



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114380909 A

(43) 申请公布日 2022.04.22

(21) 申请号 202111409317.7

(51) Int.Cl.

(22) 申请日 2016.03.29

G07K 16/28 (2006.01)

(30) 优先权数据

62/140,135 2015.03.30 US

(62) 分案原申请数据

201680026424.2 2016.03.29

(71) 申请人 斯特库比股份有限公司

地址 韩国首尔

申请人 得克萨斯大学体系董事会

(72) 发明人 S·S·刘 E·M·钟 Y-S·金

M-C·洪 C-W·李 S-O·林

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所

有限公司 11038

代理人 李程达

权利要求书1页 说明书63页

序列表30页 附图16页

(54) 发明名称

特异性针对糖基化的PD-L1的抗体及其使用方法

(57) 摘要

提供了抗体,其相对于未糖基化的PD-L1特异性结合糖基化的PD-L1。提供了抗体,其识别糖基化的PD-L1蛋白质的特异性表位并可以阻断PD-L1与PD-1的结合。在一些方面,还提供了PD-L1多肽,其在PD-L1细胞外结构域的氨基和羧基末端位置处包含糖基化的氨基酸残基。还提供了制备和使用这些抗体和多肽(例如,用于治疗癌症)的方法。

1. 分离的抗体,其相对于未糖基化的PD-L1选择性结合糖基化的PD-L1并抑制糖基化的PD-L1与PD-1的结合。

2. 权利要求1所述的分离的抗体,其是重组工程化的、嵌合的、人源化的或完全人的。

3. 权利要求1或2所述的分离的抗体,其中所述抗体相对于未糖基化的PD-L1选择性地结合PD-L1蛋白质的区域内的氨基酸残基,该区域包含SEQ ID NO:1中的氨基酸位置35、192、200和/或219。

4. 权利要求1至3中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体结合糖基化的PD-L1,其 $K_d$ 小于所述抗体与未糖基化的PD-L1结合所显示的 $K_d$ 的一半。

5. 权利要求4所述的分离的抗体,其中所述抗体结合糖基化的PD-L1,其 $K_d$ 小于所述抗体与未糖基化的PD-L1结合所显示的 $K_d$ 的至少十分之一。

6. 权利要求1至5中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体以5-20nM的亲和力结合糖基化的PD-L1。

7. 权利要求1至3中任一项所述的分离的抗体,其中可通过荧光标签直接或间接检测的抗体优先地结合表达糖基化的PD-L1的细胞,其测量的荧光强度(MFI)在细胞流式细胞术测定中是所述抗体结合表达非糖基化的PD-L1的细胞所显示的MFI的2倍至10倍高。

8. 权利要求7所述的分离的抗体,其中所述抗体优先地结合表达糖基化的PD-L1的细胞,其MFI是所述抗体结合表达非糖基化的PD-L1的细胞所示显示的MFI的3倍至5倍或更高。

9. 权利要求1至8中任一项所述的分离的抗体,其特异性结合糖基化的PD-L1的表位,所述表位包含SEQ ID NO:1的氨基酸56、62、69和75中的至少一个。

10. 权利要求9所述的分离的抗体,其中所述表位包含SEQ ID NO:1的L48至H78区域内的氨基酸。

## 特异性针对糖基化的PD-L1的抗体及其使用方法

[0001] 本申请是申请号201680026424.2的分案申请。

[0002] 序列表

[0003] 本申请包含已经以ASCII格式电子提交的序列表,其通过引用整体并入本文。2016年3月25日创建的ASCII副本命名为24258.105003PCT\_SL.txt,大小为41,706字节。

[0004] 相关领域

[0005] 本公开一般涉及分子生物学、药物和肿瘤学领域。更具体地,提供了特异性结合糖基化的PD-L1的新抗体及其用于治疗癌症的用途。

[0006] 背景

[0007] T细胞活化的永生(perpetuation)已经大大改变了对广泛的恶性癌症的治疗。例如,伊匹单抗(ipilimumab),第一种得到FDA批准的靶向T细胞应答的检查点阻断剂,使得治疗转移性黑色素瘤成为可能(Hodi,F.S.等,2010,NEJM,363:711-723;Robert,C.等人,2013,Clin.Cancer Res.,19:2232-2239;和Robert,C.等人,2011,NEJM,364:2517-2526)。虽然抗细胞毒性T淋巴细胞抗原-4(CTLA-4)单克隆抗体在治疗黑素瘤患者方面显示出有希望的结果,但已经证明靶向PD-1或PD-L1的第二代检查点抑制剂在III期临床试验中具有更好的临床活性和安全性(Topalian,S.L.等人,2012,NEJM,366:2443-54;和Brahmer,J.R.等人,2012,NEJM,366:2455-2465)。因为PD-L1除了免疫抑制活性之外还具有诱导癌细胞进程的致癌潜力(Topalian,S.L.等人,同上;Page,D.B.等人,2014,Ann.Rev.Med.,65:185-202),因此,靶向PD-1/PD-L1相互作用通过阻断经由PD-1的免疫抑制同时减少经由PD-L1的细胞进程而提供双重功效,并预期具有更敏感的结果(Topalian,S.L.等人,同上;Brahmer,J.R.等人,同上;和Hamid,O.,2013,NEJM,369:134-144)。美国FDA已经批准了两种用于治疗某些癌症的抗PD-1治疗性抗体:KEYTRUDA®(pembrolizumab)和OPDIVO®(nivolumab)。虽然已经有数个成功的临床试验,其中得到有希望的结果(Page,D.B.等,同上),但PD-L1的病理生理功能和调节机制仍然没有得到充分的定义。

[0008] 最近,在手术切除、化疗、放疗和靶向治疗之后的很多治疗选项中加上了重新唤醒沉默的免疫应答,特别是效应T细胞。尽管最初证明使用抗CTLA-4单克隆抗体(Dunn等人,2002,Nature Immunology,3:991-998;和Leach等人,1996,Science,271:1734-36)在治疗转移性黑色素瘤中有效,其还显示诱导自身免疫应答。与仅影响免疫细胞的抗CTLA-4抗体不同,抗PD-L1抗体和抗PD-1抗体在细胞水平和肿瘤位点起作用以阻断表达PD-1的效应T细胞和表达PD-L1的肿瘤细胞之间的相互作用。这产生了来自肿瘤细胞和T细胞的双重影响,从而限制了不良反应并提供了更好的治疗功效(Okazaki,T.等人,2013,Nature immunology,14:1212-1218)。仍然需要成功地靶向PD-1/PD-L1途径并激活免疫系统的效应细胞以攻击肿瘤细胞并治疗癌症新的和更有效的疗法和方法。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明人已经发现在肿瘤细胞上表达的PD-L1(也称为CD274、PDCD1L1或B7-H1)的糖基化促进或增强与在免疫效应细胞如T细胞上表达的PD-1的结合,由此增加针对肿瘤细胞的T细胞活性的抑制。本发明人已经鉴定出相对于未糖基化的人PD-L1多肽特异地并优

先地结合糖基化的人PD-L1多肽并且阻断或抑制糖基化的PD-L1与PD-1的结合的抗体。如本文所用,对于糖基化的人PD-L1是特异的并且抑制糖基化的PD-L1与PD-1的结合的这种抗体被称为“抗glycPD-L1抗体”。

[0011] 还提供了通过施用这些抗glycPD-L1抗体中的一种或多种在有需要的受试者中治疗癌症的方法,特别是其细胞表达或过表达PD-L1的癌症。如本文所述的抗glycPD-L1抗体抑制或阻断PD-1和PD-L1之间的相互作用,其又抑制由PD-1/PD-L1相互作用产生的免疫抑制,从而允许表达PD-1的效应T细胞针对表达PD-L1(由肿瘤细胞表达的免疫抑制配体)的肿瘤细胞的细胞毒活性的永生。通过抑制PD-1/PD-L1相互作用,如本文所述的抗glycPD-L1抗体能增强效应T细胞应答并介导抗肿瘤活性。如本文所用,术语未糖基化的PD-L1和非糖基化的PD-L1可互换使用。除非另有说明,本文所用的“PD-L1”是指PD-L1蛋白质、多肽或肽,特别是人PD-L1(其包含信号序列的氨基酸序列为SEQ ID NO:1);“PD-1”是指PD-1蛋白质、多肽或肽,特别是人PD-1。

[0012] 本发明人进一步发现人PD-L1在人PD-L1蛋白质的细胞外结构域(ECD)的四个位点在氨基酸位置N35、N192、N200和/或N219处被糖基化,例如SEQ ID NO:1中所示。如所述的抗glycPD-L1抗体可以与这些位点中的一个或多个结合,并且例如可以不结合在这些糖基化位点的一个或多个具有突变(例如,谷氨酰胺取代在糖基化共有序列内的天冬酰胺),并因此在这些位点的一个或多个处不被糖基化的PD-L1。因此,在一些实施方案中,抗glycPD-L1抗体特异性结合PD-L1糖多肽或其肽中的一个或多个糖基化基序。在一些实施方案中,抗glycPD-L1抗体结合包含糖基化基序和相邻肽的PD-L1糖肽。在一些实施方案中,抗glycPD-L1抗体结合在三维结构中位于一个或多个糖基化基序附近的肽序列。因此,在实施方案中,抗glycPD-L1抗体识别并选择性结合糖基化的PD-L1的构象表位。举例来说,在某些实施方案中,抗glycPD-L1抗体结合糖基化的PD-L1,其 $K_d$ 值为相对于未糖基化的PD-L1所显示的 $K_d$ 值的小于85%、小于80%、小于75%、小于70%、小于65%、小于60%、小于55%、小于50%、小于45%,但在实施方案中,为相对于未糖基化的PD-L1的 $K_d$ 的不超过5%、10%、15%、20%或25%。应当理解,包含等于或在上述 $K_d$ 值之间的值。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体与糖基化的PD-L1蛋白质结合,其 $K_d$ 小于相对于未糖基化的PD-L1所显示的 $K_d$ 的一半,但仍显示双重抗糖基化的PD-L1功能。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体与糖基化的PD-L1蛋白质结合,其 $K_d$ 小于相对于未糖基化的PD-L1所显示的 $K_d$ 的至少五分之一。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体结合糖基化的PD-L1蛋白,其 $K_d$ 小于相对于未糖基化的PD-L1蛋白所显示的 $K_d$ 的至少十分之一。在某些实施方案中,抗glycPD-L1抗体优先地结合表达WT糖基化的PD-L1的细胞,比结合表达非糖基化的PD-L1的细胞的频率高至少1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍,例如在细胞流式细胞术测定法中测定的,其中将表达WT PD-L1和未糖基化的PD-L1的细胞混合并差异标记,然后与待测定用可检测的标记物的标记的抗体接触,例如如实施例5所述,例如通过当抗体用荧光标签或标记物(如FITC)直接或间接检测时两个细胞群体的测量的荧光强度(MFI)。在一个实施方案中,用荧光标签或标记物(例如FITC)直接标记抗体。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体以5-20nM、5-10nM或10-20nM的亲和力选择性地结合糖基化的PD-L1蛋白。在一个实施方案中,抗体是单克隆抗体,更优选是嵌合的或人源化的或人抗体。术语“特异性结合”和“选择性结合”在本文中可互换使用。

[0013] 在具体方面,提供了抗glycPD-L1单克隆抗体STM004,其重链和轻链可变结构域分

别具有SEQ ID NO:3和11(成熟V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>区氨基酸序列)或分别具有SEQ ID NO:86和88的氨基酸序列(其含有信号肽序列及其抗原结合部分),以及其人源化和嵌合形式。已经确定STM004结合对应于PD-L1上本文SEQ ID NO:1所示的人PD-L1氨基酸序列的Y56、K62和K75位置的氨基酸残基的表位,并且是构象表位。人PD-L1多肽包含STM004 MAb表位的部分具有序列LDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEEEDLKVQH(SEQ ID NO:93)。如本文所示,对包含被MAb STM004识别的表位即与结合PD-L1的mAb接触的氨基酸残基Y56、K62和K75加下划线。本文提供了抗glycPD-L1抗体,其与STM004 MAb竞争与PD-L1的结合和/或结合与STM004相同的表位。

[0014] STM004 MAb的重链和轻链可变(V)结构域的核酸(DNA)和相应的氨基酸序列如下表3所示。SEQ ID NO:2、3、10和11是重链和轻链可变结构域的成熟形式(即不具有信号肽)的核苷酸和氨基酸序列。表3还提供了SEQ ID NO:85-88,即重链和轻链可变结构域的核苷酸和氨基酸序列,其中信号序列以斜体字体表示。表3中还显示了STM004的Kabat和Chothia重链和轻链V结构域CDR。

[0015] 在一个实施方案中,特异地并优先地结合糖基化的PD-L1的抗glycPD-L1抗体包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的V<sub>H</sub>结构域和/或具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的V<sub>L</sub>结构域。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体与包含SEQ ID NO:3的V<sub>H</sub>结构域和SEQ ID NO:11的V<sub>L</sub>结构域的抗体竞争与糖基化的PD-L1的特异性结合。在其它实施方案中,抗glycPD-L1抗体包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的V<sub>H</sub>结构域和/或与SEQ ID NO:11的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的V<sub>L</sub>结构域。这些抗glycPD-L1抗体可以是嵌合抗体,并且包含例如来自人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的人恒定结构域。

[0016] 在一个实施方案中,特异地并优先地结合糖基化的PD-L1的抗glycPD-L1抗体包含V<sub>H</sub>结构域,其包含分别具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:8的氨基酸序列的Chothia CDR 1-3,或分别具有来自SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9的氨基酸序列的Kabat CDR 1-3,或其组合。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体与这样的抗体竞争与糖基化的PD-L1的特异性结合,所述抗体包含V<sub>H</sub>结构域,其包含分别具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:8的氨基酸序列的Chothia CDR 1-3,包含分别具有SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:9的氨基酸序列的Kabat CDR 1-3,或其组合。在一个实施方案中,特异地并优先地结合糖基化的PD-L1的抗glycPD-L1抗体包含V<sub>L</sub>结构域,其包含分别具有SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR 1-3。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体与这样的抗体竞争与糖基化的PD-L1的特异性结合,所述抗体包含V<sub>L</sub>结构域,其包含分别具有SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体包含或竞争结合包含如下V<sub>H</sub>结构域并且包含如下V<sub>L</sub>结构域的抗体,所述V<sub>H</sub>结构域包含分别具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:8的氨基酸序列的Chothia CDR 1-3,或包含分别具有来自SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:9的氨基酸序列的Kabat CDR 1-3,所述V<sub>L</sub>结构域包含分别具有SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR 1-3。

[0017] 在其它实施方案中,抗glycPD-L1抗体具有包含CDR H1、H2和H3的V<sub>H</sub>结构域,所述CDR H1、H2和H3的氨基酸序列在分别具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR或在分别具有SEQ ID NO:5、SEQ ID No:7和SEQ ID NO:9的氨基酸序列的CDR

的1、2或3个中有1、2、3、4或5个氨基酸取代。抗glycPD-L1抗体可以具有包含CDR L1、L2和L3的V<sub>L</sub>结构域,所述CDR L1、L2和L3的氨基酸序列在分别具有SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR的1、2或3个中有1、2、3、4或5个氨基酸取代。抗glycPD-L1抗体可以在V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>结构域的CDR中具有氨基酸取代。在一些实施方案中,氨基酸取代是保守取代。

[0018] 优选地,前述抗体具有人框架区,即是STM004的人源化形式,并且任选地包含人恒定结构域,例如来自人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[0019] 本领域技术人员将理解,可以在人源化抗体的CDR和/或框架区域中进行一个或多个氨基酸取代以提高结合亲和力或其它参数。在实施方案中,抗glycPD-L1抗体与包含上述V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>结构域和其中的CDR的抗体竞争与糖基化的PD-L1的特异性结合。在实施方案中,抗glycPD-L1抗体结合糖基化的PD-L1,其K<sub>d</sub>小于抗体与未糖基化的PD-L1结合所显示的K<sub>d</sub>的一半。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体结合糖基化的PD-L1蛋白,其K<sub>d</sub>小于相对于未糖基化的PD-L1所显示的K<sub>d</sub>的至少5分之一。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体结合糖基化的PD-L1蛋白,其K<sub>d</sub>小于抗体与未糖基化的PD-L1蛋白结合所显示的K<sub>d</sub>的至少10分之一。在一个实施方案中,在如实施例5所述的细胞流式细胞术结合测定法中,抗体显示出由MFI表示的与表达WT PD-L1的细胞的结合是与表达未糖基化的PD-L1的细胞结合的MFI的1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。在一个实施方案中,所述抗体是通过荧光标签(label)或标记物(marker)直接或间接可检测的。在一个实施方案中,用荧光标签或标记物(例如FITC)直接标记抗体。在一个实施方案中,STM004 MAb或者其嵌合或人源化形式对糖基化的PD-L1的结合亲和力为5-20nM或5-10nM,包括上下限值。在一个实施方案中,抗体抑制PD-1与PD-L1的相互作用,并且特别地抑制由效应T细胞表达的PD-1与PD-L1,特别是由肿瘤表达的糖基化的PD-L1的相互作用。

[0020] 在另一个具体方面,提供了抗glycPD-L1单克隆抗体STM115,其重链和轻链可变结构域分别具有SEQ ID NO:19和27(成熟V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>区氨基酸)或分别具有SEQ ID NO:90和92(这些序列含有信号肽序列)的氨基酸序列,以及其特异性结合糖基化的PD-L1的抗原结合部分,及其人源化和嵌合形式。STM115 MAb的重链和轻链可变(V)结构域的核酸(DNA)和相应的氨基酸序列如下表3所示。SEQ ID NO 18、19、26和27是编码重链和轻链可变结构域的成熟形式(即不具有信号肽)的氨基酸序列的核苷酸序列。表3还提供了SEQ ID NO:89-92为包含信号序列的重链和轻链可变结构域的核苷酸和氨基酸序列,其中信号序列以斜体字体表示。表3中还显示了STM115的Kabat和Chothia重链和轻链V结构域CDR。还提供抗glycPD-L1抗体,其与STM115 MAb竞争与PD-L1的结合,和/或结合与STM115相同的表位。

[0021] 在一个实施方案中,特异地并优先地结合糖基化的PD-L1的抗glycPD-L1抗体包含具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的V<sub>H</sub>结构域和/或具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的V<sub>L</sub>结构域。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体与包含SEQ ID NO:19的V<sub>H</sub>结构域和SEQ ID NO:27的V<sub>L</sub>结构域的抗体竞争与糖基化的PD-L1的特异性结合。在一个实施方案中,特异地并优先地结合糖基化的PD-L1的抗glycPD-L1抗体包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的V<sub>H</sub>结构域和/或与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%相同的V<sub>L</sub>结构域。这些抗glycPD-L1抗体可以是嵌合抗体,并且包含人恒定结构域,例如来自人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

[0022] 在一个实施方案中,特异地并优先地结合糖基化的PD-L1的抗glycPD-L1抗体包含 $V_H$ 结构域,其包含分别具有SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22或SEQ ID NO:24的氨基酸序列的Chothia CDR 1-3,或包含分别具有SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:25的氨基酸序列的Kabat CDR 1-3,或其组合。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体与包含如下 $V_H$ 结构域的抗体竞争与糖基化的PD-L1的特异性结合,其中 $V_H$ 结构域包含分别具有SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24的氨基酸序列的Chothia CDR 1-3,或分别具有SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:25的氨基酸序列的Kabat CDR 1-3,或其组合。在一个实施方案中,特异地并优先地结合糖基化的PD-L1的抗glycPD-L1抗体包含 $V_L$ 结构域,其包含分别具有SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDR 1-3。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体与包含如下 $V_L$ 结构域的抗体竞争与糖基化的PD-L1的特异性结合,其中所述 $V_L$ 结构域包含分别具有SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDR 1-3,或其组合。在一个实施方案中,特异地并优先地结合糖基化的PD-L1的抗glycPD-L1抗体包含或竞争结合包含如下 $V_H$ 结构域并包含如下 $V_L$ 结构域的抗体,其中所述 $V_H$ 结构域包含分别具有SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:24的氨基酸序列的Chothia CDR 1-3,或包含分别具有SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:25的氨基酸序列的Kabat CDR 1-3,并且所述 $V_L$ 结构域包含分别具有SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDR 1-3。

[0023] 在某些实施方案中提供了具有包含CDR H1、H2和H3的 $V_H$ 结构域的抗glycPD-L1抗体,其中所述CDR H1、H2和H3的氨基酸序列在分别具有SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:24的氨基酸序列,或分别具有SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:25的氨基酸序列的1、2或3个CDR中有1、2、3、4或5个氨基酸取代。抗glycPD-L1抗体还可以具有包含CDR L1、L2和L3的 $V_L$ 结构域,其中所述CDR L1、L2和L3的氨基酸序列在分别具有SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:32的氨基酸序列的1、2或3个CDR中有1、2、3、4或5个氨基酸取代。抗glycPD-L1抗体可以在 $V_H$ 和 $V_L$ 结构域中的CDR中具有氨基酸取代。在一些实施方案中,氨基酸取代是保守取代。

[0024] 在实施方案中,抗glycPD-L1抗体与包含上述 $V_H$ 和 $V_L$ 结构域及其CDR的抗体竞争与糖基化的PD-L1的特异性结合。优选地,这些抗体具有人框架区,即是人源化形式的STM115,并且任选地包含人恒定结构域,例如来自人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。本领域技术人员将理解,可以在人源化抗体的CDR或框架区域中进行一个或多个氨基酸取代以提高结合亲和力或其它参数。在实施方案中,抗glycPD-L1抗体结合糖基化的PD-L1,其 $K_d$ 小于相对于未糖基化的PD-L1所显示的 $K_d$ 的一半。在实施方案中,抗glycPD-L1抗体结合糖基化的PD-L1蛋白,其 $K_d$ 小于相对于未糖基化的PD-L1所显示的 $K_d$ 的一半。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体结合糖基化的PD-L1蛋白,其 $K_d$ 小于所述抗体与未糖基化的PD-L1结合所显示的 $K_d$ 的至少5分之一。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体结合糖基化的PD-L1蛋白,其 $K_d$ 小于所述抗体与未糖基化的PD-L1蛋白结合所显示的 $K_d$ 的至少10分之一。在一个实施方案中,在如实施例5所述的细胞流式细胞术结合测定法中,抗体表现出由MFI表示的与表达WT PD-L1的细胞的结合是与表达未糖基化的PD-L1的细胞结合的MFI的1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。在一个实施方案中,所述抗体是通过荧光标签或标记物直接或间接可检测的。在一个实施方案中,用荧光标签或标记物如FITC直接标记抗体。在一个实施方案中,用

于糖基化的PD-L1的STM115 MAb或者其结合结构域或其人源化或嵌合形式的结合亲和力为5-20nM或5-10nM,包括上下限值。在一个实施方案中,抗体抑制PD-1与PD-L1的相互作用,并且特别地抑制由效应T细胞表达的PD-1与PD-L1,特别是由肿瘤细胞表达的糖基化的PD-L1的相互作用。

[0025] 在一方面,提供了分离的抗glycPD-L1抗体,其结合糖基化的PD-L1,并且通过常规竞争法来测定时,其与如本文所述的MAb STM004或MAb STM115竞争或交叉竞争与糖基化的PD-L1的特异性结合。在一方面,提供了分离的抗体,其与MAb STM004、MAb STM115结合相同的表位,或提供了如本文所述的分离的抗glycPD-L1 MAb。

[0026] 另一方面提供了分离的抗glycPD-L1抗体,其特异性结合PD-L1序列LDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHGEE DLK VQH (SEQ ID NO:93)中的表位。

[0027] 在某个实施方案中提供了分离的抗glycPD-L1抗体,其结合包含SEQ ID NO:1的人PD-L1蛋白质的氨基酸残基Y56、K62和K75的表位。在一方面,提供了分离的抗glycPD-L1抗体,其特异性结合糖基化的人PD-L1,当与人PD-L1结合时,所述抗体结合至少一个如下氨基酸残基:SEQ ID NO:1的Y56、K62或K75,其中所述抗体抑制人PD-1与人糖基化的PD-L1的结合。

[0028] 在另一个实施方案中提供了分离的抗glycPD-L1抗体,其结合包含SEQ ID NO:1的人PD-L1蛋白质的氨基酸残基K62、H69和K75的表位。在一方面,提供了分离的抗glycPD-L1抗体,其特异性结合糖基化的人PD-L1,当与人PD-L1结合时,所述抗体结合至少一个如下氨基酸残基:SEQ ID NO:1的K62、H69或K75,其中所述抗体抑制人PD-1与人糖基化的PD-L1的结合。在实施方案中,抗glycPD-L1抗体与包含PD-L1的表位区域的至少两个、至少三个或四个氨基酸残基相接触。

[0029] 在另一方面,提供了分离的抗体,其特异性结合糖基化的人PD-L1,当与人PD-L1结合时,所述抗体结合SEQ ID NO:1的L48至H78的氨基酸区域内的至少一个氨基酸。在一方面,提供了分离的抗体,其特异性结合糖基化的人PD-L1,当与人PD-L1结合时,所述单克隆抗体结合如下氨基酸残基:SEQ ID NO:1的L48至H78的氨基酸区域内的Y56、K62、K75;其中所述单克隆抗体抑制PD-1与PD-L1,特别是人PD-1与人糖基化的PD-L1的结合。在另一方面,提供了分离的抗体,其特异性结合糖基化的人PD-L1,当与人PD-L1结合时,所述抗体结合SEQ ID NO:1的D61至H78的氨基酸区域内的至少一个氨基酸。一方面,提供了分离的抗体,其特异性结合糖基化的人PD-L1,当与人PD-L1结合时,所述单克隆抗体结合如下氨基酸残基:SEQ ID NO:1的D61至H78的氨基酸区域内的K62、H69和K75;其中所述单克隆抗体抑制PD-1与PD-L1特别是人PD-1与人糖基化的PD-L1的结合。

[0030] 在另一方面,提供了分离的抗glycPD-L1抗体,其特异性结合糖基化的人PD-L1蛋白质,当与人PD-L1结合时,所述抗体结合在人PD-L1蛋白质(SEQ ID NO:1)的氨基酸区域L48-H78内或氨基酸区域D61-H78内。

[0031] 提供了分离的抗体或其结合片段,其相对于与非糖基化的人PD-L1,特异地并优先地结合糖基化的人PD-L1,所述抗体包含(a)  $V_H$ 结构域,其包含具有SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:21的氨基酸序列的Kabat CDR1或者具有SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:20的氨基酸序列的Chothia CDR1;具有SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:23的氨基酸序列的Kabat CDR2或者具有SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:22的氨基酸序列的Chothia CDR2;以及具有SEQ ID NO:9或SEQ ID

N0:25的氨基酸序列的Kabat CDR3或者具有SEQ ID N0:8或SEQ ID N0:24的氨基酸序列的Chothia CDR3;和(b)  $V_L$ 结构域,其包含具有SEQ ID N0:12或SEQ ID N0:28的氨基酸序列的CDR1;具有SEQ ID N0:14或SEQ ID N0:30的氨基酸序列的CDR2;以及具有SEQ ID N0:16或SEQ ID N0:32的氨基酸序列的CDR3,其中所述抗体抑制人PD-1和人PD-L1相互作用。在优选的实施方案中,抗体是具有人抗体框架和任选的人抗体恒定结构域的人源化抗体。

[0032] 在另一方面,提供了分离的核苷酸分子,其分别包含选自SEQ ID N0:2或18的核苷酸序列和/或选自SEQ ID N0:10或26的核苷酸序列。一个实施方案提供了分离的核苷酸序列,其编码抗glycPD-L1  $V_H$ 结构域,所述核苷酸序列与SEQ ID N0:2或18的核苷酸序列至少90-98%相同。另一个实施方案提供了分离的核苷酸序列,其编码抗glycPD-L1的 $V_L$ 结构域,所述核苷酸序列与SEQ ID N0:19或26的核苷酸序列至少90-98%相同。在实施方案中,编码 $V_H$ 和/或 $V_L$ 结构域的核苷酸序列分别与SEQ ID N0:2或18或者SEQ ID N0:10或26有90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多相同。这些核苷酸序列编码至少对于特异性结合糖基化的PD-L1的二价抗体而言的 $V_H$ 结构域和 $V_L$ 结构域。

