖基化模式,优选具有降低的岩藻糖残基水平。优选地,岩藻糖的量为Asn297上寡糖总量的60%或更少(在一个实施方案中,岩藻糖的量在40%至60%之间,在另一实施方案中,岩藻糖的量为50%或更少,还在另一实施方案中,岩藻糖的量为30%或更少)。此外,Fc区的寡糖优选是一分为二的。这些糖改造人源化B-Ly1抗体具有提高的ADCC。

[0126] 按实施例2中所述,在Raji细胞(ATCC-No.CCL-86)的FACSArray(Becton Dickinson)中,使用缀合Cy5的该抗CD20抗体和缀合Cy5的利妥昔单抗,通过直接免疫荧光测量(测量平均荧光强度(MFI))来测定并按以下计算“抗CD20抗体与利妥昔单抗相比对Raji细胞(ATCC-No.CCL-86)上CD20的结合能力的比值”:

[0127] 对Raji细胞(ATCC-No.CCL-86)上CD20的结合能力的**比值**=

[0128]
$$\frac{\text{MFI}(\text{Cy5-抗CD20抗体})}{\text{MFI}(\text{Cy5-利妥昔单抗})} \times \frac{\text{Cy5-标记比}(\text{Cy5-利妥昔单抗})}{\text{Cy5-标记比}(\text{Cy5-抗CD20抗体})}$$

[0129] MFI是平均荧光强度。本文所用的“Cy5-标记比”意指每分子抗体的Cy5标记分子的数目。

[0130] 通常,该II型抗CD20抗体具有这样的对Raji细胞(ATCC-No.CCL-86)上CD20的结合能力的比值,该第二抗CD20抗体与利妥昔单抗相比为0.3至0.6,在一个实施方案中为0.35至0.55,还在另一实施方案中为0.4至0.5。

[0131] 在一个实施方案中,该II型抗CD20抗体(例如GA101)具有提高的抗体依赖性细胞毒作用(ADCC)。

[0132] 如该术语在本文中所定义,“具有提高的抗体依赖性细胞毒作用(ADCC)的抗体”意指通过本领域普通技术人员已知的任意适宜的方法测定具有提高的ADCC的抗体。一种可接受的体外ADCC测定如下:

[0133] 1)该测定使用已知表达该抗体的抗原结合区所识别的靶抗原的靶细胞;

[0134] 2)该测定用分离自随机选择的健康供体的血液的人外周血单核细胞(PBMC)作为效应细胞;

[0135] 3)按照以下流程进行该测定:

[0136] i)用标准密度梯度离心法分离PBMC,并按 5×10^6 细胞/ml悬浮在RPMI细胞培养基中;

[0137] ii)通过标准组织培养法培养靶细胞,从活率高于90%的指数生长期收集,在RPMI细胞培养基中洗涤,用100micro-Curies的 ^{51}Cr 标记,在细胞培养基中洗涤两次,并按 10^5 细胞/ml的密度重悬在细胞培养基中;

[0138] iii)将100 μl 的以上最终靶细胞悬液转移至96孔微量滴定板的各孔;

[0139] iv)将抗体从4000ng/ml至0.04ng/ml系列稀释在细胞培养基中,并将50 μ l所得到的抗体溶液加至96孔微量滴定板中的靶细胞,一式三份地测试覆盖以上整个浓度范围的多种抗体浓度;

[0140] v)对于最大释放(MR)对照,在包含标记靶细胞的平板的3个附加孔中加入50 μ l非离子型去垢剂(Nonidet,Sigma,St.Louis)的2%(VN)水溶液代替抗体溶液(以上第iv点);

[0141] vi)对于自发性释放(SR)对照,在包含标记靶细胞的平板的3个附加孔中加入50 μ l RPMI细胞培养基代替抗体溶液(以上第iv点);

[0142] vii)然后50x g离心96孔微量滴定板1分钟,并在4 $^{\circ}$ C孵育1小时;

[0143] viii)向各孔加入50 μ l PBMC悬液(以上第i点)以产生25:1的效应细胞:靶细胞比,并将平板放入5%CO₂、37 $^{\circ}$ C的培养箱中4小时;

[0144] ix)收集来自各孔的无细胞上清,并用 γ 计数器定量实验释放的放射性(ER);

[0145] x)按照公式 $(ER-MR)/(MR-SR) \times 100$ 计算各抗体浓度的特异性裂解的百分比,其中ER是针对该抗体浓度定量的平均放射性(参见以上第ix点),MR是针对MR对照(参见以上第v点)定量(参见以上第ix点)的平均放射性,SR是针对SR对照(参见以上第vi点)定量(参见以上第ix点)的平均放射性;

[0146] 4)“提高的ADCC”定义为在以上测试的抗体浓度范围内观察到的最大特异性裂解百分比的提高,和/或达到在以上测试的抗体浓度范围内观察到的最大特异性裂解百分比的一半所需的抗体浓度的降低。在一个实施方案中,ADCC的提高是相对于用以上测定测量的由相同抗体介导的ADCC,除通过改造为过量表达GnTIII和/或改造为具有降低的岩藻糖基转移酶8(FUT8)基因表达(例如,包括改造为FUT8敲除)的宿主细胞产生比较抗体(缺乏提到的ADCC)外,该相同抗体通过相同类型的宿主细胞产生,使用本领域技术人员已知的相同的标准产生、纯化、配制和保存方法。

[0147] 该“提高的ADCC”可以例如通过突变和/或糖改造该抗体而获得。在一个实施方案中,将抗体糖改造为具有由GlcNAc二等分的附着于抗体Fc区的双触角寡糖,例如在WO 2003/011878(Jean-Mairet等);美国专利号6,602,684(Umana等);US 2005/0123546(Umana等);Umana,P.等,Nature Biotechnol.17(1999)176-180)中。在另一实施方案中,通过在蛋白质岩藻糖基化缺陷的宿主细胞(例如Lec13CHO细胞或 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因(FUT8)缺失或FUT基因表达敲减的细胞(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)中表达抗体来将抗体糖改造为在附着于Fc区的糖类上缺乏岩藻糖。还在另一实施方案中,在其Fc区中改造抗体序列来增强ADCC(例如,在一个实施方案中,这种改造的抗体变体包含在Fc区的298、333和/或334位(残基的EU编号)具有一个或多个氨基酸取代的Fc区。

[0148] 术语“依赖补体的细胞毒性(CDC)”指本发明的抗体在补体存在下裂解人肿瘤靶细胞。可以通过在补体存在下用本发明的抗CD20抗体处理表达CD20的细胞的制备物来测量CDC。如果抗体在100nM的浓度下在4小时后裂解(细胞死亡)20%或更多的肿瘤细胞,则发现CDC。在一个实施方案中,用⁵¹Cr或Eu标记的肿瘤细胞进行测定,并测量释放的⁵¹Cr或Eu。对照包括用补体孵育肿瘤靶细胞而不含抗体。

[0149] 术语“CD20抗原的表达”旨在指细胞例如T或B细胞中CD20的显著表达水平。在一个实施方案中,待按照本发明的方法治疗的患者在B细胞肿瘤或癌症上表达显著水平的CD20。

患有“表达CD20的癌症”的患者可以通过本领域已知的标准测定来确定。例如,用免疫组织化学(IHC)检测、FACS或通过相应mRNA的基于PCR的检测来测量CD20抗原表达。

[0150] 本文所用的术语“表达CD20的癌症”指其中癌细胞显示CD20抗原的表达的所有癌症。这种表达CD20的癌症可以是,例如,淋巴瘤、淋巴细胞性白血病、肺癌、非小细胞肺(NSCL)癌、细支气管肺泡细胞肺癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌、皮肤或眼内黑素瘤、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛区癌、胃癌(stomach cancer)、胃癌(gastric cancer)、结肠癌、乳腺癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金病、食管癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、前列腺癌、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾细胞癌、肾盂癌、间皮瘤、肝细胞癌、胆管癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、脊髓肿瘤、脑干胶质瘤、多形性成胶质细胞瘤、星细胞瘤、施万细胞瘤、室管膜细胞瘤、成神经管细胞瘤、脑膜瘤、鳞状细胞癌、垂体腺瘤,包括任意以上癌症的难治性形式,或一种或多种以上癌症的组合。

[0151] 在一个实施方案中,本文所用的表达CD20的癌症指淋巴瘤(例如B细胞非霍奇金淋巴瘤(NHL))和淋巴细胞性白血病。这类淋巴瘤和淋巴细胞性白血病包括,例如:a)滤泡型淋巴瘤;b)小非裂细胞淋巴瘤/伯基特淋巴瘤(包括地方性伯基特淋巴瘤、散发性伯基特淋巴瘤和非伯基特淋巴瘤);c)边缘区淋巴瘤(包括结外边缘区B细胞淋巴瘤(黏膜相关淋巴组织淋巴瘤,MALT)、淋巴结边缘区B细胞淋巴瘤和脾边缘区淋巴瘤);d)套细胞淋巴瘤(MCL);e)大细胞淋巴瘤(包括B细胞弥漫性大细胞淋巴瘤(DLCL)、弥漫性混合细胞淋巴瘤、免疫母细胞性淋巴瘤、原发性纵隔B细胞淋巴瘤、血管中心性淋巴瘤-肺B细胞淋巴瘤);f)多毛细胞白血病;g)淋巴细胞性淋巴瘤、waldenstrom巨球蛋白血症;h)急性淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性髓性白血病(CLL)/小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)、B细胞幼淋巴细胞性白血病;i)浆细胞肿瘤、浆细胞骨髓瘤、多发性骨髓瘤、浆细胞瘤;j)霍奇金病。

[0152] 在一个实施方案中,表达CD20的癌症是B细胞非霍奇金淋巴瘤(NHL)。在另一实施方案中,表达CD20的癌症是套细胞淋巴瘤(MCL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、慢性髓性白血病(CLL)、B细胞弥漫性大细胞淋巴瘤(DLCL)、伯基特淋巴瘤、多毛细胞白血病、滤泡型淋巴瘤、多发性骨髓瘤、边缘区淋巴瘤、移植后淋巴增生性障碍(PTLD)、HIV相关淋巴瘤、waldenstrom巨球蛋白血症或原发性CNS淋巴瘤。

[0153] 本文所用的“复发性或难治性”CLL包括已接受过至少一个之前的包含化疗的治疗方案的患者。复发的患者通常在响应之前的包含化疗的治疗方案之后发展进行性疾病。难治的患者通常未能响应或在距之前最后的包含化疗的方案6个月内复发。

[0154] 本文所用的“之前未治疗过的”CLL包括诊断患有CLL但通常未接受过之前的化疗或免疫治疗的患者。具有急救、局部区域放疗(例如,为了减轻压迫性病征或症状)或糖皮质激素历史的患者仍可认为是之前未治疗过的。

[0155] 除非文中清楚地另有说明,本文及所附权利要求中所用的单数形式“一”、“或”和“该”包括复数指代物。

[0156] 本文提到“约”某个值或参数包括(或描述)了指向该值或参数本身的变通形式。例如,提到“约X”的描述包括“X”的描述。

[0157] 应理解,本文所述发明的方面和变通形式包括“由方面和变通形式组成”及“基本由方面和变通形式组成”。

[0158] III.方法

[0159] 在一方面,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轴结合拮抗剂和抗CD20抗体。

[0160] 本发明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。可以治疗多种癌症或可以延迟其进展,包括但不限于非实体瘤癌症。在一些实施方案中,该癌症是淋巴瘤或白血病。在一些实施方案中,该白血病是慢性淋巴细胞性白血病(CLL)或急性髓性白血病(AML)。在一些实施方案中,该淋巴瘤是滤泡型淋巴瘤(FL)、弥漫型大B细胞淋巴瘤(DLBCL)或非霍奇金淋巴瘤(NHL)。

[0161] 上述可用抗CD20抗体和PD-1轴结合拮抗剂治疗的癌症包括治疗表达CD20的癌症。在一些实施方案中,所治疗的个体患有表达CD20的癌症。

[0162] 在一个实施方案中,该抗CD20抗体具有这样的对Raji细胞(ATCC-No.CCL-86)上CD20的结合能力的比值,该II型抗CD20抗体与利妥昔单抗相比为0.3至0.6,在一个实施方案中为0.35至0.55,在另一实施方案中为0.4至0.5。

[0163] 在一个实施方案中,该II型抗CD20抗体是GA101抗体。

[0164] 在一个实施方案中,该II型抗CD20抗体具有提高的抗体依赖性细胞毒作用(ADCC)。

[0165] 在本文提供的在患者中治疗癌症的方法的某些实施方案中,该癌症是非实体瘤。在一个实施方案中,该非实体瘤是表达CD20的非实体瘤。可以在本文提供的方法中治疗的示例性非实体瘤包括例如白血病或淋巴瘤。在一个实施方案中,该非实体瘤是B细胞淋巴瘤。

