



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 106604933 B

(45) 授权公告日 2021.08.10

(21) 申请号 201580047724.4
(22) 申请日 2015.05.29
(65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 106604933 A
(43) 申请公布日 2017.04.26
(30) 优先权数据
 62/023,741 2014.07.11 US
(85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2017.03.06
(86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/US2015/033395 2015.05.29
(87) PCT国际申请的公布数据
 W02016/007235 EN 2016.01.14
(73) 专利权人 文塔纳医疗系统公司
 地址 美国亚利桑那州
(72) 发明人 B·维纳普萨 Z·廖
 M·科万尼茨 Z·博伊德
 H·克彭 P·C·罗奇 Y·朱
(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
 代理人 岑晓东

(51) Int.Cl.
 C07K 16/28 (2006.01)
 C12N 15/13 (2006.01)
 G01N 33/574 (2006.01)
(56) 对比文件
 CN 101248089 A, 2008.08.20
 WO 2013173233 A1, 2013.11.21
 孙静. 鼠抗人PD-L1单克隆抗体的研制及其生物学功能的研究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫生科技辑》.2006,E059-242.
 Suzanne L Topalian, et al..Targeting the PD-1/B7-H1 (PD-L1) pathway to activate anti-tumor immunity.《Current Opinion in Immunology 》.2012,第24卷第207-212页.
 Sznol M, et al..Antagonist antibodies to PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of advanced human cancer..《Clin Cancer Res.》.2013,第19卷(第5期),1021-1034.

审查员 夏文静

权利要求书4页 说明书54页
 序列表7页 附图14页

(54) 发明名称
 抗PD-L1抗体及其诊断用途
(57) 摘要
 本发明提供程序性死亡配体1 (PD-L1) 抗体及其使用方法。

1. 一种特异性地结合PD-L1的分离抗体,其中所述抗体包含以下高变区(HVR):
 - (a) HVR-H1,其如SNGLT (SEQ ID NO:2)的氨基酸序列所示;
 - (b) HVR-H2,其如TINKDASAYYASWAKG (SEQ ID NO:3)的氨基酸序列所示;
 - (c) HVR-H3,其如IAFKTGTSI (SEQ ID NO:4)的氨基酸序列所示;
 - (d) HVR-L1,其如QASESVYSNNYLS (SEQ ID NO:9)的氨基酸序列所示;
 - (e) HVR-L2,其如LASTLAS (SEQ ID NO:10)的氨基酸序列所示;以及
 - (f) HVR-L3,其如IGGKSSSTDGNA (SEQ ID NO:11)的氨基酸序列所示。
2. 如权利要求1所述的抗体,其还包含以下重链可变域(VH)框架区(FR):
 - (a) FR-H1,其如QSLEESGGRLVKPDETLTITCTVSGIDLS (SEQ ID NO:5)的氨基酸序列所示;
 - (b) FR-H2,其如WVRQAPGEGLWIG (SEQ ID NO:6)的氨基酸序列所示;
 - (c) FR-H3,其如RLTISKPSSTKVDLKITSPTTEDTATYFCGR (SEQ ID NO:7)的氨基酸序列所示;以及
 - (d) FR-H4,其如WPGGTLVTVSS (SEQ ID NO:8)的氨基酸序列所示。
3. 如权利要求2所述的抗体,其包含SEQ ID NO:16的VH序列。
4. 如权利要求1所述的抗体,其还包含以下轻链可变域(VL)FR:
 - (a) FR-L1,其如AIVMTQTPSPVSAAVGGTVTINC (SEQ ID NO:12)的氨基酸序列所示;
 - (b) FR-L2,其如WFQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO:13)的氨基酸序列所示;
 - (c) FR-L3,其如GVPSRFKSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYC (SEQ ID NO:14)的氨基酸序列所示;以及
 - (d) FR-L4,其如FGGGTEVVVR (SEQ ID NO:15)的氨基酸序列所示。
5. 如权利要求4所述的抗体,其包含SEQ ID NO:17的VL序列。
6. 如权利要求1所述的抗体,其包含:(a) VH序列,其与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少95%序列同一性;(b) VL序列,其与SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有至少95%序列同一性;或(c)如(a)中的VH序列,和如(b)中的VL序列。
7. 如权利要求1所述的抗体,其中所述抗体包含SEQ ID NO:16的VH序列和SEQ ID NO:17的VL序列。
8. 如权利要求1所述的抗体,其中所述抗体结合到包含如SEQ ID NO:1所示的人PD-L1多肽的氨基酸残基279-290的表位。
9. 如权利要求1所述的抗体,其中所述抗体为单克隆抗体。
10. 如权利要求9所述的抗体,其中所述单克隆抗体为兔单克隆抗体。
11. 如权利要求1所述的抗体,其中所述抗体为IgG抗体。
12. 如权利要求1所述的抗体,其中所述抗体为特异性地结合PD-L1的抗体片段,其中所述抗体片段为Fab、单链可变片段(scFv)、Fv、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂或双抗体。
13. 一种分离核酸,其编码如权利要求1-12中任一项所述的分离抗体。
14. 一种载体,其包含如权利要求13所述的核酸。
15. 一种宿主细胞,其包含如权利要求14所述的载体。
16. 一种免疫缀合物,其包含如权利要求1-12中任一项所述的抗体。
17. 如权利要求1-12中任一项所述的抗体,其用于检测生物样品中PD-L1的存在或表达水平。

18. 如权利要求17所述用途的抗体,其中所述检测通过免疫组织化学(IHC)、免疫荧光(IF)、流式细胞术、酶联免疫吸附测定(ELISA)或免疫印迹进行。

19. 如权利要求18所述用途的抗体,其中所述检测通过IHC进行。

20. 如权利要求17所述用途的抗体,其中所述样品包含固定组织。

21. 如权利要求20所述用途的抗体,其中所述固定组织为福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)组织。

22. 如权利要求17所述用途的抗体,其中所述样品来自患有癌症或免疫功能失调或者处于其风险下的受试者。

23. 如权利要求22所述用途的抗体,其中所述免疫功能失调为T细胞功能失调性病症。

24. 如权利要求23所述用途的抗体,其中所述T细胞功能失调性病症为未解决的急性感染、慢性感染或肿瘤免疫。

25. 如权利要求1-12中任一项所述的抗体制造供一种检测来自受试者的生物样品中PD-L1的存在或表达水平的方法使用的试剂或试剂盒的用途,其中所述方法包括使所述生物样品与如权利要求1-12中任一项所述的抗体接触,并且检测结合的抗体的存在。

26. 如权利要求25所述的用途,其中所述检测通过IHC、IF、流式细胞术、ELISA或免疫印迹进行。

27. 如权利要求26所述的用途,其中所述检测通过IHC进行。

28. 如权利要求25所述的用途,其中所述样品包含固定组织。

29. 如权利要求28所述的用途,其中所述固定组织为FFPE组织。

30. 如权利要求25所述的用途,其中所述样品来自患有癌症或免疫功能失调或者处于其风险下的受试者。

31. 如权利要求30所述的用途,其中所述免疫功能失调为T细胞功能失调性病症。

32. 如权利要求31所述的用途,其中所述T细胞功能失调性病症为未解决的急性感染、慢性感染或肿瘤免疫。

33. 如权利要求30所述的用途,其中所述样品来自患有癌症的受试者。

34. 如权利要求25所述的用途,其中所述样品中PD-L1的存在或表达水平指示所述受试者可能响应于用抗癌疗法进行的治疗。

35. 如权利要求25所述的用途,其中所述样品中PD-L1的存在或表达水平指示所述受试者更可能响应于用抗癌疗法进行的治疗。

36. 如权利要求25所述的用途,其中所述样品中PD-L1的存在或表达水平指示所述受试者将展现出来自用抗癌疗法进行的治疗的益处可能性。

37. 如权利要求33所述的用途,其中所述方法还包括基于所述样品中PD-L1的存在或表达水平选择用于所述受试者的抗癌疗法。

38. 如权利要求33所述的用途,其中所述方法还包括向所述受试者施用治疗有效量的抗癌疗法。

39. 如权利要求33所述的用途,其中所述癌症为非小细胞肺癌、鳞状细胞癌、小细胞肺癌、腹膜癌、胃肠癌、胰腺癌、神经胶质瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、乳腺癌、子宫癌、唾液腺癌、肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、白血病或头颈癌。

40. 如权利要求39所述的用途,其中所述癌症为非小细胞肺癌。

41. 如权利要求40所述的用途,其中所述非小细胞肺癌为肺腺癌或肺鳞状癌。
42. 如权利要求39所述的用途,其中所述肝癌为肝细胞癌。
43. 如权利要求39所述的用途,其中所述肝癌为肝细胞瘤。
44. 如权利要求39所述的用途,其中所述肝癌为肝的癌瘤。
45. 如权利要求39所述的用途,其中所述胃肠癌为结肠癌。
46. 如权利要求39所述的用途,其中所述胃肠癌为结肠直肠癌。
47. 如权利要求39所述的用途,其中所述子宫癌为子宫内膜癌。
48. 如权利要求33所述的用途,其中所述样品为肿瘤样品。
49. 如权利要求48所述的用途,其中所述肿瘤样品包含肿瘤浸润性免疫细胞、肿瘤细胞、基质细胞或其任何组合。
50. 如权利要求49所述的用途,其中所述肿瘤样品在肿瘤浸润性免疫细胞中具有可检测的PD-L1表达水平,所述肿瘤浸润性免疫细胞的面积占所述肿瘤样品的约1%或更多。
51. 如权利要求50所述的用途,其中所述肿瘤样品在肿瘤浸润性免疫细胞中具有可检测的PD-L1表达水平,所述肿瘤浸润性免疫细胞的面积占所述肿瘤样品的约5%或更多。
52. 如权利要求51所述的用途,其中所述肿瘤样品在肿瘤浸润性免疫细胞中具有可检测的PD-L1表达水平,所述肿瘤浸润性免疫细胞的面积占所述肿瘤样品的约10%或更多。
53. 如权利要求48所述的用途,其中所述肿瘤样品在所述肿瘤样品中的约1%或更多所述肿瘤细胞中具有可检测的PD-L1表达水平。
54. 如权利要求53所述的用途,其中所述肿瘤样品在所述肿瘤样品中的约5%或更多所述肿瘤细胞中具有可检测的PD-L1表达水平。
55. 如权利要求54所述的用途,其中所述肿瘤样品在所述肿瘤样品中的约10%或更多所述肿瘤细胞中具有可检测的PD-L1表达水平。
56. 如权利要求55所述的用途,其中所述肿瘤样品在所述肿瘤样品中的约50%或更多所述肿瘤细胞中具有可检测的PD-L1表达水平。
57. 如权利要求38所述的用途,其中所述抗癌疗法包括PD-1轴结合拮抗剂。
58. 如权利要求57所述的用途,其中所述PD-1轴结合拮抗剂为PD-L1结合拮抗剂、PD-1结合拮抗剂或PD-L2结合拮抗剂。
59. 如权利要求58所述的用途,其中所述PD-1轴结合拮抗剂为PD-L1结合拮抗剂。
60. 如权利要求59所述的用途,其中所述PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与其配体结合配偶体中的一种或多种的结合。
61. 如权利要求60所述的用途,其中所述PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与PD-1的结合。
62. 如权利要求60所述的用途,其中所述PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与B7-1的结合。
63. 如权利要求60所述的用途,其中所述PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与PD-1和B7-1两者的结合。
64. 如权利要求59所述的用途,其中所述PD-L1结合拮抗剂为抗体。
65. 如权利要求64所述的用途,其中所述抗体为阿特珠单抗、MDX-1105和MEDI4736(德瓦鲁单抗)或MSB0010718C(avelumab)。
66. 如权利要求58所述的用途,其中所述PD-1轴结合拮抗剂为PD-1结合拮抗剂。
67. 如权利要求66所述的用途,其中所述PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与其配体结合配偶

体中的一种或多种的结合。

68. 如权利要求67所述的用途,其中所述PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD-L1的结合。

69. 如权利要求67所述的用途,其中所述PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD-L2的结合。

70. 如权利要求67所述的用途,其中所述PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD-L1和PD-L2两者的结合。

71. 如权利要求66所述的用途,其中所述PD-1结合拮抗剂为抗体。

72. 如权利要求71所述的用途,其中所述抗体为MDX 1106 (纳武单抗)、MK-3475 (派姆单抗)、MEDI-0680 (AMP-514)、PDR001、REGN2810或BGB-108。

73. 如权利要求66所述的用途,其中所述PD-1结合拮抗剂为Fc融合蛋白。

74. 如权利要求73所述的用途,其中所述Fc融合蛋白为AMP-224。

75. 如权利要求38所述的用途,其中所述方法还包括向患者施用有效量的第二治疗剂。

76. 如权利要求75所述的用途,其中所述第二治疗剂为细胞毒性剂、生长抑制剂、辐射治疗剂、抗血管生成剂或其组合。

77. 如权利要求25所述的用途,其中所述受试者为人。

78. 如权利要求1-12中任一项所述的抗体制造供一种预测患有癌症的受试者对用包括PD-1轴结合拮抗剂的抗癌疗法进行的治疗的应答性的方法使用的试剂或试剂盒的用途,其中所述方法包括:

通过使肿瘤样品与抗PD-L1抗体接触并检测结合的抗体的存在来确定获自受试者的肿瘤样品中PD-L1的存在或表达水平,其中样品中PD-L1的存在或表达水平指示受试者更可能响应于用包括PD-1轴结合拮抗剂的抗癌疗法进行的治疗,且其中所述抗PD-L1抗体包含以下HVR:

(a) HVR-H1,其如SNGLT (SEQ ID NO:2)的氨基酸序列所示;

(b) HVR-H2,其如TINKDASAYYASWAKG (SEQ ID NO:3)的氨基酸序列所示;

(c) HVR-H3,其如IAFKTGTSI (SEQ ID NO:4)的氨基酸序列所示;

(d) HVR-L1,其如QASESVYSNNYLS (SEQ ID NO:9)的氨基酸序列所示;

(e) HVR-L2,其如LASTLAS (SEQ ID NO:10)的氨基酸序列所示;以及

(f) HVR-L3,其如IGGKSSSTDGNA (SEQ ID NO:11)的氨基酸序列所示。

79. 如权利要求1-12中任一项所述的抗体制造供一种选择用于患有癌症的受试者的包括PD-1轴结合拮抗剂的抗癌疗法的方法使用的试剂或试剂盒的用途,其中所述方法包括:

通过使肿瘤样品与抗PD-L1抗体接触并检测结合的抗体的存在来确定获自受试者的肿瘤样品中PD-L1的存在或表达水平,其中所述抗PD-L1抗体包含以下HVR:

(a) HVR-H1,其如SNGLT (SEQ ID NO:2)的氨基酸序列所示;

(b) HVR-H2,其如TINKDASAYYASWAKG (SEQ ID NO:3)的氨基酸序列所示;

(c) HVR-H3,其如IAFKTGTSI (SEQ ID NO:4)的氨基酸序列所示;

(d) HVR-L1,其如QASESVYSNNYLS (SEQ ID NO:9)的氨基酸序列所示;

(e) HVR-L2,其如LASTLAS (SEQ ID NO:10)的氨基酸序列所示;以及

(f) HVR-L3,其如IGGKSSSTDGNA (SEQ ID NO:11)的氨基酸序列所示;以及

基于肿瘤样品中PD-L1的存在或表达水平选择用于受试者的包括PD-1轴结合拮抗剂的抗癌疗法。

抗PD-L1抗体及其诊断用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2014年7月11日提交的美国临时申请号62/023,741的提交日期的权益,所述申请的公开内容以引用的方式整体并入本文。

发明领域

[0003] 本发明涉及抗程序性死亡配体1 (PD-L1) 抗体及其使用方法。

[0004] 背景

[0005] 程序性死亡配体1 (PD-L1) 是一直涉及在慢性感染、妊娠、组织同种异体移植、自身免疫性疾病和癌症期间抑制免疫系统应答的蛋白质。PD-L1通过结合到被称为程序性死亡1 (PD-1) 的抑制性受体来调节免疫应答,所述程序性死亡1表达于T细胞、B细胞和单核细胞的表面上。PD-L1还通过与另一种受体B7.1 (也称为B7-1或CD80) 的相互作用负调节T细胞功能。PD-L1/PD-1和PD-L1/B7.1复合物的形成负调节T细胞受体信号传导,导致随后的T细胞活化的下调和抗肿瘤免疫活性的抑制。PD-L1在许多癌症中过表达,所述癌症包括多种多样的实体瘤,诸如膀胱肿瘤、乳腺肿瘤、结肠肿瘤、肺肿瘤、黑色素瘤、卵巢肿瘤、唾液肿瘤、胃肿瘤和甲状腺肿瘤。肿瘤细胞中的PD-L1过表达可促进肿瘤侵袭,并且常常与不良预后相关。

[0006] 考虑到PD-L1在癌症发展和免疫系统调节中的作用,期望检测例如用于诊断和/或患者选择的PD-L1的存在的另外工具。

[0007] 概述

[0008] 本发明涉及抗程序性死亡配体1 (PD-L1) 抗体及其使用方法。

[0009] 在一个方面,本发明的特征在于特异性地结合到PD-L1的分离抗体,其中所述抗体结合到包含人PD-L1多肽 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸残基279-290的表位。在一些实施方案中,所述抗体包含以下高变区 (HVR): (a) HVR-H1,其包含SNGLT (SEQ ID NO:2) 的氨基酸序列; (b) HVR-H2,其包含TINKDASAYYASWAKG (SEQ ID NO:3) 的氨基酸序列;以及 (c) HVR-H3,其包含IAFKTGTSTI (SEQ ID NO:4) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗体还包含以下重链可变域框架区 (FR): (a) FR-H1,其包含QSLEESGGRLVKPDETLTITCTVSGIDLS (SEQ ID NO:5) 的氨基酸序列; (b) FR-H2,其包含WVRQAPGEGLEWIG (SEQ ID NO:6) 的氨基酸序列; (c) FR-H3,其包含RLTISKPSSTKVDLKITSPPTEDTATYFCGR (SEQ ID NO:7) 的氨基酸序列;以及 (d) FR-H4,其包含WGPGTLTVTVSS (SEQ ID NO:8) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗体还包含以下HVR: (a) HVR-L1,其包含QASESVYSNNYLS (SEQ ID NO:9) 的氨基酸序列; (b) HVR-L2,其包含LASTLAS (SEQ ID NO:10) 的氨基酸序列;以及 (c) HVR-L3,其包含IGGKSSSTDGNA (SEQ ID NO:11) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗体还包含以下轻链可变域FR: (a) FR-L1,其包含AIVMTQTPSPVSAAVGGTVTINC (SEQ ID NO:12) 的氨基酸序列; (b) FR-L2,其包含WFQQKPGQPPLLIIY (SEQ ID NO:13) 的氨基酸序列; (c) FR-L3,其包含GVPSRFKSGSGTQFTLTI SGVQCDDAATYYC (SEQ ID NO:14) 的氨基酸序列;以及 (d) FR-L4,其包含FGGGTEVVVR (SEQ ID NO:15) 的氨基酸序列。在一些实施方案中,所述抗体包含: (a) VH序列,其与SEQ ID NO:16的

氨基酸序列具有至少95%序列同一性；(b) VL序列，其与SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有至少95%序列同一性；或(c) 如(a)中的VH序列，和如(b)中的VL序列。在一些实施方案中，所述抗体包含SEQ ID NO:16的VH序列。在一些实施方案中，所述抗体包含SEQ ID NO:17的VL序列。

[0010] 在其他实施方案中，所述抗体包含以下HVR：(a) HVR-L1，其包含QASESVYSNNYLS (SEQ ID NO:9)的氨基酸序列；(b) HVR-L2，其包含LASTLAS (SEQ ID NO:10)的氨基酸序列；以及(c) HVR-L3，其包含IGGKSSSTDGNA (SEQ ID NO:11)的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述抗体还包含以下轻链可变域FR：(a) FR-L1，其包含AIVMTQTPSPVSAAVGGTIVTINC (SEQ ID NO:12)的氨基酸序列；(b) FR-L2，其包含WFQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO:13)的氨基酸序列；(c) FR-L3，其包含GVPSRFKSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYC (SEQ ID NO:14)的氨基酸序列；以及(d) FR-L4，其包含FGGGTEVVVR (SEQ ID NO:15)的氨基酸序列。

[0011] 在另一个方面，本发明的特征在于特异性地结合PD-L1的分离抗体，其中所述抗体包含以下HVR：(a) HVR-H1，其包含SNGLT (SEQ ID NO:2)的氨基酸序列；(b) HVR-H2，其包含TINKDASAYYASWAKG (SEQ ID NO:3)的氨基酸序列；(c) HVR-H3，其包含IAFKTGTSI (SEQ ID NO:4)的氨基酸序列；(d) HVR-L1，其包含QASESVYSNNYLS (SEQ ID NO:9)的氨基酸序列；(e) HVR-L2，其包含LASTLAS (SEQ ID NO:10)的氨基酸序列；以及(f) HVR-L3，其包含IGGKSSSTDGNA (SEQ ID NO:11)的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述抗体还包含以下重链可变域和轻链可变域FR：(a) FR-H1，其包含QSLEESGGRVLPDETITCTVSGIDLS (SEQ ID NO:5)的氨基酸序列；(b) FR-H2，其包含WVRQAPGEGLEWIG (SEQ ID NO:6)的氨基酸序列；(c) FR-H3，其包含RLTISKPSSTKVDLKITSPPTEDTATYFCGR (SEQ ID NO:7)的氨基酸序列；(d) FR-H4，其包含WPGTLVTVSS (SEQ ID NO:8)的氨基酸序列；(e) FR-L1，其包含AIVMTQTPSPVSAAVGGTIVTINC (SEQ ID NO:12)的氨基酸序列；(f) FR-L2，其包含WFQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO:13)的氨基酸序列；(g) FR-L3，其包含GVPSRFKSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYC (SEQ ID NO:14)的氨基酸序列；以及(h) FR-L4，其包含FGGGTEVVVR (SEQ ID NO:15)的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述抗体包含SEQ ID NO:16的VH序列和SEQ ID NO:17的VL序列。

[0012] 在另一个方面，本发明的特征在于与前述抗体中的任一种竞争结合到PD-L1的分离抗体。

[0013] 在另一个方面，本发明的特征在于与前述抗体中的任一种结合到相同的表位的分离抗体。

[0014] 在一些实施方案中，前述抗体中的任一种可为单克隆抗体。在一些实施方案中，所述单克隆抗体可为兔单克隆抗体。

[0015] 在一些实施方案中，前述抗体中的任一种可为IgG抗体(例如，IgG1抗体)。

[0016] 在一些实施方案中，前述抗体中的任一种可为特异性地结合PD-L1的抗体片段。在一些实施方案中，所述抗体片段选自由以下组成的组：Fab、单链可变片段(scFv)、Fv、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂和双抗体。

[0017] 在另一个方面，本发明的特征在于包含前述抗体中的任一种的免疫缀合物。

[0018] 在另一个方面，本发明的特征在于编码本文描述的抗体中的任一种的分离核酸。在另一个方面，本发明的特征在于包含用于表达所述抗体的核酸的载体(例如，表达载体)。

在另一个方面,本发明的特征在于包含前述核酸和/或载体的宿主细胞。

[0019] 在一些方面,前述抗体中的任一种可用于检测生物样品中PD-L1的存在或表达水平。在一些实施方案中,检测通过免疫组织化学(IHC)、免疫荧光(IF)、流式细胞术、ELISA或免疫印迹进行。在一些实施方案中,检测通过IHC进行。在一些实施方案中,所述样品包含固定组织。在一些实施方案中,所述固定组织为福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)组织。在一些实施方案中,所述样品来自患有癌症或免疫功能失调或者处于其风险下的受试者。在一些实施方案中,所述免疫功能失调为T细胞功能失调性病症。在一些实施方案中,所述T细胞功能失调性病症为未解决的急性感染、慢性感染或肿瘤免疫。

[0020] 本发明的又一个方面为检测生物样品中PD-L1的存在或表达水平的方法,所述方法包括使所述生物样品与前述抗体中的任一种接触,并且检测结合的抗体的存在。在一些实施方案中,检测通过IHC、IF、流式细胞术、ELISA或免疫印迹进行。在一些实施方案中,检测通过IHC进行。在一些实施方案中,所述样品包含固定组织。在一些实施方案中,所述固定组织为FFPE组织。在一些实施方案中,所述样品来自患有癌症或免疫功能失调或者处于其风险下的受试者。在一些实施方案中,所述免疫功能失调为T细胞功能失调性病症。在一些实施方案中,所述T细胞功能失调性病症为未解决的急性感染、慢性感染或肿瘤免疫。在一些实施方案中,所述样品来自患有癌症的受试者。在一些实施方案中,所述样品中PD-L1的存在或表达水平指示所述受试者可能响应于用抗癌疗法进行的治疗。在一些实施方案中,所述样品中PD-L1的存在或表达水平指示所述受试者更可能响应于用抗癌疗法进行的治疗。在一些实施方案中,所述样品中PD-L1的存在或表达水平指示所述受试者将展现出来自用抗癌疗法进行的治疗的益处可能性。在一些实施方案中,所述方法还包括基于所述样品中PD-L1的存在或表达水平选择用于所述受试者的抗癌疗法。在一些实施方案中,所述方法还包括向受试者施用治疗有效量的抗癌疗法。在一些实施方案中,所述癌症选自以下组成的组:非小细胞肺癌、鳞状细胞癌、小细胞肺癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胰腺癌、神经胶质瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌(liver cancer)、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、唾液腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌(hepatic carcinoma)、白血病和头颈癌。在一些实施方案中,所述癌症为非小细胞肺癌(NSCLC)。在一些实施方案中,所述NSCLC为肺腺癌或肺鳞状癌。在一些实施方案中,所述样品为肿瘤样品。在一些实施方案中,所述肿瘤样品包含肿瘤浸润性免疫细胞、肿瘤细胞、基质细胞或其任何组合。在一些实施方案中,所述肿瘤样品在肿瘤浸润性免疫细胞中具有可检测的PD-L1表达水平,所述肿瘤浸润性免疫细胞的面积占所述肿瘤样品的约1%或更多。在一些实施方案中,所述肿瘤样品在肿瘤浸润性免疫细胞中具有可检测的PD-L1表达水平,所述肿瘤浸润性免疫细胞的面积占所述肿瘤样品的约5%或更多。在一些实施方案中,所述肿瘤样品在肿瘤浸润性免疫细胞中具有可检测的PD-L1表达水平,所述肿瘤浸润性免疫细胞的面积占所述肿瘤样品的约10%或更多。在一些实施方案中,所述肿瘤样品在所述肿瘤样品中的约1%或更多所述肿瘤细胞中具有可检测的PD-L1表达水平。在一些实施方案中,所述肿瘤样品在所述肿瘤样品中的约5%或更多所述肿瘤细胞中具有可检测的PD-L1表达水平。在一些实施方案中,所述肿瘤样品在所述肿瘤样品中的约10%或更多所述肿瘤细胞中具有可检测的PD-L1表达水平。在一些实施方案中,抗癌疗法包括PD-1轴结合拮抗剂。在一些实施方案中,所述PD-1轴结合拮抗剂选自以下组成的组:PD-L1结合拮抗剂、PD-1结

合拮抗剂和PD-L2结合拮抗剂。在一些实施方案中,所述PD-1轴结合拮抗剂为PD-L1结合拮抗剂。在一些实施方案中,所述PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与其配体结合配偶体中的一种或多种的结合。在一些实施方案中,所述PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与PD-1的结合。在一些实施方案中,所述PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与B7-1的结合。在一些实施方案中,所述PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与PD-1和B7-1两者的结合。在一些实施方案中,所述PD-L1结合拮抗剂为抗体。在一些实施方案中,所述抗体选自由以下组成的组:YW243.55.S70、MPDL3280A(阿特殊单抗(atezolizumab))、MDX-1105、MEDI4736(德瓦鲁单抗(durvalumab))和MSB0010718C(avelumab)。在一些实施方案中,所述PD-1轴结合拮抗剂为PD-1结合拮抗剂。在一些实施方案中,所述PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与其配体结合配偶体中的一种或多种的结合。在一些实施方案中,所述PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD L1的结合。在一些实施方案中,所述PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD L2的结合。在一些实施方案中,所述PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD-L1和PD-L2两者的结合。在一些实施方案中,所述PD-1结合拮抗剂为抗体。在一些实施方案中,所述抗体选自由以下组成的组:MDX 1106(纳武单抗(nivolumab))、MK-3475(派姆单抗(pembrolizumab))、CT-011(pidilizumab)、MEDI-0680(AMP-514)、PDR001、REGN2810和BGB-108。在一些实施方案中,所述PD-1结合拮抗剂为Fc融合蛋白。在一些实施方案中,所述Fc融合蛋白为AMP-224。在一些实施方案中,所述方法还包括向患者施用有效量的第二治疗剂。在一些实施方案中,所述第二治疗剂选自由以下组成的组:细胞毒性剂、生长抑制剂、辐射疗法剂、抗血管生成剂及其组合。在一些实施方案中,所述受试者为人。

[0021] 附图简述

[0022] 本申请文件含有至少一张以彩色制作的附图。在提出请求并支付必要费用后,本事务所将提供具有彩色附图的本专利或专利申请的副本。

[0023] 图1为示出用于SP142抗PD-L1抗体的一般抗体生产方法的示意图。

[0024] 图2A为示出使用抗PD-L1抗体SP142对用空载体(阴性对照)转染的福尔马林固定石蜡包埋(FFPE) HEK-293细胞进行的免疫组织化学(IHC)的结果的图像。

[0025] 图2B为示出使用抗PD-L1抗体SP142对FFPE DOR-13细胞(低至中度表达)进行的IHC的结果的图像。

[0026] 图2C为示出使用抗PD-L1抗体SP142对FFPE结肠癌RKO细胞(中度表达)进行的IHC的结果的图像。

[0027] 图2D为示出使用抗PD-L1抗体SP142对用全长人PD-L1(高表达)转染的FFPE HEK-293细胞进行的IHC的结果的图像。

[0028] 图3A为示出使用抗PD-L1抗体SP142对FFPE胎盘组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0029] 图3B为示出使用抗PD-L1抗体SP142对FFPE扁桃体组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0030] 图3C为示出使用抗PD-L1抗体SP142对FFPE霍奇金(HK)淋巴瘤患者组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0031] 图4为使用抗PD-L1抗体SP142示出来自FFPE NIH H820肺腺癌细胞系(高表达)、Karpas 299 T细胞淋巴瘤细胞系(中间表达)和Calu-3肺腺癌细胞系(阴性对照)的细胞裂解物中的PD-L1表达的蛋白质印迹。

[0032] 图5A为示出以0.11 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度使用抗PD-L1抗体E1L3N对FFPE胎盘组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0033] 图5B为示出以0.44 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度使用抗PD-L1抗体E1L3N对FFPE胎盘组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0034] 图5C为示出以1.75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度使用抗PD-L1抗体E1L3N对FFPE胎盘组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0035] 图5D为示出以7.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度使用抗PD-L1抗体E1L3N对FFPE胎盘组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0036] 图5E为示出以28.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度使用抗PD-L1抗体E1L3N对FFPE胎盘组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0037] 图5F为示出以0.11 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度使用抗PD-L1抗体SP142对FFPE胎盘组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0038] 图5G为示出以0.44 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度使用抗PD-L1抗体SP142对FFPE胎盘组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0039] 图5H为示出以1.75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度使用抗PD-L1抗体SP142对FFPE胎盘组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0040] 图5I为示出以7.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度使用抗PD-L1抗体SP142对FFPE胎盘组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0041] 图5J为示出以28.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度使用抗PD-L1抗体SP142对FFPE胎盘组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0042] 图6A为示出以0.11 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度使用抗PD-L1抗体E1L3N对FFPE胃上皮组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0043] 图6B为示出以0.44 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度使用抗PD-L1抗体E1L3N对FFPE胃上皮组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0044] 图6C为示出以1.75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度使用抗PD-L1抗体E1L3N对FFPE胃上皮组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0045] 图6D为示出以7.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度使用抗PD-L1抗体E1L3N对FFPE胃上皮组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0046] 图6E为示出以28.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度使用抗PD-L1抗体E1L3N对FFPE胃上皮组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0047] 图6F为示出以0.11 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度使用抗PD-L1抗体E1L3N对FFPE神经组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0048] 图6G为示出以0.44 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度使用抗PD-L1抗体E1L3N对FFPE神经组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0049] 图6H为示出以1.75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度使用抗PD-L1抗体E1L3N对FFPE神经组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0050] 图6I为示出以7.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度使用抗PD-L1抗体E1L3N对FFPE神经组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0051] 图6J为示出以28.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度使用抗PD-L1抗体E1L3N对FFPE神经组织切片进行