[0033] 在某些方面,抗glycPD-L1抗体是IgG、IgM、IgA,其同种型,例如IgG1、IgG2a、IgG2b、IgG4,或其抗原结合片段。在其它方面,抗glycPD-L1抗体是Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、F(ab')<sub>3</sub>、一价scFv、二价scFv、双特异性抗体、双特异性scFv或单个结构域抗体。在一些方面,抗glycPD-L1抗体是人抗体或人源化抗体。在一方面,重组产生抗glycPD-L1抗体。在另外的方面,抗glycPD-L1抗体缀合于成像剂、化疗剂、毒素或放射性核素。

[0034] 在一方面,提供了一种组合物,其包含在药学上可接受的载体或基质中的抗glycPD-L1抗体(例如,相对于未糖基化的PD-L1选择性地并优先地结合糖基化的PD-L1的抗体)。

[0035] 在另一方面,提供了分离的多肽,其包含人PD-L1的至少7(例如至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多)个连续氨基酸的肽,所述连续氨基酸包含对应于人PD-L1细胞外结构域(ECD)中的N35、N192、N200或N219位置的至少一个氨基酸。在一个实施方案中,分离的多肽包含人PD-L1的至少7(例如至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多)个连续氨基酸的肽,所述连续氨基酸包含对应于人PD-L1的N35、N192、N200或N219位置的至少一个氨基酸,其中对应于PD-L1的N35、N192、N200或N219位置的至少一个氨基酸是糖基化的。在一个实施方案中,分离的多肽与免疫原性多肽(例如钥孔血蓝蛋白, KLH)融合或缀合。在某些方面,多肽还在其氨基(N)-或羧基(C)-末端包含半胱氨酸(Cys)残基。例如,多肽可以通过在Cys残基处的二硫键与免疫原性多肽缀合。在一个具体实施方案中,将包含在对应于人PD-L1的N35、N192、N200或N219位置上糖基化的至少一个氨基酸残基的PD-L1肽用作免疫原以产生抗glycPD-L1抗体。

[0036] 在另一方面,提供了组合物,其包含人PD-L1的至少7(例如至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多)个连续氨基酸的多肽,所述连续氨基酸包含对应于人PD-L1的ECD内N35、N192、N200或N219位置的至少一个氨基酸,其中所述对应于PD-L1的N35、N192、N200或N219位置的至少一个氨基酸是糖基化的,其中在药学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或媒介物中配制所述多肽。

[0037] 在另一方面,提供了免疫原性组合物,其包含人PD-L1的至少7个连续氨基酸的多肽,所述连续氨基酸包含对应于人PD-L1多肽的ECD内N35、N192、N200或N219位置的至少一

个氨基酸,其中所述对应于PD-L1多肽的ECD内N35、N192、N200或N219位置的至少一个氨基酸是糖基化的,并且其中在药理学上可接受的载体、稀释剂、赋形剂或媒介物中配制所述多肽。在一些方面,免疫原性组合物还包含佐剂,例如明矾或弗氏佐剂。

[0038] 在另一方面,提供一种用于治疗有需要的受试者,例如患有癌症的受试者的方法,其包括向所述受试者施用有效量的抗glycPD-L1抗体。在具体实施方案中,抗glycPD-L1抗体是人源化或嵌合形式的MAb STM004或MAb STM115或者如本文所述的另一抗glycPD-L1抗体。在某些实施方案中,抗glycPD-L1抗体是与MAb STM004、MAb STM115或如本文所述的抗glycPD-L1抗体竞争与糖基化的PD-L1的抗体的结合的抗体。在一个实施方案中,提供了在有此需要的受试者中治疗癌症的方法,其中所述方法包括向受试者施用有效量的本文所述的抗体。抗glycPD-L1抗体的施用阻断PD-1的免疫抑制活性,从而促进T细胞的抗癌活性,导致肿瘤细胞杀伤。

[0039] 在非限制性实施方案中,待在受试者中治疗的癌症、疾病或病状是乳腺癌、肺癌、头颈癌、前列腺癌、食管癌、气管癌、皮肤癌脑癌、肝癌、膀胱癌症、胃癌、胰腺癌、胆囊癌、卵巢癌、子宫癌、子宫颈癌、睾丸癌、结肠癌、直肠癌或皮肤癌。在某些实施方案中,待治疗的癌症是肾上腺癌、肛门癌、胆管癌、膀胱癌、骨癌、成人的脑/CNS肿瘤、儿童的脑/CNS肿瘤、乳腺癌、男性乳腺癌、青少年癌症、儿童癌症、年轻成人癌症、未知原发癌、Castleman病、宫颈癌、结肠/直肠癌、子宫内膜癌、食道癌、Ewing家族肿瘤、眼癌、胆囊癌、胃肠类癌肿瘤、胃肠道间质瘤(GIST)、妊娠滋养细胞病、霍奇金病、卡波西肉瘤、肾癌、喉癌或下咽癌、白血病(如成人急性淋巴细胞性白血病(ALL)、急性骨髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、慢性髓细胞白血病(CML)、慢性骨髓单核细胞白血病(CMML)、儿童白血病)、肝癌、肺癌(例如非小细胞、小细胞)、肺类癌肿瘤、淋巴瘤、皮肤淋巴瘤、恶性间皮瘤、多发骨髓瘤、骨髓增生异常综合征、鼻腔癌、鼻旁窦癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤、非霍奇金淋巴瘤、儿童非霍奇金淋巴瘤、口腔癌、口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、阴茎癌、垂体瘤、前列腺癌、视网膜母细胞瘤、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、肉瘤(如成人软组织癌)、皮肤癌(如基底和鳞状细胞、黑素瘤、梅克尔氏细胞)、小肠癌、胃癌、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、子宫肉瘤、阴道癌、外阴癌、瓦尔登氏巨球蛋白血症或肾母细胞瘤。

[0040] 在某些实施方案中,癌症对于PD-L1和第二癌症标志物,例如EGFR是阳性的。可以用抗glycPD-L1抗体和靶向癌症标志物的抗癌剂的组合治疗这样的癌症,所述抗癌剂例如受体酪氨酸激酶抑制剂,例如EGFR酪氨酸激酶抑制剂,如吉非替尼。

[0041] 在某些方面,抗glycPD-L1抗体是药理学上可接受的组合物。在另外的方面,系统性施用抗体。在特定方面,静脉内、皮内、肿瘤内、肌内、腹膜内、皮下、鞘内或局部施用抗体。在其它方面,可以将一种或多于一种的抗glycPD-L1抗体共同施用于有需要的受试者。抗体的共同施用可涉及在另一抗体之前、之后或同时施用一种抗体。

[0042] 在一方面,提供了一种治疗患有癌症或肿瘤,特别是在癌症或肿瘤细胞表面上表达PD-L1或高表达PD-L1的癌症或肿瘤的受试者的方法。这样的方法包括向有需要的受试者施用有效量的根据本文实施方案的抗glycPD-L1抗体,以抑制或阻断PD-L1与PD-1的相互作用并且预防免疫抑制并促进由受试者的效应T淋巴细胞杀伤癌症或肿瘤细胞。在实施方案中,抗glycPD-L1抗体是STM004或STM115的人源化或嵌合形式,或者与这些抗体中的一种或两者竞争与PD-L1对于比非糖基化的PD-L1的选择性结合。

[0043] 某些实施方案提供在受试者中治疗癌症的方法,包括施用至少两种不同的抗glycPD-L1抗体,优选地产生比一种抗glycPD-L1抗体更强的治疗功效。

[0044] 在一些方面,所述方法还包括向正在接受根据实施方案的抗glycPD-L1抗体治疗的受试者施用至少第二种抗癌疗法或药物。第二种抗癌疗法可以由手术疗法、化疗、放疗、冷冻疗法、激素疗法、免疫疗法或细胞因子疗法构成,但不限于此。第二种抗癌药物也不旨在受到限制,并且能够由本技术领域的临床医生、医学专业人员(例如,肿瘤学家)根据实际或经验确定。如本领域技术人员将理解的,所述至少第二种抗癌疗法或药物的施用可以在施用实施方案的抗体之前、之后或同时进行。

[0045] 在另一方面,提供了确定癌症患者是否受益于使用阻断PD-L1与PD-1结合的试剂的治疗方法,所述方法包括使用优先地结合糖基化的PD-L1的抗体测试衍生自患者癌细胞样品的细胞上糖基化的PD-L1的存在情况;并且如果发现患者癌细胞对于糖基化的PD-L1蛋白质的表达是阳性的,则向患者施用有效量的防止PD-L1与PD-1结合的试剂。在一个实施方案中,防止PD-L1与PD-1结合的试剂是抗glycPD-1抗体,如本文所述的抗PD-1抗体或其组合。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体和/或抗PD-1抗体与另一种抗癌药物或治疗剂组合施用。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体与另外一种抗glycPD-L1抗体组合施用,如本文所述。在一个实施方案中,该方法还涉及从患者获得癌细胞样品。

[0046] 在另一方面,提供了用于评估生物学样品中PD-L1蛋白质的糖基化、N-连接糖基化或N-糖基化的方法,其中所述方法包括使样品与本文所述的抗体接触(例如,相对于未糖基化的PD-L1优先地结合糖基化的PD-L1的抗体,如本文中的STM004或STM115)。在一些方面,该方法是体外方法或测定法。在某些方面,生物学样品是细胞样品、组织样品、体液(例如血浆、血清、血液、尿液、痰液、淋巴、腹水、腹膜内液体、脑或脊髓液等)。在具体实施方案中,样品是细胞样品或者来自患有癌症或肿瘤的受试者获得的肿瘤或癌症的细胞样品。可以使用如本文所述的抗glycPD-L1抗体,就在癌症或肿瘤细胞表面上的糖基化的PD-L1,测定这样的癌症或肿瘤细胞样品,特别是确定如果糖基化的PD-L1存在于受试者的癌症或肿瘤细胞上,则所述细胞可能是作为使用所述抗glycPD-L1抗体的治疗的适合靶标。

[0047] 在另一方面,提供制备抗体的方法,其中所述方法包括向受试者(例如,动物)施用根据实施方案的多肽(例如,包含人PD-L1的至少7个连续氨基酸的片段的多肽,所述连续氨基酸包含对应于人PD-L1的N35、N192、N200或N219位置的至少一个氨基酸,其中所述对应于PD-L1的N35、N192、N200或N219位置的至少一个氨基酸是糖基化的)并从受试者中分离抗体。作为示例,动物可以是非人灵长类、小鼠、大鼠、兔、山羊或人类。在某些方面,所述方法还包括鉴定抗体的CDR,并使用本领域已知的方法和程序将CDR周围的序列(即框架序列)进行人源化以产生人源化抗体。在另外的方面,该方法包括重组表达人源化抗体。因此,在另一个实施方案中,提供了通过前述方法产生的分离的抗体。因此,在一些实施方案中,提供了分离的抗体,其相对于未糖基化的PD-L1选择性地结合实施方案的多肽的表位例如构象表位(例如,包含人PD-L1的至少7个连续氨基酸的片段的多肽,所述连续氨基酸包含对应于人PD-L1的N35、N192、N200或N219位置的至少一个氨基酸,其中所述对应于PD-L1的N35、N192、N200或N219位置的至少一个氨基酸被糖基化)。在一个实施方案中提供了用于免疫受试者以产生免疫应答,例如针对抗原的抗体应答的方法,包括施用有效量的实施方案的多肽(例如,糖基化的PD-L1多肽)作为免疫原性抗原。

[0048] 所描述的实施方案的其它方面、特征和优点将从以下详细描述和说明性示例中变得显而易见。

### 附图说明

[0049] 以下附图形成本说明书的一部分,并且被包括在内以进一步表明本文描述的实施方案的某些方面而不产生限制。

[0050] 图1A-1H。PD-L1在癌细胞中是糖基化的。1A. PD-L1蛋白质在原发性乳腺癌患者样品中的表达。对代表性乳腺癌患者样本中PD-L1的Western印迹分析。1B. 对四个代表性乳腺癌细胞系、四个黑素瘤细胞系、三个肺癌细胞系和三个结肠癌细胞系中PD-L1的Western印迹分析。1C. 在shCTRL和两个独立的shPD-L1稳定克隆的A431细胞中PD-L1表达的Western印迹分析。PD-L1瞬时转染到shPD-L1#5克隆中。1D. 用或不用PNGase F处理的纯化的PD-L1蛋白质的糖蛋白染色。考马斯蓝染色组代表PD-L1蛋白质的总量。泳道4和5中出现的上部的条带来自PNGase F的上样。(-) Ctrl, 非糖蛋白的对照; 及 (+) Ctrl. 糖蛋白对照。1E. PD-L1-GFP、HA-PD-L1和PD-L1-Flag蛋白质的糖基化模式。用PNGase F和Endo H处理细胞裂解物, 并通过Western印迹进行分析。1F. 加GFP标签的PD-L1全长蛋白(WT)、细胞外结构域(ECD)或细胞内结构域(ICD)在293T细胞中瞬时表达。然后加或不加5 $\mu$ g/ml 衣霉素(TM)处理细胞过夜。使用Western印迹检测PD-L1的蛋白质表达。1G. 在本文所述的实验研究中使用的代表性PD-L1蛋白质表达构建体的示意图, 显示全长PD-L1蛋白质及其组分细胞外结构域(ECD)、细胞内结构域(ICD)、信号肽(SP)、跨膜结构域(TM)。在图中, 以红色显示PD-L1的ECD结构域中的四个N-糖基化位点(NXT基序)。数字表示PD-L1多肽中氨基酸残基的位置。1H. Western印迹分析PD-L1WT和PD-L1的糖基化突变体(NQ突变体)的蛋白质表达模式。泳道14表示用衣霉素(TM)处理过夜的非糖基化的野生型(WT)PD-L1。在图中, 黑色圆圈表示糖基化的PD-L1, 黑色箭头表示非糖基化的PD-L1。

[0051] 图2A-2D。PD-L1蛋白在癌细胞中的表达。A. 肺癌细胞中PD-L1的Western印迹分析。B. 结肠癌细胞中PD-L1的Western印迹分析。C. 乳腺癌细胞中PD-L1的Western印迹分析。D. 卵巢癌细胞中PD-L1的Western印迹分析。黑圈=糖基化的PD-L1; 箭头=非糖基化的PD-L1。

[0052] 图3A-3D。PD-L1在癌细胞中是糖基化的。A. 使用不同抗PD-L1抗体在癌细胞中PD-L1的Western印迹分析。选择四个BLBC细胞系, HCC1937、SUM149、MB-231和BT20, 以及两个非BLBC细胞系, MB-483和MB-474以使用不同抗体来分析PD-L1的表达。B. 在shCTRL和两个独立的shPD-L1稳定克隆的MDA-MB-231和A431细胞中PD-L1的Western印迹分析。C. PD-L1的Flag-PD-L1和shRNA的双重表达构建体示意图。D. MDA-MB-231和A431细胞中PD-L1蛋白质的糖基化模式。细胞裂解物用PNGase F处理, 并通过Western印迹进行分析。黑圈=糖基化的PD-L1; 箭头=非糖基化的PD-L1。

[0053] 图4A-4E。糖基化的和非糖基化的PD-L1蛋白质的表达。A. 衣霉素(TM)处理的细胞中PD-L1-Myc、PD-L1-Flag和HA-PD-L1蛋白质的Western印迹分析。B. 衣霉素(TM)处理的或未处理的细胞中PD-L1-GFP-WT、PD-L1-GFP-ECD和PD-L1-GFP-ICD蛋白质的Western印迹分析。C. 衣霉素(TM)处理的细胞中PD-L1-Myc、PD-L1-Flag、HA-PD-L1、PD-L1-GFP-WT、PD-L1-GFP-ECD和PD-L1-GFP-ICD蛋白质的Western印迹分析。通过光密度定量法(在Western印迹分析中的条形图)中测定糖基化的PD-L1蛋白质(黑色条)或非糖基化的PD-L1蛋白质(红色

条)的强度。D.从上述(c)所示条形图获得糖基化的PD-L1蛋白质(黑条)或非糖基化的PD-L1蛋白质(红条)的强度平均值。误差条代表SD。E.在表达PD-L1的HEK 293T细胞中PD-L1蛋白质的糖基化模式。加或不加PNGase F或O-糖苷酶处理细胞裂解物,并通过Western印迹进行分析。黑圈=糖基化的PD-L1;箭头=非糖基化的PD-L1。如本领域技术人员所理解的,衣霉素是抑制蛋白质的N-连接糖基化的核苷抗生素。(Heifetz, A. 等人, 1979, *Biochemistry*, 18:2186-2192)。

[0054] 图5A和5B。PD-L1蛋白质的N-糖基化位点。来自不同物种的PD-L1氨基酸序列的序列比对。四个NXT基序N35、N192、N200和N219被框出并以红色呈现,两个非NXT基序N63和N204以绿色呈现。红框=保守的NXT基序。图5A:共有序列(SEQ ID NO:74);Q9NZQ7\_HUMAN (SEQ ID NO:75);Q9EP73\_MOUSE (SEQ ID NO:76);D4AE25\_RAT (SEQ ID NO:77);C5NU11\_BOVINE (SEQ ID NO:78);Q4QTK1\_PIG (SEQ ID NO:79)和F7DZ76\_HORSE (SEQ ID NO:80)。图5B:共有序列(SEQ ID NO:94);Q9NZQ7\_HUMAN (SEQ ID NO:95);Q9EP73\_MOUSE (SEQ ID NO:96);D4AE25\_RAT (SEQ ID NO:97);C5NU11\_BOVINE (SEQ ID NO:98);Q4QTK1\_PIG (SEQ ID NO:99)和F7DZ76\_HORSE (SEQ ID NO:100)。

[0055] 图6A-6H。基于LC-MS/MS的N-糖肽鉴定。对应于来自HEK 293细胞的PD-L1的四个N-糖基化位点中每个位点:N35 (A和E)、N192 (B和F)、N200 (C和G)和N219 (D和H)的基于LC-MS/MS的N-糖肽鉴定。当检测到糖形式的代表性子集时,LC-MS谱(A-D)显示为在洗脱时间期间平均的光谱(如图中标记)。对于每个N-糖基化位点,显示一个代表性的HCD MS<sup>2</sup>光谱(E-H),以示例其鉴定是基于检测y1离子(具有附着至N-糖基化Asn的GlcNAc的胰蛋白酶肽主链)以及定义其肽序列的b和y离子。用于聚糖的卡通符号(参见插图)符合功能糖组学联盟(Consortium for Functional Glycomics)推荐的标准表示形式:此外的Hex和HexNAc暂时被指定为从三甘露糖核心(Man<sub>3</sub>-GlcNAc<sub>2</sub>)的lacNAc(Gal-GlcNAc)或lacdiNAc(GalNAc-GlcNAc)延伸,其可以是或不是核心岩藻糖基化的。图6E-6H中所示的序列分别列于SEQ ID NO:81-84。

[0056] 图7A-7E。PD-L1的糖基化是癌细胞相关免疫抑制所必需的。A.流式细胞术测量膜结合PD-1与在BT549细胞上表达的PD-L1 WT或PD-L1 4NQ突变蛋白质的相互作用。在实验前用MG132预处理细胞。B.延时显微镜图像显示了PD-L1和PD-1在最后时间点的动态相互作用。表达PD-L1 WT或4NQ的细胞中红色荧光(核内RFP)和绿色荧光(绿色荧光标签的PD-1/Fc蛋白)合并图像(20x)。B.显示在每个小时时间点PD-1/Fc蛋白质与在BT549细胞上表达的PD-L1 WT或PD-L1 4NQ蛋白质的定量结合。C.T细胞介导的肿瘤细胞杀伤(TTK)测定法涉及在BT549细胞上表达的PD-L1 WT或4NQ PD-L1蛋白质。在胱天蛋白酶(Caspase)3/7底物存在下将表达PD-L1 WT或4NQ的细胞和表达PD-1的T细胞共培养的第96小时的代表性的相位,红色荧光(核内RFP)和/或绿色荧光(NucView™ 488胱天蛋白酶3/7底物)的合并图像(10x)。用抗CD3抗体(100ng/ml)和IL-2(10ng/ml)活化T细胞。将绿色荧光细胞计数为死细胞。死细胞对总细胞的定量比例与PD-L1 WT或PD-L1 4NQ蛋白质相关,呈现在图像右侧的条形图中。D.BALB/c小鼠的肿瘤生长,所述小鼠携带衍生自表达PD-L1 WT或PD-L1 4NQ突变蛋白质的4T1细胞注射形成的肿瘤。通过使用IVIS100的生物发光成像(D中左图)体内显示4T1-luc细胞的肿瘤生长。D中右图:显示肿瘤体积的盒形图和显示肿瘤大小的照片,来自携带衍生自表达PD-L1 WT与PD-L1 4NQ蛋白质的4T1细胞的肿瘤的小鼠。在终点测量肿瘤并切片。每组n

=8只小鼠(右)。E. CD8+CD3+T细胞群体IFN $\gamma$ 细胞内细胞因子染色。通过双因素方差分析确定显著性,\* $p<0.05$ 和\*\* $p<0.001$ ;每组 $n=7$ 只小鼠。\*表示统计学显著的学生t检验。所有误差条均表示为3次独立实验的平均值 $\pm$ 标准差。

[0057] 图8A-8C.糖基化和非糖基化形式的PD-L1蛋白质和Western印迹分析示意图。A.野生型糖基化的PD-L1蛋白质(PD-L1 WT)和四个PD-L1蛋白变体的示意图,后者每个都在PD-L1蛋白质的四个N-糖基化位点中具有一个糖基化的氨基酸残基和三个非糖基化的氨基酸残基(N35/3NQ、N192/3NQ、N200/3NQ和N219/3NQ)。黑色表示的氨基酸代表糖基化的残基;红色显示的氨基酸位点在变体PD-L1蛋白质中未糖基化。B.生成表达N35/3NQ、N192/3NQ、N200/3NQ和N219/3NQ形式的PD-L1蛋白质的BT 549稳定克隆。通过Western印迹分析测定,一些抗glycPD-L1抗体显示出与某些PD-L1糖基化变体比与其它变体更高水平的结合,证明这些MAb是位点特异性的。如B所示,例如,MAb STM004识别并结合N35/3NQ PD-L1变体,表明该单克隆抗体与糖基化的PD-L1的N35区结合。C.显示STM004 MAb与肝癌细胞系的裂解物结合的Western印迹结果。

[0058] 图9.抗glycPD-L1抗体增强T细胞的肿瘤细胞杀伤作用。如实施例8所述,在细胞的细胞毒性测定中以不同的量使用STM004 MAb,以评估PBMC衍生的T细胞对肿瘤细胞(BT549)的细胞毒性。图9显示用MAb STM004处理的BT549(RFP PD-L1(WT))细胞的实时细胞死亡情况。图9中,底部图(实心蓝色方块)代表对照(没有来自PBMC的T细胞);实心红色圆圈表示无抗体对照;实心黑色方块表示测定法中使用20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的STM004 MAb;实心棕色圆圈表示测定法中使用40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的STM004 MAb,如图9观察到的,证明了随着时间的推移,对荷有PD-L1的肿瘤细胞有与剂量成比例的杀伤。

[0059] 图10A和10B.结合测定法。图10A和10B显示了如实施例9中所述的结合测定法的结果,其中观察到STM004 MAb(图10A)以剂量依赖性方式阻断PD-1与表达WT PD-L1的BT549靶细胞的结合,相对于测定对照,无PD-1/Fc;无Ab;mIgG Ab对照(图10B)。

[0060] 所描述的实施例的其它方面、特征和优点将从以下详细描述和说明性示例中变得显而易见。

[0061] 具体实施方式详述

[0062] 在肿瘤细胞上表达的程序性死亡配体-1蛋白质(PD-L1)与在免疫效应细胞(如T细胞)上表达的程序性死亡-1蛋白质(PD-1)之间的胞外相互作用对肿瘤相关免疫逃逸有显著影响。尽管使用抗PD-1或抗PD-L1抗体进行免疫检查点阻断取得临床成功,然而PD-L1和PD-1相互作用的调控机制和结构特征仍然在很大程度上是未知的。根据本文所述的发现,已经表明PD-L1的N-连接糖基化促进和增强PD-L1与PD-1结合,这促进T细胞介导的免疫应答的抑制。相反,已经新发现,在肿瘤细胞上表达的PD-L1多肽的异常糖基化或缺乏N-连接的糖基化,例如部分或完全去糖基化作用,对PD-L1/PD-1相互作用有负面效应,例如减弱或破坏了所述相互作用,其进而抑制免疫抑制并促进效应T细胞细胞的毒性活性并杀伤肿瘤细胞。此外,由于其肿瘤表达高糖基化的PD-L1的患者的存活率差,因此根据本文的发现,糖基化的PD-L1被认为是癌症治疗的有效治疗靶标。本文提供和描述的是癌症治疗剂,如抗glycPD-L1抗体,其相对于未糖基化的PD-L1可特异地并优先地结合糖基化的PD-L1并与糖基化的PD-L1相互作用,以破坏糖基化的PD-L1/PD-1相互作用,抑制免疫抑制并促进T效应功能,以治疗癌症。用本文所述的抗糖基化的PD-L1抗体的肿瘤治疗相对于不特异于PD-L1

的糖基化形式的抗PD-L1抗体提供了增强的免疫抑制抑制性作用。在实施方案中,抗glycPD-L1抗体是本文命名为“MAb”的单克隆抗体。

[0063] 本文所述的实施例提供的实验结果显示了通过如本文所述的抗glycPD-L1抗体结合糖基化的PD-L1与非糖基化的PD-L1的显著差异,例如2-3倍。在实施方案中,相对于非糖基化的PD-L1,抗glycPD-L1抗体对糖基化的PD-L1显示纳摩尔范围的结合亲和力,例如约5-20nM或约10-20nM。

[0064] 定义

[0065] 如本文所用,术语“一”或“一个”可以表示一个或多个。

[0066] 如本文所使用的,术语“或”是指“和/或”,除非明确地指示仅替代物或替代物是相互排斥的,尽管本公开支持指代仅是替代物以及“和/或”的定义。

[0067] 如本文所用,术语“另一”是指至少第二个或更多个。

[0068] 如本文所使用的,术语“约”用于指示值包括用于确定值的设备、方法的误差的固有变化,或存在于研究对象之间的变化。

[0069] 如本文所用,术语“程序性死亡配体-1”或“PD-L1”是指来自任何脊椎动物来源的多肽(术语“多肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用)或任何天然PD-L1,包括诸如灵长类(例如人、食蟹猴(cyno))、狗和啮齿动物(例如,小鼠和大鼠)的哺乳动物,除非另有说明,并且在某些实施方案中,包括各种PD-L1同种型,相关的PD-L1多肽,包括其SNP变体。

[0070] 人PD-L1(UniProtKB/Swiss-Prot:Q9NZQ7.1;GI:83287884)的示例性氨基酸序列如下文提供:

[0071] MRIFAVFIFM TYWHLNAFT VTPKDLVYV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPTSE HELTCQAEGY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TNSKREEKL FNVSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAEVPELP LAHPPNERH LVILGAILLC LGVALTFIFR LRGKRMMDVK KCGIQDTNSK KQSDTHLEET(SEQ ID NO:1)。在SEQ ID NO:1中,氨基末端氨基酸1-18构成人PD-L1蛋白质的信号序列。因此,成熟的人PD-L1蛋白质由SEQ ID NO:1的氨基酸19-290组成。

[0072] 包含本文所述的多肽和肽的氨基酸残基的缩写以及这些氨基酸残基的保守取代示于下表1中。含有本文所述多肽的一个或多个保守氨基酸置换或保守修饰的变体的多肽是指其中原始或天然存在的氨基酸被具有相似特征的其他氨基酸取代的多肽,例如具有类似的电荷、疏水性/亲水性、侧链大小、骨架构象、结构和刚性等。因此,这些氨基酸变化通常可以在不改变多肽的生物学活性、功能或其它所需性质的情况下进行,例如不改变其对抗原的亲和力或其特异性。通常,多肽的非必需区域中的单个氨基酸取代基本上不改变生物学活性。此外,结构或功能相似的氨基酸的取代不太可能破坏多肽的生物学活性。