[0166] 在一个实施方案中,该表达CD20的癌症是B细胞非霍奇金淋巴瘤(NHL)。

[0167] 在一些实施方案中,该个体患有癌症或处于发展癌症的风险。在一些实施方案中,该治疗在停止治疗后在个体中产生持续反应。在一些实施方案中,该个体患有可处于早期或晚期的癌症。在一些实施方案中,该癌症是转移性的。在一些实施方案中,该个体是人。

[0168] 在一些实施方案中,该个体是哺乳动物,如饲养动物(例如牛、绵羊、猫、狗和马)、灵长类(例如人类和非人灵长类,如猴)、兔和啮齿类(例如小鼠和大鼠)。在一些实施方案中,所治疗的个体是人。

[0169] 在另一方面,本文提供在患有癌症的个体中增强免疫功能的方法,其包括施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和抗CD20抗体。

[0170] 在一些实施方案中,该个体中的CD8 T细胞相对于施用PD-1途径拮抗剂和抗CD20抗体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,该CD8 T细胞引发表征为CD8 T细胞中提高的CD44表达和/或增强的溶细胞活性。在一些实施方案中,该CD8 T细胞激活表征为提高的 γ -IFN⁺ CD8 T细胞频度。在一些实施方案中,该CD8 T细胞是抗原特异性T细胞。在一些实施方案中,通过PD-L1表面表达发放信号而发生的免疫逃避得到抑制。

[0171] 在一些实施方案中,相对于施用PD-1途径拮抗剂和抗CD20抗体之前,个体中的癌细胞具有提高的MHC I类抗原表达。

[0172] 在一些实施方案中,相对于施用PD-1途径拮抗剂和抗CD20抗体之前,个体中的抗原呈递细胞具有增强的成熟和激活。在一些实施方案中,其中抗原呈递细胞是树突细胞。在

一些实施方案中,抗原呈递细胞的成熟表征为CD83⁺树突细胞的频度提高。在一些实施方案中,抗原呈递细胞的成熟表征为树突细胞上CD80和CD86的表达提高。

[0173] 在一些实施方案中,相对于施用抗PD-L1抗体和抗CD20抗体之前,个体中细胞因子IL-10和/或趋化因子IL-8(鼠KC的人同源物)的血清水平降低。

[0174] 在一些实施方案中,癌症具有提高的T细胞浸润水平。

[0175] 在一些实施方案中,本发明的联合治疗包括施用PD-1轴结合拮抗剂和抗CD20抗体。PD-1轴结合拮抗剂和抗CD20抗体可以以本领域已知的任意适宜的方式施用。例如,PD-1轴结合拮抗剂和抗CD20抗体可以顺次(在不同时间)或同时(在同一时间)施用。

[0176] 在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂或抗CD20抗体连续施用。在一些实施方案中,PD-1轴结合拮抗剂或抗CD20抗体间隔施用。在一些实施方案中,抗CD20抗体在施用PD-1轴结合拮抗剂之前施用。在一些实施方案中,抗CD20抗体与施用PD-1轴结合拮抗剂同时施用。在一些实施方案中,抗CD20抗体在施用PD-1轴结合拮抗剂之后施用。

[0177] 在一些实施方案中,提供用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展的方法,其包括对该个体施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和抗CD20抗体,进一步包括施用附加治疗。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(nanotherapy)、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)。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。

[0178] PD-1轴结合拮抗剂和抗CD20抗体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、通过移植、通过吸入、鞘内、心室内或鼻内施用。在一些实施方案中,抗CD20抗体静脉内、肌内、皮下、局部、口服、经皮、腹腔内、眼眶内、通过移植、通过吸入、鞘内、心室内或鼻内施用。可以施用有效量的PD-1轴结合拮抗剂和抗CD20抗体来预防或治疗疾病。PD-1轴结合拮抗剂和/或抗CD20抗体的适当剂量可以根据待治疗的疾病类型、PD-1轴结合拮抗剂和抗CD20抗体的类型、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。

[0179] 在一些实施方案中,即使成功可能性低也将进行治疗癌症的方法,但鉴于患者的病史和估计的预期生存期,认为其诱导总体有益作用过程。在一些实施方案中,抗CD20抗体和PD-1轴结合拮抗剂共同施用,例如作为两种分开的制剂施用该抗CD20抗体和PD-1轴结合拮抗剂。共同施用可以是同时施用或以任一顺序顺次施用。在另一实施方案中,存在两种(或全部)活性剂同时发挥其生物学活性的时期。该抗CD20抗体和该PD-1轴结合拮抗剂通过连续输注同时或顺次(例如通过静脉内(i.v.))共同施用。在两种治疗剂顺次共同施用时,药物在相隔“特定期限”的两次分开的施用中施用。术语特定期限意指1小时至15天的任何时间。例如药物之一可以在距施用另一药物约15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1

天、或24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1小时内施用,在一个实施方案中,该特定时期是10、9、8、7、6、5、4、3、2或1天、或24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1小时。

[0180] 在一些实施方案中,同时施用意指在同一时间或在通常小于1小时的短时期内。

[0181] 本文所用的给药期意指其间施用各治疗剂至少一次的时期。给药循环通常为约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30天,在一个实施方案中为6、7、8、9、10、11、12、13或14天,例如7或14天。

[0182] 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抗体按每三周一次1200mg的剂量对个体静脉内施用。在一些实施方案中,该抗PD-L1抗体与抗CD20抗体一起施用。在一些实施方案中,该抗CD20抗体在循环1的第1、8和15天及循环2至8的第1天按一次1000mg的剂量对个体静脉内施用。

[0183] 本领域已知或下文描述的任意PD-1轴结合拮抗剂和抗CD20抗体都可用于该方法。

[0184] PD-1轴结合拮抗剂

[0185] 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轴结合拮抗剂和抗CD20抗体。例如,PD-1轴结合拮抗剂包括PD-1结合拮抗剂、PD-L1结合拮抗剂和PD-L2结合拮抗剂。用于“PD-1”的备选名称包括CD279和SLEB2。用于“PD-L1”的备选名称包括B7-H1、B7-4、CD274和B7-H。用于“PD-L2”的备选名称包括B7-DC、Btde和CD273。在一些实施方案中,PD-1、PD-L1和PD-L2是人PD-1、PD-L1和PD-L2。

[0186] 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/或B7-1。在另一方面,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。

[0187] 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(也称为nivolumab、MDX-1106-04、ONO-4538、BMS-936558和**OPDIVO®**)、Merck 3475(也称为pembrolizumab、MK-3475、lambrolizumab、**KEYTRUDA®**和SCH-900475)和CT-011(也称为pidilizumab、hBAT和hBAT-1)。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(也称为B-DCIg)。在一些实施方案中,该PD-L1结合拮抗剂是抗PD-L1抗体。在一些实施方案中,该抗PD-L1结合拮抗剂选自YW243.55.S70、MPDL3280A、MDX-1105和MEDI4736。MDX-1105(也称为BMS-936559)是W02007/005874中描述的抗PD-L1抗体。抗体YW243.55.S70(重链和轻链可变区序列分别显示在SEQ ID No.20和21中)是W02010/077634 A1中描述的抗PD-L1抗体。MEDI4736是W02011/066389和US2013/034559中描述的抗PD-L1抗体。MDX-1106(也称为MDX-1106-04、ONO-4538或BMS-936558)是W02006/121168中描述的抗PD-1抗体。Merck 3475(也称为MK-3475或SCH-900475)是W02009/114335中描述的抗PD-1抗体。CT-011(也称为hBAT或hBAT-1)是W02009/101611中描述的抗PD-1抗体。AMP-224(也称为B7-DCIg)是W02010/027827和W02011/066342中描述的

PD-L2-Fc融合可溶性受体。

[0188] 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、ON0-4538、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:22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:23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:

[0189] (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:

[0190]

QVQLVESGGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKRYYADSVKGRFTISRDN
SKNTLFLQMNSLRAEDTAVYYCATNDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPV
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEF
LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP
ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLK(SEQ ID NO:22),
或

[0191] (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:

[0192]

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTATGIPARFSGSGSGTDFTLTIS
LEPEDFAVYYCQQSSNWPRTFGQGTKVEIKRTVAAPSFIPTPSDEQLKSGTASVCLLNFPYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC(SEQ ID NO:23)。

[0193] 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W0 2010/077634 A1中,其在此引入作为参考。

[0194] 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。

[0195] 用于本发明的抗PD-L1抗体,包括含有这类抗体的组合物,如W0 2010/077634 A1和US 8,217,149中所描述的那些,可以与抗CD20抗体组合使用来治疗癌症。在一些实施方案中,该抗PD-L1抗体包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:20的重链可变区和含有氨基酸序列SEQ ID NO:21的轻链可变区。

[0196] 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序列的重链可变区多肽,其中:

[0197] (a)该HVR-H1序列是GFTFSX₁SWIH(SEQ ID NO:1);

[0198] (b)该HVR-H2序列是AWIX₂PYGGSX₃YYADSVKG(SEQ ID NO:2);

[0199] (c)该HVR-H3序列是RHWPGGFDY(SEQ ID NO:3);

[0200] 此外,其中:X₁是D或G;X₂是S或L;X₃是T或S。

[0201] 在一个具体方面,X₁是D;X₂是S;X₃是T。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是:

[0202] HC-FR1是EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS(SEQ ID NO:4);

[0203] HC-FR2是WVRQAPGKGLEWV(SEQ ID NO:5);

[0204] HC-FR3是RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR(SEQ ID NO:6);

[0205] HC-FR4是WGQGTLVTVSA(SEQ ID NO:7)。

[0206] 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:

[0207] (a)该HVR-L1序列是RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A(SEQ ID NO:8);

[0208] (b)该HVR-L2序列是SASX₉LX₁₀S(SEQ ID NO:9);

[0209] (c)该HVR-L3序列是QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T(SEQ ID NO:10);

[0210] 此外,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。

[0211] 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。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_κI共有构架。还在另一方面,该构架序列中的至少一个以下是:

[0212] LC-FR1是DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC(SEQ ID NO:11);

[0213] LC-FR2是WYQQKPGKAPKLLIY(SEQ ID NO:12);

[0214] LC-FR3是GVPSRFGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC(SEQ ID NO:13);

[0215] LC-FR4是FGQGTKVEIKR(SEQ ID NO:14)。

[0216] 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:

[0217] (a)该重链包含HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3,此外,其中:

[0218] (i)该HVR-H1序列是GFTFSX₁SWIH(SEQ ID NO:1);

[0219] (ii)该HVR-H2序列是AWIX₂PYGGSX₃YYADSVKG(SEQ ID NO:2);

[0220] (iii)该HVR-H3序列是RHWPGGFDY(SEQ ID NO:3);和

[0221] (b)该轻链包含HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3,此外,其中:

[0222] (i)该HVR-L1序列是RASQX₄X₅X₆TX₇X₈A(SEQ ID NO:8);

[0223] (ii)该HVR-L2序列是SASX₉LX₁₀S(SEQ ID NO:9);和

[0224] (iii)该HVR-L3序列是QQX₁₁X₁₂X₁₃X₁₄PX₁₅T(SEQ ID NO:10);

[0225] 此外,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。

[0226] 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。还在另一方面, X₁是D; X₂是S; X₃是T; X₄是D; X₅是V; X₆是S; X₇是A; X₈是V; X₉是F; X₁₀是Y; X₁₁是Y; X₁₂是L; X₁₃是Y; X₁₄是H; X₁₅是A。

[0227] 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:

[0228]

HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	(SEQ ID NO:4)
HC-FR2	WVRQAPGKCLEWV	(SEQ ID NO:5)
HC-FR3	RFTISADISKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO:6)
HC-FR4	WGQGTLVTVSA	(SEQ ID NO:7)。

[0229] 还在另一方面, 该轻链构架序列源自Kabat κ I、II或IV亚组序列。还在另一方面, 该轻链构架序列是VL κ I共有序列。还在另一方面, 该轻链构架序列中的一个或多个是以下:

[0230]

LC-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	(SEQ ID NO:11)
LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO:12)
LC-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO:13)
LC-FR4	FGQGTKVEIKR	(SEQ ID NO:14)。

[0231] 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。

[0232] 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:

[0233] (a) 该重链进一步包含分别与GFTFSDSWIH(SEQ ID NO:15)、AWISPYGGSTYYADSVKG(SEQ ID NO:16)和RHWPGGFDY(SEQ ID NO:3)具有至少85%序列同一性的HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3序列; 或

[0234] (b) 该轻链进一步包含分别与RASQDVSTAVA(SEQ ID NO:17)、SASFLYS(SEQ ID NO:18)和QQYLYHPAT(SEQ ID NO:19)具有至少85%序列同一性的HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3序列。

[0235] 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是以下:

[0236]

HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	(SEQ ID NO:4)
HC-FR2	WVRQAPGKGLEWV	(SEQ ID NO:5)
HC-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO:6)
HC-FR4	WGQGTILVTVSA	(SEQ ID NO:7)。

[0237] 还在另一方面,该轻链构架序列源自Kabat κ 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:

[0238]

LC-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	(SEQ ID NO:11)
LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO:12)
LC-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO:13)
LC-FR4	FGQGTKVEIKR	(SEQ ID NO:14)。

