



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107750166 B

(45) 授权公告日 2022.02.11

(21) 申请号 201680035168.3

A·伍尔夫松

(22) 申请日 2016.06.15

(74) 专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 107750166 A

代理人 左路 林晓红

(43) 申请公布日 2018.03.02

(51) Int.Cl.

(30) 优先权数据

A61K 45/06 (2006.01)

62/180,543 2015.06.16 US

A61K 39/395 (2006.01)

62/219,995 2015.09.17 US

A61K 31/4439 (2006.01)

62/286,501 2016.01.25 US

A61K 31/706 (2006.01)

62/337,489 2016.05.17 US

A61K 31/4184 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2017.12.15

A61P 35/02 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2016/037498 2016.06.15

(56) 对比文件

CN 105440135 A, 2016.03.30

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02016/205277 EN 2016.12.22

Hu-Lowe, Dana D.等. "Nonclinical

(73) 专利权人 默克专利股份有限公司  
地址 德国达姆施塔特  
专利权人 辉瑞公司

Antiangiogenesis and Antitumor Activities of Axitinib (AG-013736), an Oral, Potent, and Selective Inhibitor of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor Tyrosine Kinases 1, 2, 3".《CLINICAL CANCER RESEARCH》.2008,第14卷(第22期),第7272-7283页.

(72) 发明人 G·I·安德鲁斯 陈士浩  
A·迪彼得罗 D·丰塔纳  
Z·戈德堡 林家杨 龙华  
M·马尔蒂尼奥尼  
D·S·A·纳伊特恩 A·D·塔尔

审查员 徐玉琴

权利要求书1页 说明书50页  
序列表21页 附图3页

(54) 发明名称

PD-L1拮抗剂组合治疗

(57) 摘要

本发明公开了包含程序性死亡配体1受体(PD-L1)的拮抗剂和另一种治疗剂的组合法,和所述组合法用于治疗癌症的用途。

1. 程序性死亡配体1蛋白 (PD-L1) 的拮抗剂与VEGFR抑制剂在制备用于治疗受试者中的癌症的组合药剂中的用途, 其中所述PD-L1拮抗剂与VEGFR抑制剂组合使用, 其中所述PD-L1拮抗剂为抗PD-L1单克隆抗体, 其包含具有根据SEQ ID NO: 2、3和4的氨基酸序列的在重链可变区中的三个CDR和具有根据SEQ ID NO: 5、6和7的氨基酸序列的在轻链可变区中的三个CDR, 且其中所述VEGFR抑制剂为N-甲基-2-[3-(E)-2-吡啶-2-基-乙烯基]-1H-吡唑-6-基硫基]-苯甲酰胺或其药学上可接受的盐, 且其中所述癌症为肾细胞癌。

2. 如权利要求1所述的用途, 其中所述癌症为晚期肾细胞癌。

3. 如权利要求2所述的用途, 其中所述肾细胞癌为以前未治疗的晚期肾细胞癌。

4. 如权利要求1-3中任一项所述的用途, 其中所述PD-L1拮抗剂为艾维路单抗且所述VEGFR抑制剂为阿西替尼。

5. 如权利要求1-3中任一项所述的用途, 其中所述PD-L1拮抗剂以至少5mg/kg或10mg/kg的初始剂量施用; 且所述VEGFR抑制剂以至少3mg/kg或5mg/kg的初始剂量施用。

6. 如权利要求1-3中任一项所述的用途, 其中所述PD-L1拮抗剂以每两周一次施用; 且所述VEGFR抑制剂以每天两次施用。

7. 如权利要求1-3中任一项所述的用途, 其中所述PD-L1拮抗剂以1小时静脉内输注形式施用, 并且所述VEGFR抑制剂以口服施用。

8. 如权利要求7所述的用途, 其中所述VEGFR抑制剂与或不与食物一起服用。

9. 如权利要求7所述的用途, 其中所述VEGFR抑制剂以连续给药时间表施用。

10. 如权利要求8的所述用途, 其中所述VEGFR抑制剂以连续给药时间表施用。

11. 如权利要求7的所述用途, 其中所述PD-L1拮抗剂配制成液体药剂且所述VEGFR抑制剂配制成1mg片剂、3mg片剂或5mg片剂。

12. 如权利要求11的所述用途, 其中所述VEGFR抑制剂被配制成5mg片剂。

13. 一种试剂盒, 其包含第一容器、第二容器和包装插页, 其中所述第一容器包含至少一个剂量的包含程序性死亡配体1蛋白 (PD-L1) 的拮抗剂的药剂, 所述第二容器包含至少一个剂量的包含VEGFR抑制剂的药剂, 且所述包装插页包含使用所述药剂治疗受试者的癌症的说明, 其中所述PD-L1拮抗剂为抗PD-L1单克隆抗体, 其包含具有根据SEQ ID NO: 2、3和4的氨基酸序列的在重链可变区中的三个CDR和具有根据SEQ ID NO: 5、6和7的氨基酸序列的在轻链可变区中的三个CDR, 且进一步其中所述VEGFR抑制剂为N-甲基-2-[3-(E)-2-吡啶-2-基-乙烯基]-1H-吡唑-6-基硫基]-苯甲酰胺或其药学上可接受的盐, 且其中所述癌症为肾细胞癌。

14. 如权利要求13所述的试剂盒, 其中所述包装插页说明所述药剂意欲用于治疗患有癌症的受试者, 所述癌症通过免疫组织化学 (IHC) 分析法测试为PD-L1表达阳性。

15. 如权利要求13或14所述的试剂盒, 其中所述PD-L1拮抗剂为配制成液体药剂的艾维路单抗, 且所述VEGFR抑制剂为配制成1mg片剂或5mg片剂的阿西替尼。

16. 如权利要求13或14所述的试剂盒, 其中所述癌症为晚期肾细胞癌。

17. 如权利要求16所述的试剂盒, 其中所述肾细胞癌为以前未治疗的晚期肾细胞癌。

## PD-L1拮抗剂组合治疗

### 技术领域

[0001] 本发明涉及可用于治疗癌症的组合疗法。具体而言,本发明涉及组合疗法,其包含程序性死亡配体1蛋白(PD-L1)的拮抗剂和一种或多种其他治疗剂。

### 背景技术

[0002] 肾细胞癌(RCC)是最常见的肾脏癌症且构成成人中所有恶性肿瘤的约3%。直至2005年,干扰素- $\alpha$ (IFN- $\alpha$ )和高剂量白介素(IL)-2疗法是用于晚期RCC(aRCC)患者的标准治疗,但功效有限。自此以后,多重血管内皮生长因子(VEGF)途径抑制剂和雷帕霉素的哺乳动物靶标(mTOR)抑制剂的开发和批准显著改善了aRCC患者的结果。这些药剂包括VEGF受体(VEGFR)酪氨酸激酶抑制剂(TKI)舒尼替尼(sunitinib)、帕唑帕尼(pazopanib)、阿西替尼(axitinib)和索拉非尼(sorafenib),mTOR抑制剂替西罗莫司(temsirolimus)和依维莫司(everolimus),以及抗VEGF单克隆抗体贝伐单抗(bevacizumab)。然而,尽管这些药剂使患者的结果有明显改善,但持久和完全的缓解在aRCC患者中仍是不常见的;大部分患者将最终出现抗性,在疗法过程中呈现疾病进展,且由于转移性疾病而死亡。

[0003] 程序性死亡1(PD-1)受体和PD-1配体1和2(分别为PD-L1和PD-L2)在免疫调节中起整体作用。PD-1表达于活化的T细胞,由基质细胞、肿瘤细胞或其两者表达的PD-L1(也称为B7-H1)和PD-L2活化,引发T细胞死亡和局部免疫抑制(Dong等人,Nat Med 1999;5:1365-69;Freeman等人J Exp Med 2000;192:1027-34),潜在地提供肿瘤发展和生长的免疫耐受环境。反过来,在非临床动物模型中,抑制该相互作用可增强局部T细胞反应和介导抗肿瘤活性(Iwai Y等人,Proc Natl Acad Sci USA 2002;99:12293-97)。艾维路单抗(Avelumab)是IgG1同种型的完全人类mAb,其特异性靶向和阻断PD-L1。艾维路单抗是抗PD-L1单克隆抗体MSB0010718C的国际非专属名称(INN)。

[0004] 阿西替尼(Axitinib)是VEGF受体(VEGFR)TKI。在随机化、开放标记、3期试验中针对索拉非尼评估以前未治疗的具有透明细胞aRCC的患者中单药剂阿西替尼5mg每天两次(BID)给药的抗肿瘤活性。尽管研究未证实阿西替尼或索拉非尼治疗的患者之间在无进展存活期(PFS)方面有统计显著性差异,但阿西替尼与较长中值PFS(mPFS)时间相关(阿西替尼的mPFS为10.1个月(95%CI 7.2,12.1),相比之下索拉非尼为6.5个月(95%CI 4.7,8.3),分层风险比率0.77(95%CI 0.56,1.05))。

[0005] 首先被鉴定为表达于活化的T细胞上的诱导性共刺激受体的4-1BB(CD137和TNFRSF9)是肿瘤坏死因子(TNF)受体超家族的跨膜糖蛋白。当前对4-1BB的理解表明表达通常为活化依赖性的且涵盖免疫细胞的广泛子集,包括活化的NK和NKT细胞;调节T细胞;树突状细胞(DC),包括滤泡DC;刺激的肥大细胞、分化的髓细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和活化的B细胞。还在肿瘤脉管(19-20)和动脉粥样硬化内皮上证实4-1BB表达。刺激4-1BB的配体(4-1BBL)表达于活化的抗原递呈细胞(APC)、髓性祖细胞和造血干细胞上。4-1BB激动剂mAb增加共刺激分子表达且显著增强溶细胞性T淋巴细胞反应,在多种模型中引起抗肿瘤功效。4-1BB激动剂mAb在预防性和治疗性设置以及单药疗法和组合疗法肿瘤模

型中显示功效且具有确立的持久抗肿瘤保护性T细胞记忆反应。

[0006] 巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF)是称为集落刺激因子(CSF)的蛋白家族的成员。M-CSF,也称为CSF-1,是分泌性或细胞表面糖蛋白,其包含通过二硫键连接的两个亚单位,其总分子量为40至90kD变化(Stanley E.R.,等人,Mol.Reprod.Dev.,46:4-10(1997))。与其他CSF类似,M-CSF由巨噬细胞、单核细胞和人类关节组织细胞(诸如软骨细胞和滑膜成纤维细胞)响应于蛋白(诸如白介素-1或肿瘤坏死因子- $\alpha$ )而产生。M-CSF刺激由多能造血前体干细胞形成巨噬细胞集落(Stanley E.R.等人,Mol.Reprod.Dev.,46:4-10(1997))。M-CSF通常结合至其受体c-fms,以发挥生物学效应。c-fms含有五个细胞外Ig结构域,一个跨膜结构域和具有两个激酶结构域的胞内结构域。在M-CSF结合至c-fms后,受体同源二聚化且起始信号转导途径(包括JAK/STAT、PI3K和ERK途径)的级联。

[0007] OX40受体(OX40,也称为CD134、TNFRSF4、ACT-4、ACT35和TXGP1L)是TNF受体超家族的成员。发现OX40表达于活化的CD4<sup>+</sup>T细胞上。已在癌症患者的肿瘤(肿瘤浸润性淋巴细胞)和引流淋巴结中发现大量OX40<sup>+</sup>T细胞(Weinberg,A等人,J.Immunol.164:2160-69,2000;Petty,J.等人,Am.J.Surg.183:512-518,2002)。在小鼠中的肿瘤模型中显示,与处理的对照小鼠相比,肿瘤引发期间的OX40的募集在体内显著延迟且阻止肿瘤出现(Weinberg等人,2000)。因此,考虑经由使用OX40结合剂通过募集OX40来增强哺乳动物对抗原的免疫反应(WO 99/42585;Weinberg等人,2000)。

[0008] 利妥昔单抗(rituximab)抗体是针对CD20抗原的基因工程改造的嵌合鼠/人类单克隆抗体。利妥昔单抗是1998年4月7日授权的美国专利号5,736,137(Anderson等人)中称为“C2B8”的抗体。利妥昔单抗适用于治疗复发性或难治性的低度或滤泡性、CD20阳性、B细胞非霍奇金淋巴瘤的患者。体外作用机制研究表明利妥昔单抗结合人类补体且经由补体依赖性细胞毒性(CDC)裂解淋巴B细胞系(Reff等人Blood 83(2):435-445(1994))。此外,其在抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的分析法中具有显著活性。

[0009] 需要改善的用于治疗癌症的疗法。此外,需要与现有疗法相比具有较大功效的疗法。本发明的优选组合疗法与单独用任一治疗剂的治疗相比展示更大功效。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明涉及用于治疗癌症的治疗方案。

[0012] 本文中提供用于治疗受试者中的癌症的方法。还提供抑制具有恶性细胞的受试者中的肿瘤生长或进展的方法。还提供抑制受试者中恶性细胞转移的方法。还提供在具有恶性细胞的受试者中诱导肿瘤消退的方法。

[0013] 在一些实施方案中,该方法包括给受试者施用组合疗法,其包含PD-L1拮抗剂和VEGFR抑制剂。在一些实施方案中,本发明提供一种用于治疗癌症的药剂,其包含用于与VEGFR抑制剂组合使用的PD-L1拮抗剂。在一些实施方案中,本发明提供一种用于治疗癌症的药剂,其包含用于与PD-L1拮抗剂组合使用的VEGFR抑制剂。其他实施方案提供PD-L1拮抗剂在制造在与VEGFR抑制剂组合施用用于治疗受试者中的癌症的药剂中的用途,和VEGFR抑制剂在制造在与PD-L1拮抗剂组合施用用于治疗受试者中的癌症的药剂中的用途。在一些实施方案中,本发明提供PD-L1拮抗剂和VEGFR抑制剂在制造用于治疗受试者中的癌症的药剂中的用途。在一些实施方案中,药剂包含试剂盒,且试剂盒还包含包装插页,其包含使用PD-L1拮抗剂与VEGFR抑制剂的组合治疗受试者中的癌症的说明。在本文中的治疗方

法、药剂和用途的所有以上实施方案中,VEGFR抑制剂为N-甲基-2-[3-(E)-2-吡啶-2-基-乙烯基]-1H-吡唑-6-基硫基]-苯甲酰胺或其药学上可接受的盐。

[0014] 还提供试剂盒,其包含第一容器、第二容器和包装插页,其中第一容器包含至少一个剂量的包含抗PD-L1拮抗剂的药剂,第二容器包含至少一个剂量的包含VEGFR抑制剂的药剂,且包装插页包含使用所述药剂治疗受试者的癌症的说明。

[0015] 在以上方法、药剂、用途或试剂盒的一些实施方案中,VEGFR抑制剂可以是阿西替尼且可配制成1mg片剂、3mg片剂或5mg片剂。

[0016] 在一些实施方案中,该方法包括给受试者施用组合疗法,其包含PD-L1拮抗剂和抗-4-1BB抗体。在一些实施方案中,该方法包括给受试者施用组合疗法,其包含PD-L1拮抗剂和抗M-CSF抗体。在一些实施方案中,该方法包括给受试者施用组合疗法,其包含PD-L1拮抗剂和抗OX40抗体。在一些实施方案中,该方法包括给受试者施用组合疗法,其包含PD-L1拮抗剂、抗4-1BB抗体和抗M-CSF抗体。在一些实施方案中,该方法包括给受试者施用组合疗法,其包含PD-L1拮抗剂、抗4-1BB抗体和抗OX40抗体。

[0017] 在一些实施方案中,该方法包括给受试者施用组合疗法,其包含PD-L1拮抗剂和CD20拮抗剂。在一些实施方案中,该方法包括给受试者施用组合疗法,其包含PD-L1拮抗剂、CD20拮抗剂和抗4-1BB抗体。在一些实施方案中,PD-L1拮抗剂为艾维路单抗且CD20拮抗剂为利妥昔单抗。在一些实施方案中,抗4-1BB抗体为PF-05082566。在一些实施方案中,该方法包括在28天周期中的第1天以375mg/m<sup>2</sup>的剂量静脉内施用利妥昔单抗,在每一周期的第2天以1小时静脉内输注形式施用100mg的固定剂量的PF-05082566,和在每一周期的第2天和第16天以1小时静脉内输注形式施用10mg/kg的剂量的艾维路单抗。在一些实施方案中,该方法包括在28天周期的第1天以375mg/m<sup>2</sup>的剂量静脉内施用利妥昔单抗,在每一周期的第1天以1小时静脉内输注形式施用100mg的固定剂量的PF-05082566,和在每一周期的第2天和第16天以1小时静脉内输注形式施用10mg/kg的剂量的艾维路单抗。在一些实施方案中,该方法包括在28天周期中的第1天以375mg/m<sup>2</sup>的剂量静脉内施用利妥昔单抗,在每一周期的第1天以1小时静脉内输注形式施用100mg的固定剂量的PF-05082566,和在每一周期的第1天和第15天以1小时静脉内输注形式施用10mg/kg的剂量的艾维路单抗。在一些实施方案中,该方法包括在28天周期中的第1天以375mg/m<sup>2</sup>的剂量静脉内施用利妥昔单抗,在每一周期的第2天以1小时静脉内输注形式施用100mg的固定剂量的PF-05082566,和在每一周期的第1天和第15天以1小时静脉内输注形式施用10mg/kg的剂量的艾维路单抗。在一些实施方案中,当在同一天施用艾维路单抗和PF-05082566时,在PF-05082566之后至少3小时施用艾维路单抗。在一些实施方案中,当在同一天施用艾维路单抗和PF-05082566时,在PF-05082566之后约60分钟施用艾维路单抗。在一些实施方案中,当在同一天施用艾维路单抗和PF-05082566时,在PF-05082566之后约30分钟施用艾维路单抗。在一些实施方案中,癌症为R/R DLBCL。

[0018] 在一些实施方案中,该方法包括给受试者施用组合疗法,其包含PD-L1拮抗剂、CD20拮抗剂和苯达莫司汀。在一些实施方案中,该方法包括给受试者施用组合疗法,其包含PD-L1拮抗剂、CD20拮抗剂和苯达莫司汀。在一些实施方案中,PD-L1拮抗剂为艾维路单抗且CD20拮抗剂为利妥昔单抗。在一些实施方案中,该方法包括在28天周期的第1天静脉内施用375mg/m<sup>2</sup>的剂量的利妥昔单抗,在每一28天周期的第2天和第3天静脉内施用90mg/m<sup>2</sup>的剂量

的苯达莫司汀,和在每一周期的第2天和第16天以1小时静脉内输注形式施用10mg/kg的剂量的艾维路单抗。在一些实施方案中,该方法包括在28天周期的第1天以375mg/m<sup>2</sup>的剂量静脉内施用利妥昔单抗,在每一28天周期的第1天和第2天静脉内施用90mg/m<sup>2</sup>的剂量的苯达莫司汀,和在每一周期的第2天和第16天以1小时静脉内输注形式施用10mg/kg的剂量的艾维路单抗。在一些实施方案中,该方法包括在28天周期的第1天以375mg/m<sup>2</sup>的剂量静脉内施用利妥昔单抗,在每一28天周期的第2天和第3天静脉内施用90mg/m<sup>2</sup>的剂量的苯达莫司汀,和在每一周期的第1天和第15天以1小时静脉内输注形式施用10mg/kg的剂量的艾维路单抗。在一些实施方案中,该方法包括在28天周期的第1天以375mg/m<sup>2</sup>的剂量静脉内施用利妥昔单抗,在每一28天周期的第1天和第2天静脉内施用90mg/m<sup>2</sup>的剂量的苯达莫司汀,和在每一周期的第1天和第15天以1小时静脉内输注形式施用10mg/kg的剂量的艾维路单抗。在一些实施方案中,当在同一天施用艾维路单抗和苯达莫司汀时,在苯达莫司汀之后至少3小时施用艾维路单抗。在一些实施方案中,癌症为R/R DLBCL。

[0019] 在一些实施方案中,该方法包括给受试者施用组合疗法,其包含PD-L1拮抗剂、阿扎胞苷(azacitidine)和抗4-1BB抗体。在一些实施方案中,该方法包括给受试者施用组合疗法,其包含艾维路单抗、阿扎胞苷和PF-05082566。在一些实施方案中,该方法包括在28天周期的第1天至第7天每天皮下(SC)施用75mg/m<sup>2</sup>的日剂量的阿扎胞苷,在每一周期的第2天以1小时静脉内输注形式施用100mg的固定剂量的PF-05082566,和在每一周期的第2天和第16天以1小时静脉内输注形式施用10mg/kg的剂量的艾维路单抗。在一些实施方案中,该方法包括在28天周期的第1天至第7天每天皮下施用75mg/m<sup>2</sup>的日剂量的阿扎胞苷,在每一周期的第1天以1小时静脉内输注形式施用100mg的固定剂量的PF-05082566,和在每一周期的第2天和第16天以1小时静脉内输注形式施用10mg/kg的剂量的艾维路单抗。在一些实施方案中,该方法包括在28天周期的第1天至第7天每天皮下施用75mg/m<sup>2</sup>的日剂量的阿扎胞苷,在每一周期的第1天以1小时静脉内输注形式施用100mg的固定剂量的PF-05082566,和在每一周期的第1天和第15天以1小时静脉内输注形式施用10mg/kg的剂量的艾维路单抗。在一些实施方案中,该方法包括在28天周期的第1天至第7天每天皮下施用75mg/m<sup>2</sup>的日剂量的阿扎胞苷,在每一周期的第2天以1小时静脉内输注形式施用100mg的固定剂量的PF-05082566,和在每一周期的第1天和第15天以1小时静脉内输注形式施用10mg/kg的剂量的艾维路单抗。在一些实施方案中,当在同一天施用艾维路单抗与阿扎胞苷时,在阿扎胞苷施用之后至少3小时施用艾维路单抗。在一些实施方案中,当在同一天施用艾维路单抗和PF-05082566时,在PF-05082566之后至少3小时施用艾维路单抗。在一些实施方案中,当在同一天施用艾维路单抗和PF-05082566时,在PF-05082566之后约60分钟施用艾维路单抗。在一些实施方案中,当在同一天施用艾维路单抗和PF-05082566时,在PF-05082566之后约30分钟施用艾维路单抗。在一些实施方案中,癌症为R/R DLBCL。

[0020] 在一些实施方案中,该方法包括给受试者施用组合疗法,其包含艾维路单抗和PF-05082566。在一些实施方案中,癌症为晚期NSCLC、RCC或尿道上皮癌,其对先前疗法具有抗性(响应但然后进展)或难治性(从不反应),先前疗法包括例如单药剂免疫检查点抑制剂(例如抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体或抗CTLA-4抗体治疗)。在一些实施方案中,每2周以1小时静脉内输注形式施用10mg/kg的剂量的艾维路单抗,在每一周期的第1天,每四周一次以1小时静脉内输注形式施用10mg的固定剂量的PF-05082566,并在施用艾维路单抗和PF-

05082566的当天,首先施用PF-05082566,随后在PF-05082566输注结束之后30分钟内进行艾维路单抗输注。

[0021] 在一些实施方案中,该方法包括给受试者施用组合疗法,其包含艾维路单抗和化学放射疗法。在一些实施方案中,化学放射疗法包含顺铂和根治性放射疗法(definitive radiation therapy)。在一些实施方案中,受试者患有头颈部的局部晚期鳞状细胞癌(SCCHN)。在一些实施方案中,SCCHN位于口腔、口咽、喉或喉咽。在一些实施方案中,该方法包括导入期(lead-in phase)和化学放射疗法(CRT)期,其中导入期在CRT期起始之前七天开始。在一些实施方案中,在导入期的第1天以及CRT期的第8天、第29天和第39天施用10mg/kg的剂量的艾维路单抗;在CRT期的第1天、第22天和第23天施用100mg/m<sup>2</sup>的剂量的顺铂;且放射疗法为70Gy/33-35部分/天、5部分/周强度调节式放射疗法(IMRT)。在一些实施方案中,该方法包括维持期,其在CRT期完成之后两周开始。在一些实施方案中,维持期包含CRT期完成之后,每两周(Q2W)施用10mg/kg的剂量的艾维路单抗。

[0022] 在所有以上治疗方法、药剂和用途中,PD-L1拮抗剂抑制PD-L1与PD-1的结合。在以上治疗方法、药剂和用途的一些实施方案中,PD-L1拮抗剂为单克隆抗体或其抗原结合片段,其特异性结合至PD-L1或PD-1且阻断PD-L1与PD-1的结合。在一些实施方案中,PD-L1拮抗剂为抗PD-L1抗体,其包含来自包含SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列的重链可变区的三个互补决定区(CDR)和来自包含SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列的轻链可变区的三个CDR。在一些实施方案中,PD-L1拮抗剂为抗PD-L1抗体,其包含重链和轻链可变区,分别包含SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列。

[0023] 在一些实施方案中,本发明提供一种用于治疗癌症的药剂,其包含用于与抗4-1BB抗体组合使用的PD-L1拮抗剂。

[0024] 在一些实施方案中,本发明提供一种用于治疗癌症的药剂,其包含用于与PD-L1拮抗剂组合使用的抗4-1BB抗体。

[0025] 其他实施方案提供PD-L1拮抗剂在制造当与抗4-1BB抗体组合施用用于治疗受试者中的癌症的药剂中的用途,和抗4-1BB抗体在制造当与PD-L1拮抗剂组合施用用于治疗受试者中的癌症的药剂中的用途。

[0026] 在一些实施方案中,本发明提供PD-L1拮抗剂和抗4-1BB抗体在制造用于治疗受试者中的癌症的药剂中的用途。在一些实施方案中,药剂包含试剂盒,且试剂盒还包含包装插页,其包含使用PD-L1拮抗剂与抗4-1BB抗体的组合治疗受试者中的癌症的说明。

[0027] 在一些实施方案中,本发明提供一种用于治疗癌症的药剂,其包含用于与抗M-CSF抗体组合使用的PD-L1拮抗剂。

[0028] 在一些实施方案中,本发明提供一种用于治疗癌症的药剂,其包含用于与PD-L1拮抗剂组合使用的抗M-CSF抗体。

[0029] 其他实施方案提供PD-L1拮抗剂在制造当与抗M-CSF抗体组合施用用于治疗受试者中的癌症的药剂中的用途,和抗M-CSF抗体在制造当与PD-L1拮抗剂组合施用用于治疗受试者中的癌症的药剂中的用途。

[0030] 在一些实施方案中,本发明提供PD-L1拮抗剂和抗M-CSF抗体在制造用于治疗受试者中的癌症的药剂中的用途。在一些实施方案中,药剂包含试剂盒,且试剂盒还包含包装插页,其包含使用PD-L1拮抗剂与抗M-CSF抗体的组合治疗受试者中的癌症的说明。