[0073] 表1. 氨基酸残基和保守氨基酸取代的实例

原始残基 三字母编码和单字母编码	保守取代
丙氨酸(Ala) (A)	Gly; Ser
精氨酸(Arg) (R)	Lys; His
天冬酰胺(Asn) (N)	Gln; His
天冬氨酸(Asp) (D)	Glu; Asn
半胱氨酸(Cys) (C)	Ser; Ala
谷氨酰胺(Gln) (Q)	Asn
谷氨酸(Glu) (E)	Asp; Gln
甘氨酸(Gly) (G)	Ala
组氨酸(His) (H)	Asn; Gln
异亮氨酸(Ile) (I)	Leu; Val
亮氨酸(Leu) (L)	Ile; Val
赖氨酸(Lys) (K)	Arg; His
甲硫氨酸(Met) (M)	Leu; Ile; Tyr
苯丙氨酸(Phe) (F)	Tyr; Met; Leu
脯氨酸(Pro) (P)	Ala
丝氨酸(Ser) (S)	Thr
苏氨酸(Thr) (T)	Ser
色氨酸(Trp) (W)	Tyr; Phe
酪氨酸(Tyr) (Y)	Trp; Phe
缬氨酸(Val) (V)	Ile; Leu

[0075] 本文中术语“抗体”、“免疫球蛋白”和“Ig”在广义上可互换使用,并且具体涵盖例如个体抗PD-L1抗体,例如本文所述的单克隆抗体(包括激动剂、拮抗剂、中和抗体、全长或完整的单克隆抗体、维持抗原结合活性的抗体的肽片段)、抗非糖基化的PD-L1的抗体和抗糖基化的PD-L1的抗体;具有多表位或单表位特异性的抗PD-L1抗体组合物、多克隆或单价抗体、多价抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体,只要它们表现出所需的生物学活性)(其由至少两个完整抗体形成)、单链抗PD-L1抗体和抗PD-L1抗体的片段,如下所述。抗体可以是人、人源化、嵌合和/或亲和力成熟的。抗体可以来自其它物种,例如小鼠、大鼠、兔等。术语“抗体”旨在包括在能够结合特异性分子抗原的多肽的免疫球蛋白类别范畴内的B细胞的多肽产物。抗体通常由两对相同的多肽链组成,其中每对具有一条重链(约50-70kDa)和一条轻链(约25kDa);并且其中重链和轻链的氨基末端部分包含约100至约130个或更多个氨基酸的可变区,且每个链的羧基末端部分包含恒定区(参见Borrebaeck(ed.),1995, Antibody Engineering,第二版,Oxford University Press;Kuby,1997 Immunology,第三版,WH Freeman and Company,New York)。在具体实施方案中,由本文提供的抗体结合的特异性分子抗原包括PD-L1多肽、PD-L1肽片段或PD-L1表位。PD-L1多肽、PD-L1肽片段或PD-L1表位可以是非糖基化或糖基化的。在一个具体实施方案中,PD-L1多肽、PD-L1肽片段或PD-

L1表位是糖基化的。可以例如通过免疫测定法、BIAcore或本领域技术人员已知的其它技术鉴定与PD-L1抗原结合的抗体或其肽片段。当使用实验技术(例如放射免疫测定法(RIA)和酶联免疫吸附测定法(ELISA))测定时,抗体或其片段当其以比任何交叉反应性抗原更高的亲和力结合PD-L1抗原时则特异性结合PD-L1抗原。通常,特异性或选择性结合反应将是背景信号或噪音的至少两倍,并且更典型地是背景信号或噪音的5-10倍以上。参见例如Paul, ed., 1989, *Fundamental Immunology Second Edition*, Raven Press, New York, 第332-336页,关于抗体特异性的讨论。

[0076] 本文提供的抗体包括但不限于合成抗体、单克隆抗体、重组产生的抗体、多特异性抗体(包括双特异性抗体)、人抗体、人源化抗体、骆驼化抗体、嵌合抗体、胞内抗体、抗独特型(anti-Id)抗体以及上述任何一种的功能片段(例如抗原结合片段如PD-L1结合片段)。结合片段是指抗体重链或轻链多肽的部分,例如肽部分,其保留从其中衍生出所述片段的抗体的一些或全部结合活性。功能片段(例如,抗原结合片段例如PD-L1结合片段)的非限制性实例包括单链Fv(scFv)(例如,包括单特异性、双特异性等)、Fab片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、F(ab')<sub>2</sub>片段、二硫键连接的Fv(sdFv)、Fd片段、Fv片段、双抗体、三抗体、四体抗体和微型抗体。特别地,本文提供的抗体包括免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分,例如含有结合PD-L1抗原(特别是糖基化的PD-L1抗原)的抗原结合位点的抗原结合结构域或分子(例如抗PD-L1抗体的一个或多个互补决定区(CDR))。对这些抗体片段的描述可以见于例如Harlow和Lane, 1989, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York; Myers(ed.), *Molec. Biology and Biotechnology: A Comprehensive Desk Reference*, New York: VCH Publisher, Inc.; Huston等人, 1993, *Cell Biophysics*, 22: 189-224; Plückthun和Skerra, 1989, *Meth. Enzymol.*, 178: 497-515 and in Day, E.D., 1990, *Advanced Immunochimistry*, Second Ed., Wiley-Liss, Inc., New York, NY.。本文提供的抗体可以是任何类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY),任何类别(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或任何亚类(例如, IgG2a和IgG2b)的免疫球蛋白分子。抗PD-L1抗体可以是激动性抗体或拮抗性抗体。在某些实施方案中,抗PD-L1抗体是完全人的,例如完全人单克隆抗PD-L1抗体。在某些实施方案中,抗PD-L1抗体是人源化的,例如人源化单克隆抗PD-L1抗体。在某些实施方案中,本文提供的抗体是IgG抗体或其的一类(例如,人IgG1或IgG4)或其亚类,特别是IgG1亚类抗体。

[0077] 四链抗体单元是由两个相同的轻(L)链和两个相同的重(H)链组成的异四聚体糖蛋白。在IgG的情况下,四链(未还原)抗体单元的分子量通常为约150,000道尔顿。每个L链通过一个共价二硫键与H链连接,而两个H链通过一个或多个二硫键彼此连接,这取决于H链同种型。每个H和L链还具有规则间隔的链内二硫桥。在N末端,每个H链具有可变结构域(V<sub>H</sub>),随后是每个α链和γ链的三个恒定结构域(C<sub>H</sub>),以及μ和ε同种型的四个C<sub>H</sub>结构域。每个L链在N末端具有可变结构域(V<sub>L</sub>),随后在其羧基末端具有恒定结构域(C<sub>L</sub>)。V<sub>L</sub>结构域与V<sub>H</sub>结构域比对,C<sub>L</sub>结构域与重链的第一个恒定域(C<sub>H1</sub>)比对。据信特定的氨基酸残基形成轻链和重链可变结构域之间的界面。V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>的配对一起形成单个抗原结合位点,尽管某些V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>结构域可以分别结合抗原而不与V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>结构域配对。免疫球蛋白分子的基本结构是本领域技术人员理解的。例如,不同类型的抗体的结构和性质可以在Terr, Abba I.等人, 1994, *Basic and Clinical Immunology*, 第8版, Appleton&Lange, Norwalk, CT, 第71页和第6章中找到。

[0078] 如本文所用,术语“抗原”或“靶抗原”是抗体可选择性结合的预先确定的分子。靶抗原可以是多肽、肽、碳水化合物、核酸、脂质、半抗原或者其它天然存在或合成的化合物。在实施方案中,靶抗原是小分子。在某些实施方案中,靶抗原是多肽或肽,优选地糖基化的PD-L1多肽。

[0079] 如本文所用,术语“抗原结合片段”、“抗原结合结构域”、“抗原结合区”和类似术语是指抗体的部分,其包括与抗原相互作用并在抗体上作为结合剂赋予抗体针对抗原的特异性和亲和力的氨基酸残基(例如,抗体的CDR是抗原结合区)。抗原结合区可以衍生自任何动物物种,例如啮齿动物(例如兔、大鼠或仓鼠)和人。在具体实施方案中,抗原结合区可以是人来源的。

[0080] “分离的”抗体基本上不含来自细胞或组织来源的细胞材料或其它污染性蛋白质和/或衍生抗体的其它污染成分,或者当化学合成时基本上不含化学前体或其它化学物质。“基本上不含细胞材料”的说法包括抗体的制备物,其中抗体与从中分离或重组产生抗体的细胞的细胞组分分离。因此,基本上不含细胞材料的抗体包括抗体的制备物,其具有小于约30%、25%、20%、15%、10%、5%或1%(以干重计)的异源蛋白质(本文中也称为“污染性蛋白质”)。在某些实施方案中,当重组产生抗体时,其基本上不含培养基,例如,培养基小于蛋白质制备物体积的约20%、15%、10%、5%或1%。在某些实施方案中,当通过化学合成制备抗体时,其基本上不含化学前体或其它化学物质,例如,其与参与蛋白质合成的化学前体或其它化学物质分离。因此,这种抗体的制备物具有除目的抗体之外小于约30%、25%、20%、15%、10%、5%或1%(以干重计)的化学前体或化合物。污染物组分还可以包括但不限于干扰抗体的治疗用途的材料,并且可以包括酶、激素和其它蛋白质或非蛋白质溶质。在某些实施方案中,如Lowry方法确定的(Lowry等人,1951, J. Bio. Chem., 193:265-275),抗体被纯化(1)至大于或等于抗体重量的95%,例如95%、96%、97%、98%或99%(重量计), (2)至足以通过转杯式测序仪获得N-末端或内部氨基酸序列至少15个残基的程度,或(3)至通过SDS-PAGE在还原或非还原条件下使用考马斯亮蓝或银色染色达到均一。因为抗体的天然环境的至少一种成分将不存在,则分离的抗体还包括在重组细胞内的原位抗体。分离的抗体通常通过至少一个纯化步骤进行制备。在一些实施方案中,分离本文提供的抗体。

[0081] 如本文所用,术语“结合”或“结合至”是指分子之间的相互作用,包括例如形成复合物。说明性地,这种相互作用包括非共价相互作用,包括氢键、离子键、疏水相互作用和/或范德华相互作用。复合物还可以包括通过共价键或非共价键、相互作用或力结合在一起的两个或更多个分子的结合。抗体的单个抗原结合位点与靶(抗原)分子如PD-L1上的其表位之间的总非共价相互作用的强度是抗体或功能片段对该表位的亲和力。抗体与单价抗原的结合( $k_{on}$ )与解离( $k_{off}$ )的比例( $k_{on}/k_{off}$ )是结合常数 $K_a$ ,其是亲和力的量度。对于抗体和抗原的不同复合物, $K$ 值有所不同,并且取决于 $k_{on}$ 和 $k_{off}$ 两者。可以使用本文提供的任何方法或本领域技术人员已知的任何其它方法来确定本文提供的抗体的结合常数 $K_a$ 。在一个结合位点的亲和力并不总是反映抗体与抗原之间相互作用的真实强度。当含有多个重复抗原决定簇的复合抗原与含有多个结合位点的抗体接触时,抗体与抗原在一个位点的相互作用将增加第二结合位点相互作用的可能性。多价抗体与抗原之间的这种多重相互作用的强度称为结合力(avidity)。与其单个结合位点的亲和力相比,抗体的结合力可以是对其结合能力的更好的量度。例如,高结合力可以补偿低亲和力,如有些情况下在五聚体IgM抗体中发现的,

其可以具有比IgG更低的亲和力,但是由于其多价引起的IgM的高结合力使其能够有效地结合抗原。

[0082] “结合亲和力”通常是指分子(例如,结合蛋白例如抗体)的单个结合位点与其结合配偶体(例如抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另有说明,如本文所用,“结合亲和力”是指反映结合对成员(例如抗体和抗原)之间的1:1相互作用的固有结合亲和力。结合分子X对其结合配偶体Y的亲和力通常可以由解离常数( $K_d$ )表示。亲和力可以通过本领域已知的常规方法测量,包括本文所述的那些。低亲和力抗体通常缓慢地结合抗原并趋向于易于解离,而高亲和力抗体通常更快地结合抗原并且趋向于保持更长地与抗原结合。用于测量结合亲和力的各种方法是本领域已知的,其中任何一种可以用于本公开的目的。具体说明性实施方案包括以下内容:在一个实施方案中,通过本领域已知的测定法例如通过结合测定法测量“ $K_d$ ”或“ $K_d$ 值”。可以在加放射性标签的抗原结合测定法(RIA)中测量 $K_d$ ,例如用目的抗体的Fab部分和其抗原进行(Chen等人,1999,J.Mol.Biol.,293:865-881)。测量 $K_d$ 或 $K_d$ 值还可以使用表面等离子共振(SPR)测定法(通过BIAcore),使用例如BIAcoreTM-2000或BIAcoreTM-3000(BIAcore,Inc.,Piscataway,NJ),或使用例如OctetQK384系统(ForteBio,Menlo Park,CA)进行生物膜干涉术(BLI),或通过石英晶体微量天平(QCM)技术。也可以使用与上文描述相同的表面等离子体共振或生物膜干涉技术,例如使用BIAcoreTM-2000或BIAcoreTM-3000(BIAcore,Inc.,Piscataway,NJ)或OctetQK384系统(ForteBio,Menlo Park,CA)来确定“连上的速率”或“结合的速率”或“结合速率”或“ $k_{on}$ ”。

[0083] 术语“抗PD-L1抗体”、“特异性结合PD-L1的抗体”或“特异于PD-L1的抗体”、“特异性结合PD-L1表位的抗体”、“选择性结合PD-L1的抗体”、“选择性结合PD-L1表位的抗体”、“优先地结合PD-L1的抗体”,以及类似术语在本文中可互换使用,并且是指代特别是相比非糖基化的PD-L1或PD-L1的糖基化突变体,能够以足够的亲和力和特异性结合PD-L1,即糖基化的或WT PD-L1的抗体。可以基于与适当的对照(例如结合非糖基化的或变体PD-L1(例如,4NQ PD-L1)或表达非糖基化的或变体形式的PD-L1(例如,4NQ PD-L1)的细胞,例如分子工程改造的细胞、细胞系或肿瘤细胞分离物)相比时,抗体与细胞上表达的PD-L1,即糖基化的PD-L1多肽或PD-L1 WT或糖基化的PD-L1结合的荧光强度的定量来确定或限定本文提供的抗glycPD-L1抗体的“优先地结合”,如本文所述,例如实施例5中所述。所述的抗glycPD-L1抗体对糖基化的PD-L1多肽或对表达糖基化的PD-L1(PD-L1WT)的细胞的优选的结合由通过细胞流式细胞术测定的与抗体与非糖基化的或突变的糖基化的PD-L1多肽或者表达非糖基化的或突变的糖基化的PD-L1细胞的结合相比至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少10倍与、至少15倍、至少20倍或更多的测量的荧光结合强度(MFI)值表示,其中待测定的抗体直接或间接地通过荧光标签或标记物如FITC可检测。在一个实施方案中,待测定的抗体用荧光标签物例如FITC直接标记。在实施方案中,优先地或选择性地结合糖基化的PD-L1的抗glycPD-L1抗体显示的MFI值为相同抗体结合非糖基化的PD-L1或如本文所述的PD-L1糖基化变体(例如4NQ PD-L1,其未被糖基化)的MFI值的1.5倍至25倍、或2倍至20倍、或3倍至15倍、或4倍至8倍、或2倍至10倍、或2倍至5倍或更高。旨在包括等于或在所有前述值之间的荧光强度值倍数。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体特异性地并优先地结合糖基化的PD-L1多肽,例如糖基化的PD-L1抗原、肽片段或表位(例如,人糖基化的PD-L1,例如人糖基化的PD-L1多肽、抗原或表位)。特异性结合PD-L1(例如,糖基化

的或野生型人PD-L1)的抗体可以结合PD-L1的细胞外结构域(ECD)或衍生自ECD的肽。特异性结合PD-L1抗原(例如人PD-L1)的抗体可以与相关抗原(例如食蟹猴(cyno)PD-L1)交叉反应。在优选的实施方案中,特异性结合PD-L1抗原的抗体不与其它抗原交叉反应。可以例如通过免疫荧光结合测定法、免疫组织化学测定方法、免疫测定方法、Biacore或本领域技术人员已知的其它技术鉴定特异性结合PD-L1抗原的抗体。

[0084] 在某些其它实施方案中,如本文所述与PD-L1结合的抗体具有小于或等于20nM、19nM、18nM、17nM、16nM、15nM、14nM、13nM、12nM、11nM、10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、0.9nM、0.8nM、0.7nM、0.6nM、0.5nM、0.4nM、0.3nM、0.2nM或0.1nM、和/或大于或等于0.1nM的解离常数( $K_d$ )。在某些实施方案中,抗PD-L1抗体结合在来自不同物种(例如人和食蟹猴PD-L1之间)的PD-L1蛋白质中保守的PD-L1表位。使用实验技术(例如放射免疫测定法(RIA)和酶联免疫吸附测定法(ELISA))测定时,当抗体以比任何交叉反应性抗原更高的亲和力结合PD-L1抗原时,则此抗体是特异性结合PD-L1抗原。通常,特异性或选择性反应将是背景信号或噪声的至少两倍,并且可以超过背景的10倍。关于抗体特异性的讨论参见例如Paul ed, 1989, *Fundamental Immunology Second Edition*, Raven Press, New York, 第332-336页。在这样的实施方案中,抗体与“非靶”蛋白质的结合程度将小于抗体与其特定靶蛋白质的结合的约10%,例如通过荧光激活细胞分选(FACS)分析或放射免疫沉淀(RIA)确定的。

[0085] 抗PD-L1抗体包括抗糖基化的PD-L1抗体或抗野生型PD-L1(PD-L1 WT)抗体,其中野生型PD-L1蛋白是糖基化的,这些都是特异于糖基化的PD-L1的抗体。在优选的实施方案中,抗PD-L1抗体是相对于非糖基化的PD-L1,特异性结合糖基化的PD-L1的抗glycPD-L1抗体。在一些实施方案中,抗糖基化的PD-L1的抗体结合PD-L1的线性糖基化基序。在一些实施方案中,抗糖基化的PD-L1抗体结合位于三维结构中一个或多个糖基化基序附近的肽序列。在一些实施方案中,抗糖基化的PD-L1的抗体相对于未糖基化的PD-L1选择性地结合PD-L1的一个或多个糖基化基序或具有PD-L1糖基化基序的PD-L1肽。在其它实施方案中,抗糖基化的PD-L1抗体(抗glycPD-L1抗体)结合包含PD-L1蛋白的氨基酸的线性表位。在一些实施方案中,抗糖基化的PD-L1抗体选择性结合PD-L1的一个或多个糖基化基序,其中糖基化基序包含SEQ ID NO:1的PD-L1多肽的N35、N192、N200和/或N219。在其它实施方案中,抗glycPD-L1抗体结合包含PD-L1蛋白质的氨基酸的构象(非线性)表位。在一些实施方案中,抗glycPD-L1抗体或其结合部分结合糖基化的PD-L1,其 $K_d$ 比相对于未糖基化的PD-L1所显示的 $K_d$ 值小至少30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或90%。在某些实施方案中,抗glycPD-L1抗体或其结合部分结合糖基化的PD-L1,其 $K_d$ 比相对于未糖基化的PD-L1所显示的 $K_d$ 值小50%。在一些实施方案中,抗glycPD-L1抗体或其结合部分结合糖基化的PD-L1,其 $K_d$ 比相对于未糖基化的PD-L1所显示的 $K_d$ 值小1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%、20%、30%、40%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或90%。在另外的方面,抗glycPD-L1抗体或其结合部分结合糖基化的PD-L1,其 $K_d$ 小于相对于未糖基化的PD-L1所显示的 $K_d$ 的至少5-10分之一。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体或其结合部分结合糖基化的PD-L1,其 $K_d$ 小于相对于其结合未糖基化的PD-L1所显示的 $K_d$ 的至少10分之一。在某些实施方案中,抗体结合糖基化的PD-L1,其 $K_d$ 值不超过结合未糖基化的PD-L1所显示的 $K_d$ 值的1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、15%或20%。

[0086] 在一个实施方案中,在如实施例5所述的细胞流式细胞术结合测定法中,抗体显示出如MFI所表示的与表达WT PD-L1的细胞的结合相比于对于结合表达非糖基化的PD-L1的细胞的MFI是或至少大1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍或9倍或10倍,并且在某些实施方案中,比对于结合表达非糖基化的PD-L1的细胞的MFI大不超过10倍、20倍、50倍或100倍。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体或其结合部分以纳摩尔亲和力结合糖基化的PD-L1,例如5-20nM或10-20nM的亲和力,包括上下限值。

[0087] 如本文中关于抗体所使用的,术语“重(H)链”是指约50-70kDa的多肽链,其中氨基末端部分包含可变(V)区(也称为V结构域)约115至130个或更多个氨基酸,并且羧基末端部分包含恒定(C)区。恒定区(或恒定结构域)可以是被称为阿尔法( $\alpha$ )、德尔塔( $\delta$ )、艾普西隆( $\epsilon$ )、伽马( $\gamma$ )和缪( $\mu$ )的五种不同类型(例如,同种型)之一,取决于在重链恒定区的氨基酸序列。不同的重链大小不同: $\alpha$ 、 $\delta$ 和 $\gamma$ 含有约450个氨基酸,而 $\mu$ 和 $\epsilon$ 含有约550个氨基酸。当与轻链组合时,这些不同类型的重链分别产生抗体的五种众所周知的类别(例如,同种型),即IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,包括IgG的四个亚类,即IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。抗体重链可以是人抗体重链。

[0088] 如本文中关于抗体所使用的,术语“轻(L)链”是指约25kDa的多肽链,其中氨基末端部分包含约100至约110个或更多个氨基酸的可变结构域,并且羧基末端部分包含恒定区。轻链(V和C结构域)的近似长度为211至217个氨基酸。基于恒定结构域的氨基酸序列,存在两种不同类型的轻链,称为卡巴( $\kappa$ )和兰姆达( $\lambda$ )。轻链氨基酸序列是本领域公知的。抗体轻链可以是人抗体轻链。

[0089] 如本文所用,术语“可变(V)区”或“可变(V)结构域”是指抗体多肽的轻(L)或重(H)链的部分,其通常位于L或H链的氨基末端。H链V结构域具有约115至130个氨基酸的长度,而L链V结构域长度为约100至110个氨基酸。H和L链的V结构域用于每种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。H链的V结构域可以称为“ $V_H$ ”。L链的V区可以称为“ $V_L$ ”。术语“可变”是指V结构域的某些区段在不同抗体的序列之间具有极大的差异。虽然V结构域介导抗原结合并且限定特定抗体对其特定抗原的特异性,但是变异性并没有均匀分布在抗体V结构域的110个氨基酸跨度上。相反,V域由称为框架区(FR)约15-30个氨基酸的较少变异(例如,相对不变)的区段组成,所述框架区被具有更大变异性(例如有极大变异性)的称为“超变区”或“互补决定区(CDR)”的每个长度大约为9-12个氨基酸的更短区域隔开。抗体H和L链的V结构域各自包含四个FR,主要采用 $\beta$ 片层构型,通过三个超变区连接,其形成环形连接并且在某些情况下形成 $\beta$ 片层结构的部分。每个链中的超变区通过FR与来自另一个链的超变区紧密地靠近在一起,有助于抗体的抗原结合位点的形成(参见例如Kabat等人,1991,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD)。C结构域不直接涉及抗体与抗原的结合,而是表现出各种效应功能,例如抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)。在不同抗体类别或类型之间,V结构域的序列有极大不同。序列中的变异性集中在CDR中,其主要负责抗体与抗原的相互作用。在具体实施方案中,抗体的可变结构域是人或人源化的可变结构域。

[0090] 如本文所用,术语“互补决定区”,“CDR”,“超变区”,“HVR”和“HV”可互换使用。“CDR”是指抗体 $V_H\beta$ -片层框架的非框架区域内的三个超变区(H1、H2或H3)中的一个,或抗体

$V_L\beta$ -片层框架的非框架区域内的三个超变区(L1、L2或L3)之一。该术语当在本文中使用时,是指抗体V结构域中序列是高度变异的和/或形成结构上限定的环的区域。通常,抗体包括六个超变区: $V_H$ 结构域中的三个(H1、H2、H3)和 $V_L$ 结构域中的三个(L1、L2、L3)。因此,CDR通常是散布在V结构域的框架区序列内的高度可变序列。“框架”或“FR”残基是CDR侧翼的那些可变区残基。FR残基存在于例如嵌合的、人源化的、人、结构域抗体、双抗体、线性抗体和双特异性抗体中。

[0091] 本文中使用的并包括许多超变区的描述。CDR区域是本领域技术人员公知的,并且已由例如Kabat定义为抗体V结构域内的最具超变性的区域(Kabat等人,1977,*J. Biol. Chem.*, 252:6609-6616;Kabat,1978,*Adv. Prot. Chem.*, 32:1-75)。Kabat CDR基于序列变异性并且是最常用的(参见例如Kabat等人,1991,*Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD)。CDR区序列也由Chothia在结构上定义为不是保守 $\beta$ -片层框架的部分,因此能够采用不同构象的残基(Chothia等人,1987,*J. Mol. Biol.*, 196:901-917)。相反地,Chothia指代结构环的位置。使用Kabat编号习惯对Chothia CDR-H1环的末端编号时,在H32和H34之间有变化,这取决于环的长度(这是因为Kabat编号方案将插入放置在H35A和H35B;如果35A和35B都不存在时,环在32处结束;如果仅存在35A,则环在33处结束;如果35A和35B都存在,则环在34处结束)。编号系统和术语都是本领域中公认的。

[0092] 近来,已经开发并广泛采用通用编号系统,ImMunoGeneTics (IMGT) Information System<sup>®</sup> (Lafranc等人,2003,*Dev. Comp. Immunol.*, 27 (1):55-77)。IMGT是专门针对人类和其它脊椎动物的免疫球蛋白(Ig)、T细胞受体(TR)和主要组织相容性复合物(MHC)的综合信息系统。本文中,CDR以氨基酸序列和在轻链或重链中的位置两者来表示。由于免疫球蛋白V结构域的结构内CDR的“位置”在物种之间保守,并存在于称为环的结构中,因此通过使用编号系统根据结构特征、CDR和框架残基比对可变结构域序列可容易地进行鉴定。该信息可以用于将某一物种的免疫球蛋白的CDR残基嫁接或取代到来自通常为人抗体的受体框架中。Honegger等人,2001年,*J. Mol. Biol.*, 309:657-670开发了另外的编号系统(AHon)。编号系统之间的对应,包括例如Kabat编号和IMGT唯一编号系统是本领域技术人员所熟知的(参见例如Kabat,同上;Chothia等人,同上;Martin,2010,*Antibody Engineering*, Vol. 2, Chapter 3, Springer Verlag;以及Lefranc等,1999,*Nuc. Acids Res.*, 27:209-212)。

[0093] CDR区序列也由AbM、Contact和IMGT定义。AbM超变区代表Kabat CDR和Chothia结构环之间的折中,并被Oxford Molecular的AbM抗体建模软件使用(参见例如Martin,2010,*Antibody Engineering*, 第2卷,第3章, Springer出版社)。“contact”超变区基于对可用的复杂晶体结构的分析。来自每一个这些超变区或CDR的残基如下所述。

[0094] CDR区序列的示例性描绘示于下表2中。已经通过比较许多结构(A1-Lazikani等人,1997,*J. Mol. Biol.*, 273:927-948)确定了规范的抗体可变区内的CDR的位置;Morea等人,2000,*Methods*, 20:267-279)。因为超变区内的残基数目在不同的抗体中变化,相对于规范位置的附加残基通常用规范可变区域编号方案中的残基编号旁边的a, b, c等进行编号(A1-Lazikani等人,同上)。这种命名法对于本领域技术人员来说是同样熟知的。

[0095] 表2. CDR区序列的示例性描绘

[0096]		IMGT	Kabat	AbM	Chothia	Contact
	V <sub>H</sub> CDR1	27-38	31-35	26-35	26-32	30-35
	V <sub>H</sub> CDR2	56-65	50-65	50-58	53-55	47-58
	V <sub>H</sub> CDR3	105-117	95-102	95-102	96-101	93-101
	V <sub>L</sub> CDR1	27-38	24-34	24-34	26-32	30-36
	V <sub>L</sub> CDR2	56-65	50-56	50-56	50-52	46-55
	V <sub>L</sub> CDR3	105-117	89-97	89-97	91-96	89-96