[0239] 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。

[0240] 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:

[0241] (a)该重链序列与以下重链序列具有至少85%序列同一性:

[0242]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTILVTVSA(SEQ ID NO:20);或

[0243] (b)该轻链序列与以下轻链序列具有至少85%序列同一性:

[0244]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR(SEQ ID NO:21)。

[0245] 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是以下：

[0246]

HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	(SEQ ID NO:4)
HC-FR2	WVRQAPGKGLEWV	(SEQ ID NO:5)
HC-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO:6)
HC-FR4	WGQGTLVTVSA	(SEQ ID NO:7)

[0247] 还在另一方面，该轻链构架序列源自Kabat κ 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：

[0248]

LC-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	(SEQ ID NO:11)
LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO:12)
LC-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTITSSLPEDFATYYC	(SEQ ID NO:13)
LC-FR4	FGQGTKVEIKR	(SEQ ID NO:14)

[0249] 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“无效效应子功能的Fc突变”或无岩藻糖基化。还在另一实施方案中，该无效效应子功能的Fc突变是恒定区中的N297A或D265A/N297A取代。

[0250] 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：

[0251] (a)该重链序列与以下重链序列具有至少85%序列同一性：

[0252]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKN
TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGTLVTVSS(SEQ ID NO:24)；或

[0253] (b)该轻链序列与以下轻链序列具有至少85%序列同一性：

[0254]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTITSS
LPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR(SEQ ID NO:21)。

[0255] 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：

[0256] (a)该重链序列与以下重链序列具有至少85%序列同一性：

[0257]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWIHVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKN

TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSSASTK(SEQ ID NO:28);或

[0258] (b)该轻链序列与以下轻链序列具有至少85%序列同一性:

[0259]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFLTITSS
LQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKR(SEQ ID NO:29)。

[0260] 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。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:

[0261]

HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS	(SEQ ID NO:4)
HC-FR2	WVRQAPGKGLEWV	(SEQ ID NO:5)
HC-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO:6)
HC-FR4	WGQGLTVTVSS	(SEQ ID NO:25)。

[0262] 还在另一方面,该轻链构架序列源自Kabat κ 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:

[0263]

LC-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC	(SEQ ID NO:11)
LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO:12)
LC-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFLTITSS	(SEQ ID NO:13)
LC-FR4	FGQGTKVEIKR	(SEQ ID NO:14)。

[0264] 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“无效效应子功能的Fc突变”或无岩藻糖基化。还在另一实施方案中,该无效效应子功能的Fc突变是恒定区中的N297A或D265A/N297A取代。

[0265] 还在另一实施方案中,该抗PD-1抗体是MPDL3280A。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:24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:25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PDL-1抗体,其包含重链和/或轻链,其中:

[0266] (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:

[0267]

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDSWTHWVRQAPGKGLEWVAWISPYGGSTYYADSVKGRFTISADTSKN
TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARRHWPGGFDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP
VTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPC
PAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYASTYRVVSVL
TVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
SNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:
26);或

[0268] (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:

[0269]

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDVSTAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISS
LQPEDFATYYCQQYLYHPATFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNAL
QSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO:27)。。

[0270] 还在另一实施方案中,本发明提供包含与至少一种可药用载体组合的任意上述抗PD-L1抗体的组合物。

[0271] 还在另一实施方案中,提供分离的核酸,其编码抗PD-L1抗体的轻链或重链可变区序列,其中:

[0272] (a)该重链进一步包含分别与GFTFSDSWIH (SEQ ID NO:15)、AWISPYGGSTYYADSVKG (SEQ ID NO:16)和RHWPGGFDY (SEQ ID NO:3)具有至少85%序列同一性的HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3序列;和

[0273] (b)该轻链进一步包含分别与RASQDVSTAVA (SEQ ID NO:17)、SASFLYS (SEQ ID NO:18)和QQYLYHPAT (SEQ ID NO:19)具有至少85%序列同一性的HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3序列。

[0274] 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:

[0275]

HC-FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS	(SEQ ID NO:4)
HC-FR2	WVRQAPGKGLEWV	(SEQ ID NO:5)
HC-FR3	RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR	(SEQ ID NO:6)
HC-FR4	WGQGTLVTVSA	(SEQ ID NO:7)

[0276] 还在另一方面,该轻链构架序列源自Kabat κ 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:

[0277]

LC-FR1	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTTC	(SEQ ID NO:11)
LC-FR2	WYQQKPGKAPKLLIY	(SEQ ID NO:12)
LC-FR3	GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC	(SEQ ID NO:13)
LC-FR4	FGQGTKVEIKR	(SEQ ID NO:14)

[0278] 还在另一具体方面,本文所述的抗体(如抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体或抗PD-L2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“无效效应子功能的Fc突变”或无岩藻糖基化。还在另一方面,该无效效应子功能的Fc突变是恒定区中的N297A或D265A/N297A取代。

[0279] 还在另一方面,本文提供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、抗PD-1抗体或抗PD-L2抗体的核酸的载体。还在另一具体方面,该载体进一步包含适合用于表达该核酸的宿主细胞。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)。

[0280] 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,培养包含处于适合用于表达的形式编码之前所述任意抗PD-L1、抗PD-1或抗PD-L2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。

[0281] 还在另一实施方案中,本发明提供包含本文提供的抗PD-L1、抗PD-1或抗PD-L2抗体或其抗原结合片段和至少一种可药用载体的组合物。在一些实施方案中,对个体施用的抗PD-L1、抗PD-1或抗PD-L2抗体或其抗原结合片段是包含一种或多种可药用载体的组合物。可以使用本文所述或本领域已知的任意可药用载体。

[0282] 在一些实施方案中,本文所述的抗PD-L1抗体是在包含量为约60mg/mL的抗体、浓度为约20mM的组氨酸醋酸盐、浓度为约120mM的蔗糖和浓度为约0.04%(w/v)的聚山梨酸酯(例如聚山梨酸酯20)的制剂中,且该制剂具有约5.8的pH。在一些实施方案中,本文所述的抗PD-L1抗体是在包含量为约125mg/mL的抗体、浓度为约20mM的组氨酸醋酸盐、浓度为约240mM的蔗糖和浓度为约0.02%(w/v)的聚山梨酸酯(例如聚山梨酸酯20)的制剂中,且该制

剂具有约5.5的pH。

[0283] 抗CD20抗体

[0284] 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轴结合拮抗剂和抗CD20抗体。本领域已知和本文所述的任意CD20抗体都可以用于该方法。在一些实施方案中,该抗CD20抗体与人CD20结合。在一些实施方案中,该抗CD20抗体是I型抗体或II型抗体。在一些实施方案中,该抗CD20抗体是无岩藻糖基化的。

[0285] II型抗CD20抗体的实例包括,例如人源化B-Ly1抗体IgG1(WO 2005/044859中所公开的嵌合人源化IgG1)、11B8 IgG1(如WO 2004/035607中所公开)和AT80 IgG1。通常,IgG1同种型的II型抗CD20抗体显示特征性CDC特性。与IgG1同种型的I型抗体相比,II型抗CD20抗体具有降低的CDC(若为IgG1同种型)。

[0286] I型抗CD20抗体的实例包括,例如利妥昔单抗、HI47 IgG3(ECACC,杂交瘤),2C6 IgG1(如WO 2005/103081中所公开)、2F2 IgG1(如WO 2004/035607和WO 2005/103081中所公开)和2H7 IgG1(如WO 2004/056312中所公开)。

[0287] 在一些实施方案中,该抗CD20抗体是本文所述的GA101抗体。在一些实施方案中,该抗CD20抗体是以下结合人CD20的抗体中的任一种:(1)包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:50的HVR-H1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:51的HVR-H2、含有氨基酸序列SEQ ID NO:52的HVR-H3、含有氨基酸序列SEQ ID NO:53的HVR-L1、含有氨基酸序列SEQ ID NO:54的HVR-L2和含有氨基酸序列SEQ ID NO:55的HVR-L3的抗体;(2)包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:56的VH结构域和含有氨基酸序列SEQ ID NO:57的VL结构域的抗体;(3)包含氨基酸序列SEQ ID NO:58和氨基酸序列SEQ ID NO:59的抗体;(4)称为obinituzumab的抗体;或(5)包含与氨基酸序列SEQ ID NO:58具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列且包含与氨基酸序列SEQ ID NO:59具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列同一性的氨基酸序列的抗体。在一个实施方案中,该GA101抗体是IgG1同种型抗体。

[0288] 在一些实施方案中,该抗CD20抗体包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:56的重链可变区(VH)和含有氨基酸序列SEQ ID NO:57的轻链可变区(VH)。

[0289]

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGD^{TD}TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGQGT^{LV}TVSS(SEQ ID NO:56)

[0290]

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSL^{LH}SNGIT^{YLY}WYLQKPGQSPQ^{LLIY}QMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKVEIKRTV(SEQ ID NO:57)

[0291] 在一些实施方案中,该抗CD20抗体包含含有氨基酸序列SEQ ID NO:58的重链和含有氨基酸序列SEQ ID NO:59的轻链。

[0292]

QVQLVQSGAEVKKPGSSSVKVSCKASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEWMGRIFPGDGDYNGKF
 KGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDITAVYYCARNVFDGYWLVYNGQGITLVTVSSASTKGPSVF
 FLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTISWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSSVTVFSS
 SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMIS
 RTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
 YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE
 SNGQPENNYKTTTPFVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHYTQKSLSLSPG
 (SEQ ID NO: 58)

DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLSHNGITYLYWYLQKPGQSPQLLIYQMSNLVSGVP
 DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLELPYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE
 QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYE
 KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 59)

[0293] 在一些实施方案中,该抗CD20抗体是人源化B-Ly1抗体。在一些实施方案中,该人源化B-Ly1抗体包含含有SEQ ID NO:60的三个重链CDR的重链可变区和含有SEQ ID NO:61的三个轻链CDR的轻链可变区。在一些实施方案中,该人源化B-Ly1抗体包含含有序列SEQ ID NO:60的重链和含有序列SEQ ID NO:61的轻链。

[0294] 重链(SEQ ID NO:60)

[0295]

QVQLVQSGAE	VKKPGSSVKV	SCKASGYAFS	YSWINWVRQA	PGQGLEWMGR	50
IFPGDGDY	NGKFKGRVTI	TADKSTSTAY	MELSSLRSED	TAVYYCARNV	100
FDGYWLVYWG	QGTLVTVSSA	STKGPSVFPL	APSSKSTSGG	TAALGCLVKD	150
YFPEPVTISW	NSGALTSGVH	TFFPAVLQSSG	LYSLSSSVTV	PSSSLGTQTY	200
ICNVNHKPSN	TKVDKKVEPK	SCDKTHTCP	CPAPELLGGP	SVFLFPPKPK	250
DTLMISRTPE	VTCVVVDVSH	EDPEVKFNWY	VDGVEVHNAK	TKPREEQYNS	300
TYRVVSVLTV	LHQDWLNGKE	YKCKVSNKAL	PAPIEKTISK	AKGQPREPQV	350
YTLPPSRDEL	TKNQVSLTCL	VKGFYPSDIA	VEWESNGQPE	NNYKTTTPVL	400
DSDGSFFLYS	KLTVDKSRWQ	QGNVFSVMS	HEALHNHYTQ	KSLSLSPG	449

[0296] 轻链(SEQ ID NO:61)

[0297]

DIVMTQTPLS	LPVTPGEPAS	ISCRSSKSL	SHNGITYLYW	YLQKPGQSPQ	50
LLIYQMSNLV	SGVPDRFSGS	SGTDFTLKI	SRVEAEDVGV	YYCAQNLELP	100
YTFGGGTKVE	IKRTVAAPSV	FIFPPSDEQL	KSGTASVVCL	LNNFYPREAK	150
VQWKVDNALQ	SGNSQESVTE	QDSKDSYSTL	SSTLTLSKAD	YEKHKVYACE	200
VTHQGLSSPV	TKSFNRGEC				219

[0298] 在一些实施方案中,该抗CD20抗体是无岩藻糖基化糖改造抗体。这类糖改造抗体在Fc区中具有改变的糖基化模式,优选具有降低的岩藻糖残基水平。优选地,岩藻糖的量是Asn297上寡糖总量的60%或更少(在一个实施方案中,岩藻糖的量在40%至60%之间,在另一实施方案中,岩藻糖的量为50%或更少,还在另一实施方案中,岩藻糖的量为30%或更少)。此外,Fc区的寡糖优选是一分为二的。这些糖改造人源化抗CD20(例如B-Ly1)抗体具有提高的ADCC。

[0299] 寡糖成分可以显著影响与治疗性糖蛋白的功效相关的特性,包括物理稳定性、对蛋白酶攻击的抗性、与免疫系统的相互作用、药代动力学和具体生物学活性。这类特性可以不仅依赖于寡糖的存在或缺乏,还依赖于寡糖的具体结构。可以进行寡糖结构和糖蛋白功能之前的一些泛化。例如,某些寡糖结构通过与特定糖类结合蛋白质相互作用介导糖蛋白