[0031] 在一些实施方案中,本发明提供一种用于治疗癌症的药剂,其包含用于与抗OX40抗体组合使用的PD-L1拮抗剂。

[0032] 在一些实施方案中,本发明提供一种用于治疗癌症的药剂,其包含用于与PD-L1拮抗剂组合使用的抗OX40抗体。

[0033] 其他实施方案提供PD-L1拮抗剂在制造当与抗OX40抗体组合施用用于治疗受试者中的癌症的药剂中的用途,和抗OX40抗体在制造当与PD-L1拮抗剂组合施用用于治疗受试者中的癌症的药剂中的用途。

[0034] 在一些实施方案中,本发明提供PD-L1拮抗剂和抗OX40抗体在制造用于治疗受试者中的癌症的药剂中的用途。在一些实施方案中,药剂包含试剂盒,且试剂盒还包含包装插页,其包含使用PD-L1拮抗剂与抗OX40抗体的组合治疗受试者中的癌症的说明。

[0035] 在一些实施方案中,本发明提供一种用于治疗癌症的药剂,其包含用于与抗M-CSF抗体组合使用的PD-L1拮抗剂。

[0036] 在一些实施方案中,本发明提供一种用于治疗癌症的药剂,其包含用于与PD-L1拮抗剂组合使用的抗M-CSF抗体。

[0037] 其他实施方案提供PD-L1拮抗剂在制造当与抗M-CSF抗体组合施用用于治疗受试者中的癌症的药剂中的用途,和抗M-CSF抗体在制造当与PD-L1拮抗剂组合施用用于治疗受试者中的癌症的药剂中的用途。

[0038] 在一些实施方案中,本发明提供PD-L1拮抗剂和抗M-CSF抗体在制造用于治疗受试者中的癌症的药剂中的用途。在一些实施方案中,药剂包含试剂盒,且试剂盒还包含包装插页,其包含使用PD-L1拮抗剂与抗M-CSF抗体的组合治疗受试者中的癌症的说明。

[0039] 在一些实施方案中,本发明提供一种用于治疗癌症的药剂,其包含用于与抗OX40抗体组合使用的PD-L1拮抗剂。

[0040] 在一些实施方案中,本发明提供一种用于治疗癌症的药剂,其包含用于与PD-L1拮抗剂组合使用的抗OX40抗体。

[0041] 其他实施方案提供PD-L1拮抗剂在制造当与抗OX40抗体组合施用用于治疗受试者中的癌症的药剂中的用途,和抗OX40抗体在制造当与PD-L1拮抗剂组合施用用于治疗受试者中的癌症的药剂中的用途。

[0042] 在一些实施方案中,本发明提供PD-L1拮抗剂和抗OX40抗体在制造用于治疗受试者中的癌症的药剂中的用途。在一些实施方案中,药剂包含试剂盒,且试剂盒还包含包装插页,其包含使用PD-L1拮抗剂与抗OX40抗体的组合治疗受试者中的癌症的说明。

[0043] 在一些实施方案中,本发明提供一种用于治疗癌症的药剂,其包含用于与抗4-1BB抗体和抗M-CSF抗体组合使用的PD-L1拮抗剂。

[0044] 在一些实施方案中,本发明提供一种用于治疗癌症的药剂,其包含用于与PD-L1拮抗剂组合使用的抗4-1BB抗体和抗M-CSF抗体。

[0045] 其他实施方案提供PD-L1拮抗剂在制造当与抗4-1BB抗体和抗M-CSF抗体组合施用用于治疗受试者中的癌症的药剂中的用途,以及抗4-1BB抗体和抗M-CSF抗体在制造当与PD-L1拮抗剂组合施用用于治疗受试者中的癌症的药剂中的用途。

[0046] 在一些实施方案中,本发明提供PD-L1拮抗剂和抗4-1BB抗体和抗M-CSF抗体在制造用于治疗受试者中的癌症的药剂中的用途。在一些实施方案中,药剂包含试剂盒,且试剂

盒还包含包装插页,其包含使用PD-L1拮抗剂与抗4-1BB抗体和抗M-CSF抗体的组合治疗受试者中的癌症的说明。

[0047] 在一些实施方案中,本发明提供一种用于治疗癌症的药剂,其包含用于与抗4-1BB抗体和抗OX40抗体组合使用的PD-L1拮抗剂。

[0048] 在一些实施方案中,本发明提供一种用于治疗癌症的药剂,其包含用于与PD-L1拮抗剂组合使用的抗4-1BB抗体和抗OX40抗体。

[0049] 其他实施方案提供PD-L1拮抗剂在制造当与抗4-1BB抗体和抗OX40抗体组合施用时用于治疗受试者中的癌症的药剂中的用途,以及抗4-1BB抗体和抗OX40抗体在制造当与PD-L1拮抗剂组合施用时用于治疗受试者中的癌症的药剂中的用途。

[0050] 在一些实施方案中,本发明提供PD-L1拮抗剂和抗4-1BB抗体和抗OX40抗体在制造用于治疗受试者中的癌症的药剂中的用途。在一些实施方案中,药剂包含试剂盒,且试剂盒还包含包装插页,其包含使用PD-L1拮抗剂与抗4-1BB抗体和抗OX40抗体的组合治疗受试者中的癌症的说明。

[0051] 在所有以上治疗方法、药剂和用途中,PD-L1拮抗剂抑制PD-L1与PD-1的结合。在以上治疗方法、药剂和用途的一些实施方案中,PD-L1拮抗剂为单克隆抗体或其抗原结合片段,其特异性结合至PD-L1或PD-1且阻断PD-L1与PD-1的结合。在一些实施方案中,PD-L1拮抗剂为抗PD-L1抗体,其包含来自包含SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列的重链可变区的三个CDR,和来自包含SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列的轻链可变区的三个CDR。在一些实施方案中,PD-L1拮抗剂为抗PD-L1抗体,其包含重链和轻链可变区,分别包含SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:9中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗PD-L1抗体为艾维路单抗。

[0052] 在一些实施方案中,抗4-1BB抗体可包含重链可变区,其包含来自具有SEQ ID NO:18中所示的氨基酸序列的重链可变区的三个CDR,和轻链可变区,其包含来自具有SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列的轻链可变区的三个CDR。在一些实施方案中,抗4-1BB抗体可包含重链和轻链可变区,其分别包含SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗4-1BB抗体为PF-05082566。

[0053] 在一些实施方案中,抗M-CSF抗体可包含重链可变区,其包含来自具有SEQ ID NO:30中所示的氨基酸序列的重链可变区的三个CDR,和轻链可变区,其包含来自具有SEQ ID NO:31中所示的氨基酸序列的轻链可变区的三个CDR。在一些实施方案中,抗M-CSF抗体可包含重链和轻链可变区,其分别包含SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗M-CSF抗体为PD-0360324。

[0054] 在一些实施方案中,抗OX40抗体可包含重链可变区,其包含来自具有SEQ ID NO:38中所示的氨基酸序列的重链可变区的三个CDR,和轻链可变区,其包含来自具有SEQ ID NO:39中所示的氨基酸序列的轻链可变区的三个CDR。在一些实施方案中,抗OX40抗体可包含重链可变区,其包含SEQ ID NO:38中所示的氨基酸序列,和轻链可变区,其包含SEQ ID NO:39中所示的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗OX40抗体为PF-04518600。

[0055] 在本发明的以上治疗方法、药剂和用途的一些实施方案中,受试者为人类且癌症为实体瘤。在一些实施方案中,实体瘤为肾细胞癌(RCC)、膀胱癌、乳腺癌、肾透明细胞癌、头部/颈部鳞状细胞癌(SCCHN)、肺鳞状细胞癌、恶性黑色素瘤、非小细胞肺癌(NSCLC)、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、小细胞肺癌(SCLC)或三阴性乳腺癌。

[0056] 在本发明的以上治疗方法、药剂和用途的其他实施方案中,受试者为人类且癌症为血液系统恶性疾病且在一些实施方案中,血液系统恶性疾病为急性淋巴母细胞白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、慢性髓性白血病(CML)、弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)、EBV阳性DLBCL、原发性纵隔大B细胞淋巴瘤、富含T细胞/组织细胞的大B细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤(HL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、多发性骨髓瘤(MM)、髓细胞白血病-1蛋白(Mc1-1)、骨髓异常增生综合征(MDS)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)或小淋巴细胞性淋巴瘤(SLL)。

[0057] 此外,在以上治疗方法、药剂和用途中的任一种的一些实施方案中,所述癌症对于PD-L1和PD-L2中的一者或两者的表达测试为阳性。在其他实施方案中,癌症具有升高的PD-L1表达。

[0058] 在以上治疗方法、药剂和用途的一些实施方案中,受试者是人类且癌症是人类PD-L1测试为阳性的RCC。

[0059] 在以上治疗方法、药剂和用途的一些实施方案中,所述癌症是具有透明细胞亚型的晚期RCC且存在于先前未针对RCC治疗的人类中。

[0060] 在以上治疗方法、药剂和用途的一些实施方案中,所述癌症是复发性或难治性(R/R)癌症。在一些实施方案中,所述R/R癌症是R/R DLBCL。

[0061] 在以上治疗方法、药剂和用途的一些实施方案中,所述癌症是局部晚期癌症。在一些实施方案中,所述局部晚期癌症是局部晚期SCCHN。在一些实施方案中,SCCHN位于口腔、口咽、喉或喉咽。

## 附图说明

[0062] 图1概述响应于治疗的T细胞的浸润。

[0063] 图2概述响应于治疗的CD8+T细胞/Treg的比率。

[0064] 图3概述响应于治疗的Eomes诱导。

[0065] 发明详述

[0066] I. 定义

[0067] 为使本发明可更容易理解,在下文中具体地定义某些技术和科学术语。除非在本文件中其他地方具体地定义,否则本文所使用的所有其他技术和科学术语均具有本领域普通技术人员通常所理解的含义。

[0068] 当用于修饰数值定义参数(例如PD-L1拮抗剂或VEGFR抑制剂的剂量,或本文中所描述的组合疗法的治疗时间长度)时,“约”意味着参数可变化多达关于该参数所述的数值的低于或高于10%。例如,约5mg/kg的剂量可在4.5mg/kg和5.5mg/kg之间变化。

[0069] 除非上下文另外清楚地规定,否则如本文(包括随附权利要求书)所用,词语的单数形式诸如“一(a/an)”和“该(the)”包括其对应的复数情况。

[0070] “施用”和“治疗”在其应用于动物、人类、实验受试者、细胞、组织、器官或生物流体时是指外源性药剂、治疗剂、诊断剂或组合物与动物、人类、受试者、细胞、组织、器官或生物流体的接触。细胞处理涵盖使试剂与细胞接触,以及使试剂与流体接触,其中该流体与细胞接触。“施用”和“治疗”还意味着通过试剂、诊断剂、结合化合物或通过另一细胞体外和离体处理例如细胞。术语“受试者”包括任何生物体,优选为动物,更优选为哺乳动物(例如大鼠、

小鼠、狗、猫、兔)且最优选为人类。

[0071] “抗体”是能够经由至少一个位于免疫球蛋白分子的可变区中的抗原识别位点特异性结合至靶标诸如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽的免疫球蛋白分子。如本文中所示使用,该术语不仅涵盖完整多克隆或单克隆抗体,而且涵盖其片段(诸如Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv)、单链(scFv)和结构域抗体(包括例如鲨鱼和骆驼抗体)以及包含抗体的融合蛋白,和包含抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其他修饰的构型。抗体包括任何类别的抗体,诸如IgG、IgA或IgM(或其亚类),且该抗体不必为任何特定类别。根据其重链的恒定区的抗体氨基酸序列,免疫球蛋白可被归为不同类别。存在五种主要类别的免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,且这些中的几种可进一步分成亚类(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。对应于不同种类的免疫球蛋白的重链恒定区分别称为 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 和 $\mu$ 。不同类别的免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型是众所周知的。

[0072] 如本文所使用的术语抗体的“抗原结合片段”或“抗原结合部分”是指保留与给定抗原(例如PD-L1)特异性结合的能力的完整抗体的一个或多个片段。抗体的抗原结合功能可由完整抗体的片段执行。涵盖在术语抗体的“抗原结合片段”内的结合片段的实例包括Fab;Fab';F(ab')<sub>2</sub>;由VH结构域和CH1结构域组成的Fd片段;由抗体的单臂的VL结构域和VH结构域组成的Fv片段;单结构域抗体(dAb)片段(Ward等人,Nature 341:544-546,1989)和分离的互补决定区(CDR)。

[0073] “优先结合”或“特异性结合”(在本文中可互换地使用)至靶标(例如PD-L1蛋白)的抗体、抗体缀合物或多肽是本领域中熟知的术语,并且用于测定此类特异性或优先结合的方法也是本领域中众所周知的。如果分子与特定细胞或物质的反应或缔合比其与替代性细胞或物质更频繁、更快速,持续时间更长和/或亲和力更大,则称其呈现“特异性结合”或“优先结合”。如果与抗体与其他物质结合相比,其与靶标结合具有更大亲和力、亲合力、更容易和/或具有更长持续时间,则抗体“特异性结合”或“优先结合”至靶标。例如,与抗体与其他PD-L1表位或非PD-L1表位的结合相比,如果抗体与一PD-L1表位结合具有更大亲和力、亲合力、更容易和/或以更长持续时间,则抗体与此表位“特异性结合”或“优先结合”。通过阅读此定义还应理解,例如特异性或优先结合至第一靶标的抗体(或部分或表位)可以或不特异性或优先结合至第二靶标。因此,“特异性结合”或“优先结合”不必需要(尽管其可包括)排他式结合。一般但不一定,提及结合意味着优先结合。

[0074] 抗体的“可变区”是指单独或组合的抗体轻链的可变区或抗体重链的可变区。如本领域中已知,重链和轻链的可变区各自由三个互补决定区(CDR)(也称为高变区)连接的四个构架区(FR)组成。各链中的CDR由FR聚集在一起并与来自另一个链的CDR靠近,促成形成抗体的抗原结合位点。存在至少两种用于测定CDR的技术:(1)基于交叉物种序列变化性的方法(即Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,(第5版,1991,National Institutes of Health,Bethesda MD));和(2)基于抗原-抗体复合物的结晶学研究的方法(Al-lazikani等人,1997,J.Molec.Biol.273:927-948)。如本文中所使用,CDR可指由任一种方法或由两种方法的组合定义的CDR。

[0075] 可变结构域的“CDR”是可变区内的氨基酸残基,其根据Kabat定义、Chothia定义、Kabat和Chothia二者的累积、AbM、接触和/或构型定义或本领域中众所周知的任何CDR测定方法鉴定。抗体CDR可被鉴定为最初由Kabat等人定义的高变区。参见例如Kabat等人,1992,

Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第5版, Public Health Service, NIH, Washington D.C.。CDR的位置也可被鉴定为最初由Chothia和其他人描述的结构环结构。参见例如Chothia等人, *Nature* 342:877-883, 1989。其他CDR鉴定的方法包括“AbM定义”, 其为Kabat和Chothia之间的折衷且使用Oxford Molecular's AbM抗体模型化软件(现为 **Accelrys®**) 或基于观察的抗原接触的CDR的“接触定义”获得, 其记载于MacCallum等人, *J.Mol.Biol.*, 262:732-745, 1996中。在另一方法(在本文中称为CDR的“构型定义”)中, CDR的位置可被鉴定为向抗原结合贡献热焓的残基。参见例如Makabe等人, *Journal of Biological Chemistry*, 283:1156-1166, 2008。其他CDR边界定义可不严格遵循以上方法之一, 但仍然将与Kabat CDR的至少一部分重叠, 虽然其可根据以下预测或实验结果而缩短或延长: 特定残基或残基组或甚至全部CDR不显著影响抗原结合。如本文所用, CDR可指由本领域中已知的任何方法(包括方法的组合)所定义的CDR。本文所用的方法可利用根据任何这些方法定义的CDR。对于任何含有超过一个CDR的给定实施方案, CDR可根据Kabat定义、Chothia定义、扩展定义、AbM定义、接触定义和/或构型定义中的任一种定义。

[0076] “分离的抗体”和“分离的抗体片段”是指纯化状态并在此类情形中意味着所命名的分子大体上不含其他生物分子, 诸如核酸、蛋白、脂质、碳水化合物或其他材料诸如细胞碎片和生长培养基。通常, 术语“分离的”并不意欲指完全不存在此类材料或不存在水、缓冲液或盐, 除非其含量实质上干扰如本文所述的结合化合物的实验或治疗用途。

[0077] 如本文中所使用, “单克隆抗体”或“mAb”或“Mab”是指大体上均质抗体的群体, 即除了可少量存在的可能的天然存在的突变以外, 构成该群体的抗体分子的氨基酸序列相同。相比之下, 常规(多克隆)抗体制剂典型地包括在其可变结构域、尤其CDR中具有不同氨基酸序列的许多不同抗体, 其通常对不同表位是特异性的。修饰语“单克隆”指示抗体的特征为获得自大体上均质的抗体群体, 且不应理解为需要通过任何特定方法产生该抗体。例如, 待根据本发明使用的单克隆抗体可通过Kohler等人(1975) *Nature* 256:495首先描述的杂交瘤方法制得, 或可通过重组DNA方法(参见例如美国专利号4,816,567)制得。“单克隆抗体”也可例如使用Clackson等人(1991) *Nature* 352:624-628和Marks等人(1991) *J.Mol.Biol.* 222:581-597中描述的技术分离自噬菌体抗体文库。还参见Presta(2005) *J.Allergy Clin.Immunol.* 116:731。

[0078] “嵌合抗体”是指以下抗体: 其中重链和/或轻链的一部分与来源于特定物种(例如人类)或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源, 而链的其余部分与来源于另一物种(例如小鼠)或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源, 以及此类抗体的片段, 只要其呈现所需生物学活性。

[0079] “人类抗体”是指仅包含人类免疫球蛋白序列的抗体。如果人类抗体产生于小鼠中、小鼠细胞中或来源于小鼠细胞的杂交瘤中, 则人类抗体可含有鼠碳水化合物链。类似地, “小鼠抗体”或“大鼠抗体”分别是指仅包含小鼠或大鼠免疫球蛋白序列的抗体。

[0080] “人源化抗体”是指含有来自非人类(例如鼠)抗体以及人类抗体的序列的抗体形式。此类抗体含有来源于非人类免疫球蛋白的最小序列。通常, 人源化抗体将包含至少一个且典型地两个可变结构域中的大体上全部, 其中全部或大体上全部高变环对应于非人类免疫球蛋白的高变环而全部或大体上全部FR结构域是人类免疫球蛋白序列的FR结构域。人源化抗体任选地还将包含免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分, 典型地, 人类免疫球蛋白的

恒定区的至少一部分。当必需区分人源化抗体与亲本啮齿动物抗体时,将前缀“hum”、“hu”或“h”添加至抗体克隆名称中。啮齿动物抗体的人源化形式将通常包含亲本啮齿动物抗体的相同CDR序列,不过可包括某些氨基酸取代以提高亲和力、增加人源化抗体的稳定性或为了其他原因。

[0081] 术语“癌症”、“癌性”或“恶性”是指或描述哺乳动物中的生理学病况,其特征典型地在于不受调控的细胞生长。癌症的实例包括但不限于癌、淋巴瘤、白血病、母细胞瘤和肉瘤。此类癌症的更特定实例包括鳞状细胞癌、骨髓瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、神经胶质瘤、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、急性髓性白血病(AML)、多发性骨髓瘤、胃肠(道)癌、肾癌、卵巢癌、肝癌、淋巴母细胞白血病、淋巴细胞性白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、前列腺癌、甲状腺癌、黑色素瘤、软骨肉瘤、神经母细胞瘤、胰腺癌、多形性胶质母细胞瘤、子宫颈癌、脑癌、胃癌、膀胱癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌和头颈癌。癌症的另一特定实例包括肾细胞癌。

[0082] “生物治疗剂”意味着生物分子,诸如抗体或融合蛋白,其阻断任何生物途径中支持肿瘤维持和/或生长或抑止抗肿瘤免疫反应的配体/受体信号传导。

[0083] “化学治疗剂”是可用于治疗癌症的化合物。化学治疗剂的类别包括但不限于:烷化剂、抗代谢剂、激酶抑制剂、纺锤体毒素植物生物碱、细胞毒性/抗肿瘤抗生素、拓扑异构酶抑制剂、光敏剂、抗雌激素和选择性雌激素受体调节剂(SERM)、抗孕酮剂、雌激素受体下调剂(ERD)、雌激素受体拮抗剂、黄体生成激素释放激素激动剂、抗雄激素剂、芳香酶抑制剂、EGFR抑制剂、VEGF抑制剂和反义寡核苷酸,其抑制与异常细胞增殖或肿瘤生长有关的基因的表达。可用于本发明的治疗方法的化学治疗剂包括细胞生长抑制剂和/或细胞毒素剂。

[0084] “保守性修饰的变体”或“保守性取代”是指用其他具有类似特征(例如电荷、侧链大小、疏水性/亲水性、主链构型和刚性等)的氨基酸取代蛋白中的氨基酸,使得所述变化可通常在不改变蛋白的生物学活性或其他所需性质(诸如抗原亲和力和/或特异性)的情况下进行。本领域技术人员认识到,通常,多肽的非必需区域中的单个氨基酸取代不会实质上改变生物学活性(参见例如Watson等人,(1987)Molecular Biology of the Gene,The Benjamin/Cummings Pub.Co.,第224页(第4版))。此外,结构上或功能上类似的氨基酸的取代不大可能破坏生物学活性。示例性保守性取代记载于下文表1中。

[0085] 表1. 示例性保守性氨基酸取代

[0086]

原始残基	保守性取代
Ala (A)	Gly;Ser
Arg (R)	Lys;His
Asn (N)	Gln;His
Asp (D)	Glu;Asn
Cys (C)	Ser;Ala
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp;Gln
Gly (G)	Ala
His (H)	Asn;Gln
Ile (I)	Leu;Val

Leu (L)	Ile;Val
Lys (K)	Arg;His
Met (M)	Leu;Ile;Tyr
Phe (F)	Tyr;Met;Leu
Pro (P)	Ala
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr;Phe
Tyr (Y)	Trp;Phe
Val (V)	Ile;Leu

[0087] 如本说明书和权利要求中所用,“基本上由……组成 (Consists essentially of)”和变型诸如“基本上由……组成 (consist essentially of)”或“基本上由……组成 (consisting essentially of)”指示包括任何所述要素或要素组,且任选地包括具有与所述要素类似或不同的性质的其他要素,所述其他要素并不实质上改变指定剂量方案、方法或组合物的基础特性或新特性。作为非限制性实例,基本上由所述氨基酸序列组成的PD-L1拮抗剂也可包括一个或多个氨基酸,包括一个或多个氨基酸残基的取代,其并不实质上影响结合化合物的特性。

[0088] “诊断性抗PD-L1单克隆抗体”意味着特异性结合至表达于某些哺乳动物细胞的表面上的PD-L1的mAb。成熟PD-L1缺乏分泌前前导序列,也称为前导肽。除非另有指示或可由上下文容易地显而易见,否则术语“PD-L1”和“成熟PD-L1”在本文中可互换地使用,且应理解为意味着相同分子。

[0089] 如本文中所使用,抗人类PD-L1mAb或诊断性抗hPD-L1mAb是指特异性结合至成熟人类PD-L1的单克隆抗体。成熟人类PD-L1分子由以下序列 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸19-290组成:MRIFAVFIFMTYWHLLNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDKNI IQFVHGE EDLKVQHSSYRQRARLLKDKLSLGNALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYKRITVKVNAPYNKINQRILVDPV TSEHELTCQAEGYPKAEVIWTSSDHQVLSGKTTTTNSKREEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAE LVIPELPLAHPNERTHLVILGAILLCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET (SEQ ID NO:1)。

[0090] “同源性”是指当两个多肽序列最佳比对时在两个序列之间的序列相似性。当两个比较的序列的两者中的位置由相同氨基酸单体亚单位占据时,例如如果两个不同Ab的轻链CDR中的位置由丙氨酸占据时,则两个Ab在该位置处同源。同源性百分比是由两个序列共有的同源性位置的数目除以所比较的位置的总数目 $\times 100$ 。例如,如果当序列最佳比对时,两个序列中的10个位置中的8个位置匹配或同源,则该两个序列是80%同源的。通常,在两个序列被比对以产生最大同源性百分比时进行比较。例如,比较可通过BLAST算法进行,其中该算法的参数被选择以在各参考序列的完整长度上的各序列之间产生最大匹配。

[0091] 以下参考文献涉及通常用于序列分析的BLAST算法:BLAST ALGORITHMS: Altschul, S.F., 等人, (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410; Gish, W., 等人, (1993) Nature Genet. 3:266-272; Madden, T.L., 等人, (1996) Meth. Enzymol. 266:131-141; Altschul, S.F., 等人, (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402; Zhang, J., 等人, (1997) Genome

Res.7:649-656;Wootton,J.C.,等人,(1993)Comput.Chem.17:149-163;Hancock,J.M.等人,(1994)Comput.Appl.Biosci.10:67-70;ALIGNMENT SCORING SYSTEMS:Dayhoff,M.O.,等人,"A model of evolutionary change in proteins."Atlas of Protein Sequence and Structure,(1978)vol.5,suppl.3.M.O.Dayhoff(编),pp.345-352,Natl.Biomed.Res.Found.,Washington,DC;Schwartz,R.M.,等人,"Matrices for detecting distant relationships."Atlas of Protein Sequence and Structure,(1978)vol.5,suppl.3."M.O.Dayhoff(编),pp.353-358,Natl.Biomed.Res.Found.,Washington,DC;Altschul,S.F.,(1991)J.Mol.Biol.219:555-565;States,D.J.,等人,(1991)Methods 3:66-70;Henikoff,S.,等人,(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:10915-10919;Altschul,S.F.,等人,(1993)J.Mol.Evol.36:290-300;ALIGNMENT STATISTICS:Karlin,S.,等人,(1990)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:2264-2268;Karlin,S.,等人,(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-5877;Dembo,A.,等人,(1994)Ann.Prob.22:2022-2039;和Altschul,S.F."Evaluating the statistical significance of multiple distinct local alignments."Theoretical and Computational Methods in Genome Research(S.Suhai,编),(1997)pp.1-14,Plenum,New York.