[0097] “亲和力成熟的”抗体是在其一个或多个HVR中具有一个或多个改变(例如,氨基酸序列变异,包括改变、添加和/或缺失)的抗体,其导致与不具有所述改变的亲本抗体相比较,抗体对抗原的亲和力改善。在某些实施方案中,亲和力成熟的抗体对靶抗原例如糖基化的PD-L1具有纳摩尔或甚至皮摩尔级的亲和力。亲和力成熟的抗体通过本领域已知的方法产生。其综述参见Hudson and Souriau,2003,Nature Medicine,9:129-134;Hoogenboom,2005,Nature Biotechnol.,23:1105-1116;Quiroz和Sinclair,2010,Revista Ingeneria Biomedia,4:39-51。

[0098] “嵌合”抗体是其中H和/或L链的部分(例如V结构域)与衍生自特定物种或者属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应氨基酸序列相同或同源,而链的其余部分,例如C结构域,与衍生自另一个物种或者属于另一种抗体类或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,以及这种抗体的片段,只要显示出所需生物学活性的(参见例如美国专利号4,816,567;和Morrison等人,1984,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855)。

[0099] “人源化”非人(例如,小鼠)抗体是抗体的嵌合形式,其指代人免疫球蛋白序列(例如,受体抗体),其中原生CDR残基被来自非人类物种(例如,供体抗体)如小鼠、大鼠、兔或非人灵长类大的具有所需特异性、亲和性和抗原结合和相互作用能力的相应CDR的残基替代。在一些情况下,人免疫球蛋白的一个或多个FR区残基也可以被相应的非人残基代替。此外,人源化抗体可以包含在受体抗体或在供体抗体中未发现的残基。进行这些修饰以进一步改善人源化抗体的性能。人源化抗体H或L链可以包含基本上所有的至少一个或多个可变区,其中所有或基本上所有的CDR对应于非人免疫球蛋白的CDR,并且所有或基本上所有的FR是人免疫球蛋白序列的那些。在某些实施方案中,人源化抗体将包含至少部分的免疫球蛋白恒定区(Fc),通常为人免疫球蛋白的那些。虽然本领域技术人员已知,但如果需要,更详细内容参见例如Jones等人,1986,Nature,321:522-525;Riechmann等人,1988,Nature,332:323-329;和Presta,1992,Curr.Op.Struct.Biol.,2:593-596;Carter等人,1992,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:4285-4289;和美国专利号6,800,738(2004年10月5日授权),6,719,971(2005年9月27日颁布),6,639,055(2003年10月28日颁布),6,407,213(2002年6月18日授权)和6,054,297(2000年4月25日公布)。

[0100] 术语“人抗体”和“完全人抗体”在本文中可互换使用,并且是指具有对应于人产生的抗体的氨基酸序列的抗体和/或已经使用任何本领域技术人员实施的用于制备人抗体的技术制备的抗体。人抗体的这种定义特异地排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。人抗体可以使用本领域已知的各种技术生产,包括噬菌体展示文库(Hoogenboom等人,1991,J.Mol.Biol.,227:381;Marks等人,1991,J.Mol.Biol.,222:581和酵母展示文库(Chao等人,2006,Nature Protocols,1:755-768)。还可用于制备人单克隆抗体是Cole等人,

1985 Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Alan R. Liss, p.77; Boerner 等人, 1991, J. Immunol., 147 (1): 86-95 描述的方法。另见 van Dijk 等人, 2001, Curr. Opin. Pharmacol., 5: 368-74。可以通过向其内源性 Ig 基因座已经被失活并且已经被遗传修饰以携带编码人抗体的人免疫球蛋白基因的转基因动物 (例如小鼠) 施用抗原, 使得针对抗原攻击产生响应而生成成人抗体, 从而制备人抗体 (参见例如 Jakobovits, A., 1995, Curr. Opin. Biotechnol. 6 (5): 561-566; Brüggemann 等人 1997 Curr. Opin. Biotechnol., 8 (4): 455-8; 和关于 XENOMOUSE™ 技术的美国专利号 6,075,181 和 6,150,584)。另见, 例如, Li 等人, 2006, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 103: 3557-3562, 关于通过人 B 细胞杂交瘤技术产生的人抗体。在具体实施方案中, 人抗体包含人源的可变区和恒定区。在某些实施方案中, “完全人” 的抗 PD-L1 抗体还可以包括结合 PD-L1 多肽并由人种系免疫球蛋白核酸序列的天然存在的体细胞变体的核酸序列编码的抗体。在具体实施方案中, 本文提供的抗 PD-L1 抗体是完全人抗体。术语“完全人抗体”包括具有对应于人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区的抗体, 如 Kabat 等人所述。(参见 Kabat 等人, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, 美国卫生和公共服务部, NIH 出版号 91-3242)。词语“重组人抗体”包括通过重组方法制备、表达、产生或分离的人抗体, 例如使用转染入宿主细胞的重组表达载体表达的抗体; 从重组的组合人抗体文库分离的抗体; 从用于人免疫球蛋白基因的转基因和/或转染色体的动物 (例如, 小鼠或牛) 分离的抗体 (参见例如 Taylor, L.D. 等人, 1992, Nucl. Acids Res. 20: 6287-6295); 或通过涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接到其它 DNA 序列的任何其它方式制备、表达、产生或分离的抗体。这样的重组人抗体可以具有源自人种系免疫球蛋白序列的可变和恒定区 (参见 Kabat 等人, 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第五版, 美国卫生和公共服务部, NIH 出版号 91-3242)。然而, 在某些实施方案中, 对这些重组人抗体进行体外诱变 (或者当使用针对人 Ig 序列的转基因动物时, 进行体内体细胞诱变), 这样重组抗体的  $V_H$  和  $V_L$  区的氨基酸序列是这样的序列, 其尽管衍生自人种系  $V_H$  和  $V_L$  序列衍生并与之相关, 但在体内可能不会天然存在于人类抗体种系谱中。

[0101] 如本文所用, 术语“表位”是抗原分子的表面上, 单个抗体分子与之结合的位点或区域, 例如抗原表面上的局部区域, 例如能够被抗 PD-L1 或抗 glycPD-L1 抗体的一个或多个抗原结合区结合的 PD-L1 多肽或糖基化的 PD-L1 多肽。表位可以是免疫原性的并且能够在动物中引发免疫应答。表位不一定是免疫原性的。表位通常由诸如氨基酸或糖侧链的化学活性表面分子组成, 并且具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。表位可以是线性表位和构象表位。参与形成表位的多肽的区域可以是形成线性表位的多肽的连续氨基酸, 或者表位可以由多肽的两个或多个非连续氨基酸或区域形成, 通常称为构象表位。表位可以是或不是抗原的三维表面特征。在某些实施方案中, PD-L1 表位是 PD-L1 多肽的三维表面特征。在其它实施方案中, PD-L1 表位是 PD-L1 多肽的线性特征。在一些实施方案中, PD-L1 表位是未糖基化的 PD-L1 多肽。在一些实施方案中, PD-L1 表位在一个或多个位点被糖基化。通常, 抗原具有几个或许多不同的表位并且可以与许多不同的抗体反应。在一个具体的实施方案中, 如所述的抗 glycPD-L1 抗体结合 PD-L1 的表位, 尤其是糖基化的 PD-L1 的表位, 其为构象表位。

[0102] 当两个抗体在三维空间中识别相同、重叠或相邻表位时, 抗体与参照抗体结合“表

位”或“基本上相同的表位”或“相同的表位”。用于确定两个抗体是否结合到三维空间中的相同、重叠或相邻表位的最广泛使用和快速的方法是竞争测定法,其可以以许多不同的形式配置,例如使用标记的抗原或标记的抗体。在一些测定中,将抗原固定化在96孔板上或在细胞表面上表达,并使用可检测的信号(例如放射性的、荧光的或酶标签)测量未标记的抗体阻断标记的抗体与抗原结合的能力。

[0103] 当在竞争PD-L1靶蛋白或其肽上的相同表位或结合位点的抗PD-L1抗体的上下文中使用时,术语“竞争”是指通过测定法确定的竞争,其中正在研究的抗体或其结合片段防止、阻断或抑制参照分子(例如,参照配体或参照抗原结合蛋白,例如参照抗体)与共同抗原(例如PD-L1或其片段)的特异性结合。可以使用许多类型的竞争性结合测定法来确定测试抗体是否与参照抗体竞争与PD-L1(例如人PD-L1或人糖基化的PD-L1)的结合。可以使用的测定法实例包括固相直接或间接放射免疫测定法(RIA);固相直接或间接酶免疫测定法(EIA);夹心法竞争测定法(参见例如Stahli等人,1983,Methods in Enzymology 9:242-253);固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(参见例如Kirkland等人,1986,J.Immunol.137:3614-3619);固相直接标记测定法;固相直接标记的夹心测定法(参见例如Harlow和Lane,1988,Antibodies,A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Press);使用标记的碘的固相直接标记RIA( $I^{125}$ 标签)(参见例如Morel等人,1988,Molec.Immunol.25:7-15);固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(参见例如Cheung等人,1990,Virology176:546-552)和直接标记的RIA(Moldenhauer等人,1990,Scand.J.Immunol.32:77-82)。通常,所述测定涉及使用与固体表面结合的纯化抗原(例如,PD-L1如人PD-L1或糖基化的PD-L1),或者携带任何未标记的测试抗原结合蛋白(例如,测试抗PD-L1抗体)或标记的参照抗原结合蛋白(例如参照抗PD-L1抗体)的细胞。可以通过测定在已知量的测试抗原结合蛋白存在下与固体表面或细胞结合的标签的量来测量竞争性抑制。通常测试抗原结合蛋白过量存在。通过竞争测定法(竞争性抗体)鉴定的抗体包括与参照抗体结合相同表位的抗体和/或结合足够接近由参照抗体结合的表位的相邻表位而引起空间位阻产生的抗体。本文描述了关于确定竞争性结合的方法的附加细节。通常,当竞争性抗体蛋白质过量存在时,它抑制参照抗体与共同抗原的特异性结合达到至少15%或至少23%,例如但不限于40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%或75%以上,以及所述量之间的百分数。在某些情况下,结合被抑制至少80%、85%、90%、95%、96%或97%、98%、99%或更多。

[0104] 如本文所用,术语“阻断性”抗体或“拮抗性”抗体是指防止、抑制、阻断或降低其结合的抗原的生物学或功能活性的抗体。阻断性抗体或拮抗性抗体可以基本上或完全地防止、抑制、阻断或降低抗原的生物学活性或功能。例如,阻断性抗PD-L1抗体可以预防、抑制、阻断或降低PD-L1和PD-1之间的结合相互作用,从而防止、阻断、抑制或降低与PD-1/PD-L1相互作用相关的免疫抑制功能。术语阻断、抑制和中和在本文中可互换使用,是指抗glycPD-L1抗体防止或者以其它方式破坏或减少PD-L1/PD-1相互作用的能力。

[0105] 如本文所用,术语“多肽”或“肽”是指通过肽键连接的串联阵列中的三个或更多个氨基酸的氨基酸聚合物。“多肽”可以是蛋白质、蛋白质片段、蛋白质类似物、寡肽等。构成多肽的氨基酸可以是天然衍生的或合成的。可以从生物学样品中纯化多肽。例如,PD-L1多肽或肽可以由人PD-L1或糖基化的PD-L1的至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续氨基酸组成。在一些实施方案中,多肽具有人PD-L1或糖

基化的PD-L1的至少25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、160、170、180、190、200、210、220、230、240、250、260、270、280或285个连续氨基酸。在某些实施方案中,PD-L1多肽包含PD-L1多肽或糖基化的PD-L1多肽氨基酸序列的至少5个连续氨基酸残基、至少10个连续氨基酸残基、至少15个连续氨基酸残基、至少20个连续氨基酸残基、至少25个连续氨基酸残基、至少40个连续氨基酸残基、至少50个连续氨基酸残基、至少60个连续氨基酸残基、至少70个连续氨基酸残基、至少80个连续氨基酸残基、至少90个连续氨基酸残基、100个氨基酸残基、至少125个连续氨基酸残基、至少150个连续氨基酸残基、至少175个连续氨基酸残基、至少200个连续氨基酸残基、至少250个连续氨基酸残基。

[0106] 如本文所用,术语“类似物”是指具有与参照多肽相似或相同功能的多肽,但不一定包含参照多肽的相似或相同的氨基酸序列,或者具有与参照多肽相似或相同的结构。参照多肽可以是PD-L1多肽、PD-L1多肽的片段、抗PD-L1抗体或抗glycPD-L1抗体。具有与参照多肽相似的氨基酸序列的多肽是指这样的多肽,其具有的氨基酸序列与参照多肽的氨基酸序列至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%相同,参照多肽可以是本文所述的PD-L1多肽或抗glycPD-L1抗体。具有与参照多肽相似结构的多肽是指具有与参照多肽类似的二级、三级或四级结构的多肽,参照多肽可以是本文所述的PD-L1多肽或抗glycPD-L1抗体。多肽的结构可以通过本领域技术人员已知的方法测定,包括但不限于X射线晶体学、核磁共振(NMR)和晶体电子显微镜。

[0107] 如本文所用,当与PD-L1多肽或抗PD-L1抗体相关使用时,术语“变体”是指多肽或抗PD-L1抗体,其与原生的或未修饰的PD-L1序列或抗PD-L1抗体序列相比具有一个或多个(例如,约1至约25、约1至约20、约1至约15、约1至约10、或约1至约5个)氨基酸序列的取代、缺失和/或添加。例如,可以由对原生PD-L1的氨基酸序列进行一个或多个(例如约1至约25、约1至约20、约1至约15、约1至约10、或约1至约5)变化产生PD-L1变体。另外,作为实例,可以由对原生或此前未修饰的抗PD-L1抗体氨基酸序列进行一个或更多(例如,约1至约25、约1至约20、约1至约15、约1至约10、或约1至约5个)变化产生抗PD-L1抗体的变体。变体可以是天然存在的,例如等位基因或剪接变体,或者可以人工构建。多肽变体可以从编码变体的相应核酸分子制备。

[0108] 术语“同一性”是指通过比对和比较序列确定的两个或多个多肽分子或者两个或多个核酸分子的序列之间的关系。“百分比同一性”是指在进行比较的分子中氨基酸或核苷酸之间相同残基的百分比,这是基于被比较的最小分子的大小来计算的。为进行这些计算,比对中的缺口(如果有的话)必须由特定的数学模型或计算机程序(例如,“算法”)来解决。可用于计算比对的核酸或多肽的同一性的方法包括在Lesk, A.M., ed., 1988, Computational Molecular Biology, New York: Oxford University Press; Smith, D.W., ed., 1993, Biocomputing Informatics and Genome Projects, New York: Academic Press; Griffin, A.M. 等人, 1994, Computer Analysis of Sequence Data, Part I, New Jersey: Humana Press; von Heinje, G., 1987, Sequence Analysis in Molecular Biology, New York: Academic Press; Gribskov, M. 等人, 1991, Sequence Analysis Primer, New York: M. Sostton Press; 和Carillo等人, 1988, Applied Math., 48:1073中描

述的那些。

[0109] 在计算百分比同一性时,可以以给出序列之间最大匹配的方式来比对被比较的序列。可用于确定百分比同一性的计算机程序的实例是GCG程序包,其中包括GAP (Devereux等人,1984,Nucl. Acid Res.,12:387;Genetics Computer Group,University of Wisconsin, Madison, WI),其是用于比对两个多肽或多核苷酸以确定其百分比序列同一性的计算机算法。可以将序列进行比对以使其各自的氨基酸或核苷酸序列达到最佳匹配(即通过算法确定的“匹配跨度”)。缺口打开罚分(以平均对角线的3倍计算,其中“平均对角线”是所使用的比较矩阵的对角线的平均值,并且“对角线”是通过特定比较矩阵分配给每个完全氨基酸匹配的得分或数字);缺口延伸罚分(通常是缺口开放罚分的1/10)以及诸如PAM 250或BLOSUM 62之类的比较矩阵与算法结合使用。在某些实施方案中,算法也使用了标准比较矩阵(PAM 250比较矩阵参见Dayhoff等人,1978,Atlas of Protein Sequence and Structure 5:345-352;BLOSUM 62比较矩阵见于Henikoff等人,1992,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:10915-10919)。用于使用GAP程序确定多肽或核苷酸序列的百分比同一性的示例性参数包括以下:(i) 算法:Needleman等人,1970年,J.Mol.Biol.,48:443-453;(ii) 比较矩阵:来自Henikoff等人的BLOSUM62,同上;(iii) 缺口罚分:12(但对末端缺口不罚分);(iv) 缺口长度罚分:4;和(v) 相似度阈值:0。

[0110] 用于比对两个氨基酸序列的某些比对方案可导致仅匹配两个序列的短区域,并且即使两个全长序列之间没有显著的关系,该比对的小段区域也可以具有非常高的序列同一性。因此,如果需要,可以调整所选择的比对方法(例如,GAP程序),以产生跨越代表性数量的氨基酸的比对,例如目标多肽的至少50个连续氨基酸的比对。

[0111] 相对于参照多肽序列的百分比(%)氨基酸序列同一性定义为候选序列中与参照多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比,如果需要,可以在比对序列和引入缺口后实现最大百分比序列同一性,并且不将任何保守取代认为是序列同一性的部分。用于确定百分比氨基酸序列同一性的比对可以以本领域技术人员的技术范围内的各种方式实现,例如使用公开获得的计算机软件,例如BLAST、BLAST-2、ALIGN或Megalign (DNASTAR)软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适当参数,包括在被比较的序列的全长上实现最大比对的任何所需的算法。

[0112] 如本文所用,术语“衍生物”指代包含通过引入氨基酸残基取代、缺失或添加而改变的参照多肽的氨基酸序列的多肽。参照多肽可以是PD-L1多肽或抗PD-L1抗体。本文所用的术语“衍生物”还指经化学修饰的PD-L1多肽或抗PD-L1抗体,例如通过任何类型的分子共价连接到多肽。例如,可以化学修饰PD-L1多肽或抗PD-L1抗体,例如通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、使用已知保护/封闭基团的衍生化、蛋白水解裂解、连接细胞配体、连接肽或蛋白质标签分子或其它蛋白质等。衍生物以与天然存在或起始肽或多肽所连接的分子的类型或位置不同的方式进行修饰。衍生物还可包括天然存在于肽或多肽上的一个或多个化学基团的缺失。PD-L1多肽或抗PD-L1抗体的衍生物可以通过使用本领域技术人员已知技术的化学修饰进行化学修饰,包括但不限于特异性化学裂解、乙酰化、制剂、通过衣霉素的代谢合成等。此外,PD-L1多肽或抗PD-L1抗体的衍生物可含有一种或多种非经典氨基酸。多肽衍生物具有与参照多肽相似或相同的功能,参照多肽可以是本文所述的PD-L1多肽或抗PD-L1抗体,特别是抗glycPD-L1单克隆抗体。

[0113] 本文所用的术语“融合蛋白”是指包含至少两个异源多肽的氨基酸序列的多肽。当与PD-L1多肽或抗PD-L1抗体相关使用时,术语“融合”指代PD-L1多肽或抗PD-L1抗体、其变体和/或衍生物与异源肽或多肽的连接、融合或偶联。在某些实施方案中,融合蛋白保留PD-L1多肽或抗PD-L1抗体的生物学活性。在某些实施方案中,融合蛋白包括与异源肽或多肽偶联、融合或连接的PD-L1抗体 $V_H$ 区, $V_L$ 区, $V_H$  CDR(一个、两个或三个 $V_H$  CDR)和/或 $V_L$  CDR(一个、两个或三个 $V_L$  CDR),其中融合蛋白与PD-L1蛋白或肽上的表位结合。融合蛋白可以通过本领域实践的化学偶联反应或通过分子重组技术制备。

[0114] 如本文所用,术语“组合物”是指产品,其含有任选地指定或有效量的指定组分成分(例如,本文提供的多肽或抗体),以及任何所需产物,其由任选地指定或有效量的特定组分成分的组合或相互作用直接或间接地得到。

[0115] 如本文所用,术语“载体”包括药学上可接受的载体、赋形剂、稀释剂、媒介物或稳定剂,其使用的剂量和浓度对暴露于其中的细胞或哺乳动物无毒。通常,生理上可接受的载体是水性pH缓冲溶液。生理上可接受的载体的实例包括缓冲剂如磷酸盐、柠檬酸盐、琥珀酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸;低分子量(例如,小于约10个氨基酸残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖,二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖、蔗糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖醇,如甘露醇或山梨糖醇;盐形成抗衡离子,如钠;和/或非离子表面活性剂如TWEEN<sup>TM</sup>、聚乙二醇(PEG)和PLURONICS<sup>TM</sup>。术语“载体”还可以指与治疗剂一同施用的稀释剂、佐剂(例如弗氏佐剂,完全或不完整)、赋形剂或媒介物。这种载体,包括药物载体,可以是无菌液体,例如包括石油、动物、植物或合成来源的水和油,例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当静脉内施用组合物(例如药物组合物)时,水是示例性的载体。盐溶液和葡萄糖水溶液和甘油溶液也可用作液体载体,特别是用于可注射溶液。合适的赋形剂(例如药用赋形剂)包括但不限于淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石粉、氯化钠、干脱脂乳、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。如果需要,组合物还可以含有少量的润湿剂或乳化剂或pH缓冲剂。组合物可以采取溶液、悬浮液、乳剂、片剂、丸剂、胶囊、粉剂、持续释放制剂等形式。包括制剂在内的口服组合物可以包括标准载体,如药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。合适的药物载体的实例描述于Remington's Pharmaceutical Sciences, (1990) Mack出版公司, Easton, PA.。包括药物化合物在内的组合物可以含有治疗有效量的抗PD-L1抗体,例如抗glycPD-L1抗体,例如为分离或纯化形式,以及适量的载体,以提供对受试者(如患者)进行适当施用的形式。组合物或制剂应与施用方式相适应。

[0116] 如本文所用,术语“赋形剂”是指通常用作稀释剂、媒介物、防腐剂、粘合剂或稳定剂的惰性物质,并且包括但不限于蛋白质(例如血清白蛋白等)、氨基酸(例如天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸、精氨酸、甘氨酸、组氨酸等)、脂肪酸和磷脂(例如烷基磺酸酯、辛酸酯等)、表面活性剂(例如SDS、聚山梨醇酯、非离子表面活性剂等)、糖类(例如蔗糖、麦芽糖、海藻糖等)和多元醇(例如甘露醇、山梨糖醇等)。另参考Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA,其全部内容通过引用并入本文。

[0117] 如本文所用,术语“药物可接受的”或“药学上可接受的”是指适当地向动物如人施用时不产生不利的、过敏的或者其它不利或不期望的反应的分子实体、制剂和组合物。考

考虑到本公开内容,包含抗体或其它活性成分的药物组合物的制备是本领域技术人员已知的,示例见Remington's Pharmaceutical Sciences,同上。此外,对于动物(例如,人)施用,应当理解,制备物应满足联邦或州政府的管理机构(如FDA生物制品标准局)要求,或者如美国药典、欧洲药典或其它普遍认可的药典中列出的用于动物,特别是人的无菌性、热原性、一般安全性和纯度标准。

[0118] 术语“药物制剂”是指以允许活性成分(例如,抗PD-L1抗体和抗glycPD-L1抗体)的生物学活性生效的形式的制备物,并且其不含有会对施用该制剂的受试者具有不可接受的毒性的其它成分。这种制剂可以是灭菌的,即无菌的或不含有所有活的微生物及其孢子等。

[0119] 术语“包装插入物”用于指通常包括在治疗产品的商业包装中的说明书,其包含关于使用这种治疗产品的适应症、使用、剂量、施用、禁忌症和/或警告的信息。

[0120] 如本文所用,术语“治疗”、“疗法”或“处理”是指将治疗剂施用或应用于有需要的受试者,或对受试者执行手术或手段,以达到获得至少一种积极的治疗效果或益处的目的,例如治疗疾病或健康相关病况。例如,治疗可以包括施用药物有效量的特异性结合糖基化的PD-L1的抗体或其组合物或制剂,以治疗各种类型的癌症。术语“治疗方案”、“给药方案”或“给药流程”可互换使用,并且是指治疗剂的时间安排和剂量,例如本文所述的抗glycPD-L1抗体。如本文所用,术语“受试者”是指具有癌症或被诊断患有癌症的人或非人动物,例如灵长类动物、哺乳动物和脊椎动物。在优选的实施方案中,受试者是人。在一些实施方案中,受试者是癌症患者。在一个实施方案中,有需要的受试者将受益于或被预测能受益于抗glycPD-L1抗体治疗。

[0121] 如本文所用,术语“治疗益处”或“治疗有效”是指通过对病况的药物治疗、疗法、剂量施用促进或增强有需要的受试者(例如,患有癌症或被诊断患有癌症的受试者)的健康状态,特别是使用抗glycPD-L1抗体以及所述方法的实施的结果。这包括但不限于减少疾病的体征或症状的频率或严重程度。例如,癌症的治疗可能涉及例如减小肿瘤大小、降低肿瘤侵入性或严重程度、减少癌细胞向外周组织或器官的浸润、降低肿瘤或癌症的生长速度、或者防止或减少转移。癌症的治疗也可以是指在受试者中达到持续的响应或延长患有癌症的受试者的存活。

[0122] 如本文所用,术语“施用”或“给药”指代物理递送的行为,例如经由注射或口服使存在于身体外部的物质进入患者体内,例如通过口服、皮下、粘膜、皮内、静脉内、肌内递送和/或本文所述或本领域已知的物理递送的任何其它方法。当疾病、障碍或症状或者其症状正在接受治疗性处理时,通常在疾病、障碍或病况或者其症状发生之后进行所述物质的施用。预防性处理包括在疾病、障碍或病况或其症状发作之前的时间内施用所述物质。

[0123] 如本文所用,术语“有效量”指代足以减少、减轻、缓解和/或改善癌症或与其相关症状的严重性和/或持续时间的治疗剂(例如本文所提供抗体或药物组合物)的量或数量。该术语还包括减少或改善癌症发展或进展;减少或改善癌症的复发、发展或发作;和/或改善或增强另一种癌症疗法的预防或治疗作用(例如,除了施用本文提供的抗PD-L1抗体或抗glycPD-L1抗体之外的疗法)所需的量。在一些实施方案中,本文提供的抗体的有效量为约或等于0.1mg/kg(mg抗体/受试者的每kg体重)至约或等于100mg/kg。在某些实施方案中,其中提供的抗体的有效量为约或等于0.1mg/kg、约或等于0.5mg/kg、约或等于1mg/kg、约或等于3mg/kg、约或等于5mg/kg、约或等于10mg/kg、约或等于15mg/kg、约或等于20mg/kg、约或

等于25mg/kg、约或等于30mg/kg、约或等于35mg/kg、约或等于40mg/kg、约或等于45mg/kg、约或等于50mg/kg、约或等于60mg/kg、约或等于70mg/kg、80mg/kg、90mg/kg或100mg/kg。这些量意在包括其中的数量和范围。在一些实施方案中，“有效量”还指本文提供的用于实现特定结果(例如,防止、阻断或抑制细胞表面PD-1与细胞表面PD-L1的结合;或防止、阻断或抑制PD-1/PD-L1介导的免疫抑制)的抗体的量。

[0124] 在还施用其它疗法(例如其它试剂、癌症药物、癌症疗法)的情况下,术语“组合”包括使用多于一种疗法(例如药物疗法和/或癌症疗法)。“组合于”一种或多种另外的治疗剂的施用包括同时(例如并发)和以任何顺序连续施用。术语“组合”的使用不限制对受试者施用疗法的顺序。作为非限制性实例,可以在向具有或诊断患有癌症的受试者施用第二种疗法(例如,试剂)之前(例如1分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、8周、8周、9周、10周、11周或12周)之前、同时或(例如1分钟、15分钟、30分钟、45分钟、1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、7小时、8小时、12小时、24小时、48小时、72小时、96小时、1周、2周、3周、4周、5周、6周、7周、8周、9周、10周、11周或12周或更长时间)施用第一疗法(例如,抗glycPD-L1抗体)。