的IHC的结果的图像。

[0052] 图6K为示出以0.11 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度使用抗PD-L1抗体SP142对FFPE胃上皮组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0053] 图6L为示出以0.44 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度使用抗PD-L1抗体SP142对FFPE胃上皮组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0054] 图6M为示出以1.75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度使用抗PD-L1抗体SP142对FFPE胃上皮组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0055] 图6N为示出以7.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度使用抗PD-L1抗体SP142对FFPE胃上皮组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0056] 图6O为示出以28.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度使用抗PD-L1抗体SP142对FFPE胃上皮组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0057] 图6P为示出以0.11 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度使用抗PD-L1抗体SP142对FFPE神经组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0058] 图6Q为示出以0.44 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度使用抗PD-L1抗体SP142对FFPE神经组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0059] 图6R为示出以1.75 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度使用抗PD-L1抗体SP142对FFPE神经组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0060] 图6S为示出以7.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度使用抗PD-L1抗体SP142对FFPE神经组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0061] 图6T为示出以28.0 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的浓度使用抗PD-L1抗体SP142对FFPE神经组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0062] 图7A为示出使用抗PD-L1抗体E1L3N对FFPE胃上皮组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0063] 图7B为示出使用抗PD-L1抗体E1L3N对FFPE肾组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0064] 图7C为示出使用抗PD-L1抗体E1L3N对FFPE膀胱移行细胞癌(TCC)组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0065] 图7D为示出使用抗PD-L1抗体E1L3N对FFPE乳腺导管癌(Ca)组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0066] 图7E为示出使用抗PD-L1抗体E1L3N对FFPE肺鳞状细胞癌组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0067] 图7F为示出使用抗PD-L1抗体SP142对FFPE胃上皮组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0068] 图7G为示出使用抗PD-L1抗体SP142对FFPE肾组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0069] 图7H为示出使用抗PD-L1抗体SP142对FFPE膀胱移行细胞癌(TCC)组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0070] 图7I为示出使用抗PD-L1抗体SP142对FFPE乳腺导管癌(Ca)组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0071] 图7J为示出使用抗PD-L1抗体SP142对FFPE肺鳞状细胞癌组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0072] 图8A为示出使用抗PD-L1抗体E1L3N对FFPE扁桃体组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0073] 图8B为示出使用抗PD-L1抗体E1L3N对FFPE宫颈鳞状细胞癌 (SCC) 组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0074] 图8C为示出使用抗PD-L1抗体E1L3N对FFPE霍奇金淋巴瘤 (HK淋巴瘤) 组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0075] 图8D为示出使用抗PD-L1抗体E1L3N对FFPE胰腺腺癌组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0076] 图8E为示出使用抗PD-L1抗体E1L3N对FFPE前列腺腺癌组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0077] 图8F为示出使用抗PD-L1抗体E1L3N对FFPE皮肤SCC组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0078] 图8G为示出使用抗PD-L1抗体SP142对FFPE扁桃体组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0079] 图8H为示出使用抗PD-L1抗体SP142对FFPE宫颈鳞状细胞癌 (SCC) 组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0080] 图8I为示出使用抗PD-L1抗体SP142对FFPE霍奇金淋巴瘤 (HK淋巴瘤) 组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0081] 图8J为示出使用抗PD-L1抗体SP142对FFPE胰腺腺癌组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0082] 图8K为示出使用抗PD-L1抗体SP142对FFPE前列腺腺癌组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0083] 图8L为示出使用抗PD-L1抗体SP142对FFPE皮肤SCC组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0084] 图9A为示出使用抗PD-L1抗体E1L3N对来自NSCLC患者的FFPE组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0085] 图9B为示出使用抗PD-L1抗体E1L3N对来自NSCLC患者的FFPE组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0086] 图9C为示出使用抗PD-L1抗体E1L3N对来自NSCLC患者的FFPE组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0087] 图9D为示出使用抗PD-L1抗体E1L3N对来自NSCLC患者的FFPE组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0088] 图9E为示出使用抗PD-L1抗体E1L3N对来自NSCLC患者的FFPE组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0089] 图9F为示出使用抗PD-L1抗体SP142对来自NSCLC患者的FFPE组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0090] 图9G为示出使用抗PD-L1抗体SP142对来自NSCLC患者的FFPE组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0091] 图9H为示出使用抗PD-L1抗体SP142对来自NSCLC患者的FFPE组织切片进行的IHC

的结果的图像。

[0092] 图9I为示出使用抗PD-L1抗体SP142对来自NSCLC患者的FFPE组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0093] 图9J为示出使用抗PD-L1抗体SP142对来自NSCLC患者的FFPE组织切片进行的IHC的结果的图像。

[0094] 图10为示出使用抗PD-L1抗体SP142对来自NSCLC患者的FFPE组织切片进行的IHC的结果的图像。所述图像示出在肿瘤基质中呈现为聚集体的PD-L1阳性肿瘤浸润性免疫细胞(IC,深棕色染色)。组织切片用苏木精(蓝色)来复染。

[0095] 图11为示出使用抗PD-L1抗体SP142对来自NSCLC患者的FFPE组织切片进行的IHC的结果的图像。所述图示出PD-L1阳性肿瘤细胞(TC)染色。PD-L1信号以深棕色示出。组织切片用苏木精(蓝色)来复染。

[0096] 图12A为示出H&E染色的NSCLC肿瘤切除标本中的基质区和肿瘤区域的图像。箭头指示肿瘤周围基质、肿瘤细胞团和肿瘤内基质。黑线勾勒出肿瘤区域的边缘。图像在较高放大倍率下拍摄。

[0097] 图12B-12C为示出NSCLC切除标本的肿瘤区域的图像。肿瘤标本的连续切片用H&E(图12B)或通过PD-L1 IHC使用SP142抗体(图12C)来染色。图12C中的PD-L1信号示出为深棕色。蓝线勾勒出肿瘤区域(参见实施例5)。这些图像对应于图12A中所示的相同标本,但是在较低放大倍率下拍摄。

[0098] 图13为示出用于测定由PD-L1阳性肿瘤浸润性免疫细胞覆盖的肿瘤区域的百分比(IC%)的示例性工作流程的示意图。在此实例中,目测估算IC%为10%。

[0099] 图14A-14B示出用于使用PD-L1阳性IC聚集体染色图案的PD-L1 IHC的示例性评分方法。图14A示出尽可能接近地目测环绕PD-L1阳性IC聚集体(深棕色信号),产生了每个PD-L1阳性IC聚集体的轮廓(蓝色轮廓)。将这些区组合,并且将组合区域估算为肿瘤区域的百分比(图14B)。在图14B中,将肿瘤区域分成1/10(框),并且组合来自图14A的PD-L1阳性IC聚集体的轮廓。轮廓装满框中的一个,并且因此在此实例中,由PD-L1阳性IC覆盖的肿瘤区域的百分比估算为10%。图像示出使用抗PD-L1抗体SP142对来自NSCLC患者的FFPE组织切片进行的IHC的结果。

[0100] 图15A-15B示出具有单细胞扩散PD-L1阳性IC染色图案的图像。在此实例中,通过与参照图像(参见,例如图16)比较,基于单细胞扩散的密度对图像进行评分。图15A示出单细胞扩散PD-L1阳性IC的细胞密度为1%的图像。图15B示出单细胞扩散PD-L1阳性IC的细胞密度为5%的图像。图像示出使用抗PD-L1抗体SP142对来自NSCLC患者的FFPE组织切片进行的IHC的结果。

[0101] 图16A-16H示出在指示的PD-L1 IC表达截断值处的单细胞扩散PD-L1阳性IC染色图案的示例性参照图像。图像示出使用抗PD-L1抗体SP142对来自NSCLC患者的FFPE组织切片进行的IHC的结果。图16A-16B示出PD-L1阳性IC%小于1%的图像。图16C-16D示出PD-L1阳性IC%为大于或等于1%至小于5%的图像。图16E-16F示出PD-L1阳性IC%为大于或等于5%至小于10%的图像。图16G-16H示出PD-L1阳性IC%大于或等于10%的图像。

[0102] 图17A示出经H&E染色(顶部)或使用抗PD-L1抗体SP142处理以进行IHC(底部)的来自NSCLC患者的FFPE组织连续切片的图像。在此实例中,在H&E染色的切片中未检测到肿瘤

内IC,并且通过IHC检测到强TC PD-L1染色。对基质中的IC进行评分(箭头)。

[0103] 图17B示出经H&E染色(顶部)或使用抗PD-L1抗体SP142处理以进行IHC(底部)的来自NSCLC患者的FFPE组织连续切片的图像。在此实例中,在H&E染色的切片中检测到肿瘤内IC,并且通过IHC检测到弱至中等TC PD-L1染色。对基质和肿瘤细胞组中的IC进行评分。

[0104] 图17C示出经H&E染色(顶部)或使用抗PD-L1抗体SP142处理以进行IHC(底部)的来自NSCLC患者的FFPE组织连续切片的图像。在此实例中,在H&E染色的切片中未检测到肿瘤内IC,并且通过IHC检测到颗粒状PD-L1 TC染色。颗粒状染色评分为PD-L1阳性TC,只要染色以线性方式(即沿着细胞膜的轮廓)排列即可。

[0105] 图18A-18F示出在指示的PD-L1 TC%截断值处的PD-L1阳性TC染色图案的示例性图像。图像示出使用抗PD-L1抗体SP142对来自NSCLC患者的FFPE组织切片进行的IHC的结果。图18A-18B示出TC%小于5%的图像。图18C-18D示出TC%为大于或等于5%至小于50%的图像。图18E-18F示出TC%大于或等于50%的图像。

[0106] 本发明实施方案的详述

[0107] I. 定义

[0108] 如本文所用的术语“约”是指本技术领域的技术人员容易知道的相应值的通常误差范围。本文中对“约”某一个值或参数的提及包括(以及描述)针对所述值或参数本身的实施方案。例如,关于“约X”的描述包括“X”的描述。

[0109] “亲和力”是指分子(例如抗体)的单个结合位点与其结合配偶体(例如抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指示,否则如本文所用,“结合亲和力”是指反映结合对的成员(例如抗体和抗原)之间的1:1相互作用的内在结合亲和力。分子X对其配偶体Y的亲和力可通常由解离常数(Kd)表示。亲和力可通过本领域中已知的常用方法(包括本文所述的)加以测量。测量结合亲和力的具体说明性和示例性实施方案在下文中描述。

[0110] “亲和力成熟的”抗体是指与在一个或多个高变区(HVR)中不具有一个或多个改变的亲本抗体相比,具有此类改变的抗体,此类改变会导致抗体对抗原的亲和力得到改善。

[0111] 术语“无变应性”是指由通过T细胞受体递送的不完全或不充足的信号(例如,在不存在ras活化时细胞内Ca⁺²增加)引起的对抗原刺激的无应答性的状态。T细胞无变应性还可不存在在共刺激的情况下用抗原刺激时产生,导致即使在共刺激的情况下,细胞也对由抗原进行的后续活化变得难治。无应答状态常常可由白细胞介素-2的存在覆写。无变应性的T细胞未进行克隆扩增和/或获得效应子功能。

[0112] 术语“抗癌疗法”是指用于治疗癌症的疗法。抗癌治疗剂的实例包括但不限于细胞毒性剂、化疗剂、生长抑制剂、用于放射疗法的药剂、抗血管生成剂、凋亡剂、抗微管蛋白剂和/或治疗癌症的其他药剂,例如PD-1轴结合拮抗剂、抗CD20抗体、血小板衍生生长因子抑制剂(例如,GLEEVEC™(甲磺酸伊马替尼))、COX-2抑制剂(例如塞来考昔)、干扰素、细胞因子、结合以下靶标中的一种或多种的拮抗剂(例如中和抗体):PDGFR-β、BlyS、APRIL、BCMA受体、TRAIL/Apo2、其他生物活性和有机化学药剂等。其组合物也包括在本发明中。

[0113] 术语“抗PD-L1抗体”、“抗PD-L1抗体”、“特异性结合到PD-L1的抗体”和“结合到PD-L1的抗体”是指能够以足以使抗体在靶向PD-L1方面用作诊断剂和/或治疗剂的亲和力结合PD-L1的抗体。在一个实施方案中,如例如通过放射免疫测定(RIA)所测量的,抗PD-L1抗体与无关的非PD-L1蛋白的结合程度小于抗体与PD-L1的结合的约10%。在某些实施方案中,

结合到PD-L1的抗体的解离常数(Kd)为 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如, 10^{-8}M 或更少,例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M)。在某些实施方案中,抗PD-L1抗体结合到在来自不同物种的PD-L1中保守的PD-L1的表位。

[0114] 术语“抗PD-1抗体”和“结合到PD-1的抗体”是指能够以足以使抗体在靶向PD-1方面用作诊断剂和/或治疗剂的亲和力结合PD-1的抗体。在一个实施方案中,例如通过放射免疫测定(RIA)所测量的,抗PD-1抗体与无关的非PD-1蛋白的结合程度小于抗体与PD-1的结合的约10%。在某些实施方案中,结合到PD-1的抗体的解离常数(Kd)为 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如, 10^{-8}M 或更少,例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M)。在某些实施方案中,抗PD-1抗体结合到在来自不同物种的PD-1中保守的PD-1的表位。示例性抗PD-1抗体包括但不限于MDX 1106(纳武单抗)、MK-3475(派姆单抗)和CT-011(pidilizumab)。

[0115] 术语“抗体”在本文中是以最广泛意义使用且涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)和抗体片段,只要其展现所需抗原结合活性即可。

[0116] “抗体片段”是指非完整抗体的分子,其包含结合完整抗体结合到的抗原的完整抗体的一部分。抗体片段的实例包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如scFv);和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0117] 木瓜蛋白酶消化抗体产生两个称为“Fab”片段的相同抗原结合片段,各自具有单个抗原结合位点和残余“Fc”片段,其名称反映其易于结晶的能力。胃蛋白酶处理产生具有两个抗原结合位点并且仍能够交联抗原的F(ab')₂片段。

[0118] “Fv”是含有完全抗原结合位点的最小抗体片段。在一个实施方案中,双链Fv物质由处于紧密、非共价缔合的一个重链可变域和一个轻链可变域的二聚体构成。在单链Fv(scFv)物质中,一个重链可变域和一个轻链可变域可通过柔性肽接头共价连接,使得轻链和重链可以与双链Fv物质中的“二聚”结构类似的“二聚”结构缔合。在此构型中,每个可变域的三个HVR相互作用以将抗原结合位点限定在VH-VL二聚体的表面上。总之,六个HVR赋予抗体抗原结合特异性。然而,甚至单个可变域(或仅包含三个对抗原特异性的HVR的一半Fv)具有识别和结合抗原的能力,尽管与整个结合位点相比,处于较低的亲和力下。

[0119] Fab片段含有重链可变域和轻链可变域,并且还含有轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH1)。Fab'片段因在重链CH1结构域的羧基端添加少量残基(包括一个或多个来自抗体铰链区的半胱氨酸)而不同于Fab片段。Fab'-SH是恒定域的半胱氨酸残基带有自由巯基的Fab'在本文中的名称。F(ab')₂抗体片段最初以之间具有铰链半胱氨酸的Fab'片段对形式产生。抗体片段的其他化学偶联也是已知的。

[0120] “单链Fv”或“scFv”抗体片段包含抗体的VH和VL结构域,其中这些结构域存在于单个多肽链中。通常,scFv多肽还包含VH与VL结构域之间的多肽接头,所述接头能够使scFv形成用于抗原结合的所需结构。对于scFv的综述,参见,例如Pluckthün,在The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,第113卷,Rosenburg和Moore编,(Springer-Verlag,New York,1994),第269-315页中。

[0121] 术语“双抗体”是指具有两个抗原结合位点的抗体片段,所述片段包含在相同多肽链(VH-VL)中与轻链可变域(VL)连接的重链可变域(VH)。通过使用太短而不允许在相同链

上的两个结构域之间配对的接头,迫使所述结构域与另一链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点。双抗体可为二价的或双特异性的。双抗体更完整地描述于例如EP 404,097; WO 1993/01161; Hudson等, Nat. Med. 9:129-134 (2003); 以及Hollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993) 中。三抗体和四抗体也描述于Hudson等, Nat. Med. 9:129-134 (2003) 中。

[0122] 作为参照抗体的“结合相同表位的抗体”是指在竞争测定中使参照抗体与其抗原的结合被阻断50%或更多的抗体,且相反,参照抗体在竞争测定中使所述抗体与其抗原的结合被阻断50%或更多。本文提供示例性竞争测定。

[0123] “自身免疫性疾病”是起因于或针对个体的自身组织或器官或其共分离或表现或由其产生的病状的疾病或病症。自身免疫性疾病可为器官特异性疾病(即,免疫应答特异性地针对器官系统,诸如内分泌系统、造血系统、皮肤、心肺系统、胃肠和肝系统、肾系统、甲状腺、耳、神经肌肉系统、中枢神经系统等)或可影响多器官系统的系统性疾病(例如,系统性红斑狼疮(SLE)、类风湿性关节炎(RA)、多发性肌炎等)。非限制性示例性自身免疫性疾病包括自身免疫性风湿病症(诸如RA、干燥综合征、硬皮病、狼疮诸如SLE和狼疮性肾炎、多发性肌炎-皮肌炎、冷球蛋白血症、抗磷脂抗体综合征和银屑病性关节炎)、自体免疫性胃肠道和肝病(例如像,炎性肠病(例如,溃疡性结肠炎和克罗恩病)、自身免疫性胃炎和恶性贫血、自身免疫性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎和乳糜泻)、血管炎(例如像, ANCA阴性血管炎和ANCA相关血管炎,包括变应性肉芽肿性血管炎(Churg-Strauss vasculitis)、韦格纳氏肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)和显微镜下多血管炎)、自身免疫性神经病症(例如像,多发性硬化、视性眼阵挛肌阵挛综合征、重症肌无力、视神经脊髓炎、帕金森氏病、阿尔茨海默病和自身免疫性多发性神经病)、肾病(例如像,肾小球肾炎、古德帕斯彻氏综合征(Goodpasture's syndrome)和伯杰氏病)、自身免疫性皮肤病病症(例如像,银屑病、风疹、荨麻疹、寻常型天疱疮、大疱性类天疱疮和皮肤红斑狼疮)、血液学病症(例如像,血小板减少性紫癜、血栓性血小板减少性紫癜、输血后紫癜和自身免疫性溶血性贫血)、动脉粥样硬化、葡萄膜炎、自身免疫性听力疾病(例如像,内耳疾病和听力损失)、贝赛特氏疾病(Behcet's disease)、雷诺氏综合征(Raynaud's syndrome)、器官移植和自身免疫性内分泌病症(例如像,糖尿病相关自身免疫性疾病,诸如胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)、艾迪生氏病(Addison's disease)和自身免疫性甲状腺疾病(例如,格雷夫斯氏病(Graves' disease)和甲状腺炎))。更优选的此类疾病包括例如RA、溃疡性结肠炎、ANCA相关性血管炎、狼疮、多发性硬化、干燥综合征、格雷夫斯氏病、IDDM、恶性贫血、甲状腺炎和肾小球肾炎。

[0124] 例如,当在本文中使用时,短语“基于”是指关于一种或多种生物标记(例如,PD-L1)的信息用来通知治疗决定、包装说明书上提供信息或营销/促销指导。

[0125] “生物样品”意指从受试者或患者获得的类似细胞的集合。生物样品可为组织或细胞样品。组织或细胞样品的来源可为如来自新鲜、冷冻和/或防腐器官或组织样品或活检物或吸出物的固体组织;血液或任何血液成分;体液,诸如脑脊髓液、羊水、腹膜液或间质液;来自受试者妊娠或发育的任何时间的细胞。生物样品还可从体外组织或细胞培养物获得。组织样品可含有本质上不与组织天然混杂的化合物,诸如防腐剂、抗凝血剂、缓冲剂、固定剂、营养素、抗生素等。本文中的生物样品的实例包括但不限于肿瘤活检、循环肿瘤细胞、血

清或血浆、循环血浆蛋白、腹水、来源于肿瘤的或展现出肿瘤样特性的原代细胞培养物或细胞系,以及保存的肿瘤样品,诸如福尔马林固定石蜡包埋的肿瘤样品或冷冻的肿瘤样品。

[0126] 如本文所用的术语“生物标记”是指可以在样品例如PD-L1中检测到的例如预测性的、诊断性的和/或预后性的指示物。生物标记可用作特征在于某些分子、病理学、组织学和/或临床特征的疾病或病症(例如,癌症)的特定亚型的指示物。在一些实施方案中,生物标记为基因。生物标记包括但不限于多核苷酸(例如,DNA和/或RNA)、多核苷酸拷贝数改变(例如,DNA拷贝数)、多肽、多肽和多核苷酸修饰(例如,翻译后修饰)、碳水化合物和/或基于糖脂的分子标记。

[0127] “阻断”抗体或“拮抗剂”抗体是抑制或减少其所结合的抗原的生物活性的一种抗体。优选的阻断抗体或拮抗剂抗体基本上或完全地抑制抗原的生物活性。

[0128] 术语“癌症”和“癌性”是指或描述哺乳动物的特征通常在于细胞生长/增殖不受调控的生理病状。癌症的实例包括但不限于癌、淋巴瘤(例如霍奇金氏和非霍奇金氏淋巴瘤)、母细胞瘤、肉瘤和白血病。此类癌症的更具体的实例包括非小细胞肺癌(NSCLC)(包括肺腺癌和肺鳞状癌)、鳞状细胞癌、小细胞肺癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胰腺癌、神经胶质瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌(liver cancer)、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、唾液腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌(hepatic carcinoma)、白血病和其他淋巴增殖性病症以及各种类型的头颈癌。在特定实施方案中,所述癌症为NSCLC。在一些实施方案中,所述NSCLC为肺腺癌或肺鳞状癌。NSCLC可为鳞状NSCLC或非鳞状NSCLC。

[0129] “化疗剂”是用于治疗癌症的化学化合物。化学治疗剂的实例包括烷基化剂,诸如噻替派(thiotepa)和CYTOXAN®环磷酰胺;烷基磺酸盐,诸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶,诸如本多帕(benzodopa)、卡巴醌(carboquone)、米特多帕(meturedopa)和优多帕(uredopa);乙烯亚胺和甲基蜜胺(methylamelamine),包括六甲蜜胺(altretamine)、三乙烯蜜胺(triethylenemelamine)、三乙烯磷酰胺(triethylenephosphoramidate)、三乙烯硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲基蜜胺(trimethylolomelamine);多聚乙酰(acetogenin)(尤其是布拉它辛(bullatacin)和布拉它辛酮(bullatacinone)); δ -9-四氢大麻酚(tetrahydrocannabinol)(屈大麻酚(dronabinol),MARINOL®); β -拉帕醌(beta-lapachone);拉帕醇(lapachol);秋水仙碱(colchicine);桦木酸(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®)、乙酰基喜树碱(acetylcamptothecin)、莨菪素(scopolectin)和9-氨基喜树碱(aminocamptothecin));苔藓抑素(bryostatins);凯利他汀(callystatin);CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物);足叶草素(podophyllotoxin);足叶草酸(podophyllinic acid);替尼泊昔(teniposide);念珠藻素(cryptophycin)(具体是念珠藻素1和念珠藻素8);多拉司他汀(dolastatin);倍癌霉素(duocarmycin)(包括合成类似物KW-2189和CB1-TM1);软珊瑚醇(eleutherobin);潘卡他汀(pancratistatin);匍枝珊瑚醇(sarcodictyin);海绵抑制素(spongistatin);氮芥,诸如

苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlomaphazine)、氯磷酰胺(cholophosphamide)、雌氮芥(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、二氯甲基二乙胺(mechlorethamine)、二氯甲基二乙胺氧化物盐酸盐、美法仑、新恩比兴(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、氯乙环磷酰胺(trofosfamide)、尿嘧啶氮芥(uracil mustard);亚硝基脲,诸如卡莫司汀(carmustine)、吡葡亚硝脲(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)和雷莫司汀(ranimustine);抗生素,诸如烯二炔抗生素(例如卡里奇霉素,尤其卡里奇霉素 γ 1I和卡里奇霉素 ω 1I(参见,例如Nicolaou等,.Angew.Chem Intl.Ed.Engl.,33:183-186(1994));达内霉素(dynemicin),包括达内霉素A;埃斯塔拉霉素(esperamicin);以及新制癌菌素(neocarzinostatin)发色团和相关色蛋白烯二炔抗生素发色团、阿克拉霉素(aclacinomycin)、放线菌素(actinomycin)、安曲霉素(authramycin)、重氮丝氨酸(azaserine)、博莱霉素(bleomycin)、放线菌素C(cactinomycin)、卡拉比星(carabycin)、洋红霉素(carminomycin)、嗜癌菌素(carzinophilin)、色霉素(chromomycin)、放线菌素D(dactinomycin)、道诺霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮基-5-氧代-L-正亮氨酸、**ADRIAMYCIN®**阿霉素(包括吗啉代-阿霉素、氰基吗啉代-阿霉素、2-吡咯啉基-阿霉素和脱氧阿霉素)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、麻西罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素(mitomycin)(诸如丝裂霉素C)、霉酚酸(mycophenolic acid)、诺加霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycin)、培洛霉素(peplomycin)、泊非霉素(porfiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑菌素(streptonigrin)、链脲霉素(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他汀(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin);抗代谢物,诸如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,诸如二甲叶酸(denopterin)、甲氨蝶呤、蝶罗呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate);嘌呤类似物,诸如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯基嘌呤(6-mercaptopurine)、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鸟嘌呤(thioguanine);嘧啶类似物,诸如环胞苷(ancitabine)、阿扎胞苷(azacitidine)、6-氮尿苷(6-azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、二脱氧尿苷(dideoxyuridine)、脱氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine);雄激素(androgen),诸如二甲睾酮(calusterone)、屈他雄酮丙酸盐(dromostanolone propionate)、环硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、睾内酯(testolactone);抗肾上腺剂,诸如氨鲁米特(aminoglutethimide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane);叶酸(folic acid)补充剂,诸如弗罗林酸(frolinic acid);乙酰葡醛酯(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);倍曲布西(bestrabucil);比生群(bisantrene);依达曲沙(edatraxate);地佛法明(defofamine);地美可辛(demecolcine);地吡醌(diaziquone);依洛尼塞(elfomithine);依利醋铵(elliptinium acetate);埃博霉素(epothilone);依托格鲁(etoglucid);硝酸镓(gallium nitrate);羟基脲(hydroxyurea);香菇多糖(lentinan);洛尼代宁(lonidainine);美登木素,诸如美登素(maytansine)和安丝菌素(ansamitocin);米托胍脲(mitoguazone);米托蒽醌(mitoxantrone);莫匹丹莫

(mopidanmol);二胺硝吡啶(nitraerine);喷司他汀(pentostatin);苯来美特(phenamet);吡柔比星(pirarubicin);洛索蒽醌(losoxantrone);2-乙基酰肼;丙卡巴肼(procarbazine);**PSK®**多糖复合物(JHS Natural Products,Eugene,OR);雷佐生(razoxane);根霉素(rhizoxin);西索菲兰(sizofiran);螺旋锗(spirogermanium);细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid);三亚胺醌(triaziquone);2,2',2''-三氯三乙胺;单端孢霉烯(trichothecene)(尤其T-2毒素、维拉库林A(verracurin A)、杆孢菌素A(roridin A)和蛇形菌素(anguidine));乌拉坦(urethan);长春地辛(vindesine)(**ELDISINE®**, **FILDESIN®**);达卡巴嗪(dacarbazine);甘露醇氮芥(mannomustine);二溴甘露醇(mitobronitol);二溴卫矛醇(mitolactol);哌泊溴烷(pipobroman);格塞图辛(gacytosine);阿拉伯糖苷(arabinoside) (“Ara-C”);噻替派(thiotepa);紫杉烷(taxoid),例如紫杉烷(taxane),包括**TAXOL®**紫杉醇(paclitaxel)(Bristol-Myers Squibb Oncology,Princeton,N.J.)、**ABRAXANE™**无聚氧乙烯蓖麻油(Cremophor-free)的白蛋白工程化的紫杉醇纳米颗粒制剂(American Pharmaceutical Partners,Schaumburg,Illinois)和**TAXOTERE®**多西他赛(docetaxel)(**Rhône-Poulenc Rorer**,Antony,France);苯丁酸氮芥;吉西他滨(gemcitabine)(**GEMZAR®**);6-硫代鸟嘌呤(6-thioguanine);巯基嘌呤(mercaptapurine);甲氨蝶呤;铂类似物,诸如顺铂(cisplatin)和卡铂(carboplatin);长春花碱(vinblastine)(**VELBAN®**);铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱(vincristine)(**ONCOVIN®**);奥沙利铂(oxaliplatin);亚叶酸(leucovorin);长春瑞滨(vinorelbine)(**NAVELBINE®**);诺消灵(novantrone);依达曲沙(edatrexate);道诺霉素;氨基蝶呤(aminopterin);伊班膦酸盐(ibandronate);拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟胺酸(DMF0);类视色素(retinoid),诸如视黄酸(retinoic acid);卡培他滨(capecitabine)(**XELODA®**);任何上述各物的药学上可接受的盐、酸或衍生物;以及上述各物中两种或更多种的组合,诸如CHOP,即环磷酰胺、阿霉素、长春新碱和泼尼松龙(prednisolone)的组合疗法的缩写,以及FOLFOX,即用奥沙利铂(ELOXATIN™)与5-FU和亚叶酸组合进行的治疗方案的缩写。另外的化疗剂包括用作抗体药物缀合物的细胞毒性剂,例如像美登木素生物碱(例如,DM1)和奥里斯他汀(auristatin) MMAE和MMAF。

[0130] “化疗剂”还包括用来调节、减少、阻断或抑制可促进癌生长的激素作用并且常常为系统性或全身治疗形式的“抗激素剂”或“内分泌治疗剂”。它们可能为激素本身。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(包括**NOLVADEX®**他莫昔芬)、**EVISTA®**雷洛昔芬、屈洛昔芬、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬、keoxifene、LY117018、奥那司酮和**FARESTON®**托瑞米芬;抗孕酮;雌激素受体下调剂(ERD);用来抑制或停止卵巢的药剂,例如,促黄体激素释放激素(leutinizing hormone-releasing hormone)(LHRH)激动剂诸如**LUPRON®**和**ELIGARD®**醋酸亮丙瑞林、醋酸戈舍瑞林、醋酸布舍瑞林和曲普瑞林(tripterelin);其他抗雄激素诸如氟他胺、尼鲁米特和比卡鲁胺;和抑制调节肾上腺中雌激素产生的酶芳香酶的芳香酶抑制剂,诸如4(5)-咪唑、氨鲁米特、**MEGASE®**醋酸甲地孕酮、**AROMASIN®**依西美坦、福美司坦(formestanie)、法倔唑、**RIVISOR®**伏氯唑、**FEMARA®**来曲唑和**ARIMIDEX®**阿那曲唑。此外,化疗剂的此

类定义包括二膦酸盐,诸如氯膦酸盐(例如BONEFOS®或OSTAC®)、DIDROCAL®依替膦酸盐、NE-58095、ZOMETA®唑来膦酸/唑来膦酸盐、FOSAMAX®阿仑膦酸盐、AREDIA®帕米膦酸盐、SKELID®替鲁膦酸盐或ACTONEL®利塞膦酸盐;以及曲沙他滨(1,3-二氧戊环核苷胞嘧啶类似物);反义寡核苷酸,特别是抑制涉及异常细胞增殖的信号通路方面的基因表达的那些反义寡核苷酸,诸如PKC- α 、Raf、H-Ras和表皮生长因子受体(EGFR);疫苗,诸如THERATOPE®疫苗和基因疗法疫苗,例如ALLOVECTIN®疫苗、LEUVECTIN®疫苗和VAXID®疫苗;LURTOTECAN®拓扑异构酶1抑制剂;ABARELIX®rmRH;拉帕替尼二甲苯磺酸盐(ErbB-2和EGFR双酪氨酸激酶小分子抑制剂,也称为GW572016);以及任何以上化疗剂的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0131] 术语“嵌合”抗体是指重链和/或轻链的一部分来源于特定来源或物种,而重链和/或轻链的其余部分来源于不同来源或物种的抗体。

[0132] 抗体的“类别”是指其重链所具有的恒定域或恒定区的类型。存在五种主要的抗体类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且这些抗体中的若干种还可分成亚类(同种型),例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂。对应于不同免疫球蛋白类别的重链恒定域分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。

[0133] “关联(correlate)”或“关联(correlating)”意指以任何方式对第一次分析或方案的性能和/或结果与第二次分析或方案的性能和/或结果进行比较。例如,可在执行第二方案中使用第一分析或方案的结果,并且/或者可使用第一分析或方案的结果来确定是否应当进行第二分析或方案。关于多肽分析或方案的实施方案,可使用多肽表达分析或方案的结果来确定是否应当进行具体治疗方案。关于多核苷酸分析或方案的实施方案,可使用多核苷酸表达分析或方案的结果来确定是否应当进行具体治疗方案。

[0134] 如本文所用的术语“细胞毒性剂”是指抑制或阻止细胞功能和/或导致细胞死亡或破坏的物质。细胞毒性剂包括但不限于放射性同位素(例如,At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²和Lu的放射性同位素);化学治疗剂或药物(例如甲胺蝶呤(methotrexate)、阿德力霉素(adriamicin)、长春花生物碱(长春新碱(vincristine)、长春花碱(vinblastine)、依托泊苷(etoposide))、阿霉素、美法仑(melphalan)、丝裂霉素C(mitomycin C)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、道诺霉素(daunombicin)或其他插入剂);生长抑制剂;酶及其片段,诸如溶核酶;抗生素;毒素,诸如小分子毒素或细菌、真菌、植物或动物来源的酶活性毒素,包括其片段和/或变体;以及以下公开的各种抗肿瘤剂或抗癌剂。

[0135] 术语“检测”包括任何手段的检测,包括直接和间接检测。

[0136] 术语“诊断”在本文用来指分子或病理状态、疾病或病状(例如,癌症)的鉴别或分类。例如,“诊断”可以是指特定类型的癌症的鉴别。“诊断”还可以是指例如通过组织病理学标准或通过分子特征(例如,特征在于生物标记(例如,特定基因或由所述基因编码的蛋白质)中的一种或组合的表达的亚型)进行的癌症的特定亚型的分类。

[0137] “病症”是将受益于治疗的任何病状,包括但不限于慢性和急性病症或疾病,包括使哺乳动物易患所考虑的病症的那些病理病状。

[0138] “效应子功能”是指可归因于抗体的Fc区的那些生物活性,其随抗体同种型而变化。抗体效应子功能的实例包括:C1q结合和补体依赖性细胞毒性(CDC);Fc受体结合;抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC);吞噬作用;细胞表面受体(例如B细胞受体)的下调;以