[0092] “患者”或“受试者”是指需要治疗或正在参与临床试验、流行病学研究或用作对照的任何单一受试者,包括人类和哺乳动物兽医学患者,诸如牛、马、狗和猫。

[0093] “PD-L1拮抗剂”意味着阻断癌细胞上表达的PD-L1与PD-1的结合的任何化合物或生物分子。在本发明的其中治疗人类受试者的治疗方法、药剂和用途中的任一种中,PD-L1拮抗剂阻断人类PD-L1与人类PD-1的结合。

[0094] 可用于本发明的治疗方法、药剂和用途中的任一种的PD-L1拮抗剂包括特异性结合至PD-L1且优选特异性结合至人类PD-L1的单克隆抗体(mAb)。mAb可以是人类抗体、人源化抗体或嵌合抗体,且可包括人类恒定区。在一些实施方案中,人类恒定区选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4恒定区,且在优选实施方案中,人类恒定区为IgG1或IgG4恒定区。在一些实施方案中,抗原结合片段选自Fab、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>、scFv和Fv片段。

[0095] 结合至人类PD-L1且可用于本发明的治疗方法、药剂和用途的mAb的实例描述于W02013079174、W02015061668、W02010089411、W0/2007/005874、W0/2010/036959、W0/2014/100079、W02013/019906、W0/2010/077634和美国专利号8552154、8779108和8383796。可用作本发明的治疗方法、药剂和用途中的PD-L1拮抗剂的特异性抗人类PD-L1mAb包括例如但不限于:艾维路单抗(MSB0010718C)、尼沃单抗(nivolunab)(BMS-936558)、MPDL3280A(IgG1工程改造的抗PD-L1抗体)、BMS-936559(完全人类、抗PD-L1、IgG4单克隆抗体)、MEDI4736(在Fc结构域中具有三重突变以移除抗体依赖性、细胞介导的细胞毒活性的工程改造的IgG1 $\kappa$ 单克隆抗体)和W02013/019906的分别包含SEQ ID NO:24和SEQ ID NO:21的重链和轻链可变区的抗体。

[0096] 其他可用于本发明的治疗方法、药剂和用途中的任一种的PD-L1拮抗剂包括特异性结合至PD-L1且优选特异性结合至人类PD-L1的免疫粘附素,例如含有与免疫球蛋白分子的恒定区(诸如Fc区)融合的PD-1的PD-L1结合部分的融合蛋白。

[0097] 以下表2提供用于本发明的治疗方法、药剂和用途的示例性抗PD-L1抗体序列。

表 2. 示例性抗人类 PD-L1 单克隆抗体序列	
重链 CDR1 (CDRH1)	SYIMM (SEQ ID NO:2)
重链 CDR2 (CDRH2)	SIYPSGGITFY (SEQ ID NO:3)
重链 CDR3 (CDRH3)	IKLGTVTVDY (SEQ ID NO:4)
轻链 CDR1 (CDRL1)	TGTSSDVGGYNYVS (SEQ ID NO:5)
轻链 CDR2 (CDRL2)	DVSNRPS (SEQ ID NO:6)
轻链 CDR3 (CDRL3)	SSYTSSSTRV (SEQ ID NO:7)
重链可变区 (VR)	EVQLLES GGLVQP GGS LRLS CAASGFT FSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYP SGGITFYADKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARIKLGTVTTVD YWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 8)
轻链 VR	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDV SNRPSGVS NRFS GSKSGNTASLTISGLQAEDEADYICSSYTSSSTRVFGTGK VTVL (SEQ ID NO: 9)
重链	EVQLLES GGLVQP GGS LRLS CAASGFT FSSYIMMWVRQAPGKGLEWVSSIYP SGGITFYADTVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCARIKLGTVTT VDYWGQGLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSGTQTYICNVNHKPSNT KVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPEL LGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLW GKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 10)
轻链	QSALTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGKAPKLMYDV SNRPSGVS NRFS GSKSGNTASLTISGLQAEDEADYICSSYTSSSTRVFGTGK VTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPV KAGVETTKPSKQSNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAP TECS (SEQ ID NO: 11)

[0098]

[0099] 如本文所使用,“PD-L1”表达意味着细胞表面上的任何可检测水平的PD-L1蛋白的表达或细胞或组织内的任何可检测水平的PD-L1mRNA的表达。PD-L1蛋白表达可用诊断性PD-L1抗体在肿瘤组织切片的IHC分析法中或通过流式细胞术进行检测。或者,可使用特异性结合至PD-L1的结合剂(例如抗体片段、亲和抗体等)通过PET成像来检测肿瘤细胞的PD-L1蛋白表达。用于检测和测量PD-L1mRNA表达的技术包括RT-PCR和实时定量RT-PCR。

[0100] 已描述几种用于在肿瘤组织切片的IHC分析法中定量PD-L1蛋白表达的方法。参见例如Thompson, R.H., 等人, PNAS 101 (49):17174-17179 (2004); Thompson, R.H. 等人, Cancer Res. 66:3381-3385 (2006); Gadiot, J., 等人, Cancer 117:2192-2201 (2011); Taube, J.M. 等人, Sci Transl Med 4, 127ra37 (2012); 和Toplian, S.L. 等人, New Eng. J Med. 366 (26):2443-2454 (2012)。

[0101] 一种方法使用PD-L1表达阳性或阴性的简单二元终点,其中阳性结果以在呈现细胞-表面膜染色的组织学迹象的肿瘤细胞的百分比来定义。关于PD-L1表达被计数为阳性的肿瘤组织切片为总肿瘤细胞的至少1%,且优选为5%。

[0102] 在另一方法中,肿瘤组织切片中的PD-L1表达在肿瘤细胞中以及在浸润性免疫细胞(其主要包含淋巴细胞)中定量。呈现膜染色的肿瘤细胞和浸润性免疫细胞的百分比分别定量为<5%、5至9%且然后以10%递增至100%。关于肿瘤细胞,如果评分为<5%评分,则PD-L1表达被计数为阴性,而如果评分 $\geq 5\%$ ,则PD-L1表达被计数为阳性。免疫浸润物中的PD-L1表达被报导为半定量测量值,称为调节的炎症评分(AIS),其通过膜染色细胞的百分

比乘以浸润物的强度来测定,浸润物的强度分级为无(0)、轻度(评分1,罕见淋巴细胞)、中等(评分2,由淋巴组织细胞聚集体局部浸润肿瘤)或严重(评分3,弥漫浸润)。如果AIS $\geq$ 5,则肿瘤组织切片被计数为免疫浸润物的PD-L1表达阳性。

[0103] PD-L1mRNA表达水平可与频繁地用于定量RT-PCR的一种或多种参考基因(诸如泛素C)的mRNA表达水平进行比较。

[0104] 在一些实施方案中,基于与适当对照的PD-L1表达水平(蛋白和/或mRNA)的比较,肿瘤内恶性细胞和/或浸润性免疫细胞的PD-L1表达水平(蛋白和/或mRNA)被测定为“过表达”或“升高”。例如,对照PD-L1蛋白或mRNA表达水平可以是在相同类型的非恶性细胞中或在来自匹配的正常组织的切片中定量的水平。

[0105] 如本文所使用,“RECIST 1.1反应标准”意味着Eisenhauer等人,E.A.等人,Eur.J Cancer 45:228-247(2009)中关于目标病灶或非目标病灶所述的定义,其根据需要基于其中测量反应的情形。

[0106] “持续反应”意味着在停止用治疗剂或本文所述的组合疗法治疗之后的持续治疗效果。在一些实施方案中,持续反应具有至少与治疗持续时间相同或至少为治疗持续时间的1.5、2.0、2.5或3倍长的持续时间。

[0107] “组织切片”是指组织样品的单一部分或片段,例如,从正常组织或肿瘤样品切割的组织的薄切片。

[0108] 如本文所用的“治疗”癌症意味着向患有癌症或被诊断患有癌症的受试者施用PD-L1拮抗剂和另一治疗剂的组合疗法,以实现至少一种阳性治疗效果,诸如例如减少的癌细胞数目、降低的肿瘤大小、降低的癌细胞浸润至周边器官中的速率或降低的肿瘤转移或肿瘤生长速率。可以多种方式测量癌症中的阳性治疗性作用(参见W.A.Weber, J.Nucl.Med.50:1S-10S(2009))。例如,相对于肿瘤生长抑制,根据国家癌症学会(National Cancer Institute;NCI)标准,低于或等于42%的T/C是抗肿瘤活性的最低水平。T/C $<$ 10%被视为高抗肿瘤活性水平,T/C(%)=处理的中值肿瘤体积/对照性中值肿瘤体积 $\times$ 100。在一些实施方案中,由本发明的组合实现的治疗是以下中的任一种:部分反应(PR)、完全反应(CR)、总体反应(OR)、无进展存活期(PFS)、无疾病存活期(DFS)和总体存活期(OS)。PFS,也称为“至肿瘤出现进展的时间”,指示在治疗期间和在治疗之后癌症不生长的时间长度,且包括患者已经历CR或PR的时间量,以及患者已经历稳定疾病(SD)的时间量。DFS是指在患者保持无疾病的治疗期间和之后的时间长度。OS是指与未处理或未治疗的受试者或患者相比预期寿命延长。在一些实施方案中,对本发明的组合的反应是使用实体瘤中的反应评估标准(RECIST)1.1反应标准评估的PR、CR、PFS、DFS、OR或OS中的任一种。可有效治疗癌症患者的本发明的组合的治疗方案可根据因素诸如患者的疾病状态、年龄和体重以及疗法引发受试者中的抗癌反应的能力而变化。尽管本发明的任一方面的一个实施方案在每个受试者中实现积极治疗作用方面可能并不都有效,但其应在统计显著数目的受试者中有效,如通过本领域中已知的任何统计检验所测定,所述统计检验诸如Student氏t检验(Student's t-test)、chi<sup>2</sup>检验、根据Mann和Whitney的U-检验、Kruskal-Wallis检验(Kruskal-Wallis test,H检验)、Jonckheere-Terpstra-检验(Jonckheere-Terpstra-test)和Wilcoxon-检验(Wilcoxon-test)。

[0109] 术语“治疗方案”和“给药方案”可互换地用于指本发明的组合中每种治疗剂的施

用的剂量和时机。

[0110] 如本文中所使用,“治疗”是用于获得有利或所需临床结果的方法。对于本发明的目的,有利或所需临床结果包括但不限于以下中的一种或多种:减少赘生性或癌细胞的增殖(或使之破坏)、抑制赘生性细胞的转移、收缩或减小肿瘤大小、缓解PD-L1相关疾病(例如癌症)、减少由PD-L1相关疾病(例如癌症)引起的症状、提高PD-L1相关疾病(例如癌症)患者的生活质量、降低治疗PD-L1相关疾病(例如癌症)所需的其他药物的剂量、延迟PD-L1相关疾病(例如癌症)的进展、治愈PD-L1相关疾病(例如癌症)和/或延长具有PD-L1相关疾病(例如癌症)的患者的存活期。

[0111] “改善”意味着与未施用PD-L1抗体相比,一种或多种症状减轻或改善。“改善”还包括缩短或降低症状的持续时间。

[0112] 如本文中所使用,药物、化合物或药物组合物的“有效剂量”或“有效量”是足以影响任一种或多种有利或所需结果的量。对于预防性用途,有利或所需结果包括消除或降低疾病的风险、减轻疾病的严重水平或延迟疾病(包括疾病、其并发症和在疾病发展期间所呈现的中间病理性表型的生物化学、组织和/或行为症状)发生。对于治疗性用途,有利或所需结果包括临床结果,诸如降低发病率或改善各种PD-L1相关疾病或病况(诸如晚期RCC)的一种或多种症状、降低治疗疾病所需的其他药物的剂量、增强另一种药物的作用和/或延迟患者的PD-L1相关疾病的进程。有效剂量可在一次或多次施用中施用。对于本发明的目的,药物、化合物或药物组合物的有效剂量是足以直接或间接完成预防性或治疗性治疗的量。如在临床情形下所理解,药物、化合物或药物组合物的有效剂量可以与或不与另一药物、化合物或药物组合物一起实现。因此,“有效剂量”可视为在施用一种或多种治疗剂的情形下,且如果与一种或多种其他药剂结合,可实现或已实现所需结果,则单一药剂可视为以有效量给出。

[0113] “肿瘤”在应用于被诊断患有或怀疑患有癌症的受试者时是指任何大小的恶性或潜在恶性赘生物或组织块状物,且包括原发性肿瘤和继发性赘生物。实体瘤是通常不含囊肿或液体区域的组织的异常生长或块状物。不同类型的实体瘤根据形成其的细胞类型而命名。实体瘤的实例是肉瘤、癌和淋巴瘤。白血病(血液癌症)通常不形成实体瘤(国家癌症研究所(National Cancer Institute),癌症术语词典(Dictionary of Cancer Terms))。

[0114] “肿瘤负荷”也称为“肿瘤负载”,是指分布于体内的肿瘤物质的总量。肿瘤负荷是指体内(包括淋巴结和骨髓)的癌细胞的总数或肿瘤的总大小。肿瘤负荷可通过本领域中已知的多种方法,诸如例如通过在从受试者移出之后例如使用卡尺测量肿瘤的大小,或同时在体内使用成像技术,例如超声波、骨扫描、计算机断层摄影术(CT)或磁共振成像(MRI)扫描来测定。

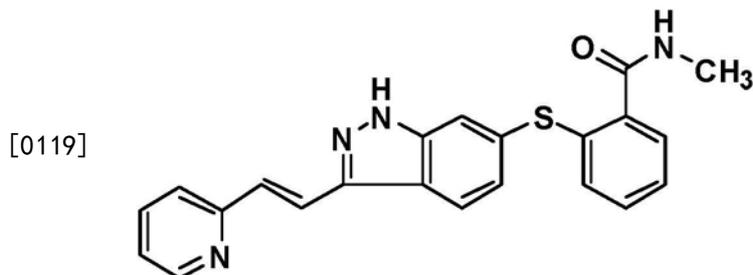
[0115] 术语“肿瘤大小”是指可作为肿瘤的长度和宽度测量的肿瘤的总大小。肿瘤大小可通过本领域中已知的多种方法,诸如通过在从受试者移出之后例如使用卡尺测量肿瘤的大小,或同时在体内使用成像技术,例如骨扫描、超声波、CT或MRI扫描来测定。

[0116] 如本文所用的“可变区”或“V区”意味着在不同抗体之间序列可变的IgG链的区段。其延伸至轻链中的Kabat残基109和重链中的Kabat残基113。

[0117] “VEGFR抑制剂”意味着血管内皮生长因子(VEGF)受体的小分子抑制剂或针对血管内皮生长因子(VEGF)的单克隆抗体。在一个实施方案中,“VEGFR抑制剂”意味着血管内皮生

长因子 (VEGF) 受体的小分子抑制剂。可用作本发明的治疗方法、药剂和用途中的 VEGFR 抑制剂的特异性 VEGFR 抑制剂包括阿西替尼 (axitinib)、舒尼替尼 (sunitinib)、索拉非尼 (sorafenib)、替沃扎尼 (tivozanib) 和贝伐单抗 (bevacizumab)。在一个实施方案中,可用作本发明的治疗方法、药剂和用途中的 VEGFR 抑制剂的特异性 VEGFR 抑制剂包括阿西替尼、舒尼替尼、索拉非尼和替沃扎尼。

[0118] 在本发明的治疗方法、药剂和用途的一个实施方案中,VEGFR 抑制剂为以下结构的化合物 N-甲基-2-[3-(E)-2-吡啶-2-基-乙烯基]-1H-吡唑-6-基硫基]-苯甲酰胺或 6-[2-(甲基氨基甲酰基)苯基硫基]-3-E-[2-(吡啶-2-基)乙烯基]吡唑:



[0120] 其称为阿西替尼或 AG-013736。

[0121] 阿西替尼是血管内皮生长因子 (VEGF) 受体 1、2 和 3 的有效和选择性抑制剂。这些受体涉及病理性血管生成、肿瘤生长和癌症的转移性进程。已显示阿西替尼有效抑制 VEGF 介导的内皮细胞增殖和存活 (Hu-Lowe, D.D., 等人, Clin Cancer Res 14:7272-7283 (2008); Solowiej, S., 等人, Biochemistry 48:7019-31 (2009))。当前正在进行或已进行临床试验以研究阿西替尼用于治疗多种癌症 (包括肝癌、黑色素瘤、间皮瘤、非小细胞肺癌、前列腺癌、肾细胞癌、软组织肉瘤和实体瘤) 的用途。Inlyta® (阿西替尼) 已在美国、欧洲、日本和其他管辖区批准用于治疗肾细胞癌。

[0122] 阿西替尼以及其药学上可接受的盐描述于美国专利号 6,534,524 中。制造阿西替尼的方法描述于美国专利号 6,884,890 和 7,232,910、美国公开号 2006-0091067 和 2007-0203196 以及国际公开号 W0 2006/048745 中。阿西替尼的剂型描述于美国公开号 2004-0224988 中。阿西替尼的多晶型形式和药物组合物也描述于美国公开号 2006-0094763、2008-0274192 和 2010-0179329 以及国际公开号 W0 2013/046133 中。以上列出的专利和专利申请通过引用并入本文。

[0123] 除非另有指示,否则应理解,阿西替尼包括对其盐的提及。阿西替尼性质为碱性且能够与各种无机和有机酸形成多种盐。如本文所使用,术语“盐”表示与无机和/或有机酸形成的酸式盐。可例如通过使阿西替尼与一定量 (诸如等量) 的酸在介质诸如其中盐沉淀的介质或在水性介质中反应,随后冻干来形成阿西替尼的药学上可接受的盐。

[0124] 式 I 化合物的示例性酸加成盐包括乙酸盐、抗坏血酸盐、苯甲酸盐、苯磺酸盐、硫酸氢盐、硼酸盐、丁酸盐、柠檬酸盐、樟脑酸盐、樟脑磺酸盐、反丁烯二酸盐、氢氯酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、乳酸盐、顺丁烯二酸盐、甲磺酸盐、萘磺酸盐、硝酸盐、草酸盐、磷酸盐、丙酸盐、水杨酸盐、丁二酸盐、硫酸盐、酒石酸盐、硫氰酸盐、甲苯磺酸盐 (toluenesulfonates) (也称为甲苯磺酸盐 (tosylates)) 等。此外,通常认为适用于从碱性药物化合物形成药学上可用的盐的酸由例如 S. Berge 等人, Journal of Pharmaceutical Sciences (1977) 66 (1) 1-

19;P.Gould,International J.of Pharmaceutics(1986) 33 201-217;Anderson等人,The Practice of Medicinal Chemistry(1996),Academic Press,New York;和The Orange Book (Food&Drug Administration,Washington,D.C.,在其网站上)讨论。这些公开内容通过引用并入本文。

[0125] 如本发明中所用,所有此类酸式盐意欲是阿西替尼范围内的药学上可接受的盐,并且对于本发明的目的,所有酸盐都被视为等效于相应化合物的游离形式。

[0126] 还考虑阿西替尼的前药用于本发明的方法、药剂和用途中。如本文所用的术语“前药”表示作为药物前体的化合物,其在给受试者施用后通过代谢或化学过程经历化学转化以产生阿西替尼或其盐。前药的讨论提供于T.Higuchi and V.Stella,Pro-drugs as Novel Delivery Systems(1987) 14of the A.C.S.Symposium Series和Bioreversible Carriers in Drug Design,(1987)Edward B.Roche,编,American Pharmaceutical Association and Pergamon Press,其两者都通过引用并入本文。

[0127] 如本文所使用,术语“4-1BB抗体”意味着如本文所定义的能够结合至人类4-1BB受体的抗体。

[0128] 术语“4-1BB”和“4-1BB受体”在本申请中可互换地使用,且是指4-1BB受体的任何形式,以及其保留4-1BB受体的至少一部分活性的变体、同种型和物种同系物。因此,如本文中所定义和公开的结合分子也可结合来自除人类以外的物种的4-1BB。在其他情况下,结合分子可对人类4-1BB具有完全特异性且可不呈现物种或其他类型的交叉反应性。除非另有说明,诸如通过特定提及人类4-1BB,否则4-1BB包括天然序列4-1BB的所有哺乳动物物种,例如人类、犬、猫、马和牛。一种示例性人类4-1BB为255个氨基酸的蛋白(登录号NM\_001561;NP\_001552)。

[0129] 4-1BB包含信号序列(氨基酸残基1-17),随后为细胞外结构域(169个氨基酸)、跨膜区(27个氨基酸)和胞内结构域(42个氨基酸)(Cheuk ATC等人2004Cancer Gene Therapy 11:215-226)。受体以单体和二聚体形式表达于细胞表面上且可能与4-1BB配体三聚化以进行信号传导。

[0130] 如本文所使用,“4-1BB激动剂”意味着如本文所定义的任何化合物或生物分子,其在结合至4-1BB后(1)刺激或活化4-1BB,(2)增强、增加、促进、诱导或延长4-1BB的活性、功能或存在或(3)增强、增加、促进或诱导4-1BB的表达。可用于本发明的治疗方法、药剂和用途中的任一种中的4-1BB激动剂包括特异性结合至4-1BB的单克隆抗体(mAb)或其抗原结合片段。4-1BB的替代性名称或同义词包括CD137和TNFRSF9。在本发明的其中治疗人类受试者的治疗方法、药剂和用途中的任一种中,4-1BB激动剂增加4-1BB介导的反应。在本发明的治疗方法、药剂和用途的一些实施方案中,4-1BB激动剂显著增强细胞毒性T细胞反应,在几种模型中产生抗肿瘤活性。

[0131] 人类4-1BB包含信号序列(氨基酸残基1-17),随后为细胞外结构域(169个氨基酸)、跨膜区(27个氨基酸)和胞内结构域(42个氨基酸)(Cheuk ATC等人2004Cancer Gene Therapy 11:215-226)。受体以单体和二聚体形式表达于细胞表面上且可能与4-1BB配体三聚化以进行信号传导。

[0132] 结合至人类4-1BB且可用于本发明的治疗方法、药剂和用途中的mAb的实例描述于US 8,337,850和US20130078240中。在一些实施方案中,可用于本文中所公开的治疗方法、

药剂和用途中的抗4-1BB抗体是完全人源化IgG2激动剂单克隆抗体,其包含分别包含SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列的重链可变区和轻链可变区。

[0133] 以下表3A提供用于本发明的治疗方法、药剂和用途的示例性抗4-1BB抗体序列。

表 3A. 示例性抗人类 4-1BB 单克隆抗体序列	
CDRH1	STYWIS (SEQ ID NO:12)
CDRH2	KIYPGDSYTNYSFSFQG (SEQ ID NO:13)
CDRH3	RGYGIFDY (SEQ ID NO:14)
CDRL1	SGDNIGDQYAH (SEQ ID NO:15)
CDRL2	QDKNRPS (SEQ ID NO:16)
CDRL3	ATYTGFGSLAV (SEQ ID NO:17)
重链 VR	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFSTYWISWVRQMPGKGLEWMGKIYPGDSYTNYSFSFQG QVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARGYGIFDYWGQGLVTVSS (SEQ ID NO: 18)
轻链 VR	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQQKPGQSPVLVIYQDKNRPSGIPERFSGSNS GNTATLTISGTQAMDEADYYCATYTGFGSLAVFVGGGKLTVL (SEQ ID NO: 19)
重链	EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFSTYWISWVRQMPGKGLEWMGKIYPGDSYTNYSFSFQG QVTISADKSI STAYLQWSSLKASDTAMYYCARGYGIFDYWGQGLVTVSSastkqpsvfplapcsr stsestaalgclvkdyfpepvtvswngalstsgvhtfpavlgssglyslssvvtvpssnfgtqtyt cnvdhkpsntkvdkterkccvecpappvagpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvvdvshe dpevqfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstfrvsvltvvhqdwlngkeykckvsnkglpapiekt isktkgqprepqvylppsreemtknqvsitclvkgyfypsdiavewesngqpennykttppmlsd gsfflyskltvdksrwqgnvfscsvmhealhnhytqkslsispkg (SEQ ID NO: 20)
轻链	SYELTQPPSVSVSPGQTASITCSGDNIGDQYAHWYQQKPGQSPVLVIYQDKNRPSGIPERFSGSNS GNTATLTISGTQAMDEADYYCATYTGFGSLAVFVGGGKLTVLgqpkaapsvtlfppsseelqanka tlvclisdfypgavtvawkadsspvkagvetttpskqsnnkyaassylsltpeqwkshrsyscqv hegstvektvaptecs (SEQ ID NO: 21)

[0135] 如本文所使用,术语“M-CSF抗体”意味着如本文所定义的能够结合至人类M-CSF受体的抗体。

[0136] 术语“M-CSF”和“M-CSF受体”在本申请中可互换地使用,且是指M-CSF受体的任何形式,以及其保留M-CSF受体的至少一部分活性的变体、同种型和物种同系物。因此,如本文中所定义和公开的结合分子也可结合来自除人类以外的物种的M-CSF。在其他情况下,结合分子可对人类M-CSF具有完全特异性且可不呈现物种或其他类型的交叉反应性。除非另有说明,诸如通过特定提及人类M-CSF,否则M-CSF包括天然序列M-CSF的所有哺乳动物物种,例如人类、犬、猫、马和牛。一种示例性人类M-CSF为554个氨基酸的蛋白(UniProt登录号P09603)。

[0137] 如本文所使用,“M-CSF拮抗性抗体”意味着如本文所定义的在结合至M-CSF后抑制M-CSF与c-fms受体的结合且阻断或防止c-fms活化的任何抗体。可用于本发明的治疗方法、药剂和用途中的任一种中的M-CSF拮抗剂包括特异性结合至M-CSF的单克隆抗体(mAb)。

[0138] 结合至人类M-CSF且可用于本发明的治疗方法、药剂和用途中的mAb的实例描述于例如美国专利号7,326,414、PCT专利申请公开号W02014167088和美国专利申请公开号20140242071中。在一些实施方案中,可用于本文中所公开的治疗方法、药剂和用途中的抗M-CSF抗体是完全人类IgG2拮抗剂单克隆抗体,其包含分别包含SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:31中所示的氨基酸序列的重链可变区和轻链可变区。

[0139] 以下表3B提供用于本发明的治疗方法、药剂和用途中的示例性抗M-CSF抗体序列。

表 3B. 示例性抗人类 M-CSF 单克隆抗体序列	
CDRH1	SFSMT (SEQ ID NO: 24)
CDRH2	YISSRSSTISYADSVKG (SEQ ID NO: 25)
CDRH3	DPLLAGATFFDY (SEQ ID NO: 26)
CDRL1	RASQSVSSSYLA (SEQ ID NO: 27)
CDRL2	GASSRAT (SEQ ID NO: 28)
CDRL3	QQYGSSPLT (SEQ ID NO: 29)
[0140] 重链 VR	MELGLCWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMTWVRQAPGKGLE WVSYISSRSSTISYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNLSRDEDTAVYYCARDPLLAGATFFDYW GQGTLLTVSSA (SEQ ID NO: 30)
轻链 VR	METPAQLLFLLLLWLPDTTGEFVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGKVEIK (SEQ ID NO: 31)
重链	MELGLCWVFLVAILEGVQCEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFSMTWVRQAPGKGLE WVSYISSRSSTISYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNLSRDEDTAVYYCARDPLLAGATFFDYW GQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSVHTFPA
[0141]	VLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDHKPSNTKVDKTVKCCVECPAPVAGPSVF LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVS TVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSGFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVMSHEALHNHY TQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 22)
轻链	METPAQLLFLLLLWLPDTTGEFVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAP RLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSPLTFGGGKVEIKRT VAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCVLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYS LSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 23)