[0125] 疗法的组合(例如,使用试剂,包括治疗剂)可以比任何两种或更多种单一疗法的叠加效应更有效(例如具有协同效应)。协同效应通常是意想不到的,并且不能预测。例如,治疗剂的组合的协同效应经常允许使用更低剂量的一种或多种试剂和/或以更低频率向癌症患者施用试剂。使用更低剂量的治疗剂和癌症疗法和/或以更低频率施用所述疗法的能力减少与向受试者施用这些疗法相关的毒性的可能性,而不降低疗法的有效性。此外,协同效应可以使得这些疗法在治疗或缓解癌症中的功效得以改善。此外,疗法(例如治疗剂)的组合表现出的协同效应可避免或减少与使用任何单一疗法相关的不利或不期望的副作用。

[0126] 抗糖基化的PD-L1抗体(抗glycPD-L1抗体)

[0127] 在实施方案中提供了抗体或其结合片段,其结合糖基化的PD-L1蛋白质(例如,具有特定N-聚糖结构的PD-L1蛋白质;PD-L1的特异性糖肽)或糖基化的PD-L1肽的,优选具有比结合未糖基化的PD-L1更高的亲和力(即优先地结合糖基化形式),并且抑制糖基化的PD-L1/PD-1相互作用的免疫抑制功能,以及这些抗体在治疗疾病特别是癌症中的用途。所述抗glycPD-L1抗体可以为IgG、IgM、IgA、IgD和IgE Ig类别,也可以是包含保留抗原结合活性的一个或多个抗体CDR结构域的多肽。为说明目的,所述抗glycPD-L1抗体可以是嵌合的、亲和力成熟的、人源化的或人抗体。抗glycPD-L1抗体是单克隆抗体。在某些实施方案中,单克隆抗glycPD-L1抗体是STM004或STM115,或者其人源化或嵌合形式。在另一个优选的实施方案中,单克隆抗glycPD-L1抗体是人源化抗体。通过已知及如本文所述的方式可以产生特异于糖基化的PD-L1抗原及其相应表位中的一个或多个的多克隆或单克隆抗体、抗体片段、结合结构域和CDR(包括上述任何一种的工程化形式),或任何前述物质的缀合物,无论这些抗原或表位是从天然来源分离的还是天然蛋白质的合成衍生物或变体。

[0128] 在一个实施方案中,抗体是嵌合抗体,例如包含来自非人供体的抗原结合序列(例如,V结构域和/或CDR)的抗体,所述抗原结合序列嫁接到异源的非人、人或人源化序列(例如框架和/或恒定结构域序列)。在一个实施方案中,非人供体序列来自小鼠或大鼠。在一个实施方案中,抗原结合序列是合成的,例如通过诱变(例如人噬菌体文库的噬菌体展示筛选

等)获得。在一个实施方案中,嵌合抗体具有小鼠V区和人C区。在一个实施方案中,小鼠轻链V区与人 $\kappa$ 轻链C区融合。在一个实施方案中,鼠重链V区与人IgG1 C区融合。

[0129] 在一个实施方案中,抗体是衍生自骆驼抗体的免疫球蛋白单可变结构域,优选来自没有轻链的重链骆驼抗体,其被称为 $V_H$ H结构域序列或Nanobodies<sup>TM</sup>。Nanobody<sup>TM</sup>(Nb)是天然存在的单链抗体的最小功能片段或单可变结构域( $V_H$ H),并且是本领域技术人员已知的。它们衍生自见于骆驼类的仅有重链的抗体(Hamers-Casterman等人,1993,Nature,363,p.446-448;Desmyter等人,1996,Nat.Struct.Biol.,第803-811页)。在“骆驼科”家族中,发现了没有轻链多肽的免疫球蛋白。“骆驼科”包括旧世界骆驼(双峰骆驼(Camelus bactrianus)和单峰骆驼(Camelus dromedarius))和新世界骆驼(例如,羊驼(Lama paccos)、大羊驼(Lama glama)、原驼(Lama guanicoe)和小羊驼(Lama vicugna))。本文将单可变结构域重链抗体命名为Nanobody<sup>TM</sup>或 $V_H$ H抗体。对于识别不常见或隐藏的表位并结合到蛋白质靶标的空腔或活性位点,Nb的小尺寸和独特的生物物理性质优于常规抗体片段。此外,Nb可以被设计为连接至报告分子或人源化的多特异性和多价抗体。Nb是稳定的,可以在胃肠系统中存活并且可以容易地制造。

[0130] 在另一个实施方案中,抗体是双特异性抗体。将具有不同特异性的两个抗原结合位点整合到单个构建体中,双特异性抗体能够以极大的特异性使两种独立的抗原相互靠拢,因此具有巨大作为治疗剂的潜力。最初通过融合各自能够产生不同的免疫球蛋白的两种杂交瘤制造双特异性抗体。双特异性抗体还通过连接两个scFv抗体片段而省略存在于完全免疫球蛋白中的Fc部分而产生。这种构建体中的每个scFv单元可以包含来自各重( $V_H$ )和轻链( $V_L$ )抗体链的一个可变结构域,其通过合成多肽连接子彼此连接,后者通常被遗传工程化使其免疫原性最低,同时最大限度地保持抵抗蛋白水解。相应scFv单元可以通过多种已知技术连接,包括并入桥接两个scFv单元的短(通常少于10个氨基酸)多肽间隔子,由此产生双特异性单链抗体。因此,所得双特异性单链抗体是在一条单链上含有不同特异性的两种 $V_H/V_L$ 对种类,其中相应scFv单元中的 $V_H$ 和 $V_L$ 结构域由多肽连接子分开,所述连接子长到足以允许这两个结构域之间有分子间结合,这样如此形成的scFv单元通过另一个多肽间隔子连接靠近,所述多肽间隔子足够短以防止例如一个scFv单元的 $V_H$ 结构域和另一个scFv单元的 $V_L$ 之间发生不想要的结合。

[0131] 适合使用的抗体片段的实例包括但不限于:(i)由 $V_L$ 、 $V_H$ 、 $C_L$ 和 $C_{H1}$ 结构域组成的Fab片段;(ii)由 $V_H$ 和 $C_{H1}$ 结构域组成的“Fd”片段;(iii)由单个抗体的 $V_L$ 和 $V_H$ 结构域组成的“Fv”片段;(iv)由 $V_H$ 结构域组成的“dAb”片段;(v)分离的CDR区;(vi)F(ab')<sub>2</sub>片段,包含两个连接的Fab片段的二价片段;(vii)单链Fv分子(“scFv”),其中 $V_H$ 结构域和 $V_L$ 结构域通过允许两个结构域结合形成结合结构域的肽连接子连接;(viii)双特异性单链Fv二聚体(参见美国专利号5,091,513);和(ix)通过基因融合构建的双抗体、多价或多特异性片段(美国专利申请公开号20050214860)。Fv、scFv或双抗体分子可以通过并入连接 $V_H$ 和 $V_L$ 结构域的二硫桥来稳定化。包含连接到 $CH_3$ 结构域的scFv的微体(Hu等人,1996,Cancer Res.,56:3055-3061)也可使用。此外,在实施方案中也预期有抗体样结合肽模拟物。Liu等人,2003,Cell Mol.Biol.49:209-216报道了“类抗体肽模拟物”(ABiPs),它们是作为精简版抗体起作用的肽,具有某些优点:更长血清半衰期以及合成方法更不繁琐。

[0132] 可以用抗原例如糖基化的PD-L1多肽或肽接种动物以产生免疫应答并产生对糖基

化的PD-L1多肽特异的抗体。经常地,抗原与另一个分子结合或缀合以增强免疫应答。如本文所用,缀合物是与用于在动物中引发免疫应答的与抗原结合的任何肽、多肽、蛋白质或非蛋白质物质。在动物中产生的针对抗原接种应答的抗体包含由各种产生抗体的B淋巴细胞产生的各种不相同的分子(多克隆抗体)。多克隆抗体是抗体种类的混合群体,其各自可以识别相同抗原上的不同表位。考虑到动物中多克隆抗体产生的正确条件,动物血清中的大多数抗体将识别对动物免疫接种的抗原化合物上的集合表位。这种特异性通过亲和纯化进一步增强,以仅选择识别目的抗原或表位的那些抗体。

[0133] 单克隆抗体是抗体的单个克隆种类,其中每个抗体分子识别相同的表位,因为所有产生抗体的细胞衍生自单个产生抗体的B淋巴细胞(或其它克隆细胞,例如重组表达抗体分子的细胞)。产生单克隆抗体(MAb)的方法一般开始于制备多克隆抗体的相同方法。在一些实施方案中,使用啮齿动物例如小鼠和大鼠来产生单克隆抗体。在一些实施方案中,使用兔、羊或蛙细胞产生单克隆抗体。大鼠的使用是众所周知的并且可以提供某些优点。通常使用小鼠(例如,BALB/c小鼠),并且通常得到高百分比的稳定融合。用于单克隆抗体生产的杂交瘤技术涉及从先前用糖基化的PD-L1蛋白质或肽进行免疫的小鼠分离的单个产生抗体的B淋巴细胞与永生化的骨髓瘤细胞例如小鼠骨髓瘤细胞系的融合。该技术提供了方法,对单个产生抗体的细胞进行无限次传代,从而可以产生无限量的具有相同抗原或表位特异性的结构相同的抗体,即单克隆抗体。

[0134] 已经开发了用人源的类似结构域代替单克隆抗体的轻链和重链恒定结构域的方法,使外来抗体的可变区保持完整。备选地,在针对人免疫球蛋白基因进行转基因的小鼠或大鼠中产生“完全人”单克隆抗体。还开发了方法通过重组构建具有啮齿动物和人氨基酸序列的抗体可变结构域以将单克隆抗体的可变结构域转化为更像人的形式。在“人源化”单克隆抗体中,仅高可变CDR来自非人(例如小鼠、大鼠、鸡、美洲驼等)单克隆抗体,而框架区衍生自人抗体氨基酸序列。将啮齿动物特征性的抗体中氨基酸序列用在人类抗体的相应位置中发现的氨基酸序列替换减少了在对人类进行治疗使用期间对外源蛋白产生不良免疫反应的可能性。也可对产生抗体的杂交瘤或其它细胞进行遗传突变或其它改变,其可能改变或不改变由杂交瘤产生的抗体的结合特异性。

[0135] 可以使用单克隆抗体和其它抗体及重组DNA技术产生工程化抗体,以产生保留原始抗体的抗原或表位结合特异性的其它抗体或嵌合分子,即该分子具有特异性结合结构域。这样的技术可以包括将编码免疫球蛋白可变区或抗体CDR的DNA导入不同抗体的框架区、恒定区或恒定区加框架区的遗传物质。参见例如美国专利号5,091,513和6,881,557,其通过引用并入本文。

[0136] 通过如本文所述的已知方法,可以产生多克隆或单克隆抗体,具有结合活性的抗体片段,结合结构域和CDR(包括前述任何一种的工程化形式),其特异性结合糖基化的PD-L1蛋白质、一种或多种其各自的表位或任何前述的缀合物,无论这样的抗原或表位是从天然来源分离的还是天然化合物的合成衍生物或变体。

[0137] 抗体可以从任何动物来源产生,包括鸟类和哺乳动物。优选地,抗体是羊、鼠(例如小鼠和大鼠)、兔、山羊、豚鼠、骆驼、马或鸡。此外,更新的技术允许从人组合抗体文库开发和筛选人抗体。例如,细菌噬菌体抗体表达技术允许在没有动物免疫的情况下产生特异性抗体,如美国专利号6,946,546中所述,其通过引用并入本文。这些技术在Marks等人,1992,

Bio/Technol., 10:779-783; Stemmer, 1994, Nature, 370:389-391; Gram等人, 1992, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:3576-3580; Barbas等人, 1994, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91:3809-3813; 和 Schier等人, 1996, Gene, 169 (2) :147-155中有进一步描述。

[0138] 用于在多种动物物种中生产多克隆抗体的方法以及用于生产包括人源化、嵌合和完全人的各种类型的单克隆抗体的方法是本领域公知的, 并且是高度可重复的。例如, 以下美国专利提供了这些方法的描述, 并且通过引用并入本文: 美国专利号3,817,837; 3,850,752; 3,939,350; 3,996,345; 4,196,265; 4,275,149; 4,277,437; 4,366,241; 4,469,797; 4,472,509; 4,606,855; 4,703,003; 4,742,159; 4,767,720; 4,816,567; 4,867,973; 4,938,948; 4,946,778; 5,021,236; 5,164,296; 5,196,066; 5,223,409; 5,403,484; 5,420,253; 5,565,332; 5,571,698; 5,627,052; 5,656,434; 5,770,376; 5,789,208; 5,821,337; 5,844,091; 5,858,657; 5,861,155; 5,871,907; 5,969,108; 6,054,297; 6,165,464; 6,365,157; 6,406,867; 6,709,659; 6,709,873; 6,753,407; 6,814,965; 6,849,259; 6,861,572; 6,875,434; 6,891,024; 7,407,659和8,178,098。

[0139] 预期如本文所述的针对糖基化的PD-L1的抗体将具有中和、阻断、抑制或抵消糖基化的PD-L1的作用的能力, 而不管动物种类、单克隆细胞系或抗体其它来源如何。某些动物物种可能不太优选用于产生治疗性抗体, 因为它们更可能由于通过抗体的“Fc”部分活化补体系统而引起免疫或过敏应答。然而, 完全抗体可以通过酶消化成“Fc” (补体结合) 片段, 并形成具有结合结构域或CDR的肽片段。去除Fc部分降低了该抗体片段引发不希望的免疫应答的可能性, 并因此, 没有Fc部分的抗体可能是预防性或治疗性处理所优选的。如上所述, 抗体也可以被构建为嵌合的, 人源化的或者部分或完全人的, 以便减少或消除由于向动物施用已经在另一物种产生的或具有来自另一物种氨基酸序列的抗体导致的潜在的不良免疫学效应。

[0140] 取代变体通常包含在蛋白质内的一个或多个位点处的一个氨基酸交换为另一个氨基酸, 并且可以设计为调制多肽的一种或多种性质, 有或没有其它功能或性质的丧失。取代可以是保守的, 也就是说, 一个氨基酸用类似形态和电荷的氨基酸代替。保守取代如上述表1所述。备选地, 取代可以是非保守的, 使得多肽的功能或活性受到影响。非保守变化通常涉及残基用化学上不相似的残基取代, 例如用非极性或不带电氨基酸取代极性或带电荷的氨基酸, 反之亦然。

[0141] 抗体蛋白可以是重组的, 或在体外合成的。预期在本文所述的含抗glycPD-L1抗体的组合物中, 每ml有约0.001mg至约10mg的总抗体多肽。因此, 组合物中抗体蛋白质的浓度可以是约、至少约、或至多约、或等于0.001、0.010、0.050、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0mg/ml或更多(或来自其中的任何范围)。这当中, 约、至少约、至多约或等于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、54、55、56、57、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%可以是结合糖基化的PD-L1的抗体。

[0142] 抗体或保留结合活性的抗体的免疫部分可以化学缀合于其它蛋白质或重组表达

为与其它蛋白质的融合蛋白。为了本文所述的目的,所有这些融合蛋白都包括在抗体或抗体的免疫部分的定义中。在一些实施方案中,包含针对糖基化的PD-L1产生的抗体和抗体样分子,或与至少一种试剂连接以形成抗体缀合物或有效载体的多肽。为了增加抗体分子作为诊断剂或治疗剂的功效,通常将至少一种所需分子或部分与抗体连接或者共价结合或复合。这种连接的分子或部分可以是但不限于至少一种效应或报告分子。效应分子包含具有所需活性的分子,例如细胞毒活性。可能与抗体连接的效应分子的非限制性实例包括毒素、治疗酶、抗生素、加放射性标签的核苷酸等。相反,报告分子被定义为可以使用测定法检测的任何部分。可以与抗体缀合的报告分子的非限制性实例包括酶、放射性标签、半抗原、荧光标签、磷光分子、化学发光分子、发色团、发光分子、光亲和分子、着色颗粒或配体如生物素等。本领域已知几种用于将抗体附着或缀合至缀合物分子或部分的方法。一些附着方法涉及使用金属螯合物,非限制性实例使用有机螯合剂如二亚乙基三胺五乙酸酐(DTPA)、亚乙基三胺四乙酸、N-氯-对甲苯磺酰胺和/或四氯-3,6 $\alpha$ -二苯基甘氨酸-3,与抗体连接。本文所述的抗体,特别是单克隆抗体也可以在偶联剂如戊二醛或高碘酸盐存在下与酶反应。通常在这些偶联剂存在下或通过与异硫氰酸盐反应来制备与荧光素标记物的缀合物。在另一个实施方案中,如本文所述的抗glycPD-L1抗体,特别是其结合片段可以与化合物或物质如聚乙二醇(PEG)偶联或连接,以增加施用后在血浆、血清或血液中的其体内半衰期。

[0143] 在特定实施方案中提供了抗体,例如单克隆抗体,其相对于非糖基化的PD-L1蛋白质特异地并优先地结合糖基化的PD-L1蛋白质。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体特异地或优先地结合在PD-L1蛋白质的氨基酸序列的N35、N192、N200和/或N219位置处糖基化的PD-L1蛋白质,例如在SEQ ID NO:1中列出的。备选地,抗glycPD-L1抗体在三维空间中结合靠近于N35、N192、N200或N219中的一个或多个,并且例如可以掩蔽或阻断糖基化的一个或多个残基。例如,抗glycPD-L1抗体的特异性或选择性结合涉及抗体结合PD-L1抗原,其 $K_d$ 小于相对于未糖基化的PD-L1所显示的 $K_d$ 的一半。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体结合糖基化的PD-L1蛋白质,其 $K_d$ 小于相对于未糖基化的PD-L1所显示的 $K_d$ 的至少5分之一。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体结合糖基化的PD-L1蛋白质,其 $K_d$ 小于相对于未糖基化的PD-L1所显示的 $K_d$ 的至少10分之一。在一个实施方案中,在如实施例5所述的细胞流式细胞术结合测定法中,抗体表现出由MFI表示的与表达WT PD-L1的细胞的结合是与表达未糖基化的PD-L1的细胞结合的MFI的1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。

[0144] 具体实施方案提供了特异于糖基化的PD-L1的抗体或其结合片段,其是抗glycPD-L1单克隆抗体STM004。在其它实施方案中,抗glycPD-L1抗体特异性结合PD-L1上对应于本文SEQ ID NO:1所示的人PD-L1氨基酸序列的Y56、K62和K75位置处的氨基酸残基的表位。STM004与PD-L1内的非连续氨基酸结合,该表位是构象表位。包含STM004 MAb表位的人PD-L1多肽的部分具有序列LDLAALIVYWEMEDKNI IQFVHGEEDLKVQH (SEQ ID NO:93)。如本文所示,对包含被MAb STM004识别的表位的氨基酸残基Y56、K62和K75加下划线。

[0145] 另一个具体实施方案提供了特异于糖基化的PD-L1的抗体或其结合片段,其是抗glycPD-L1单克隆抗体STM115。在其它实施方案中,抗glycPD-L1抗体特异性结合PD-L1上对应于本文SEQ ID NO:1所示的人PD-L1氨基酸序列的K62、H69和K75位置的氨基酸残基的表位。包含STM115 MAb表位的人PD-L1多肽的部分具有在SEQ ID NO:1内的序列DKNI IQFVHGEEDLKVQH。如本文所示,对包含被MAb STM115识别的表位的氨基酸残基K62、H69

和K75加下划线。

[0146] STM004 MAb的重链和轻链可变(V)结构域的核酸(DNA)和对应的氨基酸序列如下表3所示。表3提供了STM004的成熟(即不含信号肽) $V_H$ 和 $V_L$ 结构域的核苷酸和氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:2、3、10和11)以及含有信号肽的 $V_H$ 和 $V_L$ 结构域序列(分别为SEQ ID NO:85、86、87和88)。在表3所示含有信号序列的重链和轻链结构域的重链DNA和蛋白V结构域序列中,氨基末端信号序列(分别为 $V_H$ 结构域的1-57号核苷酸和1-19号氨基酸,以及 $V_L$ 结构域的1-60号核苷酸和1-20号氨基酸)以斜体字体表示。表3中还显示了使用Kabat和Chothia编号定义的STM004 MAb重链和轻链V结构域CDR。

[0147] 在一个实施方案中,特异地并优先地结合糖基化的PD-L1的抗glycPD-L1抗体包含SEQ ID NO:3的 $V_H$ 结构域和SEQ ID NO:11的 $V_L$ 结构域。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体与包含SEQ ID NO:3的 $V_H$ 结构域和SEQ ID NO:11的 $V_L$ 结构域的抗体竞争与糖基化的PD-L1的特异性结合。在一个实施方案中,特异地并优先地结合糖基化的PD-L1的抗glycPD-L1抗体包含 $V_H$ 结构域,其包含分别具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:8的氨基酸序列的Chothia CDR1-3,或分别具有SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9的氨基酸序列的Kabat CDR 1-3,或其组合。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体与这样的抗体竞争与糖基化的PD-L1的特异性结合,所述抗体包含的 $V_H$ 结构域,其包含分别具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:8的氨基酸序列的Chothia CDR 1-3,或分别具有SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:9的氨基酸序列的Kabat CDR 1-3,或其组合。在一个实施方案中,特异地并优先地结合糖基化的PD-L1的抗glycPD-L1抗体包含 $V_L$ 结构域,其包含分别具有SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR 1-3。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体与这样的抗体竞争与糖基化的PD-L1的特异性结合,所述抗体包含 $V_L$ 结构域,其包含分别具有SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR 1-3。在一个实施方案中,特异地并优先地结合糖基化的PD-L1的抗glycPD-L1抗体包含(a)  $V_H$ 结构域,其包含分别具有SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:8的氨基酸序列的Chothia CDR 1-3,或分别具有来自SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:9的氨基酸序列的Kabat CDR 1-3,或其组合;及(b)  $V_L$ 结构域,其包含分别具有SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:16的氨基酸序列的CDR 1-3。在实施方案中,抗glycPD-L1抗体与包含上述 $V_H$ 和 $V_L$ 结构域和其中的CDR的抗体竞争与糖基化的PD-L1的特异性结合。

[0148] 在一个实施方案中,特异性结合糖基化的PD-L1的抗glycPD-L1抗体包含与SEQ ID NO:3的氨基酸序列80%、85%、90%、95%、98%或99%相同的 $V_H$ 结构域和/或与SEQ ID NO:11的氨基酸序列80%、85%、90%、95%、98%或99%相同的 $V_L$ 结构域,并且其抑制或阻断糖基化的PD-L1与PD-1的结合。在一个实施方案中,特异地并优先地结合糖基化的PD-L1的抗glycPD-L1抗体包含 $V_H$ 结构域,其包含CDR 1-3,其中至少1、2或全部3个CDR分别相对于SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:8的氨基酸序列,或分别相对于SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:9的氨基酸序列有至少1、2、3、4或5个氨基酸取代,所述抗glycPD-L1抗体阻断糖基化的PD-L1与PD-1的结合。在一个实施方案中,特异地并优先地结合糖基化的PD-L1的抗glycPD-L1抗体包含 $V_L$ 结构域,其包含CDR 1-3,其中至少1、2或全部3个CDR分别相对于SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:16的氨基酸序列有至少1、2、3、4或5个氨基酸取代。在一个实施方案中,特异地并优先地结合糖基化的PD-L1的抗glycPD-L1抗体包含(a)

包含CDR 1-3的 $V_H$ 结构域,其中至少1、2或全部3个CDR分别相对于SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:8的氨基酸序列,或分别相对于SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:9的氨基酸序列有至少1、2、3、4或5个氨基酸取代;和(b)包含CDR 1-3的 $V_L$ 结构域,其中至少1、2个或全部3个CDR分别相对于SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:16的氨基酸序列有至少1、2、3、4或5个氨基酸取代,所述抗体阻断糖基化的PD-L1与PD-1的结合。还提供了使用AbM,Contact或IMGT定义的CDR的STM004的人源化形式,具有人框架区和任选的人恒定结构域。

[0149] 上述抗glycPD-L1抗体结合糖基化的PD-L1,其 $K_d$ 小于相对于未糖基化的PD-L1所显示的 $K_d$ 的一半。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体结合糖基化的PD-L1蛋白,其 $K_d$ 小于相对于未糖基化的PD-L1所显示的 $K_d$ 的至少五分之一。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体结合糖基化的PD-L1蛋白,其 $K_d$ 小于相对于未糖基化的PD-L1蛋白所显示的 $K_d$ 的至少十分之一。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体对糖基化的PD-L1的结合亲和力为5-20nM或5-10nM,包括上下限值。在一个实施方案中,在如实施例5所述的细胞流式细胞术结合测定法中,抗体表现出由MFI表示的与表达WT PD-L1的细胞的结合是与表达未糖基化的PD-L1的细胞结合的MFI的1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。

[0150] 在一个实施方案中,抗体抑制PD-1与PD-L1的相互作用,并且特别地抑制由效应T细胞表达PD-1与PD-L1,特别是抑制由肿瘤细胞表达的糖基化的PD-L1的相互作用。

[0151] 在另一具体实施方案中,提供了特异地并优先地结合糖基化的PD-L1的抗体或其结合片段,其是抗glycPD-L1单克隆抗体STM115。STM115 MAb的成熟重链和轻链可变(V)结构域的核酸(DNA)和相应的氨基酸序列(SEQ ID NO:18、19、26和27)如下表3所示。未加工的重链和轻链V结构域序列(即在N末端含有信号序列)的DNA和氨基酸序列也显示于表3(SEQ ID NO:89、90、91和92),并且氨基末端信号序列以斜体字体表示( $V_H$ 域的1-57号核苷酸和1-19号氨基酸以及 $V_L$ 结构域的1-66号核苷酸和1-22号氨基酸)。表3中还显示了根据Kabat和Chothia定义的STM115 MAb重链和轻链V结构域CDR。

[0152] 在一个实施方案中,特异地并优先地结合糖基化的PD-L1的抗glycPD-L1抗体包含具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的 $V_H$ 结构域和具有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的 $V_L$ 结构域。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体与包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的 $V_H$ 结构域和SEQ ID NO:27的氨基酸序列的 $V_L$ 结构域的抗体竞争与糖基化的PD-L1的特异性结合。在一个实施方案中,特异地并优先地结合糖基化的PD-L1的抗glycPD-L1抗体包含 $V_H$ 结构域,其包含分别具有SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:24的氨基酸序列的Chothia CDR 1-3,或分别具有SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25的氨基酸序列的Kabat CDR 1-3,或其组合。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体与这样的抗体竞争与糖基化的PD-L1的特异性结合,所述抗体包含 $V_H$ 结构域,其包含分别具有SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:24的氨基酸序列的Chothia CDR 1-3,或分别具有SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:25的氨基酸序列的Kabat CDR 1-3,或其组合。在一个实施方案中,特异地并优先地结合糖基化的PD-L1的抗glycPD-L1抗体包含 $V_L$ 结构域,其包含分别具有SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDR 1-3。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体与这样的抗体竞争与糖基化的PD-L1的特异性结合,所述抗体包含 $V_L$ 结构域,其包含分别具有SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDR 1-3。在一个实

实施方案中,特异地并优先地结合糖基化的PD-L1的抗glycPD-L1抗体包含(a)  $V_H$ 结构域,其包含分别具有SEQ ID NO:20,SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:24的氨基酸序列的Chothia CDR 1-3,或分别具有SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:25的氨基酸序列的Kabat CDR1-3,或其组合;及(b)  $V_L$ 结构域,其包含分别具有SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:32的氨基酸序列的CDR 1-3。在实施方案中,抗glycPD-L1抗体与包含上述 $V_H$ 和 $V_L$ 结构域和其中的CDR的抗体竞争与糖基化的PD-L1的特异性结合。