从血流快速清除,而其他寡糖结构可以结合抗体,并触发不希望得到的免疫反应。(Jenkins,N.等,Nature Biotechnol.14(1996)975-81)。

[0300] 由于其以对人应用而言最相容的形式糖基化蛋白质的能力,哺乳动物细胞是优选用于产生治疗性糖蛋白的宿主。(Cumming,D.A.等,Glycobiology 1(1991)115-30; Jenkins,N.等,Nature Biotechnol.14(1996)975-81)。细菌极少糖基化蛋白质,且与其他类型的常见宿主如酵母、丝状真菌、昆虫细胞和植物细胞一样,产生与从血流快速清除相关的糖基化模式、不希望得到的免疫反应,且在一些具体情况下产生降低的生物学活性。在哺乳动物细胞中,中国仓鼠卵巢(CHO)细胞是过去二十年间最常用的。除提供适宜的糖基化模式外,这些细胞允许一致地产生遗传稳定、高产的克隆细胞系。它们可以用无血清培养基在简单的生物反应器中培养至高密度,并允许开发安全和可重现的生物工艺。其他常用的动物细胞包括幼仓鼠肾(BHK)细胞、NSO和SP2/0小鼠骨髓瘤细胞。最近,还测试了从转基因动物产生。(Jenkins,N.等,Nature Biotechnol.14(1996)975-981)

[0301] 所有抗体都在重链恒定区中的保守位置上包含糖类结构,每种同种型具有一系列不同的N连接糖类结构,其可变地影响蛋白质组装、分泌或功能活性。(Wright,A.和Morrison,S.L.,Trends Biotech.15(1997)26-32)。取决于加工的程度,所附着的N连接糖类的结构显著不同,且可以包括高甘露糖、多分枝以及双触角复合寡糖。(Wright,A.和Morrison,S.L.,Trends Biotech.15(1997)26-32)。通常,附着在特定糖基化位点上的核心寡糖结构存在异质加工,使得甚至单克隆抗体也作为多种糖型存在。同样,已显示细胞系之间存在抗体糖基化的巨大差异,甚至针对在不同培养条件下培养的给定细胞系观察到微小差异。(Lifely,M.R.等,Glycobiology 5(8)(1995)813-22)。

[0302] 获得功效大幅提高,同时保持简单生产工艺,并可能避免显著的不希望得到的副作用的一种方式是通过按Umana,P.等,Nature Biotechnol.17(1999)176-180和US 6,602,684中所述改造其寡糖成分来增强单克隆抗体的天然的、细胞介导的效应子功能。IgG1类型抗体(癌症免疫治疗中最常用的抗体)是在每个CH2结构域中的Asn297上具有保守N连接糖基化的糖蛋白。附着于Asn297的两个复合双触角寡糖埋藏在CH2结构域之间,与多肽骨架形成广泛接触,且其存在对抗体介导效应子功能如抗体依赖性细胞毒作用(ADCC)而言是必需的(Lifely,M.R.等,Glycobiology 5(1995)813-822;Jefferis,R.等,Immunol.Rev.163(1998)59-76;Wright,A.和Morrison,S.L.,Trends Biotechnol.15(1997)26-32)。

[0303] 之前显示,在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中过量表达 $\beta(1,4)$ -N-乙酰葡萄糖氨基转移酶I11("GnTIII17y)(催化形成二等分寡糖的糖基转移酶)显著提高由该改造的CHO细胞产生的抗成神经细胞瘤嵌合单克隆抗体(chCE7)的体外ADCC活性。(参见Umana,P.等,Nature Biotechnol.17(1999)176-180;及WO 99/154342;其全部内容在此引入作为参考)。抗体chCE7隶属于这样的一大类未缀合的单克隆抗体,在缺乏GnTIII酶的标准工业细胞系中产生时,该类未缀合的单克隆抗体具有高肿瘤亲和力和特异性,但功效太小而不能在临床上使用(Umana,P.等,Nature Biotechnol.17(1999)176-180)。该研究首次显示,可以通过将产生抗体的细胞改造为表达GnTIII来获得ADCC活性的大幅提高,该改造还导致恒定区(Fc)结合的二等分寡糖(包括二等分非岩藻糖基化寡糖)的比例提高至见于天然存在的抗体中的水平以上。

[0304] 在一些实施方案中,该抗CD20抗体是多特异性抗体或双特异性抗体。

[0305] IV. 抗体制备

[0306] 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。

[0307] 该抗体针对目的抗原(即PD-L1(如人PD-L1)或CD20(如人CD20))。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。

[0308] 在某些实施方案中,本文提供的抗体对具体目的抗原具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 150\text{nM}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 50\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更小,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)。

[0309] 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 $5\mu\text{g/ml}$ 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°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 $150\mu\text{l}$ /孔的闪烁体(MICROSCINT-20[™];Packard),在TOPCOUNT[™] 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。

[0310] 根据另一实施方案,用 ~ 10 个响应单位(RU)的固定化抗原CM5芯片,在 25°C 下使用**BIACORE**[®]-2000或**BIACORE**[®]-3000(BIAcore, Inc., Piscataway, NJ),用表面等离子共振测定来测量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 $5\mu\text{g/ml}$ ($\sim 0.2\mu\text{M}$),然后按 $5\mu\text{l}/\text{分钟}$ 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 $25\mu\text{l}/\text{分钟}$ 的流速在 25°C 下注入两倍系列稀释于含0.05%聚山梨酸酯20(**TWEEN-20**[™])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1:1 Langmuir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 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 。参见例如Chen等, J. Mol. Biol. 293:865-881(1999)。如果通过以上表面等离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°C 下的荧光发射强度(激发=295nm;发射=340nm,16nm带通)的提高或降低。

[0311] (i) 抗原制备

[0312] 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。

[0313] (ii) 某些基于抗体的方法

[0314] 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磺基琥珀酰亚胺酯(通过半胱氨酸残基缀合)、N-羟基琥珀酰亚胺(通过赖氨酸残基)、戊二醛、琥珀酐、 SOCl_2 或 $\text{R}^1\text{N}=\text{C}=\text{NR}$,其中R和 R^1 是不同的烷基)将相关抗原与在待免疫的物种中具有免疫原性的多肽(例如匙孔螯血蓝蛋白、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。

[0315] 通过将例如100 μg 或5 μg 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。

[0316] 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 Mianyixue, 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。

[0317] 对于多种其他杂交瘤技术,参见例如US 2006/258841; US 2006/183887(全人抗体); US 2006/059575; US 2005/287149; US 2005/100546; US 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(如单磷酸脂质A(MPL)/trehalose dicrynomycolate(TDM)(Ribi Immunochem. Research, Inc., Hamilton, Mont.))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。针对抗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。

[0318] 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))。

[0319] 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。

[0320] 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。

[0321] 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)。

[0322] 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。

[0323] (iii)文库衍生的抗体

[0324] 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, 如实施例3中所述的方法。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。

[0325] 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。

[0326] 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。

[0327] (iv)嵌合抗体、人源化抗体和人抗体

[0328] 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。

[0329] 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。

[0330] 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, Nature 332:323-329(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, Methods 36:43-60(2005)(描述“FR改组”); Osbourn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。

[0331] 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.Natl.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))。

[0332] 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。

[0333] 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XENOMOUSE™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。

[0334] 还可以通过基于杂交瘤的方法来制备人抗体。已描述了用于产生人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。

[0335] 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。

[0336] (v) 抗体片段

[0337] 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。

[0338] 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WO 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。

[0339] (vi)多特异性抗体

[0340] 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此表述所涵盖。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。

[0341] 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(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。WO 93/08829和Traunecker等,EMBO J.,10:3655-3659(1991)中公开了类似的方法。

[0342] 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)对应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。

[0343] 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。

[0344] 表2:氨基酸残基的特性

[0345]

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

[0346] ^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。

[0347] ^b来自A.A. Zamyatin, Prog. Biophys. Mol. Biol. 24:107-123, 1972的值。

[0348] ^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。

[0349] 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。

[0350] 表3:形成对应的杵和臼的突变的示例性组

[0351]

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

[0352] 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。

[0353] 在一些实施方案中，免疫球蛋白多肽包含含有以上表3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3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3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。

[0354] 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。

[0355] 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。

[0356] 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W0 94/04690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)。

[0357] 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 C_H3 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。

[0358] 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物素蛋白偶联,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(W0 91/00360、W0 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。

[0359] 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来将 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。

[0360] 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。

[0361] 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)。

[0362] 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W02004/106381、W02005/061547、W02007/042261和W02008/119567)。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。

[0363] 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,可以需要具体纯化技术(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。

[0364] 考虑具有两价以上的抗体。例如,可以制备三特异性抗体。Tuft等.*J. Immunol.*147:60(1991)

[0365] (vii)单结构域抗体

[0366] 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。

[0367] (viii)抗体变体

[0368] 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。

[0369] (ix)取代、插入和缺失变体

[0370] 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。

[0371] 表4:示例性取代

[0372]

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

[0373] 氨基酸可以按照共同的侧链性质分组：

[0374] a. 疏水性：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

[0375] b. 中性亲水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

[0376] c. 酸性：Asp、Glu；

[0377] d. 碱性：His、Lys、Arg；

[0378] e. 影响链取向的残基：Gly、Pro；

[0379] f. 芳香族：Trp、Tyr、Phe。

[0380] 非保守取代将需要将这些种类之一的成员换为另一种类。

[0381] 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(例如提高的亲合力、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。

[0382] 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。

[0383] 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。

[0384] 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。

[0385] 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端蛋氨酸残基的抗体。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。

[0386] (x)糖基化变体

[0387] 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。

[0388] 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。

[0389] 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.);US 2004/0093621(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Lec13 CHO细胞(Ripka等Arch.Biochem.Biophys.249:533-545(1986);美国专利申请号US 2003/0157108 A1,Presta,L;及WO 2004/056312 A1,Adams等,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)。

[0390] 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(Jean-Mairet等);美国专利号6,602,684(Umana等.);US 2005/0123546(Umana等);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(Patel等);WO 1998/58964(Raju,S.);及WO 1999/22764(Raju,S.)中。

[0391] 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。

[0392] (xi)Fc区变体

[0393] 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)。

[0394] 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, M.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ACTI™非放射性细胞毒性测定(Cell Technology, Inc. Mountain View, CA);和CytoTox 96®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, M. S.等, *Blood* 101:1045-1052(2003);及Cragg, M. S.和M. J. Glennie, *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, S. B.等, *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769(2006))。

[0395] 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)。

[0396] 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))。

[0397] 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。

[0398] 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)。

[0399] 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。

[0400] (xii)抗体衍生物

[0401] 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、聚乙烯吡咯烷酮、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、polypropylene 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。

[0402] (xiii)载体、宿主细胞和重组方法

[0403] 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。

[0404] (a)信号序列成分

[0405] 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*)葡糖淀粉酶前导序列或WO 90/13646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)。

[0406] (b)复制起点

[0407] 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)。

[0408] (c)选择基因成分

[0409] 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,例如编码芽孢杆菌属D-丙氨酸消旋酶的基因。

[0410] 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。

[0411] 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。

[0412] 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)。

[0413] 备选地,通过在包含L-蛋氨酸亚砷亚胺(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。

[0414] 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。

[0415] 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(ATCC 20,622或38,626)。

[0416] 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)。

[0417] (d)启动子成分

[0418] 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。

[0419] 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。

[0420] 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酵解酶

(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。

[0421] 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。

[0422] 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。

[0423] 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启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。

[0424] (e)增强子元件成分

[0425] 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。

[0426] (f)转录终止成分

[0427] 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。

[0428] (g)宿主细胞的选择和转化

[0429] 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。

[0430] 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,从可溶性级分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。

[0431] 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*)(ATCC 16,045)、威克克鲁维酵母(*K.wickerhamii*)(ATCC 24,178)、瓦尔提克鲁维酵母(*K.waltii*)(ATCC 56,500)、果蝇克鲁维酵母(*K.drosophilum*)(ATCC 36,906)、耐热克鲁维酵母(*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 reesia*)(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)。

[0432] 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。

[0433] 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容纳昆虫宿主细胞。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。

[0434] 也可以用棉花、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛、番茄、浮萍(*Leninaceae*)、苜蓿(蒺藜苜蓿(*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PLANTIBODIES™技术)。

[0435] 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, HB 8065);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。

[0436] 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。

[0437] (h)培养宿主细胞

[0438] 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;WO 87/00195;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GENTAMYCIN™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)和葡萄糖或等等的能量来源。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。

[0439] (xiv)纯化抗体

[0440] 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。

[0441] 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 $\gamma 1$ 、 $\gamma 2$ 或 $\gamma 4$ 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 $\gamma 3$ (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 ABX™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SEPHAROSE™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。

[0442] 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。

[0443] 选择具有生物学活性的抗体

[0444] 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。

[0445] 例如,对于抗PDL1抗体,可以在检测结合PDL1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。

[0446] 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PDL1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。

[0447] 药物组合物和制剂

[0448] 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抗体或抗CD20抗体)和可药用载体的药物组合物和制剂。