[0142] 如本文所使用,术语“OX40抗体”意味着如本文所定义的能够结合至人类OX40受体的抗体。

[0143] 术语“OX40”和“OX40受体”在本申请中可互换地使用,且是指OX40受体的任何形式,以及其保留OX40受体的至少一部分活性的变体、同种型和物种同系物。因此,本文中所定义和公开的结合分子也可结合来自除人类以外的物种的OX40。在其他情况下,结合分子可对人类OX40具有完全特异性且可不呈现物种或其他类型的交叉反应性。除非另有不同指示,诸如通过特定提及人类OX40,否则OX40包括天然序列OX40的所有哺乳动物物种,例如人类、犬、猫、马和牛。一种示例性人类OX40为277个氨基酸的蛋白(UniProt登录号P43489)。

[0144] 如本文所使用,“OX40激动抗体”意味着如本文所定义的在结合至OX40时发挥以下作用的任何抗体:(1)刺激或活化OX40,(2)增强、增加、促进、诱导或延长OX40的活性、功能或存在,或(3)增强、增加、促进或诱导OX40的表达。可用于本发明的治疗方法、药剂和用途中的任一种中的OX40拮抗剂包括特异性结合至OX40单克隆抗体(mAb)。

[0145] 结合至人类OX40且可用于本发明的治疗方法、药剂和用途中的mAb的实例描述于例如美国专利号7,960,515、PCT专利申请公开号W02013028231和第W02013/119202,以及美国专利申请公开号20150190506中。在一些实施方案中,可用于本文中所公开的治疗方法、药剂和用途中的抗OX40抗体是完全人类激动剂单克隆抗体,其包含分别包含SEQ ID NO:38

和SEQ ID NO:39中所示的氨基酸序列的重链可变区和轻链可变区。在一些实施方案中,抗OX40抗体是完全人类IgG2或IgG1抗体。

[0146] 以下表3C提供用于本发明的治疗方法、药剂和用途中的示例性抗OX40抗体序列。

表 3C. 示例性抗人类 OX40 单克隆抗体序列	
CDRH1	SYSMN (SEQ ID NO: 32)
CDRH2	YISSSSSTIDYADSVKG (SEQ ID NO: 33)
CDRH3	ESGWYLFDY (SEQ ID NO: 34)
CDRL1	RASQGISSWLA (SEQ ID NO: 35)
CDRL2	AASSLQS (SEQ ID NO: 36)
CDRL3	QQYNSYPPT (SEQ ID NO: 37)
重链 VR	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIDYADS VKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARESGWYLFDYWGQGLTIVTSS (SEQ ID NO: 38)
轻链 VR	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPPTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 39)
重链	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISSSSSTIDYADS VKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCARESGWYLFDYWGQGLTIVTSSastkqpsv fplapcsrstsestaalgclvkdyfpepvtvswngaltsgvhtfpavqlqssglyslssvvtv pssnfgtqtytcnvdhkpsntkvdktkverkcceppcpappvagpsvflfppkpkdtlmsr tpevtcvvvdvshedpevqfnwyvdgvevhnaktkpreeqfnstfrvsvltvvhqdwlngke ykckvsnkglpapiektisktkgqprepqvylppsreemtknqvsltclvkgfypsdiavew esngqpennykttppmlsdsgsfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhealhnhytqkslsls pgk (SEQ ID NO: 40)
轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQGISSWLAWYQQKPEKAPKSLIYAASSLQSGVPSRFS GSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQYNSYPPTFGGGTKVEIKrtvaapsvfifppsdeqlk sgtasvvc11nnfybreakvqkwvdnalqsgnsqesvteqdskdstyslsstltlslskadyekh kvyacevthqglsspvtksfnrgec (SEQ ID NO: 41)

[0147]

[0148] “CD20”抗原是在超过90%的来自外周血液或淋巴器官的B细胞的表面上发现的约35kDa、非糖基化磷蛋白。CD20在早期前B细胞发育期间表达且保持直至浆细胞分化。CD20存在于正常B细胞以及恶性B细胞上。文献中CD20的其他名称包括“B淋巴细胞限制性抗原”和“Bp35”。CD20抗原描述于例如Clark等人PNAS (USA) 82:1766 (1985) 中。

[0149] 除非另外定义,否则本文所使用的所有技术和科学术语均具有与本领域普通技术人员通常所理解相同的含义。在矛盾的情况下,将以本申请说明书(包括定义)为准。在整个本说明书和权利要求中,措词“包含”或变型诸如“包括”应理解为暗示包括所述元素或元素组,但不排除任何其他元素或元素组。除非上下文另外需要,否则单数术语应包括复数且复数术语应包括单数。

[0150] 本文描述示例性方法和物质,虽然类似或等效于本文所述的方法和物质的方法和物质也可用于本发明的实践或测试。所述材料、方法和实例仅为说明性的且不意欲为限制性的。

[0151] II. 方法、用途和药剂

[0152] 在本发明的一个方面,本发明提供用于治疗受试者中的癌症的方法,其包括给受试者施用组合疗法,其包含PD-L1拮抗剂和VEGFR抑制剂。

[0153] 在本发明的另一个方面,本发明提供用于治疗受试者中的癌症的方法,其包括给受试者施用组合疗法,其包含PD-L1拮抗剂和抗4-1BB抗体。

[0154] 在本发明的另一个方面,本发明提供用于治疗受试者中的癌症的方法,其包括给受试者施用组合疗法,其包含PD-L1拮抗剂和抗M-CSF抗体。

[0155] 在本发明的另一个方面,本发明提供用于治疗受试者中的癌症的方法,其包括给受试者施用组合疗法,其包含PD-L1拮抗剂和抗OX40抗体。

[0156] 在本发明的另一个方面,本发明提供用于治疗受试者中的癌症的方法,其包括给受试者施用组合疗法,其包含PD-L1拮抗剂、抗4-1BB抗体和抗M-CSF抗体。

[0157] 在本发明的另一个方面,本发明提供用于治疗受试者中的癌症的方法,其包括给受试者施用组合疗法,其包含PD-L1拮抗剂、抗4-1BB抗体和抗OX40抗体。

[0158] 在本发明的另一个方面,本发明提供用于治疗受试者中的癌症的方法,其包括给受试者施用组合疗法,其包含PD-L1拮抗剂、抗4-1BB抗体和CD20拮抗剂。在一些实施方案中,PD-L1拮抗剂为艾维路单抗,抗4-1BB抗体为PF-05082566,且CD20拮抗剂为利妥昔单抗。在一些实施方案中,该方法包括28天周期,其中利妥昔单抗在每一28天周期的第1天以 $375\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量施用,PF-05082566在第1天或第2天以100mg的固定剂量施用,且艾维路单抗在每一28天周期的第2天和第15天或第16天以 $10\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量施用。在一些实施方案中,在第2天,在PF-05082566施用之后至少3小时施用艾维路单抗。在一些实施方案中,在第2天,在PF-05082566施用之后约30分钟施用艾维路单抗。在一些实施方案中,在第2天,在PF-05082566施用之后约60分钟施用艾维路单抗。

[0159] 在本发明的另一个方面,本发明提供用于治疗受试者中的癌症的方法,其包括给受试者施用组合疗法,其包含PD-L1拮抗剂、抗4-1BB抗体和阿扎胞苷。在一些实施方案中,PD-L1拮抗剂为艾维路单抗,且抗4-1BB抗体为PF-05082566。在一些实施方案中,该方法包括28天周期,其中在每一28天周期的第1天至第7天连续以 $75\text{mg}/\text{m}^2$ 的日剂量皮下施用阿扎胞苷,在第1天或第2天以100mg的固定剂量静脉内施用PF-05082566,并在每一28天周期的第2天和第15天或第16天以 $10\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量施用艾维路单抗。在一些实施方案中,在第2天,在PF-05082566施用之后至少3小时施用艾维路单抗。在一些实施方案中,在第2天,在PF-05082566施用之后约30分钟施用艾维路单抗。在一些实施方案中,在第2天,在PF-05082566施用之后约60分钟施用艾维路单抗。在一些实施方案中,在第2天,在PF-05082566施用之后至少3小时施用艾维路单抗。在一些实施方案中,在第2天,在PF-05082566施用之后约30分钟施用艾维路单抗。在一些实施方案中,在第2天,在PF-05082566施用之后约60分钟施用艾维路单抗。在一些实施方案中,当在同一天给药时,在PF-05082566之前至少3小时施用阿扎胞苷。

[0160] 在本发明的另一个方面,本发明提供用于治疗受试者中的癌症的方法,其包括给受试者施用组合疗法,其包含PD-L1拮抗剂、苯达莫司汀和CD20拮抗剂。在一些实施方案中,PD-L1拮抗剂为艾维路单抗且CD20拮抗剂为利妥昔单抗。在一些实施方案中,该方法包括28天周期,其中利妥昔单抗在每一28天周期的第1天以 $375\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量施用,苯达莫司汀在第2天和第3天以 $90\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量静脉内施用,且艾维路单抗在每一28天周期的第2天和第15天或第16天以 $10\text{mg}/\text{kg}$ 的剂量施用。在一些实施方案中,该方法包括28天周期,其中利妥昔单抗在每一28天周期的第1天以 $375\text{mg}/\text{m}^2$ 的剂量施用,苯达莫司汀在第1天和第2天以 $90\text{mg}/\text{m}^2$

的剂量静脉内施用,且艾维路单抗在每一28天周期的第2天和第15天或第16天以10mg/kg的剂量施用。在一些实施方案中,在第2天,在苯达莫司汀施用之后至少3小时施用艾维路单抗。在一些实施方案中,在第2天,在苯达莫司汀施用之后约30分钟施用艾维路单抗。在一些实施方案中,在第2天,在苯达莫司汀施用之后约60分钟施用艾维路单抗。

[0161] 在本发明的另一个方面,本发明提供用于治疗受试者中的癌症的方法,其包括给受试者施用组合疗法,其包含PD-L1拮抗剂和化学放射疗法。

[0162] 组合疗法也可包含一种或多种其他治疗剂。该其他治疗剂可以是例如除VEGR抑制剂以外的化学治疗剂、生物治疗剂(包括但不限于针对VEGF、EGFR、Her2/neu、其他生长因子受体、CD40、CD-40L、CTLA-4和ICOS的抗体)、免疫原性剂(例如灭活的癌细胞、肿瘤抗原、抗原递呈细胞(诸如用肿瘤衍生的抗原或核酸脉冲的树突状细胞)、免疫刺激细胞因子(例如IL-2、IFN $\alpha$ 2、GM-CSF)、嵌合抗原受体(CAR)-T细胞和用编码免疫刺激细胞因子(诸如但不限于GM-CSF)的基因转染的细胞)。

[0163] 化学治疗剂的实例包括烷化剂,诸如塞替哌(thiotepa)和环磷酰胺(cyclophosphamide);烷基磺酸酯(alkyl sulfonates)诸如白消安(busulfan)、英丙舒凡(improsulfan)和哌泊舒凡(piposulfan);氮丙啶类(aziridines)诸如苯佐替派(benzodopa)、卡波醌(carboquone)、美妥替哌(meturedopa)和乌瑞替哌(uredopa);乙撑亚胺类(ethylenimines)和甲基蜜胺类(methylamelamines),包括六甲蜜胺(altretamine)、曲他胺(triethylenemelamine)、三亚乙基磷酰胺(triethylenephosphoramidate)、三亚乙基硫代磷酰胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲基蜜胺(trimethylolomelamine);多聚乙酰类(acetogenins)(特别是布拉他辛(bullatacin)和布拉他辛酮(bullatacinone));喜树碱(camptothecin)(包括合成的类似物托泊替康(topotecan));苔藓抑素(bryostatin);callystatin;CC-1065(包括其阿多来新(adozelesin)、卡折来新(carzelesin)和比折来新(bizelesin)合成类似物);隐藻素类(cryptophycins)(特别是隐藻素1和隐藻素8);多拉司他汀(dolastatin);倍癌霉素(duocarmycin)(包括合成的类似物、KW-2189和CB1-TMI);艾槽素(eleutherobin);pancratistatin;匍枝珊瑚醇(sarcodictyin);海绵素(spongistatin);氮芥类(nitrogen mustards)诸如苯丁酸氮芥(chlorambucil)、萘氮芥(chlornaphazine)、胆磷酰胺(cholophosphamide)、雌莫司汀(estramustine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、二氯甲基二乙胺(mechlorethamine)、盐酸氧二氯甲基二乙胺(mechlorethamine oxide hydrochloride)、美法仑(melphalan)、新恩比兴(novembichin)、苯芥胆甾醇(phenesterine)、泼尼莫司汀(prednimustine)、曲磷胺(trofosfamide)、乌拉莫司汀(uracil mustard);亚硝基脲类(nitrosureas)诸如卡莫司汀(carmustine)、氯脲菌素(chlorozotocin)、福莫司汀(fotemustine)、洛莫司汀(lomustine)、尼莫司汀(nimustine)和雷莫司汀(ranimustine);抗生素诸如烯二炔类(enediyne)抗生素(例如加利车霉素(calicheamicin),尤其是加利车霉素 $\gamma$ 1I和加利车霉素 $\phi$ 1I(参见例如Angew,Chem.Intl.Ed.Engl.33:183-186(1994)));烯二炔萜环类抗生素(dynemicin),包括烯二炔萜环类抗生素A;双膦酸盐,诸如氯屈膦酸盐(clodronate);埃斯波霉素(esperamicin);以及新制癌菌素(neocarzinostatin)生色团和相关色素蛋白烯二炔类抗生素生色团)、阿克拉霉素(aclacinomysins)、方文线菌素(actinomycin)、安曲霉素(anthramycin)、偶氮丝氨酸(azaserine)、博来霉素(bleomycins)、放线菌素C

(cactinomycin)、carabycin、洋红霉素(caminomycin)、嗜癌霉素(carzinophilin)、色霉素(chromomycins)、放线菌素D(dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸(6-diazo-5-oxo-L-norleucine)、多柔比星(doxorubicin)(包括吗啉代多柔比星(morpholino-doxorubicin)、氰基吗啉代多柔比星(cyanomorpholino-doxorubicin)、2-吡咯啉-多柔比星(2-pyrrolino-doxorubicin)和脱氧多柔比星(deoxydoxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、依索比星(esorubicin)、伊达比星(idarubicin)、马塞罗霉素(marcellomycin)、丝裂霉素类(mitomycins)诸如丝裂霉素C、霉酚酸(mycophenolic acid)、诺拉霉素(nogalamycin)、橄榄霉素(olivomycins)、培洛霉素(peplomycin)、紫菜霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素(puromycin)、三铁阿霉素(quelamycin)、罗多比星(rodorubicin)、链黑霉素(streptonigrin)、链佐星(streptozocin)、杀结核菌素(tubercidin)、乌苯美司(ubenimex)、净司他丁(zinostatin)、佐柔比星(zorubicin);抗代谢物诸如甲氨喋呤(methotrexate)和5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)(5-FU);叶酸类似物诸如二甲叶酸(denopterin)、甲氨喋呤、喋罗呤(pteropterin)、三甲曲沙(trimetrexate);嘌呤类似物诸如氟达拉滨(fludarabine)、6-巯嘌呤(6-mercaptopurine)、硫咪嘌呤(thiamiprine)、硫鸟嘌呤(thioguanine);嘧啶类似物诸如安西他滨(ancitabine)、6-氮尿苷(6-azauridine)、卡莫氟(carmofur)、阿糖胞苷(cytarabine)、双脱氧尿苷(dideoxyuridine)、去氧氟尿苷(doxifluridine)、依诺他滨(enocitabine)、氟尿苷(floxuridine);雄激素类,诸如卡鲁睾酮(calusterone)、丙酸屈他雄酮(dromostanolone propionate)、环硫雄醇(epitiostanol)、美雄烷(mepitiostane)、睾内酯(testolactone);抗肾上腺素药类(anti-adrenals)诸如氛鲁米特(aminogluthetamide)、米托坦(mitotane)、曲洛司坦(trilostane);叶酸补偿剂诸如亚叶酸(folinic acid);醋葡醛内酯(aceglatone);醛磷酰胺糖苷(aldophosphamide glycoside);氨基酮戊酸(aminolevulinic acid);恩尿嘧啶(eniluracil);安吡啶(amsacrine);bestrabucil;比生群(bisantrene);依达曲沙(edatraxate);defofamine;秋水仙胺(demecolcine);地吡醌(diaziquone);elformithine;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);氯尼达明(lonidamine);美登木素生物碱类(maytansinoids)诸如美登素(maytansine)和安丝菌素(ansamitocins);米托胍脲(mitoguazone);米托蒽醌(mitoxantrone);莫哌达醇(mopidamol);尼曲吡啶(nitracrine);喷司他丁(pentostatin);异丙嗪(phenamet);吡柔比星(pirarubicin);洛索蒽醌(losoxantrone);鬼臼酸(podophyllinic acid);2-乙基酰肼(2-ethylhydrazide);丙卡巴肼(procarbazine);雷佐生(razoxane);利索新(rhizoxin);西佐喃(sizofuran);锗螺胺(spirogermanium);细交链孢菌酮酸(tenuazonic acid);三亚胺醌(triaziquone);2,2',2''-三氯三乙胺(2',2'',2''-trichlorotriethylamine);单端孢霉烯族化合物(trichothecenes)(特别是T-2毒素、verracurin A、杆孢菌素A(roridin A)和蛇形菌素(anguidine));乌拉坦(urethan);长春地辛(vindesine);达卡巴嗪(dacarbazine);甘露莫司汀(mannomustine);二溴甘露醇(mitobronitol);二溴卫矛醇(mitolactol);哌泊溴烧(pipobroman);gacytosine;阿糖胞苷(arabinoside)("Ara-C");环磷酰胺(cyclophosphamide);塞替哌(thiotepa);紫杉烷类化合物(taxoids),例如紫杉醇

(paclitaxel) 和多西他塞 (docetaxel); 苯丁酸氮芥 (chlorambucil); 吉西他滨 (gemcitabine); 6-硫鸟嘌呤 (6-thioguanine); 巯嘌呤 (mercaptapurine); 甲氨嘌呤; 铂类似物诸如卡铂 (carboplatin); 长春碱 (vinblastine); 铂; 依托泊苷 (etoposide) (VP-16); 异环磷酰胺 (ifosfamide); 米托蒽醌 (mitoxantrone); 长春新碱 (vincristine); 长春瑞滨 (vinorelbine); 诺安托 (novantrone); 替尼泊苷 (teniposide); 依达曲沙 (edatrexate); 道诺霉素 (daunomycin); 氨基嘌呤 (aminopterin); 希罗达 (xeloda); 伊班膦酸盐 (ibandronate); CPT-11; 拓扑异构酶抑制剂 RFS 2000; 二氟甲基鸟氨酸 (difluoromethylornithine) (DMFO); 维甲类 (retinoids) 诸如视黄酸 (retinoic acid); 卡培他滨 (capecitabine); 和任何上述物质的药学上可接受的盐、酸或衍生物。还包括用于调节或抑制对肿瘤的激素作用的抗激素剂, 诸如抗雌激素和选择性雌激素受体调节剂 (SERM), 包括例如他莫昔芬 (tamoxifen)、雷洛昔芬 (raloxifene)、屈洛昔芬 (droloxifene)、4-羟基他莫昔芬、曲沃昔芬 (trioxifene)、keoxifene、LY117018、奥那司酮 (onapristone) 和托瑞米芬 (toremifene) (Fareston); 抑制芳香酶的芳香酶抑制剂, 其调节肾上腺中的雌激素产生, 诸如4(5)-咪唑类、氨鲁米特 (aminoglutethimide)、乙酸甲地孕酮 (megestrol acetate)、依西美坦 (exemestane)、福美司坦 (formestane)、法屈唑 (fadrozole)、伏罗唑 (vorozole)、来曲唑 (letrozole) 和阿那曲唑 (anastrozole); 和抗雄激素类, 诸如氟他胺 (flutamide)、尼鲁胺 (nilutamide)、比卡鲁胺 (bicalutamide)、亮丙瑞林 (leuprolide) 和戈舍瑞林 (goserelin); 和以上中的任一种的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0164] 根据标准药物实践, 本发明的组合疗法中的各治疗剂可单独或在包含治疗剂和一种或多种药学上可接受的载体、赋形剂和稀释剂的药剂 (在本文中也称为药物组合物) 中施用。

[0165] 本发明的组合疗法中的各治疗剂可同时 (即在同一药剂中)、并行 (即在以任何顺序在施用一种之后立即施用另一种的单独药剂中) 或以任何顺序依次施用。当组合疗法中的治疗剂呈不同剂型 (一种药剂为片剂或胶囊且另一药剂为无菌液体) 和/或以不同给药时间表施用, 例如化学治疗剂至少每天施用而生物治疗剂不太频繁地施用, 诸如每周一次、每两周一次或每三周一次时, 依次施用是特别有用的。

[0166] 在一些实施方案中, 在PD-L1拮抗剂施用之前施用VEGFR抑制剂或抗4-1BB抗体, 而在其他实施方案中, 在PD-L1拮抗剂施用之后施用VEGFR抑制剂或抗4-1BB抗体。

[0167] 在一些实施方案中, 组合疗法中的至少一种治疗剂使用当该药剂用作治疗相同癌症的单一疗法时典型地使用的相同剂量方案 (治疗的剂量、频率和持续时间) 施用。在其他实施方案中, 患者接受的组合疗法中的至少一种治疗剂的总量低于当该药剂用作单一疗法时, 例如较小的剂量、较低的给药频率和/或较短的给药时长。

[0168] 本发明的组合疗法中的各小分子治疗剂可口服或肠胃外施用, 包括静脉内、肌肉内、腹膜内、皮下、经直肠、局部和经皮施用途径。

[0169] 本发明的组合疗法可在手术移除肿瘤之前或之后使用且可在辐射疗法之前、期间或之后使用。

[0170] 在一些实施方案中, 本发明的组合疗法被施用至先前未经生物治疗剂或化学治疗剂治疗, 即未治疗的患者。在其他实施方案中, 该组合疗法被施用至在使用生物治疗剂或化

学治疗剂的先前疗法之后未能实现持续反应,即经历治疗的患者。

[0171] 本发明的组合疗法典型地用于治疗大到足以通过触诊或通过本领域中众所周知的成像技术(诸如MRI、超声波或CAT扫描)发现的肿瘤。在一些实施方案中,本发明的组合疗法用于治疗具有至少约200mm<sup>3</sup>、300mm<sup>3</sup>、400mm<sup>3</sup>、500mm<sup>3</sup>、750mm<sup>3</sup>或直至1000mm<sup>3</sup>的大小的晚期肿瘤。

[0172] 在一些实施方案中,本发明的组合疗法施用于患有PD-L1表达测试阳性的癌症的人类患者。在一些实施方案中,可在从患者移除的肿瘤样品的FFPE或冷冻组织切片上,在IHC分析法中使用诊断性抗人类PD-L1抗体或其抗原结合片段检测PD-L1表达。典型地,患者的医师会安排诊断性测试来测定在起始用PD-L1拮抗剂和VEGFR抑制剂治疗之前从患者移取的肿瘤组织样品中的PD-L1表达,但预期医师也可在起始治疗之后的任何时间,诸如在完成治疗周期之后,安排首次以及后续诊断性测试。

[0173] 选择用于本发明的组合疗法的剂量方案(在本文中也称为施用方案)取决于几种因素,包括实体的血清或组织周转率、症状的水平、实体的免疫原性和所治疗的受试者中的靶细胞、组织或器官的可接近性。优选地,剂量方案使递送至患者的各治疗剂的量最大化,而同时使得不良反应处于可接受水平。因此,组合中的各生物治疗剂和化学治疗剂的剂量和给药频率部分地取决于特定治疗剂、所治疗癌症的严重水平和患者特征。选择抗体、细胞因子和小分子的适当剂量的指导是可得的。参见例如Wawrzynczak (1996) *Antibody Therapy*, Bios Scientific Pub.Ltd, Oxfordshire, UK; Kresina (编) (1991) *Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis*, Marcel Dekker, New York, NY; Bach (编) (1993) *Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases*, Marcel Dekker, New York, NY; Baert等人 (2003) *New Engl. J. Med.* 348:601-608; Milgrom等人 (1999) *New Engl. J. Med.* 341:1966-1973; Slamon等人 (2001) *New Engl. J. Med.* 344:783-792; Beniaminovitz等人 (2000) *New Engl. J. Med.* 342:613-619; Ghosh等人 (2003) *New Engl. J. Med.* 348:24-32; Lipsky等人 (2000) *New Engl. J. Med.* 343:1594-1602; *Physicians' Desk Reference 2003 (Physicians' Desk Reference, 第57版)*; Medical Economics Company; ISBN:1563634457; 第57版 (November 2002)。适当剂量方案的确定可由临床医师例如使用本领域中已知或疑似影响治疗或被预测会影响治疗的参数或因素来进行,并将取决于例如患者的临床病史(例如前述疗法)、待治疗的癌症的类型和阶段和响应于组合疗法中的一种或多种治疗剂的生物学标记物。

[0174] 本发明的组合疗法中的生物治疗剂可通过连续输注或通过以例如每天、每隔一天、每周三次或每周、两周、三周、每月、每两月一次等时间间隔分剂量施用。总每周剂量一般为至少0.05μg/kg、0.2μg/kg、0.5μg/kg、1μg/kg、10μg/kg、100μg/kg、0.2mg/kg、1.0mg/kg、2.0mg/kg、10mg/kg、25mg/kg、50mg/kg体重或更大。参见例如Yang等人 (2003) *New Engl. J. Med.* 349:427-434; Herold等人 (2002) *New Engl. J. Med.* 346:1692-1698; Liu等人 (1999) *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 67:451-456; Portielji et al. (2000) *Cancer Immunol. Immunother.* 52:133-144。

[0175] 在使用抗人类PD-L1mAb作为组合疗法中的PD-L1拮抗剂的一些实施方案中,给药方案将包括在治疗过程中以1、2、3、5或10mg/kg的剂量以约14天(±2天)或约21天(±2天)或约30天(±2天)的时间间隔施用抗人类PD-L1mAb。

[0176] 在采用抗人类PD-L1mAb作为组合疗法中的PD-L1拮抗剂的其他实施方案中,给药方案将包括以约0.005mg/kg至约10mg/kg的剂量施用抗人类PD-L1mAb,使得患者内的剂量递增。在其他递增剂量实施方案中,剂量之间的时间间隔将逐渐地缩短,例如在第一和第二剂量之间为约30天(±2天)、在第二和第三剂量之间为约14天(±2天)。在某些实施方案中,对于在第二剂量之后的剂量,给药时间间隔将为约14天(±2天)。

[0177] 在某些实施方案中,受试者将施用包含本文所述的任何PD-L1拮抗剂的药剂的静脉内(IV)输注。

[0178] 在一些实施方案中,组合疗法中的PD-L1拮抗剂为艾维路单抗,其以选自以下的剂量静脉内施用:约1mg/kg Q2W(Q2W=每两周一个剂量)、约2mg/kg Q2W、约3mg/kg Q2W、约5mg/kg Q2W、约10mg Q2W、约1mg/kg Q3W(Q3W=每三周一个剂量)、约2mg/kg Q3W、约3mg/kg Q3W、约5mg/kg Q3W和约10mg Q3W。