[0153] 在一个实施方案中,特异地并优先地结合糖基化的PD-L1的抗glycPD-L1抗体包含与SEQ ID NO:19的氨基酸序列80%、85%、90%、95%、98%或99%相同的 $V_H$ 结构域和与SEQ ID NO:27的氨基酸序列80%、85%、90%、95%、98%或99%相同的 $V_L$ 结构域。在一个实施方案中,特异地并优先地结合糖基化的PD-L1的抗glycPD-L1抗体包含 $V_H$ 结构域,其包含CDR 1-3,其中至少1、2或全部3个CDR分别相对于SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:24的氨基酸序列或分别相对于SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:25的氨基酸序列有至少1、2、3、4或5个氨基酸取代。在一个实施方案中,特异地并优先地结合糖基化的PD-L1的抗glycPD-L1抗体包含 $V_L$ 结构域,其包含CDR 1-3,其中至少1、2或全部3个CDR分别相对于SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:32的氨基酸序列有至少1、2、3、4或5个氨基酸取代。在一个实施方案中,特异地并优先地结合糖基化的PD-L1的抗glycPD-L1抗体包含(a)  $V_H$ 结构域,其包含CDR1-3,其中至少1、2个或全部3个CDR分别相对于SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22和SEQ ID NO:24的氨基酸序列或分别相对于SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:23和SEQ ID NO:25的氨基酸序列具有至少1、2、3、4或5个氨基酸取代;和/或(b)  $V_L$ 结构域,其包含CDR 1-3,其中至少1、2或全部3个CDR分别相对于SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:32的氨基酸序列有至少1、2、3、4或5个氨基酸取代。还提供了使用AbM,Contact或IMGT定义的CDR的STM115的人源化形式,具有人框架区和任选的人恒定结构域。

[0154] 在实施方案中,前述抗glycPD-L1抗体结合糖基化的PD-L1,其 $K_d$ 小于相对于未糖基化的PD-L1所显示的 $K_d$ 的一半。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体结合糖基化的PD-L1蛋白,其 $K_d$ 小于相对于未糖基化的PD-L1结合所显示的 $K_d$ 的至少五分之一。在一个实施方案中,抗glycPD-L1抗体结合糖基化的PD-L1蛋白,其 $K_d$ 小于相对于未糖基化的PD-L1蛋白结合所显示的 $K_d$ 的至少十分之一。在一个实施方案中,STM115 MAb对糖基化的PD-L1的结合亲和力为5-20nM或5-10nM,包括上下限值。在一个实施方案中,在如实施例5所述的细胞流式细胞术结合测定法中,抗体表现出由MFI表示的与表达WT PD-L1的细胞的结合为与表达未糖基化的PD-L1的细胞结合的MFI的1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。这些抗glycPD-L1抗体抑制PD-1与PD-L1的相互作用,特别是抑制由效应T细胞表达的PD-1与PD-L1,特别是与由肿瘤细胞表达的糖基化的PD-L1的相互作用。

[0155] 在另一个实施方案中,提供了分离的抗glycPD-L1抗体或其结合片段,通过常规竞争方法进行测定时,其结合糖基化的PD-L1或与本文所述的MAb STM004或MAb STM115竞争或交叉竞争与糖基化的PD-L1的特异性结合。在一方面,提供了与MAb STM004或MAb STM115结合相同表位的分离的抗体,例如单克隆抗体,或其结合片段。

[0156] 另一个实施方案提供了分离的抗glycPD-L1抗体,其特异性结合选自LDLAALIVYWEMEDKNIIQFVHG EEDLKVQH (SEQ ID NO:93) 氨基酸序列中的表位,该序列位于SEQ ID NO:1的成熟人PD-L1多肽序列内。

[0157] 另一个实施方案提供了分离的抗glycPD-L1抗体,其与包含SEQ ID NO:1的人PD-L1蛋白质的氨基酸残基Y56、K62和K75的表位结合。一方面,提供了分离的抗glycPD-L1抗体,其在包含SEQ ID NO:1的Y56、K62或K75中的至少一个氨基酸残基的表位上特异性结合糖基化的人PD-L1。另一个实施方案提供了分离的抗glycPD-L1抗体,其与包含SEQ ID NO:1的人PD-L1蛋白质的氨基酸残基K62、H69和K75的表位结合。一方面,提供了分离的抗glycPD-L1抗体,其在SEQ ID NO:1的K62、H69或K75中的至少一个氨基酸残基的表位上特异性结合糖基化的人PD-L1。在实施方案中,抗glycPD-L1抗体接触PD-L1即糖基化的人PD-L1的表位区域中包含的至少两个、至少三个或四个氨基酸残基。

[0158] 另一个实施方案提供了分离的抗glycPD-L1抗体,其在包含SEQ ID NO:1的L48至H78的氨基酸区域内或在D61至H78的氨基酸区域内的至少一个氨基酸的表位上特异性结合糖基化的人PD-L1。在一个实施方案中,提供了分离的抗glycPD-L1抗体,其在包含SEQ ID NO:1的L48至H78的氨基酸区域内的Y56、K62、K75的氨基酸残基的表位上特异性结合糖基化的人PD-L1。在另一个实施方案中,提供了分离的抗glycPD-L1抗体,其在包含SEQ ID NO:1的L48至H78的氨基酸区域内或在D61至H78的氨基酸区域内的K62、H69、K75的氨基酸残基的表位上特异性结合糖基化的人PD-L1。

[0159] 另一个实施方案提供了编码抗glycPD-L1 V<sub>H</sub>结构域的分离的核酸分子,其包含与SEQ ID NO:2或18至少90-98%相同的核苷酸序列和/或编码抗glycPD-L1抗体V<sub>L</sub>结构域,包含分别与SEQ ID NO:10或26至少90-98%相同的核苷酸序列。在实施方案中,编码V<sub>H</sub>和/或V<sub>L</sub>结构域的核苷酸序列分别与SEQ ID NO:2或18,或者SEQ ID NO:10或26是90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的相同。

[0160] 表3. 抗glycPD-L1 MAb的核苷酸和氨基酸序列

SEQ ID NO:	序列	描述
[0161] SEQ ID NO: 2	caggttcagctgcaacagtctgacgctgagttggtgaaacctgggg cttcagtgaaagatacctgcaaggcttctggctacaccttcagtgacc atgctattcactgggtgaaacagaggcctgaacagggcctggaatg	MAb STM004 的成熟重链 V 结构域核苷酸 (DNA) 序列

[0162]

SEQ ID NO:	序列	描述
	gattggatgtatttctcccgaagtggatattacttataatgagaaat tcaagggaaggccacctgactgcagacaaatcctccagcactgc ctacatgcagctcaacagcctgacatctgaggattctgcagtgattt ctgtaaaagatggggctgactactggggccaaggaaccactctc acagtctctca	
SEQ ID NO: 3	QVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFS DHAIHWVKQRPEQGLEWIGCISPGSGDITYN EKFKGKATLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDS AVYFCKRWGLDYWGQGTTLTVSS	MAb STM004 成熟重链 V 结构域蛋白质序列
SEQ ID NO: 4	GYTFTDH	MAb STM004 重链 V 结 构域 Chothia CDR1
SEQ ID NO: 5	DHAIH	MAb STM004 重链 V 结 构域 Kabat CDR1
SEQ ID NO: 6	SPGSGD	MAb STM004 重链 V 结 构域 Chothia CDR2
SEQ ID NO: 7	CISPGSGDITYNEKFKG	MAb STM004 重链 V 结 构域 Kabat CDR2
SEQ ID NO: 8	WGLDY	MAb STM004 重链 V 结 构域 Chothia CDR3
SEQ ID NO: 9	KRWGLD	MAb STM004 重链 V 结 构域 Kabat CDR3
SEQ ID NO: 10	gacattgtgctcaccatctccagcttcttggctgtgctctagggc agagagccaccatctcctgcagagccagtgaaagtgtgaatttat ggcacaactttaatgcagtggtaccaacagaaaccaggacagccac ccagactcctcatctatgctgcatccaacgtagaatctggggtccctg ccaggttagtggcagtggtctgggacagacttcagcctcaacatc catcctgtggaggacgatgataatgcaatgtattctgtcagcaaagta ggaaggtccgtacacgttcggaggggggaccaagctggaaataa aa	MAb STM004 成熟 κ 轻 链 V 结构域核苷酸 (DNA) 序列
SEQ ID NO: 11	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVEFY GTTLMQWYQQKPGQPPELLIYAASNVESGV PARFSGSGGTDFSLNIHPVEDDDIAMYFCQ QSRKVPYTFGGGTKLEIK	MAb STM004 成熟 κ 轻 链 V 结构域蛋白质序列
SEQ ID NO: 12	RASESVEFYGTTLMQ	MAb STM004 κ 轻链 V 结构域 Chothia CDR1
SEQ ID NO: 13	RASESVEFYGTTLMQ	MAb STM004 κ 轻链 V 结构域 Kabat CDR1
SEQ ID NO: 14	AASNVES	MAb STM004 κ 轻链 V

[0163]

SEQ ID NO:	序列	描述
		结构域 Chothia CDR2
SEQ ID NO: 15	AASNVES	MAb STM004 $\kappa$ 轻链 V 结构域 Kabat CDR2
SEQ ID NO: 16	QQSRKVPYT	MAb STM004 $\kappa$ 轻链 V 结构域 Chothia CDR3 Chothia CDR3
SEQ ID NO: 17	QQSRKVPYT	MAb STM004 $\kappa$ 轻链 V 结构域 Kabat CDR3
SEQ ID NO: 18	gaagtgatgctggaggagctctgggggagccttagtgagcctgga gggtccctgaaactctctgtgtagcctctggattcactttcagtaact atgccatgtcttgggttcgccagactccagagaggaggctggagtg ggtcgcattactaataatggtggtacttacactactatccagacagt gtgaagggtcgattcaccatctccagagacaatgccaggaacacc tgtacctcaaatgagcagctctgaggtctgaggacacggccatgat ttctgtcaagaccgctccattactacggtggttagccactttgactact ggggccaaggcaccactctcacggtctcctca	MAb STM115 成熟重链 V 结构域核苷酸 (DNA) 序列
SEQ ID NO: 19	EVMLVESGGALVEPGGSLKLSVASGFTFS NYAMSWVRQTPERRLEWVASITNGGTYTY YPDSVKGRFTISRDNARNTLYLQMSSLRSE DTAMYFCARPLHYYGGSHFDYWGQGTTLT VSS	MAb STM115 重链 V 结构域蛋白质序列
SEQ ID NO: 20	GFTFSNY	MAb STM115 重链 V 结构域 Chothia CDR1
SEQ ID NO: 21	NYAMS	MAb STM115 重链 V 结构域 Kabat CDR1
SEQ ID NO: 22	TNGGTY	MAb STM115 重链 V 结构域 Chothia CDR2
SEQ ID NO: 23	SITNGGTYTYYPDSVKG	MAb STM115 重链 V 结构域 Kabat CDR2
SEQ ID NO: 24	PLHYYGGSHFDY	MAb STM115 重链 V 结构域 Chothia CDR3
SEQ ID NO: 25	PLHYYGGSHFDY	MAb STM115 重链 V 结构域 Kabat CDR3
SEQ ID NO: 26	gaaattgtgctcaccagctctccagcactcatggctgcattccagg ggagaaggtcaccatcacctgcagtgctcagttcaagtataagttcca acactttgactggtaccagcagaagtcagaaattcccccaaaccc tggatttatggcacatccaacctggcttctggagtcctgttcgcttca	MAb STM115 成熟 $\kappa$ 轻链 V 结构域核苷酸 (DNA) 序列

[0164]

SEQ ID NO:	序列	描述
	gtggcagtgatctgggacctcttattctctcacaatcagcagcatgg aggctgaagatgctgccacttattactgtcaacagtggagtagtacc cactcacgttcggagggggaccaagctggaaataaaa	
SEQ ID NO: 27	EIVLTQSPALMAASPGKVTITCSVSSISSN TLHWYQQKSEISPKPWIYGTSNLASGVPVR FSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQW SSYPLTFGGGTKLEIK	MAb STM115 成熟 κ 轻链 V 结构域蛋白质序列
SEQ ID NO: 28	SVSSISSNTLH	MAb STM115 κ 轻链 V 结构域 Chothia CDR1
SEQ ID NO: 29	SVSSISSNTLH	MAb STM115 κ 轻链 V 结构域 Kabat CDR1
SEQ ID NO: 30	GTSNLAS	MAb STM115 κ 轻链 V 结构域 Chothia CDR2
SEQ ID NO: 31	GTSNLAS	MAb STM115 κ 轻链 V 结构域 Kabat CDR2
SEQ ID NO: 32	QQWSSYPLT	MAb STM115 κ 轻链 V 结构域 Chothia CDR3
SEQ ID NO: 33	QQWSSYPLT	MAb STM115 κ 轻链 V 结构域 Kabat CDR3
SEQ ID NO: 85	<i>atggaatgcagctgggttattctcttctcctgtcagtaactacaggtgtccactcccaggtcagctgcaacagctgacgctgagttggtgaaacctggggctcagtgaaatctcctgcaaggcttctggctacacctcagtgaccatgctattcactgggtgaaacagaggcctgaacagggcctggaatggattggatgtattctcccgaagtggatattactataatgagaaatcaagggcaaggccacctgactgcagacaaatcctccagcactgcctacatgcagctcaacagcctgacatctgaggattctcagtgatttctgtaaaagatggggctgactactggggccaaggaaacacttcacagctcctca</i>	MAb STM004 重链 V 结构域核苷酸 (DNA) 序列  5' 末端 1-57 号核苷酸以斜体表示, 其编码信号序列
SEQ ID NO: 86	<i>MECSWVILFFLSVTTGVHSQVQLQQSDAELVKPGASVKISCKASGYTFS DHAIHWVKQRP</i> EQGLEWIGCISPGSGDITYNEKFKGKATLTA DKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYFCKRWGLD YWGQGTTLTVSS	MAb STM004 重链 V 结构域蛋白质序列 氨基末端 M1-S19 号残基以斜体表示, 其构成信号序列
SEQ ID NO: 87	<i>atggagacagacacactcctgctatgggtgctgctgctgggttcaggctccactgggtgacattgtgctacccaatcctcagctctttggctgtgtcttagggcagagagccaccatctcctgcagagccagtgaagtgttgaatttatggcacaactttaatgcagtggtaccaacagaaaccaggacagccaccagactcctcatctatgctgcatccaacgta</i>	MAb STM004 κ 轻链 V 结构域核苷酸 (DNA) 序列  5' 末端 1-60 号核苷酸以斜体表示, 其编码信号

SEQ ID NO:	序列	描述
	gaatctggggtccctgccaggtttagtggcagtggtctgggacag acttcagcctcaacatccatcctgtggaggacgatgatattgcaatgt atttctgcagcaaagtaggaaggttccgtacacgttcggaggggg gaccaagctggaaataaaa	序列
SEQ ID NO: 88	<b>METDLLLWVLLLWVPGSTG</b> DIVLTQSPAS LAVSLGQRATISCRASESVEFYGTTLMQWY QQKPGQPPRLLIYAASNVESGVPARFSGSGS GTDFSLNIHPVEDDDIAMYFCQQSRKVPYTF GGGTKLEIK	MAb STM004 κ 轻链 V 结构域蛋白质序列 氨基末端 M1-G20 号残基以斜体表示, 其构成信号序列
SEQ ID NO: 89	<i>atggactcgggctaaactgggttttctngtcttattttaaaaggt</i> <i>gtccagtgtgaagtgatgctggtggagtctgggggagccttagtgg</i> <i>agcctggagggtccctgaaactctctgtgtagcctctggattcacttt</i> <i>cagtaactatgccatgctctgggttcgccagactccagagaggagg</i> <i>ctggagtgggtcgcattactaatggtggtacttacacctactatc</i> <i>cagacagtgtgaagggtcattcaccatctccagagacaatgccag</i> <i>gaacacctgtacctcaaatgagcagtctgaggtctgaggacacg</i> <i>gccatgtatttctgtgcaagaccgctcattactacggtgtagccac</i> <i>tttgactactggggccaaggcaccactctcacgggtctcctca</i>	MAb STM115 重链 V 结构域核苷酸 (DNA) 序列 5' 末端 1-57 号核苷酸以斜体表示, 其编码信号序列
[0165] SEQ ID NO: 90	<b>MDFGLNWFVLVLILKGVQCE</b> VMLVESGGA LVEPGGSLKLSVASGFTFSNYAMSWVRQT PERRLEWVASITNGGTYTYYPDSVKGRFTIS RDNARNTLYLQMSSLRSEDAMYFCARPLH YYGGSHFDYWGQGTTLTVSS	MAb STM115 重链 V 结构域蛋白质序列 氨基末端 M1-C19 号残基以斜体表示, 其构成信号序列
SEQ ID NO: 91	<i>atggatttcatgtgcagatttcagcttcatgctaactcagtgccaca</i> <i>gtcatttcgtccagtgagaaattgtgctcaccagctcaccagcactc</i> <i>atggctgcatctccaggggagaaggtcaccatcacctgcagtgtca</i> <i>gttcaagtataagtccaacactttgactggtaccagcagaagttag</i> <i>aaatttcccccaccctggattatggcacatccaacctggcttctg</i> <i>gagtccctgttcgcttcagtggcagtgatctgggacctcttattctc</i> <i>cacaatcagcagcatggaggctgaagatgctgccacttattactgtc</i> <i>aacagtggagtagttaccactcacgttcggaggggggaccaagct</i> <i>ggaaataaaa</i>	MAb STM115 κ 轻链 V 结构域核苷酸 (DNA) 序列 5' 末端 1-66 号核苷酸以斜体表示, 其编码信号序列
SEQ ID NO: 92	<b>MDFHVQIFSFMLISVTVISSSGE</b> IVLTQSPAL MAASPGEKVITITCSVSSISSNTLHWYQQKS EISPKPWIYGTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYS LTISSMEAEDAATYYCQQWSSYPLTFGGGT KLEIK	MAb STM115 κ 轻链 V 结构域蛋白质序列 氨基末端 M1-G22 号残基以斜体表示, 其构成信号序列

[0166] 疾病治疗

[0167] 在某些方面,如本文实施方案中所述的抗体或其抗原结合片段(例如,特异地并优先地与糖基化的PD-L1结合并阻断或抑制抗PD-L1与PD-1的结合的抗体)可用于治疗方法,并被施用以治疗癌症。因此,本文提供的是通过向有需要的受试者施用治疗有效量的至少

一种如本文所述的抗glycPD-L1抗体来治疗癌症的方法。受试者优选为人类患者。如本文所述,处理或治疗性处理包括减少、防止、抑制或阻断患者中的癌细胞的生长、增殖、迁移等,特别是促进对其的细胞杀伤或细胞凋亡。所描述的方法对进行治疗的受试者,优选人类患者提供益处,特别是对于受试者的表达PD-L1细胞表面蛋白质的肿瘤细胞,PD-L1细胞表面蛋白质可以与免疫效应细胞,如T细胞,特别是杀伤细胞或细胞毒性T细胞的细胞表面上表达的PD-1结合/相互作用。

[0168] 预期用有效量的本文所述的至少一种抗glycPD-L1抗体治疗这些受试者会导致抗体与肿瘤细胞上的糖基化的PD-L1的结合,并防止、阻断或抑制表达PD-L1的肿瘤细胞与表达PD-1的T细胞的相互作用,从而防止或避免T细胞活性的免疫抑制,并允许T细胞被激活以杀伤携带PD-L1的肿瘤细胞。因此,所提供的方法对于有需要、能够受益于或希望受益于通过实践本发明的方法达到的效果的受试者是有利的。受试者正寻求涉及施用治疗有效量的至少一种抗glycPD-L1抗体的方法的治疗益处,或正接受这种治疗益处,这提供了对本领域的优势。另外,与其它处理和治疗方法相比,本方法还提供消除或避免副作用、不良后果、禁忌症等的进一步优点,或降低与此类问题相关的风险或可能性。

[0169] 在某些实施方案中,所述方法包括施用如本文所述的两种或更多种不同的抗glycPD-L1抗体。抗glycPD-L1抗体的共同施用可以比单独施用任一抗体更具治疗或预防有效性,和/或可以允许比单独施用任一抗体以更剂量或更低频率施用。

[0170] 可使用本治疗方法的癌症包括任何恶性细胞类型,例如在实体瘤或血液肿瘤中发现的那些。通常,肿瘤是指任何大小的恶性或潜在恶性的赘生物或组织块,包括原发性肿瘤和继发性肿瘤。实体肿瘤是通常不含囊肿或液体的异常组织块或生长。示例性的实体瘤可以包括但不限于选自以下器官的肿瘤,选自:胰腺、胆囊、结肠、盲肠、胃、脑、头、颈、卵巢、睾丸、肾、喉、肉瘤、肺、膀胱、黑素瘤、前列腺和乳腺。示例性的血液肿瘤包括骨髓的肿瘤、T或B细胞恶性肿瘤、白血病、淋巴瘤、母细胞瘤、骨髓瘤等。可以使用本文提供的方法治疗的癌症的其它实例包括但不限于上皮组织癌(carcinoma)、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤、白血病、鳞状细胞癌、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状细胞癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌或胃部癌症(包括胃肠癌和胃肠道间质瘤)、胰腺癌、胆囊癌、胶质母细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜或子宫癌、唾液腺癌、肾癌或肾癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、多种头颈癌、黑素瘤、浅表性扩散性黑色素瘤、雀斑恶性黑色素瘤、肢端雀斑样黑色素瘤、结节性黑素瘤、以及B细胞淋巴瘤(包括低级/滤泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL)、小淋巴细胞(SL)NHL、中级/滤泡NHL、中级弥漫性NHL、高级免疫母细胞NHL、高级淋巴细胞性NHL、高级小型非裂解细胞NHL、大体积NHL、套细胞淋巴瘤、AIDS相关淋巴瘤和Waldenstrom氏巨球蛋白血症)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性淋巴细胞白血病(ALL)、毛细胞白血病、多发性骨髓瘤、急性骨髓性白血病(AML)和慢性髓细胞白血病。

[0171] 癌症可以具体地具有以下组织学类型,但不必局限于此:赘生物,恶性;上皮组织癌;上皮组织癌,未分化的;巨细胞和梭状细胞癌;小细胞癌;乳头状癌;鳞状细胞癌;淋巴上皮癌;基底细胞癌;毛母质癌;移行细胞癌;乳头状移行细胞癌;腺癌;胃泌素瘤,恶性;胆管癌;肝细胞癌;联合肝细胞癌和胆管癌;小梁腺癌;腺样囊性癌;腺瘤息肉中的腺瘤;腺癌,家族性结肠息肉病;实体癌;类癌肿瘤,恶性;分支肺泡腺癌;乳头状腺癌;发色细胞癌;嗜酸细胞癌;嗜酸细胞腺癌;嗜碱细胞癌;透明细胞腺癌;颗粒细胞癌;滤泡腺癌;乳头状和滤泡性

腺癌;非包囊硬化性癌;肾上腺皮质癌;子宫内膜癌;皮肤附件癌;大汗腺腺癌;皮脂腺腺癌;盯眇腺癌;粘液表皮样癌;囊腺癌;乳头状囊腺癌;乳头状浆液性囊腺癌;粘液性囊腺癌;粘液腺癌;印戒细胞癌;浸润性导管癌;髓样癌;小叶癌;炎性癌;佩吉特病,乳腺;腺泡细胞癌;腺鳞癌;腺癌伴随鳞状上皮化生;胸腺瘤,恶性;卵巢基质肿瘤,恶性;泡膜细胞瘤、恶性;颗粒细胞瘤,恶性;成骨细胞瘤,恶性;支持细胞瘤;间质细胞(leydig cell)瘤,恶性;脂质细胞瘤,恶性;副神经节瘤,恶性;乳腺外副神经节瘤,恶性;嗜铬细胞瘤;血管球肉瘤,恶性黑色素瘤;无色素黑素瘤;浅表扩散性黑色素瘤;巨型色素痣恶性黑色素瘤;上皮样细胞黑素瘤;蓝色痣,恶性;肉瘤;纤维肉瘤;纤维组织细胞瘤,恶性;粘液肉瘤;脂肪肉瘤;平滑肌肉瘤;横纹肌肉瘤;胚胎横纹肌肉瘤;肺泡横纹肌肉瘤;间质肉瘤;混合肿瘤,恶性;穆勒混合肿瘤;肾母细胞瘤;肝母细胞瘤;癌肉瘤;间质瘤,恶性;膀胱肿瘤,恶性;叶状肿瘤,恶性;滑膜肉瘤;间皮瘤,恶性;无性细胞瘤;胚胎癌;畸胎瘤,恶性;卵巢甲状腺瘤,恶性;绒毛膜癌;中肾瘤,恶性;血管肉瘤、血管内皮瘤,恶性;卡波西肉瘤;血管外皮细胞瘤,恶性;淋巴管瘤、骨肉瘤、并发骨肉瘤;软骨肉瘤;软骨细胞瘤,恶性;间充质软骨肉瘤;骨巨细胞肿瘤;尤因氏肉瘤;牙源性肿瘤,恶性;成釉细胞性牙肉瘤;成釉细胞瘤,恶性;成釉细胞纤维肉瘤;松果体瘤,恶性;脊索瘤;胶质瘤,恶性;室管膜瘤、星形细胞瘤;原生质星形细胞瘤;纤维性星形细胞瘤;星形母细胞瘤;胶质母细胞瘤;少突胶质细胞瘤;少突胶质母细胞瘤;原始神经外胚层瘤;小脑肉瘤;神经节母细胞瘤;神经母细胞瘤;视网膜母细胞瘤;嗅觉神经源性肿瘤;脑膜瘤,恶性;神经纤维肉瘤;神经鞘瘤,恶性;颗粒细胞肿瘤,恶性;恶性淋巴瘤;霍奇金病;副肉芽肿;恶性淋巴瘤,小淋巴细胞;恶性淋巴瘤,大细胞,弥漫性;恶性淋巴瘤,滤泡性;蕈样肉芽肿病;其它指定的非霍奇金淋巴瘤;恶性组织细胞增多症;多发性骨髓瘤;肥大细胞肉瘤;免疫增生性小肠疾病;白血病;淋巴样白血病;浆细胞白血病;红细胞白血病;淋巴瘤肉瘤细胞白血病;骨髓性白血病;嗜碱性白血病;嗜酸粒细胞性白血病;单核细胞白血病;肥大细胞白血病;巨核细胞白血病;骨髓肉瘤和毛细胞白血病。

[0172] 待治疗的癌症优选地对于PD-L1,特别是糖基化的PD-L1是阳性的。在某些实施方案中,肿瘤细胞对于诸如EGFR或HER2/neu的肿瘤细胞标记物表达也是阳性的,例如对于乳腺癌。这些标记物存在与否可以表明可以将靶向治疗剂如针对EGFR阳性癌症的吉非替尼、或针对HER2/neu阳性癌症的赫赛汀的酪氨酸激酶抑制剂与本文描述的双功能抗glycPD-L1抗体组合的组合法。因此,某些实施方案提供了治疗患有对糖基化的PD-L1和第二癌症标志物如EGFR是阳性的癌症的受试者的癌症的方法,所述方法包括施用本文所述的抗glycPD-L1抗体组合靶向第二癌症标志物的癌症治疗剂,例如EGFR酪氨酸激酶抑制剂,例如吉非替尼。这样的组合可以得到改善的治疗功效,包括减少副作用、毒性等。在某些实施方案中,癌症是BLBC。

[0173] 可用于表征癌症以指导选择疗法或监测疗法的其它标记物包括在非小细胞肺癌和间变性大细胞淋巴瘤中的ALK基因重排和过表达;用于肝癌和生殖细胞肿瘤的甲胎蛋白(AFP);用于多发性骨髓瘤、慢性淋巴细胞白血病和一些淋巴瘤的 $\beta$ -2-微球蛋白(B2M);用于绒毛膜癌和生殖细胞肿瘤的 $\beta$ -人绒毛膜促性腺激素( $\beta$ -hCG);用于卵巢癌和乳腺癌的BRCA1和BRCA2基因突变;用于慢性骨髓性白血病、急性淋巴细胞白血病和急性骨髓性白血病的BCR-ABL融合基因(菲律宾染色体);用于皮肤黑色素瘤和结肠直肠癌的BRAF V600突变;用于胃肠道间质瘤和粘膜黑色素瘤的C-kit/CD117;用于乳腺癌的CA15-3/CA27.29;用于胰腺