及B细胞活化。

[0139] 本文的术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的含有恒定区的至少一部分的C端区。所述术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。在一个实施方案中,人IgG重链Fc区自Cys226或Pro230延伸至重链的羧基末端。然而,Fc区的C端赖氨酸(Lys447)可存在或可不存在。除非本文另外规定,否则Fc区或恒定区中的氨基酸残基的编号是根据EU编号系统,又称为EU索引,如Kabat等Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991中所述。

[0140] “框架”或“FR”是指除高变区(HVR)残基以外的可变域残基。可变域的FR通常由四个FR域组成:FR1、FR2、FR3和FR4。因此,HVR和FR序列通常按以下顺序出现在VH(或VL)中:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0141] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文中可互换使用来表示具有与天然抗体结构基本上类似的结构或具有含有如本文定义的Fc区的重链的抗体。

[0142] 术语“表达水平(level of expression)”或“表达水平(expression level)”通常可互换使用,并且通常是指生物样品中多核苷酸、mRNA或氨基酸产物或蛋白质的量。“表达”通常是指将基因编码的信息转变成存在于细胞中并在细胞中操作的结构的过程。因此,根据本发明,基因(例如,PD-L1基因)的“表达”可以是指转录成多核苷酸、翻译成蛋白质或甚至蛋白质的翻译后修饰。转录的多核苷酸、翻译的蛋白质或翻译后修饰的蛋白质的片段也应被视为表达,无论它们是否起源于由选择性剪接产生的转录物或降解的转录物,或起源于例如通过蛋白水解进行的蛋白质的翻译后加工。在一些实施方案中,“表达水平”是指如使用本领域已知或本文所述的方法所测定的生物样品中蛋白质(例如,PD-L1)的量,包括但不限于免疫组织化学(IHC)、免疫印迹(例如蛋白质印迹)、免疫荧光(IF)、流式细胞术,例如荧光活化细胞分选(FACS™)或酶联免疫吸附测定(ELISA)。

[0143] “表达增加”、“表达水平增加”、“水平增加”、“表达升高”、“表达水平升高”或“水平升高”是指相对于对照,个体中生物标记的表达增加或水平增加,所述对照诸如未患有疾病或病症(例如,癌症)的一个个体或多个个体或内部对照(例如,持家生物标记)。

[0144] “表达减少”、“表达水平减少”、“水平减少”、“表达降低”、“表达水平降低”或“水平降低”是指相对于对照,个体中生物标记的表达较少或水平减少,所述对照诸如未患有疾病或病症(例如,癌症)的一个个体或多个个体或内部对照(例如,持家生物标记)。在一些实施方案中,降低的表达是几乎没有表达。

[0145] 术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可互换使用且是指其中已引入外源性核酸的细胞,包括此类细胞的子代。宿主细胞包括“转化体”和“转化细胞”,其包括初级转化细胞和源于其的子代而不考虑传代数。子代在核酸内含物方面可能不完全与母细胞相同,而是可能含有突变。本文包括具有如在原始转化细胞中所筛选或选择的相同功能或生物活性的突变型子代。

[0146] “人抗体”为具有某一氨基酸序列的抗体,所述氨基酸序列对应于由人或人细胞产生或来源于利用人抗体全部组成成分或其他人抗体编码序列的非人来源的抗体的氨基酸序列。人抗体的此定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0147] “人共有框架”为代表在人免疫球蛋白VL或VH框架序列的选择中最常存在的氨基酸残基的框架。一般说来,人免疫球蛋白VL或VH序列选自可变域序列的亚组。一般说来,序

列亚组为如Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest. 第五版, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD, 第1-3卷, 1991中的亚组。在一个实施方案中, 对于VL, 亚组为如Kabat等(上文)中的亚组 κ I。在一个实施方案中, 对于VH, 亚组为如Kabat等(上文)中的亚组III。

[0148] “人源化”抗体是指包含来自非人HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施方案中, 人源化抗体将包含至少一个且通常两个可变域的基本上全部, 其中全部或基本上全部HVR(例如CDR)对应于非人抗体的HVR, 且全部或基本上全部FR对应于人抗体的FR。人源化抗体任选可包含源于人抗体的抗体恒定区的至少一部分。抗体(例如非人抗体)的“人源化形式”是指已进行人源化的抗体。

[0149] 如本文所用的术语“高变区”或“HVR”是指在序列(“互补决定区”或“CDR”)方面高度可变和/或形成结构确定环(“高变环”)和/或含有抗原接触残基(“抗原接触”)的抗体可变域的区中的每个。一般说来, 抗体包含六个HVR: 三个在VH中(H1、H2、H3), 且三个在VL中(L1、L2、L3)。本文中的示例性HVR包括:

[0150] (a) 存在于氨基酸残基26-32(L1)、50-52(L2)、91-96(L3)、26-32(H1)、53-55(H2)和96-101(H3)处的高变环(Chothia等J.Mol.Biol.196:901-917,1987);

[0151] (b) 存在于氨基酸残基24-34(L1)、50-56(L2)、89-97(L3)、31-35b(H1)、50-65(H2)和95-102(H3)处的CDR(Kaba等, Sequences of Proteins of Immunological Interest. 第5版Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991);

[0152] (c) 存在于氨基酸残基27c-36(L1)、46-55(L2)、89-96(L3)、30-35b(H1)、47-58(H2)和93-101(H3)处的抗原接触(MacCallum等J.Mol.Biol.262:732-745,1996); 以及

[0153] (d) (a)、(b)和/或(c)的组合, 包括HVR氨基酸残基46-56(L2)、47-56(L2)、48-56(L2)、49-56(L2)、26-35(H1)、26-35b(H1)、49-65(H2)、93-102(H3)和94-102(H3)。除非另外指示, 否则HVR残基和可变域中的其他残基(例如FR残基)在本文中是根据Kabat等(上文)加以编号。

[0154] “免疫功能失调”是影响免疫系统的病症或病状, 包括例如自身免疫性疾病和T细胞功能失调性病症。

[0155] 如本文所用, 术语“免疫粘附素”指代将异源蛋白质(“粘附素”)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的抗体样分子。在结构上, 免疫粘附素包含不同于抗体的抗原识别和结合位点(即, 是“异源的”)的具有所需结合特异性的氨基酸序列和免疫球蛋白恒定结构域序列的融合。免疫粘附素分子的粘附素部分通常是至少包含受体或配体的结合位点的连续氨基酸序列。免疫粘附素中的免疫球蛋白恒定结构域序列可从诸如以下的任何免疫球蛋白获得: IgG1、IgG2(包括IgG2A和IgG2B)、IgG3或IgG4亚型、IgA(包括IgA1和IgA2)、IgE、IgD或IgM。Ig融合优选地包括在Ig分子内的至少一个可变区的位置中替代本文所述的多肽或抗体的结构域。在特别优选的实施方案中, 免疫球蛋白融合包括IgG1分子的较链、CH2和CH3或较链、CH1、CH2和CH3区。对于免疫球蛋白融合的产生, 还参见美国专利号5,428,130。例如, 作为药物用于本文疗法的有用的免疫粘附素包括包含分别与免疫球蛋白序列的恒定结构域(诸如PD-L1 ECD-Fc、PD-L2 ECD-Fc和PD-1 ECD-Fc)融合的PD-L1或PD-L2的细胞外结构域(ECD)或PD-1结合部分, 或PD-1的细胞外或PD-L1结合部分或PD-L2结合部分的多肽。细胞表面受体的Ig Fc和ECD的免疫粘附素组合有时称为可溶性受体。

[0156] “融合蛋白”和“融合多肽”是指具有共价连接在一起的两个部分的多肽,其中每个部分为具有不同特性的多肽。所述特性可为生物特性,诸如体外或体内活性。所述特性还可为简单的化学或物理特性,诸如与靶分子的结合、反应的催化等。所述两个部分可通过单个肽键或通过肽接头直接连接,但是彼此处于阅读框中。

[0157] “免疫缀合物”为缀合至一个或多个异源分子(包括但不限于细胞毒性剂)的抗体。

[0158] “分离抗体”为已与天然环境的组分分离的抗体。在一些实施方案中,将抗体纯化至纯度大于95%或99%,如通过例如电泳(例如SDS-PAGE、等电聚焦(IEF)、毛细管电泳)或色谱(例如离子交换或逆相HPLC)所测定。对于评估抗体纯度的方法的综述,参见,例如Flatman等J.Chromatogr.B.848:79-87,2007。

[0159] “分离核酸”是指已与天然环境的组分分离的核酸分子。分离核酸包括通常含有核酸分子的细胞中所含的核酸分子,但核酸分子是存在于染色体外或存在于不同于其天然染色体位置的染色体位置上。

[0160] “编码抗PD-L1抗体的分离核酸”是指一个或多个编码抗体重链和轻链(或其片段)的核酸分子,包括在单个载体或单独载体中的所述核酸分子和存在于宿主细胞中的一个或多个位置处的所述核酸分子。

[0161] 当本文使用时词语“标记”是指被直接或间接缀合或融合至诸如多核苷酸探针或抗体的试剂并且促进其缀合或融合的试剂的检测的化合物或组合物。标记本身可以是可检测的(例如,放射性同位素标记或荧光标记)或在酶促标记的情况下可以催化可检测的底物化合物或组合物的化学改变。术语旨在涵盖通过将可检测物质偶联(即,物理连接)至探针或抗体的直接标记探针或抗体以及通过与直接标记的另一种试剂反应性的间接标记探针或抗体。间接标记的实例包括使用荧光标记的二级抗体进行的一级抗体的检测和具有生物素的DNA探针的末端标记,使得其可以用荧光标记的链霉抗生素蛋白来检测。

[0162] 如本文所用的术语“单克隆抗体”是指从基本上均质抗体的群体获得的抗体,即除可能的变体抗体(例如含有天然存在的突变或在制造单克隆抗体制剂的期间产生的突变,这些变体通常以少量存在)之外,构成所述群体的个别抗体相同和/或结合相同表位。与通常包括针对不同决定子(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂不同,单克隆抗体制剂的各单克隆抗体是针对抗原上的单个决定子。因此,修饰语“单克隆”指示如从基本上均质抗体群体获得的抗体的特性,且不应解释为需要通过任何特定方法来制造抗体。例如,有待根据本发明使用的单克隆抗体可通过多种技术制备,所述技术包括但不限于杂交瘤方法、重组DNA方法、噬菌体展示方法和利用含有全部或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法或其组合。

[0163] 关于参照多肽序列的“氨基酸序列同一性百分比(%)”定义为在比对序列并且必要时引入间隙以实现最大序列同一性百分比,并且不考虑任何保守性置换作为序列同一性的一部分之后,候选序列中与参照多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比。用于测定氨基酸序列同一性百分比的目的的比对可以属于本领域中的技能的多种方式实现,所述方式例如使用可公开获得的计算机软件,诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员可确定用于比对序列的适当参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大对准所需的任何算法。然而,出于本文目的,使用序列比较计算机程序ALIGN-2产生氨基酸序列同一性%值。ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech公司创造,

且原始码已与用户文件一起在美国版权办公室(U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559) 备案, 其中其在美国版权登记号TXU510087下登记。ALIGN-2程序可公开从Genentech公司(South San Francisco, California) 获得, 或可从源代码编译。ALIGN-2程序应编译用于UNIX操作系统(包括数字UNIX V4.0D) 上。所有序列比较参数皆由ALIGN-2程序设置且不改变。

[0164] 在ALIGN-2用于氨基酸序列比较的情形下, 给定氨基酸序列A对于、与或相对于给定氨基酸序列B的氨基酸序列同一性% (其可替代地措词为给定氨基酸序列A具有或包含对于、与或相对于给定氨基酸序列B的某一氨基酸序列同一性%) 如下计算:

[0165] $100 \times \text{分数} X/Y$

[0166] 其中X为通过序列比对程序ALIGN-2在所述程序的A和B的比对中评分为相同匹配的氨基酸残基的数目, 并且其中Y为B中的氨基酸残基的总数。应当理解, 当氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度时, A与B的氨基酸序列同一性%将不等于B与A的氨基酸序列同一性%。除非另外特别说明, 否则本文使用的所有氨基酸序列同一性%值如在紧接的前述段落中所述的那样使用ALIGN-2计算机程序获得。

[0167] 术语“药物制剂”是指以下制剂: 其呈允许其中所含的活性成分的生物活性有效的形式, 且不含对将施用制剂的受试者具有不可接受毒性的另外组分。

[0168] “药学上可接受的载剂”是指药物制剂中除活性成分以外的对受试者无毒的成分。药学上可接受的载剂包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0169] 除非另外指示, 否则如本文所用的术语“程序性细胞死亡1配体1”、“PD-L1”、“程序性死亡配体1”、“分化簇274”、“CD274”或“B7同系物1”是指来自任何脊椎动物来源的任何天然PD-L1, 所述任何脊椎动物来源包括哺乳动物, 诸如灵长类(例如, 人) 和啮齿类(例如, 小鼠和大鼠)。所述术语涵盖“全长”、未加工的PD-L1以及由细胞中的加工所产生的任何形式的PD-L1。PD-L1可作为跨膜蛋白或作为可溶性蛋白存在。所述术语还涵盖天然存在的PD-L1的变体, 例如剪接变体或等位基因变体。PD-L1的基本结构包括4个结构域: 胞外Ig样V型结构域和Ig样C2型结构域、跨膜结构域以及细胞质结构域。可在NCBI Gene ID No. 29126下找到关于人PD-L1基因(包括基因组DNA序列) 的另外信息。可在NCBI Gene ID No. 60533下找到关于小鼠PD-L1基因(包括基因组DNA序列) 的另外信息。示例性全长人PD-L1蛋白的氨基酸序列示于SEQ ID NO: 18中。示例性全长人PD-L1蛋白的氨基酸序列可例如在NCBI登录号NP_001254653或UniProt登录号Q9NZQ7下找到, 而可例如在NCBI登录号NP_068693或Uniprot登录号Q9EP73下找到示例性全长小鼠PD-L1蛋白序列。

[0170] 术语“PD-1轴结合拮抗剂”是指抑制PD-1轴结合配偶体与其结合配偶体中的一种或多种相互作用的分子, 以便除去由PD-1信号轴上的信号传导所产生的T细胞功能失调-结果是恢复或增强T细胞功能(例如, 增殖、细胞因子产生和/或靶细胞杀伤)。如本文所用, PD-1轴结合拮抗剂包括PD-1结合拮抗剂、PD-L1结合拮抗剂和PD-L2结合拮抗剂。

[0171] 如本文所用, “PD-L1结合拮抗剂”是减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-L1与其结合配偶体中的一种或多种(诸如PD-1和/或B7-1) 的相互作用所产生的信号转导的分子。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, 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, PD-L1结合拮抗剂包括抗PD-L1抗体及其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白、寡肽、小分子拮抗剂、多

核苷酸拮抗剂以及减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-L1与其结合配偶体中的一种或多种(诸如PD-1和/或B7-1)的相互作用所产生的信号转导的其他分子。在一个实施方案中,PD-L1结合拮抗剂减少由或通过T淋巴细胞和其他细胞上表达的细胞表面蛋白介导的负信号,通过PD-L1或PD-1进行的介导的信号传导使得功能失调性T细胞成为较少功能失调的。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YW243.55.S70。在另一个具体方面,抗PD-L1抗体是MDX-1105。在又一个具体方面,抗PD-L1抗体是MPDL3280A(阿特殊单抗)。在又一个具体方面,抗PD-L1抗体是MEDI4736(德瓦鲁单抗)。在又一个具体方面,抗PD-L1抗体是MSB0010718C(avelumab)。MDX-1105(也称为BMS-936559)是W02007/005874中描述的抗PD-L1抗体。抗体YW243.55.S70是W0 2010/077634和US 8,217,149中描述的抗PD-L1抗体,所述专利中的每个的全部内容以引用方式并入本文。

[0172] 如本文所用,“PD-1结合拮抗剂”是减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-1与其结合配偶体中的一种或多种(诸如PD-L1和/或PD-L2)的相互作用所产生的信号转导的分子。在一些实施方案中,PD-1结合拮抗剂是抑制PD-1与其结合配偶体的结合分子。在具体方面,PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD-L1和/或PD-L2的结合。例如,PD-1结合拮抗剂包括抗PD-1抗体及其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白、寡肽、小分子拮抗剂、多核苷酸拮抗剂以及减少、阻断、抑制、消除或干扰由PD-1与PD-L1和/或PD-L2的相互作用所产生的信号转导的其他分子。在一个实施方案中,PD-1结合拮抗剂减少由或通过T淋巴细胞和其他细胞上表达的细胞表面蛋白介导的负信号,通过PD-1或PD-L1进行的介导的信号传导使得功能失调性T细胞成为较少功能失调的。在一些实施方案中,所述PD-1结合拮抗剂为抗PD-1抗体。在具体方面,PD-1结合拮抗剂为MDX-1106(纳武单抗)。在另一个具体方面,PD-1结合拮抗剂为MK-3475(派姆单抗)。在另一个具体方面,PD-1结合拮抗剂为CT-011(pidilizumab)。在另一个具体方面,PD-1结合拮抗剂为MEDI-0680(AMP-514)。在另一个具体方面,PD-1结合拮抗剂为PDR001。在另一个具体方面,PD-1结合拮抗剂为REGN2810。在另一个具体方面,PD-1结合拮抗剂为BGB-108。在另一个具体方面,PD-1结合拮抗剂为AMP-224。MDX-1106(也称为MDX-1106-04、ONO-4538、BMS-936558或纳武单抗)是W02006/121168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。

[0173] 如本文所用的“参照样品”、“参照细胞”、“参照组织”、“对样品”、“对照细胞”或“对照组织”是指用于比较目的样品、细胞、组织、标准或水平。在一个实施方案中,参照样品、参照细胞、参照组织、对样品、对照细胞或对照组织获自相同受试者或个体的身体的健康和/或非患病部分(例如,组织或细胞)。例如,参照样品、参照细胞、参照组织、对样品、对照细胞或对照组织可为与患病细胞或组织相邻的健康和/或非患病细胞或组织(例如,与肿瘤相邻的细胞或组织)。在另一个实施方案中,参照样品获自相同受试者或个体的身体的未处理组织和/或细胞。在又一个实施方案中,参照样品、参照细胞、参照组织、对样品、对照细胞或对照组织获自不是受试者或个体的个体的身体的健康和/或非患病部分(例如,组织或细胞)。在再一个实施方案中,参照样品、参照细胞、参照组织、对样品、对照细胞或对照组织获自不是受试者或个体的个体的身体的未处理组织和/或细胞。

[0174] 可使用指示对个体的益处的任何端点来评估“个体应答”或“应答”,所述益处包括但不限于(1)在一定程度上抑制疾病进展(例如,癌症进展),包括减缓和完全停滞;(2)肿瘤

尺寸的减小；(3) 抑制(即,减少、减缓或完全停止) 癌细胞浸润到相邻的外周器官和/或组织中；(4) 抑制(即,减少、减缓或完全停止) 转移；(5) 在一定程度上减轻与疾病或病症(例如,癌症)相关的一种或多种症状；(6) 存活(包括总体存活和无进展存活)的长度的增加或延长；和/或(9) 治疗后给定时间点处的死亡率降低。

[0175] 患者的“有效应答”或患者对用药物进行的治疗的“应答性”和类似措辞是指赋予至处于疾病或病症(诸如癌症)的风险下或患有其的患者的临床或治疗益处。在一个实施方案中,此类益处包括以下任何一种或多种:延长存活(包括总体存活和无进展存活);致使客观应答(包括完全应答或部分应答);或改善癌症的体征或症状。在一个实施方案中,生物标记(例如,如使用IHC所测定的PD-L1表达)用来鉴别预测相对于不表达生物标记的患者具有增加的对用药物进行的治疗(例如,包括抗癌疗法的治疗)的应答的可能性的患者。在一个实施方案中,生物标记(例如,如使用IHC所测定的PD-L1表达)用来鉴别预测相对于不表达相同水平的生物标记的患者具有增加的对用药物进行的治疗(例如,抗癌疗法)的应答的可能性的患者。在一个实施方案中,生物标记的存在用来鉴别相对于不具有生物标记的存在患者更可能响应于用药物进行的治疗的患者。在另一个实施方案中,生物标记的存在用来确定患者相对于不具有生物标记的存在患者将具有来自用药物进行的治疗的益处的增加的可能性。

[0176] “客观应答”是指可测量的应答,包括完全应答(CR)或部分应答(PR)。在一些实施方案中,“客观应答率(ORR)”是指完全应答(CR)率和部分应答(PR)率的总和。

[0177] “完全应答”或“CR”意指响应于治疗的癌症的所有体征的消失(例如,所有靶损伤的消失)。这不总是意味着癌症已被治愈。

[0178] “持续应答”是指在停止治疗后对减少肿瘤生长的持续作用。例如,肿瘤尺寸与施用阶段开始时的尺寸相比可保持相同或更小。在一些实施方案中,持续应答具有与治疗持续时间至少相同的持续时间、至少1.5X、2.0X、2.5X或3.0X治疗持续时间的长度或更长。

[0179] 如本文所用,“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。

[0180] 如本文所用,“部分应答”或“PR”是指响应于治疗的一个或多个肿瘤的尺寸或损伤的减小或体内癌症程度的降低。例如,在一些实施方案中,PR是指以基线SLD作为参照,靶损伤的最长直径(SLD)之和的至少30%减少。

[0181] 如本文所用,“稳定疾病”或“SD”是指以自治疗开始以来的最小SLD作为参照,既没有足够的靶损伤收缩以符合PR,又没有足够的增加以符合PD。

[0182] 如本文所用,“进行性疾病”或“PD”是指以自治疗开始或一个或多个新损伤的存在以来记录的最小SLD作为参照,靶损伤的SLD的至少20%增加。

[0183] 术语“存活”是指患者保持活着,并且包括总体存活以及无进展存活

[0184] 如本文所用,“无进展存活”(PFS)是指所治疗的疾病(例如,癌症)未变差的治疗期间和之后的时间长度。无进展存活可包括患者已经历完全应答或部分应答的时间量,以及患者经历稳定疾病的时间量。

[0185] 如本文所用,“总体存活”(OS)是指在特定持续时间之后可能活着的组中的个体的百分比。

[0186] “延长存活”意指相对于未治疗的患者(即,相对于未用药物治疗的患者),或相对

于不表达指定水平的生物标记的患者,和/或相对于用核准的抗肿瘤剂治疗的患者,增加治疗的患者中的总体或无进展存活。

[0187] 出于本文的目的,组织样品的“切片”意指组织样品的单个部分或片,例如从组织样品(例如,肿瘤样品)切下的组织薄片或细胞。应当理解,可将多个组织样品切片采集并进行分析,条件是应当理解,可在形态和分子水平上分析相同的组织样品切片,或者关于肽(例如,通过免疫组织化学)和/或多核苷酸(例如,通过原位杂交)来分析相同的组织样品切片。

[0188] 如本文所用,术语“特异性结合到”或“对...特异性的”是指可测量的和可再现的相互作用,诸如靶标与抗体的结合,所述结合在存在包括生物分子的分子的异质群体的情况下确定靶标的存在。例如,特异性地结合到靶标(其可以是表位,例如人PD-L1 (SEQ ID NO:1)的氨基酸残基279-290)的抗体是以更大的亲和力、亲合力更更容易地和/或以比结合到其他靶标更长的持续时间结合此靶标的抗体。在一个实施方案中,如例如通过放射免疫测定(RIA)所测量的,抗体与无关的靶标的结合程度小于抗体与靶标的结合的约10%。在某些实施方案中,特异性地结合到靶标的抗体的解离常数(Kd)为 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 或 $\leq 0.1\text{nM}$ 。在某些实施方案中,抗体特异性地结合到在来自不同物种的蛋白质中保守的蛋白质上的表位。在另一个实施方案中,特异性结合可包括但不需要专一性结合。

[0189] “受试者”或“个体”为哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯化动物(例如奶牛、绵羊、猫、狗和马)、灵长类(例如人和非人灵长类,诸如猴)、兔以及啮齿类(例如,小鼠和大鼠)。在某些实施方案中,个体或受试者为人。

[0190] 如本文所用,术语“基本上相同”表示两个数值之间的足够高的相似度,以使得本领域技术人员将认为在通过所述值(例如,Kd值或表达水平)测量的生物学特性的背景下这两个值之间的差异几乎没有或没有生物学和/或统计显著性。所述两个值之间的差异随着参照/比较值的变化而例如小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约20%和/或小于约10%。

[0191] 如本文所用,短语“基本上不同”表示两个数值之间的足够高的差异,以使得本领域技术人员将认为在通过所述值(例如,Kd值或表达水平)测量的生物学特性的背景下这两个值之间的差异具有统计显著性。所述两个值之间的差异随着参照/比较分子的值的变化而例如大于约10%、大于约20%、大于约30%、大于约40%和/或大于约50%。

[0192] “T细胞功能失调性病症”是特征在于对抗原刺激的应答性增加或减少的T细胞的病症或病状。在特定实施方案中,T细胞功能失调性病症是与通过PD-1/PD-L1和/或PD-L1/B7.1进行的不适当增加的信号传导特异性地相关的病症。在另一个实施方案中,T细胞功能失调性病症是T细胞为无变应性的或分泌细胞因子、增殖或执行溶细胞活性的能力下降的病症。在另一个实施方案中,T细胞功能失调是T细胞耗尽由许多慢性感染和癌症期间发生的持续TCR信号传导而引起的T细胞功能失调。其区别于无变应性,因为其不是通过不完全或缺乏的信号传导而是由持续信号传导引起。其被定义为较差的效应子功能、抑制性受体的持续表达,以及与功能效应子或记忆T细胞的转录状态不同的转录状态。耗尽防止感染和肿瘤的最佳控制。耗尽可由外在负调节途径(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)引起。在具体方面,降低的应答性致使对病原体或表达免疫原的肿瘤的控制无效。特征在于T细胞功能失调的T细胞功能失调性病症的实例包

括未解决的急性感染、慢性感染和肿瘤免疫。

[0193] 如本文所用,“治疗(treatment)”(及其语法变化形式,诸如“治疗(treat)”或“治疗(treating)”)是指企图改变所治疗个体的天然病程,且可为实现防治或在临床病变过程中进行的临床介入。合乎需要的治疗效果包括但不限于防止疾病发生或复发性、减轻症状、减弱疾病的任何直接或间接病理学后果、防止转移、降低疾病进展速率、改善或缓解疾病状态以及缓和或改善预后。在一些实施方案中,抗体(例如,抗PD-1抗体和/或抗PD-L1抗体)用来延迟疾病发展或减缓疾病进展。

[0194] 如本文所用,术语“肿瘤”是指所有赘生性细胞生长和增殖(无论恶性还是良性)以及所有癌前和癌性细胞和组织。如本文所提及的,术语“癌症”、“癌性”和“肿瘤”不是相互排斥的。

[0195] 如本文所用,“肿瘤浸润性免疫细胞”是指存在于肿瘤或其样品中的任何免疫细胞。肿瘤浸润性免疫细胞包括但不限于肿瘤内免疫细胞、肿瘤周围免疫细胞、其他肿瘤基质细胞(例如,成纤维细胞)或其任何组合。此类肿瘤浸润性免疫细胞可为例如T淋巴细胞(诸如CD8⁺ T淋巴细胞和/或CD4⁺ T淋巴细胞)、B淋巴细胞或其他骨髓谱系细胞,包括粒细胞(例如,嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和嗜碱性粒细胞)、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞(例如,交错突树突细胞)、组织细胞和自然杀伤细胞。

[0196] 如本文所用,“肿瘤细胞”是指存在于肿瘤或其样品中的任何肿瘤细胞。可使用本领域已知和/或本文所述的方法将肿瘤细胞与可存在于肿瘤样品中的其他细胞(例如,基质细胞和肿瘤浸润性免疫细胞)区分。

[0197] “肿瘤免疫”是指肿瘤逃避免疫识别和清除的过程。因此,作为治疗概念,当所述逃避减弱时,肿瘤免疫被“治疗”,并且肿瘤被免疫系统识别并攻击。肿瘤识别的实例包括肿瘤结合、肿瘤收缩和肿瘤清除。

[0198] “治疗有效量”是指治疗或预防哺乳动物中的疾病或病症的治疗剂的量。在癌症的情况下,治疗剂的治疗有效量可减少癌细胞的数量;减小原发性肿瘤的尺寸;抑制(即,在某种程度上减慢并优选阻止)癌细胞对周边器官的浸润;抑制(即,在某种程度上减慢并在优选阻止)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病症相关的一种或多种症状。在药物可防止生长和/或杀死现有的癌细胞的程度上,它可为细胞抑制的和/或细胞毒性的。对于癌症疗法,可例如通过评估存活的持续时间、疾病进展时间(TTP)、应答率(例如,CR和PR)、应答持续时间和/或生命质量来测量体内功效。

[0199] 术语“可变区”或“可变域”是指抗体重链或轻链中参与使抗体与抗原结合的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变域(分别为VH和VL)通常具有类似结构,其中各域包含四个保守框架区(FR)和三个高变区(HVR)。参见,例如,Kindt等Kuby Immunology,第6版,第91页,W.H.Freeman and Co.,2007。单个VH或VL结构域可足以赋予抗原结合特异性。此外,结合特定抗原的抗体可使用来自结合所述抗原的抗体的VH或VL结构域来分离以分别筛选互补VL或VH结构域的文库。参见,例如,Portolano等J.Immunol.150:880-887,1993,以及Clarkson等Nature.352:624-628,1991。

[0200] 术语“如Kabat中的可变域残基编号”或“Kabat中的氨基酸位置编号”及其变体是指用于Kabat等(上文)中的抗体编译的重链可变域或轻链可变域的编号系统。使用此编号系统,实际线性氨基酸序列可含有较少或另外的氨基酸,其对应于可变域的FR或HVR的缩短

或对其进行的插入。例如,重链可变域可包括H2的残基52之后的单个氨基酸插入(根据Kabat的残基52a)和重链FR残基82之后的插入残基(例如根据Kabat的残基82a、82b和82c等)。可通过在抗体序列的同源区处与“标准”Kabat编号序列比对来确定给定抗体的残基的Kabat编号。

[0201] 当提及可变域中的残基时,通常使用Kabat编号系统(大约轻链的残基1-107和重链的残基1-113)(例如,Kabat等,Sequences of Immunological Interest.第5版.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,Md.(1991))。“EU编号系统”或“EU索引”通常在提及免疫球蛋白重链恒定区中的残基时使用(例如,Kabat等(上文)中报告的EU索引)。“如Kabat中的EU索引”是指人IgG1 EU抗体的残基编号。

[0202] 如本文所用的术语“载体”是指能够使其所连接的另一种核酸增殖的核酸分子。所述术语包括呈自我复制核酸结构的载体,以及并入其已引入的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导与其可操作地连接的核酸的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。

[0203] 当在本文中使用时,“生长抑制剂”是指在体外或体内抑制细胞(例如,生长依赖于PD-L1表达的细胞)的生长和/或增殖的化合物或组合物。因此,生长抑制剂可为显著降低处于S期的细胞的百分比的生长抑制剂。生长抑制剂的实例包括阻断细胞周期进展(在不同于S期的地方)的药剂,诸如诱导G1停滞和M期停滞的药剂。经典的M期阻断剂包括长春花碱(vincas)(长春新碱和长春花碱)、紫杉烷和拓扑异构酶II抑制剂,诸如蒽环类抗生素阿霉素((8S-顺)-10-[(3-氨基-2,3,6-三脱氧- α -L-来苏-己吡喃糖基)氧]-7,8,9,10-四氢-6,8,11-三羟基-8-(羟基乙酰基)-1-甲氧基-5,12-并四苯二酮)、表柔比星、道诺霉素、依托泊苷和博来霉素。停滞G1的那些药剂也外溢到S期停滞,例如DNA烷化剂诸如他莫昔芬、泼尼松、达卡巴嗪、氮芥、顺铂、甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶和阿糖胞苷。另外的信息可见于Mendelsohn和Israel编的“The Molecular Basis of Cancer,”的第1章,由Murakami等撰写的名称为“Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs”(WB Saunders:Philadelphia,1995),尤其是第13页。紫杉烷(紫杉醇和多西他赛)是来源于紫杉树的抗癌药。来源于欧洲紫杉的多西他赛(TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer)是紫杉醇(TAXOL®, Bristol-Myers Squibb)的半合成类似物。紫杉醇和多西他赛促进由微管蛋白二聚体组装微管并通过防止解聚来稳定微管,这导致细胞中有丝分裂的抑制。

[0204] “放射疗法”是指使用定向的 γ 射线或 β 射线来诱导对细胞的足够损伤,以便限制其正常发挥功能的能力或完全破坏细胞。应当理解,将存在许多在本领域中已知的方法来确定治疗的剂量和持续时间。典型的治疗作为一次性施用给予,并且典型剂量的范围为每天10至200个单位(戈瑞)。

[0205] 如本文所用,术语“患者”或“受试者”可互换地使用,并且是指期望治疗的任何单个动物,更优选地哺乳动物(包括例如像狗、猫、马、兔、动物园动物、奶牛、猪、绵羊以及非人灵长类动物那样的非人动物)。在特定实施方案中,本文中的患者为人。

[0206] 如本文所用,“施用”意指向受试者(例如,患者)给予一定剂量的化合物(例如,抗癌治疗剂)或药物组合物(例如,包含抗癌治疗剂的药物组合物)的方法。施用可通过任何合适的方式进行,包括肠胃外、肺内和鼻内,以及(如果局部治疗需要)损伤内施用。胃肠外输