[0449] 可以通过将具有希望得到的纯度的活性成分(如抗体或多肽)和/或抗HER2抗体与一种或多种可选的可药用载体(Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,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。

[0450] 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WO 2006/044908中的那些,后一种制剂包含组氨酸-乙酸缓冲液。

[0451] 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。

[0452] 活性成分可以包载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。

[0453] 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。

[0454] V. 药盒

[0455] 在另一方面,提供包含PD-L1轴结合拮抗剂和/或抗CD20抗体的药盒,该药盒用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展,或用于增强患有癌症的个体的免疫功能。在一些实施方案中,该药盒包含PD-1轴结合拮抗剂和包装说明书,该包装说明书包含用该PD-1轴结合拮抗剂与抗CD20抗体组合来在个体中治疗癌症或延迟癌症进展或增强患有癌症的个体的免疫功能的说明。在一些实施方案中,该药盒包含抗CD20抗体和包装说明书,该包装说明书包含用该CD20抗体与PD-1轴结合拮抗剂组合来在个体中治疗癌症或延迟癌症进展或增强患有癌症的个体的免疫功能的说明。在一些实施方案中,该药盒包含PD-1轴结合拮抗剂和抗CD20抗体及包装说明书,该包装说明书包含用该PD-1轴结合拮抗剂和该抗CD20抗体来在个体中治疗癌症或延迟癌症进展或增强患有癌症的个体的免疫功能的说明。本文所述的任意PD-1轴结合拮抗剂和/或抗CD20抗体都可以包含在该药盒内。

[0456] 在一些实施方案中,该药盒包含含有本文所述的一种或多种PD-1轴结合拮抗剂和抗CD20抗体的容器。适宜的容器包括例如瓶、小管(例如双腔小管)、注射器(如单腔或双腔注射器)和试管。容器可以形成自多种材料,如玻璃或塑料。在一些实施方案中,该药盒可以

包含标签(例如容器上或与容器结合)或包装说明书。标签或包装说明书可以指示其中所包含的化合物可以用于或预期用于在个体中治疗癌症或延迟癌症进展或用于增强患有癌症的个体的免疫功能。该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、针头和注射器。

抗 CD20 抗体序列

```
<210> 30
<211> 112
<212> PRT
<213> 小家鼠属物种 (Mus sp.)
<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> 鼠单克隆抗 CD20 抗体 B-Ly1 重链可变区 (VH) 氨基酸序列
<400> 30
Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys
1          5          10          15
Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Leu
          20          25          30
Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp
          35          40          45
Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
          50          55          60
Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Thr Ser Leu Thr
          65          70          75          80
Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly
          85          90          95
Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
          100          105          110
```

[0457]

```
<210> 31
<211> 103
<212> PRT
<213> 小家鼠属物种
<220>
<221> MISC_FEATURE
<223> 鼠单克隆抗 CD20 抗体 B-Ly1 轻链可变区 (VL) 氨基酸序列
<400> 31
Asn Pro Val Thr Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
1          5          10          15
Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu
          20          25          30
Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn
          35          40          45
Leu Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr
          50          55          60
Asp Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val
          65          70          75          80
Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly
          85          90          95
Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
          100
```

<210> 32
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工的
<220>
<223> 人源化 B-Ly1 抗体 (B-HH2) 重链可变区 (VH) 氨基酸序列
<400> 32
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

[0458]

<210> 33
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工的
<220>
<223> 人源化 B-Ly1 抗体 (B-HH3) 重链可变区 (VH) 氨基酸序列
<400> 33
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Leu Cys
85 90 95
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 34
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工的

<220>

<223> 人源化 B-Ly1 抗体(B-HH4)重链可变区(VH)氨基酸序列

<400> 34

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

<210> 35

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人源化 B-Ly1 抗体(B-HH5)重链可变区(VH)氨基酸序列

<400> 35

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

<210> 36

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人源化 B-Ly1 抗体(B-HH6)重链可变区(VH)氨基酸序列

<400> 36

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

[0459]

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

<210> 37

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人源化 B-Ly1 抗体(B-HH7)重链可变区(VH)氨基酸序列

<400> 37

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

[0460]

<210> 38

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人源化 B-Ly1 抗体(B-HH8)重链可变区(VH)氨基酸序列

<400> 38

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 39
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 人源化 B-Ly1 抗体(B-HH9)重链可变区(VH)氨基酸序列
 <400> 39

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

[0461]

<210> 40
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 人源化 B-Ly1 抗体(B-HL8)重链可变区(VH)氨基酸序列
 <400> 40

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

```

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

```

<210> 41
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 人源化 B-Ly1 抗体(B-HL10)重链可变区(VH)氨基酸序列
 <400> 41

```

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

```

[0462]

<210> 42
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> 人源化 B-Ly1 抗体(B-HL11)重链可变区(VH)氨基酸序列
 <400> 42

```

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

```

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 43

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人源化 B-Ly1 抗体(B-HL12)重链可变区(VH)氨基酸序列

<400> 43

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

[0463]

<210> 44

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 人源化 B-Ly1 抗体(B-HL13)重链可变区(VH)氨基酸序列

<400> 44

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

115

<210> 45
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工的
<220>
<223> 人源化 B-Ly1 抗体(B-HL14)重链可变区(VH)氨基酸序列
<400> 45

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

[0464]

<210> 46
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工的
<220>
<223> 人源化 B-Ly1 抗体(B-HL15)重链可变区(VH)氨基酸序列
<400> 46

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

<210> 47

<211> 119
<212> PRT
<213> 人工的
<220>
<223> 人源化 B-Ly1 抗体(B-HL16)重链可变区(VH)氨基酸序列
<400> 47

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

[0465]

<210> 48
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工的
<220>
<223> 人源化 B-Ly1 抗体(B-HL17)重链可变区(VH)氨基酸序列
<400> 48

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

<210> 49
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工的

<220>

<223> 人源化 B-Ly1 抗体 B-KV1 轻链可变区 (VL) 氨基酸序列

<400> 49

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

<210> 50

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工的

[0466]

<220>

<223> GA101 抗体 HVR-H1 序列

<400> 50

Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr
1 5

<210> 51

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> GA101 抗体 HVR-H2 序列

<400> 51

Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp
1 5

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> GA101 抗体 HVR-H3 序列

<400> 52

Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr
1 5 10

<210> 53
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工的
<220>
<223> GA101 抗体 HVR-L1 序列
<400> 53

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 54
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工的
<220>
<223> GA101 抗体 HVR-L2 序列
<400> 54

Gln Met Ser Asn Leu Val Ser
1 5

[0467]

<210> 55
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工的
<220>
<223> GA101 抗体 HVR-L3 序列
<400> 55

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 56
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工的
<220>
<223> GA101 抗体 VH 序列
<400> 56

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30
Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 57
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> GA101 抗体 VL 序列
 <400> 57

[0468]

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

<210> 58
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>
 <223> GA101 抗体重链全序列的序列
 <400> 58

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

[0469]

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

<210> 59

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> GA101 抗体轻链全序列的序列

<400> 59

[0470]

```

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

```

实施例

[0471] 可通过参考以下实施例来进一步理解本发明,该实施例以说明的方式提供,并非意在限制。

[0472] 实施例1:与obinutuzumab一起施用的MPDL3280A在复发性/难治性滤泡型淋巴瘤和弥漫型大B细胞淋巴瘤患者中的安全性与药理学研究

[0473] 此1期介入性开发标签、多中心、全球研究旨在评估对难治性或复发性滤泡型淋巴瘤(FL)或弥漫型大B细胞淋巴瘤(DLBCL)患者组合施用的静脉内MPDL3280A(即抗PD-L1抗体)和obinutuzumab(即抗CD20抗体)的安全性、耐受性和药代动力学。此研究的预期持续时间为约44个月。研究设计是治疗、单组分配、开放标签、非随机化安全性研究。

[0474] 阶段1主要结果测量是:(a)至多21天的时限内剂量限制性毒性(DLT)的发生率;和(b)至多21天的时限内观察到的DLT的性质。

[0475] 次要结果测量是:(a)至多44个月的时限内按照美国国家癌症研究所不良事件通用术语标准(National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events,NCI CTCAE)v4.0分级的不良事件(AE)的发生率;(b)至多44个月的时限内抗治疗性

抗体反应的发生率；(c)循环2的第1天的MPDL3280A最大血清浓度(C_{max})；(d)循环1、3、4和9的第1天及研究终止时的MPDL3280A最小血清浓度(C_{min})；和(e)循环1-4的第1天及循环1的第8天的obinutuzumab给药前和输注结束血清浓度(C_{max}、C_{min})。

[0476] 此研究的估计招募为52个个体。研究中有两条臂。第一条臂是实验性安全性评价阶段(阶段1)。第一条臂中所分配的干预是：(a)MPDL3280A：21天的obinutuzumab导入期之后，每3周静脉内施用1200mg MPDL3280A；和(b)obinutuzumab：在循环1的第1(首剂量分次施用，并在2天内施用)、8和15天及循环2至8的第1天静脉内施用1000mg obinutuzumab。第二条臂是放大阶段(阶段2)。第二条臂中所分配的干预是：(a)MPDL3280A：21天的obinutuzumab导入期之后，每3周静脉内施用1200mg MPDL3280A；和(b)obinutuzumab：在循环1的第1(首剂量分次施用，并在2天内施用)、8和15天及循环2至8的第1天静脉内施用1000mg obinutuzumab。

[0477] 18岁及以上的男女个体都符合此研究的条件。入选标准是：(a)组织学上证明的、CD20阳性、复发性或难治性(定义为在距之前的治疗6个月内复发)滤泡型淋巴瘤(FL)或弥漫型大B细胞淋巴瘤(DLBC)，包括原发性纵隔大B细胞淋巴瘤(PMBCL)；(b)筛查时的骨髓活组织检查(除非在筛查前3个月内进行过)；(c)美国东部肿瘤协作组(ECOG)表现状况为0或1；(d)预期寿命≥12周；(e)计算层析X射线照相术(CT)扫描或MRI显示至少一个可二维测量的病灶在其最大维度上≥2cm，如恶性淋巴瘤修订应答标准所定义；(f)足够的血液功能和终器功能；(g)对有生育能力的女性患者及拥有有生育能力配偶的男性患者，(患者和/或配偶)同意使用高效的避孕形式；和(h)存档肿瘤组织。

[0478] 淘汰标准是：(a)中枢神经系统淋巴瘤、柔脑膜淋巴瘤或转化为高级或DLBCL的组织学证据；(b)3b级FL、小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)或Waldenstrom巨球蛋白血症(WM)；(c)需要经常性引流操作(每月一次或更频繁)的不受控胸腔积液、心包积液或腹水*；(d)需要持续使用二磷酸盐治疗或denosumab的不受控高钙血症或症状性高钙血症；(e)对单克隆抗体治疗有严重变态反应或过敏反应的历史；(f)循环1开始之前的4周内的定期糖皮质激素治疗，除非按等同于<30mg/天强的松/强的松龙的剂量为非霍奇金淋巴瘤以外的适应症施用；(g)怀孕和授乳妇女；(h)自身免疫病史；(i)具有进行性多灶性白质脑病(PML)病史的患者；(j)具有同种异体骨髓移植史或实体器官移植史的患者；(k)特发性肺纤维化、机化性肺炎(例如闭塞性细支气管炎)、药物性肺炎、特发性肺炎病史，或筛查时胸部CT扫描有活性肺炎的迹象**；(l)HIV测试阳性；(m)慢性乙型肝炎感染病史，或活性或慢性乙型肝炎或丙型肝炎测试结果阳性；(n)严重心血管疾病，如心脏病(纽约心脏病学会II类或更高)、之前3个月内的心肌梗塞、不稳定心律失常、或不稳定性心绞痛；(o)超敏反应或之前用obinutuzumab治疗过；(p)进入研究前12个月内接受过氟达拉滨或**Campath®**；(q)之前用CD137激动剂或免疫检验点阻断疗法(包括抗CTLA4、抗PD-1、抗PD-L1治疗性抗体)治疗过；(r)在循环1第1天之前6周或药物的5个半衰期(以较短者为准)内用全身性免疫刺激剂(包括但不限于干扰素、白介素-2)治疗过；和(r)在循环1第1天之前2周内用全身性免疫抑制药物(包括但不限于强的松、环磷酰胺、硫唑嘌呤、氨甲蝶呤、沙利度胺和抗肿瘤坏死因子(抗TNF)剂)治疗过***；

[0479] *具有留置导管的患者符合条件。

[0480] **允许辐射场中的放射性肺炎(纤维化)病史。

[0481] ***允许吸入型糖皮质激素和盐皮质激素。

[0482] 实施例2:抗CD20抗体与抗PD-L1抗体组合对小鼠中肿瘤体积和淋巴细胞群体的影响

[0483] 用体积100 μ l至200 μ l之间的含 2.5×10^6 个A20细胞的HBSS+Matrigel皮下接种入小鼠右单侧胸区。使小鼠长出肿瘤。在肿瘤达到约80–150mm³的平均肿瘤体积时(第0天,接种后约6天),将小鼠招募入下列处理组。在第0天起始处理。(对未招募入处理组的小鼠(即由于不相似的肿瘤体积)实施安乐死。)