[0179] 在本发明的一些实施方案中,组合疗法中的PD-L1拮抗剂为艾维路单抗,其在液体药剂中以选自以下的剂量施用:约1mg/kg Q2W、约2mg/kg Q2W、约3mg/kg Q2W、约5mg/kg Q2W、约10mg Q2W、约1mg/kg Q3W、约2mg/kg Q3W、约3mg/kg Q3W、约5mg/kg Q3W和约10mg Q3W。

[0180] 在一些实施方案中,治疗周期在组合治疗的第一天开始且持续2周。在此类实施方案中,组合疗法施用优选持续至少12周(6个治疗周期),更优选持续至少24周且甚至更优选持续至患者实现CR之后至少2周。

[0181] 在一些实施方案中,组合疗法中的4-1BB激动剂包含抗4-1BB单克隆抗体,其包含分别包含SEQ ID NO:18和SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列的重链可变区和轻链可变区,并在液体药剂中以选自以下的剂量施用:1mg/kg Q2W、2mg/kg Q2W、3mg/kg Q2W、5mg/kg Q2W、10mg Q2W、1mg/kg Q3W、2mg/kg Q3W、3mg/kg Q3W、5mg/kg Q3W和10mg Q3W。在一些实施方案中,抗4-1BB单克隆抗体以液体药剂形式施用,且通过静脉内输注在约60分钟时段内施用所选择剂量的药剂。

[0182] 在一些实施方案中,抗4-1BB单克隆抗体以约0.6mg/kg Q4W的起始剂量施用且艾维路单抗以10mg/kg Q2W的起始剂量施用,且如果患者不耐受起始剂量组合,则艾维路单抗的剂量降低至5mg/kg Q2W和/或抗4-1BB单克隆抗体的剂量降低至0.3mg/kg Q4W。

[0183] 在一些实施方案中,选择用于用本发明的组合疗法治疗的患者是已诊断患有具有显著透明细胞亚型的晚期RCC且原发性肿瘤已切除的患者。在一些实施方案中,患者未接受用于晚期RCC的先前全身性疗法。

[0184] 本发明还提供包含如上文所述的PD-L1拮抗剂和药学上可接受的赋形剂的药剂。当PD-L1拮抗剂为生物治疗剂,例如mAb时,该拮抗剂可在CHO细胞中使用常规细胞培养和回收/纯化技术产生。

[0185] 在一些实施方案中,包含抗PD-L1抗体作为PD-L1拮抗剂的药剂可以液体制剂的形式提供,或通过使用之前用注射用无菌水重构冻干粉末来制备。

[0186] 本发明还提供一种药剂,其包含阿西替尼和药学上可接受的赋形剂。

[0187] 本文所述的抗PD-L1和VEGFR抑制剂药剂可以作为包含第一容器和第二容器和包装插页的试剂盒提供。第一容器含有至少一个剂量的包含抗PD-L1拮抗剂的药剂,第二容器含有至少一个剂量的包含VEGFR抑制剂的药剂,且包装插页或标签包含关于使用药剂治疗

患者癌症的说明书。第一和第二容器可包含相同或不同形状(例如小瓶、注射器和瓶子)和/或材料(例如塑料或玻璃)。该试剂盒可进一步包含可用于施用药剂的其他材料,诸如稀释剂、过滤器、IV袋和管路、针和注射器。在该试剂盒的一些实施方案中,抗PD-L1拮抗剂是抗PD-L1抗体且说明书表明所述药剂意欲用于治疗患有通过IHC分析测试PD-L1表达阳性的癌症的患者。

[0188] 本文所述的抗PD-L1抗体和抗4-1BB抗体药剂可以作为包含第一容器和第二容器和包装插页的试剂盒提供。第一容器含有至少一个剂量的包含抗PD-L1拮抗剂的药剂,第二容器含有至少一个剂量的包含抗4-1BB抗体的药剂,且包装插页或标签包含关于使用药剂治疗患者癌症的说明书。第一和第二容器可包含相同或不同形状(例如小瓶、注射器和瓶子)和/或材料(例如塑料或玻璃)。该试剂盒可进一步包含可用于施用所述药剂的其他材料,诸如稀释剂、过滤器、IV袋和管路、针和注射器。在该试剂盒的一些实施方案中,抗PD-L1拮抗剂为抗PD-L1抗体且说明书表明所述药剂意欲用于治疗患有通过IHC分析测试PD-L1表达阳性的癌症的患者。

[0189] 本文所述的抗PD-L1抗体和CD20拮抗剂药剂可以作为包含第一容器和第二容器和包装插页的试剂盒提供。第一容器含有至少一个剂量的包含抗PD-L1拮抗剂的药剂,第二容器含有至少一个剂量的包含CD20拮抗剂的药剂,且包装插页或标签包含关于使用药剂治疗患者癌症的说明书。第一和第二容器可包含相同或不同形状(例如小瓶、注射器和瓶子)和/或材料(例如塑料或玻璃)。该试剂盒可进一步包含可用于施用所述药剂的其他材料,诸如稀释剂、过滤器、IV袋和管路、针和注射器。在该试剂盒的一些实施方案中,抗PD-L1拮抗剂为抗PD-L1抗体且说明书表明所述药剂意欲用于治疗患有通过IHC分析测试PD-L1表达阳性的癌症的患者。

[0190] 本发明的这些和其他方面,包括下文所列举的示例性具体实施方案将根据本文含有的教导而显而易见。

[0191] III. 通用方法

[0192] Sambrook, Fritsch和Maniatis (1982&1989第2版,2001第3版) *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Sambrook and Russell (2001) *Molecular Cloning*, 第3版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Wu (1993) *Recombinant DNA*, Vol. 217, Academic Press, San Diego, CA) 描述分子生物学中的标准方法。标准方法还见于 Ausubel等人 (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vols. 1-4, John Wiley and Sons, Inc., New York, NY, 其描述细菌细胞和DNA诱变中的克隆(卷1)、哺乳动物细胞和酵母中的克隆(卷2)、糖缀合物和蛋白表达(卷3)和生物信息(卷4)。

[0193] 描述用于蛋白纯化的方法,包括免疫沉淀、色谱、电泳、离心和结晶 (Coligan等人 (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 1, John Wiley and Sons, Inc., New York)。描述化学分析、化学修饰、翻译后修饰、融合蛋白的产生、蛋白的糖基化(参见例如 Coligan等人 (2000) *Current Protocols in Protein Science*, Vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., New York; Ausubel等人 (2001) *Current Protocols in Molecular Biology*, Vol. 3, John Wiley and Sons, Inc., NY, NY, pp. 16.0.5-16.22.17; Sigma-Aldrich, Co. (2001) *Products for Life Science Research*, St. Louis, MO; pp. 45-89; Amersham

Pharmacia Biotech (2001) BioDirectory, Piscataway, N.J., pp.384-391)。描述多克隆和单克隆抗体的产生、纯化和片段化 (Coligan 等人 (2001) Current Protocols in Immunology, Vol.1, John Wiley and Sons, Inc., New York; Harlow 和 Lane (1999) Using Antibodies, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Harlow and Lane, 上文)。可获得用于表征配体/受体相互作用的标准技术 (参见例如 Coligan 等人, Current Protocols in Immunology, Vol.4, John Wiley, Inc., New York)。

[0194] 可制备单克隆、多克隆和人源化抗体 (参见例如 Sheperd 和 Dean (编) (2000) Monoclonal Antibodies, Oxford Univ. Press, New York, NY; Kontermann 和 Dubel (编) (2001) Antibody Engineering, Springer-Verlag, New York; Harlow and Lane (1988) Antibodies A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, pp.139-243; Carpenter 等人 (2000) J. Immunol. 165:6205; He 等人 (1998) J. Immunol. 160:1029; Tang 等人 (1999) J. Biol. Chem. 274:27371-27378; Baca 等人 (1997) J. Biol. Chem. 272:10678-10684; Chothia 等人 (1989) Nature 342:877-883; Foote 和 Winter (1992) J. Mol. Biol. 224:487-499; 美国专利号 6,329,511)。

[0195] 人源化的替代性方法是使用转基因小鼠中在噬菌体或人类抗体文库上展示的人类抗体文库 (Vaughan 等人 (1996) Nature Biotechnol. 14:309-314; Barbas (1995) Nature Medicine 1:837-839; Mendez 等人 (1997) Nature Genetics 15:146-156; Hoogenboom and Chames (2000) Immunol. Today 21:371-377; Barbas 等人 (2001) Phage Display: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York; Kay 等人 (1996) Phage Display of Peptides and Proteins: A Laboratory Manual, Academic Press, San Diego, CA; de Bruin 等人 (1999) Nature Biotechnol. 17:397-399)。

[0196] 抗原的纯化不是抗体产生所必需。动物可用携带相关抗原的细胞免疫。然后可从免疫的动物分离脾细胞,且脾细胞可与骨髓瘤细胞系融合以产生杂交瘤 (参见例如 Meyaard 等人 (1997) Immunity 7:283-290; Wright 等人 (2000) Immunity 13:233-242; Preston 等人, 上文; Kaithamana 等人 (1999) J. Immunol. 163:5157-5164)。

[0197] 抗体可缀合至例如小药物分子、酶、脂质体、聚乙二醇 (PEG)。抗体可用于治疗性、诊断性、试剂盒或其他目的,且包括与例如染料、放射性同位素、酶或金属 (例如胶态金) 偶联的抗体 (参见例如 Le Doussal 等人 (1991) J. Immunol. 146:169-175; Gibellini 等人 (1998) J. Immunol. 160:3891-3898; Hsing and Bishop (1999) J. Immunol. 162:2804-2811; Everts 等人 (2002) J. Immunol. 168:883-889)。

[0198] 可获得用于流式细胞术 (包括荧光活化细胞分选 (FACS)) 的方法 (参见例如 Owens 等人 (1994) Flow Cytometry Principles for Clinical Laboratory Practice, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ; Givan (2001) Flow Cytometry, 第2版; Wiley-Liss, Hoboken, NJ; Shapiro (2003) Practical Flow Cytometry, John Wiley and Sons, Hoboken, NJ)。可获得用作例如诊断剂的适用于修饰核酸 (包括核酸引物和探针、多肽和抗体) 的荧光试剂 (Molecular Probes (2003) Catalogue, Molecular Probes, Inc., Eugene, OR; Sigma-Aldrich (2003) Catalogue, St. Louis, MO)。

[0199] 描述免疫系统的组织学的标准方法 (参见例如 Muller-Harmelink (编) (1986) Human Thymus: Histopathology and Pathology, Springer Verlag, New York, NY; Hiatt 等

人(2000)Color Atlas of Histology,Lippincott,Williams,and Wilkins,Phila,PA; Louis等人(2002)Basic Histology:Text and Atlas,McGraw-Hill,New York,NY)。

[0200] 可获得用于测定例如抗原片段、前导序列、蛋白折叠、功能性结构域、糖基化位点和序列比对的软件包和数据库(参见例如GenBank,Vector NTI® Suite (Informax, Inc, Bethesda,MD);GCG Wisconsin Package (Accelrys,Inc.,San Diego,CA); DeCypher® (TimeLogic Corp.,Crystal Bay,Nevada);Menne等人(2000)Bioinformatics 16:741-742;Menne等人(2000)Bioinformatics Applications Note 16:741-742;Wren等人(2002)Comput.Methods Programs Biomed.68:177-181;von Heijne(1983)Eur.J.Biochem.133:17-21;von Heijne(1986)Nucleic Acids Res.14:4683-4690)。

#### IV. 实施例

[0201] 实施例1:使用艾维路单抗和阿西替尼的组合治疗

[0202] 本实施例说明用于评估先前未治疗的晚期肾细胞癌(aRCC)患者中艾维路单抗(MSB0010718C)和阿西替尼(AG-013736)的组的安全性、功效、药代动力学和药效动力学的临床试验研究。

[0203] 该研究是开放标记、多中心、多剂量试验,其被设计以估计最大耐受剂量(MTD)且选择艾维路单抗(MSB0010718C)和阿西替尼(AG-013736)的组推荐的2期剂量(RP2D)。一旦估计与阿西替尼组合施用的艾维路单抗的MTD(剂量发现部分),将开放剂量扩展阶段以在安全性概况、抗肿瘤活性、药代动力学、药效动力学和生物学标记物调节来进一步表征该组合。方案设计记载于表4中。

[0204] 剂量发现阶段将使用修改的毒性机率间隔(mTPI)方法骨架具有透明细胞组织学的aRCC患者中的MTD和RP2D,所述患者未接受晚期疾病的先前全身疗法。剂量发现将遵循“上和下(Up-and-Down)”设计,其中测试最多达4种潜在剂量水平(DL),如表4中所示。

[0205] 剂量发现阶段将为aRCC患者鉴定到艾维路单抗和阿西替尼的组的扩展测试剂量,所述患者未接受用于其晚期疾病的先前全身疗法。扩展测试剂量将是MTD(即与<33%患者中出现DLT相关的艾维路单抗和阿西替尼的最高剂量)或RP2D,即由研究者和发起人声明安全且可耐受的最高测试剂量。一旦鉴定到扩展测试剂量,将开放剂量扩展阶段,并将在最多达约20-40名先前未治疗的aRCC患者中评估艾维路单抗和阿西替尼的组合。

[0206] 表4

组	指定的干预
[0207] 剂量发现阶段	组 1: 艾维路单抗 10 mg/kg IV Q2W; 阿西替尼 5 mg 口服 BID
	组 2: 艾维路单抗 5 mg/kg IV Q2W; 阿西替尼 5 mg 口服 BID
	组 3: 艾维路单抗 10 mg/kg IV Q2W; 阿西替尼 3 mg 口服 BID
	组 4: 艾维路单抗 5 mg/kg IV Q2W; 阿西替尼 3 mg 口服 BID
剂量扩展阶段	组 1: 艾维路单抗 10 mg/kg IV Q2W; 阿西替尼 5 mg 口服 BID
	组 2: 艾维路单抗 5 mg/kg IV Q2W; 阿西替尼 5 mg 口服 BID
	组 3: 艾维路单抗 10 mg/kg IV Q2W; 阿西替尼 3 mg 口服 BID
	组 4: 艾维路单抗 5 mg/kg IV Q2W; 阿西替尼 3 mg 口服 BID

[0208] 纳入标准:组织学或细胞学确认具有透明细胞组分的晚期RCC。原发性肿瘤已切除。必须有来自原发性肿瘤切除样品的福尔马林固定、石蜡包埋的(FFPE)存档肿瘤组织块

(所有患者)。仅对于扩展组群,除非进入研究时在6个月内已进行,否则必须自局部复发性或转移性病灶重新进行肿瘤活检,且患者未接受过干预性全身抗癌治疗。如RECIST版本1.1所定义的至少一个可测量病灶。年龄 $\geq 18$ 岁。东部肿瘤协作组(Eastern Cooperative Oncology Group; ECOG)表现状态0或1。骨髓功能、肾和肝功能良好。

[0209] 入选剂量发现阶段的患者的数目将取决于所观察到的安全性概况和所测试的剂量水平的数量。计划最多达约55名患者(包括剂量发现阶段和剂量扩展阶段)入选该研究。

[0210] 研究治疗:依照连续给药时间表每天两次(BID)口服(PO)施用阿西替尼(与或不与食物一起服用)。艾维路单抗将每两周一次(Q2W)以1小时静脉内输注(IV)的形式施用。在所有患者中,用研究药物进行的治疗可持续直至确认疾病进展、患者拒绝、患者不再随诊、不可接受的毒性或由发起人终止研究(无论哪个首先发生)。

[0211] 为了缓和艾维路单抗输注相关的反应,可在艾维路单抗的每次给药之前约30至60分钟给予静脉施用25至50mg或口服等效剂量的苯海拉明(diphenhydramine)以及静脉施用650mg或口服等效剂量的乙酰氨基酚/扑热息痛(paracetamol)(根据当地实践)的预处理用药方案。这可根据需要基于当地治疗标准和指南而变化。

[0212] 肿瘤评估:将使用RECIST版本1.1以6周间隔通过放射学肿瘤评估来评估抗肿瘤活性。至少在初始记录之后4周重复成像以确认完全和部分反应。在入选该研究起1年之后,进行肿瘤评估的频率应降低(即以12周间隔)。此外,还将在每当怀疑疾病进展(例如症状恶化)时和在治疗结束/退出时(如果过去6周中未曾进行)进行放射学肿瘤评估。如果放射性成像显示进展性疾病(PD),则应在至少 $>4$ 周之后重复肿瘤评估以确认PD。

[0213] 在基线处和当存在怀疑的脑转移时需要进行脑部计算机化断层成像术(CT)或磁共振成像(MRI)扫描。在基线处需要进行骨扫描(骨闪烁成像术)或<sup>18</sup>氟脱氧葡萄糖-正电子发射断层摄影法/CT(18FDG-PET/CT),然后仅当基线处存在骨转移时才每隔16周进行一次。否则,仅当怀疑新骨转移时才需要骨成像。对于患有骨转移的患者,在确认CR时也需要骨成像。

[0214] 药代动力学/免疫原性评估:将收集PK/免疫原性样品。为了理解艾维路单抗对阿西替尼的PK影响,在研究的剂量发现阶段在所有患者的第1个周期之前以及在剂量扩展阶段在至少8名患者的第1个周期之前,将纳入为期7天的单药剂阿西替尼导入期。因为艾维路单抗具有长半衰期(3-5天),进行导入以研究单独的艾维路单抗的PK是不可行的。因此,通过将阿西替尼存在的情况下艾维路单抗在稳态下的谷浓度与先前研究中所报导的艾维路单抗单独使用时的浓度进行比较,来评估阿西替尼对艾维路单抗的影响。

[0215] 生物学标记物评估:本研究中将进行的生物学标记物分析的关键目标是研究对艾维路单抗与阿西替尼的组的治疗益处具有潜在预测作用的生物学标记物。此外,将进行肿瘤和血液生物学样品的生物学标记物研究以帮助进一步理解艾维路单抗和阿西替尼的组的作用机制,以及潜在抗性机制。

[0216] 对于其鉴定最可能受益于用研究药物进行的治疗的患者的能力,将使用来自存档组织样品和转移性病灶的肿瘤生物学样品来分析候选DNA、RNA或蛋白标记物或相关标记物的特征。可分析的标记物包括但不限于PD-L1表达肿瘤浸润性CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞和T细胞受体基因序列定量。在疾病进展后获得的任意的肿瘤活检样品将用于研究获得性抗性机制。仅粗针活检样品或切除活检样品,或切除标本是合适的。

[0217] 外周血液:除非由地方条例或机构审查委员会 (Institutional Review Board) 或伦理委员会 (Ethics Committee) 的决策禁止, 否则样品将在生物库 (biobank) 中作为全血、血清和血浆保留以用于探索性生物学标记物评估。样品可用于鉴定或表征已知或怀疑与作用机制或对与阿西替尼组合使用的艾维路单抗的抗性发展相关的细胞、DNA、RNA或蛋白标记物。这些包括生物学标记物, 其可辅助鉴定可优先受益于用艾维路单抗和阿西替尼的组合进行的治疗的患者, 包括但不限于与抗肿瘤免疫反应或靶标调节相关的生物学标记物, 诸如可溶性VEGF-A、IL-8、IFN $\gamma$  和/或组织FoxP3、PD-1、PD-L2。每当可能时, 应在给药前和与PK样品同时获得生物学样品。

[0218] 实施例2:用阿西替尼和艾维路单抗vs.舒尼替尼进行的组合治疗

[0219] 本实施例说明临床试验研究, 以评估艾维路单抗 (MSB0010718C) 和阿西替尼 (AG-013736) 的组合的安全性和功效, 和说明在晚期RCC (aRCC) 患者的一线治疗中, 该组合vs. 标准治疗舒尼替尼单药疗法的优越性。苹果酸舒尼替尼 (SUTENT®) 是干细胞受体因子 (KIT)、血小板衍生生长因子-受体 (PDGFR)、VEGFR、神经胶质细胞系神经营养因子受体 (RET) 和FMS样酪氨酸激酶3 (FLT3) 和集落刺激因子受体类型1 (CSF-1R) 的口服多靶标TKI, 在多个国家获批准用于治疗aRCC、伊马替尼抗性或不耐受性胃肠道基质肿瘤 (GIST) 和不可切除性、良好分化的转移性胰腺神经内分泌肿瘤 (NET)。

[0220] 研究是3期、随机、多国、多中心、开放标记、平行两组研究, 其中计划约465名患者随机接受艾维路单抗和阿西替尼的组合或舒尼替尼单药疗法: 组A: 艾维路单抗与阿西替尼的组合; 组B: 舒尼替尼。患者将根据ECOG表现状态 (0vs. 1) 和LDH (>1.5ULN vs.  $\leq$ 1.5ULN) 分类。在组A (艾维路单抗与阿西替尼的组合) 中, 艾维路单抗将在6周周期中每2周一次以1小时静脉内输注 (IV) 的形式施用。阿西替尼将在连续给药时间表中与或不与食物一起每天两次 (BID) 口服 (PO) 施用。

[0221] 用研究药物进行的治疗可持续直至确认疾病进展、患者拒绝、患者不再随诊、不可接受的毒性或由发起人终止研究 (无论哪个首先发生)。可通过给药中断 (伴有或不伴有剂量降低) 来调节阿西替尼治疗。如果符合患者内递增标准, 则可进行患者内阿西替尼剂量递增。

[0222] 研究治疗: 阿西替尼将在连续每天给药时间表中每天两次口服施用。艾维路单抗将在6周周期中每2周一次以1小时静脉内输注的形式施用。舒尼替尼将在4周治疗时间表中每天一次以50mg口服施用, 随后中断2周 (时间表4/2)。在研究治疗中出现疾病进展, 但以其他方式继续从研究治疗获得临床益处的患者将有资格继续使用艾维路单抗和阿西替尼的组合, 或单剂艾维路单抗, 或单剂阿西替尼, 或单剂舒尼替尼, 条件是治疗医师已确定如此做的益处/风险是有利的。

[0223] 肿瘤评估: 抗肿瘤活性将通过放射学肿瘤评估来评估并将基于第一和第二终点的RECIST指南版本1.1以及用于探索性终点的免疫相关RECIST (irRECIST) 指南。将在从第一剂量疗法起长达1年内每6周一次 (Q6W) 进行肿瘤评估; 随后, 将每2个周期一次进行肿瘤评估。此外, 还将在怀疑疾病进展 (例如症状性恶化) 时、在治疗结束/退出随访时 (如果过去6周中未曾进行) 和在短期随诊期间 (仅在90天随访时) 进行放射学肿瘤评估; 可在不存在撤回同意书的情况下收集在长期随诊期间之后续肿瘤评估 (与后续抗癌疗法的起始无关)。

[0224] 肿瘤评估将包括所有已知或怀疑疾病位点。成像可包括胸部、腹部和骨盆CT或MRI

扫描;脑部CT或MRI扫描(在基线处和当怀疑脑部转移时需要)和骨扫描或<sup>18</sup>F-FDG PET(在基线处需要,然后仅当基线处存在骨转移时才每16周进行)。否则,仅当怀疑新的骨转移时在确认具有骨转移的患者有完全反应时才需要骨成像。除非由于医学原因而限制,否则应用造影剂进行CT扫描。在以下肿瘤评估中将使用用于表征各鉴定和报导的病灶相同的成像技术。抗肿瘤活性将通过放射学肿瘤评估法来评估,其在基线处、在疗法的第一剂量之后6周、然后在从疗法的第一剂量起长达1年内每6周一次且随后每12周一次(如果过去6周中未曾进行)和在短期随诊期间(仅在第90天随访时)进行;可在不存在撤回同意书的情况下收集在长期随诊期间的后续肿瘤评估(与后续抗癌疗法的起始无关)。可在有临床指示(例如怀疑PD、症状恶化等)时在任何时间进行其他成像评估。将使用RECIST版本1.1和根据免疫相关反应标准(irRC)(Nishino2013)进行反应评估。将收集所有放射性图像且可通过BICR独立第三方核心成像实验室客观地验证。

[0225] 第一终点:如根据RECIST v1.1通过盲式独立中心审核(BICR)评估的无进展存活期(PFS)。第二终点:总体存活期(OS);客观肿瘤反应率(OR),如根据RECIST版本1.1通过BICR评估;疾病控制(DC),如:根据RECIST版本1.1通过BICR评估;至事件的时间:至反应的时间(TTR)、反应持续时间(DR);不良事件(AE),如由类型、频率、严重度(如由国家癌症学会常用不良事件术语标准(National Cancer Institute Common Terminology Criteria for Adverse Events;NCI CTCAE v.4.03)分级)、时机、严重性和与研究疗法的相关性所表征;实验室异常,如由类型、频率、严重度(如由NCI CTCAE v.4.03分级)和时机表征;PK参数,包括艾维路单抗的谷浓度(C<sub>trough</sub>)以及阿西替尼的谷浓度(C<sub>trough</sub>)和最大浓度(C<sub>max</sub>);肿瘤组织生物学标记物状态(即阳性或阴性;基于例如肿瘤浸润性CD8<sup>+</sup>T淋巴细胞的PD-L1表达和/或定量,如通过免疫组织化学评估);生物学标记物阳性和生物学标记物阴性亚组中临床结果(PFS、OS、OR、DCR、DR和TTR)的量度;当与阿西替尼组合时,艾维路单抗的抗药物抗体(ADA;中和抗体);患者报导的结果(PRO):FACT-肾脏症状指数(FKSI-19),EuroQol 5Dimension(EQ5D)。

[0226] 实施例3:用抗4-1BB抗体和艾维路单抗的组合作用

[0227] 本实施例说明在鼠B16F10黑色素瘤和MC38结肠癌模型中,抗4-1BB抗体与艾维路单抗组合疗法的治疗活性。

[0228] 从Jackson Laboratories购买六(6)至8周龄雌性C57BL/6小鼠。所有动物在Rinat在无病原体饲养机构中圈养且根据符合机构动物护理和使用委员会(Institutional Animal Care and Use Committee;IACUC)指南的方案进行实验。

[0229] 从美国典型培养物保藏中心(ATCC)购买B16F10黑色素瘤细胞系。MC38结肠癌细胞系由University of California,Los Angeles,CA的Antoni Ribas博士友好提供。细胞在补充有10%胎牛血清(FBS)、2mM L-谷氨酰胺的Dulbecco氏改良Eagle氏培养基(DMEM)中,在37°C和5%二氧化碳(CO<sub>2</sub>)下培养,并在研究动物诊断实验室(Research Animal Diagnostic Laboratory;RADIL)(Columbia,MO)进行针对病原体的IMPACT测试。收获在指数生长期中生长的无病原体细胞并用于肿瘤接种。

[0230] 用于细胞表面或细胞内染色的抗体购自BD Biosciences或eBioscience。其为大鼠抗小鼠CD4-PerCP-Cy5.5(克隆RM4-5,BD Biosciences)、大鼠抗小鼠CD8a-APC-H7(克隆53-6.7,BD Biosciences)、大鼠抗小鼠CD25-PE-Cy7(克隆PC61,BD Biosciences)、大鼠抗