注包括例如肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。部分地根据施用是否为短暂的或长期的,给药可通过任何适合的途径进行,例如通过注射,诸如静脉内或皮下注射。本文涵盖各种给药排程,包括但不限于单次施用或各种时间点内的多次施用、推注施用(bolus administration)和脉冲输注。

[0207] 术语“同时地”在本文中是指施用两种或更多种治疗剂,其中至少部分施用在时间上重叠。因此,同时施用包括当在停止施用一种或多种其他试剂之后继续施用一种或多种试剂时的给药方案。

[0208] II. 组合物和方法

[0209] 本发明提供结合到PD-L1的新型抗体。本发明的抗体用于例如检测PD-L1的存在或PD-L1的表达水平(例如,在包括肿瘤样品的生物样品中)。

[0210] A. 示例性抗PD-L1抗体

[0211] 本发明提供用于例如诊断应用(例如,免疫组织化学(IHC)、免疫荧光(IF)和免疫印迹(例如,蛋白质印迹))的抗PD-L1抗体。在一个实例中,本发明提供结合到包含PD-L1的氨基酸残基279-290(例如,人PD-L1 SKKQSDTHLEET (SEQ ID NO:1)的氨基酸残基279-290)的表位的抗PD-L1抗体,所述氨基酸残基279-290是人PD-L1的N端胞质区的一部分。PD-L1上的表位可以依赖构象的或不依赖构象的方式识别。

[0212] 在一些情况下,结合到PD-L1的氨基酸残基279-290的抗PD-L1抗体包含选自以下的至少一种、两种、三种、四种、五种或六种HVR:(a) HVR-H1,其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;(b) HVR-H2,其包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列;(c) HVR-H3,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列;(d) HVR-L1,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;(e) HVR-L2,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;以及(f) HVR-L3,其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。例如,在一些情况下,抗PD-L1抗体包含:(a) HVR-H1,其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;(b) HVR-H2,其包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列;以及(c) HVR-H3,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。在一些情况下,抗PD-L1抗体包含:(a) HVR-L1,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列;(b) HVR-L2,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列;以及(c) HVR-L3,其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0213] 在抗PD-L1抗体结合到PD-L1的氨基酸残基279-290并且包含:(a) HVR-H1,其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;(b) HVR-H2,其包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列;以及(c) HVR-H3,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的一些情况下,所述抗PD-L1抗体还包含以下重链可变域框架区(FR):(a) FR-H1,其包含QSLEESGGRLVKPDETLTITCTVSGIDLS (SEQ ID NO:5)的氨基酸序列;(b) FR-H2,其包含WVRQAPGEGLEWIG (SEQ ID NO:6)的氨基酸序列;(c) FR-H3,其包含RLTISKPSSTKVDLKITSPPTTEDTATYFCGR (SEQ ID NO:7)的氨基酸序列;或(d) FR-H4,其包含WPGTLVTVSS (SEQ ID NO:8)的氨基酸序列。在抗PD-L1抗体结合到PD-L1的氨基酸残基279-290并且包含:(a) HVR-H1,其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;(b) HVR-H2,其包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列;以及(c) HVR-H3,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的一些情况下,所述抗PD-L1抗体还包含以下重链可变域框架区(FR):(a) FR-H1,其包含QSLEESGGRLVKPDETLTITCTVSGIDLS (SEQ ID NO:5)的氨基酸序列;(b) FR-H2,其包含WVRQAPGEGLEWIG (SEQ ID NO:6)的氨基酸序列;(c) FR-H3,其包含RLTISKPSSTKVDLKITSPPTTEDTATYFCGR (SEQ ID NO:7)的氨基酸序列;以及(d) FR-H4,其包含WPGTLVTVSS (SEQ ID NO:8)的氨基酸序列。

[0214] 在抗PD-L1抗体结合到PD-L1的氨基酸残基279-290的一些情况下,所述抗体包含:(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列;(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列;(d)HVR-L1,其包含QASESVYSNNYLS (SEQ ID NO:9)的氨基酸序列;(e)HVR-L2,其包含LASTLAS (SEQ ID NO:10)的氨基酸序列;以及(f)HVR-L3,其包含IGGKSSSTDGNA (SEQ ID NO:11)的氨基酸序列。在一些情况下,这些抗PD-L1抗体包含以下FR:(a)FR-H1,其包含QSLEESGGRLVKPDETLTITCTVSGIDLS (SEQ ID NO:5)的氨基酸序列;(b)FR-H2,其包含WVRQAPGEGLEWIG (SEQ ID NO:6)的氨基酸序列;(c)FR-H3,其包含RLTISKPSSTKVDLKITSPPTTEDTATYFCGR (SEQ ID NO:7)的氨基酸序列;以及(d)FR-H4,其包含WGPGLTVTVSS (SEQ ID NO:8)的氨基酸序列,并且可另外或可替代地包含:(e)FR-L1,其包含AIVMTQTPSPVSAAVGGTVTINC (SEQ ID NO:12)的氨基酸序列;(f)FR-L2,其包含WFQQKPGQPPLLIIY (SEQ ID NO:13)的氨基酸序列;(g)FR-L3,其包含GVPSRFKSGSGTQFTLTI SGVQCDDAATYYC (SEQ ID NO:14)的氨基酸序列;以及(h)FR-L4,其包含FGGGTEVVVR (SEQ ID NO:15)的氨基酸序列。

[0215] 在一些情况下,结合到PD-L1的氨基酸残基279-290的抗PD-L1抗体还可包含重链可变域(VH)序列,所述重链可变域(VH)序列与SEQ ID NO:16的氨基酸序列具有至少80%(例如,至少81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%或89%)、至少90%(例如,至少91%、92%、93%或94%)或至少95%(例如,至少96%、97%、98%或99%)序列同一性或具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的序列。在某些实施方案中,具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VH序列相对于参照序列(SEQ ID NO:16)含有置换(例如,保守置换)、插入或缺失,但是包含所述序列的抗PD-L1抗体保留结合到PD-L1的能力。在某些实施方案中,总计1至10个氨基酸(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸)已在SEQ ID NO:16中置换、插入和/或缺失。在某些实施方案中,置换、插入或缺失发生在HVR以外的区域中(即在FR中)。任选地,抗PD-L1抗体包含SEQ ID NO:16中的VH序列,包含所述序列的翻译后修饰。在特定实施方案中,VH包含选自以下的一种、两种或三种HVR:(a)HVR-H1,其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列;(b)HVR-H2,其包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列;以及(c)HVR-H3,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列。

[0216] 在一些情况下,结合到PD-L1的氨基酸残基279-290的抗PD-L1抗体还可包含轻链可变域(VL),所述轻链可变域(VL)与SEQ ID NO:17的氨基酸序列具有至少80%(例如,至少81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%或89%)、至少90%(例如,至少91%、92%、93%或94%)或至少95%(例如,至少96%、97%、98%或99%)序列同一性或具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的序列。在某些实施方案中,具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的VL序列相对于参照序列(SEQ ID NO:17)含有置换(例如,保守置换)、插入或缺失,但是包含所述序列的抗PD-L1抗体保留结合到PD-L1的能力。在某些实施方案中,总计1至10个氨基酸(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸)已在SEQ ID NO:17中置换、插入和/或缺失。在某些实施方案中,置换、插入或缺失发生在HVR以外的区域中(即在FR中)。任选地,抗PD-L1抗体包含SEQ ID NO:17中的VL序列,包含所述序列的翻译后修饰。在特定实施方案中,VL包含选自以下的一种、两种或三种HVR:(a)HVR-L1,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序

列；(b) HVR-L2,其包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列；以及(c) HVR-L3,其包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0217] 在一些情况下,结合到PD-L1的氨基酸残基279-290的抗PD-L1抗体包含VH和VL序列,所述VH和VL序列分别与SEQ ID NO:16和17的氨基酸序列具有至少80% (例如,至少81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%或89%)、至少90% (例如,至少91%、92%、93%或94%)或至少95% (例如,至少96%、97%、98%或99%)序列同一性或分别具有SEQ ID NO:16和17的氨基酸序列的序列,并且可以或不包含这些序列的翻译后修饰。

[0218] 在其他情况下,本发明提供特异性地结合PD-L1的抗体,其中所述抗体包含:(a) HVR-H1,其包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列；(b) HVR-H2,其包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列；(c) HVR-H3,其包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列；(d) HVR-L1,其包含QASESVYSNNYLS (SEQ ID NO:9)的氨基酸序列；(e) HVR-L2,其包含LASTLAS (SEQ ID NO:10)的氨基酸序列；以及(f) HVR-L3,其包含IGGKSSSTDGNA (SEQ ID NO:11)的氨基酸序列。在一些情况下,这些抗PD-L1抗体包含以下FR:(a) FR-H1,其包含QSLEESGGRLVKPDETLTITCTVSGIDLS (SEQ ID NO:5)的氨基酸序列；(b) FR-H2,其包含WVRQAPGEGLEWIG (SEQ ID NO:6)的氨基酸序列；(c) FR-H3,其包含RLTISKPSSTKVDLKITSPPTEDTATYFCGR (SEQ ID NO:7)的氨基酸序列；以及(d) FR-H4,其包含WPGTLVTVSS (SEQ ID NO:8)的氨基酸序列,并且可另外或可替代地包含:(e) FR-L1,其包含AIVMTQTPSPVSAAVGGTVTINC (SEQ ID NO:12)的氨基酸序列；(f) FR-L2,其包含WFQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO:13)的氨基酸序列；(g) FR-L3,其包含GVPSRFKSGSGTQFTLTISGVQCDDAATYYC (SEQ ID NO:14)的氨基酸序列；以及(h) FR-L4,其包含FGGGTEVVVR (SEQ ID NO:15)的氨基酸序列。例如,在一些实施方案中,抗PD-L1抗体包含VH和VL序列,所述VH和VL序列分别包含SEQ ID NO:16和17的氨基酸序列的序列,并且可以或不包含翻译后修饰。

[0219] 例如,本发明的特征在于抗PD-L1抗体,诸如具有以下重链可变区序列和轻链可变区序列的抗PD-L1抗体SP142。

[0220] SP142的重链可变区的氨基酸序列如下:

QSLEESGGRLVKPDETLTITCTVSGIDLSSNGLTWVRQAPGEGLEWIGTINKDASAYYASWAKGRLTISKP

[0221] HVR-H1 HVR-H2
SSTKVDLKITSPPTEDTATYFCGRIAFKTGTSIWWPGTLVTVSS (SEQ ID NO: 16)。

HVR-H3

[0222] SP142的轻链可变区的氨基酸序列如下:

AIVMTQTPSPVSAAVGGTVTINCQASESVYSNNYLSWFQQKPGQPPKLLIYLASTLASGVPSRFKSGSGG

[0223] HVR-L1 HVR-L2
TQFTLTISGVQCDDAATYYCIGGKSSSTDGNAFGGGTEVVVR (SEQ ID NO: 17)。

HVR-L3

[0224] 在一些情况下,本发明的抗PD-L1抗体是与上述抗PD-L1抗体中的任何一种或多种竞争结合到PD-L1的抗体。在一些情况下,本发明的抗PD-L1抗体是与上述抗PD-L1抗体中的任何一种或多种结合到相同的表位或基本上相同的表位的抗体。

[0225] 在一些情况下,根据任何以上实施方案的抗PD-L1抗体可为包括嵌合抗体、人源化抗体或人抗体的单克隆抗体。在一个实施方案中,抗PD-L1抗体为抗体片段,例如Fv、Fab、Fab'、scFv、双抗体或F(ab')₂片段。在另一个实施方案中,抗体为全长抗体,例如完整IgG抗

体(例如,完整IgG1抗体)或如本文所定义的其他抗体类别或同种型。

[0226] 应当理解,本发明的抗PD-L1抗体虽然如由以下实例所例证的那样用于检测生物样品中PD-L1的存在或表达水平,但还可用于或适于治疗性用途。

[0227] 在其他方面,根据任何以上实施方案的抗PD-L1抗体可并入单一或成组合形式的如以下部分1-5中所述的任何特征。

[0228] 1. 抗体亲和力

[0229] 在某些实施方案中,本文提供的抗体的解离常数(Kd)为 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 、 $\leq 0.1\text{nM}$ 、 $\leq 0.01\text{nM}$ 或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如, 10^{-8}M 或更少,例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M)。

[0230] 在一个实施方案中,Kd是如以下测定所述,通过用目标抗体的Fab型式及其抗原进行放射性标记抗原结合测定(RIA)来测量。Fab对抗原的溶液结合亲和力是通过在一滴定系列的未标记抗原存在下,使Fab与最小浓度的(^{125}I)标记的抗原平衡,然后用抗Fab抗体涂布的板捕获所结合抗原来测量(参见,例如Chen等J.Mol.Biol.293:865-881,1999)。为建立测定条件,将MICROTITER®多孔板(Thermo Scientific)用含 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 捕获抗Fab抗体(Cappel Labs)的 50mM 碳酸钠(pH 9.6)涂布过夜,并且随后在室温(大约 23°C)下用含2%(w/v)牛血清白蛋白的PBS阻断2至5小时。在非吸附性板(Nunc号269620)中,将 100pM 或 26pM [^{125}I]-抗原与目标Fab的连续稀释液混合(例如,符合Presta等Cancer Res.57:4593-4599,1997中对抗VEGF抗体Fab-12的评估)。然后将目标Fab孵育过夜;然而,孵育可持续较长时间(例如约65小时)以确保达到平衡。此后,将混合物转移至捕获板,以在室温下孵育(例如1小时)。然后将溶液移除,并且将板用含0.1%聚山梨醇酯20(TWEEN-20™)的PBS洗涤八次。当板已干燥时,每孔添加 $150\mu\text{l}$ 闪烁体(MICROSCINT-20™;Packard),且将板在TOPCOUNT™ γ 计数器(Packard)上计数10分钟。选择产生小于或等于最大结合的20%的各Fab的浓度以用于竞争性结合测定中。

[0231] 根据另一个实施方案,使用BIACORE®-2000或BIACORE®-3000(BIAcore, Inc.,Piscataway,NJ),用固定的抗原CM5芯片在约10个应答单位(RU)下在 25°C 下使用表面等离子体共振测定来测量Kd。简而言之,根据供货商说明书用N-乙基-N'- (3-二甲基氨基丙基)-碳化二亚胺盐酸盐(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化羧甲基化葡聚糖生物传感器芯片(CM5,BIACORE, Inc.)。用 10mM 乙酸钠(pH 4.8)将抗原稀释至 $5\mu\text{g}/\text{ml}$ ($0.2\mu\text{M}$),随后在流速 $5\mu\text{l}/\text{min}$ 下注射以实现约10个应答单位(RU)的偶联蛋白。在注射抗原之后,注射 1M 乙醇胺以阻断未反应的基团。对于动力学测量,在 25°C 下在流速约 $25\mu\text{l}/\text{min}$ 下注射Fab于含0.05%聚山梨醇酯20(TWEEN-20™)表面活性剂的PBS(PBST)中的两倍连续稀释液(0.78nM 至 500nM)。通过同时拟合缔合和解离传感器图,使用简单一对朗缪尔结合模型(BIACORE®评估软件3.2版)计算缔合速率($k_{\text{缔合}}$)和解离速率($k_{\text{解离}}$)。平衡解离常数(Kd)被计算为比率 $k_{\text{解离}}/k_{\text{缔合}}$ 。参见,例如Chen等J.Mol.Biol.293:865-881,1999。如果根据以上表面等离子体共振测定的缔合速率超过 $10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$,则然后可通过使用荧光淬灭技术来测定缔合速率,所述荧光淬灭技术测量在如在分光计(诸如停流配备分光光度计(Aviv Instruments)或具有搅拌比色皿的8000系列SLM-AMINCO™分光光度计(ThermoSpectronic))中测量的递增浓度的抗原存在下,在 25°C 下于PBS(pH 7.2)中的 20nM 抗抗原抗体(Fab形式)的荧光发射强度(激发= 295nm ;发射= 340nm , 16nm 带通)的增加或降

低。

[0232] 2. 抗体片段

[0233] 在某些实施方案中,本文提供的抗体为抗体片段。抗体片段包括但不限于Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv和scFv片段以及下述其他片段。对于某些抗体片段的综述,参见Hudson等*Nat. Med.* 9:129-134, 2003。对于scFv片段的综述,参见,例如Pluckthun. *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies*. 第113卷,第269-315页, Rosenburg和Moore编 Springer-Verlag, New York, 1994; 还参见W0 93/16185; 以及美国专利号5,571,894和5,587,458。对于包含结合表位残基的补救受体且体内半衰期增加的Fab和F(ab')₂片段的论述,参见美国专利号5,869,046。

[0234] 双抗体是可为二价或双特异性的具有两个抗原结合位点的抗体片段。参见,例如EP 404,097; W0 1993/01161; Hudson等*Nat. Med.* 9:129-134, 2003; 以及Hollinger等*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:6444-6448, 1993。三抗体和四抗体也描述于Hudson等*Nat. Med.* 9:129-134, 2003中。

[0235] 单域抗体是包含抗体的全部或一部分重链可变域或全部或一部分轻链可变域的抗体片段。在某些实施方案中,单域抗体是人单域抗体(Domantis公司, Waltham, MA; 参见,例如美国专利号6,248,516)。

[0236] 抗体片段可通过各种技术制备,包括但不限于蛋白水解消化完整抗体以及如本文所述,通过重组宿主细胞(例如大肠杆菌(*E. coli*)或噬菌体)产生。

[0237] 3. 嵌合抗体和人源化抗体

[0238] 在某些实施方案中,本文提供的抗体为嵌合抗体。某些嵌合抗体描述于例如美国专利号4,816,567; 以及Morrison等*Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81:6851-6855, 1984中。在一个实施例中,嵌合抗体包含非人可变区(例如来源于小鼠、大鼠、仓鼠、兔或非人灵长类诸如猴的可变区)和人恒定区。在又一个实施例中,嵌合抗体为“类别转换”抗体,其中类别或亚类与亲本抗体的类别或亚类相比已经改变。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0239] 在某些实施方案中,嵌合抗体为人源化抗体。通常,非人抗体被人源化以降低对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。一般说来,人源化抗体包含一个或多个可变域,其中例如CDR的HVR(或其部分)来源于非人抗体,并且FR(或其部分)来源于人抗体序列。人源化抗体任选还将包含至少一部分人恒定区。在一些实施方案中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如HVR残基所来源的抗体)的相应残基置换,例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0240] 人源化抗体以及制备它们的方法回顾于例如Almagro等*Front. Biosci.* 13:1619-1633, 2008中,并且还描述于例如Riechmann等*Nature.* 332:323-329, 1988; Queen等*Proc. Natl. 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“表面重修”); DaU' Acqua等*Methods.* 36:43-60, 2005(描述“FR改组”); 以及Osborn等*Methods* 36:61-68, 2005, 和Klimka等*Br. J. Cancer.* 83:252-260, 2000(描述FR改组的“定向选择”方法)中。

[0241] 可用于人源化的人框架区包括但不限于:使用“最佳拟合”法选择的框架区(参见,例如Sims等*J. Immunol.* 151:2296, 1993); 来源于具有轻链可变区或重链可变区的特定亚

组的人抗体的共有序列的框架区(参见,例如Carter等Proc.Natl.Acad.Sci.USA.89:4285,1992;以及Presta等J.Immunol.151:2623,1993);人成熟(体细胞突变)框架区或人生殖系框架区(参见,例如Almagro等Front.Biosci.13:1619-1633,2008);以及来源于筛选FR文库的框架区(参见,例如Baca等J.Biol.Chem.272:10678-10684,1997,和Rosok等J.Biol.Chem.271:22611-22618,1996)。

[0242] 4. 多特异性抗体

[0243] 在某些实施方案中,本文提供的抗体为多特异性抗体,例如双特异性抗体。多特异性抗体为对至少两个不同位点具有结合特异性的单克隆抗体。在某些实施方案中,一种结合特异性是针对PD-L1,并且另一种是针对任何其他抗原。在某些实施方案中,双特异性抗体可结合PD-L1的两个不同表位。双特异性抗体也可用于使细胞毒性剂定位于表达PD-L1的细胞。双特异性抗体可制备成全长抗体或抗体片段。

[0244] 用于制备多特异性抗体的技术包括但不限于具有不同特异性的两个免疫球蛋白重链-轻链对的重组共表达(参见,Milstein等Nature.305:537,1983,WO 93/08829,和Traunecker等EMBO J.10:3655,1991)以及“knob-in-hole”工程(参见,例如美国专利号5,731,168)。多特异性抗体还可通过以下方式制备:工程改造静电转向效应以制备抗体Fc异二聚体分子(WO 2009/089004A1);使两个或更多个抗体或片段交联(参见,例如美国专利号4,676,980和Brennan等Science.229:81,1985);使用亮氨酸拉链产生双特异性抗体(参见,例如Kostelny等J.Immunol.148(5):1547-1553,1992);使用“双抗体”技术以制备双特异性抗体片段(参见,例如Hollinger等Proc.Natl.Acad.Sci.USA.,90:6444-6448,1993);以及使用单链Fv(sFv)二聚体(参见,例如Gruber等J.Immunol.152:5368,1994);以及制备如例如Tutt等J.Immunol.147:60,1991中所述的三特异性抗体。

[0245] 本文还包括具有三个或更多个功能性抗原结合位点的改造抗体,包括“章鱼抗体(Octopus antibody)”(参见例如US 2006/0025576A1)。

[0246] 本文抗体或片段也包括“双重作用性Fab”或“DAF”,其包含结合PD-L1以及另一不同抗原的抗原结合位点(参见,例如US 2008/0069820)。

[0247] 5. 抗体变体

[0248] 在某些实施方案中,涵盖本文提供的抗体的氨基酸序列变体。例如,可能需要改善抗体的结合亲和力和/或其他生物特性。抗体的氨基酸序列变体可通过将适当修饰引入编码抗体的核苷酸序列中或通过肽合成来制备。此类修饰包括例如抗体的氨基酸序列内的残基的缺失和/或插入和/或置换。可对缺失、插入和置换进行任何组合以获得最终构建体,其限制条件为最终构建体具有所需特征,例如抗原结合性。

[0249] a) 置换、插入和缺失变体

[0250] 在某些实施方案中,提供具有一个或多个氨基酸置换的抗体变体。用于置换性诱变的目标位点包括HVR和FR。保守性置换展示于表1中的标题“优选置换”下。更实质性变化提供于表1中的标题“示例性置换”下,且如以下关于氨基酸侧链类别进一步所述。氨基酸置换可引入目标抗体和经筛选所需活性(例如,保留的/改善的抗原结合性、降低的免疫原性或改善的ADCC或CDC)的产物中。

[0251] 表1. 示例性和优选的氨基酸置换

	原始 残余	示例性 置换	优选 置换
	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
[0252]	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
	原始 残余	示例性 置换	优选 置换
[0253]	Val (V)	Ile ; Leu ; Met ; Phe ; Ala ; 正亮氨酸	Leu

[0254] 可根据共同的侧链特性来将氨基酸分组：

[0255] (1) 疏水性：正亮氨酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；

[0256] (2) 中性亲水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；

[0257] (3) 酸性：Asp、Glu；

[0258] (4) 碱性：His、Lys、Arg；

[0259] (5) 影响链取向的残基：Gly、Pro；

[0260] (6) 芳族：Trp、Tyr、Phe。

[0261] 非保守性置换将需要将这些类别中的一类的成员更换成另一类别。

[0262] 一种类型的置换变体涉及置换亲本抗体(例如,人源化抗体或人抗体)的一个或多个高变区残基。一般说来,选择用于进一步研究的所得变体相对于亲本抗体将在某些生物

特性方面具有修饰(例如改善)(例如亲和力增加、免疫原性降低)和/或将基本上保留亲本抗体的某些生物特性。一个示例性置换变体为亲和力成熟抗体,其可例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术(诸如本文描述的那些技术)便利地产生。简而言之,使一个或多个HVR残基突变,并且使变体抗体展示在噬菌体上并筛选特定生物活性(例如结合亲和力)。

[0263] 可在HVR中进行改变(例如置换)以例如改善抗体亲和力。此类改变可在HVR“热点”(即由在体细胞成熟过程期间以高频率进行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,测试所得变体VH或VL的结合亲和力。通过构建和从二级文库重选进行的亲和力成熟已在例如Hoogenboom等Methods in Molecular Biology.178:1-37,0' Brien等编,Human Press, Totowa,NJ,2001中有所描述。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向诱变)中的任一种将多样性引入选用于成熟的可变基因中。然后产生二级文库。然后筛选文库以鉴别具有所需亲和力的任何抗体变体。引入多样性的另一方法涉及HVR定向方法,其中使若干HVR残基(例如一次4-6个残基)随机化。可例如使用丙氨酸扫描诱变或模型化来特异性地鉴别抗原结合中涉及的HVR残基。具体说来,常常靶向HVR-H3和HVR-L3。

[0264] 在某些实施方案中,置换、插入或缺失可发生在一个或多个HVR内,只要这些改变基本上不降低抗体结合抗原的能力即可。例如,可在HVR中进行基本上不降低结合亲和力的保守性改变(例如如本文所提供的保守性置换)。此类改变可处于HVR“热点”或SDR以外。在以上提供的变体VH和VL序列的某些实施方案中,各HVR未被改变或含有不超过一个、两个或三个氨基酸置换。

[0265] 用于鉴别可经靶向以诱变的抗体的残基或区的有用方法被称为如由Cunningham等Science.244:1081-1085,1989所述的“丙氨酸扫描诱变”。在此方法中,鉴别某一残基或一组目标残基(例如带电荷残基,诸如Arg、Asp、His、Lys和Glu)且置换为中性或带负电荷氨基酸(例如丙氨酸或聚丙氨酸)以确定抗体与抗原的相互作用是否受到影响。可在对初始置换显示功能敏感性的氨基酸位置上引入进一步置换。可替代地或另外,抗原-抗体复合物的晶体结构用来鉴别抗体与抗原之间的接触点。此类接触残基和相邻残基可作为置换的候选物而被靶向或消除。可筛选变体以确定其是否含有所需特性。

[0266] 氨基酸序列插入包括长度在一个残基至含有一百个或更多个残基的多肽的范围内的氨基末端和/或羧基末端融合,以及具有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端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其他插入变体包括抗体的N端或C端与增加抗体的血清半衰期的酶(例如用于ADEPT)或多肽的融合。

[0267] b) 糖基化变体

[0268] 在某些实施方案中,改变本文提供的抗体以提高或降低抗体糖基化的程度。对抗体添加糖基化位点或使抗体缺失糖基化位点可通过改变氨基酸序列以使得产生或除去一个或多个糖基化位点来便利地实现。

[0269] 当抗体包含Fc区时,可改变与其连接的碳水化合物。由哺乳动物细胞产生的天然抗体通常包含一般通过N-键连接到Fc区的CH₂域的Asn297的分支二天线寡糖。参见,例如Wright等TIBTECH.15:26-32,1997。寡糖可包括各种碳水化合物,例如甘露糖、N-乙酰基葡萄糖胺(GlcNAc)、半乳糖和唾液酸,以及连接到二天线寡糖结构的“主干”中的GlcNAc的岩藻

糖。在一些实施方案中,可对本发明的抗体中的寡糖进行修饰以产生具有某些改善特性的抗体变体。

[0270] 在一个实施方案中,提供具有缺乏(直接或间接)连接到Fc区上的岩藻糖的碳水化合物结构的抗体变体。例如,岩藻糖在此类抗体中的量可为1%至80%、1%至65%、5%至65%或20%至40%。如通过MALDI-TOF质谱法所测量,通过相对于连接到Asn297的所有糖结构(例如复合、杂合和高甘露糖结构)的总和计算Asn297上的糖链内岩藻糖的平均量来测定岩藻糖的量,如例如WO 2008/077546中所述。Asn297是指位于Fc区中大致位置297(Fc区残基的Eu编号)上的天冬酰胺残基;然而,Asn297也可由于抗体中的微小序列变化而位于位置297的上游或下游约±3个氨基酸处,即在位置294与300之间。此类岩藻糖基化变体可具有改善的ADCC功能。参见,例如美国专利号US 2003/0157108和US 2004/0093621。与“去岩藻糖基化”或“岩藻糖缺陷型”抗体变体相关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;以及Yamane-Ohnuki等Biotech.Bioeng.87:614,2004。能够产生去岩藻糖基化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;US 2003/0157108;以及WO 2004/056312,特别是在实施例11处)和敲除细胞系,诸如 α -1,6-岩藻糖基转移酶基因FUT8、敲除CHO细胞(参见,例如Yamane-Ohnuki等Biotech.Bioeng.87:614,2004;Kanda等Biotechnol.Bioeng.94(4):680-688,2006;以及WO2003/085107)。

[0271] 进一步提供具有二等分寡糖的抗体变体,例如其中连接到抗体的Fc区的二天线寡糖是由GlcNAc二等分。此类抗体变体可具有降低的岩藻糖基化和/或改善的ADCC功能。此类抗体变体的实例描述于例如WO 2003/011878;美国专利号6,602,684;以及US 2005/0123546中。还提供在连接到Fc区的寡糖中具有至少一个半乳糖残基的抗体变体。此类抗体变体可具有改善的CDC功能。此类抗体变体描述于例如WO 1997/30087;WO 1998/58964;以及WO 1999/22764中。

[0272] c) Fc区变体

[0273] 在某些实施方案中,可将一个或多个氨基酸修饰引入本文提供的本发明的抗PD-L1抗体(例如,SP142)的Fc区中,由此生成Fc区变体。Fc区变体可包含在一个或多个氨基酸位置上包含氨基酸修饰(例如置换)的人Fc区序列(例如人IgG₁、IgG₂、IgG₃或IgG₄ Fc区)。

[0274] 在某些实施方案中,本发明涵盖具有一些而非所有效应子功能的抗体变体,所述效应子功能使所述抗体变体成为抗体的体内半衰期较为重要但某些效应子功能(诸如补体和ADCC)不必要或有害的应用所需要的候选物。可进行体外和/或体内细胞毒性测定以确认CDC和/或ADCC活性的降低/减少。例如,可进行Fc受体(FcR)结合测定以确保抗体缺乏Fc γ R结合性(因此可能缺乏ADCC活性),但保留Fc γ Rn结合能力。用于介导ADCC的初级细胞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表达概述于Ravetch等Annu.Rev.Immunol.9:457-492,1991的第464页上的表3中。评估目标分子的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和5,821,337;Hellstrom等Proc.Natl.Acad.Sci.USA.83:7059-7063,1986;Hellstrom等Proc.Natl

Acad.Sci.USA.82:1499-1502,1985;以及Bruggemann等J.Exp.Med.166:1351-1361,1987中。可替代地,可采用非放射性测定方法(参见例如用于流式细胞术的ACT1™非放射性细胞毒性测定(CellTechnology公司Mountain View,CA);以及CytoTox 96®非放射性细胞毒性测定(Promega, Madison, WI)。用于此类测定的有效效应子细胞包括外周血液单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。可替代地或另外,目标分子的ADCC活性可例如在动物模型,诸如Clynes等Proc.Natl.Acad.Sci.USA.95:652-656,1998中公开的动物模型中进行体内评估。还可进行C1q结合测定以确认抗体不能结合C1q并且因此缺乏CDC活性。参见,例如W0 2006/029879和W0 2005/100402中的C1q和C3c结合ELISA。为评估补体活化,可进行CDC测定(参见,例如Gazzano-Santoro等J.Immunol.Methods.202:163,1996;Cragg等Blood.101:1045-1052,2003;以及Cragg等Blood 103:2738-2743,2004。也可使用本领域中已知的方法对FcRn结合和体内清除率/半衰期进行测定(参见,例如Petkova等Intl.Immunol.18(12):1759-1769,2006)。

[0275] 效应子功能降低的抗体包括在Fc区残基238、265、269、270、297、327和329的一个或多个中有置换的抗体(美国专利号6,737,056)。此类Fc突变体包括在氨基酸位置265、269、270、297和327中的两个或更多个处具有置换的Fc突变体,包括残基265和297置换成丙氨酸的所谓“DANA”Fc突变体(美国专利号7,332,581)。

[0276] 与FcR的结合改善或削弱的某些抗体变体已有描述。参见,例如美国专利号6,737,056;W0 2004/056312;以及Shields等J.Biol.Chem.9(2):6591-6604,2001。

[0277] 在某些实施方案中,抗体变体包含具有一个或多个改善的ADCC的氨基酸置换(例如在Fc区的位置298、333和/或334(EU残基编号)处的置换)的Fc区。

[0278] 在一些实施方案中,在Fc区中进行导致C1q结合和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)改变(即改善或削弱)的改变,例如如美国专利号6,194,551、W0 99/51642以及Idusogie等J.Immunol.164:4178-4184,2000中所述。

[0279] 美国专利申请号2005/0014934中描述了具有增加的半衰期和改善的与新生儿Fc受体(FcRn)的结合的抗体,所述抗体负责将母体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改善Fc区与FcRn的结合的一个或多个置换的Fc区。此类Fc变体包括在以下一个或多个Fc区残基处具有置换的变体:238、256、265、272、286、303、305、307、311、312、317、340、356、360、362、376、378、380、382、413、424或434,例如Fc区残基434的置换(美国专利号7,371,826)。还参见关于Fc区变体的其他实例的Duncan等Nature.322:738-740,1988;美国专利号5,648,260和5,624,821;以及W0 94/29351。

[0280] d) 半胱氨酸工程化抗体变体

[0281] 在某些实施方案中,可能需要产生半胱氨酸改造抗体,例如“巯基单抗(thioMAb)”,其中抗体的一个或多个残基被半胱氨酸残基置换。在特定实施方案中,置换的残基存在于抗体的可及位点处。通过用半胱氨酸置换那些残基,反应性硫醇基由此定位在抗体的可及位点处且可用于使抗体缀合至其他部分(诸如药物部分或接头-药物部分)以产生如本文进一步所述的免疫缀合物。在某些实施方案中,以下残基中的任一种或多种均可被半胱氨酸置换轻链的V205(Kabat编号);重链的A118(EU编号);和重链Fc区的S400(EU编号)。可如例如美国专利号7,521,541中所述来生成半胱氨酸改造抗体。