[0484] 处理组:

[0485] 1. 抗豚草(mIgG2a),第0天、第3天10mg/kg剂量,第10天和第17天5mg/kg腹腔内+Mu IgG1抗gp120 9338,10mg/kg腹腔内,每周三次x3周,n=10

[0486] 2. 抗豚草(mIgG2a),第0天、第3天10mg/kg剂量,第10天和第17天5mg/kg腹腔内+Mu IgG1抗PD-L1 6E11.1.9,10mg/kg,腹腔内,每周三次x3周,n=10

[0487] 3. Mu IgG2a抗CD20豚草/5D2,第0天、第3天10mg/kg剂量,第10天和第17天5mg/kg+Mu IgG1 gp120 9338,10mg/kg,腹腔内,每周三次x3周,n=10

[0488] 4. Mu IgG2a抗CD20豚草/5D2,第0天、第3天10mg/kg剂量,第10天和第17天5mg/kg+Mu IgG1抗PD-L1 6E11.1.9,10mg/kg,腹腔内,每周三次x3周,n=10

[0489] 在第3、5、7、10、12、14、17、19和21天施用Mu IgG1抗gp120,Mu IgG2a抗PD-L1。联合组中的抗体先后给药。联合剂量体积不超过每只小鼠300 μ L。抗PD-L1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(吐温-20)、pH=5.5中。

[0490] 所有小鼠都在第4天或第5天采血,以测定B细胞耗竭的有效性。在异氟烷诱导麻醉(吸入实现)下,通过眼眶采血收集血液(收集体积不超过200 μ l)。眼眶交替采血。测定各处理组的%CD19+B淋巴细胞、%CD4+T淋巴细胞和%CD8+T淋巴细胞的第4天血液FACS分析分别显示在图1A、图1B和图1C中。

[0491] 每周至少两次收集测量结果和体重。显示>15%体重减轻的小鼠每天称重,如果它们体重减轻>20%,则实施安乐死。在整个研究过程中,每周进行所有小鼠的临床观察两次。对显示不良临床问题的小鼠进行更频繁的观察,例如,取决于严重度,多至每天观察。如果小鼠濒死,则实施安乐死。如果肿瘤体积超过3,000mm³,或者如果3个月后肿瘤未形成,则对小鼠实施安乐死。之前的研究已显示,8周后,剩余肿瘤生长速率降低,且攻击性显著降低。每周测量和称重这些剩余肿瘤一次。对于8周后存在的任何大肿瘤或激烈生长的肿瘤,每周两次收集这些具体小鼠的测量结果和体重。图2中显示各处理组的肿瘤体积对时间(第0天至第30天之间)的曲线。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,Stat Med.2014年5月10日;33(10):1646–61(Epub 2013年12月3日)。此方法处理研究结束前的重复测量结果和适度丢失(dropout)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。抗PD-L1抗体与抗CD20抗体组合处理在抑制肿瘤生长和延迟肿瘤生长上比任一单一药物处理更有效。

[0492] 在具有A20pRK-CD20-GFP的小鼠中重复了上述实验。按上文所述用 2.5×10^6 个A20pRK-CD20-GFP细胞接种100只小鼠,并使小鼠长出肿瘤。在肿瘤达到约100–200mm³的平

均肿瘤体积时(第0天,接种后约7天),将动物招募入下列处理组。在第1天起始处理。(对例如由于不相似的肿瘤体积而未招募入以下处理组的小鼠实施安乐死。)

[0493] 处理组:

[0494] 1. 抗豚草(mIgG2a),第-2天、第1天10mg/kg剂量,第8天和第15天5mg/kg腹腔内+Mu IgG1抗gp120 9338,10mg/kg,腹腔内,每周三次x3周,n=10

[0495] 2. 抗豚草(mIgG2a),第-2天、第1天10mg/kg剂量,第8天和第15天5mg/kg腹腔内+Mu IgG2a抗PDL1 25A1 DANA,10mg/kg,腹腔内,每周三次x3周,n=10

[0496] 3. Mu IgG2a抗CD20豚草/5D2,第-2天、第1天10mg/kg剂量,第8天和第15天5mg/kg+Mu IgG1 gp120 9338,10mg/kg,腹腔内,每周三次x3周,n=10

[0497] 4. Mu IgG2a抗CD20豚草/5D2,第-2天、第1天10mg/kg剂量,第8天和第15天5mg/kg+Mu IgG2a抗PDL1 25A1 DANA,10mg/kg,腹腔内,每周三次x3周,n=10

[0498] 5. Mu IgG2a抗hCD202H7-mIgG2a/5D2,第1天10mg/kg,第8天和第15天5mg/kg+Mu IgG1 gp120 9338,10mg/kg,腹腔内,每周三次x3周,n=10

[0499] 6. Mu IgG2a抗hCD20 2H7-mIgG2a/5D2,第1天10mg/kg,第8天和第15天5mg/kg+Mu IgG2a抗PDL1 25A1 DANA,10mg/kg,腹腔内,每周三次x3周,n=10

[0500] 在第3、5、7、10、12、14、17、19和21天施用Mu IgG1抗gp120,Mu IgG2a抗PD-L1。联合组中的抗体先后给药。联合剂量体积不超过每只小鼠300 μ L。抗PD-L1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(吐温-20)、pH=5.5中。

[0501] 所有动物都在第2天或第3天采血,以测定B细胞耗竭的有效性。在异氟烷诱导麻醉(吸入实现)下,通过眼眶采血收集血液(收集体积不超过200 μ L)。眼眶交替采血。

[0502] 每周至少两次收集测量结果和体重。显示>15%体重减轻的小鼠每天称重,如果它们体重减轻>20%,则实施安乐死。在整个研究过程中,每周进行所有小鼠的临床观察两次。对显示不良临床问题的小鼠进行更频繁的观察,例如,取决于严重度,多至每天观察。如果小鼠濒死,则实施安乐死。如果肿瘤体积超过3,000mm³,或者如果3个月后肿瘤未形成,则对小鼠实施安乐死。之前的研究已显示,8周后,剩余肿瘤生长速率降低,且攻击性显著降低。每周测量和称重这些剩余肿瘤一次。对于8周后存在的任何大肿瘤或激烈生长的肿瘤,每周两次收集这些具体小鼠的测量结果和体重。图3中显示各处理组的肿瘤体积对时间(第0天至第30天之间)的曲线。用与图2所利用相同的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。抗PD-L1抗体与抗CD20抗体组合处理在抑制肿瘤生长和延迟肿瘤生长上比任一单一药物处理更有效。

[0503] 本文引用的所有专利、专利申请、文件和论文在此完整引入作为参考。

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)
J·金姆 (Jeong KIM)
- <120> 用 PD-1 轴结合拮抗剂和抗 CD20 抗体治疗癌症的方法
- <130> 146392027940
- <140> 尚未分配
- <141> 同时附上
- <150> US 62/034,766
- <151> 2014-08-07
- <150> US 61/917,264
- <151> 2013-12-17
- <160> 61
- <170> Windows 版本 4.0 的 FastSEQ
- [0001] <210> 1
- <211> 10
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成构建体
- <220>
- <221> 变体
- <222> 6
- <223> Xaa = Asp 或 Gly
- <400> 1
- Gly Phe Thr Phe Ser Xaa Ser Trp Ile His
- 1 5 10
- <210> 2
- <211> 18
- <212> PRT
- <213> 人工序列
- <220>
- <223> 合成构建体
- <220>
- <221> 变体
- <222> 4
- <223> Xaa = Ser 或 Leu
- <220>
- <221> 变体
- <222> 10
- <223> Xaa = Thr 或 Ser
- <400> 2

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

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 3

Arg His Trp Pro Gly Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 4

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 4

[0002] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 5

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

<210> 6

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 6

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> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 7

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

<210> 8

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<220>

<221> 变体

[0003]

<222> 5

<223> Xaa = Asp 或 Val

<220>

<221> 变体

<222> 6

<223> Xaa = Val 或 Ile

<220>

<221> 变体

<222> 7

<223> Xaa = Ser 或 Asn

<220>

<221> 变体

<222> 9

<223> Xaa = Ala 或 Phe

<220>

<221> 变体

<222> 10

<223> Xaa = Val 或 Leu

<400> 8

Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Xaa Thr Xaa Xaa Ala
1 5 10

<210> 9

[0004]

<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> 4
<223> Xaa = F 或 T
<220>
<221> 变体
<222> 6
<223> Xaa = Y 或 A
<400> 9
Ser Ala Ser Xaa Leu Xaa Ser
1 5

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<220>
<221> 变体
<222> 3
<223> Xaa = Tyr, Gly, Phe 或 Ser
<220>
<221> 变体
<222> 4
<223> Xaa = Leu, Tyr, Phe 或 Trp
<220>
<221> 变体
<222> 5
<223> Xaa = Tyr, Asn, Ala, Thr, Gly, Phe 或 Ile
<220>
<221> 变体
<222> 6
<223> Xaa = His, Val, Pro, Thr 或 Ile
<220>
<221> 变体
<222> 8
<223> Xaa = Ala, Trp, Arg, Pro 或 Thr
<400> 10
Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr

	1	5	
	<210> 11		
	<211> 23		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成构建体		
	<400> 11		
	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> 12		
	<211> 15		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成构建体		
	<400> 12		
	Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr		
[0005]	1	5	10 15
	<210> 13		
	<211> 32		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成构建体		
	<400> 13		
	Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr		
	1	5	10 15
	Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys		
	20 25 30		
	<210> 14		
	<211> 11		
	<212> PRT		
	<213> 人工序列		
	<220>		
	<223> 合成构建体		
	<400> 14		
	Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg		
	1	5	10

<210> 15
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 15
Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ser Trp Ile His
1 5 10

<210> 16
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 16
Ala Trp Ile Ser Pro Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15
Lys Gly

[0006]

<210> 17
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 17
Arg Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成构建体
<400> 18
Ser Ala Ser Phe Leu Tyr Ser
1 5

<210> 19
<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 19

Gln Gln Tyr Leu Tyr His Pro Ala Thr

1

5

<210> 20

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 20

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

1

5

10

15

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

20

25

30

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

35

40

45

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

50

55

60

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

65

70

75

80

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

85

90

95

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

100

105

110

Leu Val Thr Val Ser Ala

115

<210> 21

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 21

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

[0007]

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> 22

<211> 440

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 22

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
 20 25 30
 Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

[0008]

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

[0009]

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
 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> 23

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 23

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> 24

<211> 118

<212> PRT

[0010]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 24

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> 25

<211> 11

[0011]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 25

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1

5

10

<210> 26

<211> 447

<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

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

100

105

110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

115

120

125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly

130

135

140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145

150

155

160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln

165

170

175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180

185

190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser

195

200

205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

210

215

220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser

225

230

235

240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255
 Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270
 Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Glu 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
 [0012] 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> 27

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 27

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

```

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

```

<210> 28

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 28

```

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

```

<210> 29

<211> 108

<212> PRT

[0013]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 29

```

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> 30

<211> 112

<212> PRT

[0014]

<213> 小家鼠属物种 (Mus sp.)

<400> 30