小鼠CD45-BV510(克隆30-F11, BD Biosciences)、大鼠抗小鼠CD90.2-FITC(克隆53-2.1, BD Biosciences)、大鼠抗小鼠Eomes-PE(克隆: Dan11mag, eBioscience)、大鼠抗小鼠FoxP3-eFluor450(克隆FJK-16s, eBioscience)和大鼠抗小鼠NKp46-BV421或-AF647(克隆29A1.4, BD Biosciences)。使用LIVE/DEAD Fixable Blue Dead Cell Stain Kit(Invitrogen)将活细胞与死细胞分离。

[0231] 内部制备来源于亲本克隆MAB9371(R&D Systems)的治疗性小鼠抗小鼠4-1BB mAb(小鼠免疫球蛋白G1[mIgG1])。艾维路单抗由Merck Serono提供。从BioXcell购买同种型对照mIgG1(克隆:MOPC-21)。内部制备人类IgG1。抗4-1BB和艾维路单抗分别在磷酸盐缓冲盐水(PBS)(Life Technologies)中稀释至0.1mg/mL和1mg/mL的浓度,且以每隔3至4天3个剂量的形式在每只小鼠腹膜内(ip)以0.2mL给药。

[0232] C57BL/6小鼠在右侧用 $0.2 \times 10^6$ 个B16F10或 $0.5 \times 10^6$ 个MC38细胞/0.1mL无血清DMEM皮下接种。当肿瘤达到目标大小时,将小鼠随机化至处理组中。治疗在随机化的同一天开始。使用卡尺以2维每周两次测量肿瘤大小,且体积使用式 $V=0.5L \times W^2$ 以立方毫米表示,其中L为肿瘤的最长直径且W为垂直于L的直径。每周一次记录体重。

[0233] 根据具有修改的制造商方案,使用温和MACS和Miltenyi小鼠解离试剂盒(Miltenyi Biotec)使肿瘤散播性至单细胞悬浮液中。使用铵-氯-钾(ACK)裂解缓冲液(Life Technologies)移除红细胞。细胞用FACS染色缓冲液(补充有2%FBS和0.9%叠氮化钠[ $\text{NaN}_3$ ])的PBS)洗涤两次,且最终再悬浮于FACS染色缓冲液中。

[0234] 将细胞的等分试样与10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的小鼠BD Fc封闭物(BD Biosciences)一起预孵育10分钟,然后添加表型分析mAb以特异性染色免疫细胞。通过在4 $^\circ\text{C}$ 下孵育细胞30分钟来标记细胞表面抗原。在移除未结合的mAb之后,细胞用FACS染色缓冲液洗涤两次,固定于固定缓冲液(PBS+2%FBS+1%多聚甲醛)中,并在黑暗中以4 $^\circ\text{C}$ 下储存,直至通过流式细胞术分析。根据制造商方案使用Foxp3/转录因子染色缓冲液集合(eBioscience)进行细胞内染色。使用LSR Fortessa(BD Biosciences)获得流式细胞术并使用FlowJo(TreeStar Inc.)分析。

[0235] 结果表示为平均值 $\pm$ SEM。使用GraphPad Prism 6.0进行统计分析。应用单向或双向ANOVA以比较相对于同种型对照的多个组中的统计差异。 $P < 0.05$ 被视为显著性差异。

[0236] 使用两种鼠模型来评估抗4-1BB和艾维路单抗的组的治疗功效。在B16F10黑色素瘤模型中,平均起始肿瘤大小为67至78 $\text{mm}^3$ (范围44至114 $\text{mm}^3$ ;  $n=7$ 只动物/组)(表5)。在肿瘤接种后第26天,同种型、单独的抗4-1BB和单独的艾维路单抗组的肿瘤分别达到 $1206 \pm 397\text{mm}^3$ 、 $1979 \pm 425\text{mm}^3$ 和 $2112 \pm 429\text{mm}^3$ 的平均值(表5)。相比之下,在同时向动物施用抗4-1BB和艾维路单抗时观察到显著肿瘤抑制( $341 \pm 146\text{mm}^3$ 的平均值)(vs单独的单药剂组,  $p < 0.0001$ )(表5)。

[0237] 表5. 皮下B16F10黑色素瘤随着时间的肿瘤测量值(平均值 $\pm$ SEM)

天	同种型			抗-4-1BB			艾维路单抗			抗-4-1BB/艾维路单抗		
	平均值	SEM	N	平均值	SEM	N	平均值	SEM	N	平均值	SEM	N
[0238] 13	67	4	7	69	6	7	78	8	7	70	10	7
17	251	109	7	364	87	7	327	78	7	219	57	7
20	475	222	7	725	266	7	654	174	7	272	94	7
24	909	368	7	1511	417	7	1304	274	7	243	106	6
26	1206	397	7	1979	425	7	2112	429	7	341	146	6

[0239] 肿瘤体积以 $\text{mm}^3$ 表示。

[0240] N=各组内的动物数目;SEM=平均值的标准误差。

[0241] 在MC38结肠癌模型中,平均起始肿瘤大小为约 $60\text{mm}^3$ (范围 $41-92\text{mm}^3$ ;n=10只动物/组)(表6)。在研究结束时(肿瘤移植后第23天),同种型、单独的抗4-1BB、单独的艾维路单抗和抗4-1BB抗体/艾维路单抗组合组的平均肿瘤体积分别为 $1177 \pm 252\text{mm}^3$ 、 $1093 \pm 183\text{mm}^3$ 、 $901 \pm 206\text{mm}^3$ 和 $530 \pm 190\text{mm}^3$ (表6)。与同种型对照( $p < 0.001$ )和单独的4-1BB组( $p < 0.01$ )相比,通过组合治疗的肿瘤大小降低是显著的,但与艾维路单抗组相比并非如此( $p > 0.05$ )(表6)。

[0242] 表6. 皮下MC38结肠癌随着时间的肿瘤测量值(平均值 $\pm$ SEM)

天	同种型			抗-4-1BB			艾维路单抗			抗-4-1BB/艾维路单抗		
	平均值	SEM	N	平均值	SEM	N	平均值	SEM	N	平均值	SEM	N
[0243] 7	60	5	10	62	3	10	63	5	10	64	5	10
10	130	21	10	122	15	10	127	19	10	117	13	10
14	357	72	10	250	30	10	254	42	10	146	42	10
16	501	108	10	355	56	10	384	86	10	176	64	10
18	680	148	10	508	76	10	523	114	10	246	93	10
21	987	236	9	785	143	10	714	158	9	416	149	10
23	1177	252	9	1093	183	10	901	206	9	530	190	10

[0244] 肿瘤体积以 $\text{mm}^3$ 表示。

[0245] N=各组内的动物数目;SEM=平均值的标准误差。

[0246] 在处理之后从MC38肿瘤分离肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)且分析与抗肿瘤免疫反应相关的标记物。组合治疗促进T细胞浸润至肿瘤中,平均值达到总体CD45+细胞中的53%,而同种型、单独的抗4-1BB抗体治疗和单独的艾维路单抗组的T细胞频率分别为25%、31%和36%(占CD45+细胞)(图1)。同种型和艾维路单抗组中CD8+T细胞/调节性T细胞(Treg)的比率分别为1.2和2.5。单独的抗4-1BB抗体治疗和与艾维路单抗的组合中的该比率分别增加至10和21(图2)。此外,在单独的抗4-1BB抗体治疗和抗4-1BB与艾维路单抗组合组中观察到Eomes(与效应T细胞/记忆分化相关的标记物)的诱导(图3)。

[0247] 这些结果表明,用抗4-1BB抗体和艾维路单抗的组的治疗具有协同抗肿瘤作用,其伴随有肿瘤中T细胞富集、增加的CD8+T细胞/调节性T细胞(Treg)比率和诱导Eomesodermin(Eomes)表达。此外,组合疗法引发肿瘤微环境中的抗肿瘤免疫反应。

[0248] 实施例4:用艾维路单抗和PF-05082566的组合治疗晚期恶性病

[0249] 本实施例说明在患有局部晚期或转移性实体瘤(例如非小细胞肺癌(NSCLC)、黑色素瘤和鳞状细胞癌(SCCHN))的患者中评估艾维路单抗(MSB0010718C)和PF-05082566(一种抗4-1BB激动剂IgG2抗体)的组的安全性、功效、药代动力学和药效动力学的临床试验研究。方案设计记载于表7中。

[0250] 表7

组	分配的干预
组群 A1: 用 10 mg/kg 艾维路单抗 + 500 mg PF-05082566 治疗的 NSCLC 患者	艾维路单抗 10 mg/kg IV Q2W; PF-05082566 500 mg, IV, 每 4 周一次。用艾维路单抗与 PF-05082566 的组合治疗将继续, 直到疾病进展。
组群 A2: 用 10 mg/kg 艾维路单抗 + 100 mg PF-05082566 治疗的 NSCLC 患者	艾维路单抗 10 mg/kg IV Q2W; PF-05082566 100 mg, IV, 每 4 周一次。用艾维路单抗与 PF-05082566 的组合治疗将继续, 直到疾病进展。
组群 A3: 用 10 mg/kg 艾维路单抗 + 20 mg PF-05082566 治疗的 NSCLC 患者	艾维路单抗 10 mg/kg IV Q2W; PF-05082566 20 mg, IV, 每 4 周一次。用艾维路单抗与 PF-05082566 的组合治疗将继续, 直到疾病进展。
组群 A4: 用 10 mg/kg 艾维路单抗 + 100 mg PF-05082566 治疗的黑色素瘤患者	艾维路单抗 10 mg/kg IV Q2W; PF-05082566 100 mg, IV, 每 4 周一次。用艾维路单抗与 PF-05082566 的组合治疗将继续, 直到疾病进展。
组群 A5: 用 10 mg/kg 艾维路单抗 + 100 mg PF-05082566 治疗的 SCCHN 患者	艾维路单抗 10 mg/kg IV Q2W; PF-05082566 100 mg, IV, 每 4 周一次。用艾维路单抗与 PF-05082566 的组合治疗将继续, 直到疾病进展。

[0252] 实施例5:用艾维路单抗、抗4-1BB抗体和抗M-CSF抗体的组合治疗癌症

[0253] 本实施例说明抗4-1BB抗体、抗M-CSF抗体和抗PD-L1抗体艾维路单抗三重组合疗法在鼠MC38结肠癌模型中的治疗活性。

[0254] 从Jackson Laboratories购买六(6)至8周龄雌性C57BL/6小鼠。所有动物在Rinat在无病原体饲养机构中圈养且根据机构动物护理和使用委员会(IACUC)指南的方案进行实验。

[0255] MC38结肠癌细胞系由California, Los Angeles, CA的Antoni Ribas博士友好提供。细胞在补充有10%胎牛血清(FBS)、2mM L-谷氨酰胺的Dulbecco氏改良Eagle氏培养基(DMEM)中在37℃和5%二氧化碳(CO<sub>2</sub>)下培养,并在研究动物诊断实验室(RADIL)(Columbia, MO)进行针对病原体的IMPACT测试。收获在指数生长期中生长的无病原体细胞并用于肿瘤接种。

[0256] 内部制备来源于亲本克隆MAB9371(R&D Systems)的治疗性小鼠抗小鼠4-1BB mAb(小鼠免疫球蛋白G1[mIgG1])。艾维路单抗由Merck Serono提供。大鼠抗小鼠M-CSF(克隆5A1)、大鼠IgG1(克隆HRPN)和mIgG1(克隆MOPC-21)同种型对照购自BioXcell。内部制备人类IgG1同种型。抗4-1BB、艾维路单抗和抗M-CSF mAb分别在磷酸盐缓冲盐水(PBS)(Life Technologies)中稀释至0.1mg/mL、1mg/mL和1.5mg/mL的浓度,且以每隔3至4天3个剂量的形式在每只小鼠腹膜内(ip)以0.2mL给药。

[0257] C57BL/6小鼠在右侧用0.5-1x 10<sup>6</sup>个MC38细胞/0.1mL DMEM皮下接种。当肿瘤达到

~60mm<sup>3</sup>的平均值(范围41-93mm<sup>3</sup>)时,小鼠随机分成10只动物/组的组群,并在同一天开始处理。使用卡尺以二维测量肿瘤大小,且体积使用式 $V=0.5L \times W^2$ 以mm<sup>3</sup>表示,其中L和W分别为肿瘤的长和短直径。每周一次记录体重。

[0258] 结果表示为平均值±SEM(表8)。使用GraphPad Prism 6.0进行统计分析。应用单向或双向ANOVA以比较相对于同种型对照的多个组中的统计差异。P<0.05被视为显著性差异。

[0259] 表8

[0260]

组 1. 同种型对照			
肿瘤接种后的天数	平均肿瘤大小 (mm <sup>3</sup> )	SEM	N
7	60	5	10
10	130	21	10
14	357	72	10
16	501	108	10
18	680	148	10
21	987	236	9
23	1177	252	9
组 2. 抗-4-1BB 抗体 (1 mg/kg)			
肿瘤接种后的天数	平均肿瘤大小 (mm <sup>3</sup> )	SEM	N
7	62	3	10
10	122	15	10
14	250	30	10
16	355	56	10
18	508	76	10
21	785	143	10
23	1093	183	10
组 3. 抗-M-CSF 抗体 (15 mg/kg)			
肿瘤接种后的天数	平均肿瘤大小 (mm <sup>3</sup> )	SEM	N
7	58	4	10
10	138	27	10
14	196	32	10
16	268	43	10
18	350	56	10
21	432	84	9
23	572	123	9
组 4. 抗-PD-L1 抗体 (艾维路单抗, 10 mg/kg)			
肿瘤接种后的天数	平均肿瘤大小 (mm <sup>3</sup> )	SEM	N

7	63	5	10
10	127	19	10
14	254	42	10
16	384	86	10
18	523	114	10
21	714	158	9
23	901	206	9
组 5. 抗-4-1BB 抗体 (1 mg/kg) + 抗-PD-L1 抗体 (艾维路单抗, 10 mg/kg)			
肿瘤接种后的天数	平均肿瘤大小 (mm <sup>3</sup> )	SEM	N
7	64	5	10
10	117	13	10
14	146	42	10
16	176	64	10
18	246	93	10
21	416	149	10
23	530	190	10
组 6. 抗-M-CSF 抗体 (15 mg/kg) + 抗-PD-L1 抗体 (艾维路单抗, 10 mg/kg)			
肿瘤接种后的天数	平均肿瘤大小 (mm <sup>3</sup> )	SEM	N
7	62	4	10
10	106	10	10
14	182	29	10
16	211	32	9
18	297	65	9
21	436	112	9
23	499	145	9
组 7. 抗-4-1BB 抗体 (1 mg/kg) + 抗-M-CSF 抗体 (15 mg/kg) + 抗-PD-L1 抗体 (艾维路单抗, 10 mg/kg)			
肿瘤接种后的天数	平均肿瘤大小 (mm <sup>3</sup> )	SEM	N
7	61	4	10
10	120	16	10
14	139	15	10
16	145	20	10
18	166	20	10
21	214	28	10
23	277	39	10

[0261]

[0262] 与同种型对照相比,用抗4-1BB抗体、艾维路单抗和抗M-CSF抗体的三重组合治疗延迟MC38肿瘤生长。三重抗体组合(表8,组7)比艾维路单抗和抗4-1BB抗体的双重组合(表8,组5)或艾维路单抗和抗CSF-1抗体的双重组合(表8,组6)更有效。例如,在肿瘤接种后第23天,用艾维路单抗、抗4-1BB抗体和抗CSF-1抗体的三重组合治疗的动物中的肿瘤的平均大小为277mm<sup>3</sup>。相比之下,在第23天,用艾维路单抗和抗4-1BB抗体或艾维路单抗和抗CSF-1抗体的双重组合治疗的动物中的肿瘤的平均大小分别为530mm<sup>3</sup>和499mm<sup>3</sup>。在第23天,给予同种型对照的动物中的肿瘤的平均大小为1177mm<sup>3</sup>。在第23天,给予抗4-1BB抗体的动物中的肿瘤的平均大小为1093mm<sup>3</sup>。在第23天,给予抗CSF-1抗体的动物中的肿瘤的平均大小为572mm<sup>3</sup>。在第23天,给予抗PD-L1抗体(艾维路单抗)的动物中的肿瘤的平均大小为901mm<sup>3</sup>。这些结果表明与单一抗体或双重抗体组合治疗相比,用抗4-1BB抗体、艾维路单抗和抗M-CSF抗体的三重组合的治疗在治疗癌症方面更有效。

[0263] 实施例6:用艾维路单抗、抗4-1BB抗体和抗OX40抗体的组合治疗结肠癌

[0264] 本实施例说明抗PD-L1抗体艾维路单抗、抗4-1BB抗体和抗OX40抗体三重组合疗法在鼠癌症模型中的治疗活性。

[0265] 使用两种鼠模型评估抗OX40抗体、抗4-1BB和艾维路单抗的组合治疗的治疗功效。从Jackson Laboratories购买六(6)至8周龄雌性C57BL/6小鼠或Balb/C小鼠。所有动物在

Rinat在无病原体饲养机构中圈养且根据机构动物护理和使用委员会 (IACUC) 指南的方案进行实验。

[0266] 从美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 购买B16F10黑色素瘤细胞系。MC38结肠癌细胞系由California, Los Angeles, CA的Antoni Ribas博士友好提供。细胞在补充有10%胎牛血清 (FBS)、2mM L-谷氨酰胺的Dulbecco氏改良Eagle氏培养基 (DMEM) 中在37°C和5%二氧化碳 (CO<sub>2</sub>) 下培养。收获在指数生长期中生长的细胞并用于肿瘤接种。

[0267] 内部从亲本克隆OX86获得具有mIgG1或mIgG2a同种型的治疗性小鼠抗OX40抗体 (分别为抗OX40mIgG1和抗OX40mIgG2a)。内部制备来源于亲本克隆MAB9371 (R&D Systems) 的治疗性小鼠抗小鼠4-1BB抗体 (小鼠免疫球蛋白G1 [mIgG1])。艾维路单抗由Merck Serono提供。同种型对照mIgG1 (克隆MOPC-21) 和mIgG2a (C1.18.4) 购自BioXcell。内部制备人类IgG1。抗OX40抗体、抗4-1BB抗体和艾维路单抗在B16F10模型中分别以磷酸盐缓冲盐水 (PBS) (Life Technologies) 中的3mg/kg、1mg/kg和20mg/kg给药,并在MC38模型中分别以磷酸盐缓冲盐水中的1mg/kg、1mg/kg和10mg/kg给药,且以每隔3至4天3个剂量的方式、以腹腔内 (ip) 方式、以每只小鼠0.2mL给药。

[0268] C57BL/6小鼠在右侧以 $0.3 \times 10^6$ 个B16F10细胞/0.1mL PBS皮下接种。Balb/C小鼠在右侧以 $0.5 \times 10^6$ 个MC38细胞/0.1mL PBS皮下接种。当肿瘤达到目标大小时,小鼠随机化至处理组中。治疗在随机化的同一天开始。每周两次使用卡尺以2维测量肿瘤大小,且体积使用式 $V = 0.5L \times W^2$ 以立方毫米计算,其中L为肿瘤的最长直径且W为垂直于L的直径。每周一次记录体重。

[0269] 结果概述于以下表9 (B16F10黑色素瘤) 和表10 (MC38结肠癌) 中 (平均肿瘤大小 $\pm$  SEM)。使用GraphPad Prism 6.0进行统计分析。应用2向ANOVA以比较相对于同种型对照或其他处理组的多个组中的统计差异。 $P < 0.05$ 视为显著性差异。肿瘤测量结果以 $\text{mm}^3$ 给出。

[0270] 表9.皮下B16F10黑色素瘤随着时间的肿瘤测量值

组 1. 同种型对照			
肿瘤接种后的天数	平均肿瘤大小 (mm <sup>3</sup> )	SEM	N
12	74	11	8
15	214	46	8
18	392	67	8
22	1015	204	8
25	1897	310	8
29	2233	249	8
32	2311	228	8
组 2. 抗-4-1BB 抗体			
肿瘤接种后的天数	平均肿瘤大小 (mm <sup>3</sup> )	SEM	N
12	73	9	8
15	282	67	8
18	413	98	8
22	742	155	8
25	1392	278	8
29	2620	518	8
32	2759	493	8
组 3. 抗-OX40 mIgG2a 抗体			
肿瘤接种后的天数	平均肿瘤大小 (mm <sup>3</sup> )	SEM	N
12	71	7	9
15	198	51	9
18	370	105	9
22	783	293	9
25	1147	283	9
29	2046	433	9
32	2576	360	9
组 4. 艾维路单抗			
肿瘤接种后的天数	平均肿瘤大小 (mm <sup>3</sup> )	SEM	N
12	77	15	5
15	236	71	5
18	396	137	5
22	750	134	5
25	1291	210	5

[0271]

29	2159	326	5
32	2352	264	5
组 5. 抗-4-1BB 抗体 + 抗-OX40 mIgG2a 抗体			
肿瘤接种后的天数	平均肿瘤大小 (mm <sup>3</sup> )	SEM	N
12	78	14	9
15	155	23	9
18	313	50	9
22	595	87	9
25	861	65	9
29	1453	137	9
32	2003	245	9
组 6. 抗-OX40 mIgG1 抗体 + 艾维路单抗			
肿瘤接种后的天数	平均肿瘤大小 (mm <sup>3</sup> )	SEM	N
12	76	15	8
15	228	77	8
18	336	80	8
22	648	149	8
25	1009	248	8
29	1381	228	8
32	1908	261	8
组 7. 艾维路单抗 + 抗-OX40 mIgG2a 抗体			
肿瘤接种后的天数	平均肿瘤大小 (mm <sup>3</sup> )	SEM	N
12	75	11	8
15	184	37	8
18	297	61	8
22	505	111	8
25	833	191	8
29	1731	392	8
32	2056	371	8
组 8. 艾维路单抗 + 抗-4-1BB 抗体			
肿瘤接种后的天数	平均肿瘤大小 (mm <sup>3</sup> )	SEM	N
12	73	10	8
15	229	52	8
18	274	52	8

[0272]

[0273]

22	537	117	8
25	803	192	8
29	1435	305	8
32	1572	307	8
组 9. 艾维路单抗 + 抗-4-1BB 抗体 + 抗-OX40 mIgG1 抗体			
肿瘤接种后的天数	平均肿瘤大小 (mm <sup>3</sup> )	SEM	N
12	72	9	9
15	176	32	9
18	228	60	9
22	373	114	9
25	585	192	9
29	788	267	9
32	979	329	9
组 10. 艾维路单抗 + 抗-4-1BB 抗体 + 抗-OX40 mIgG2a 抗体			
肿瘤接种后的天数	平均肿瘤大小 (mm <sup>3</sup> )	SEM	N
12	74	10	9
15	104	17	9
18	120	17	9
22	155	49	9
25	208	54	9
29	365	93	9
32	442	114	9

[0274] 表10. 皮下MC38结肠癌随着时间的肿瘤测量值

[0275]

组 1. 同种型对照			
肿瘤接种后的天数	平均肿瘤大小 (mm <sup>3</sup> )	SEM	N
10	85	7	9
13	162	23	9
16	305	41	9
21	696	66	9
24	1064	112	9
28	1830	214	9
组 2. 抗-OX40 mIgG1 抗体			
肿瘤接种后的天数	平均肿瘤大小 (mm <sup>3</sup> )	SEM	N

10	85	6	9
13	160	15	9
16	280	28	9
21	751	79	9
24	1238	139	9
28	2223	270	9
组 3. 抗-OX40 mIgG2a 抗体			
肿瘤接种后的天数	平均肿瘤大小 (mm <sup>3</sup> )	SEM	N
10	85	7	9
13	154	11	9
16	247	18	9
21	455	64	9
24	648	102	9
28	1053	181	9
组 4. 抗-4-1BB 抗体			
肿瘤接种后的天数	平均肿瘤大小 (mm <sup>3</sup> )	SEM	N
10	84	7	8
13	161	11	8
16	264	19	8
21	585	37	8
24	909	65	8
28	1494	129	8
组 5. 抗-OX40 mIgG1 抗体 + 抗-4-1BB 抗体			
肿瘤接种后的天数	平均肿瘤大小 (mm <sup>3</sup> )	SEM	N
10	85	7	9
13	171	11	9
16	246	20	9
21	492	27	9
24	737	62	9
28	1241	217	9
组 6. 抗-OX40 mIgG2a 抗体 + 抗-4-1BB 抗体			
肿瘤接种后的天数	平均肿瘤大小 (mm <sup>3</sup> )	SEM	N

[0276]

10	85	7	8
13	175	15	8
16	248	29	8
21	387	74	8
24	567	119	8
28	854	163	8
组 7. 抗-4-1BB 抗体 + 艾维路单抗			
肿瘤接种后的天数	平均肿瘤大小 (mm <sup>3</sup> )	SEM	N
10	85	6	9
13	152	8	9
16	195	27	9
21	349	89	9
24	573	157	9
28	1026	255	9
组 8. 抗-OX40 mIgG1 抗体 + 抗-4-1BB 抗体 + 艾维路单抗			
肿瘤接种后的天数	平均肿瘤大小 (mm <sup>3</sup> )	SEM	N
10	85	6	9
13	167	12	9
16	170	32	9
21	228	65	9
24	304	86	9
28	448	108	9
组 9. 抗-OX40 mIgG2a 抗体 + 抗-4-1BB 抗体 + 艾维路单抗			
肿瘤接种后的天数	平均肿瘤大小 (mm <sup>3</sup> )	SEM	N
10	85	6	9
13	153	17	9
16	127	23	9
21	116	37	9
24	165	67	9
28	260	107	9

[0277]

[0278] 使用两种鼠模型评估抗OX40抗体、抗4-1BB抗体和艾维路单抗的三重组合治疗的治疗功效。在B16F10黑色素瘤模型中,平均肿瘤大小在治疗开始时为71-78mm<sup>3</sup>(表9)。到肿瘤接种后第32天,用同种型对照、单独的抗4-1BB抗体、单独的艾维路单抗、单独的抗OX40mIgG2a抗体和抗OX40mIgG1抗体加艾维路单抗组群治疗的动物中的肿瘤非常接近或超过2000mm<sup>3</sup>;其分别为2311±228mm<sup>3</sup>、2759±493mm<sup>3</sup>、2352±264mm<sup>3</sup>、2576±360mm<sup>3</sup>和1908±