[0282] e) 抗体衍生物

[0283] 在某些实施方案中,本文提供的本发明的抗PD-L1抗体(例如,SP142)可被进一步修饰以含有本领域中已知且容易获得的另外非蛋白质部分。适于使抗体衍生化的部分包括但不限于水溶性聚合物。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-1,3-二氧杂环戊烷、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/顺丁烯二酸酐共聚物、聚氨基酸(均聚物或无规共聚物),以及葡聚糖或聚(n-乙基吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛由于其在水中的稳定性可具有制造优势。所述聚合物可具有任何分子量,并且可为分支或未分支的。连接到抗体的聚合物的数目可变化,并且如果连接多于一个聚合物,那么其可为相同或不同分子。一般说来,用于衍生化的聚合物的数目和/或类型可基于包括但不限于有待改善的抗体的特定特性或功能、抗体衍生物是否将在确定条件下用于疗法中等考虑因素加以确定。

[0284] 在另一个实施方案中,提供抗体与可通过暴露于辐射而选择性加热的非蛋白质部分的缀合物。在一个实施方案中,非蛋白质部分为碳纳米管(Kam等Proc.Natl.Acad.Sci.USA.102:11600-11605,2005)。辐射可具有任何波长,并且包括但不限于不损害普通细胞但会将非蛋白质部分加热至杀死邻近于抗体-非蛋白质部分的细胞的温度的波长。

[0285] B. 重组方法和组合物

[0286] 可使用例如如美国专利号4,816,567中所述的重组方法和组合物来产生抗体。在一个实施方案中,提供编码本文所述的抗PD-L1抗体(例如,SP142)的分离核酸。此类核酸可编码包含抗体的VL的氨基酸序列和/或包含抗体的VH的氨基酸序列(例如抗体的轻链和/或重链)。在又一个实施方案中,提供一种或多种包含此类核酸的载体(例如表达载体)。在又一个实施方案中,提供包含此类核酸的宿主细胞。在一个此类实施方案中,宿主细胞包含(例如已用以下转化):(1)包含编码包含抗体的VL的氨基酸序列和包含抗体的VH的氨基酸序列的核酸的载体,或(2)包含编码包含抗体的VL的氨基酸序列的核酸的第一载体和包含编码包含抗体的VH的氨基酸序列的核酸的第二载体。在一个实施方案中,宿主细胞为真核的,例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或淋巴样细胞(例如Y0、NS0、Sp20细胞)。在一个实施方案中,提供制备抗PD-L1抗体的方法,其中所述方法包括在适于表达所述抗体的条件下培养如以上提供的包含编码所述抗体的核酸的宿主细胞,和任选地自所述宿主细胞(或宿主细胞培养基)回收所述抗体。

[0287] 对于抗PD-L1抗体(例如,SP142)的重组产生,分离编码例如如上所述的抗体的核酸并且将其插入一个或多个载体中以进一步在宿主细胞中克隆和/或表达。此类核酸可易于使用常规程序(例如通过使用能够特异性结合编码抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)进行分离和测序。

[0288] 适于克隆或表达抗体编码载体的宿主细胞包括本文所述的原核或真核细胞。例如,抗体可在细菌中产生,特别是当不需要糖基化和Fc效应子功能时。对于抗体片段和多肽在细菌中的表达,参见例如美国专利号5,648,237、5,789,199和5,840,523。还参见描述抗体片段在大肠杆菌中的表达的Charlton.Methods in Molecular Biology.第248卷,第245-254页,B.K.C.Lo,编,Humana Press,Totowa,NJ,2003。在表达之后,抗体可从细菌细胞

糊状物分离于可溶性部分中并且可进一步纯化。

[0289] 除原核生物之外,诸如丝状真菌或酵母的真核微生物也为适于抗体编码性载体的克隆或表达宿主,包括糖基化路径已被“人源化”,从而产生具有部分或完全人糖基化型态的抗体的真菌和酵母菌株。参见Gerngross.Nat.Biotech.22:1409-1414,2004,和Li等Nat.Biotech.24:210-215,2006。

[0290] 适于表达糖基化抗体的宿主细胞还来源于多细胞生物体(无脊椎动物和脊椎动物)。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。已鉴别可与昆虫细胞联合使用,尤其是用于转染草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞的众多杆状病毒株。

[0291] 植物细胞培养物也可用作宿主。参见,例如美国专利号5,959,177、6,040,498、6,420,548、7,125,978和6,417,429(描述用于在转基因植物中产生抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0292] 脊椎动物细胞也可用作宿主。例如,可使用适于悬浮生长的哺乳动物细胞系。有用的哺乳动物宿主细胞系的其他实例为由SV40转化的猴肾CV1细胞系(COS-7);人胚肾系(如例如Graham等J.Gen Virol.36:59,1977中所述的293或293细胞);幼仓鼠肾细胞(BHK);小鼠Sertoli细胞(如例如Mather.Biol.Reprod.23:243-251,1980中所述的TM4细胞);猴肾细胞(CV1);非洲绿猴肾细胞(VERO-76);人宫颈癌细胞(HELA);犬肾细胞(MDCK;水牛大鼠肝细胞(BRL 3A);人肺细胞(W138);人肝细胞(Hep G2);小鼠乳腺肿瘤(MMT 060562);如例如Mather等Annals N.Y.Acad.Sci.383:44-68,1982中所述的TRI细胞;MRC 5细胞;以及FS4细胞。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);以及骨髓瘤细胞系,诸如Y0、NS0和Sp2/0。对于适于抗体生产的某些哺乳动物宿主细胞系的综述,参见,例如Yazaki等Methods in Molecular Biology.第248卷,第255-268页,B.K.C.Lo,编,Humana Press,Totowa,NJ,2003。

[0293] C. 测定

[0294] 可通过本领域已知的各种测定鉴别、筛选或表征本文提供的抗PD-L1抗体的物理/化学特性和/或生物活性。

[0295] 1. 结合测定和其他测定

[0296] 在一个方面,例如通过已知方法诸如酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫印迹(例如,蛋白质印迹)、流式细胞术(例如,FACS™)、免疫组织化学、免疫荧光等来测试本发明抗体的抗原结合活性。

[0297] 在另一个方面,竞争测定可用来鉴别与本发明的任一种抗体(例如,抗PD-L1抗体SP142)竞争结合到PD-L1的抗体。在某些实施方案中,这种竞争性抗体结合到由本发明的任一种抗体(例如,抗PD-L1抗体SP142)所结合的共同表位(例如,线性或构象表位)。用于对抗体所结合到的表位进行作图的详细示例性方法提供于Methods in Molecular Biology第66卷(Humana Press,Totowa,NJ,1996)中的Morris“表位作图方案”中。

[0298] 在示例性竞争测定中,在包含结合PD-L1的第一标记抗体(例如,抗PD-L1抗体SP142)和第二未标记抗体(将测试其与所述第一抗体竞争结合到PD-L1的能力)的溶液中孵育固定的PD-L1。第二抗体可存在于杂交瘤上清液中。作为对照,在包含第一标记抗体而不含第二未标记抗体的溶液中孵育固定的PD-L1。在容许第一抗体结合PD-L1的条件下孵育之

后,移除过量未结合抗体,并且测量与固定的PD-L1缔合的标记的量。如果相对于对照样品,与固定的PD-L1缔合的标记的量在测试样品中基本上降低,则然后指示第二抗体与第一抗体竞争结合PD-L1。参见,例如Harlow等Antibodies:A Laboratory Manual.第14章(Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY,1988)。

[0299] 2. 检测测定

[0300] 在一个方面,提供了用于鉴别用于在例如免疫组织化学(IHC)、免疫荧光(IF)、免疫印迹(例如,蛋白质印迹)、流式细胞术(例如,FACS™)或酶联免疫吸附测定(ELISA)测定中检测PD-L1的存在的抗PD-L1抗体的测定。在某些实施方案中,测试本发明的抗体的此类活性。

[0301] D. 免疫缀合物

[0302] 本发明还提供包含与一种或多种标记和/或药剂(诸如放射性同位素)缀合的本文中的抗PD-L1抗体的免疫缀合物。

[0303] 在一个实施方案中,免疫缀合物包含如本文所述的与放射性原子缀合以形成放射性缀合物的抗体。各种放射性同位素可用于产生放射性缀合物。实例包括At²¹¹、I¹³¹、I¹²⁵、Y⁹⁰、Re¹⁸⁶、Re¹⁸⁸、Sm¹⁵³、Bi²¹²、P³²、Pb²¹²和Lu的放射性同位素。当放射性缀合物用于检测时,它可包含用于闪烁法研究的放射性原子,例如Tc99m或I¹²³,或用于核磁共振(NMR)成像(也称为磁共振成像,MRI)的自旋标记,诸如碘-123(再次)、碘-131、镅-111、氟-19、碳-13、氮-15、氧-17、钆、锰或铁。

[0304] 抗PD-L1抗体和标记或药剂的缀合物可使用多种双官能蛋白偶联剂,诸如3-(2-吡啶基二硫醇)丙酸N-琥珀酰亚胺酯(SPDP)、4-(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸琥珀酰亚胺酯(SMCC)、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酸酯的双官能衍生物(诸如二亚胺代己二酸二甲酯HCl)、活性酯(诸如辛二酸二琥珀酰亚胺基酯)、醛(诸如戊二醛)、双-迭氮基化合物(诸如双(对迭氮基苯甲酰基)己二胺)、双-重氮衍生物(诸如双(对重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双-活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)来制备。例如,可如Vitetta等,Science 238:1098(1987)中所述的那样制备蓖麻毒素免疫毒素。碳14标记的1-异硫氰酸酯基苯甲基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于使放射性核苷酸与抗体缀合的示例性螯合剂。参见W094/11026。接头可为有助于释放标记或药剂的“可裂解接头”。例如,可使用酸不稳定接头、肽酶敏感性接头、光不稳定接头、二甲基接头或含二硫化物接头(Chari等,Cancer Res.52:127-131(1992);美国专利号5,208,020)。

[0305] 本文的免疫缀合物明确涵盖但不限于用交联剂试剂制备的此类缀合物,所述交联剂试剂包括但不限于BMPS、EMCS、GMBS、HBVS、LC-SMCC、MBS、MPBH、SBAP、SIA、SIAB、SMCC、SMPB、SMPH、硫代EMCS、硫代GMBS、硫代KMUS、硫代MBS、硫代SIAB、硫代SMCC,和硫代SMPB以及SVSB((4-乙烯砜)苯甲酸琥珀酰亚胺酯),其为可商购获得的(例如,获自Pierce Biotechnology公司(Rockford,IL.,U.S.A))。

[0306] E. 用于诊断及检测的方法和组合物

[0307] 在某些实施方案中,本文提供的抗PD-L1抗体(例如,例如以上部分A“示例性抗PD-L1抗体”中所述的SP142或任何其他抗PD-L1抗体)用于检测生物样品中PD-L1的存在。如本文所用的术语“检测”涵盖定量或定性检测。

[0308] 在一种情况下,提供用于诊断或检测方法的抗PD-L1抗体(例如,SP142)。在另一种

情况下,本发明提供了抗PD-L1抗体(例如,SP142)在制备用于诊断或检测方法的试剂中的用途。

[0309] 例如,在一种情况下,提供了以下描述的检测生物样品中PD-L1的存在的方法。在某些实施方案中,所述方法包括使生物样品与如本文所述的抗PD-L1抗体在容许所述抗PD-L1抗体结合PD-L1的条件下接触,和检测在所述抗PD-L1抗体与PD-L1之间是否形成复合物。此类方法可为体外或体内方法。本发明的抗PD-L1抗体(例如,SP142)可用于例如免疫测定中,所述免疫测定包括例如免疫组织化学(IHC)、免疫荧光(IF)、免疫印迹(例如,蛋白质印迹)、流式细胞术(例如,FACS™)和酶联免疫吸附测定(ELISA)。在一个实施方案中,例如当PD-L1为用于选择患者的生物标记时,抗PD-L1抗体用来选择适于用抗PD-L1抗体进行的疗法的受试者。本发明还提供了抗PD-L1抗体在诊断患有病症(例如,癌症或免疫功能失调)的受试者的方法中的用途,所述方法包括:通过使样品与本发明的抗PD-L1抗体(例如,SP142)接触并检测结合的抗体的存在来确定获自受试者的样品中PD-L1的存在或表达水平。

[0310] 例如,所述方法提供了抗PD-L1抗体在诊断患有癌症的受试者的方法中的用途,所述方法包括:通过使样品与本发明的抗PD-L1抗体(例如,SP142)接触并检测结合的抗体的存在来确定获自受试者的样品中PD-L1的存在或表达水平。在一些情况下,所述样品选自自由以下组成的组:组织样品、全血样品、血清样品和血浆样品。在一些情况下,所述组织样品为肿瘤样品。在一些情况下,所述肿瘤样品包含肿瘤浸润性免疫细胞、肿瘤细胞、基质细胞及其任何组合。

[0311] 本发明又提供了抗PD-L1抗体在制备试剂中的用途,所述试剂用于诊断患有病症(例如,癌症或免疫功能失调)的受试者的方法中,所述方法包括:通过使样品与本发明的抗PD-L1抗体(例如,SP142)接触并检测结合的抗体的存在来确定获自受试者的样品中PD-L1的存在或表达水平。

[0312] 例如,所述方法提供了抗PD-L1抗体在制备试剂中的用途,所述试剂用于诊断患有癌症的受试者的方法中,所述方法包括:通过使样品与本发明的抗PD-L1抗体(例如,SP142)接触并检测结合的抗体的存在来确定获自受试者的样品中PD-L1的存在或表达水平。在一些情况下,所述样品选自自由以下组成的组:组织样品、全血样品、血清样品和血浆样品。在一些情况下,所述组织样品为肿瘤样品。在一些情况下,所述肿瘤样品包含肿瘤浸润性免疫细胞、肿瘤细胞、基质细胞及其任何组合。

[0313] 在另一种情况下,本发明提供了用于鉴别可能响应于治疗的患有病症(例如,癌症或免疫功能失调)的受试者的方法,所述方法包括:通过使样品与本发明的抗PD-L1抗体(例如,SP142)接触并检测结合的抗体的存在来确定获自受试者的样品中PD-L1的存在或表达水平,其中样品中PD-L1的存在或表达水平指示受试者可能响应于治疗。

[0314] 例如,本发明提供了用于鉴别可能响应于用抗癌疗法进行的治疗的患有癌症的受试者的方法,所述方法包括:通过使样品与本发明的抗PD-L1抗体(例如,SP142)接触并检测结合的抗体的存在来确定获自受试者的样品中PD-L1的存在或表达水平,其中样品中PD-L1的存在或表达水平指示受试者可能响应于用抗癌疗法进行的治疗。在一些情况下,所述样品选自自由以下组成的组:组织样品、全血样品、血清样品和血浆样品。在一些情况下,所述组织样品为肿瘤样品。在一些情况下,所述肿瘤样品包含肿瘤浸润性免疫细胞、肿瘤细胞、基质细胞及其任何组合。

[0315] 在又一种情况下,本发明提供了用于预测患有病症(例如,癌症或免疫功能失调)的个体对治疗的应答性的方法,所述方法包括:通过使样品与本发明的抗PD-L1抗体(例如,SP142)接触并检测结合的抗体的存在来确定获自受试者的样品中PD-L1的存在或表达水平,其中样品中PD-L1的存在或表达水平指示受试者更可能响应于治疗。

[0316] 例如,本发明提供了用于预测患有癌症的个体对用抗癌疗法进行的治疗的应答性的方法,所述方法包括:通过使样品与本发明的抗PD-L1抗体(例如,SP142)接触并检测结合的抗体的存在来确定获自受试者的样品中PD-L1的存在或表达水平,其中样品中PD-L1的存在或表达水平指示受试者更可能响应于用抗癌疗法进行的治疗。在一些情况下,所述样品选自自由以下组成的组:组织样品、全血样品、血清样品和血浆样品。在一些情况下,所述组织样品为肿瘤样品。在一些情况下,所述肿瘤样品包含肿瘤浸润性免疫细胞、肿瘤细胞、基质细胞及其任何组合。

[0317] 在再一种情况下,本发明提供了用于确定患有病症(例如,癌症或免疫功能失调)的受试者将展现出来自治疗的益处的可能性的方法,所述方法包括:通过使样品与本发明的抗PD-L1抗体(例如,SP142)接触并检测结合的抗体的存在来确定获自受试者的样品中PD-L1的存在或表达水平,其中样品中PD-L1的存在或表达水平指示受试者将展现出来自治疗进行的治疗的益处可能性。

[0318] 例如,本发明提供了用于确定患有癌症的受试者将展现出来自抗癌疗法进行的治疗的益处可能性的方法,所述方法包括:通过使样品与本发明的抗PD-L1抗体(例如,SP142)接触并检测结合的抗体的存在来确定获自受试者的样品中PD-L1的存在或表达水平,其中样品中PD-L1的存在或表达水平指示受试者将展现出来自抗癌疗法进行的治疗的益处可能性。在一些情况下,所述样品选自自由以下组成的组:组织样品、全血样品、血清样品和血浆样品。在一些情况下,所述组织样品为肿瘤样品。在一些情况下,所述肿瘤样品包含肿瘤浸润性免疫细胞、肿瘤细胞、基质细胞及其任何组合。

[0319] 在另一种情况下,本发明提供了用于选择用于患有病症(例如,癌症或免疫功能失调)的受试者的疗法的方法,所述方法包括:通过使样品与本发明的抗PD-L1抗体(例如,SP142)接触并检测结合的抗体的存在来确定获自受试者的样品中PD-L1的存在或表达水平;以及基于样品中PD-L1的存在或表达水平选择用于所述受试者的抗癌疗法。

[0320] 例如,本发明提供了用于选择用于患有癌症的受试者的疗法的方法,所述方法包括:通过使样品与本发明的抗PD-L1抗体(例如,SP142)接触并检测结合的抗体的存在来确定获自受试者的样品中PD-L1的存在或表达水平;以及基于样品中PD-L1的存在或表达水平选择用于所述受试者的抗癌疗法。在一些情况下,所述样品选自自由以下组成的组:组织样品、全血样品、血清样品和血浆样品。在一些情况下,所述组织样品为肿瘤样品。在一些情况下,所述肿瘤样品包含肿瘤浸润性免疫细胞、肿瘤细胞、基质细胞及其任何组合。

[0321] 在任何前述方法中,所述肿瘤样品在肿瘤浸润性免疫细胞中可具有可检测的PD-L1表达水平,所述肿瘤浸润性免疫细胞(例如,面积)占所述肿瘤样品的约1%或更多(例如,约1%或更多、约2%或更多、约3%或更多、约4%或更多、约5%或更多、约10%或更多、约15%或更多、约20%或更多、约25%或更多、约30%或更多、约35%或更多、约40%或更多、约50%或更多、约55%或更多、约60%或更多、约65%或更多、约70%或更多、约80%或更多、约85%或更多、约90%或更多、约95%或更多或约99%或更多)。例如,在一些情况下,所

述肿瘤样品在肿瘤浸润性免疫细胞中可具有可检测的PD-L1表达水平,所述肿瘤浸润性免疫细胞(例如,面积)占所述肿瘤样品的约1%至小于约99%(例如约1%至小于约95%、约1%至小于约90%、约1%至小于约85%、约1%至小于约80%、约1%至小于约75%、约1%至小于约70%、约1%至小于约65%、约1%至小于约60%、约1%至小于约55%、约1%至小于约50%、约1%至小于约40%、约1%至小于约35%、约1%至小于约30%、约1%至小于约25%、约1%至小于约20%、约1%至小于约15%、约1%至小于约10%、约1%至小于约5%、约5%至小于约95%、约5%至小于约90%、约5%至小于约85%、约5%至小于约80%、约5%至小于约75%、约5%至小于约70%、约5%至小于约65%、约5%至小于约60%、约5%至小于约55%、约5%至小于约50%、约5%至小于约40%、约5%至小于约35%、约5%至小于约30%、约5%至小于约25%、约5%至小于约20%、约5%至小于约15%、约5%至小于约10%、约10%至小于约95%、约10%至小于约90%、约10%至小于约85%、约10%至小于约80%、约10%至小于约75%、约10%至小于约70%、约10%至小于约65%、约10%至小于约60%、约10%至小于约55%、约10%至小于约50%、约10%至小于约40%、约10%至小于约35%、约10%至小于约30%、约10%至小于约25%、约10%至小于约20%、约10%至小于约15%)。例如,在一些情况下,所述肿瘤在肿瘤浸润性免疫细胞中可具有可检测的PD-L1表达水平,所述肿瘤浸润性免疫细胞(例如,面积)占所述肿瘤样品的约1%或更多至小于约5%。在其他情况下,所述肿瘤在肿瘤浸润性免疫细胞中可具有可检测的PD-L1表达水平,所述肿瘤浸润性免疫细胞(例如,面积)占所述肿瘤样品的约5%或更多至小于约10%。在其他情况下,所述肿瘤在肿瘤浸润性免疫细胞中可具有可检测的PD-L1表达水平,所述肿瘤浸润性免疫细胞(例如,面积)占所述肿瘤样品的约10%或更多。

[0322] 在任何前述方法中,所述肿瘤样品在肿瘤样品中的约1%或更多(例如,约1%或更多、约2%或更多、约3%或更多、约4%或更多、约5%或更多、约10%或更多、约15%或更多、约20%或更多、约25%或更多、约30%或更多、约35%或更多、约40%或更多、约50%或更多、约55%或更多、约60%或更多、约65%或更多、约70%或更多、约80%或更多、约85%或更多、约90%或更多、约95%或更多或约99%或更多)肿瘤细胞中可具有可检测的PD-L1表达水平。例如,在一些情况下,所述肿瘤样品在肿瘤样品中的约1%至小于约99%(例如,约1%至小于约95%、约1%至小于约90%、约1%至小于约85%、约1%至小于约80%、约1%至小于约75%、约1%至小于约70%、约1%至小于约65%、约1%至小于约60%、约1%至小于约55%、约1%至小于约50%、约1%至小于约40%、约1%至小于约35%、约1%至小于约30%、约1%至小于约25%、约1%至小于约20%、约1%至小于约15%、约1%至小于约10%、约1%至小于约5%、约5%至小于约95%、约5%至小于约90%、约5%至小于约85%、约5%至小于约80%、约5%至小于约75%、约5%至小于约70%、约5%至小于约65%、约5%至小于约60%、约5%至小于约55%、约5%至小于约50%、约5%至小于约40%、约5%至小于约35%、约5%至小于约30%、约5%至小于约25%、约5%至小于约20%、约5%至小于约15%、约5%至小于约10%、约10%至小于约95%、约10%至小于约90%、约10%至小于约85%、约10%至小于约80%、约10%至小于约75%、约10%至小于约70%、约10%至小于约65%、约10%至小于约60%、约10%至小于约55%、约10%至小于约50%、约10%至小于约40%、约10%至小于约35%、约10%至小于约30%、约10%至小于约25%、约10%至小于约20%、约10%至小于约15%)肿瘤细胞中可具有可检测的PD-L1表达水平。例如,在一些情况下,所述

肿瘤样品在所述肿瘤样品中的约1%或更多至小于5%所述肿瘤细胞中可具有可检测的PD-L1表达水平。在其他情况下,所述肿瘤在所述肿瘤样品中的约5%或更多至小于10%所述肿瘤细胞中可具有可检测的PD-L1表达水平。在其他情况下,所述肿瘤在所述肿瘤样品中的约10%或更多所述肿瘤细胞中可具有可检测的PD-L1表达水平。

[0323] 在任何前述方法中,所述癌症可为非小细胞肺癌(NSCLC)、鳞状细胞癌(包括肺癌和肺鳞状癌)、小细胞肺癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胰腺癌、神经胶质瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌(liver cancer)、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、唾液腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌(hepatic carcinoma)、白血病以及头颈癌。在一些情况下,所述癌症为NSCLC。在一些实施方案中,所述NSCLC为肺腺癌或肺鳞状癌。在一些实施方案中,所述NSCLC为鳞状NSCLC或非鳞状NSCLC。

[0324] 任何前述方法中的益处和/或应答可为本领域已知的和/或本文描述的任何益处和/或应答,例如(1)在一定程度上抑制疾病进展(例如,癌症进展),包括减缓和完全停滞;(2)肿瘤尺寸的减小;(3)抑制(即,减少、减缓或完全停止)癌细胞浸润到相邻的外周器官和/或组织中;(4)抑制(即,减少、减缓或完全停止)转移;(5)在一定程度上减轻与疾病或病症(例如,癌症)相关的一种或多种症状;(6)存活(包括总体存活和无进展存活)的长度的增加或延长;和/或(9)治疗后给定时间点处的死亡率降低。在一些情况下,此类益处包括以下任何一种或多种:延长存活(包括总体存活和无进展存活);致使客观应答(包括完全应答或部分应答);或改善癌症的体征或症状。

[0325] 任何前述方法还包括基于样品中PD-L1的表达水平向所述受试者施用治疗有效量的抗癌疗法。在一些情况下,抗癌疗法包括PD-1轴结合拮抗剂。所述PD-1轴结合拮抗剂可为本领域已知的或本文描述的任何PD-1轴结合拮抗剂。

[0326] 例如,在一些情况下,所述PD-1轴结合拮抗剂选自由以下组成的组:PD-L1结合拮抗剂、PD-1结合拮抗剂和PD-L2结合拮抗剂。在一些情况下,所述PD-1轴结合拮抗剂为PD-L1结合拮抗剂。在一些情况下,所述PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与其配体结合配偶体中的一种或多种的结合。在其他情况下,所述PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与PD-1的结合。在另一些情况下,所述PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与B7-1的结合。在一些情况下,所述PD-L1结合拮抗剂抑制PD-L1与PD-1和B7-1两者的结合。在一些情况下,所述PD-L1结合拮抗剂为抗体。在一些实施方案中,所述抗体选自由以下组成的组:YW243.55.S70、MPDL3280A(阿特珠单抗)、MDX-1105、MEDI4736(德瓦鲁单抗)和MSB0010718C(avelumab)。

[0327] 在一些情况下,所述PD-1轴结合拮抗剂为PD-1结合拮抗剂。例如,在一些情况下,所述PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与其配体结合配偶体中的一种或多种的结合。在一些情况下,所述PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD-L1的结合。在其他情况下,所述PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD-L2的结合。在另一些情况下,所述PD-1结合拮抗剂抑制PD-1与PD-L1和PD-L2两者的结合。在一些情况下,所述PD-1结合拮抗剂为抗体。在一些情况下,所述抗体选自由以下组成的组:MDX 1106(纳武单抗)、MK-3475(派姆单抗)、CT-011(pidilizumab)、MEDI-0680(AMP-514)、PDR001、REGN2810和BGB-108。在一些情况下,所述PD-1结合拮抗剂为Fc融合蛋白。例如,在一些情况下,所述Fc融合蛋白为AMP-224。

[0328] 在一些情况下,所述方法还包括向患者施用有效量的第二治疗剂。在一些情况下,所述第二治疗剂选自由以下组成的组:细胞毒性剂、生长抑制剂、辐射疗法剂、抗血管生成

剂及其组合。

[0329] 在任何前述实施方案中使用的样品可如以下部分F“生物样品”中所述。在一些实施方案中,所述肿瘤样品包含肿瘤细胞、肿瘤浸润性免疫细胞、基质细胞或其任何组合。在任何前述实施方案中,肿瘤样品可为福尔马林固定和石蜡包埋 (FFPE) 肿瘤样品、存档肿瘤样品、新鲜肿瘤样品或冷冻肿瘤样品。

[0330] 在某些实施方案中,样品中PD-L1的存在和/或表达水平/量可使用IHC和染色方案来确定。组织切片的IHC染色已显示为确定或检测样品中蛋白质的存在的可靠方法。在一个实施方案中,使用包括以下的方法来测定PD-L1的表达水平:(a) 用本发明的抗PD-L1抗体(例如,SP142)进行样品(诸如获自受试者的肿瘤样品)的IHC分析;以及(b) 确定样品中PD-L1的存在和/或表达水平。在一些实施方案中,相对于参照确定IHC染色强度。在一些实施方案中,所述参照为参照值。在一些实施方案中,所述参照为参照样品的(例如,对照细胞系染色样品、来自非癌性患者的组织样品、已知具有预定的PD-L1表达水平的参照样品的(例如,具有确定的IC%或TC%的参照样品的)或PD-L1阴性肿瘤样品)。

[0331] IHC可与另外的技术诸如形态染色和/或原位杂交(例如,FISH)组合进行。两种IHC一般方法可供使用;直接测定和间接测定。根据第一测定,直接确定抗体与靶抗原的结合。这种直接测定使用了标记的试剂,诸如荧光标签或酶标记的一级抗体,所述标记的试剂可以在不需要进一步抗体相互作用的情况下可视化。在通常的间接测定中,未缀合的一级抗体与抗原结合,然后标记的二级抗体与一级抗体结合。在二级抗体缀合至酶促标记时,添加生色底物或荧光底物以提供抗原的可视化。信号扩增因为数个二级抗体可以与一级抗体上的不同表位反应而发生。用于IHC的一级和/或二级抗体通常将用可检测的部分标记。许多标记是可用的,所述标记通常分成以下类别:(a) 放射性同位素,诸如³⁵S、¹⁴C、¹²⁵I、³H和¹³¹I;(b) 胶体金颗粒;(c) 荧光标记,包括但不限于稀土金属螯合物(钆螯合物)、德克萨斯红、罗丹明、荧光素、单酰、丽丝胺、伞形酮、藻红蛋白、藻蓝蛋白或可商购获得的荧光团诸如SPECTRUM ORANGE7和SPECTRUM GREEN7和/或以上任何一种或多种的衍生物;(d) 各种酶底物标记是可用的,并且美国专利号4,275,149提供了这些标记中的一些的综述。酶促标记的实例包括萤光素酶(例如,萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶;参见,例如美国专利号4,737,456)、萤光素、2,3-二氢酞嗪二酮、苹果酸脱氢酶、尿素酶、过氧化物酶诸如辣根过氧化物酶(HRPO)、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶(例如,葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶以及葡萄糖-6-磷酸脱氢酶)、杂环氧化酶(诸如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶)、乳过氧化物酶、微过氧化物酶等。

[0332] 酶底物组合的实例包括例如辣根过氧化物酶(HRPO)与过氧化氢酶作为底物;碱性磷酸酶(AP)与对硝基苯磷酸酯作为生色底物;以及 β -D-半乳糖苷酶(β -D-Gal)与生色底物(例如,对硝基苯基- β -D-半乳糖苷酶)或荧光底物(例如,4-甲基伞形酮基- β -D-半乳糖苷酶)。对于这些的一般综述,参见,例如美国专利号4,275,149和4,318,980。

[0333] 标本可例如手工地制备,或使用自动染色仪器(例如,Ventana BenchMark XT或Benchmark ULTRA仪器)来制备。可将由此制备的标本安装并盖上盖玻片。然后例如使用显微镜确定载玻片评估,并且可采用本领域常规使用的染色强度标准。在一个实施方案中,应当理解,当使用IHC检查来自肿瘤的细胞和/或组织时,通常在肿瘤细胞和/或组织中测定或评估染色(与可存在于样品中的基质或周围组织相反)。在一些实施方案中,应当理解,当使

用IHC检查来自肿瘤的细胞和/或组织时,染色包括在肿瘤浸润性免疫细胞(包括肿瘤内或肿瘤周围免疫细胞)中测定或评估。在一些实施方案中,在>0%的样品中、在至少1%的样品中、在至少5%的样品中、在至少10%的样品中、在至少15%的样品中、在至少15%的样品中、在至少20%的样品中、在至少25%的样品中、在至少30%的样品中、在至少35%的样品中、在至少40%的样品中、在至少45%的样品中、在至少50%的样品中、在至少55%的样品中、在至少60%的样品中、在至少65%的样品中、在至少70%的样品中、在至少75%的样品中、在至少80%的样品中、在至少85%的样品中、在至少90%的样品中、在至少95%的样品或更多中通过IHC检测PD-L1的存在。可使用本文所述的任何标准(例如,由病理学家或使用自动图像分析)对样品进行评分。

[0334] 在任何前述方法的一些实施方案中,例如使用IHC在肿瘤细胞、肿瘤浸润性免疫细胞或其组合中检测PD-L1的表达水平。肿瘤浸润性免疫细胞包括但不限于肿瘤内免疫细胞、肿瘤周围免疫细胞或其任何组合,以及其他肿瘤基质细胞(例如,成纤维细胞)。此类肿瘤浸润性免疫细胞可为T淋巴细胞(诸如CD8⁺ T淋巴细胞和/或CD4⁺ T淋巴细胞)、B淋巴细胞或其他骨髓谱系细胞,包括粒细胞(嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细胞)、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞(例如,交错突树突细胞)、组织细胞和自然杀伤细胞。在一些实施方案中,PD-L1的染色被检测为膜染色、细胞质染色及其组合。在其他实施方案中,PD-L1的缺乏在样品中被检测为缺乏染色或没有染色。在一些实施方案中,例如,如本文所述,所述方法包括测定由表达可检测量的PD-L1的肿瘤浸润性免疫细胞覆盖的肿瘤区域的百分比(参见,例如,如实施例5中所述的IC%)。在一些实施方案中,例如,如本文所述,所述方法包括测定表达可检测量的PD-L1的肿瘤样品中的肿瘤细胞的百分比(参见,例如实施例5)。