癌,胆囊癌、胆管癌和胃癌的CA19-9;用于卵巢癌的CA-125;用于髓样甲状腺癌的降钙素;用于结肠直肠癌和其它一些癌症的癌胚抗原(CEA);用于非霍奇金淋巴瘤的CD20;用于神经内分泌肿瘤的嗜铬粒蛋白A(CgA);用于膀胱癌的染色体3、7、17和9p21;用于肺癌的细胞角蛋白片段21-1;用于非小细胞肺癌的EGFR基因突变分析;用于乳腺癌的雌激素受体(ER)/孕激素受体(PR);用于膀胱癌的纤维蛋白/纤维蛋白原;用于卵巢癌的HE4;用于乳腺癌、胃癌和胃食管连接腺癌的HER2/neu基因扩增或蛋白质过表达;用于多发性骨髓瘤和Waldenström巨球蛋白血症的免疫球蛋白;用于结直肠癌和非小细胞肺癌的KRAS基因突变分析;用于生殖细胞肿瘤、淋巴瘤、白血病、黑素瘤和神经母细胞瘤的乳酸脱氢酶;用于小细胞肺癌和神经母细胞瘤的神经元特异性烯醇化酶(NSE);用于膀胱癌的核基质蛋白22;用于前列腺癌的前列腺特异性抗原(PSA);用于甲状腺癌的甲状腺球蛋白;以及用于乳腺癌的尿激酶纤溶酶原激活物(uPA)和纤溶酶原激活物抑制剂(PAI-1)。

[0174] 抗glycPD-L1抗体,例如单克隆抗体,可以以多种方式用作抗肿瘤剂。一个具体实施方案涉及使用抗体作为抗肿瘤剂的方法,因此其包括使肿瘤细胞群与治疗有效量的抗体或含抗体的组合物接触足以阻断或抑制肿瘤细胞生长的时间段。在一个实施方案中,通过向需要的患者施用例如静脉内、皮下、腹膜内或肿瘤内注射的治疗有效量的生理上可耐受的组合物来实现体内接触肿瘤细胞,所述组合物包含本文描述的抗glycPD-L1抗体。抗体可以通过注射或通过在规定时间内逐渐输注进行胃肠外施用。有用的施用和递送方案包括静脉内、腹膜内、口服、肌内、皮下、腔内、透皮、经皮、蠕动泵手段或直接注射到含有肿瘤细胞的组织中。

[0175] 通常静脉内施用包含抗体的治疗组合物,例如通过注射单位剂量。当涉及治疗组合物使用时,术语“单位剂量”是指适合作为受试者的单位剂量的物理上离散的单位,每个单位含有经计算以产生所需治疗效果的预定量的活性物质与所需稀释剂相结合,即载体或媒介物。以与剂量剂型相容的方式并且以治疗有效量施用含有抗glycPD-L1抗体的组合物。待施用的量取决于待治疗的受试者、受试者系统利用活性成分的能力以及所需的治疗效果。所需施用的活性成分的精确量取决于实施者的判断,并且是针对每个人特有的。然而,本文公开了用于系统应用的合适剂量范围,并取决于施用途径。还考虑了用于初始和加强施用的合适方案,并且通常涉及初次施用后通过随后的注射或其它施用以一个或多个间隔(小时)时进行重复剂量。示例性多次施用适合于维持连续地高血清和组织水平的抗体。备选地,考虑连续静脉输注足以将血液中浓度保持在体内疗法指定的范围内。

[0176] 考虑到本文所述的抗glycPD-L1抗体可以系统或局部施用以治疗疾病,例如抑制肿瘤细胞生长或杀伤具有局部晚期或转移癌症的癌症患者中的癌细胞。抗体可以单独施用或者与抗增殖药物或抗癌药物组合施用。在一个实施方案中,在手术或其它程序之前,施用抗glycPD-L1抗体以降低患者的癌症负荷。备选地,可以在手术之后以周期性间隔施用所述抗体,以确保任何残留的癌症(例如手术未能消除的癌症)的大小或生长能力降低和/或不能存活。如上所述,抗体的治疗有效量是经计算以达到预期效果的预定量。因此,用于施用抗glycPD-L1抗体的剂量范围是足够大以产生期望效果的那些,其中肿瘤细胞分裂和细胞周期运行的症状减轻。最佳地,剂量不应大到引起不良副作用,如高粘滞综合征、肺水肿、充血性心力衰竭、神经学效应等。通常,剂量将随着患者病的年龄、状况、体型和性别以及疾病的程度而变化,并且可由本领域技术人员如医师或临床医生确定。当然,在发生任何并发症

的情况下,个体医生可以调整剂量。

#### [0177] 治疗方法

[0178] 在某些实施方案中,所述的组合物和方法涉及单独施用本文所述的抗glycPD-L1抗体或与第二种或其它药物或疗法组合。这种药物或疗法可以用于治疗与PD-L1或糖基化的PD-L1相关的任何疾病,优选与人PD-1与人PD-L1或糖基化的人PD-L1的相互作用相关。例如,该疾病可以是癌症。所述组合物和方法包含至少一种抗PD-L1抗体,其相比未糖基化的PD-L1或变体糖基化的PD-L1优先地结合糖基化的PD-L1蛋白质,所述组合物和方法在治疗癌症或其它疾病中具有治疗性或保护性作用,特别是通过防止、减少、阻断或抑制PD-1/PD-L1相互作用,从而提供治疗效果和治疗。

[0179] 所述组合物和方法,包括组合疗法,具有治疗或保护作用并且可以增强治疗或保护作用,和/或增加另一种抗癌或抗过度增殖疗法的治疗效果。治疗和预防方法和组合物可以以有效实现所需效果例如杀伤癌细胞和/或抑制细胞过度增殖的组合量提供。该方案可涉及施用抗glycPD-L1抗体或其结合片段和第二种疗法。第二种疗法可以有或没有直接的细胞毒性作用。例如,第二种疗法可以是上调免疫系统而不具有直接细胞毒性作用的试剂。组织,肿瘤和/或细胞可以暴露于包含一种或多种试剂(例如抗体或抗癌剂)的一种或多种组合物或药物制剂,或可以将组织、肿瘤和/或细胞暴露于两种或更多种不同的组合物或制剂,其中一种组合物提供例如1) 抗体、2) 抗癌剂、3) 抗体和抗癌剂或者4) 两种或更多种抗体。在一些实施方案中,第二种疗法也是抗PD-L1抗体,优选抗glycPD-L1抗体,其相比未糖基化的PD-L1优先地结合糖基化的PD-L1,或者在其它实施方案中,为抗PD-1抗体。不限于此,示例性的抗PD-1抗体包括彭培拉珠单抗和尼莫单抗;示例性的抗PD-L1抗体包括阿替珠单抗。而且,预期这种组合疗法可以与化学疗法、放疗、手术治疗或免疫疗法结合使用。

[0180] 举例来说,当应用于细胞时,术语“接触”和“暴露”用于描述将治疗性多肽,优选本文所述的抗glycPD-L1抗体递送到靶细胞或置于与靶细胞毗邻的位置的过程,特别是与靶抗原特异性结合,所述靶抗原例如PD-L1抗原,特别是在肿瘤或癌细胞表面表达或高度表达的糖基化的PD-L1。治疗性抗glycPD-L1抗体或其结合片段的这种结合防止、阻断、抑制或降低肿瘤或表达PD-L1的癌细胞与在效应T细胞上的PD-1的相互作用,由此防止与PD-L1/PD-1相互作用相关的免疫抑制。在实施方案中,化疗剂或放疗剂还与抗glycPD-L1抗体或其结合片段结合施用或递送至受试者。为了实现细胞杀伤,可将例如一种或多种试剂以有效杀死细胞或防止细胞分裂的组合量递送至细胞。

[0181] 抗glycPD-L1抗体可以相对于另一种抗癌治疗在之前、之中、之后或以多种组合进行施用。可以在一种施用的同时或在之前或之后的数分钟、数日、数周范围的间隔进行另一种施用。在将抗体与抗癌剂分开提供给患者的实施方案中,通常确保在每次递送时间之间的相当长的一段时间不会过期,这样所施用的化合物仍然能够对患者发挥有利的组合效果。为进行说明,在这种情况下,预期可以向患者提供抗体和抗癌治疗,彼此相隔约12至24或72小时,更具体地,彼此相隔约6-12小时内。在某些情况下,可能需要显著延长处理的时间段,其中各自施用之间的空隙由几天(2、3、4、5、6或7)至几周(1、2、3、4、5、6、7或8)。

[0182] 在某些实施方案中,治疗过程或治疗周期将持续1-90天或更长时间(该范围包括中间的天数和最后一天)。预期可以在第1天至第90天的任何一天(该范围包括中间的天和最后一天)或其任何组合给予一种试剂,并且在第1天至第90天的任何一天(该范围包括中

间的天和最后一天)或其任何组合给予另一种试剂。在一天(24小时内)内,可以向患者给予一次或多次施用的试剂。此外,在治疗过程之后,预期可以存在不施用抗癌治疗的时间段。这个时间段可以持续例如1-7天、和/或1-5周、和/或1-12个月或更长(该范围包括中间的天数和上限时间),这取决于患者状况,如预后、力量、健康等。治疗周期将根据需要重复。可以采用各种治疗组合。在以下所示的组合治疗方案的代表性实例中,抗体如抗glycPD-L1抗体或其结合片段以“A”表示,抗癌疗法用“B”表示:

[0183] A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B A/B/B B/A/A A/B/B/B B/A/B/B B/B/B/A B/B/A/B A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A。

[0184] 将本实施方案的任何抗体或疗法施用给患者都将遵循用于施用这些化合物的一般方案,如果有的话,需考虑到试剂的毒性。因此,在一些实施方案中,存在监测不良事件和毒性的步骤,特别是由于组合疗法造成的那些。

[0185] 在一个实施方案中,提供了一种方法,其涉及单独或与另一种抗癌剂组合施用抗glycPD-L1抗体给有此需要的患者,即患有癌症或肿瘤的患者。在施用抗glycPD-L1抗体之前,可以评估患者肿瘤或癌症的样品中PD-L1的存在情况。如果该评估的结果显示患者的肿瘤或癌症对于糖基化的PD-L1是阳性的,则基于患者的glycPD-L1+肿瘤或癌症可能会更适合用抗glycPD-L1抗体治疗,且治疗更可能得到有益的结果,选择这样的患者进行治疗。医疗专业人员或医师可以建议患者继续进行抗glycPD-L1抗体治疗方法,并且患者可以基于医疗专业人员或医师的建议来决定继续进行治疗。此外,在治疗过程中,可以测定患者的肿瘤或癌细胞的糖基化的PD-L1的存在情况,作为监测治疗进展或有效性的一种方式。如果测定法显示例如在患者肿瘤或癌细胞上的糖基化的PD-L1中有变化、损失或降低,则医学专业人员可以与患者一起决定治疗是否应该继续,或者以某种方式改变,例如,更高的剂量、添加另外的抗癌剂或疗法等。

[0186] 化疗

[0187] 可以根据本实施方案的治疗或治疗性方法使用多种多样的化疗剂。术语“化疗”是指使用药物治疗癌症。“化疗剂”是指在癌症治疗中施用的化合物或组合物。通过细胞内的活性模式对这些试剂或药物进行分类,例如,它们是否以及在什么阶段影响细胞周期以及细胞生长和增殖。备选地,可以基于其直接交联DNA、插入DNA中或通过影响细胞中的核酸合成诱导染色体和有丝分裂畸变的能力来表征化疗试剂。

[0188] 化疗剂的非限制性实例包括烷化剂,例如噻替派和环磷酰胺;烷基磺酸盐,例如白消安、英丙舒凡和哌泊舒凡;氮丙啶,如苯并多巴、卡泊酮、美妥替哌(meturedopa)和尿烷亚胺(uredopa);乙烯亚胺(ethylenimine)和甲基氨基蜜胺(methylamelamine),包括六甲蜜胺(altretamine)、三亚乙基蜜胺(triethylenemelamine)、三亚乙基磷酰胺、三亚乙基硫代磷酸胺(triethylenethiophosphoramidate)和三羟甲基蜜胺(trimethylolomelamine);多聚乙酰(acetogenins)(尤其是布拉它辛(bullatacin)和布拉它辛酮(bullatacinone));喜树碱(包括合成类似物拓扑替康);苔藓抑素(bryostatin);卡利他汀;CC-1065(包括阿多来新、卡折来新和比折来新合成类似物);念珠藻环肽(特别是念珠藻环肽1和念珠藻环肽8);多拉司他汀;倍癌霉素(包括合成类似物,KW-2189和CB1-TM1);软珊瑚醇(eleutherobin);水鬼蕉碱(pancratistatin);原肉质汀(sarcodictyin);海绵抑制素(spongistatin);氮芥

类,如苯丁酸氮芥、萘氮芥、氯磷酰胺、雌莫司汀、异环磷酰胺、氮芥、盐酸氧氮芥、美法仑、新恩比兴、酚西林、泼尼莫斯汀、曲伐沙星和尿嘧啶氮芥;亚硝基脲,如卡莫司汀、氯脲菌素、福莫司汀、洛莫司汀、尼莫司汀和雷尼司汀;抗生素,例如烯二炔抗生素(例如卡奇霉素(calicheamicin)、特别是卡奇霉素 $\gamma$  I和卡奇霉素 $\omega$  II);达内霉素(dynemicin),包括达内霉素A;二膦酸盐,如氯膦酸盐;埃斯波霉素;以及新制癌菌素(neocarzinostatin)生色团和相关色素蛋白烯二炔抗生素生色团、阿克拉霉素、放线菌素、奥曲霉素、重氮丝氨酸、博来霉素、放线菌素C、卡柔比星、洋红霉素、嗜癌霉素(carzinophilin)、染色霉素、更生霉素、柔红霉素、地托比星(detorubicin)、6-重氮-5-氧代-L-正亮氨酸、多柔比星(包括吗啉代-多柔比星、氰基吗啉代-多柔比星、2-吡咯啉-多柔比星和脱氧阿霉素)、表柔比星、伊索比星、伊达比星、马可霉素、丝裂霉素例如丝裂霉素C、霉酚酸、诺拉霉素、橄榄霉素、培洛霉素、泊非霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑霉素、链脲菌素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁和佐柔比星;抗代谢物,如甲氨蝶呤和5-氟尿嘧啶(5-FU);叶酸类似物,如二甲叶酸、蝶呤和三甲氧甲酸;嘌呤类似物,如氟达拉滨、6-巯基嘌呤、噻虫胺和硫鸟嘌呤;嘧啶类似物,如安西他滨、阿扎胞苷、6-氮尿苷、卡莫氟、阿糖胞苷、双脱氧尿苷、多西菌定、依诺他滨和氟尿苷;雄激素,如卡鲁睾酮、丙酸甲雄烷酮、环硫雄醇、美雄烷、睾内酯;抗肾上腺素,如米托坦和三链烷;叶酸补充剂,如克罗来酸;乙葡醛内酯;醛磷酰胺糖苷;氨基乙酰丙酸;恩尿嘧啶;安吡啶;贝拉布昔;比生群;依达曲沙;地磷酰胺;地美可辛;地吡醌;依氟鸟氨酸;依利醋铵;埃博霉素;乙环氧啶;硝酸镓;羟基脲;香菇多糖;氯尼达明;美登素类,如美坦生和安丝菌素;米托胍脲;米托蒽醌;莫哌达醇;硝酸醇;喷司他丁;蛋氨酸氮芥;吡柔比星;洛索蒽醌;鬼臼酸;2-乙基胍;甲基苄胍;PSK多糖复合物;雷佐生;根霉素;西佐喃;锗螺环;细交链孢菌酮酸;三乙撑亚胺苯醌;2,2',2''-三氯三乙胺;单端孢霉烯类(特别是T-2毒素、疣毒素A、杆孢菌素A和蛇形菌素);氨基甲酸乙酯;长春地辛;达卡巴嗪;甘露莫斯汀;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;gacytosine;阿拉伯糖苷("Ara-C");环磷酰胺;紫杉烷类,如紫杉醇和多西他赛吉西他滨;6-巯鸟嘌呤;巯基嘌呤;铂配位络合物,如顺铂、奥沙利铂和卡铂;长春碱;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱;长春瑞滨;诺消灵;替尼泊苷;依达曲沙;道诺霉素;氨基蝶呤;希罗达;伊班膦酸钠;伊立替康(例如、CPT-11);拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸(DMFO);类视色素,如视黄酸;卡培他滨;卡铂;甲基苄胍;普卡霉素;吉西他滨;诺维本、法呢基蛋白酪氨酸酶抑制剂、反式铂,和任何上述的药理学上可接受的盐、酸或衍生物。

#### [0189] 放疗

[0190] 放疗包括使用引起DNA损伤的药物的治疗。放疗已广泛用于癌症和疾病治疗,并且包括通常称为 $\gamma$ 射线、X射线的那些和/或将放射性同位素定向递送至肿瘤细胞。还考虑了其他形式的DNA损伤因子,例如微波、质子束照射(美国专利号5,760,395和4,870,287)和UV照射。所有这些因素最有可能影响到对DNA本身、对DNA前体、对DNA的复制和修复以及对染色体的组装和维持的广泛损害。用于X射线的示例性剂量范围从长时间(3至4周)每日剂量为50-200伦琴到单次剂量2000至6000伦琴。放射性同位素的剂量范围变化很大,并且取决于同位素的半衰期、所放射的辐射的强度和类型、被赘生细胞的摄取以及接受治疗的受试者的耐受性。

#### [0191] 免疫疗法

[0192] 在所述方法的一些实施方案中,免疫疗法可以组合或结合如本文所述的抗glycPD-L1抗体的施用而使用。在癌症治疗的情况下,免疫治疗剂通常依赖于使用免疫效应细胞和分子来靶向和破坏癌细胞。利妥昔单抗(RITUXAN<sup>®</sup>)就是这样一个实例。也可以组合施用其它检查点抑制剂,包括伊匹单抗(ipilimumab)。抗glycPD-L1抗体也可以与其它抗PD-1或抗PD-L1抑制剂组合施用,例如针对PD-L1的抗体,其包括阿唑单抗、durvalumab或阿曲单抗,或针对PD-1的抗体,包括纳武单抗、帕母单抗(pembrolizumab)或pidilizumab。此外,实施方案中的一种或多种抗glycPD-L1抗体可以彼此组合施用。单独的抗体可以用作治疗的效应子,或者可以募集其它细胞以真正影响细胞杀伤。抗体还可以与药物或毒素(化疗剂、放射性核素、蓖麻毒素A链、霍乱毒素、百日咳毒素等)缀合,并且仅用作靶向剂。备选地,效应子可以是携带表面分子的淋巴细胞,所述表面分子直接或间接地与肿瘤细胞靶标相互作用,例如T细胞上的PD-1/肿瘤细胞上的PD-L1的相互作用。多种效应细胞包括细胞毒性T细胞和天然杀伤(NK)细胞。

[0193] 在免疫治疗的一方面,肿瘤细胞必须具有适合靶向的一些标记物(蛋白质/受体)。最佳地,肿瘤标记物蛋白质/受体不存在于大多数其它细胞,例如非癌细胞或正常细胞上。存在有许多肿瘤标记物,并且在本实施方案的情况下,这些肿瘤标记物中的任何一种可以适合于被与抗glycPD-L1抗体施用的另一种药物或疗法所靶向。常见的肿瘤标记物包括例如CD20、癌胚抗原(CEA)、酪氨酸酶(p97)、gp68、TAG-72、HMFG、唾液酸化Lewis抗原、MucA、MucB、PLAP、层粘连蛋白受体、erbB和p155。免疫疗法的另一个方面是将抗癌作用与免疫刺激作用相结合。也存在免疫刺激分子,包括细胞因子,如IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、 $\gamma$ -IFN;趋化因子,如MIP-1、MCP-1、IL-8;和生长因子,如FLT3配体。

[0194] 目前正在研究或正在使用的免疫疗法的实例是免疫佐剂,例如牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)、恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)、二硝基氯苯和芳族化合物(美国专利号5,801,005和5,739,169;Hui等人,1998, *Infection Immun.*, 66(11):5329-5336;Christodoulides等人,1998, *Microbiology*, 144(Pt 11):3027-3037)、细胞因子疗法,例如 $\alpha$ 、 $\beta$ 和 $\gamma$ 干扰素;IL-1、GM-CSF和TNF(Bukowski等人,1998, *Clinical Cancer Res.*, 4(10):2337-2347;Davidson等人,1998, *J. Immunother.*, 21(5):389-398;Hellstrand等人,1998, *Acta Oncologica*, 37(4):347-353);基因疗法,例如TNF、IL-1、IL-2和p53(Qin等人,1998, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95(24):14411-14416;Austin-Ward and Villaseca, 1998, *Revista Medica de Chile*, 126(7):838-845;美国专利号5,830,880和5,846,945);和单克隆抗体,例如抗CD20、抗神经节苷脂GM2和抗p185(Hollander, 2012, *Front. Immun.*, 3:3;Hanibuchi等人,1998, *Int. J. Cancer*, 78(4):480-485;美国专利号5,824,311)。预期可以将一种或多种抗癌疗法与本文所述的抗体疗法一起使用。

[0195] 手术

[0196] 大约60%的患有癌症的个体经历过某种类型的手术,其包括预防性、诊断性或分期、治愈性和姑息性手术。治疗性手术包括其中全部或部分癌组织被物理去除、切除和/或破坏的切除术,并且可以与其它疗法结合使用,例如本文所述的抗glycPD-L1抗体治疗、化疗、放疗、激素疗法、基因疗法、免疫疗法和/或替代疗法、以及其组合。肿瘤切除是指至少部分肿瘤的物理去除。除肿瘤切除术外,手术治疗包括激光手术、冷冻手术、电外科手术和微观手术(Mohs手术)。在切除部分或全部癌细胞、组织或肿瘤时,可在体内形成空腔。可以通

过将额外的抗癌疗法灌注、直接注射或局部应用到该区域来完成治疗。可以重复这种治疗，例如每1、2、3、4、5、6或7天，或每1、2、3、4周和5周或每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月。这些治疗也可以使用不同的剂量。

[0197] 蛋白质纯化

[0198] 蛋白质(包括抗体,特别是抗glycPD-L1抗体)的纯化技术是本领域技术人员熟知的。这些技术在一个层面上涉及细胞、组织或器官的均质化和粗分级为多肽和非多肽级分。目的蛋白质或多肽可以使用色谱和电泳技术进一步纯化,以实现部分或完全纯化(或纯化至均一性),除非另有说明。特别适用于制备纯的蛋白质或肽的分析方法是离子交换色谱、尺寸排阻色谱、反相色谱、羟基磷灰石色谱、聚丙烯酰胺凝胶电泳、亲和色谱、免疫亲和色谱和等电聚焦。纯化肽的一种特别有效的方法是快速液相色谱(FPLC)或甚至高效液相色谱(HPLC)。如本领域通常已知的,可以改变进行各种纯化步骤的顺序,和/或可以省略某些步骤,仍然得到适用于制备基本上纯化的多肽的方法。

[0199] 纯化的多肽,例如本文所述的抗glycPD-L1抗体,是指可以分离或已经与其它组分分离并相对于其天然可获得状态纯化至任何程度的多肽。因此,分离或纯化的多肽也是指游离于其可以天然存在的环境的多肽,所述环境为例如细胞、组织、器官、生物学样品等。通常,“纯化的”是指已经进行分级以去除各种其它组分的多肽组合物,并且该组合物基本上保持其所表达的生物学活性。“基本上纯化的”组合物是指这样的组合物,其中多肽形成组合物的主要组分,因此构成组合物的约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%或更多的蛋白质组分。

[0200] 考虑到本公开内容,用于定量多肽例如抗体蛋白质的纯化程度的多种方法是本领域技术人员已知的。这些方法包括例如确定活性级分的比活性,或通过SDS/PAGE分析评估级分内的多肽的量。用于评估级分纯度的优选方法是计算级分的比活性,将其与初始提取物的比活性进行比较,从而计算其中的纯度,通过“纯化倍数”评估。当然,用于表示活性量的实际单位将取决于选择用于纯化的特定测定技术,以及表达的多肽是否表现出可检测的活性。

[0201] 通常不要求多肽总是以其最纯化的状态提供。实际上,预期在某些实施方案中不那么纯化的产物可以具有效用。部分纯化可以通过组合使用更少的纯化步骤或通过利用相同的一般纯化方案的不同形式来实现。例如,应当理解,使用HPLC设备进行的阳离子交换柱色谱通常将比使用低压色谱系统的相同技术产生更大“倍数”的纯化。表现出较低相对纯化程度的方法可能在蛋白质产品的完全回收中或在维持表达蛋白质的活性中有优势。

[0202] 亲和色谱是依赖于要分离的物质(蛋白质)与其可以特异性结合的分子之间(例如受体-配体类型的相互作用)的特异性亲和力的色谱程序。通过将一个结合伙伴共价偶联到不溶性基质来合成柱材料(树脂)。然后,柱材料能够从通过柱树脂的溶液中特异性吸附物质。通过将条件改变为结合将被破坏/不会发生的条件(例如,改变的pH、离子强度、温度等)而进行洗脱。该基质应该是一种物质,它不会在很大程度上吸附分子,而且具有广泛的化学、物理和热稳定性。配体应该以不影响其结合特性的方式进行偶联。配体还应提供相对紧密的结合;然而,结合物质的洗脱应该在不破坏所需的样品蛋白质或配体的情况下进行。

[0203] 尺寸排阻色谱(SEC)是这样的色谱方法,其中溶液中的分子基于其尺寸或以更技术的术语而言的其流体动力学体积而得到分离。它通常应用于大的分子或大分子复合物,

如蛋白质和工业聚合物。通常,当使用水溶液输送样品通过柱时,该技术被称为凝胶过滤色谱,这与凝胶渗透色谱的名称相对,后者是当使用有机溶剂作为流动相时所使用的。SEC的基本原理是不同尺寸的颗粒将以不同的速率通过固定相而洗脱(过滤),导致颗粒溶液基于尺寸的分选。只要所有的颗粒同时或接近同时加样,相同尺寸的颗粒将一起被洗脱。

[0204] 高效(又名高压)液相色谱(HPLC)是一种经常在生物化学和分析化学中用于分离、鉴定和定量化合物的柱色谱形式。HPLC使用装有色谱填充材料(固定相)的柱,使流动相移动通过柱的泵,以及显示分子保留时间的检测器。保留时间根据固定相、待分析的分子和所使用的溶剂之间的相互作用而变化。

[0205] 药物制备物

[0206] 在进行含有抗glycPD-L1抗体或糖基化的PD-L1多肽的药物组合物的临床应用的情况下,制备适合于预期应用的药物或治疗组合物通常是有益的。通常,药物组合物可以包含溶解或分散在药学上可接受的载体中的有效量的一种或多种多肽或其它试剂。在某些实施方案中,药物组合物可以包含例如至少约0.1%的多肽或抗体。在其它实施方案中,多肽或抗体可以构成约2%至约75%的单位重量,或例如约25%至约60%之间,以及可在其间导出的任何范围,包括上下限值。每种有治疗用途的组合物中的活性化合物的量都可以以这种方式制备,使得在任何给定的单位剂量中都能获得合适的剂量。制备这种药物制备物的本领域技术人员会考虑到诸如溶解度、生物利用度、生物半衰期、施用途径、产品保质期以及其它药理学考虑的因素,因此可能期望有各种剂量及治疗方案。

[0207] 此外,根据某些方面,适于施用的组合物可以在具有或不具有惰性稀释剂的药物可接受的载体中提供。载体应该是可吸收的,并且包括液体、半固体例如凝胶或糊状物或固体载体。载体或稀释剂的实例包括脂肪、油、水、盐溶液、脂质、脂质体、树脂、粘合剂、填充剂等,或其组合。如本文所用,“药物可接受的载体”包括任何和全部水性溶剂(例如水、醇/水溶液、乙醇、盐水溶液、胃肠外媒介物如氯化钠、林格氏葡萄糖等),非水性溶剂(例如丙二醇、聚乙二醇、植物油和可注射有机酯如油酸乙酯)、分散介质、包衣(例如卵磷脂)、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂(例如抗细菌剂或抗真菌剂、抗氧化剂、螯合剂、惰性气体、对羟基苯甲酸酯(例如对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯)、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞)、等渗剂(例如糖、氯化钠)、吸收延迟剂(例如单硬脂酸铝、明胶)、盐、药物、药物稳定剂(如缓冲液,氨基酸如甘氨酸和赖氨酸,碳水化合物如葡萄糖、甘露糖、半乳糖、果糖、乳糖、蔗糖、麦芽糖、山梨醇、甘露醇等)、凝胶、粘合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、调味剂、染料、流体和营养补充剂,诸如此类的材料及其组合是本领域普通技术人员已知的。除非任何常规的介质、试剂、稀释剂或载体对接受者或其含有的组合物的治疗有效性有害,则将其用于实施本方法的可施用组合物中是适当的。根据众所周知的参数调节药物组合物中的pH及各种组分的精确浓度。根据某些方面,以任何方便和实用的方式,即通过溶液、悬浮液、乳化、混合、包封、吸收、研磨等方式将组合物与载体组合。对于本领域技术人员来说,这些程序是常规的。