261mm<sup>3</sup>。与同种型对照治疗的动物相比,用抗4-1BB抗体加抗OX40mIgG2a抗体、抗OX40mIgG2a抗体加艾维路单抗或抗4-1BB抗体加艾维路单抗的动物治疗在第25天具有更好的治疗功效;然而,肿瘤大小的差异在第32天变得不显著。相比之下,在向动物同时施用艾维路单抗、抗4-1BB抗体和抗OX40mIgG1抗体时(表9,组9)或同时施用艾维路单抗、抗4-1BB抗体和抗OX40mIgG2a抗体时(表9,组10)观察到显著的肿瘤抑制。肿瘤分别为979±329mm<sup>3</sup>(表9,组9;vs同种型对照和单独的单药剂组,p<0.001)和442±114mm<sup>3</sup>(表9,组10;vs同种型对照和单独的单药剂组,p<0.00001)。在具有抗4-1BB抗体、抗OX40mIgG2a抗体和艾维路单抗组合的三重组合的情况下,其与双重组合组相比还显著更好(p<0.01)(表9)。

[0279] 在MC38结肠癌模型中,平均肿瘤大小在治疗开始时为84-85mm<sup>3</sup>。在肿瘤移植后第28天,用抗OX40mIgG2a抗体(表10,组3)、抗OX40mIgG1抗体加抗4-1BB抗体(表10,组5)、抗OX40mIgG2a加抗4-1BB抗体(表10,组6)或抗4-1BB抗体加艾维路单抗(表10,组7)治疗的动物中的肿瘤的肿瘤大小分别为1053±181mm<sup>3</sup>、1241±217mm<sup>3</sup>、854±163mm<sup>3</sup>和1026±255mm<sup>3</sup>,其显著低于同种型对照处理组(1830±214mm<sup>3</sup>)(p<0.001)(表10,组1)。用单独的抗OX40mIgG1抗体(表10,组2)或单独的抗4-1BB抗体(表10,组4)的治疗不抑制肿瘤生长。相比之下,用抗4-1BB抗体和艾维路单抗以及抗OX40mIgG1抗体(表10,组8)或抗OX40mIgG2a抗体(表10,组9)的三重组合的治疗显著抑制肿瘤生长,其中平均肿瘤大小分别为448±108mm<sup>3</sup>和260±107mm<sup>3</sup>。在两种情况下,这不仅与同种型对照组相比显著(p<0.0001),两种三重组合与任一种双重组合相比也显著更好(p<0.001)(表10)。

[0280] 这些结果表明与单一抗体或双重抗体组合治疗相比,用抗4-1BB抗体、艾维路单抗和抗OX40抗体的三重组合的治疗在治疗癌症方面更有效。

[0281] 实施例7:用艾维路单抗与抗4-1BB抗体、阿扎胞苷、抗CD20拮抗性抗体和/或常规化学疗法(苯达莫司汀)的组合的复发性或难治性(R/R)弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)的组合治疗

[0282] 在该研究实施例中,说明三种治疗方案:

[0283] -用于治疗复发性或难治性DLBCL患者的艾维路单抗与利妥昔单抗和PF-05082566的组合

[0284] -用于治疗复发性或难治性DLBCL患者的艾维路单抗与阿扎胞苷和PF-05082566的组合

[0285] -指示艾维路单抗与利妥昔单抗和苯达莫司汀的组合用于治疗复发性或难治性DLBCL患者

[0286] 研究的目标群体是R/R DLBCL患者,其定义如下:(i) 先前利妥昔单抗/多药剂化学疗法的至少2线(且最大为4线)失败后的R/R DLBCL患者和/或(ii) ASCT失败,或(iii) 不是ASCT(拒绝或供体不可用)的候选者,或(iv) 不是强烈第二线化学疗法的候选者。

[0287] 当前DLBCL的NCCN指南(版本1.2016)推荐在具有新诊断的疾病的患者中,在所有疾病阶段中用利妥昔单抗、环磷酰胺、多柔比星、长春新碱和强的松(R-CHOP)进行治疗,或在>80岁的具有共患病的患者中用微型CHOP进行治疗。约60%的DLBCL患者预期在用R-CHOP治疗后治愈。然而,30至50%的那些晚期疾病患者将具有对R-CHOP具有原发性难治性(~15%)或抗性(~25%)的疾病(NCCN Guidelines,2016;Sehn&Gascoyne,2015;Vacirca等人,2014)。

[0288] 高剂量化学疗法、随后ASCT提供在第二线情形中R/R DLBCL患者的最佳治愈机会；然而，由于高龄和/或共患病，仅约50%的一线R-CHOP失败的患者适应高剂量化学疗法，且这些中，仅约~50%在第二线情形中具有化学敏感性疾病且适用于ASCT (Sehn和Gascoyne, 2015)。即使符合高剂量化学疗法，患者也可拒绝ASCT、缺乏良好供体或由于多种共患病而不符合条件。甚至在用高剂量化学疗法、随后ASCT治疗的患者中，仅少数(<10%)患者被治愈。

[0289] 当前NCCN指南(版本1.2016)推荐以下含有利妥昔单抗的化学疗法方案用于第二线补救疗法和除不符合高剂量化学疗法和ASCT条件以外的患者：苯达莫司汀±利妥昔单抗、brentuximab、环磷酰胺/依托泊苷/丙卡巴肼/强的松(CEPP)、环磷酰胺/依托泊苷/长春新碱/强的松(CEOP)、剂量调节型依托泊苷、强的松、长春新碱、环磷酰胺和多柔比星(DA-EPOCH) ±利妥昔单抗、吉西他滨、地塞米松和顺铂(GDP) ±利妥昔单抗、吉西他滨/奥沙利铂 ±利妥昔单抗、来那度胺±利妥昔单抗和利妥昔单抗(NCCN Guidelines, 2016)。

[0290] R-CHOP治疗失败且不符合高剂量化学疗法或ASCT的结果是可怕的，中值PFS为3.6个月(Vacirca等人, 2014)。这些患者的治疗选择方案仍非常有限，且因此在R/R DLBCL患者中存在发展可延长PFS和总体存活期(OS)的更有效的补救策略的高度未满足的医学需要。

[0291] 提议的研究是用于治疗R/R DLBCL的多种组合中艾维路单抗的多中心、国际、平行设计、随机化、开放标记、2-组分(1b期, 随后3期)研究。测试的药剂将包括：

[0292] (i) PF-05082566, 一种新的4-1BB的完全人类IgG2单克隆抗体激动剂，

[0293] (ii) 阿扎胞苷, 一种DNA甲基转移酶抑制剂(DNMTi)和表观遗传剂, 已显示其具有通过多种机制发挥潜在的免疫引发活性, 包括肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)上PD-1和肿瘤细胞上PD-L1的诱导以及肿瘤新抗原表达的诱导，

[0294] (iii) 利妥昔单抗, 一种CD20拮抗性抗体, 和

[0295] (iv) 苯达莫司汀, 一种烷基化化学治疗剂, 其为国家综合癌症网络(National Comprehensive Cancer Network; NCCN)推荐用于DLBCL患者的补救疗法的药剂之一, 所述患者不符合高剂量化学疗法和自体干细胞移植(ASCT)的条件。

[0296] 该研究中推荐的治疗方案包括艾维路单抗与以下的组合：

[0297] (i) 利妥昔单抗和PF-05082566

[0298] (ii) 阿扎胞苷和PF-05082566, 和

[0299] (iii) 利妥昔单抗和苯达莫司汀

[0300] 在3期中, 患者将以1:1比率随机化至1b期中选择的治疗方案vs. 研究者选择标准治疗(SOC)治疗以确定选择的治疗方案在延长无进展存活期(PFS)方面是否优于研究者选择SOC治疗。

[0301] 该1b期/3期注册研究的目标研究群体将包含已完成至少2线(但不超过4线)先前利妥昔单抗/多药剂化学疗法或ASCT已失败或不是ASCT的候选者或不符合强烈化学疗法条件的R/R DLBCL患者。研究将评估安全性、功效、药代动力学(PK)、免疫原性和患者报导的结果。

[0302] 1b期组分的首要目标是进行各组合方案的安全性的基本评估。在最初6名患者中无显著安全性信号的各组将然后扩展至每组总共28名患者以选择进展至研究的3期组分的

治疗方案。该决策将基于研究者观察的各组合方案的客观反应率 (ORR) 和安全性概况。在28天周期中,在研究的1b期组分中评估的组合方案包括:

[0303] 组A:艾维路单抗/利妥昔单抗/PF-05082566 (4-1BB)

[0304] (i) 利妥昔单抗,375mg/m<sup>2</sup> (IV),每一28天周期的第1天的早晨给药。施用利妥昔单抗持续最多8个周期。

[0305] 当在同一天给药时,利妥昔单抗将在PF-05082566之前至少3小时施用。

[0306] (ii) PF-05082566,100mg固定剂量 (IV),在每一28天周期的周期1和2的第2天早晨给药。如果PF-05082566在周期1和2中被良好耐受,则可在周期3 (和所有后续周期) 中的第1天进行PF-05082566的施用。

[0307] 在周期1中,PF-05082566将在艾维路单抗之前至少3小时施用。如果PF-05082566在周期1、周期2和所有后续周期中被良好耐受,则PF-05082566和艾维路单抗之间的剂量施用窗口可从相隔至少3小时降低至相隔30-60分钟。

[0308] (iii) 艾维路单抗,10mg/kg (IV),每2周一次,在周期1和周期2中的每一28天周期的第2天和第16天给药。如果艾维路单抗在周期1和2中被良好耐受,则可在周期3 (和所有后续周期) 中的第1天和第15天进行艾维路单抗的施用。

[0309] 在周期1和周期2中,艾维路单抗将在PF-05082566之后至少3小时施用。如果艾维路单抗在周期1第2天、周期2第2天和后续周期中被良好耐受,则艾维路单抗和PF-05082566之间的剂量施用窗口可从相隔至少3小时降低至相隔30-60分钟。

[0310] 组B:艾维路单抗/阿扎胞苷/PF-05082566 (4-1BB)

[0311] (i) 阿扎胞苷,75mg/m<sup>2</sup> (SC),在每一28天周期的连续第1天-第7天的早晨给药。施用阿扎胞苷持续最多6个周期。

[0312] 当在同一天给药时,阿扎胞苷将在PF-05082566之前至少3小时施用。

[0313] (ii) PF-05082566,100mg固定剂量 (IV),在每一28天周期的周期1和周期2中的第2天早晨给药。如果PF-05082566在周期1和2中被良好耐受,则可在周期3 (和后续周期) 中的第1天开始施用PF-05082566。

[0314] PF-05082566应在艾维路单抗施用之前至少3小时施用。如果PF-05082566在周期1、周期2和所有后续周期中被良好耐受,则PF-05082566和艾维路单抗之间的剂量施用窗口可从相隔至少3小时降低至相隔30-60分钟。

[0315] (iii) 艾维路单抗,10mg/kg,每2周一次 (IV),在周期1和周期2中的每一28天周期的第2天和第16天给药。如果艾维路单抗在周期1和2中被良好耐受,则可在周期3 (和所有后续周期) 中的第1天和第15天施用艾维路单抗。

[0316] 在周期1和周期2中,艾维路单抗施用应在PF-05082566之后至少3小时进行。如果艾维路单抗在周期1第2天、周期2第2天和后续周期中被良好耐受,则艾维路单抗和PF-05082566之间的剂量施用窗口可从相隔至少3小时降低至相隔30-60分钟。

[0317] 组C:艾维路单抗/苯达莫司汀/利妥昔单抗

[0318] (i) 利妥昔单抗,375mg/m<sup>2</sup> (IV),每一28天周期的第1天的早晨给药。施用利妥昔单抗持续最多8个周期。

[0319] (ii) 苯达莫司汀,90mg/m<sup>2</sup> (IV),在周期1和周期2中每一28天周期的第2天和第3天给药。如果苯达莫司汀在周期1和2中被良好耐受,则可在周期3 (和所有后续周期) 中的第1

天和第2天施用苯达莫司汀。施用苯达莫司汀持续最多6个周期。

[0320] (iii) 艾维路单抗, 10mg/kg, 每2周一次 (IV), 在周期1和周期2中的每一28天周期的第2天和第16天给药。如果艾维路单抗在周期1和2中被良好耐受, 则可在周期3 (和所有后续周期) 中的第1天和第15天施用艾维路单抗。艾维路单抗施用应在苯达莫司汀之后至少3小时进行。

[0321] 在3期 (N=220) 中, 首要目标是说明在1b期中鉴定的组合方案与对照性治疗, 即研究者选择SOC化学疗法 (包含利妥昔单抗/苯达莫司汀或利妥昔单抗/吉西他滨/奥沙利铂) 相比, 在PFS方面的优越性 (如通过盲式独立中心审核 [BICR] 评估)。

[0322] 在研究的3期组中将评估以下治疗方案, 其中所有治疗在28天周期中施用:

[0323] 组D (N=110): 选自1b期的方案

[0324] 组D将是基于安全性和功效评估而选择的1b期中评估的治疗方案之一, 即组A、B或C。

[0325] 组群E (N=110): 以下标准治疗方案之间的研究者选择选择方案:

[0326] (i) 利妥昔单抗/苯达莫司汀

[0327] -利妥昔单抗, 375mg/m<sup>2</sup>, IV, 第1天

[0328] -苯达莫司汀, 120mg/m<sup>2</sup>, IV, 第1天和第2天

[0329] (ii) 利妥昔单抗/吉西他滨/奥沙利铂

[0330] -利妥昔单抗, 375mg/m<sup>2</sup>, IV, 第1天

[0331] -吉西他滨, 1000mg/m<sup>2</sup>, IV, 第2天和第17天

[0332] -奥沙利铂, 100mg/m<sup>2</sup>, IV, 第2天和第17天

[0333] 实施例8: 用艾维路单抗与抗4-1BB抗体的组合对疾病在免疫检查点抑制剂后已进展的具有晚期恶性病的患者的组合治疗

[0334] 本实施例说明2期研究, 其评估艾维路单抗 (MSB0010718C) 和抗4-1BB激动剂抗体 PF-05082566 的组合在晚期NSCLC、RCC或尿道上皮癌 (UC) 患者中的安全性和功效, 所述患者的疾病在先前疗法 (包括单药免疫检查点抑制剂) 后进展。

[0335] 该研究的目标是基于艾维路单抗加PF-05082566的RECIST 1.1评估客观反应率 (ORR)。患者必须患有对先前疗法 (包括单药免疫检查点抑制剂 (例如抗-PD-1/抗PD-L1或抗CTLA-4)) 具有抗性 (反应, 然后进展) 或难治性 (从不反应) 的晚期NSCLC、RCC或尿道上皮癌。

[0336] 艾维路单抗将在所有三个组群中每2周一次作为1小时静脉内输注, 以10mg/kg的剂量给予。PF-05082566将以每4周一次, 在每一周期的第1天, 作为1小时静脉内输注, 以100mg施用。

[0337] 在施用两种药物的当天, 将首先施用PF 05082566, 随后在PF-05082566输注结束之后不超过30分钟进行艾维路单抗输注。

[0338] 给药将持续直至由研究者确认疾病进展、患者拒绝、不可接受的毒性、患者不再随诊或直至由发起人终止研究 (无论哪个首先发生)。

[0339] 已使用标准人类PBMC体外测试评估艾维路单抗加抗4-1BB抗体PF-05082566和抗OX40抗体PF-04518600的组的细胞因子释放。完成单独的PF-05082566和艾维路单抗和PF-04518600的组的细胞因子释放测定。单独的PF-05082566抗体的结果未显示细胞因子

释放的显著增加。此外,当组合三种单克隆抗体时,不存在对细胞因子释放的加成作用。

[0340] ORR估计将是艾维路单抗与除PF-05082566以外的免疫疗法的组合的任何潜力评估中的主要目标。在每种情况下,将通过潜在组群扩展的数据的总体性或测试多种肿瘤类型和/或其他组合免疫治疗剂来评估ORR。

[0341] 实施例9:头颈部局部晚期鳞状细胞癌患者的前线治疗中艾维路单抗(MSB0010718C)与标准治疗化学放射疗法(顺铂和根治性放射疗法)的组合vs.标准治疗化学放射疗法的随机化、3期研究

[0342] 本实施例说明头颈部的局部晚期鳞状细胞癌患者的前线治疗中,艾维路单抗(MSB0010718C)与标准治疗(SOC)化学放射疗法(顺铂和根治性放射疗法)的组合vs.SOC化学疗法的3期、多中心、多国、随机化、安慰剂对照研究。

[0343] 约640名未曾接受用于其SCCHN(口腔、口咽、喉或喉咽)HPV-:III、IVa或IVb期或HPV+:T4或N3(符合用顺铂的根治性化学放射疗法的条件)的先前疗法的患者将以1:1随机接受用艾维路单抗+SOC化学放射疗法vs.安慰剂+化学放射疗法进行的治疗,随后维持艾维路单抗或安慰剂长达1年。患者将基于以下分类:

[0344] -肿瘤(T)分期(<T4vs T4);

[0345] -淋巴结(N)分期(N0vs N1/N2a/N2b vs N2c/N3)

[0346] 将在完成根治性化学放射疗法之后每12周一次进行肿瘤评估持续2年,且然后每16周进行一次。

[0347] 除研究者审核以外,盲式独立审核委员会(BICR)将审核肿瘤评估。

[0348] 当研究治疗由于除进展性疾病(PD)、患者同意退出或死亡以外的原因停止时,将随诊患者且每12周一次进行肿瘤评估直至:1)PD,2)死亡,3)患者同意退出研究,或4)距化学放射疗法完成已达2年,随后可每16周一次进行肿瘤评估(无论哪个首先发生)。

[0349] 组A:艾维路单抗(MSB0010718C)+SOC化学放射疗法(CRT)。

[0350] 在该研究中,导入期应在CRT期起始之前七天开始。维持期将在CRT期完成之后(即在CRT完成之后两周)开始。

[0351] -顺铂,100mg/m<sup>2</sup>,第1、22、43天。在500ml生理盐水中经60-120分钟输注施用,其后给予额外的1至1.5L流体用于水化。

[0352] -放射疗法(RT),70Gy/33-35部分/天,5部分/周强度调节式放射疗法(IMRT)

[0353] -艾维路单抗:10mg/kg,在导入期的第1天和CRT期的第8、29、39天施用,且随后每2周一次(Q2W)施用持续长达12个月。

[0354] 组B:SOC化学放射疗法。

[0355] -顺铂,100mg/m<sup>2</sup>,第1、22、43天

[0356] -RT 70Gy/33-35部分/天,5部分/周IMRT

[0357] -安慰剂:导入期的第1天,CRT期的第8、29、39天,且随后Q2W持续长达12个月。

[0358] 艾维路单抗和安慰剂将作为静脉内输注施用。

[0359] 患者将接受研究治疗直至:1)在开始维持治疗之后12个月(研究干预完成),2)PD,3)死亡,4)患者同意退出,5)患者不再随诊,6)产生不可接受的毒性或7)由发起人终止研究(无论哪个首先发生)。

[0360] 可由于毒性而在第22天和/或第43天如下修改顺铂的剂量:起始剂量水平为

100mg/m<sup>2</sup>, -1剂量水平为75mg/m<sup>2</sup>, 且-2剂量水平为50mg/m<sup>2</sup>。

[0361] 外周血液和额外肿瘤组织生物学标记物由某些水平的可与抗肿瘤免疫反应和/或对艾维路单抗的反应或疾病进展相关的细胞、脱氧核糖核酸 (DNA)、核糖核酸 (RNA) 或蛋白 (诸如与IFN- $\gamma$  或转化生长因子 (TGF) - $\beta$ 相关的基因) 组成。

[0362] 实施例10: 未治疗的晚期肾细胞癌患者中艾维路单抗 (MSB0010718C; 抗PD-L1) +阿西替尼的1b期剂量-发现研究

[0363] 本实施例说明来自以上实施例1中描述的研究的结果。符合条件的患者具有组织学确认的具有透明细胞组分的aRCC、原发性肿瘤切除、 $\geq 1$ 个可测量的病灶、存档/新鲜肿瘤活检、ECOG PS $\leq 1$ 、先前不存在不可控的高血压且先前未接受用于aRCC的全身疗法。为了测定未来组群的剂量改变, 使用了根据改变的毒性机率间隔方法的剂量递增/递减法则。通过NCI CTCAE v4对不良事件 (AE) 进行分级。评估了目标反应率 (ORR; RECIST v1.1)。

[0364] 艾维路单抗10mg/kg (1小时静脉内输注) Q2W+阿西替尼5mg PO BID的起始剂量符合MTD标准。到2016年4月5日, 6名患者 (中值年龄为59.5 [范围, 45-73]) 已用艾维路单抗治疗, 其中中值为17.0周 (范围, 11.9-21.7), 和用阿西替尼治疗, 中值为16.3周 (范围, 12.7-22.7)。出现一个3级蛋白尿的DLT。任何级别的最常见治疗相关 (TR) AE是发声困难 (n=4)、高血压 (n=4)、疲惫 (n=3) 和头痛 (n=3)。3-4级TRAE是高血压 (n=2)、手-脚综合征 (n=1)、脂肪酶升高 (n=1) 和蛋白尿 (n=1)。基于1名患者中的5PR和稳定疾病, 确认的ORR为83.3% (95%CI: 35.9, 99.6)。

[0365] 已确认该扩展阶段的MTD/RP2D和aRCC中的其他研究是连续施用艾维路单抗10mg/kg IV Q2W+阿西替尼5mg PO BID。方案在未治疗的aRCC患者中显示初步抗肿瘤活性。扩展组群进行参与。这些结果说明在aRCC中, 艾维路单抗+阿西替尼vs当前单药疗法的功效和安全性。

[0366] 尽管已参考各种申请、方法、试剂盒和组合物描述所公开的教导, 但应理解在不偏离本文中的教导和下文请求保护的发明的情况下可进行不同变化和修改。提供前述实施例以更好地说明公开的教导, 且不意欲限制本文中所呈现的教导的范围。尽管已在这些示范性实施方案方面描述本教导, 但技术人员将容易理解在无不当实验情况下这些示范性实施方案的大量变化和修改是可能的。所有此类变化和修改都在本教导的范围内。

[0367] 本文中引用的全部参考文献 (包括专利、专利申请、论文、课本等) 和其中引用的参考文献, 在其尚未引用的程度上, 在此以其整体并入本文中。在并入的文献和类似材料中的一种或多种 (包括但不限于定义的术语、术语用法、描述的技术等) 与本申请不同或抵触的情况下, 以本申请为准。

[0368] 前述描述和实施例详述本发明的某些特定实施方案, 且描述本发明人预期的最佳模式。然而应理解, 无论以文字呈现的前述内容如何详细, 本发明可以许多方式实施, 且本发明应根据随附权利要求和其任何等效物来解释。

[0001] 序列表  
 [0002] <110> 默克专利股份有限公司  
 [0003] 辉瑞公司  
 [0004] G·I·安德鲁斯  
 [0005] 陈士浩  
 [0006] A·迪彼得罗  
 [0007] D·丰塔纳  
 [0008] Z·戈德堡  
 [0009] 林家杨  
 [0010] 龙华  
 [0011] M·马尔蒂尼奥尼  
 [0012] D·S·A·纳伊特恩  
 [0013] A·D·塔尔  
 [0014] A·伍尔夫松  
 [0015] <120> PD-L1拮抗剂组合治疗  
 [0016] <130> P 15/104 W0  
 [0017] <150> 62/180,543  
 [0018] <151> 2015-06-16  
 [0019] <150> 62/219,995  
 [0020] <151> 2015-09-17  
 [0021] <150> 62/286,501  
 [0022] <151> 2016-01-25  
 [0023] <150> 62/337,489  
 [0024] <151> 2016-05-17  
 [0025] <160> 41  
 [0026] <170> PatentIn version 3.5  
 [0027] <210> 1  
 [0028] <211> 290  
 [0029] <212> PRT  
 [0030] <213> homo sapiens  
 [0031] <400> 1  
 [0032] Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu  
 [0033] 1 5 10 15  
 [0034] Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr  
 [0035] 20 25 30  
 [0036] Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu  
 [0037] 35 40 45  
 [0038] Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile

[0039]	50	55	60
[0040]	Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser		
[0041]	65	70	75 80
[0042]	Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn		
[0043]	85	90	95
[0044]	Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr		
[0045]	100	105	110
[0046]	Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val		
[0047]	115	120	125
[0048]	Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val		
[0049]	130	135	140
[0050]	Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr		
[0051]	145	150	155 160
[0052]	Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser		
[0053]	165	170	175
[0054]	Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn		
[0055]	180	185	190
[0056]	Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr		
[0057]	195	200	205
[0058]	Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu		
[0059]	210	215	220
[0060]	Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His		
[0061]	225	230	235 240
[0062]	Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr		
[0063]	245	250	255
[0064]	Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys		
[0065]	260	265	270
[0066]	Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu		
[0067]	275	280	285
[0068]	Glu Thr		
[0069]	290		
[0070]	<210> 2		
[0071]	<211> 5		
[0072]	<212> PRT		
[0073]	<213> homo sapiens		
[0074]	<400> 2		
[0075]	Ser Tyr Ile Met Met		
[0076]	1	5	
[0077]	<210> 3		

[0078] <211> 11  
 [0079] <212> PRT  
 [0080] <213> homo sapiens  
 [0081] <400> 3  
 [0082] Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr  
 [0083] 1 5 10  
 [0084] <210> 4  
 [0085] <211> 11  
 [0086] <212> PRT  
 [0087] <213> homo sapiens  
 [0088] <400> 4  
 [0089] Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr  
 [0090] 1 5 10  
 [0091] <210> 5  
 [0092] <211> 14  
 [0093] <212> PRT  
 [0094] <213> homo sapiens  
 [0095] <400> 5  
 [0096] Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr Asn Tyr Val Ser  
 [0097] 1 5 10  
 [0098] <210> 6  
 [0099] <211> 7  
 [0100] <212> PRT  
 [0101] <213> homo sapiens  
 [0102] <400> 6  
 [0103] Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser  
 [0104] 1 5  
 [0105] <210> 7  
 [0106] <211> 10  
 [0107] <212> PRT  
 [0108] <213> homo sapiens  
 [0109] <400> 7  
 [0110] Ser Ser Tyr Thr Ser Ser Ser Thr Arg Val  
 [0111] 1 5 10  
 [0112] <210> 8  
 [0113] <211> 118  
 [0114] <212> PRT  
 [0115] <213> homo sapiens  
 [0116] <400> 8

[0117] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 [0118] 1 5 10 15  
 [0119] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 [0120] 20 25 30  
 [0121] Ile Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 [0122] 35 40 45  
 [0123] Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Lys Gly  
 [0124] 50 55 60  
 [0125] Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln  
 [0126] 65 70 75 80  
 [0127] Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg  
 [0128] 85 90 95  
 [0129] Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 [0130] 100 105 110  
 [0131] Leu Val Thr Val Ser Ser  
 [0132] 115  
 [0133] <210> 9  
 [0134] <211> 110  
 [0135] <212> PRT  
 [0136] <213> Homo sapiens  
 [0137] <400> 9  
 [0138] Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln  
 [0139] 1 5 10 15  
 [0140] Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr  
 [0141] 20 25 30  
 [0142] Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu  
 [0143] 35 40 45  
 [0144] Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe  
 [0145] 50 55 60  
 [0146] Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu  
 [0147] 65 70 75 80  
 [0148] Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser  
 [0149] 85 90 95  
 [0150] Ser Thr Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
 [0151] 100 105 110  
 [0152] <210> 10  
 [0153] <211> 450  
 [0154] <212> PRT  
 [0155] <213> Homo sapiens