[0335] 在某些情况下,提供了标记的抗PD-L1抗体。标记包括但不限于直接检测的标记或部分(诸如荧光、发色团、电子致密、化学发光和放射性标记)以及例如经由酶促反应或分子相互作用间接检测的部分,诸如酶或配体。示例性标记包括但不限于放射性同位素³²P、¹⁴C、¹²⁵I、³H和¹³¹I、荧光团(诸如稀土螯合物或荧光素及其衍生物)、若丹明(rhodamine)及其衍生物、丹酰基、伞形酮(umbelliferone)、荧光素酶(例如萤火虫荧光素酶和细菌荧光素酶(美国专利号4,737,456))、荧光素(luciferin)、2,3-二氢酞嗪二酮、辣根过氧化物酶(HRP)、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶、葡糖淀粉酶、溶菌酶、糖氧化酶(例如葡萄糖氧化酶、半乳糖氧化酶和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶)、与采用过氧化氢以氧化染料前体的酶(诸如HRP、乳过氧化物酶(lactoperoxidase)或微过氧化物酶(microperoxidase))偶联的杂环氧化酶(诸如尿酸酶(uricase)和黄嘌呤氧化酶)、生物素/抗生蛋白、自旋标记、噬菌体标记、稳定自由基等。

[0336] 还应当理解,代替未缀合的抗PD-L1抗体或者除了未缀合的抗PD-L1抗体之外,还可使用如上所述的本发明的免疫缀合物来进行用于诊断和/或检测的任何以上方法。

[0337] F. 生物样品

[0338] 在某些实施方案中,本发明的抗PD-L1抗体(例如,例如以上部分A“示例性抗PD-L1抗体”中所述的SP142或任何其他抗PD-L1抗体)可用来使用本领域已知的或本文描述的方法检测生物样品中PD-L1的存在。

[0339] 在一些情况下,生物样品包括组织或细胞样品。例如,生物样品可包括来自正常或癌症患者的细胞或组织,例如像乳腺、结肠、肺、肾、骨、脑、肌肉、胃、胰腺、膀胱、卵巢、子宫

以及心脏、胚胎和胎盘组织的正常和癌性组织。

[0340] 在某些情况下,组织或细胞样品的来源可为如来自新鲜、冷冻和/或防腐器官或组织样品或活检物或吸出物的固体组织;血液或任何血液成分;体液,诸如脑脊髓液、羊水、腹膜液或间质液;来自受试者妊娠或发育的任何时间的细胞。在一些实施方案中,所述生物样品获自体外组织或细胞培养物。本文中的生物样品的实例包括但不限于肿瘤活检、循环肿瘤细胞、血清或血浆、循环血浆蛋白、腹水、来源于肿瘤的或展现出肿瘤样特性的原代细胞培养物或细胞系,以及保存的肿瘤样品,诸如福尔马林固定石蜡包埋的 (FFPE) 肿瘤样品或冷冻的肿瘤样品。

[0341] 在一些实施方案中,所述生物样品可含有本质上不与组织天然混杂的化合物,诸如防腐剂、抗凝血剂、缓冲剂、营养素、抗生素等。在某些实施方案中,生物样品已经暴露于和/或含有一种或多种固定剂。可与本发明的方法和组合物一起使用的固定剂包括福尔马林、戊二醛、四氧化锇、乙酸、乙醇、丙酮、苦味酸、氯仿、重铬酸钾和氯化汞,和/或通过微波加热或冷冻稳定。

[0342] 在一些实施方案中,生物样品来自患有、倾向于或正在测试免疫功能失调的受试者。在某些实施方案中,所述免疫功能失调为T细胞功能失调性病征。在一些实施方案中,所述T细胞功能失调性病征为未解决的急性感染、慢性感染或肿瘤免疫。在某些实施方案中,所述免疫失调为自身免疫性疾病。在一些实施方案中,自身免疫性疾病为自身免疫性风湿病症(包括类风湿性关节炎、干燥综合征、硬皮病、狼疮诸如SLE和狼疮性肾炎、多发性肌炎-皮肌炎、冷球蛋白血症、抗磷脂抗体综合征和银屑病性关节炎)、自体免疫性胃肠道和肝病征(包括炎性肠病(例如,溃疡性结肠炎和克罗恩病)、自身免疫性胃炎和恶性贫血、自身免疫性肝炎、原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎和乳糜泻)、血管炎(包括ANCA阴性血管炎和ANCA相关血管炎,包括变应性肉芽肿性血管炎(Churg-Strauss vasculitis)、韦格纳氏肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)和显微镜下多血管炎)、自身免疫性神经病症(包括多发性硬化、视性眼阵挛肌阵挛综合征、重症肌无力、视神经脊髓炎、帕金森氏病、阿尔茨海默病和自身免疫性多发性神经病)、肾病(包括肾小球肾炎、古德帕斯彻氏综合征(Goodpasture's syndrome)和伯杰氏病)、自身免疫性皮肤病病症(包括银屑病、风疹、荨麻疹、寻常型天疱疮、大疱性类天疱疮和皮肤红斑狼疮)、血液学病症(包括血小板减少性紫癜、血栓性血小板减少性紫癜、输血后紫癜和自身免疫性溶血性贫血)、动脉粥样硬化、葡萄膜炎、自身免疫性听力疾病(包括内耳疾病和听力损失)、贝赛特氏疾病(Behcet's disease)、雷诺氏综合征(Raynaud's syndrome)、器官移植或自身免疫性内分泌病症(包括糖尿病相关自身免疫性疾病,诸如胰岛素依赖型糖尿病(IDDM)、艾迪生氏病(Addison's disease)和自身免疫性甲状腺疾病(包括格雷夫斯氏病(Graves' disease)和甲状腺炎))。

[0343] 在其他实施方案中,生物样品来自患有、倾向于或正在测试癌症的受试者。在某些实施方案中,所述癌症为非小细胞肺癌(NSCLC)(包括肺腺癌和肺鳞状癌)、癌、淋巴瘤(包括霍奇金氏和非霍奇金氏淋巴瘤)、胚细胞瘤、肉瘤、白血病、鳞状细胞癌、小细胞肺癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胰腺癌、神经胶质瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌(liver cancer)、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、唾液腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌(hepatic carcinoma)、白血病和其他淋巴增殖性病征或各种类型的头颈癌。在特定实施方案中,所述癌症为NSCLC。在一些实施方案中,所述NSCLC为肺

腺癌或肺鳞状癌。在一些实施方案中,所述NSCLC为非鳞状NSCLC或鳞状NSCLC。

[0344] G. 基于PD-L1存在和/或表达水平的治疗方法

[0345] 本发明提供了基于如使用本发明抗PD-L1抗体所确定的获自受试者的样品中PD-L1的存在和/或表达水平来治疗患有病症(例如,癌症或免疫功能失调)的受试者的方法。在一些情况下,所述方法涉及基于如使用本发明抗PD-L1抗体所确定的获自受试者的样品中PD-L1的存在和/或表达水平来施用治疗(例如,抗癌疗法)。在一些情况下,治疗方法涉及将如使用本发明抗PD-L1抗体所确定的PD-L1的存在和/或表达水平与受试者受益于或响应于例如如本文所述的抗癌疗法的可能性相关联。

[0346] 所述方法提供了治疗患有病症(例如,癌症或免疫功能失调)的受试者的方法,所述方法包括:通过使样品与本发明的抗PD-L1抗体(例如,SP142)接触并检测结合的抗体的存在来确定获自受试者的样品中PD-L1的存在或表达水平;以及向所述受试者施用治疗有效量的疗法。

[0347] 例如,所述方法提供了治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包括:通过使样品与本发明的抗PD-L1抗体(例如,SP142)接触并检测结合的抗体的存在来确定获自受试者的样品中PD-L1的存在或表达水平;以及向所述受试者施用治疗有效量的抗癌疗法。在一些情况下,所述样品选自由以下组成的组:组织样品、全血样品、血清样品和血浆样品。在一些情况下,所述组织样品为肿瘤样品。在一些情况下,所述肿瘤样品包含肿瘤浸润性免疫细胞、肿瘤细胞、基质细胞及其任何组合。在任何前述方法中,所述肿瘤样品在肿瘤浸润性免疫细胞中可具有可检测的PD-L1表达水平,所述肿瘤浸润性免疫细胞(例如,面积)占所述肿瘤样品的约1%或更多(例如,约1%或更多、约2%或更多、约3%或更多、约4%或更多、约5%或更多、约10%或更多、约15%或更多、约20%或更多、约25%或更多、约30%或更多、约35%或更多、约40%或更多、约50%或更多、约55%或更多、约60%或更多、约65%或更多、约70%或更多、约80%或更多、约85%或更多、约90%或更多、约95%或更多或约99%或更多)。例如,在一些情况下,所述肿瘤样品在肿瘤浸润性免疫细胞中可具有可检测的PD-L1表达水平,所述肿瘤浸润性免疫细胞(例如,面积)占所述肿瘤样品的约1%至小于约99%(例如,约1%至小于约95%、约1%至小于约90%、约1%至小于约85%、约1%至小于约80%、约1%至小于约75%、约1%至小于约70%、约1%至小于约65%、约1%至小于约60%、约1%至小于约55%、约1%至小于约50%、约1%至小于约40%、约1%至小于约35%、约1%至小于约30%、约1%至小于约25%、约1%至小于约20%、约1%至小于约15%、约1%至小于约10%、约1%至小于约5%、约5%至小于约95%、约5%至小于约90%、约5%至小于约85%、约5%至小于约80%、约5%至小于约75%、约5%至小于约70%、约5%至小于约65%、约5%至小于约60%、约5%至小于约55%、约5%至小于约50%、约5%至小于约40%、约5%至小于约35%、约5%至小于约30%、约5%至小于约25%、约5%至小于约20%、约5%至小于约15%、约5%至小于约10%、约10%至小于约95%、约10%至小于约90%、约10%至小于约85%、约10%至小于约80%、约10%至小于约75%、约10%至小于约70%、约10%至小于约65%、约10%至小于约60%、约10%至小于约55%、约10%至小于约50%、约10%至小于约40%、约10%至小于约35%、约10%至小于约30%、约10%至小于约25%、约10%至小于约20%、约10%至小于约15%)。例如,在一些情况下,所述肿瘤在肿瘤浸润性免疫细胞中可具有可检测的PD-L1表达水平,所述肿瘤浸润性免疫细胞(例如,面积)占所述肿瘤样品的约

1%或更多至小于约5%。在其他情况下,所述肿瘤在肿瘤浸润性免疫细胞中可具有可检测的PD-L1表达水平,所述肿瘤浸润性免疫细胞(例如,面积)占所述肿瘤样品的约5%或更多至小于约10%。在其他情况下,所述肿瘤在肿瘤浸润性免疫细胞中可具有可检测的PD-L1表达水平,所述肿瘤浸润性免疫细胞(例如,面积)占所述肿瘤样品的约10%或更多。

[0348] 在任何前述方法中,所述肿瘤样品在肿瘤样品中的约1%或更多(例如,约1%或更多、约2%或更多、约3%或更多、约4%或更多、约5%或更多、约10%或更多、约15%或更多、约20%或更多、约25%或更多、约30%或更多、约35%或更多、约40%或更多、约50%或更多、约55%或更多、约60%或更多、约65%或更多、约70%或更多、约80%或更多、约85%或更多、约90%或更多、约95%或更多或约99%或更多)肿瘤细胞中可具有可检测的PD-L1表达水平。例如,在一些情况下,所述肿瘤样品在肿瘤样品中的约1%至小于约99%(例如,约1%至小于约95%、约1%至小于约90%、约1%至小于约85%、约1%至小于约80%、约1%至小于约75%、约1%至小于约70%、约1%至小于约65%、约1%至小于约60%、约1%至小于约55%、约1%至小于约50%、约1%至小于约40%、约1%至小于约35%、约1%至小于约30%、约1%至小于约25%、约1%至小于约20%、约1%至小于约15%、约1%至小于约10%、约1%至小于约5%、约5%至小于约95%、约5%至小于约90%、约5%至小于约85%、约5%至小于约80%、约5%至小于约75%、约5%至小于约70%、约5%至小于约65%、约5%至小于约60%、约5%至小于约55%、约5%至小于约50%、约5%至小于约40%、约5%至小于约35%、约5%至小于约30%、约5%至小于约25%、约5%至小于约20%、约5%至小于约15%、约5%至小于约10%、约10%至小于约95%、约10%至小于约90%、约10%至小于约85%、约10%至小于约80%、约10%至小于约75%、约10%至小于约70%、约10%至小于约65%、约10%至小于约60%、约10%至小于约55%、约10%至小于约50%、约10%至小于约40%、约10%至小于约35%、约10%至小于约30%、约10%至小于约25%、约10%至小于约20%、约10%至小于约15%)肿瘤细胞中可具有可检测的PD-L1表达水平。例如,在一些情况下,所述肿瘤样品在所述肿瘤样品中的约1%或更多至小于5%所述肿瘤细胞中可具有可检测的PD-L1表达水平。在其他情况下,所述肿瘤在所述肿瘤样品中的约5%或更多至小于10%所述肿瘤细胞中可具有可检测的PD-L1表达水平。在其他情况下,所述肿瘤在所述肿瘤样品中的约10%或更多所述肿瘤细胞中可具有可检测的PD-L1表达水平。

[0349] 在任何前述方法中,所述癌症可为非小细胞肺癌(NSCLC)(包括肺腺癌和肺鳞状癌)、鳞状细胞癌、小细胞肺癌、腹膜癌、肝细胞癌、胃肠癌、胰腺癌、神经胶质瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌(liver cancer)、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、唾液腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌(hepatic carcinoma)、白血病以及头颈癌。在一些情况下,所述癌症为NSCLC。在一些实施方案中,所述NSCLC为肺腺癌或肺鳞状癌。在一些实施方案中,所述NSCLC为非鳞状NSCLC或鳞状NSCLC。

[0350] 在任何前述方法中,所述抗癌疗法可包括PD-1轴结合拮抗剂。在一些情况下,所述方法可包括基于肿瘤样品中肿瘤细胞和/或肿瘤浸润性免疫细胞中的PD-L1的表达水平向所述患者施用治疗有效量的PD-1轴结合拮抗剂。所述PD-1轴结合拮抗剂可为本领域已知的或本文描述的任何PD-1轴结合拮抗剂。

[0351] 例如,在一些情况下,所述PD-1轴结合拮抗剂包括PD-1结合拮抗剂、PD-L1结合拮抗剂和PD-L2结合拮抗剂。PD-1(程序性死亡1)在本领域中还被称为“程序性细胞死亡1”、

“PDCD1”、“CD279”和“SLEB2”。示例性人PD-1显示在UniProtKB/Swiss-Prot登录号Q15116中。PD-L1(程序性死亡配体1)在本领域中还被称为“程序性细胞死亡1配体1”、“PDCD1LG1”、“CD274”、“B7-H”和“PDL1”。示例性人PD-L1显示在UniProtKB/Swiss-Prot登录号Q9NZQ7.1中。PD-L2(程序性死亡配体2)在本领域中还被称为“程序性细胞死亡1配体2”、“PDCD1LG2”、“CD273”、“B7-DC”、“Btdc”和“PDL2”。示例性人PD-L2显示在UniProtKB/Swiss-Prot登录号Q9BQ51中。在一些实施方案中,PD-1、PD-L1和PD-L2为人PD-1、PD-L1和PD-L2。

[0352] 在一些实施方案中,PD-1结合拮抗剂是抑制PD-1与其配体结合配偶体的结合的分子。在具体方面,PD-1配体结合配偶体为PD-L1和/或PD-L2。在另一个实施方案中,PD-L1结合拮抗剂是抑制PD-L1与其结合配体的结合的分子。在具体方面,PD-L1结合配偶体为PD-1和/或B7-1。在另一个实施方案中,PD-L2结合拮抗剂是抑制PD-L2与其配体结合配偶体的结合的分子。在具体方面,PD-L2结合配体配偶体为PD-1。拮抗剂可为抗体、其抗原结合片段、免疫粘附素、融合蛋白或寡肽。

[0353] 在一些实施方案中,PD-1结合拮抗剂为例如如以下所述的抗PD-1抗体(例如,人抗体、人源化抗体或嵌合抗体)。在一些实施方案中,抗PD-1抗体选自由以下组成的组:MDX-1106(纳武单抗)、MK-3475(派姆单抗)、CT-011(pidilizumab)、MEDI-0680(AMP-514)、PDR001、REGN2810和BGB-108。MDX-1106(也称为MDX-1106-04、ONO-4538、BMS-936558或纳武单抗)是WO2006/121168中描述的抗PD-1抗体。MK-3475(也称为派姆单抗或lambrolizumab)是WO 2009/114335中描述的抗PD-1抗体。CT-011(也称为hBAT、hBAT-1或pidilizumab)是WO 2009/101611中描述的抗PD-1抗体。在一些实施方案中,所述PD-1结合拮抗剂为免疫粘附素(例如,包含与恒定区(例如,免疫球蛋白序列的Fc区)融合的PD-L1或PD-L2的胞外或PD-1结合部分的免疫粘附素。在一些实施方案中,所述PD-1结合拮抗剂为AMP-224。AMP-224(也称为B7-DCIg)是WO 2010/027827和WO 2011/066342中描述的PD-L2-Fc融合可溶性受体。

[0354] 在一些实施方案中,所述抗PD-1抗体为MDX-1106。“MDX-1106”的可替代的名称包括MDX-1106-04、ONO-4538、BMS-936558和纳武单抗。在一些实施方案中,所述抗PD-1抗体为纳武单抗(CAS登记号:946414-94-4)。

[0355] 在一些实施方案中,所述PD-1轴结合拮抗剂为PD-L2结合拮抗剂。在一些实施方案中,PD-L2结合拮抗剂为抗PD-L2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,所述PD-L2结合拮抗剂为免疫粘附素。

[0356] 在一些实施方案中,所述PD-L1结合拮抗剂为抗PD-L1抗体。在一些实施方案中,所述抗PD-L1抗体能够抑制PD-L1与PD-1之间和/或PD-L1与B7-1之间的结合。在一些实施方案中,所述抗PD-L1抗体为单克隆抗体。在一些实施方案中,所述抗PD-L1抗体为选自由以下组成的组的抗体片段:Fab、Fab'-SH、Fv、scFv和(Fab')₂片段。在一些实施方案中,所述抗PD-L1抗体为人源化抗体。在一些实施方案中,所述抗PD-L1抗体为人抗体。在一些实施方案中,所述抗PD-L1抗体选自由以下组成的组:YW243.55.S70、MPDL3280A(阿特殊单抗)、MDX-1105、MEDI4736(德瓦鲁单抗)和MSB0010718C(avelumab)。抗体YW243.55.S70是WO 2010/077634和美国专利号8,217,149中描述的抗PD-L1,所述专利中的每个的全部内容以引用方式并入本文。MDX-1105(也称为BMS-936559)是WO 2007/005874中描述的抗PD-L1抗体。MEDI4736是WO 2011/066389和US 2013/034559中描述的抗PD-L1单克隆抗体。用于本发明方法的抗PD-L1抗体的实例和用于制备其的方法描述于PCT专利申请WO 2010/077634、WO

2007/005874、WO 2011/066389、美国专利号8,217,149和US 2013/034559中,所述专利中的每个的全部内容以引用方式并入本文。

[0357] 在任何前述实施方案中,分离的抗PD-L1抗体可结合到人PD-L1,例如如UniProtKB/Swiss-Prot登录号Q9NZQ7.1中所示的人PD-L1或其变体。

[0358] 在又一个实施方案中,提供了编码本文描述的任何抗体的分离核酸。在一些实施方案中,核酸还包括适于表达编码任何前述抗PD-L1抗体的核酸的载体。在又一个具体方面,载体处于适于核酸表达的宿主细胞中。在又一个具体方面,宿主细胞为真核细胞或原核细胞。在又一个具体方面,真核细胞为哺乳动物细胞,诸如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

[0359] 抗体或其抗原结合片段可使用本领域已知的方法,例如通过包括以下的方法来制备:将含有呈适于表达的形式编码任何前述抗PD-L1抗体或抗原结合片段的核酸的宿主细胞在适于产生此类抗体或片段的条件下培养,以及回收所述抗体或片段。明确地预期,用于以上枚举的任何实施方案中的所述PD-1轴结合拮抗剂抗体(例如,抗PD-L1抗体、抗PD-1抗体和抗PD-L2抗体)或本文描述的其他抗体(例如,用于检测PD-L1表达水平的抗PD-L1抗体)可具有单一或成组合形式的部分A“示范性抗PD-L1抗体”的分段1-5中描述的任何特征。

[0360] 在一些情况下,任何前述方法还包括向患者施用有效量的第二治疗剂。在一些情况下,所述第二治疗剂选自由以下组成的组:细胞毒性剂、生长抑制剂、辐射疗法剂、抗血管生成剂及其组合。

[0361] 用于本文描述的方法中的组合物可通过任何合适的方法来施用,所述合适的方法包括例如:以静脉内方式、以肌内方式、以皮下方式、以皮内方式、以经皮方式、以动脉内方式、以腹膜内方式、以损伤内方式、以颅内方式、以关节内方式、以前列腺内方式、以胸膜内方式、以气管内方式、以鞘内方式、以鼻内方式、以阴道内方式、以直肠内方式、以局部方式、以肿瘤内方式、以腹膜方式、以结膜下方式、以囊内方式、以粘膜方式、以心包内方式、以脐内方式、以眼内方式、以眶内方式、以口服方式、以局部方式、以透皮方式、以玻璃体内方式(例如,通过玻璃体内注射)、通过滴眼剂、通过吸入、通过注射、通过植入、通过输注、通过连续输注、通过直接沐浴靶细胞的局部灌注、通过导管、通过灌注、以乳膏形式或以脂质组合物形式。用于本文描述的方法中的组合物还可以全身方式或以局部方式施用。施用方法可以根据各种因素(例如,所施用的化合物或组合物以及所治疗的病状、疾病或病症的严重性)而变化。在一些实施方案中,以静脉内方式、以肌内方式、以皮下方式、以局部方式、以口服方式、以透皮方式、以腹膜内方式、以眶内方式、通过植入、通过吸入、以鞘内方式、以心室内方式或以鼻内方式施用抗癌疗法(例如,PD-1轴结合拮抗剂)。部分地根据施用是否为短暂的或长期的,给药可通过任何适合的途径进行,例如通过注射,诸如静脉内或皮下注射。本文涵盖各种给药排程,包括但不限于单次施用或各种时间点内的多次施用、推注施用和脉冲输注。

[0362] 本文所述的治疗剂(例如,PD-1轴结合拮抗剂(例如,抗体、结合多肽和/或小分子))可以符合良好医疗实践的方式配制、给药和施用。在此情形下的考虑因素包括所治疗的特定病症、所治疗的特定哺乳动物、单个患者的临床病状、病症的病因、药剂递送部位、施用方法、施用排程和医学从业者已知的其他因素。治疗剂(例如,PD-1轴结合拮抗剂)无需但任选地与一种或多种当前用来预防或治疗所考虑的病症的药剂一起配制和/或同时施用。此类其他药剂的有效量取决于制剂中存在的治疗剂(例如,PD-1轴结合拮抗剂)的量、病症

或治疗的类型以及以上论述的其他因素。这些药剂通常以如本文所述的相同剂量以及用如本文所述的施用途径,或以本文所述的剂量的约1%至99%,或以凭经验/临床上确定为适当的任何剂量且通过凭经验/临床上确定为适当的任何途径加以使用。

[0363] 对于癌症(例如,非小细胞肺癌)的预防或治疗,本文描述的治疗剂(例如,PD-1轴结合拮抗剂)的适当剂量(当单独使用或与一种或多种其他另外的治疗剂组合使用时)将取决于待治疗的疾病的类型、疾病的严重性和病程、是否出于预防性或治疗性目的而施用治疗剂(例如,PD-1轴结合拮抗剂)、先前疗法、患者的临床病史和对治疗剂(例如,PD-1轴结合拮抗剂)的应答,以及主治医师的判断。治疗剂(例如,PD-1轴结合拮抗剂)适宜一次或通过一系列治疗施用于患者。根据视以上提及的因素,一种典型的每日剂量的范围可为约1 μ g/kg至100mg/kg或更多。对于几天或更长时间内的重复施用,根据病状,治疗将通常持续直至出现所需的疾病症状抑制。此类剂量可间歇地施用,例如每周或每三周(例如,使得患者接受例如约两剂至约二十剂,或例如约六剂治疗剂(例如,PD-1轴结合拮抗剂))。可施用初始的较高负荷剂量,随后施用一次或多次较低剂量。然而,可使用其他给药方案。此疗法的进展易于通过常规技术和测定来监测。

[0364] 例如,作为一般提议,无论是否通过一次或多次施用进行,向人施用的拮抗剂抗体(例如,PD-1轴结合拮抗剂抗体)的治疗有效量将处于约0.01至约50mg/kg患者体重的范围内。在一些实施方案中,例如每日、每周、每两周、每三周或每月施用的所用抗体为约0.01mg/kg至约45mg/kg、约0.01mg/kg至约40mg/kg、约0.01mg/kg至约35mg/kg、约0.01mg/kg至约30mg/kg、约0.01mg/kg至约25mg/kg、约0.01mg/kg至约20mg/kg、约0.01mg/kg至约15mg/kg、约0.01mg/kg至约10mg/kg、约0.01mg/kg至约5mg/kg,或约0.01mg/kg至约1mg/kg。在一些实施方案中,所述抗体以15mg/kg施用。然而,可使用其他给药方案。在一个实施方案中,在21天周期(每三周,q3w)的第1天,以约100mg、约200mg、约300mg、约400mg、约500mg、约600mg、约700mg、约800mg、约900mg、约1000mg、约1100mg、约1200mg、约1300mg、约1400mg、约1500mg、约1600mg、约1700mg或约1800mg的剂量向人施用本文描述的拮抗剂抗体(例如,PD-1轴结合拮抗剂抗体)。剂量可作为单个剂量或作为多个剂量(例如2或3个剂量)施用,诸如输注。与单个治疗相比,可减少组合治疗中施用的抗体的剂量。通过常规技术易于监测此疗法的进展。

[0365] 在一些实施方案中,所述方法还涉及向患者施用有效量的第二治疗剂。在一些实施方案中,所述第二治疗剂选自由以下组成的组:细胞毒性剂、化疗剂、生长抑制剂、放射疗法剂、抗血管生成剂及其组合。在一些实施方案中,治疗剂(例如,PD-1轴结合拮抗剂)可与化学疗法或化疗剂联合施用。在一些实施方案中,治疗剂(例如,PD-1轴结合拮抗剂)可与放射疗法剂联合施用。在一些实施方案中,治疗剂(例如,PD-1轴结合拮抗剂)可与靶向疗法或靶向治疗剂联合施用。在一些实施方案中,治疗剂(例如,PD-1轴结合拮抗剂)可与免疫疗法或免疫治疗剂(例如,单克隆抗体)联合施用。

[0366] 以上指示的此类组合疗法涵盖组合施用(其中两种或更多种治疗剂包括在相同或单独制剂中),以及单独施用,在所述情况下,施用本发明的治疗剂(例如,PD-1轴结合拮抗剂)可在施用另外的治疗剂或药剂之前、同时和/或之后进行。在一个实施方案中,治疗剂(例如,PD-1轴结合拮抗剂)的施用和另外的治疗剂的施用在彼此的约一个月内,或约一周、两周或三周内,或约一天、两天、三天、四天、五天或六天内进行

[0367] 根据本发明使用的治疗剂(例如,PD-1轴结合拮抗剂)的治疗制剂通过将具有所需纯度的拮抗剂与呈冻干制剂或水溶液形式的任选的药学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂混合来制备以存储。对于关于制剂的一般信息,参见,例如Gilman等(编)The Pharmacological Bases of Therapeutics,第8th版,Pergamon Press,1990;A.Gennaro(编),Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,Mack Publishing Co., Pennsylvania,1990;Avis等(编)Pharmaceutical Dosage Forms:Parenteral Medications Dekker,New York,1993;Lieberman等(编)Pharmaceutical Dosage Forms:Tablets Dekker,New York,1990;Lieberman等(编),Pharmaceutical Dosage Forms:Disperse Systems Dekker,New York,1990;以及Walters(编)Dermatological and Transdermal Formulations(Drugs and the Pharmaceutical Sciences),第119卷,Marcel Dekker,2002。

[0368] 可接受的载剂、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度下对接受者无毒性,并且包括缓冲剂,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如十八烷基二甲基苄基氯化铵、氯化六烃季铵(hexamethonium chloride)、氯化苯二甲羟铵(benzalkonium chloride)、氯化苄甲乙氧铵(benzethonium chloride)、苯酚、丁醇或苄醇;对羟苯甲酸烷酯,诸如对羟苯甲酸甲酯或丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇和间-甲酚);低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、凝胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯基吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷酰氨酸、天冬酰氨酸、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、双糖以及其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐反离子,诸如钠离子;金属络合物(例如,Zn-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,诸如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

[0369] 本文中的制剂还可含有多于一种活性化合物,优选为不会不利地影响彼此的具有互补活性的那些活性化合物。此类药物的类型和有效量取决于例如制剂中存在的拮抗剂的量和类型,以及受试者的临床参数。

[0370] 所述活性成分也可截留在例如通过凝聚技术或界面聚合作用制备的微胶囊(例如分别为羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙酸甲酯)微胶囊)中、胶状药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米粒子和纳米胶囊)中或粗乳液中。此类技术公开于Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编(1980)中。

[0371] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适实例包括含有拮抗剂的固体疏水性聚合物的半透性基质,所述半透性基质呈成形制品的形式,例如膜或微胶囊。持续释放基质的实例包括聚酯、水凝胶(例如聚(2-羟乙基-甲基丙烯酸酯)或聚(乙烯醇))、聚乳酸(美国专利号3,773,919)、L-谷氨酸与 γ -乙基-L-谷氨酸酯的共聚体、不可降解乙烯-乙酸乙烯酯、可降解乳酸-乙醇酸共聚体诸如LUPRON DEPOT™(由乳酸-乙醇酸共聚体和乙酸亮丙瑞林(leuprolide acetate)组成的可注射微球)以及聚-D-(-)-3-羟基丁酸。

[0372] 有待用于体内施用的制剂必须为无菌的。这易于通过无菌过滤膜过滤来实现。

[0373] 应当理解,代替抗体(例如,抗PD-L1抗体或抗PD-1抗体)或除了抗体(例如,抗PD-L1抗体或抗PD-1抗体)之外,任何以上制品还可包括本文描述的免疫缀合物。

III. 实施例

[0374] 以下为本发明的方法和组合物的实施例。应理解，鉴于上文提供的一般性描述，可以实践各种其他实施方案。

[0375] 实施例1. 抗PD-L1抗体的产生

[0376] 如图1中示意性描述的那样产生抗PD-L1兔单克隆抗体。简而言之，合成人PD-L1 (SKKQSDTHLEET; SEQ ID NO:1) 的N端胞质区 (氨基酸残基279-290) 的肽片段。使旨在用于免疫的12-氨基酸片段与钥孔血蓝蛋白 (KLH) 缀合，所述钥孔血蓝蛋白KLH是用于通过抗体产生刺激实质性免疫应答的广泛使用的载剂蛋白。将两个氨基酸 (Cys-Gly) 附加到允许与载剂蛋白KLH缀合的序列的天然存在的N端。将新西兰白兔用使用完全弗氏佐剂乳化的KLH缀合的PD-L1抗原免疫，随后用使用不完全弗氏佐剂乳化的一系列PD-L1抗原加强剂 (booster) 免疫。通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 使用PD-L1抗原筛选抗体表达细胞。通过免疫组织化学 (IHC) 进一步筛选所有ELISA阳性克隆，并选择产生具有最高特异性的抗体的克隆。对于抗PD-L1抗体的重组产生，将编码抗体的重链和轻链序列的cDNA克隆，通过共转染表达，并通过IHC筛选与PD-L1 (SEQ ID NO:1) 的结合。将抗PD-L1单克隆抗体 (SP142) 使用这些方法产生，并且随后通过蛋白A亲和色谱纯化。SP142抗体的重链可变区序列和轻链可变区序列如下。

[0377] 重链可变区：

QSLEESGGRLVKPDETLTITCTVSGIDLSSNGLTWVRQAPGEGLEWIGTINKDASAYYASWAKGRLTISKP

HVR-H1

HVR-H2

[0378] SSTKVDLKITSPTTEDTATYFCGRIFAKTGTSIWGPGTLVTVSS (SEQ ID NO: 16)

HVR-H3

[0379] 轻链可变区：

AIVMTQTSPVSAAVGGTVTINCQASESVYSNNYLSWFQQKPGQPPKLLIYLASTLASGVPSRFKGSVSGS

HVR-L1

HVR-L2

[0380] TQFTLTISGVQCDDAATYYCIGGKSSSTDGNAFGGGTEVVVR (SEQ ID NO: 17)

HVR-L3

[0381] 实施例2. 抗PD-L1抗体的诊断用途

[0382] 将SP142抗PD-L1抗体用于进一步的IHC和蛋白质印迹分析中。对于IHC分析，将组织切片用SP142孵育16分钟，随后进行标准洗涤，并用山羊抗兔生物素化抗体进行二次检测。评估具有不同PD-L1表达水平的福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 细胞 (用空载体作为对照 (阴性) 转染的人胚肾HEK-293细胞，以及DOR-13 (低至中度表达)、结肠癌RKO细胞 (中度表达) 和PD-L1转染的293细胞 (高表达)；参见图2A-2D) 或来自不同组织类型 (胎盘组织、扁桃体组织和霍奇金 (HK) 淋巴瘤；参见图3A-3C) 的福尔马林固定石蜡包埋 (FFPE) 细胞上的SP142的特异性。为进一步确定SP142的特异性，对来自具有不同PD-L1表达水平的细胞系 (NIH H820肺腺癌细胞系 (高表达)、Karpas 299 T细胞淋巴瘤细胞系 (中间表达) 和Calu-3肺腺癌细胞系 (阴性对照)；参见图4) 的细胞裂解物进行蛋白质印迹分析。