```

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

```

<210> 31

<211> 103

<212> PRT

<213> 小家鼠属物种

<400> 31

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

<210> 32

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 32

[0015]

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

<210> 33

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 33

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 34

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

[0016]

<220>

<223> 合成构建体

<400> 34

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 35

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 35

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

<210> 36

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 36

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

[0017]

<210> 37

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 37

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser

20 25 30

Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

[0018]

<210> 38

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 38

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Ser

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly

	100	105	110
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
	115		
<210>	39		
<211>	119		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成构建体		
<400>	39		
	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
	1 5 10 15		
	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Tyr Ser		
	20 25 30		
	Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
	35 40 45		
	Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe		
	50 55 60		
	Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
	65 70 75 80		
	Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0019]	85 90 95		
	Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly		
	100 105 110		
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
	115		
<210>	40		
<211>	119		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
<223>	合成构建体		
<400>	40		
	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly		
	1 5 10 15		
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Tyr Ser		
	20 25 30		
	Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
	35 40 45		
	Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe		
	50 55 60		
	Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
	65 70 75 80		

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 41

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 41

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

[0020]

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

<210> 42

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 42

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

50 55 60
Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 43

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 43

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

[0021]

<210> 44

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 44

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

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 45

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 45

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

[0022]

<210> 46

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 46

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

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

<210> 47

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

[0023]

<400> 47

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

<210> 48

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 48

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

<210> 49

<211> 115

<212> PRT

[0024]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 49

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

<210> 50

<211> 6

[0025]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 50

Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr

1

5

<210> 51

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 51

Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp

1

5

<210> 52

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 52

Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr

1

5

10

<210> 53

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 53

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr

1

5

10

15

<210> 54

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 54

Gln Met Ser Asn Leu Val Ser

1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 55

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr

1 5

<210> 56

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 56

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1 5 10 15

[0026]

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser

20 25 30

Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 57

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 57

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

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

<210> 58

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

[0027]

<400> 58

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

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190
 Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205
 Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
 225 230 235 240
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 290 295 300
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 305 310 315 320
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
 325 330 335
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Glu Val Tyr Thr
 340 345 350
 [0028] Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 355 360 365
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 370 375 380
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 385 390 395 400
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 405 410 415
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 420 425 430
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

 <210> 59
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 59
 Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser

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

[0029]

<210> 60
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成构建体
 <400> 60
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

[0030]

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly			
100	105	110	
Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe			
115	120	125	
Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu			
130	135	140	
Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp			
145	150	155	160
Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu			
165	170	175	
Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser			
180	185	190	
Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro			
195	200	205	
Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys			
210	215	220	
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro			
225	230	235	240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser			
245	250	255	
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp			
260	265	270	
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn			
275	280	285	
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val			
290	295	300	
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu			
305	310	315	320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys			
325	330	335	
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr			
340	345	350	
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr			
355	360	365	
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu			
370	375	380	
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu			
385	390	395	400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys			
405	410	415	
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu			
420	425	430	
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
435	440	445	

<210> 61

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成构建体

<400> 61

Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

[0031] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn

85 90 95

Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln

145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser

165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu

180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser

195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

210 215

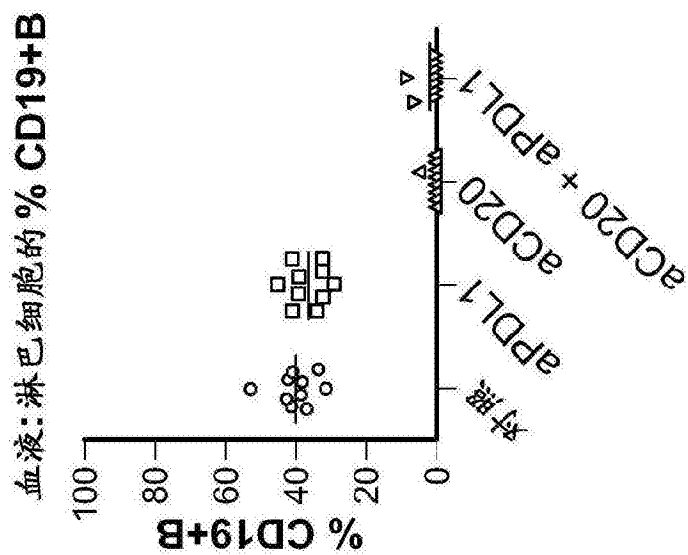


图1A

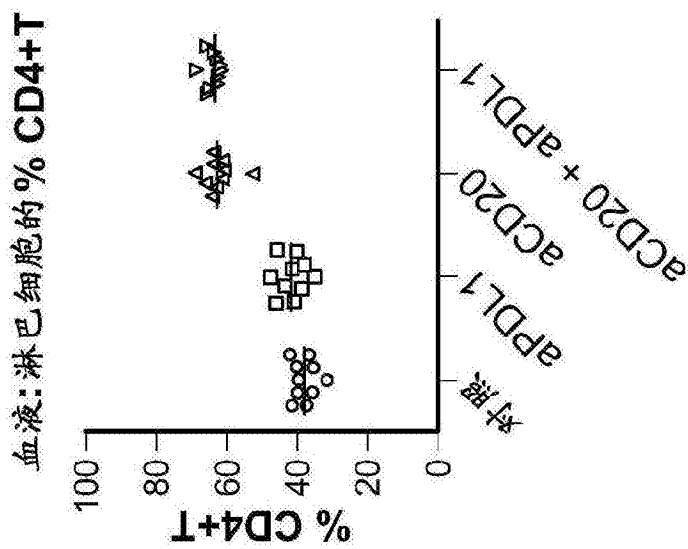


图1B

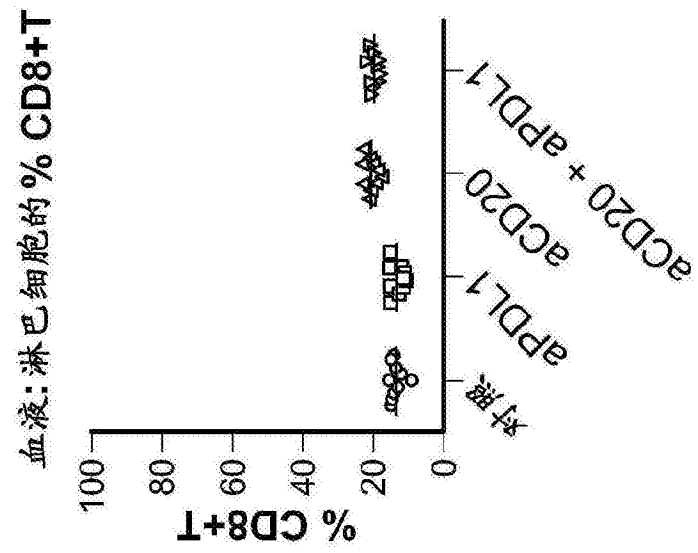


图1C

13-1366 B: PD-L1; A20
原始肿瘤体积和 LME 拟合肿瘤体积

1=——该组的使用三次样条拟合的肿瘤体积
2=——对照组的三次样条拟合
3=-----处于 32mm^3 的肿瘤体积表明肿瘤可见但太小而不能准确测量
4=-----进展体积的参考

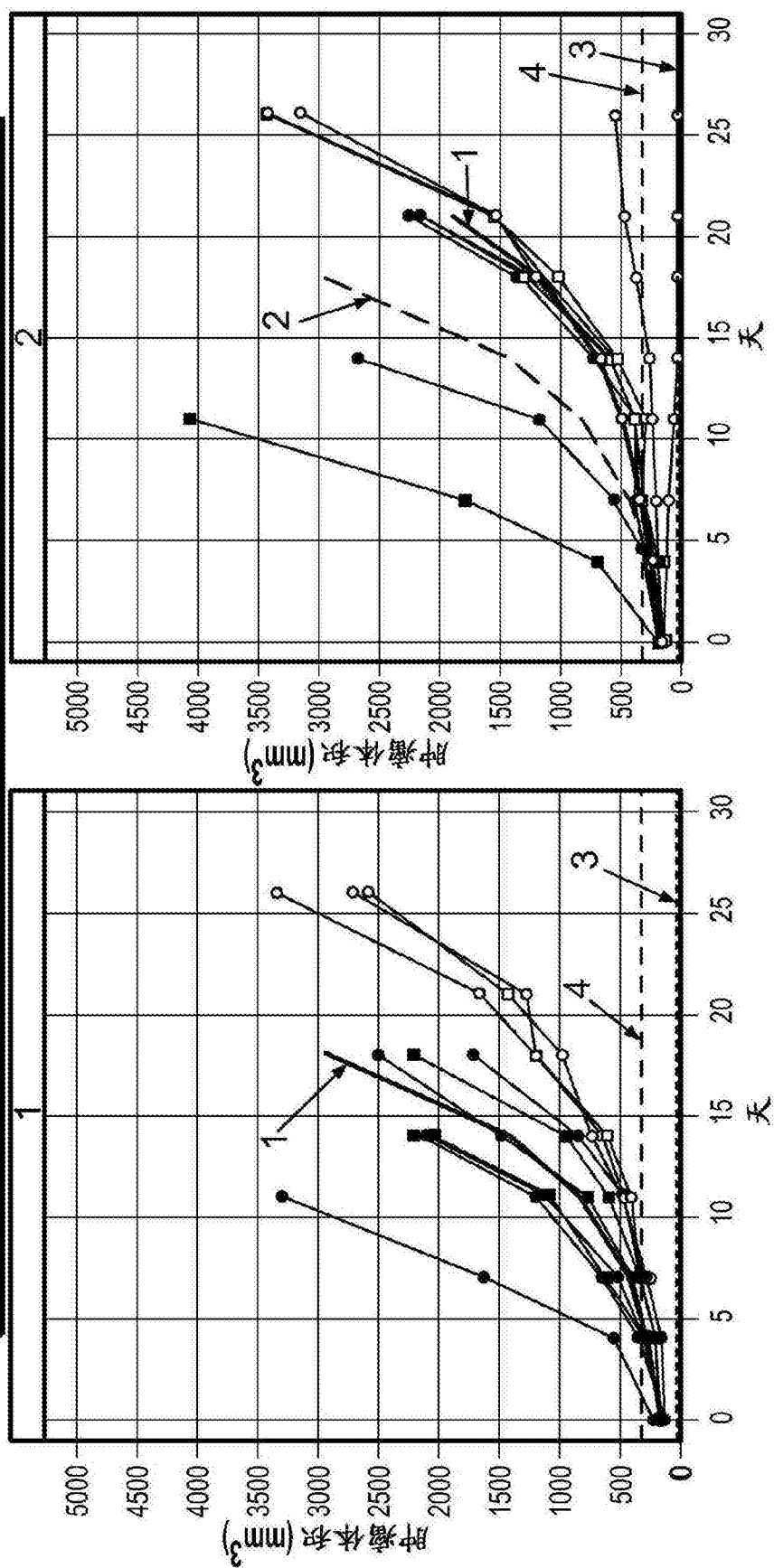


图2

13-1366 B: PD-L1: A20
原始肿瘤体积和 LME 拟合肿瘤体积

- 1=——该组的使用三次样条拟合的拟合肿瘤体积
2=——对照组的三次样条拟合
3=-----处于 32mm³ 的肿瘤体积表明肿瘤可见但太小而不能准确测量
4=-----进展体积的参考

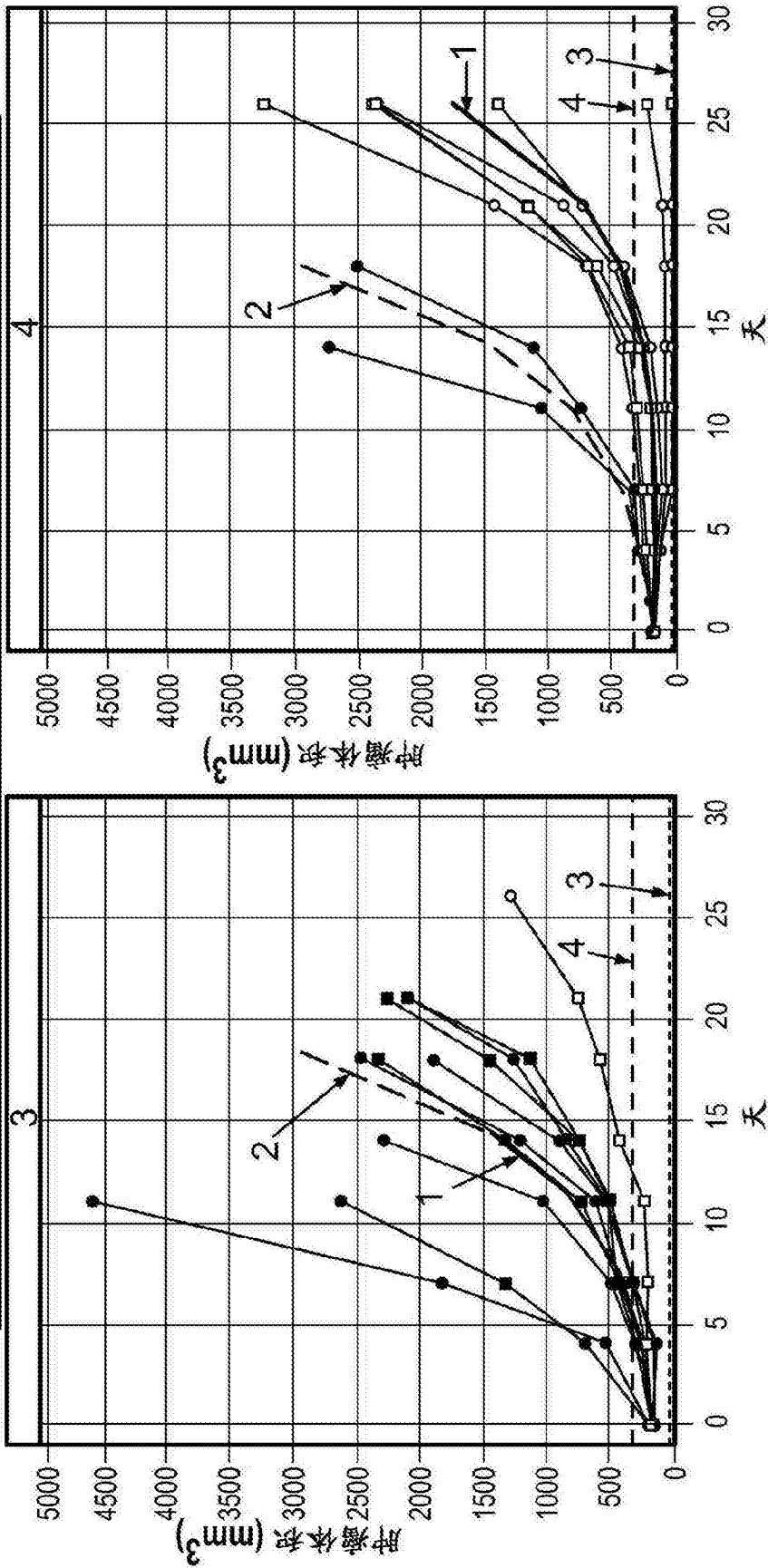


图2(续)

13-1366: PD-L1 ; A20 pGCMV CD20 EGFP#11 3B8

原始肿瘤体积和 LME 拟合肿瘤体积

- 1=——该组的使用三次样条拟合的拟合肿瘤体积
- 2=——对照组的三次样条拟合
- 3=-----处于 32mm³ 的肿瘤体积表明肿瘤可见但太小而不能准确测量
- 4=----进展体积的参考

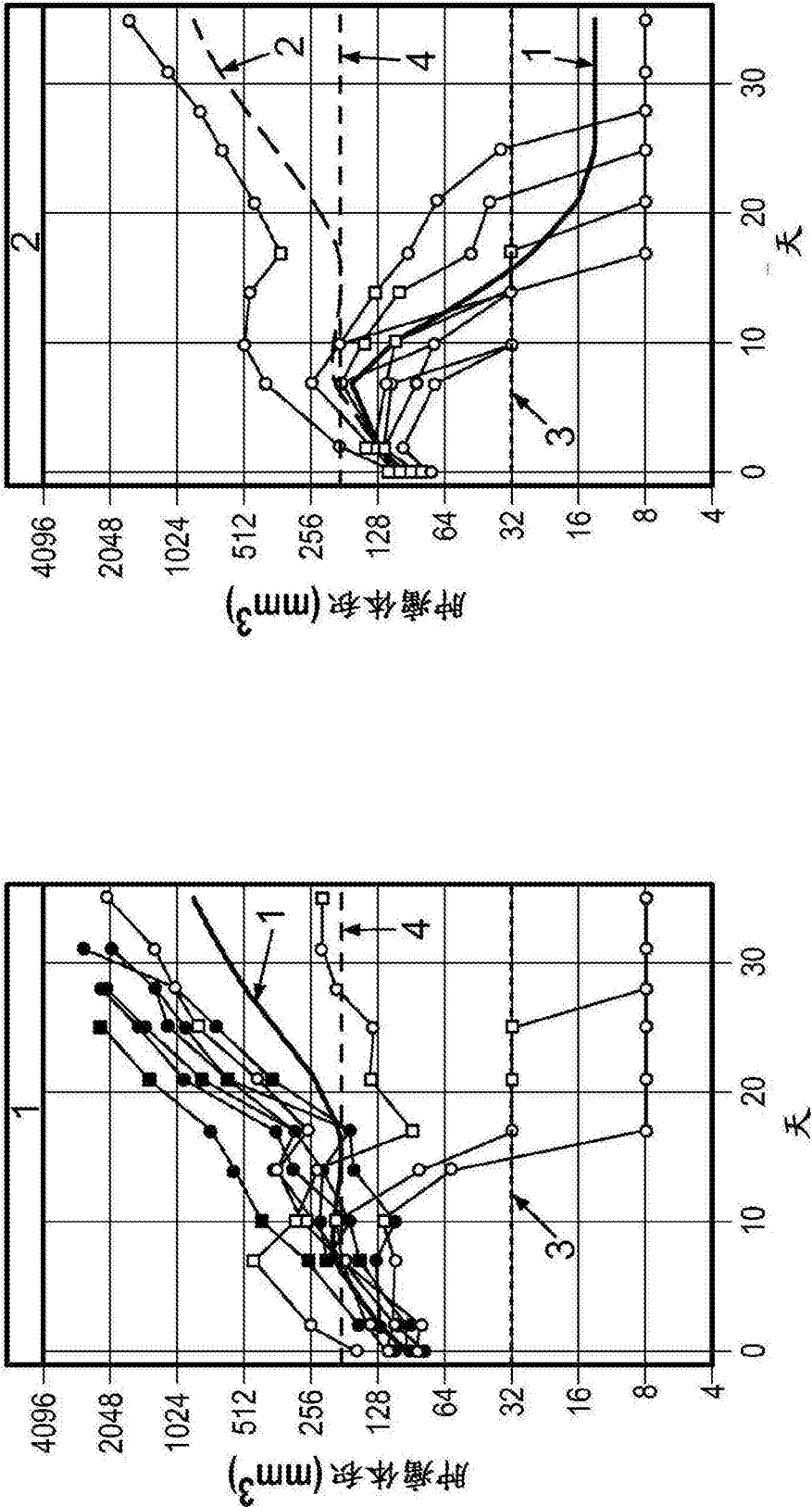


图3

13-1366: PD-L1 ; A20 pGCMV CD20 EGFP#11 3B8
原始肿瘤体积和 LME 拟合肿瘤体积

- 1= 该组的使用三次样条拟合的拟合肿瘤体积
2= 对照组的三次样条拟合
3= 处于 32mm³ 的肿瘤体积表明肿瘤可见但太小而不能准确测量
4= 进展体积的参考

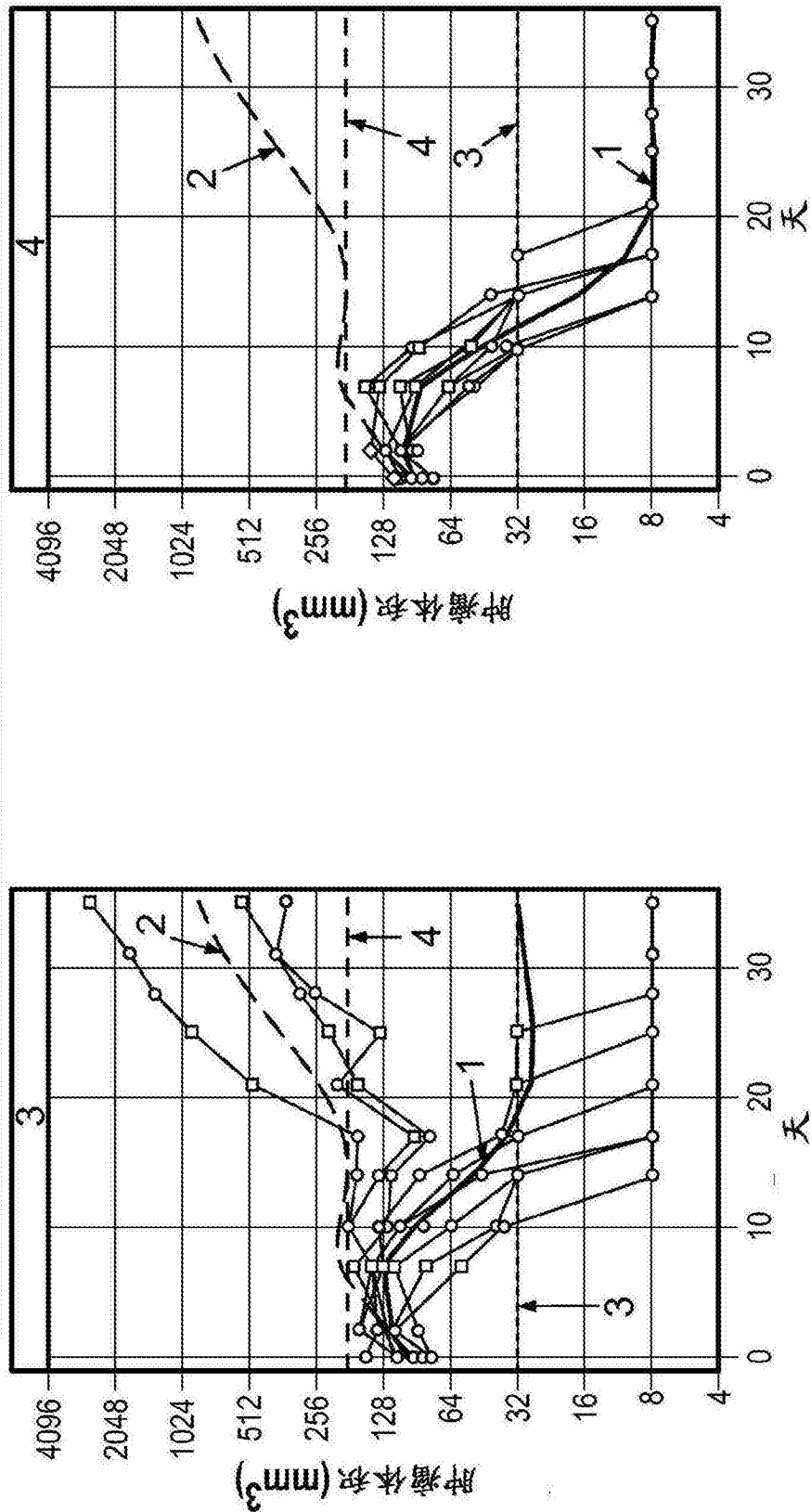


图3(续)

13-1366: PD-L1 ; A20 pGCMV CD20 EGFP#11 3B8
原始肿瘤体积和 LME 拟合肿瘤体积

- 1= 该组的使用三次样条拟合的拟合肿瘤体积
2= 对照组的三次样条拟合
3= 处于 32mm^3 的肿瘤体积表明肿瘤可见但太小而不能准确测量
4= 进展体积的参考

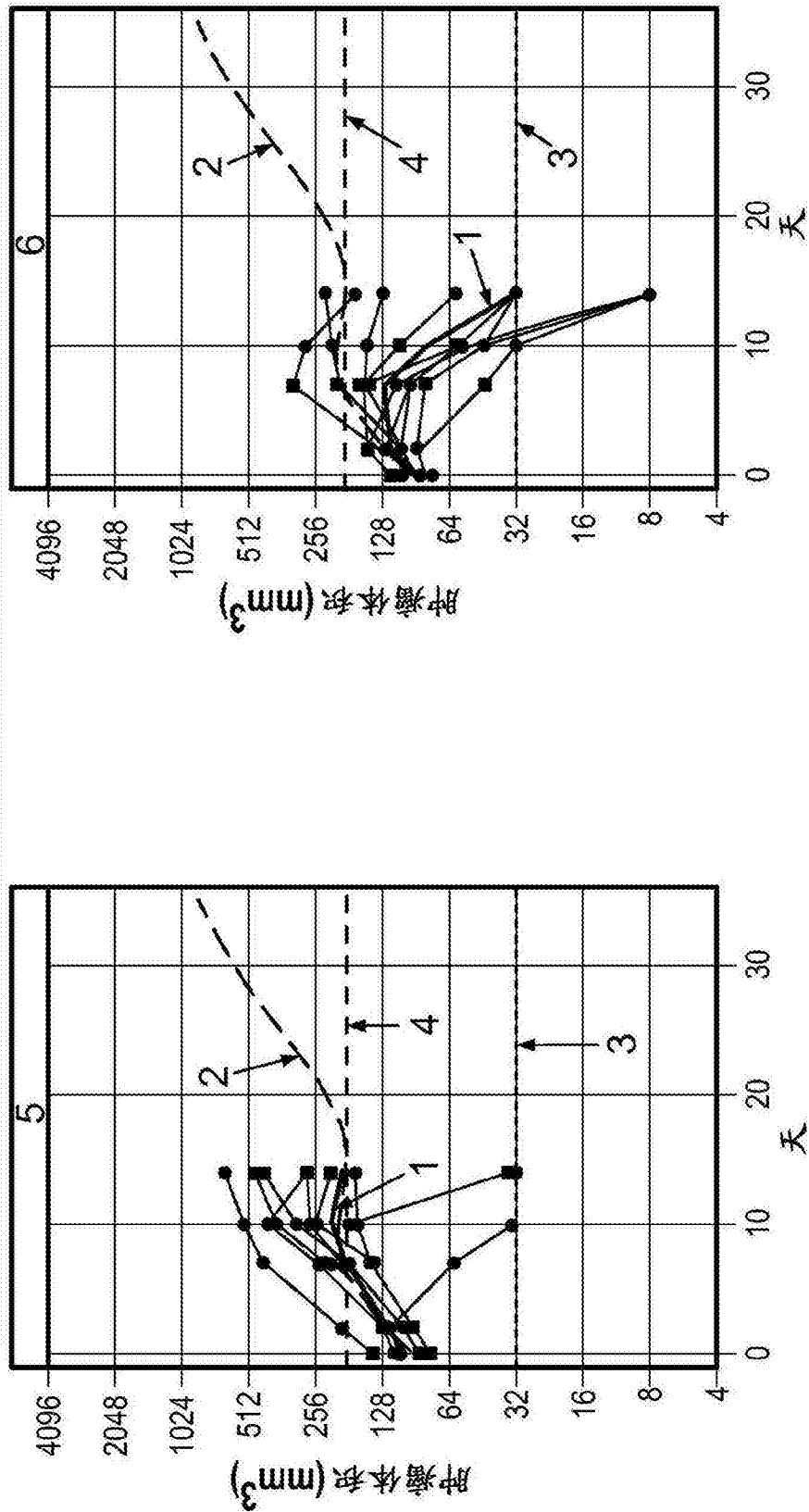


图3(续)