[0156] <400> 10  
 [0157] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 [0158] 1 5 10 15  
 [0159] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 [0160] 20 25 30  
 [0161] Ile Met Met Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 [0162] 35 40 45  
 [0163] Ser Ser Ile Tyr Pro Ser Gly Gly Ile Thr Phe Tyr Ala Asp Thr Val  
 [0164] 50 55 60  
 [0165] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 [0166] 65 70 75 80  
 [0167] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0168] 85 90 95  
 [0169] Ala Arg Ile Lys Leu Gly Thr Val Thr Thr Val Asp Tyr Trp Gly Gln  
 [0170] 100 105 110  
 [0171] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val  
 [0172] 115 120 125  
 [0173] Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala  
 [0174] 130 135 140  
 [0175] Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser  
 [0176] 145 150 155 160  
 [0177] Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val  
 [0178] 165 170 175  
 [0179] Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro  
 [0180] 180 185 190  
 [0181] Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys  
 [0182] 195 200 205  
 [0183] Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp  
 [0184] 210 215 220  
 [0185] Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 [0186] 225 230 235 240  
 [0187] Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 [0188] 245 250 255  
 [0189] Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 [0190] 260 265 270  
 [0191] Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 [0192] 275 280 285  
 [0193] Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 [0194] 290 295 300

[0195]	Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
[0196]	305 310 315 320
[0197]	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
[0198]	325 330 335
[0199]	Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
[0200]	340 345 350
[0201]	Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
[0202]	355 360 365
[0203]	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
[0204]	370 375 380
[0205]	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
[0206]	385 390 395 400
[0207]	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
[0208]	405 410 415
[0209]	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
[0210]	420 425 430
[0211]	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
[0212]	435 440 445
[0213]	Gly Lys
[0214]	450
[0215]	<210> 11
[0216]	<211> 216
[0217]	<212> PRT
[0218]	<213> Homo sapiens
[0219]	<400> 11
[0220]	Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
[0221]	1 5 10 15
[0222]	Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr
[0223]	20 25 30
[0224]	Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
[0225]	35 40 45
[0226]	Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe
[0227]	50 55 60
[0228]	Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu
[0229]	65 70 75 80
[0230]	Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser
[0231]	85 90 95
[0232]	Ser Thr Arg Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu Gly Gln
[0233]	100 105 110

[0234] Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu  
 [0235] 115 120 125  
 [0236] Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr  
 [0237] 130 135 140  
 [0238] Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys  
 [0239] 145 150 155 160  
 [0240] Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr  
 [0241] 165 170 175  
 [0242] Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His  
 [0243] 180 185 190  
 [0244] Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys  
 [0245] 195 200 205  
 [0246] Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
 [0247] 210 215  
 [0248] <210> 12  
 [0249] <211> 6  
 [0250] <212> PRT  
 [0251] <213> Artificial Sequence  
 [0252] <220>  
 [0253] <223> Humanized antibody sequence  
 [0254] <400> 12  
 [0255] Ser Thr Tyr Trp Ile Ser  
 [0256] 1 5  
 [0257] <210> 13  
 [0258] <211> 17  
 [0259] <212> PRT  
 [0260] <213> Artificial Sequence  
 [0261] <220>  
 [0262] <223> Humanized antibody sequence  
 [0263] <400> 13  
 [0264] Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe Gln  
 [0265] 1 5 10 15  
 [0266] Gly  
 [0267] <210> 14  
 [0268] <211> 8  
 [0269] <212> PRT  
 [0270] <213> Artificial Sequence  
 [0271] <220>  
 [0272] <223> Humanized antibody sequence

[0273] <400> 14  
 [0274] Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr  
 [0275] 1 5  
 [0276] <210> 15  
 [0277] <211> 11  
 [0278] <212> PRT  
 [0279] <213> Artificial Sequence  
 [0280] <220>  
 [0281] <223> Humanized antibody sequence  
 [0282] <400> 15  
 [0283] Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala His  
 [0284] 1 5 10  
 [0285] <210> 16  
 [0286] <211> 7  
 [0287] <212> PRT  
 [0288] <213> Artificial Sequence  
 [0289] <220>  
 [0290] <223> Humanized antibody sequence  
 [0291] <400> 16  
 [0292] Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser  
 [0293] 1 5  
 [0294] <210> 17  
 [0295] <211> 11  
 [0296] <212> PRT  
 [0297] <213> Artificial Sequence  
 [0298] <220>  
 [0299] <223> Humanized antibody sequence  
 [0300] <400> 17  
 [0301] Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu Ala Val  
 [0302] 1 5 10  
 [0303] <210> 18  
 [0304] <211> 116  
 [0305] <212> PRT  
 [0306] <213> Artificial Sequence  
 [0307] <220>  
 [0308] <223> Humanized antibody sequence  
 [0309] <400> 18  
 [0310] Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 [0311] 1 5 10 15

[0312]	Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr
[0313]	20 25 30
[0314]	Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
[0315]	35 40 45
[0316]	Gly Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe
[0317]	50 55 60
[0318]	Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
[0319]	65 70 75 80
[0320]	Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
[0321]	85 90 95
[0322]	Ala Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
[0323]	100 105 110
[0324]	Thr Val Ser Ser
[0325]	115
[0326]	<210> 19
[0327]	<211> 108
[0328]	<212> PRT
[0329]	<213> Artificial Sequence
[0330]	<220>
[0331]	<223> Humanized antibody sequence
[0332]	<400> 19
[0333]	Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
[0334]	1 5 10 15
[0335]	Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala
[0336]	20 25 30
[0337]	His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
[0338]	35 40 45
[0339]	Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
[0340]	50 55 60
[0341]	Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
[0342]	65 70 75 80
[0343]	Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu
[0344]	85 90 95
[0345]	Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
[0346]	100 105
[0347]	<210> 20
[0348]	<211> 442
[0349]	<212> PRT
[0350]	<213> Artificial Sequence

[0351] <220>  
 [0352] <223> Humanized antibody sequence  
 [0353] <400> 20  
 [0354] Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 [0355] 1 5 10 15  
 [0356] Ser Leu Arg Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Thr Tyr  
 [0357] 20 25 30  
 [0358] Trp Ile Ser Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 [0359] 35 40 45  
 [0360] Gly Lys Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Asn Tyr Ser Pro Ser Phe  
 [0361] 50 55 60  
 [0362] Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 [0363] 65 70 75 80  
 [0364] Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 [0365] 85 90 95  
 [0366] Ala Arg Gly Tyr Gly Ile Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 [0367] 100 105 110  
 [0368] Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala  
 [0369] 115 120 125  
 [0370] Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu  
 [0371] 130 135 140  
 [0372] Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly  
 [0373] 145 150 155 160  
 [0374] Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser  
 [0375] 165 170 175  
 [0376] Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe  
 [0377] 180 185 190  
 [0378] Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr  
 [0379] 195 200 205  
 [0380] Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro  
 [0381] 210 215 220  
 [0382] Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 [0383] 225 230 235 240  
 [0384] Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 [0385] 245 250 255  
 [0386] Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp  
 [0387] 260 265 270  
 [0388] Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 [0389] 275 280 285

[0390]	Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val
[0391]	290 295 300
[0392]	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
[0393]	305 310 315 320
[0394]	Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
[0395]	325 330 335
[0396]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
[0397]	340 345 350
[0398]	Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
[0399]	355 360 365
[0400]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
[0401]	370 375 380
[0402]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
[0403]	385 390 395 400
[0404]	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
[0405]	405 410 415
[0406]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
[0407]	420 425 430
[0408]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0409]	435 440
[0410]	<210> 21
[0411]	<211> 214
[0412]	<212> PRT
[0413]	<213> Artificial Sequence
[0414]	<220>
[0415]	<223> Humanized antibody sequence
[0416]	<400> 21
[0417]	Ser Tyr Glu Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
[0418]	1 5 10 15
[0419]	Thr Ala Ser Ile Thr Cys Ser Gly Asp Asn Ile Gly Asp Gln Tyr Ala
[0420]	20 25 30
[0421]	His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Val Leu Val Ile Tyr
[0422]	35 40 45
[0423]	Gln Asp Lys Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
[0424]	50 55 60
[0425]	Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Thr Gln Ala Met
[0426]	65 70 75 80
[0427]	Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Tyr Thr Gly Phe Gly Ser Leu
[0428]	85 90 95

[0429]	Ala Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys
[0430]	100 105 110
[0431]	Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln
[0432]	115 120 125
[0433]	Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly
[0434]	130 135 140
[0435]	Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys Ala Gly
[0436]	145 150 155 160
[0437]	Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala
[0438]	165 170 175
[0439]	Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser
[0440]	180 185 190
[0441]	Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val
[0442]	195 200 205
[0443]	Ala Pro Thr Glu Cys Ser
[0444]	210
[0445]	<210> 22
[0446]	<211> 466
[0447]	<212> PRT
[0448]	<213> Homo sapiens
[0449]	<400> 22
[0450]	Met Glu Leu Gly Leu Cys Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly
[0451]	1 5 10 15
[0452]	Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
[0453]	20 25 30
[0454]	Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
[0455]	35 40 45
[0456]	Ser Ser Phe Ser Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
[0457]	50 55 60
[0458]	Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Ser Thr Ile Ser Tyr Ala
[0459]	65 70 75 80
[0460]	Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
[0461]	85 90 95
[0462]	Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val
[0463]	100 105 110
[0464]	Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Leu Leu Ala Gly Ala Thr Phe Phe Asp
[0465]	115 120 125
[0466]	Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
[0467]	130 135 140

[0468]	Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu
[0469]	145 150 155 160
[0470]	Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
[0471]	165 170 175
[0472]	Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
[0473]	180 185 190
[0474]	Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
[0475]	195 200 205
[0476]	Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn
[0477]	210 215 220
[0478]	Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg
[0479]	225 230 235 240
[0480]	Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly
[0481]	245 250 255
[0482]	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
[0483]	260 265 270
[0484]	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
[0485]	275 280 285
[0486]	Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
[0487]	290 295 300
[0488]	Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg
[0489]	305 310 315 320
[0490]	Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
[0491]	325 330 335
[0492]	Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu
[0493]	340 345 350
[0494]	Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
[0495]	355 360 365
[0496]	Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
[0497]	370 375 380
[0498]	Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
[0499]	385 390 395 400
[0500]	Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met
[0501]	405 410 415
[0502]	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
[0503]	420 425 430
[0504]	Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
[0505]	435 440 445
[0506]	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

[0507]	450	455	460
[0508]	Gly Lys		
[0509]	465		
[0510]	<210> 23		
[0511]	<211> 235		
[0512]	<212> PRT		
[0513]	<213> Homo sapiens		
[0514]	<400> 23		
[0515]	Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro		
[0516]	1 5 10 15		
[0517]	Asp Thr Thr Gly Glu Phe Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser		
[0518]	20 25 30		
[0519]	Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser		
[0520]	35 40 45		
[0521]	Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala		
[0522]	50 55 60		
[0523]	Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro		
[0524]	65 70 75 80		
[0525]	Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile		
[0526]	85 90 95		
[0527]	Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr		
[0528]	100 105 110		
[0529]	Gly Ser Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys		
[0530]	115 120 125		
[0531]	Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu		
[0532]	130 135 140		
[0533]	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe		
[0534]	145 150 155 160		
[0535]	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln		
[0536]	165 170 175		
[0537]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser		
[0538]	180 185 190		
[0539]	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu		
[0540]	195 200 205		
[0541]	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser		
[0542]	210 215 220		
[0543]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[0544]	225 230 235		
[0545]	<210> 24		

[0546] <211> 5  
 [0547] <212> PRT  
 [0548] <213> Homo sapiens  
 [0549] <400> 24  
 [0550] Ser Phe Ser Met Thr  
 [0551] 1 5  
 [0552] <210> 25  
 [0553] <211> 17  
 [0554] <212> PRT  
 [0555] <213> Homo sapiens  
 [0556] <400> 25  
 [0557] Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Ser Thr Ile Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 [0558] 1 5 10 15  
 [0559] Gly  
 [0560] <210> 26  
 [0561] <211> 12  
 [0562] <212> PRT  
 [0563] <213> Homo sapiens  
 [0564] <400> 26  
 [0565] Asp Pro Leu Leu Ala Gly Ala Thr Phe Phe Asp Tyr  
 [0566] 1 5 10  
 [0567] <210> 27  
 [0568] <211> 12  
 [0569] <212> PRT  
 [0570] <213> Homo sapiens  
 [0571] <400> 27  
 [0572] Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala  
 [0573] 1 5 10  
 [0574] <210> 28  
 [0575] <211> 7  
 [0576] <212> PRT  
 [0577] <213> Artificial Sequence  
 [0578] <220>  
 [0579] <223> MCSF antibody CDRL2 sequence  
 [0580] <400> 28  
 [0581] Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr  
 [0582] 1 5  
 [0583] <210> 29  
 [0584] <211> 9

[0585] <212> PRT  
 [0586] <213> Homo sapiens  
 [0587] <400> 29  
 [0588] Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Leu Thr  
 [0589] 1 5  
 [0590] <210> 30  
 [0591] <211> 141  
 [0592] <212> PRT  
 [0593] <213> Artificial Sequence  
 [0594] <220>  
 [0595] <223> MCSF antibody heavy chain variable region sequence  
 [0596] <400> 30  
 [0597] Met Glu Leu Gly Leu Cys Trp Val Phe Leu Val Ala Ile Leu Glu Gly  
 [0598] 1 5 10 15  
 [0599] Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln  
 [0600] 20 25 30  
 [0601] Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
 [0602] 35 40 45  
 [0603] Ser Ser Phe Ser Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
 [0604] 50 55 60  
 [0605] Glu Trp Val Ser Tyr Ile Ser Ser Arg Ser Ser Thr Ile Ser Tyr Ala  
 [0606] 65 70 75 80  
 [0607] Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn  
 [0608] 85 90 95  
 [0609] Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val  
 [0610] 100 105 110  
 [0611] Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Pro Leu Leu Ala Gly Ala Thr Phe Phe Asp  
 [0612] 115 120 125  
 [0613] Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala  
 [0614] 130 135 140  
 [0615] <210> 31  
 [0616] <211> 128  
 [0617] <212> PRT  
 [0618] <213> Homo sapiens  
 [0619] <400> 31  
 [0620] Met Glu Thr Pro Ala Gln Leu Leu Phe Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro  
 [0621] 1 5 10 15  
 [0622] Asp Thr Thr Gly Glu Phe Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser  
 [0623] 20 25 30

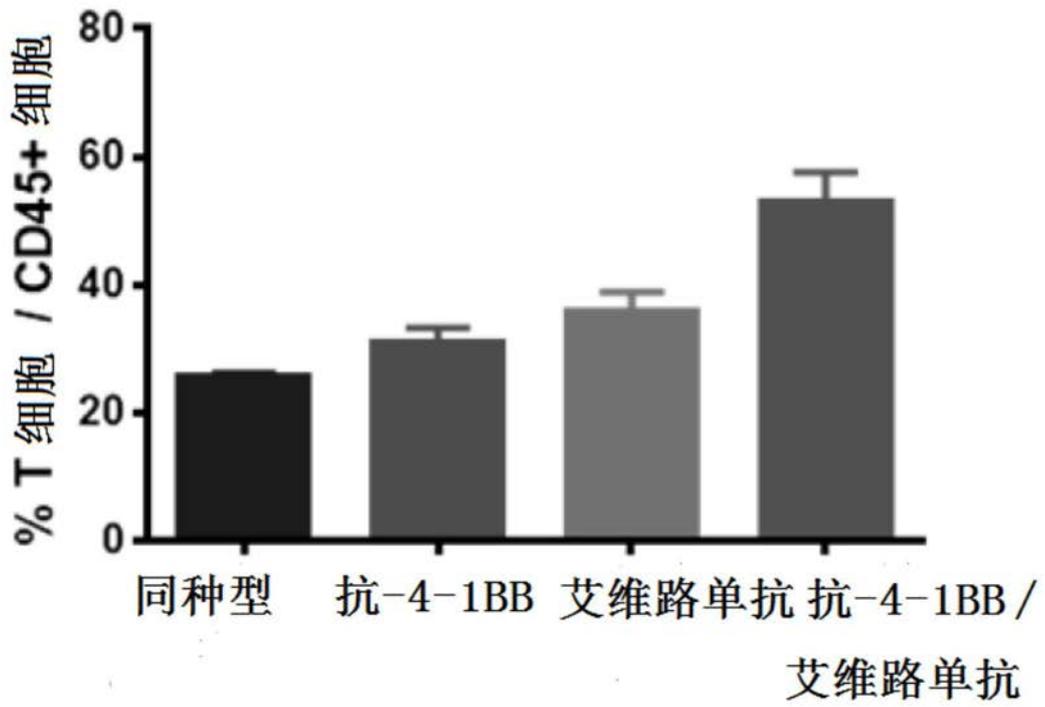
[0624] Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser  
 [0625] 35 40 45  
 [0626] Val Ser Ser Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala  
 [0627] 50 55 60  
 [0628] Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro  
 [0629] 65 70 75 80  
 [0630] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile  
 [0631] 85 90 95  
 [0632] Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr  
 [0633] 100 105 110  
 [0634] Gly Ser Ser Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 [0635] 115 120 125  
 [0636] <210> 32  
 [0637] <211> 5  
 [0638] <212> PRT  
 [0639] <213> Homo sapiens  
 [0640] <400> 32  
 [0641] Ser Tyr Ser Met Asn  
 [0642] 1 5  
 [0643] <210> 33  
 [0644] <211> 17  
 [0645] <212> PRT  
 [0646] <213> Homo sapiens  
 [0647] <400> 33  
 [0648] Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 [0649] 1 5 10 15  
 [0650] Gly  
 [0651] <210> 34  
 [0652] <211> 9  
 [0653] <212> PRT  
 [0654] <213> Homo sapiens  
 [0655] <400> 34  
 [0656] Glu Ser Gly Trp Tyr Leu Phe Asp Tyr  
 [0657] 1 5  
 [0658] <210> 35  
 [0659] <211> 11  
 [0660] <212> PRT  
 [0661] <213> Homo sapiens  
 [0662] <400> 35

[0663] Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp Leu Ala  
 [0664] 1 5 10  
 [0665] <210> 36  
 [0666] <211> 7  
 [0667] <212> PRT  
 [0668] <213> Homo sapiens  
 [0669] <400> 36  
 [0670] Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser  
 [0671] 1 5  
 [0672] <210> 37  
 [0673] <211> 9  
 [0674] <212> PRT  
 [0675] <213> Homo sapiens  
 [0676] <400> 37  
 [0677] Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro Thr  
 [0678] 1 5  
 [0679] <210> 38  
 [0680] <211> 118  
 [0681] <212> PRT  
 [0682] <213> Homo sapiens  
 [0683] <400> 38  
 [0684] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 [0685] 1 5 10 15  
 [0686] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 [0687] 20 25 30  
 [0688] Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 [0689] 35 40 45  
 [0690] Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val  
 [0691] 50 55 60  
 [0692] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 [0693] 65 70 75 80  
 [0694] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0695] 85 90 95  
 [0696] Ala Arg Glu Ser Gly Trp Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 [0697] 100 105 110  
 [0698] Leu Val Thr Val Ser Ser  
 [0699] 115  
 [0700] <210> 39  
 [0701] <211> 107

[0702] <212> PRT  
 [0703] <213> Homo sapiens  
 [0704] <400> 39  
 [0705] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 [0706] 1 5 10 15  
 [0707] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
 [0708] 20 25 30  
 [0709] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
 [0710] 35 40 45  
 [0711] Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 [0712] 50 55 60  
 [0713] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 [0714] 65 70 75 80  
 [0715] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro  
 [0716] 85 90 95  
 [0717] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
 [0718] 100 105  
 [0719] <210> 40  
 [0720] <211> 444  
 [0721] <212> PRT  
 [0722] <213> Homo sapiens  
 [0723] <400> 40  
 [0724] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 [0725] 1 5 10 15  
 [0726] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr  
 [0727] 20 25 30  
 [0728] Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 [0729] 35 40 45  
 [0730] Ser Tyr Ile Ser Ser Ser Ser Ser Thr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val  
 [0731] 50 55 60  
 [0732] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr  
 [0733] 65 70 75 80  
 [0734] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0735] 85 90 95  
 [0736] Ala Arg Glu Ser Gly Trp Tyr Leu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 [0737] 100 105 110  
 [0738] Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro  
 [0739] 115 120 125  
 [0740] Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly

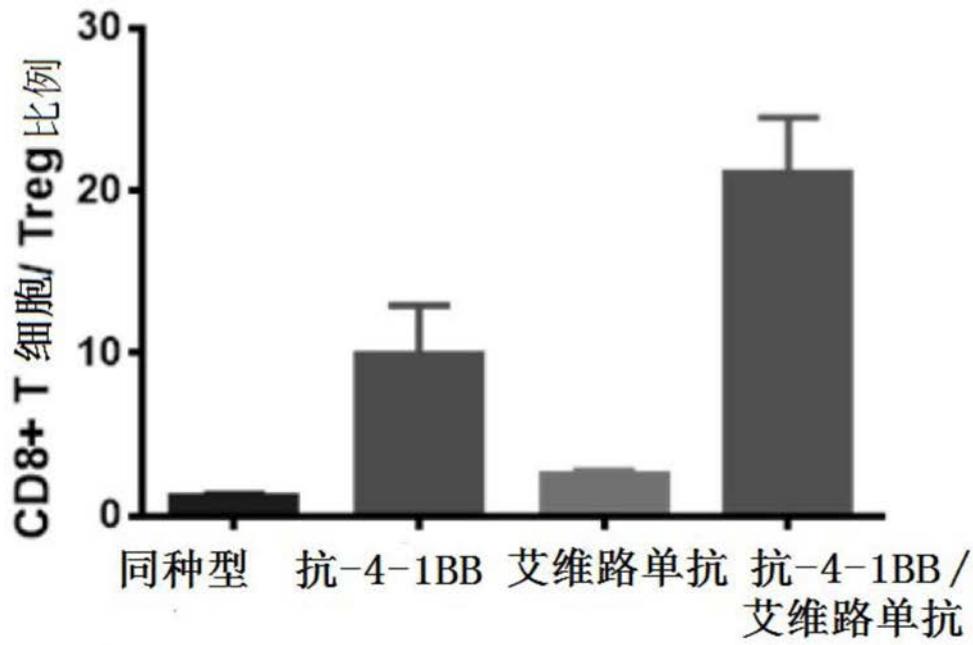
[0741]	130	135	140
[0742]	Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
[0743]	145	150	155
[0744]	Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
[0745]		165	170
[0746]	Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
[0747]		180	185
[0748]	Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser		
[0749]		195	200
[0750]	Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys		
[0751]	210	215	220
[0752]	Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe		
[0753]	225	230	235
[0754]	Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val		
[0755]		245	250
[0756]	Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe		
[0757]		260	265
[0758]	Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro		
[0759]		275	280
[0760]	Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr		
[0761]	290	295	300
[0762]	Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val		
[0763]	305	310	315
[0764]	Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr		
[0765]		325	330
[0766]	Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg		
[0767]		340	345
[0768]	Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly		
[0769]		355	360
[0770]	Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro		
[0771]	370	375	380
[0772]	Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser		
[0773]	385	390	395
[0774]	Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln		
[0775]		405	410
[0776]	Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His		
[0777]		420	425
[0778]	Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[0779]	435	440	

[0780] <210> 41  
 [0781] <211> 214  
 [0782] <212> PRT  
 [0783] <213> Homo sapiens  
 [0784] <400> 41  
 [0785] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 [0786] 1 5 10 15  
 [0787] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Ser Ser Trp  
 [0788] 20 25 30  
 [0789] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Glu Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile  
 [0790] 35 40 45  
 [0791] Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 [0792] 50 55 60  
 [0793] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
 [0794] 65 70 75 80  
 [0795] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Pro  
 [0796] 85 90 95  
 [0797] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala  
 [0798] 100 105 110  
 [0799] Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly  
 [0800] 115 120 125  
 [0801] Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
 [0802] 130 135 140  
 [0803] Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln  
 [0804] 145 150 155 160  
 [0805] Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
 [0806] 165 170 175  
 [0807] Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
 [0808] 180 185 190  
 [0809] Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
 [0810] 195 200 205  
 [0811] Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
 [0812] 210



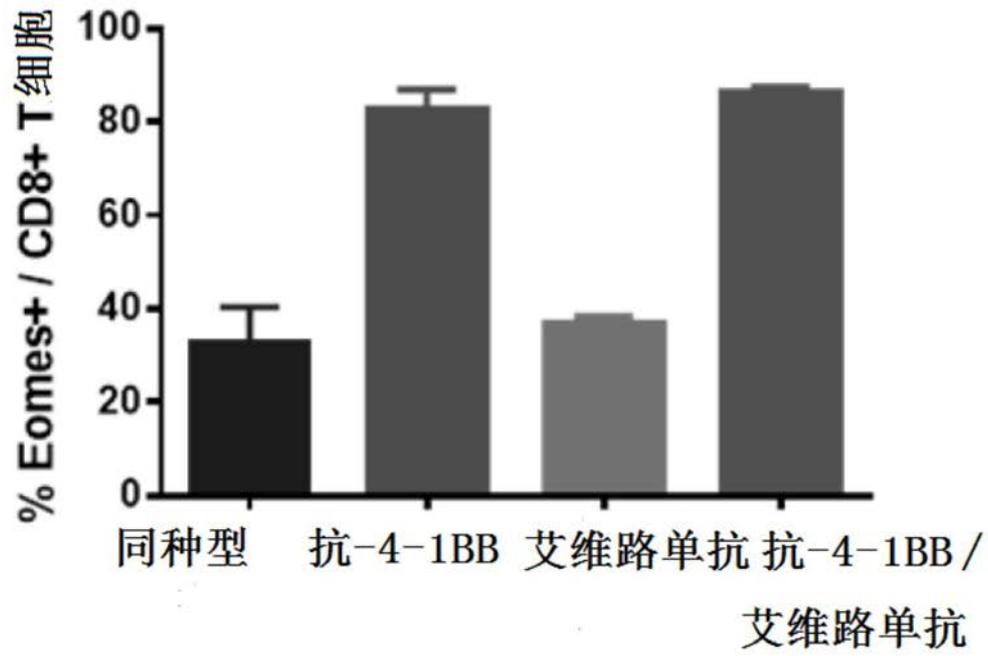
抗-4-1BB / 艾维路单抗  
vs 同种型,  $P < 0.0001$   
vs 抗-4-1BB,  $P < 0.01$   
vs 艾维路单抗,  $P < 0.05$

图1



抗-4-1BB / 艾维路单抗  
vs 同种型,  $P < 0.01$   
vs 抗-4-1BB,  $P < 0.05$   
vs 艾维路单抗,  $P < 0.01$

图2



抗-4-1BB / 艾维路单抗  
vs 同种型,  $P < 0.0001$   
vs 抗-4-1BB, 不显著  
vs 艾维路单抗,  $P < 0.0001$

图3