[0383] 实施例3. SP142抗PD-L1抗体与E1L3N抗PD-L1抗体的比较

[0384] 在正常组织切片和肿瘤组织切片 (包括来自非小细胞肺癌 (NSCLC) 患者的组织) 的IHC分析中，将SP142抗PD-L1抗体与抗PD-L1抗体E1L3N (Cell Signaling Technology) 进行比较。简而言之，对于IHC实验，将SP142和E1L3N抗PD-L1抗体连续稀释 (0.11-28μg/ml)。使

用二甲苯替代物和分级醇将组织切片的载玻片脱蜡。通过将组织切片在EDTA缓冲液(pH 8.0)中煮沸10分钟,随后在室温下冷却20分钟,来实现抗原修复。将组织切片用SP142或E1L3N孵育10分钟,随后进行标准洗涤,并用山羊抗兔抗体进行二次检测15分钟。用报道分子3,3'-二氨基联苯胺(DAB)将最终孵育进行10分钟。为评估灵敏度,在胎盘组织的FFPE组织切片上比较不同浓度的E1L3N和SP142(参见图5A-5J)。使用正常组织类型和肿瘤组织类型(胃上皮组织、神经组织、肾组织、膀胱移行细胞癌(TCC)、乳腺导管癌(Ca)和肺鳞状细胞癌(肺SCCa);参见图6A-6T和图7A-7J)确定E1L3N和SP142的特异性。还对用E1L3N或SP142染色的不同FFPE组织类型的切片(扁桃体组织、宫颈鳞状细胞癌(SCC)、霍奇金淋巴瘤(HK淋巴瘤)、胰腺腺癌、前列腺腺癌和皮肤SCC;参见图8A-8L)进行IHC分析。

[0385] 然后在来自NSCLC患者的FFPE组织切片中比较用E1L3N和SP142进行的PD-L1表达的检测。E1L3N检测来自PD-L1状态先前未被确定的119个NSCLC样品的50个PD-L1阳性病例,并且SP142检测到58个PD-L1阳性病例,其中认为阳性染色的5%或更多的肿瘤细胞指示PD-L1阳性病例。为进一步评估用这些抗体进行的PD-L1检测,将来自NSCLC患者的FFPE组织切片用E1L3N和SP142依次染色(图9A-9J)。然后计算用E1L3N或SP142染色的119个NSCLC患者组织切片的膜免疫反应性程度(即H评分)。用下式计算PD-L1的H评分:H评分=3(强染色膜的百分比)+2(中等染色膜的百分比)+1(弱染色膜的百分比),从而得到0至300的H评分范围。来自这些119个NSCLC病例的E1L3N的平均H评分(56 ± 8)显著低于SP142的平均H评分(100 ± 11)。这些集体数据证实SP142是比E1L3N更敏感和特异性的。

[0386] 实施例4. 抗PD-L1抗体SP142在IHC分析中的使用证实免疫细胞(IC)和肿瘤细胞(TC)中的PD-L1染色

[0387] 在来自所有测试的癌症类型(大约28-30种类型)的代表性病例中,抗PD-L1抗体SP142检测到肿瘤浸润性免疫细胞(IC)和肿瘤细胞中的PD-L1表达,所述测试的癌症类型包括但不限于非小细胞肺癌(NSCLC)、宫颈鳞状细胞癌、HK淋巴瘤、胰腺腺癌、前列腺腺癌和皮肤鳞状细胞癌(参见,例如图8A-8L、9A-9J、10、11、15A-15B、16A-16H和18A-18F)。

[0388] 免疫细胞(IC)

[0389] 免疫细胞(IC)是存在于肿瘤内和邻近的肿瘤周围基质中的肿瘤浸润性免疫细胞,所述免疫细胞包括形态学上异质的细胞类型群体,包括淋巴细胞、巨噬细胞、树突细胞和具有网状形态的细胞。使用SP142抗体进行肿瘤组织切片的IHC分析。在肿瘤组织切片中,PD-L1阳性IC常常显示与淋巴细胞相关的深棕色点状或不连续膜染色(图10)。PD-L1阳性IC通常被观察作为肿瘤内和肿瘤周围基质中的聚集体和/或作为单细胞或肿瘤细胞组(基于肿瘤部分中的位置的肿瘤细胞分组)中的弥散性扩散。在肿瘤-基质界面处也观察到PD-L1阳性IC染色,并且作为三级淋巴结构中的网状染色。

[0390] 肿瘤细胞(TC)

[0391] 除了上述的PD-L1阳性IC之外,在使用SP142抗体的IHC分析中,还确定PD-L1阳性肿瘤细胞(TC)存在于肿瘤样品中。PD-L1阳性TC通常通过膜染色表征(图11),其偶尔与细胞质染色相关。

[0392] 结果证实,当用于PD-L1表达的IHC分析时,SP-142抗体可用来获得肿瘤组织切片的敏感和特异性的PD-L1染色,并且还揭示了PD-L1阳性IC的存在以及肿瘤组织切片中的PD-L1阳性TC。

[0393] 材料和方法

[0394] 将FFPE组织切片脱蜡,并在EDTA抗原修复缓冲液中加热,之后将兔抗人PD-L1 (SP142)单克隆抗体添加到组织切片中。将IHC用自动染色系统 (BenchMark ULTRA,Roche)或半自动染色系统 (Autostainer,Thermo Scientific) 处理。表2示出用于BenchMark ULTRA系统的方案。

[0395] 表2.用于BenchMark ULTRA系统使用SP142的IHC方案

[0396]	方案选择	BenchMark ULTRA
	软件工具	NexES v10.6
	染色程序	U OptiView DAB IHC v4
	脱蜡	选定的
	细胞调理	48分钟CC1
	前初级过氧化物酶	选定的
	初级孵育	16分钟,36°C
	OptiView HQ接头	8分钟
	OptiView HRP多聚体	8分钟
	OptiView扩增	选定的
	扩增器和扩增H202	8分钟
	扩增多聚体	8分钟
	苏木精II	4分钟
	发蓝试剂	4分钟

[0397] 实施例5. IC、TC及其组合中的PD-L1阳性的测定

[0398] 可使用不同的截断值 (例如,1%、5%、10%等) 对用抗PD-L1抗体 (例如,本发明的任何抗PD-L1抗体,例如SP142) 染色的组织的PD-L1阳性IC、TC或IC和TC的组合的存在进行评分。这些不同截断值可用于患者分层,例如用于选择可能响应于特定抗癌疗法 (例如,包括PD-1轴结合拮抗剂的抗癌疗法) 的患者。

[0399] 免疫细胞评分方法

[0400] 可基于被任何强度的PD-L1阳性IC覆盖的肿瘤区域的百分比 (在本文称为“IC%”),对IC的PD-L1表达进行评分。如本文所用的肿瘤区域是指被肿瘤细胞以及它们相关的肿瘤内和邻近的肿瘤周围基质占据的区域 (例如,肿瘤切片的区域) (图12A-12C)。在此评分方法中选择肿瘤区域作为分母,因为IC不仅存在于基质内,而且在一些情况下作为单细胞存在或在肿瘤细胞内具有弥散性扩散。如下所述,在一些情况下,观察到IC作为肿瘤切片内的聚集体,而在其他情况下,观察到IC作为跨肿瘤切片扩散的一个或几个细胞的病灶。

[0401] 用于确定肿瘤样品的IC%的示例性工作流程示于图13中。在一些情况下,将肿瘤样品的连续切片用如上所述的H&E或抗PD-L1抗体 (例如,SP142) 染色。工作流程中的第一步是检查H&E染色的载玻片,以确定肿瘤、坏死和/或IC的存在。接着,例如使用显微镜以低放大倍率 (例如,2x或4x物镜;20x-40x总放大率) 检查相应的PD-L1染色的载玻片,并评估总体PD-L1染色图案。例如,可确定肿瘤组织切片是否在IC、TC、IC和TC两者中展现PD-L1染色,或者肿瘤组织切片是否未展现实质的PD-L1染色。接着,以较高放大倍率 (例如,10x或20x物镜,100x-200x放大率) 检查PD-L1染色的载玻片以检查基质和肿瘤细胞组的IC染色。较高放

大倍率的使用能够确认弱染色IC,以及区分处于强TC染色中的IC。最后,以较低放大倍率(例如,2x或4x物镜;20-40x总放大率)检查PD-L1染色的载玻片,以便确定或估算PD-L1阳性IC百分比(被任何强度的PD-L1阳性IC覆盖的肿瘤区域的百分比)。

[0402] 例如,如图14所示,在以较高放大率检查并确认染色之后,可以较低放大倍率(例如,2x或4x物镜;20-40x总放大率)确定被具有任何PD-L1染色强度的PD-L1阳性IC覆盖的肿瘤区域的百分比。在IC染色图案的特征在于单细胞扩散的情况下,用于特定范围的IC染色(例如,1%、5%、10%)的参照图像可用于比较目的,以估算或确定被具有任何强度的PD-L1染色的PD-L1阳性IC覆盖的肿瘤区域的百分比(例如,参见图15A和15B以及16A-16H)。

[0403] 肿瘤细胞评分方法

[0404] 可以基于显示任何强度的任何可识别的膜PD-L1染色的肿瘤细胞的总数百分比(在本文也称为“TC%”) 对肿瘤细胞(TC)的PD-L1表达进行评分。基于H&E和IHC染色的载玻片中的细胞形态,易于将TC与IC区分。参见,例如图17A-17C。即使与颗粒质量相关,膜染色应可视为线性染色(即,沿着细胞膜的轮廓排列)。图18A-18F示出展现出特定范围的TC PD-L1染色(即,TC% $<5\%$ 、 ≥ 5 至 $<50\%$ 或 $\geq 50\%$)的PD-L1染色的NSCLC肿瘤组织切片的实例。

[0405] 其他实施方案

[0406] 尽管上述本发明已出于清楚理解的目的通过说明和实例方式详细描述,但描述和实施例不应解释为限制本发明的范围。本文引用的所有专利和科学文献的公开内容皆以全文引用的方式明确并入本文。

[0039]	<213>	人工序列
[0040]	<220>	
[0041]	<223>	合成构建体
[0042]	<400>	4
[0043]		Ile Ala Phe Lys Thr Gly Thr Ser Ile
[0044]	1	5
[0045]	<210>	5
[0046]	<211>	29
[0047]	<212>	PRT
[0048]	<213>	人工序列
[0049]	<220>	
[0050]	<223>	合成构建体
[0051]	<400>	5
[0052]		Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Lys Pro Asp Glu Thr
[0053]	1	5 10 15
[0054]		Leu Thr Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser
[0055]		20 25
[0056]	<210>	6
[0057]	<211>	14
[0058]	<212>	PRT
[0059]	<213>	人工序列
[0060]	<220>	
[0061]	<223>	合成构建体
[0062]	<400>	6
[0063]		Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile Gly
[0064]	1	5 10
[0065]	<210>	7
[0066]	<211>	31
[0067]	<212>	PRT
[0068]	<213>	人工序列
[0069]	<220>	
[0070]	<223>	合成构建体
[0071]	<400>	7
[0072]		Arg Leu Thr Ile Ser Lys Pro Ser Ser Thr Lys Val Asp Leu Lys Ile
[0073]	1	5 10 15
[0074]		Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Gly Arg
[0075]		20 25 30
[0076]	<210>	8
[0077]	<211>	11

[0078]	<212>	PRT
[0079]	<213>	人工序列
[0080]	<220>	
[0081]	<223>	合成构建体
[0082]	<400>	8
[0083]	Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser	
[0084]	1	5 10
[0085]	<210>	9
[0086]	<211>	13
[0087]	<212>	PRT
[0088]	<213>	人工序列
[0089]	<220>	
[0090]	<223>	合成构建体
[0091]	<400>	9
[0092]	Gln Ala Ser Glu Ser Val Tyr Ser Asn Asn Tyr Leu Ser	
[0093]	1	5 10
[0094]	<210>	10
[0095]	<211>	7
[0096]	<212>	PRT
[0097]	<213>	人工序列
[0098]	<220>	
[0099]	<223>	合成构建体
[0100]	<400>	10
[0101]	Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser	
[0102]	1	5
[0103]	<210>	11
[0104]	<211>	12
[0105]	<212>	PRT
[0106]	<213>	人工序列
[0107]	<220>	
[0108]	<223>	合成构建体
[0109]	<400>	11
[0110]	Ile Gly Gly Lys Ser Ser Ser Thr Asp Gly Asn Ala	
[0111]	1	5 10
[0112]	<210>	12
[0113]	<211>	23
[0114]	<212>	PRT
[0115]	<213>	人工序列
[0116]	<220>	

[0117]	<223>	合成构建体
[0118]	<400>	12
[0119]	Ala Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly	
[0120]	1	5 10 15
[0121]	Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys	
[0122]		20
[0123]	<210>	13
[0124]	<211>	15
[0125]	<212>	PRT
[0126]	<213>	人工序列
[0127]	<220>	
[0128]	<223>	合成构建体
[0129]	<400>	13
[0130]	Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr	
[0131]	1	5 10 15
[0132]	<210>	14
[0133]	<211>	32
[0134]	<212>	PRT
[0135]	<213>	人工序列
[0136]	<220>	
[0137]	<223>	合成构建体
[0138]	<400>	14
[0139]	Gly Val Pro Ser Arg Phe Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr	
[0140]	1	5 10 15
[0141]	Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys	
[0142]		20 25 30
[0143]	<210>	15
[0144]	<211>	10
[0145]	<212>	PRT
[0146]	<213>	人工序列
[0147]	<220>	
[0148]	<223>	合成构建体
[0149]	<400>	15
[0150]	Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Arg	
[0151]	1	5 10
[0152]	<210>	16
[0153]	<211>	115
[0154]	<212>	PRT
[0155]	<213>	人工序列

[0156] <220>
 [0157] <223> 合成构建体
 [0158] <400> 16
 [0159] Gln Ser Leu Glu Glu Ser Gly Gly Arg Leu Val Lys Pro Asp Glu Thr
 [0160] 1 5 10 15
 [0161] Leu Thr Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Asn Gly
 [0162] 20 25 30
 [0163] Leu Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Ile Gly
 [0164] 35 40 45
 [0165] Thr Ile Asn Lys Asp Ala Ser Ala Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
 [0166] 50 55 60
 [0167] Arg Leu Thr Ile Ser Lys Pro Ser Ser Thr Lys Val Asp Leu Lys Ile
 [0168] 65 70 75 80
 [0169] Thr Ser Pro Thr Thr Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Gly Arg Ile
 [0170] 85 90 95
 [0171] Ala Phe Lys Thr Gly Thr Ser Ile Trp Gly Pro Gly Thr Leu Val Thr
 [0172] 100 105 110
 [0173] Val Ser Ser
 [0174] 115
 [0175] <210> 17
 [0176] <211> 112
 [0177] <212> PRT
 [0178] <213> 人工序列
 [0179] <220>
 [0180] <223> 合成构建体
 [0181] <400> 17
 [0182] Ala Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Ser Pro Val Ser Ala Ala Val Gly
 [0183] 1 5 10 15
 [0184] Gly Thr Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Glu Ser Val Tyr Ser Asn
 [0185] 20 25 30
 [0186] Asn Tyr Leu Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu
 [0187] 35 40 45
 [0188] Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 [0189] 50 55 60
 [0190] Lys Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val
 [0191] 65 70 75 80
 [0192] Gln Cys Asp Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Ile Gly Gly Lys Ser Ser
 [0193] 85 90 95
 [0194] Ser Thr Asp Gly Asn Ala Phe Gly Gly Gly Thr Glu Val Val Val Arg

[0195]		100		105		110
[0196]	<210>	18				
[0197]	<211>	290				
[0198]	<212>	PRT				
[0199]	<213>	智人				
[0200]	<400>	18				
[0201]	Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu					
[0202]	1	5		10		15
[0203]	Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr					
[0204]		20		25		30
[0205]	Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu					
[0206]		35		40		45
[0207]	Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile					
[0208]		50		55		60
[0209]	Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser					
[0210]	65	70		75		80
[0211]	Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn					
[0212]		85		90		95
[0213]	Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr					
[0214]		100		105		110
[0215]	Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val					
[0216]		115		120		125
[0217]	Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val					
[0218]		130		135		140
[0219]	Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr					
[0220]	145	150		155		160
[0221]	Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser					
[0222]		165		170		175
[0223]	Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn					
[0224]		180		185		190
[0225]	Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr					
[0226]		195		200		205
[0227]	Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu					
[0228]		210		215		220
[0229]	Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His					
[0230]	225	230		235		240
[0231]	Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr					
[0232]		245		250		255
[0233]	Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys					

[0234]		260		265		270										
[0235]	Gly	Ile	Gln	Asp	Thr	Asn	Ser	Lys	Lys	Gln	Ser	Asp	Thr	His	Leu	Glu
[0236]		275		280		285										
[0237]	Glu	Thr														
[0238]		290														

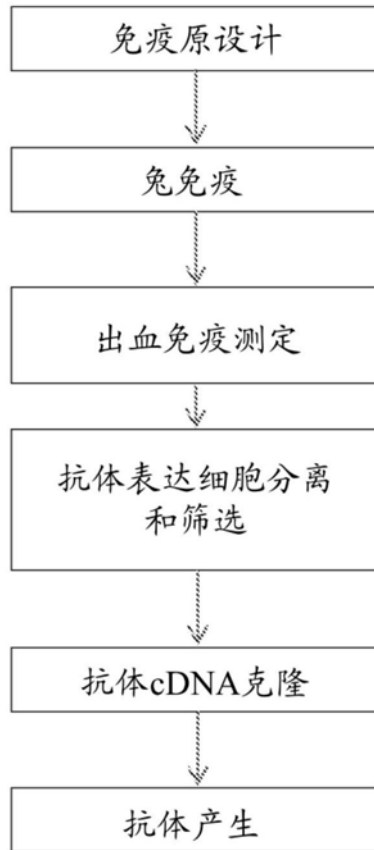


图1

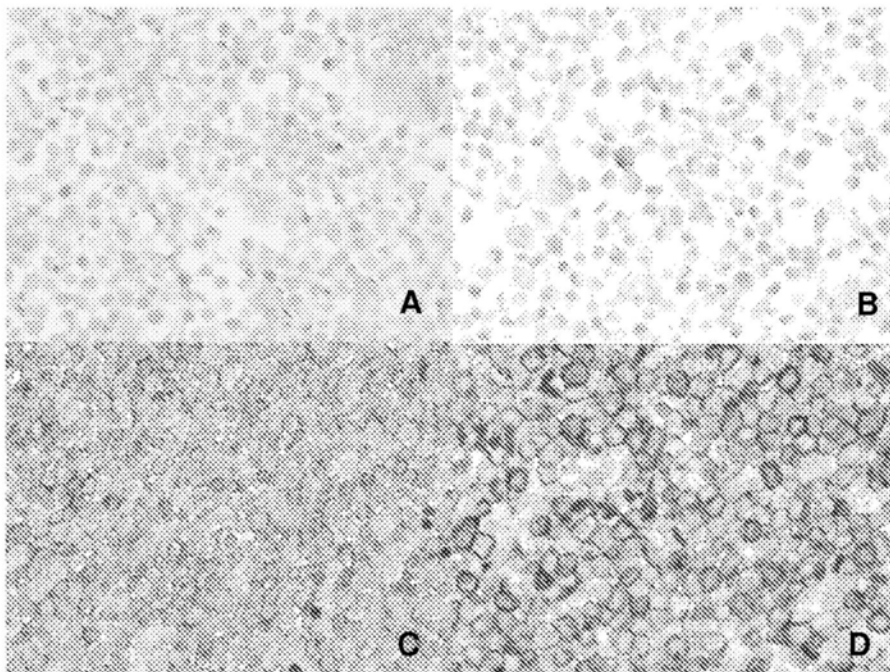


图2A-2D

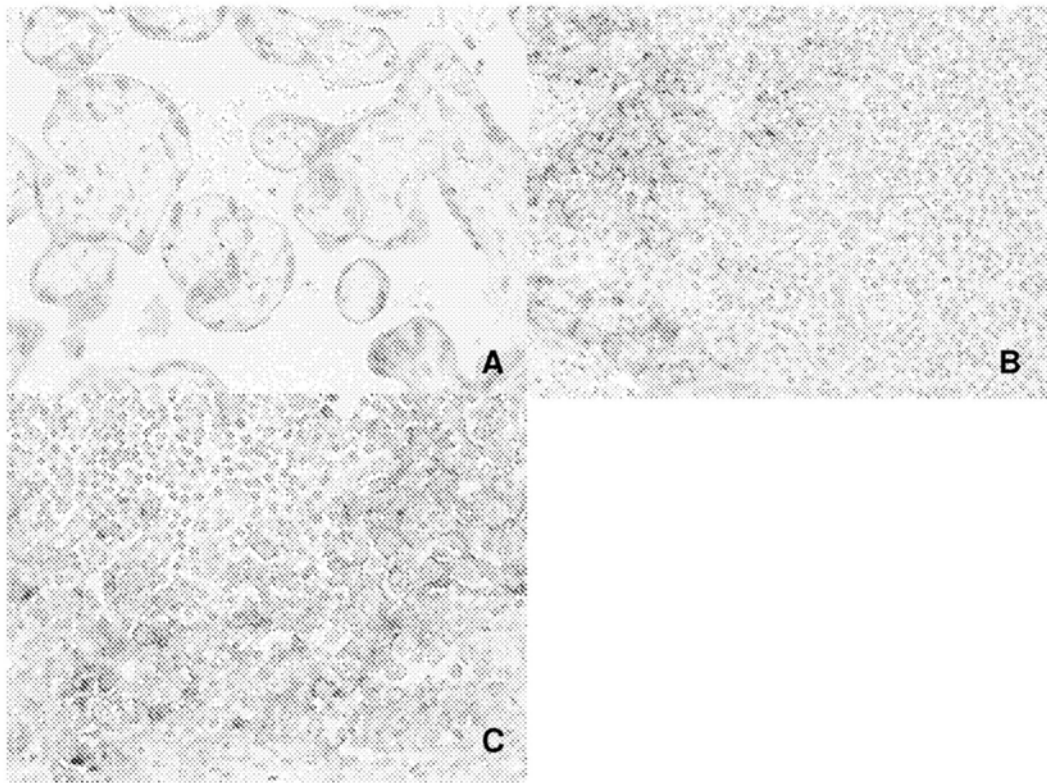


图3A-3C

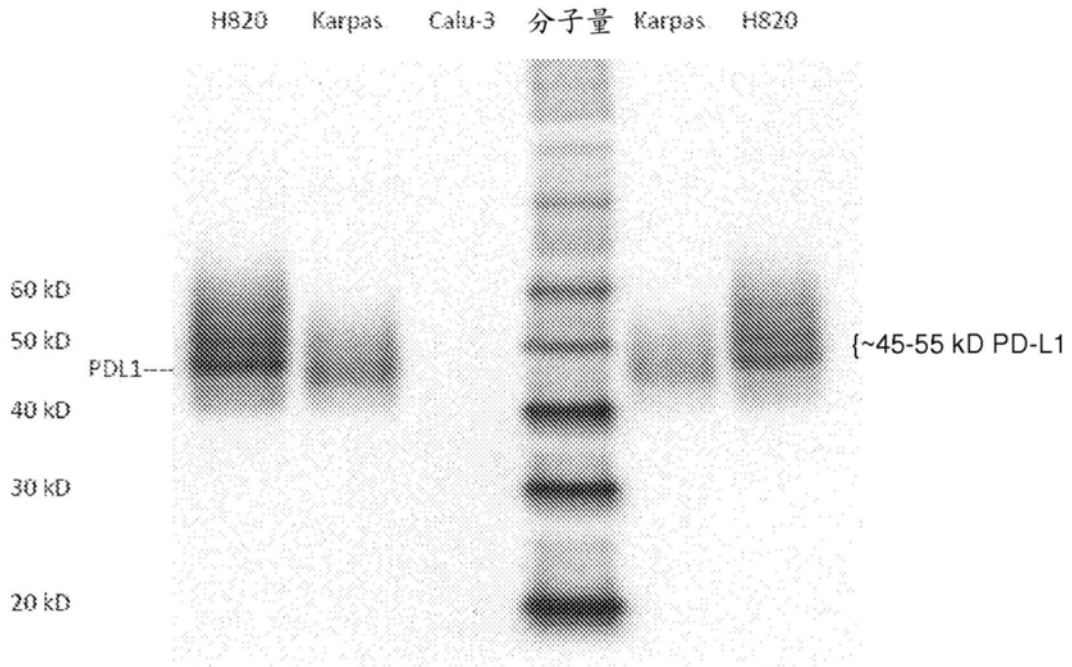


图4

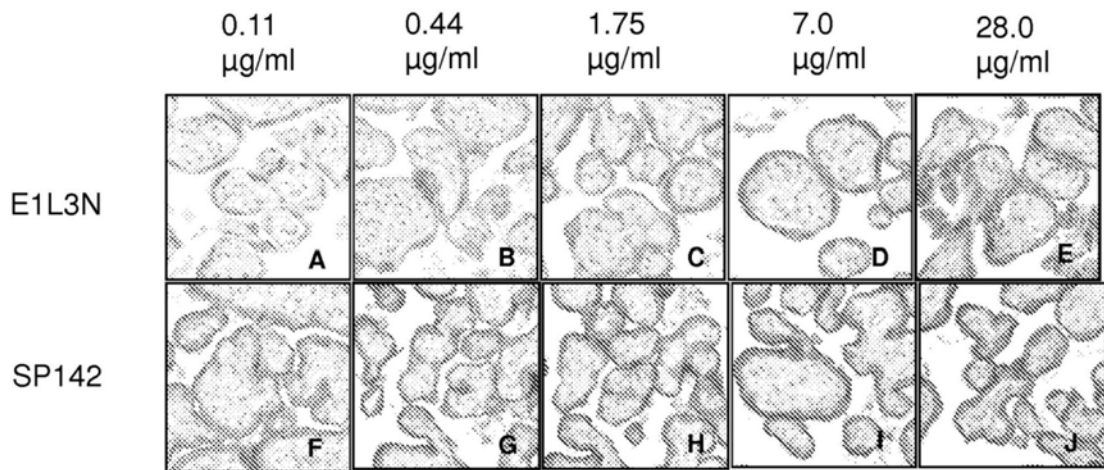


图5A-5J

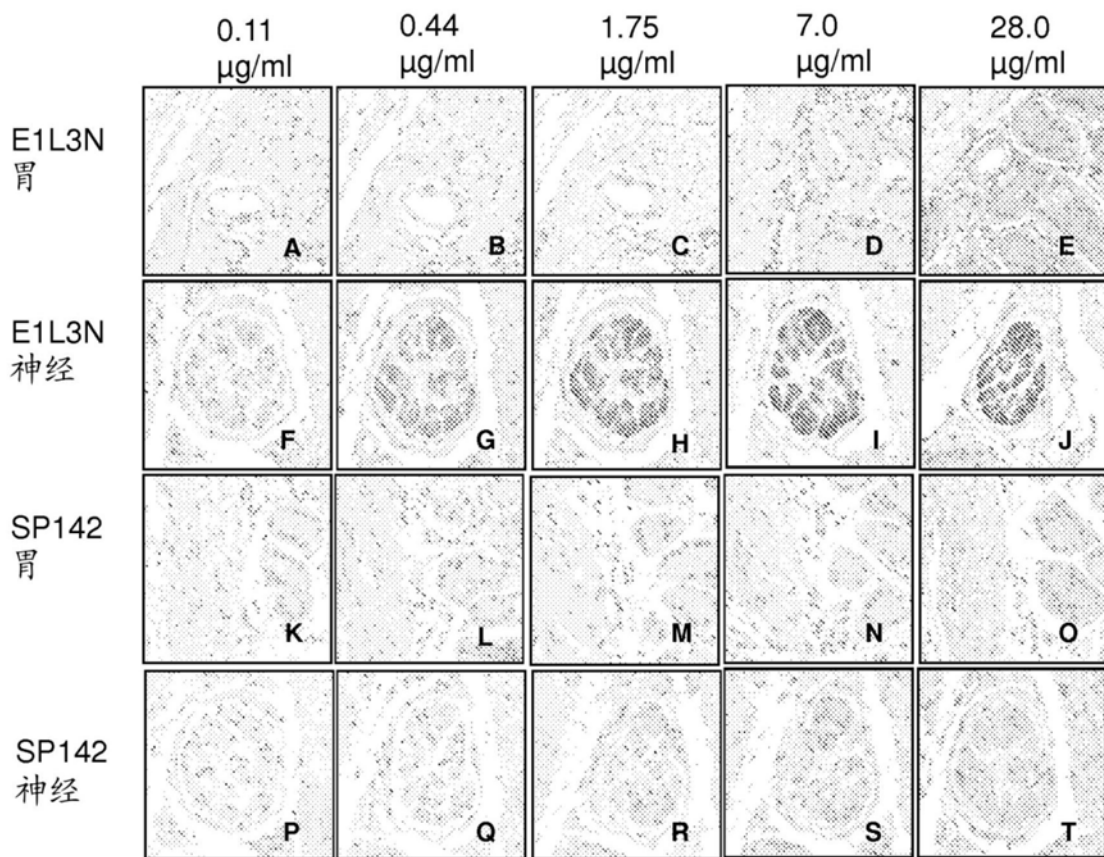


图6A-6T

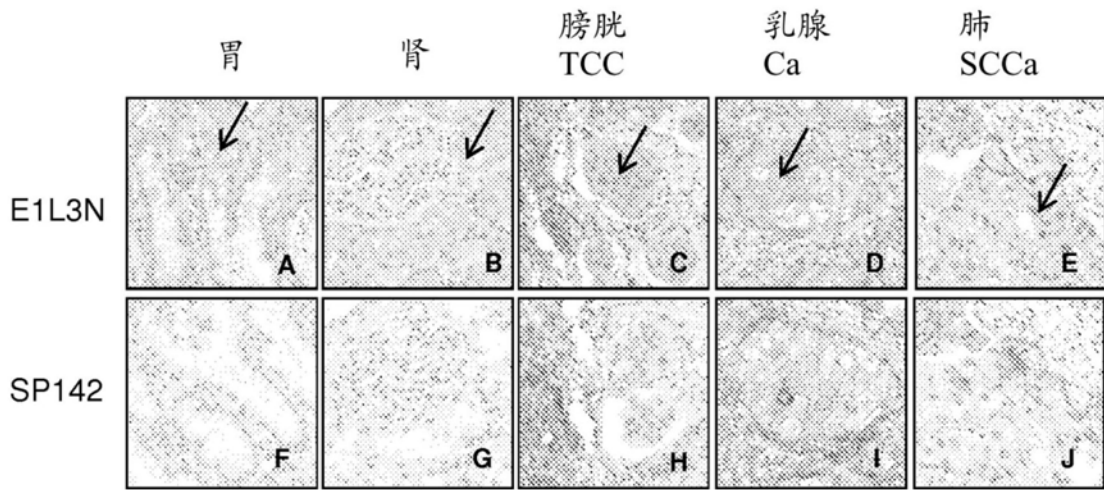


图7A-7J

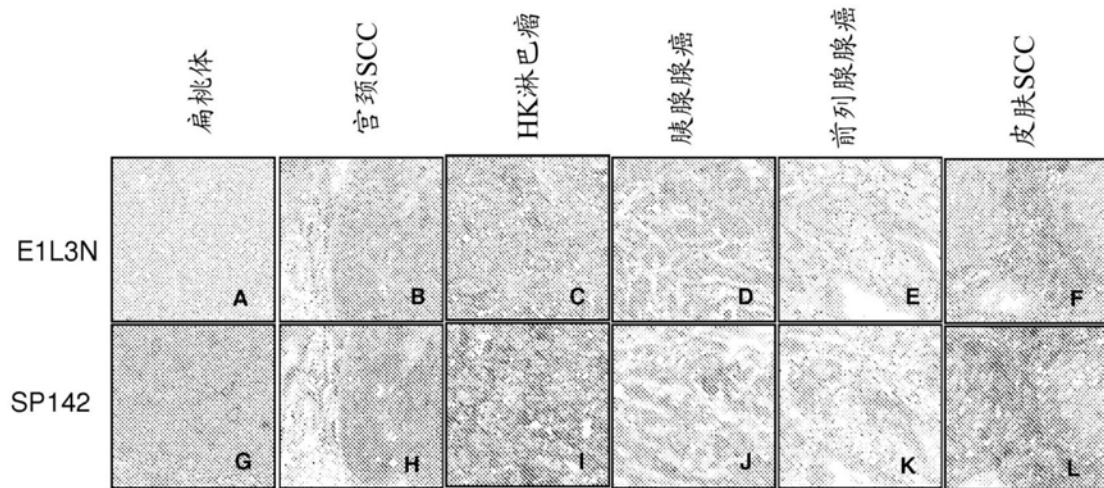


图8A-8L

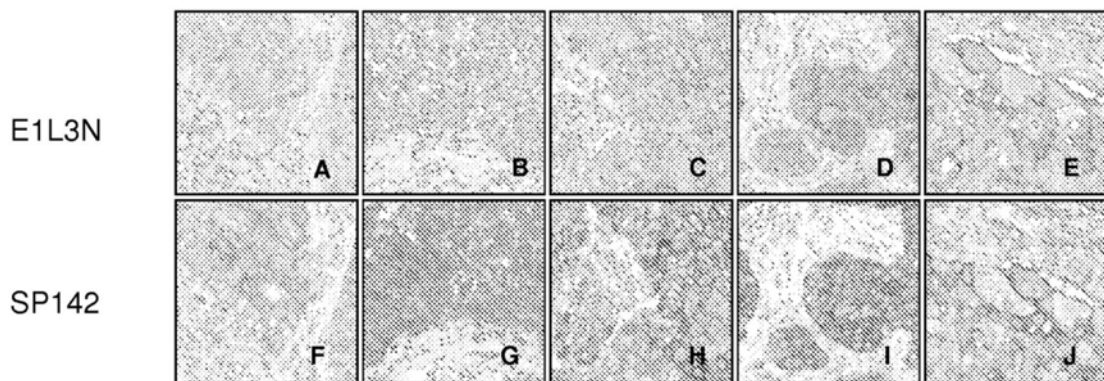


图9A-9J

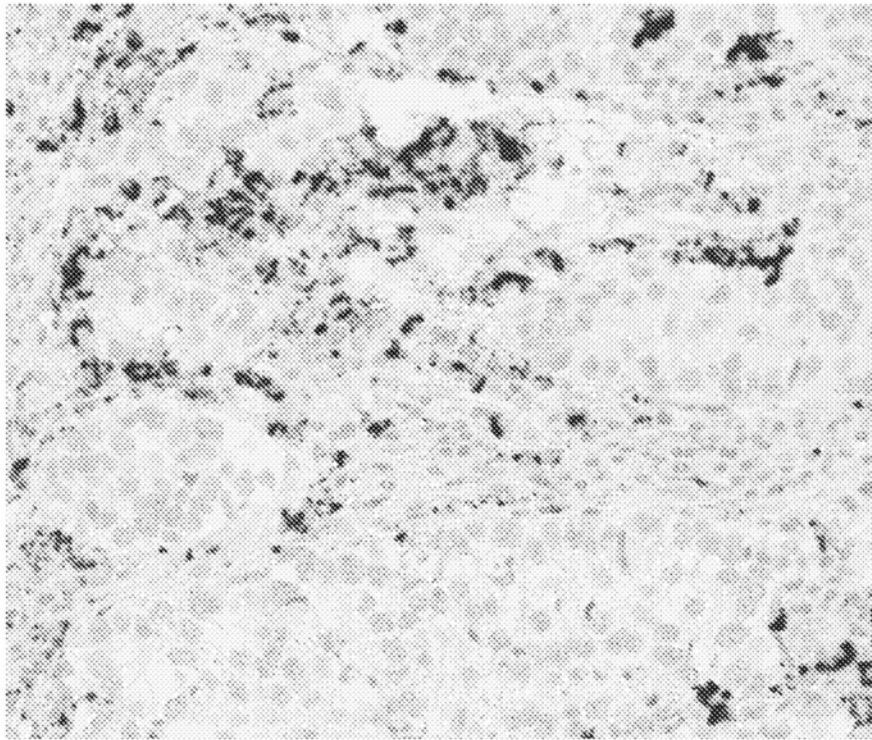


图10

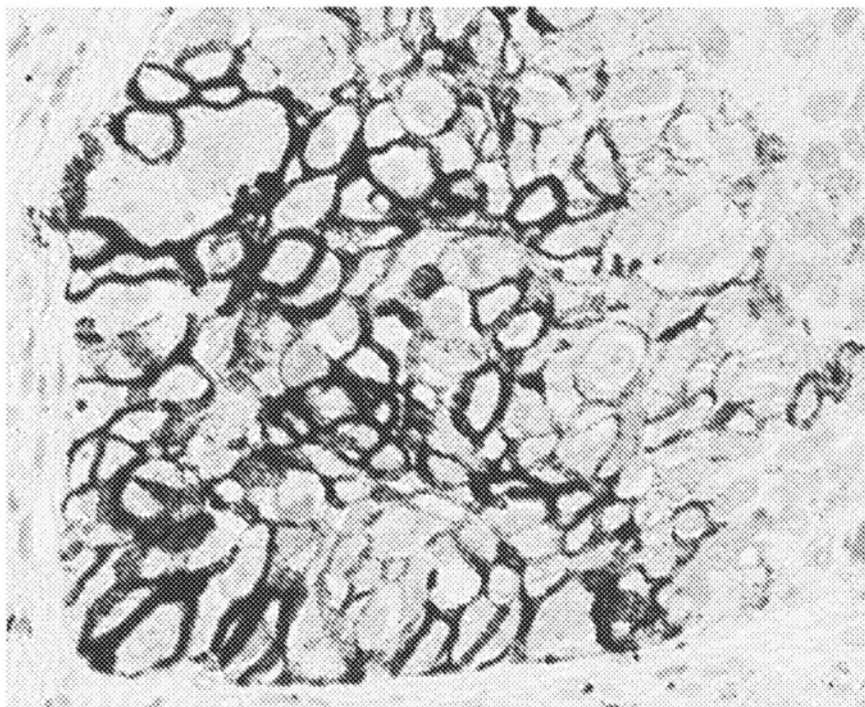


图11

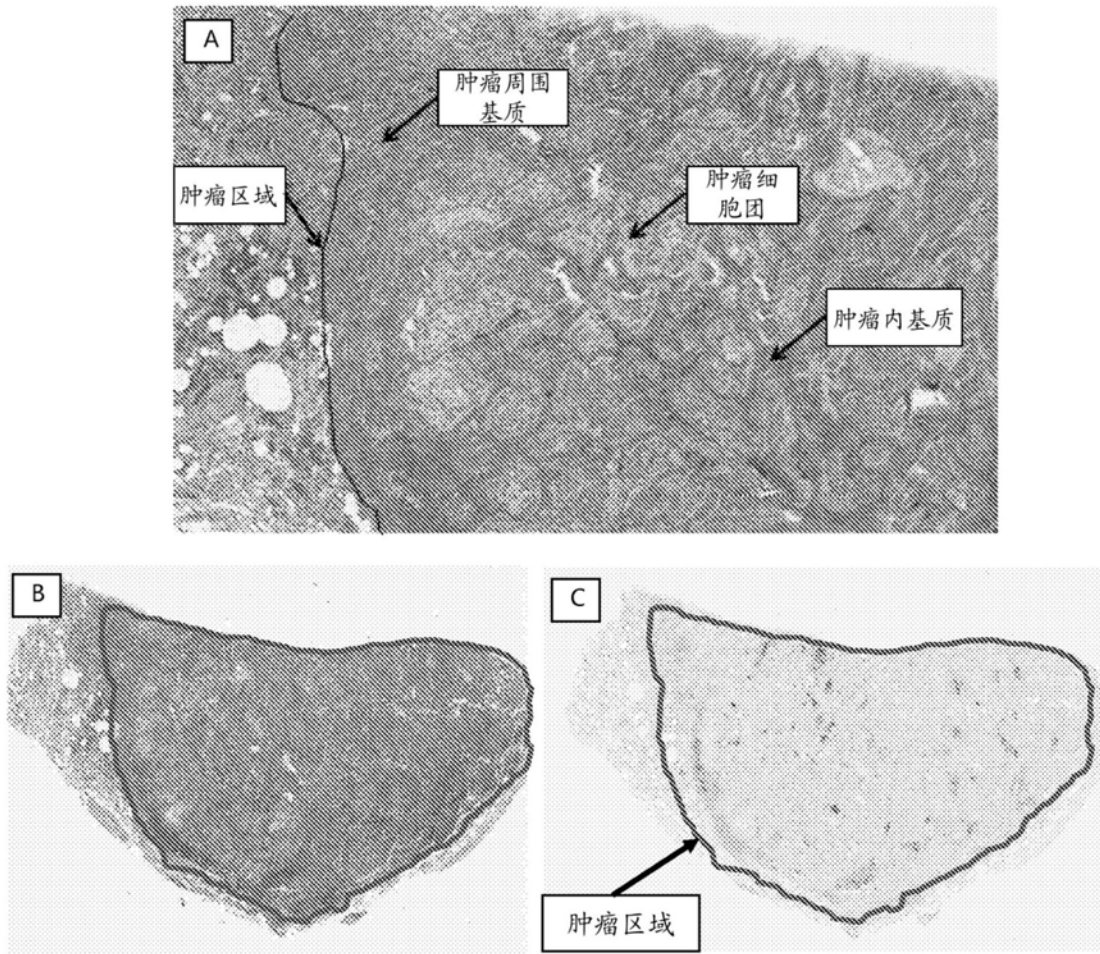


图12A-12C

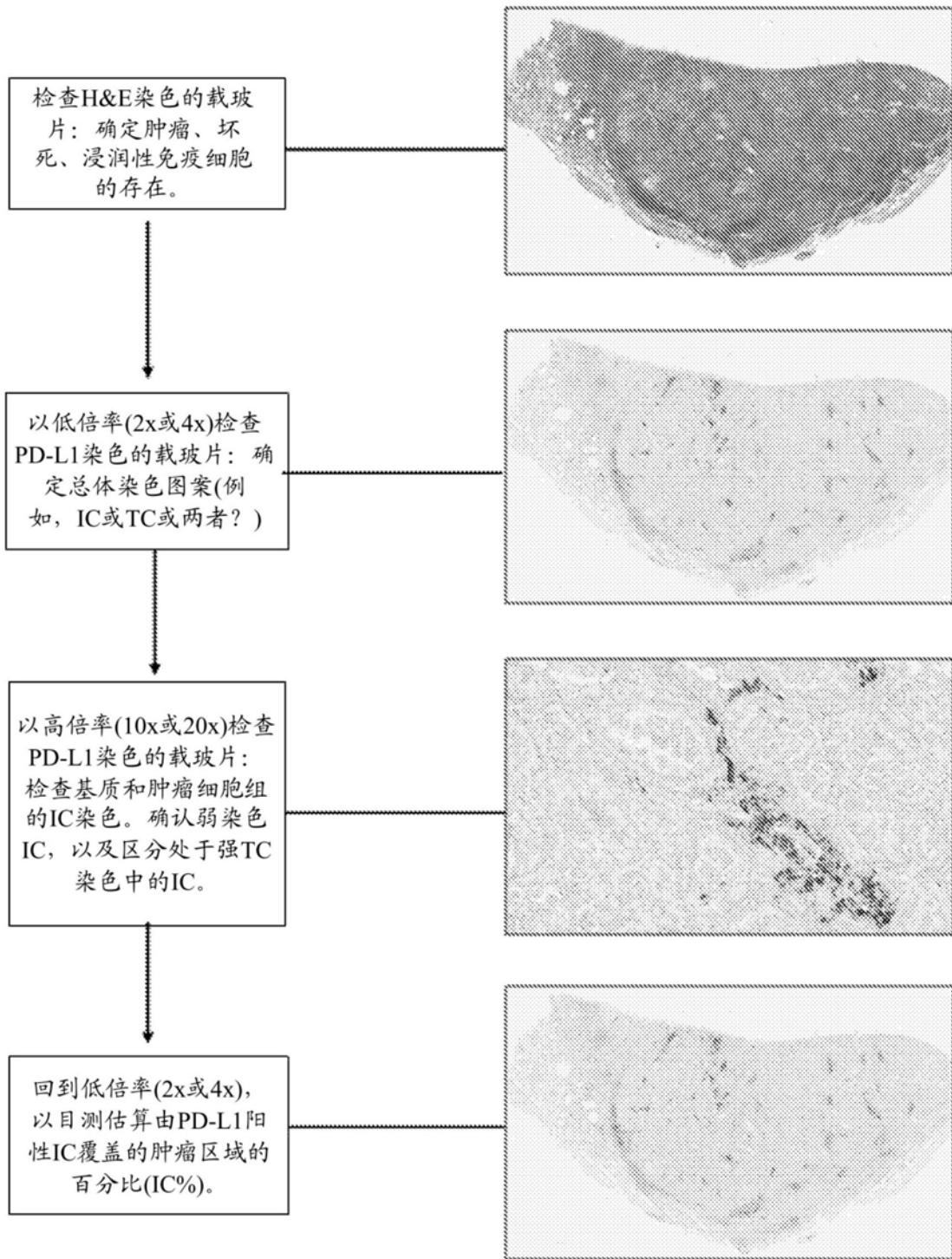
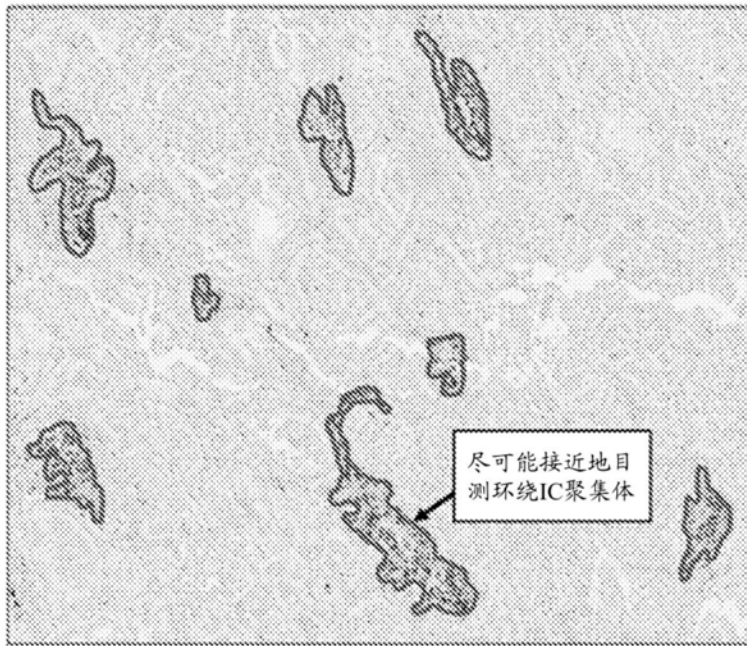


图13

A.



B.

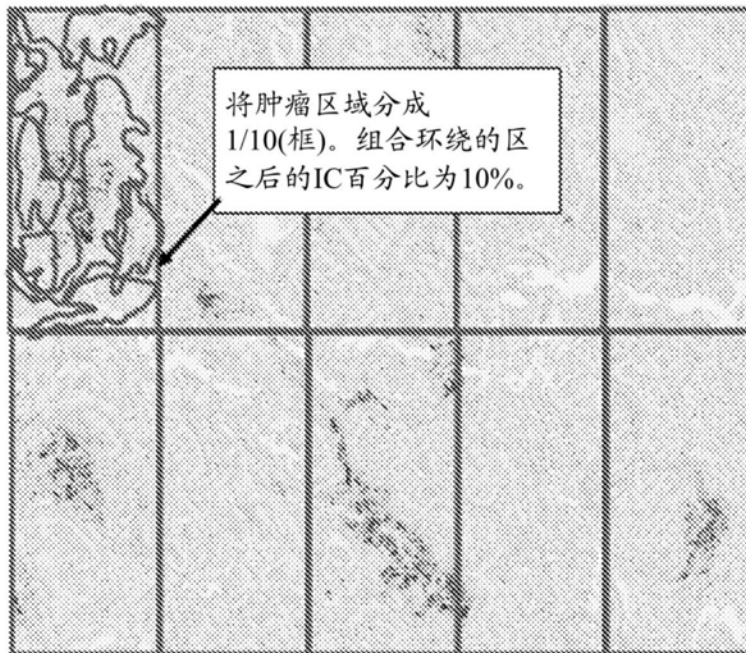


图14A-14B

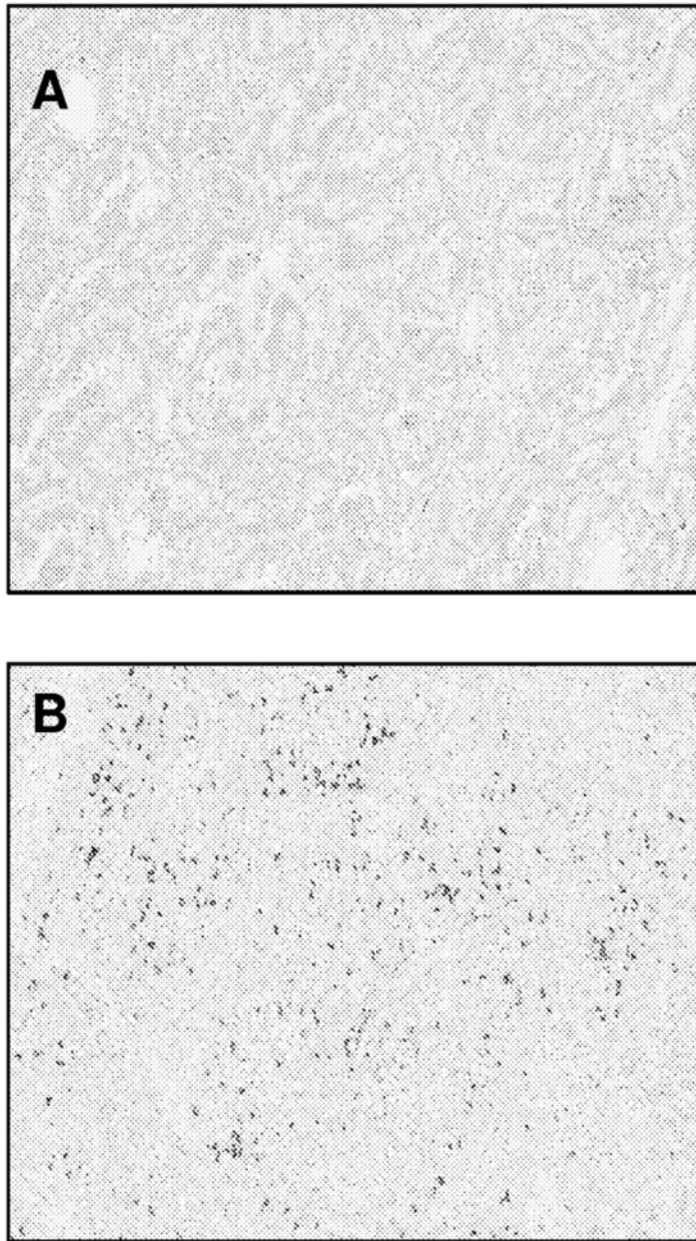


图15A-15B

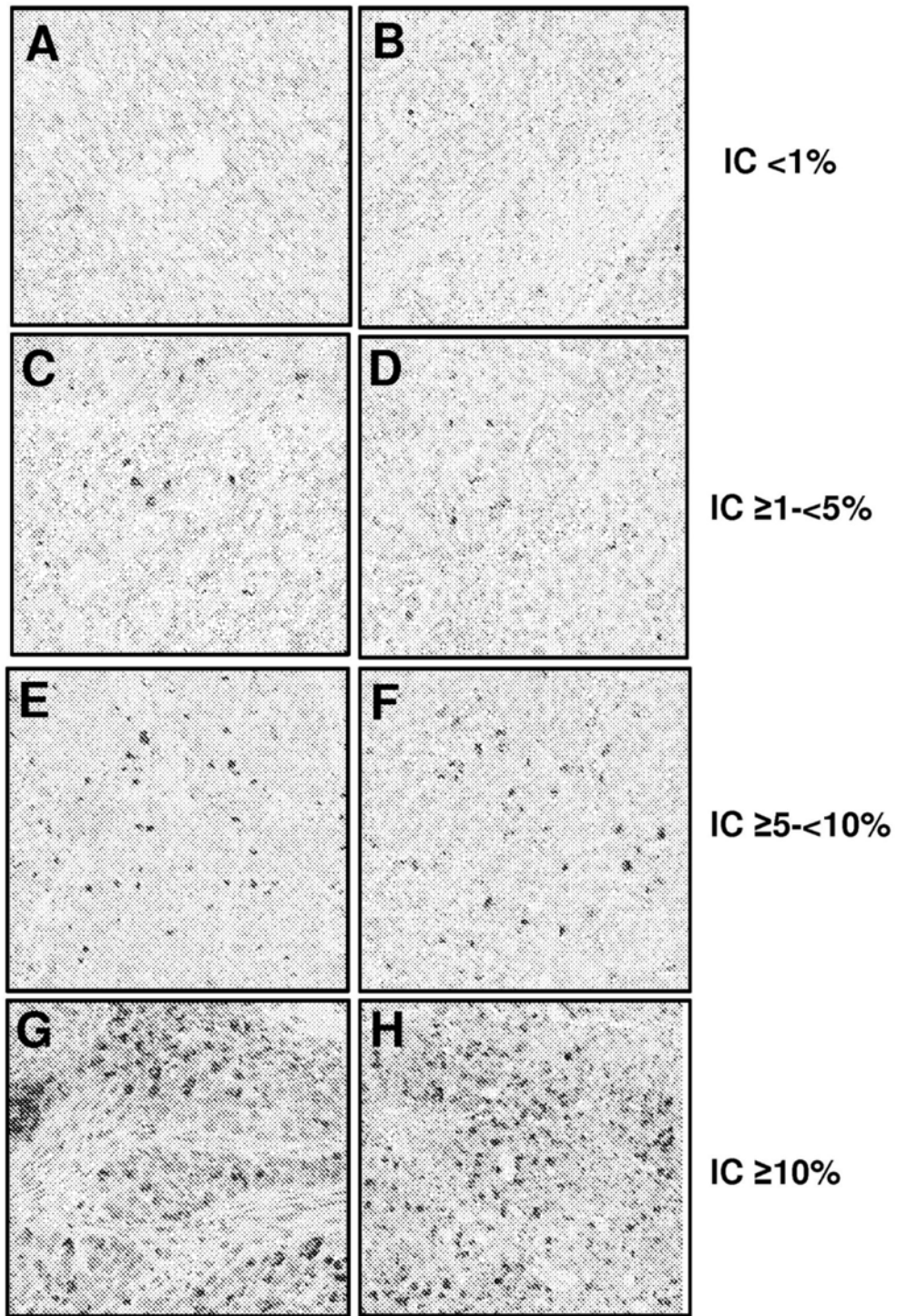


图16A-16H

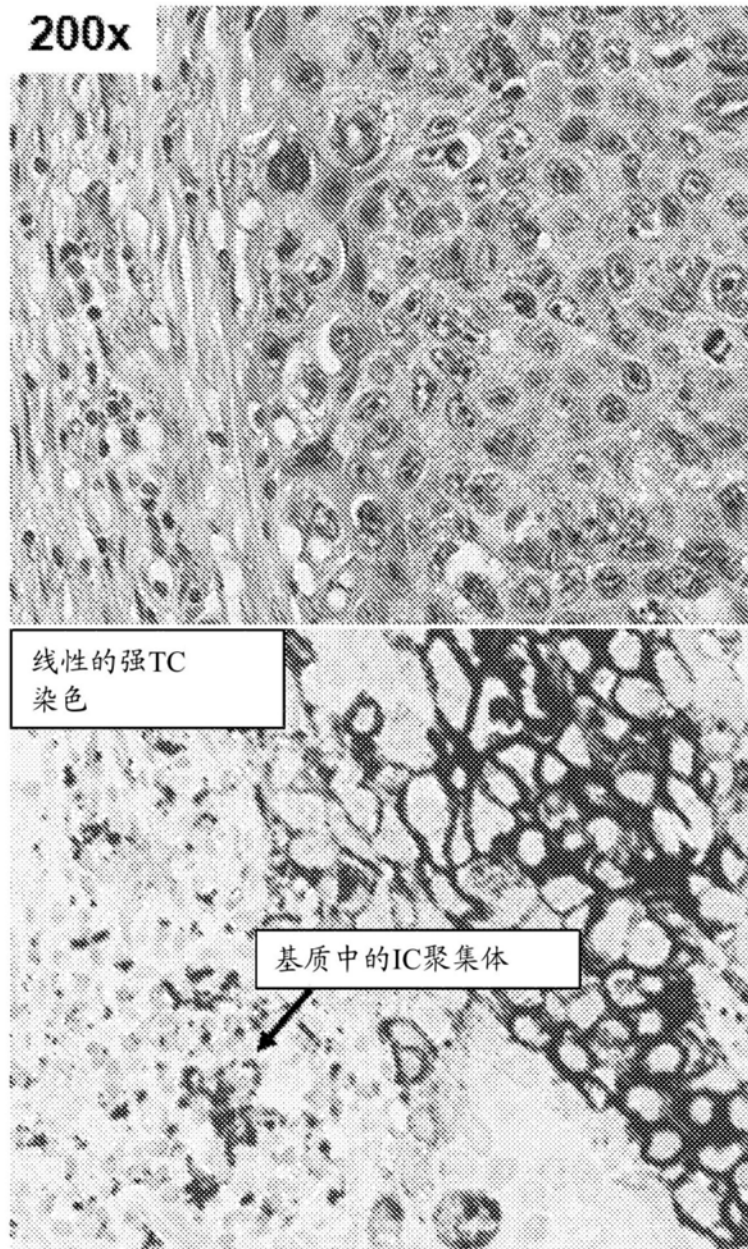


图17A

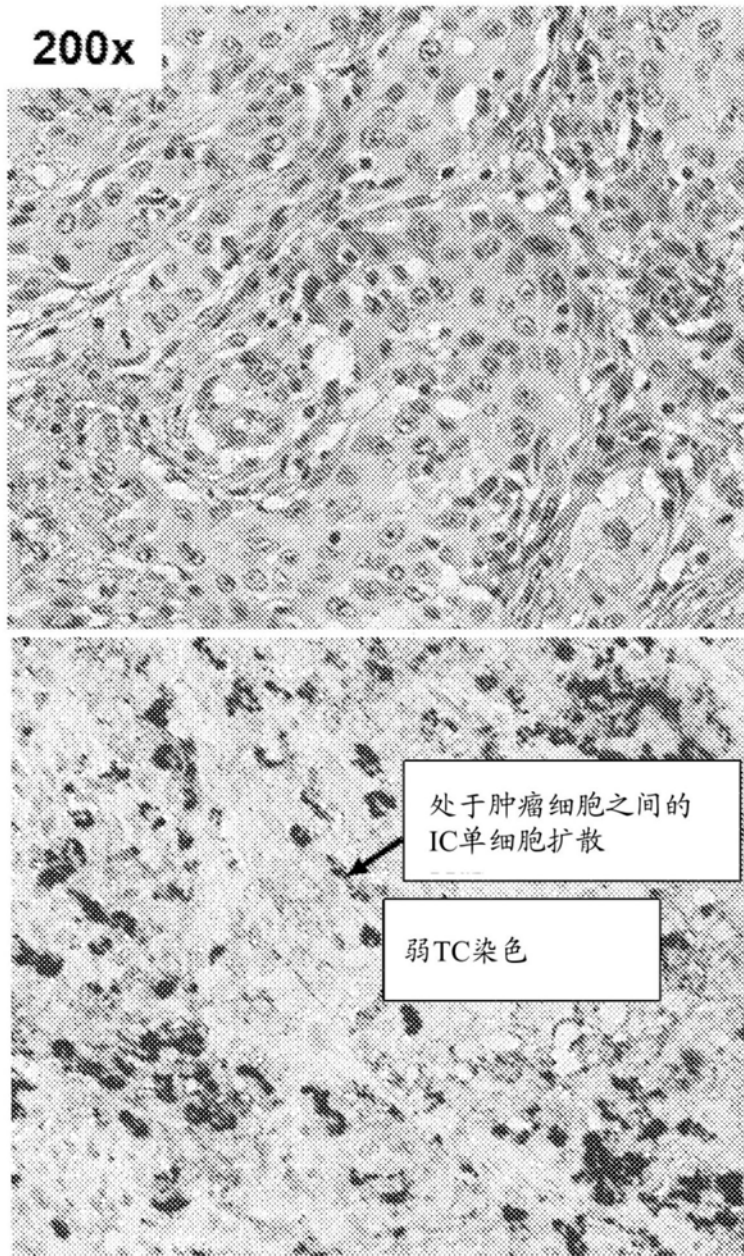


图17B

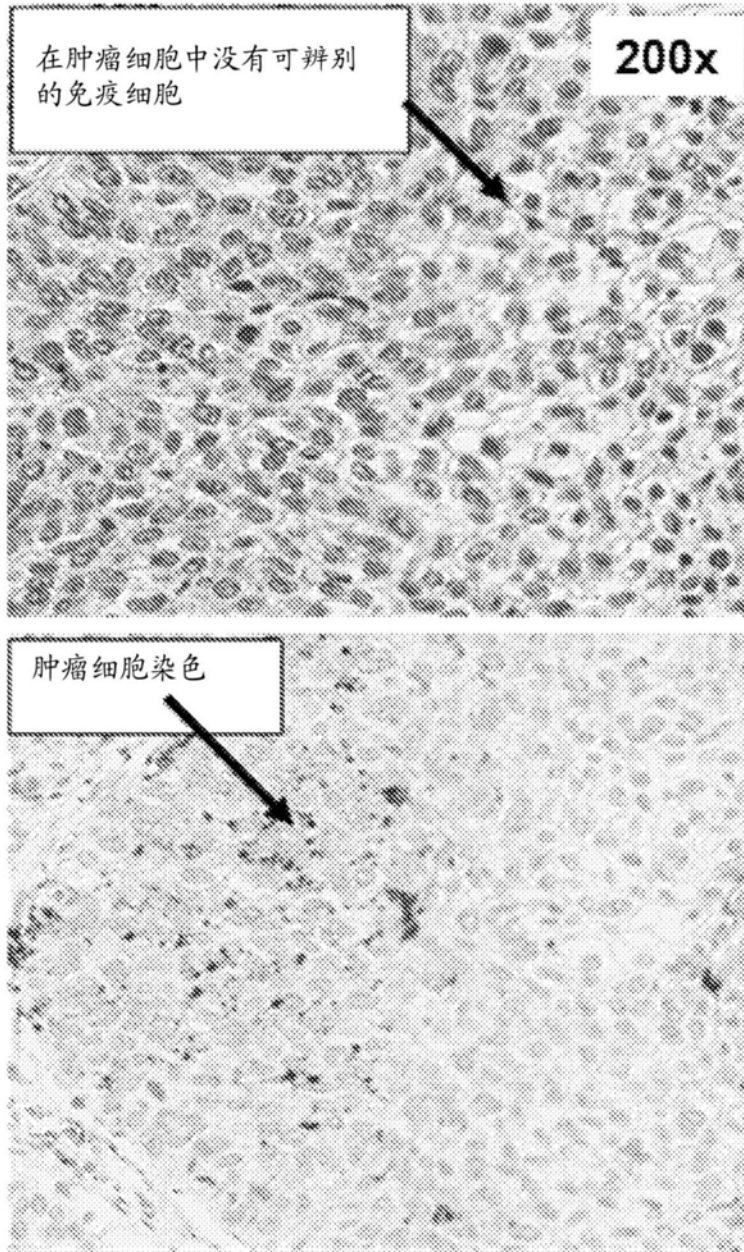


图17C

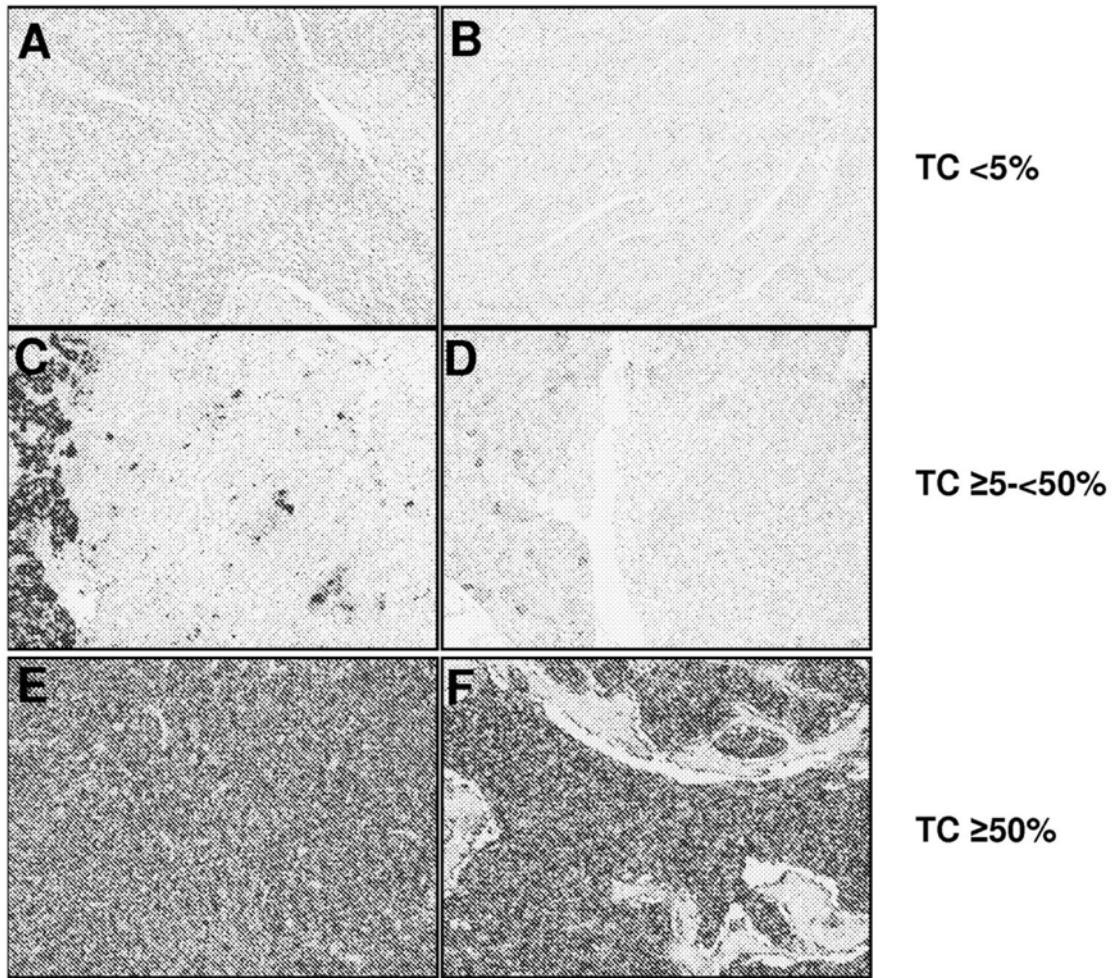


图18A-18F