[0208] 在某些实施方案中,组合物可以包含不同类型的载体,这取决于它们是以固体、液体或气溶胶形式施用,以及是否需要无菌以用于施用途径,例如注射。组合物可以配制成用于静脉内、皮内、经皮、鞘内、动脉内、腹膜内、鼻内、阴道内、直肠内、肌肉内、皮下、粘膜、口服、定位、局部施用、通过吸入(例如气溶胶吸入)、通过注射、通过输注、通过连续输注,通过局

部灌注直接洗浴靶细胞,经导管、经灌注、在脂质组合物(例如,脂质体)中或通过其它方法或者前述任何组合而施用,这些都是本领域普通技术人员已知的。参见例如Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,1990。通常,这样的组合物可以制备成液体溶液或悬浮液;还可以制备成适合于在注射之前添加液体制备溶液或悬浮液的固体或可重构形式;制备物也可以被乳化。

[0209] 抗体可以以游离碱、中性或盐形式被配制到组合物中。药物可接受的盐包括酸加成盐,例如与蛋白质性质组合物的游离氨基形成的那些、或与无机酸例如盐酸或磷酸或者有机酸如乙酸、草酸、酒石酸或扁桃酸形成的。与游离羧基形成的盐也可以衍生自无机碱,例如钠、钾、铵、钙或氢氧化铁;或有机碱,如异丙胺、三甲胺、组氨酸或普鲁卡因。

[0210] 在进一步的实施方案中,可以使用包含多肽、一种或多种脂质和水性溶剂的药物脂质媒介物组合物。如本文所用,术语“脂质”是指特征性地不溶于水并可用有机溶剂萃取的宽范围的物质中的任何一种。这种广泛类型的化合物是本领域技术人员公知的,并且如本文所用的术语“脂质”,其不限于任何特定的结构。实例包括含有长链脂族烃及其衍生物的化合物。脂质可以是天然存在的或合成的(即由人工设计或生产)。然而,脂质通常是生物学物质。生物学脂质是本领域熟知的,并且包括例如中性脂肪、磷脂、磷酸甘油酯、类固醇、萜烯、溶脂素、鞘糖脂、糖脂、硫化物、具有醚和酯连接的脂肪酸的脂质、可聚合脂质及其组合。当然,本领域技术人员所理解的除本文具体描述的化合物以外的化合物作为脂质也包括在所述组合物和方法中。本领域普通技术人员将熟悉可用于将组合物分散在脂质媒介物中的技术范围。例如,抗体可以分散在含脂质的溶液中、用脂质溶解、用脂质乳化、与脂质混合、与脂质组合、与脂质共价结合、以脂质中的悬浮液形式被包含在内、与胶束或脂质体一同被包含或与其复合,或通过本领域普通技术人员已知的任何方式与脂质或脂质结构相连。分散体可以导致或不导致脂质体的形成。

[0211] 术语“单位剂量”或“剂量”是指适合于受试者的物理上不连续的单位,每个单位含有预定量的治疗性抗体或含有治疗性抗体的组合物,经过计算产生与其施用(即适当的途径和治疗方案)相关的上述所需的反应。根据治疗次数和单位剂量,待施用的量取决于所需的效果。施用于患者或受试者的本实施方案的组合物的实际剂量可以通过物理和生理因素确定,如受试者的体重、年龄、健康和性别,待治疗的疾病的类型,疾病渗透程度,以前或同时进行治疗干预,患者特异性,施用途径以及具体治疗物质的效力、稳定性和毒性。在其它非限制性实例中,剂量还可以包含每次施用约 $1\mu\text{g}/\text{kg}/\text{体重}$ 、约 $5\mu\text{g}/\text{kg}/\text{体重}$ 、约 $10\mu\text{g}/\text{kg}/\text{体重}$ 、约 $50\mu\text{g}/\text{kg}/\text{体重}$ 、约 $100\mu\text{g}/\text{kg}/\text{体重}$ 、约 $200\mu\text{g}/\text{kg}/\text{体重}$ 、约 $350\mu\text{g}/\text{kg}/\text{体重}$ 、约 $500\mu\text{g}/\text{kg}/\text{体重}$ 、约 $1\text{mg}/\text{kg}/\text{体重}$ 、约 $5\text{mg}/\text{kg}/\text{体重}$ 、约 $10\text{mg}/\text{kg}/\text{体重}$ 、约 $50\text{mg}/\text{kg}/\text{体重}$ 、约 $100\text{mg}/\text{kg}/\text{体重}$ 、约 $200\text{mg}/\text{kg}/\text{体重}$ 、约 $350\text{mg}/\text{kg}/\text{体重}$ 、约 $500\text{mg}/\text{kg}/\text{体重}$ 至约 $1000\text{mg}/\text{kg}/\text{体重}$ 或更多,以及其中可导出的任何范围。在本文所列数量的可导出范围的非限制性实例中,可以基于上述数量施用约 $5\text{mg}/\text{kg}/\text{体重}$ 至约 $100\text{mg}/\text{kg}/\text{体重}$ 、约 $5\mu\text{g}/\text{kg}/\text{体重}$ 至约 $500\text{mg}/\text{kg}/\text{体重}$ 等的范围。上述剂量包括所指示的量之间的量,并且也旨在包括该范围的包括上下限值。在任何情况下,负责施用的执行者将决定组合物中活性成分的浓度和个体受试者的适当剂量。

[0212] 治疗组合物或制备物的具体特性不旨在是限制性的。例如,合适的组合物可以在制剂中与生理上可耐受的液体、凝胶、或固体载体、稀释剂和赋形剂一起提供。在一些实施方案中,可以将治疗制备物施用于哺乳动物用于兽医用途,例如用于家畜,也可以以类似于

其它治疗剂的方式进行人类中的临床应用。通常,治疗功效所需的剂量将根据使用类型和施用方式以及如上所述的个体受试者的特定要求而变化。

#### [0213] 糖基化的PD-L1作为标记物

[0214] 提供了涉及使用如实施方案中所述的至少一种抗glycPD-L1抗体的方法。这些方法可用于获自患有癌症或肿瘤的受试者的肿瘤或癌细胞的生物标记物评估中。提供了一种确定患有癌症的受试者是否也具有表达糖基化的PD-L1(其为携带PD-L1的肿瘤或癌细胞的生物标记物),特别是在这种细胞的细胞表面上可检测水平的糖基化的PD-L1的癌症或肿瘤的方法。例如,如果对受试者的癌症或肿瘤细胞测试并确定在细胞表面上表达糖基化的PD-L1,那么受试者是用所描述的抗glycPD-L1抗体单独或与另一种抗癌剂组合进行治疗的候选者,例如从所述治疗中受益。这些方法包括从患有癌症或肿瘤的受试者获得样品,使用本领域已知和使用的本文所述的结合方法,例如使用实施方案的抗glycPD-L1抗体测试样品中衍生自受试者的癌症或肿瘤细胞上糖基化的PD-L1的存在情况,并且如果发现所述受试者的癌症或肿瘤对于糖基化的PD-L1蛋白质的细胞表面表达呈阳性,则向所述受试者施用有效量的抗glycPD-L1抗体,单独或与另一种抗癌剂组合施用。在治疗前诊断受试者为具有表达糖基化的PD-L1的癌症或肿瘤允许对受试者更有效的治疗和益处,因为施用的抗glycPD-L1抗体更可能阻断或抑制受试者的表达糖基化的PD-L1的癌症或肿瘤细胞与受试者的表达PD-1的T细胞的相互作用,从而防止T细胞活性引起的免疫抑制,并通过活化的T细胞杀伤而促进对肿瘤或癌细胞的杀伤。在一个实施方案中,该方法可以包括首先选择受试者,其癌症或肿瘤可适于对表达的糖基化的PD-L1蛋白质的存在情况进行测试。

[0215] 在癌症治疗或疗法过程中,包括抗glycPD-L1抗体和另一种抗癌药物或治疗的组合治疗的过程中,以及治疗停止后,可以使用类似的方法来监测患者肿瘤细胞上糖基化的PD-L1的存在情况。这些方法还可与诊断方法伴随使用,其中抗癌治疗方案或组合治疗涉及在治疗前和治疗期间测试或测定患者肿瘤或癌症样品中表达糖基化的PD-L1的肿瘤或癌细胞,例如进行监测,以确定成功的结果或其可能性。

#### [0216] 其它试剂

[0217] 预期其它药剂可以与本实施方案的某些方面组合使用以改善治疗的治疗功效。这些另外的试剂包括影响细胞表面受体和GAP连接的上调的试剂,细胞生长抑制和分化剂,细胞粘附抑制剂,增加过度增殖细胞对凋亡诱导剂的敏感性的试剂,或其它生物制剂。通过提高GAP连接数增加细胞间信号传导可增加对相邻的过度增殖细胞群体的抗过度增殖作用。在其它实施方案中,细胞生长抑制或分化剂可以与本实施方案的某些方面组合使用以改善所述治疗的抗过度增殖功效。考虑细胞粘附的抑制剂以改善本实施方案的功效。细胞粘附抑制剂的实例是粘着斑激酶(FAK)抑制剂和洛伐他汀。进一步预期的是,增加过度增殖细胞对细胞凋亡的敏感性的其它试剂例如抗体c225可与本实施方案的某些方面组合使用以改善治疗功效。

#### [0218] 试剂盒和诊断

[0219] 在另一个实施方案中,提供了含有治疗剂和/或其它治疗和递送剂的试剂盒。在一些实施方案中,试剂盒用于制备和/或用于施用涉及本文所述的抗glycPD-L1抗体的疗法。试剂盒可以包含含有本文所述的任何药物组合物的一个或多个密封的小瓶。试剂盒可以包括例如至少一种抗糖基化的PD-L1的抗体,以及用于制备、配制和/或施用一种或多种抗

glycPD-L1抗体或者用于执行所描述的方法中的一个或多个步骤的试剂。在一些实施方案中,试剂盒还可以包括合适的容器装置,其是不会与试剂盒的组分反应的容器,例如Eppendorf管、测定板、注射器、瓶或管。容器可以由可灭菌的材料制成,例如塑料或玻璃。

[0220] 试剂盒还可以包括概述本文所阐述的方法的程序步骤的说明书,并将遵循与本文所述的基本相同的程序或本领域普通技术人员已知的方法。说明信息可以在包含机器可读说明的计算机可读介质中,所述机器可读说明在使用计算机执行时可显示递送药物有效量的治疗剂的实际或虚拟程序。

[0221] 融合物与缀合物

[0222] 本文提供的抗糖基化的PD-L1抗体或糖基化的PD-L1多肽也可以与其它蛋白质一起表达为融合蛋白,或者化学缀合于另一部分。在一些实施方案中,抗体或多肽可以具有同种型或亚类不同的Fc部分,可以是嵌合的或杂交的,和/或可以被修饰,例如以改善效应功能、控制半衰期或组织可及性、增加生物物理特性如稳定性、以及提高生产效率(这与降低成本有关)。用于构建融合蛋白质的许多修饰及其制备方法是本领域已知的,例如Mueller, J.P.等人,1997, *Mol. Immun.* 34 (6) :441-452; Swann, P.G., 2008, *Curr. Opin. Immunol.*, 20: 493-499; 和Presta, L.G., 2008, *Curr. Opin. Immunol.*, 20:460-470所报道的。在一些实施方案中, Fc区是抗体的天然IgG1、IgG2或IgG4 Fc区。在一些实施方案中, Fc区是杂合体,例如含有IgG2/IgG4 Fc恒定区的嵌合体。对Fc区的修饰包括但不限于修饰IgG4以防止与Fc  $\gamma$ 受体和补体的结合; 修饰IgG1以改善与一种或多种Fc  $\gamma$ 受体的结合; 修饰IgG1以最小化效应功能(氨基酸变化); 使IgG1具有改变的聚糖/无聚糖(通常通过改变表达宿主实现); 以及使IgG1具有改变的pH依赖的对FcRn的结合。Fc区可以包括整个铰链区,或小于抗体的整个铰链区。

[0223] 另一个实施方案包括IgG2-4杂交体和IgG4突变体,其具有降低的与FcR结合以增加其半衰期。代表性的IG2-4杂交体和IgG4突变体描述于例如Angal等人,1993, *Molec Immunol.*, 30 (1) :105-108; Mueller等人,1997, *Mol. Immun.*, 34 (6) :441-452; 和美国专利号6,982,323; 所有这些全部内容通过引用并入本文。在一些实施方案中, IgG1和/或IgG2结构域被删除。例如, Angal等人描述了这样的蛋白质,其中IgG1和IgG2结构域具有用脯氨酸取代241号丝氨酸。在一些实施方案中,预期的是具有至少10个、至少20个、至少30个、至少40个、至少50个、至少60个、至少70个、至少80个、至少90个或至少100个氨基酸的融合蛋白或多肽。

[0224] 在一些实施方案中,抗糖基化的PD-L1抗体或糖基化的PD-L1多肽连接或共价结合于至少一个部分或与之形成复合物。这样的部分可以是但不限于提高抗体作为诊断剂或治疗剂的功效的部分。在一些实施方案中,所述部分可以是显像剂、毒素、治疗酶、抗生素、加放射性标签的核苷酸、化疗剂等。

[0225] 在一些实施方案中,与抗glycPD-L1抗体或糖基化多肽或其部分缀合或融合的部分可以是酶、激素、细胞表面受体、毒素(例如但不限于、相思豆毒素、蓖麻毒素A、假单胞菌外毒素(即PE-40)、白喉毒素、蓖麻毒素、白树毒素或美洲商陆抗病毒蛋白)、蛋白质(例如肿瘤坏死因子、干扰素(例如 $\alpha$ -干扰素、 $\beta$ -干扰素)、神经生长因子(NGF)、血小板衍生生长因子(PDGF)、组织纤溶酶原激活物(TPA)或凋亡剂(例如肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、肿瘤坏死因子- $\beta$ )、生物反应调节剂(例如淋巴因子(例如白细胞介素-1("IL-1"))、白细胞介素-2("IL-2"))、白细

胞介素-6 (“IL-6”))、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子 (“GM-CSF”)、粒细胞集落刺激因子 (“G-CSF”) 或巨噬细胞集落刺激因子 (“M-CSF”))、或生长因子 (例如生长激素 (“GH”))、细胞毒素 (例如抑制细胞生长剂或杀细胞剂, 例如紫杉醇、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、埃米汀、丝裂霉素、依托泊苷、替诺泊苷、长春新碱、长春花碱、秋水仙碱、多柔比星、柔红霉素、二羟基蒽环丁二酮、米托蒽醌、光辉霉素、放线菌素D、1-脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔、单甲基阿司他汀F (MMAF)、单甲基阿司他汀E (MMAE; (例如, 伏妥啉) 和嘌呤霉素及其类似物或同系物)、抗代谢物 (例如, 甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶脱乙酰胺)、烷化剂 (例如盐酸氮芥、噻替哌苯丁酸氮芥、美法伦、**BicNU®** (卡莫司汀; BSNU) 和洛莫司汀 (CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲佐菌素、丝裂霉素C和西妥昔单抗铂 (II) (DDP) 顺铂)、蒽环类 (如柔红霉素 (原为道诺霉素) 和多柔比星)、抗生素 (例如更生霉素 (原为放线菌素)、博来霉素、米拉霉素和安曲霉素 (AMC))、抗有丝分裂剂 (例如长春新碱和长春花碱) 或其组合。

[0226] 在一个具体实施方案中, 抗glycPD-L1抗体可以缀合到生物学活性药物或试剂, 例如细胞毒性剂或化疗剂或放射性核素以产生抗glycPD-L1抗体-药物缀合物 (ADC), 这通常通过具有不稳定键的化学连接子实现。由此, 当这些ADC被内化到细胞中时, 它们直接起作用以杀伤细胞或靶向细胞内的分子, 这导致凋亡或细胞死亡。这些ADC包含本文所述的抗glycPD-L1抗体, 特别是单克隆、人源化的、嵌合的或人抗体, 其组合了抗体对肿瘤和癌细胞上的糖基化的PD-L1的特异性靶向和细胞毒性药物的癌细胞杀伤能力, 从而为用抗glycPD-L1抗体进行的治疗和疗法提供了进一步的优点。用于制备和使用ADC的技术是本领域已知的, 并且对于为本文所述的抗glycPD-L1抗体而言不旨在产生限制性。(参见例如Valliere Douglass, J.F. 等人, 2015, *Mol. Pharm.*, 12 (6) : 1774-1783; Leal, M. 等人, 2014, *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 1321: 41-54; Panowski, S. 等人, 2014, *mAbs*, 6 (1) : 34-45; Beck, A.R. 2014, *mAbs*, 6 (1) : 30-33; Behrens, C.R. 等人, 2014, *mAb*, 6 (1) : 46-53; 和Flygare, J.A. 等人, 2013, *Chem. Biol. Drug Des.*, 81 (1) : 113-121)。在实施方案中, 以上描述的全部或一些部分, 特别是毒素和细胞毒素可以与抗glycPD-L1抗体缀合, 以产生用于治疗癌症的有效ADC。

[0227] 用于将治疗性或细胞毒性部分与抗体缀合的技术是公知的, 参见例如Amon等人, “Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”, 见于 *MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY*, Reisfeld等人, (eds.), 1985, pp. 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom等人, “Antibodies for Drug Delivery”, 见于 *CONTROLLED DRUG DELIVERY* (第2版), Robinson等人 (eds.), 1987, pp. 623-53, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, “Antibody Carriers of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review”, 见于 *MONOCLONAL ANTIBODIES '84: BIOLOGICAL AND CLINICAL APPLICATIONS*, Pinchera等人 (eds.), 1985, pp. 475-506); “Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”, *MONOCLONAL ANTIBODIES FOR CANCER DETECTION AND THERAPY*, Baldwin等人 (eds.), 1985, pp. 303-16, Academic Press; Thorpe等人, *Immunol. Rev.* 62: 119-158 (1982); Carter等人, *Cancer J.* 14 (3) : 154-169 (2008); Alley等人, *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14 (4) : 529-537 (2010); Carter等人, *Amer. Assoc. Cancer Res. Educ. Book.* 2005 (1) : 147-154 (2005); Carter等人, *Cancer*

J.14 (3) :154-169 (2008) ;Chari, Acc.Chem Res.41 (1) :98-107 (2008) ;Doronina等人, Nat.Biotechnol.21 (7) :778-784 (2003) ;Ducry等人, Bioconjug Chem.21 (1) :5-13 (2010) ; Senter, Curr.Opin.Chem.Biol.13 (3) :235-244 (2009) ;以及Teicher, Curr Cancer Drug Targets.9 (8) :982-1004 (2009) 。

[0228] 在一些实施方案中,如本文所述的抗体和多肽可以缀合至标记物,例如肽,以促进纯化。在一些实施方案中,标记物是六组氨酸肽,即血凝素“HA”标签,其对应于源自流感血凝素蛋白的表位(Wilson, I.A.等人, Cell, 37:767-778 (1984))或标记物可为“flag”标签(Knappik, A.等人, Biotechniques 17 (4) :754-761 (1994))。

[0229] 在其它实施方案中,与本文所述的抗体和多肽缀合的部分可以在测定法中检测的成像剂。这样的成像剂可以是酶、假体基团、放射性标签、非离子活性顺磁性金属离子、半抗原、荧光标签、磷光分子、化学发光分子、发色团、发光分子、生物发光分子、光亲和分子或者着色颗粒或配体如生物素。在实施方案中,合适的酶包括但不限于辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 $\beta$ -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;假体基团复合物包括但不限于链霉亲和素/生物素和抗生物素蛋白/生物素;荧光物质包括但不限于伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料包括但不限于鲁米诺;生物发光材料包括但不限于萤光素酶、萤光素和水母发光蛋白;放射性材料包括但不限于铋( $^{213}\text{Bi}$ )、碳( $^{14}\text{C}$ )、铬( $^{51}\text{Cr}$ )、钴( $^{57}\text{Co}$ )、氟( $^{18}\text{F}$ )、钆( $^{153}\text{Gd}$ 、 $^{159}\text{Gd}$ )、镓( $^{68}\text{Ga}$ 、 $^{67}\text{Ga}$ )、锗( $^{68}\text{Ge}$ )、钬( $^{166}\text{Ho}$ )、铟( $^{115}\text{In}$ 、 $^{113}\text{In}$ 、 $^{112}\text{In}$ 、 $^{111}\text{In}$ )、碘( $^{131}\text{I}$ 、 $^{125}\text{I}$ 、 $^{123}\text{I}$ 、 $^{121}\text{I}$ )、镧( $^{140}\text{La}$ )、镥( $^{177}\text{Lu}$ )、锰( $^{54}\text{Mn}$ )、钼( $^{99}\text{Mo}$ )、钯( $^{103}\text{Pd}$ )、磷( $^{32}\text{P}$ )、镨( $^{142}\text{Pr}$ )、钷( $^{149}\text{Pm}$ )、铼( $^{186}\text{Re}$ 、 $^{188}\text{Re}$ )、铑( $^{105}\text{Rh}$ )、钌( $^{97}\text{Ru}$ )、钐( $^{153}\text{Sm}$ )、钪( $^{47}\text{Sc}$ )、硒( $^{75}\text{Se}$ )、锶( $^{85}\text{Sr}$ )、硫( $^{35}\text{S}$ )、锝( $^{99}\text{Tc}$ )、钛( $^{201}\text{Ti}$ )、锡( $^{113}\text{Sn}$ 、 $^{117}\text{Sn}$ )、氚( $^3\text{H}$ )、氙( $^{133}\text{Xe}$ )、镱( $^{169}\text{Yb}$ 、 $^{175}\text{Yb}$ )、钇( $^{90}\text{Y}$ )、锌( $^{65}\text{Zn}$ ) ;使用多种正电子发射断层扫描的正电子发射金属和非放射性顺磁金属离子。

[0230] 可以使用本领域已知的技术,通过中间体(例如本领域已知的连接子)将成像剂直接或间接地缀合至本文所述的抗体或多肽。参见例如美国专利号4,741,900,其报道了可以缀合至抗体的金属离子和本文所述的其它分子用作诊断。一些缀合方法涉及使用金属螯合物,例如有机螯合剂,如二亚乙基三胺五乙酸酐(DTPA);亚乙基三胺四乙酸;N-氯-对甲苯磺酰胺;和/或四氯-3,6 $\alpha$ -二苯基甘氨酸-3,这些分子被连接到抗体上。单克隆抗体也可以在偶联剂如戊二醛或高碘酸盐存在下与酶反应。与荧光素标记物的缀合物可以在这些偶联剂存在下或通过与异硫氰酸酯的反应来制备。

[0231] 在一些实施方案中,如本文所述的抗glycPD-L1抗体或glycPD-L1多肽可以与第二抗体缀合以形成抗体异源缀合物,例如美国专利4,676,980中所述。这样的异源缀合抗体可以另外结合半抗原(例如荧光素)或细胞标记物(例如但不限于4-1-BB、B7-H4、CD4、CD8、CD14、CD25、CD27、CD40、CD68、CD163、CTLA4、GITR、LAG-3、OX40、TIM3、TIM4、TLR2、LIGHT、ICOS、B7-H3、B7-H7、B7-H7CR、CD70、CD47)或细胞因子(例如IL-7、IL-15、IL-12、IL-4TGF- $\beta$ 、IL-10、IL-17、IFN  $\gamma$ 、Flt3、BLys)或趋化因子(例如,CCL21)。

[0232] 在一些实施方案中,本文所述的抗糖基化的PD-L1抗体或糖基化PD-1多肽也可以连接到固体支持物上,其可用于对靶抗原或其它分子进行免疫测定或者纯化,所述分子能够通过结合如本文所述的抗体或抗原结合片段与已经固定化在支持物上的靶抗原结合。这种固体支持物包括但不限于玻璃、纤维素、聚丙烯酰胺、尼龙、聚苯乙烯、聚氯乙烯或聚丙

烯。

## 实施例

[0233] 包括以下实施例以显示涉及抗glycPD-L1抗体以及本文所述方法的实施方案,其中所述抗体相比未糖基化的PD-L1和/或PD-L1糖基化突变体优先地结合糖基化的PD-L1。示例说明了代表性的抗glycPD-L1抗体。本领域技术人员应当理解,所公开的抗glycPD-L1抗体是实例,而不旨在是限制性的。

[0234] 实施例1材料和方法

[0235] 细胞培养、稳定转染子和转染。所有细胞均获自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。这些细胞在补充有10%胎牛血清(FBS)的DMEM/F12或RPMI1640培养基中培养。使用嘌呤霉素(InvivoGen, San Diego, CA, USA)选择MDA-MB-468、BT549和293T细胞中的PD-L1稳定转染子。为进行瞬时转染,使用SN脂质体(Hu, M. C. 等人, 2004, Cell, 117:225-237)和lipofectamine™ 2000(Life Technologies, Carlsbad, CA, 美国),用DNA例如编码PD-L1的DNA瞬时转染细胞。

[0236] 使用慢病毒感染产生稳定细胞。用于敲低细胞中PD-L1表达的基于慢病毒的shRNA(pGIPZ质粒)(Shen, J. 等人, 2013, Nature, 497:383-387)购自shRNA/ORF Core Facility(UT MD安德森癌症中心)。基于MDA-MB-231或A431细胞中PD-L1蛋白表达的敲低效率,本发明人为本研究选择了两种shPD-L1克隆。成熟的反义序列如下:TCAATTGTCATATTGCTAC(shPD-L1#1, SEQ ID NO:34), TTGACTCCATCTTTCTTCA(shPD-L1#5, SEQ ID NO:35)。使用pGIPZ-shPD-L1/Flag-PD-L1双重表达构建体同时敲低内源性PD-L1并重组Flag-PD-L1,本发明人建立了内源性PD-L1敲低和表达Flag-PD-L1WT或4NQ突变体的细胞系。为了产生用于PD-L1和Flag-PD-L1的慢病毒表达shRNA,本发明人用pGIPZ-non-silence(用于载体对照病毒)、pGIPZ-shPD-L1或pGIPZ-shPD-L1/PD-L1 WT或pGIPZ-shPD-L1/PD-L14NQ突变体与FuGENE 6转染试剂转染293T细胞。转染后24小时,更换培养基,然后以24小时的间隔收集培养基。将收集的含有慢病毒的培养基进行离心以除去细胞碎片,并通过0.45μm过滤器过滤。在感染前12小时将细胞以50%汇合度接种,并将培养基更换为含有慢病毒的培养基。感染24小时后,用新鲜培养基更换培养基,并用1μg/ml嘌呤霉素(InvivoGen)选择感染的细胞。

[0237] 质粒。从shRNA/ORF Core Facility(UT MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA)获得人PD-L1克隆,并使用已知的分子生物学技术将其克隆到pCDH慢病毒表达载体中以建立PD-L1-Flag或PD-L1-Myc表达细胞。此外,也将人PD-L1核酸克隆到pEGFP-N1和pCMV-HA哺乳动物细胞表达载体中用于瞬时转染。使用pCDH/PD-L1-Flag表达载体作为模板,通过使用引物进行定点诱变来产生PD-L1-Flag NQ突变体N35Q、N192Q、N200Q、N219Q和4NQ(N35Q/N192Q/N200Q/N219Q),引物如下表4所示。为了产生pGIPZ-shPD-L1/Flag-PD-L1双重表达构建体以同时敲低内源性PD-L1并重组Flag-PD-L1,选择靶向PD-L1 mRNA的3'-UTR区的shPD-L1构建体(shPD-L1#5)。将Flag-PD-L1野生型(WT)或4NQ突变体DNA克隆到表达对内源PD-L1是特异性的shRNA的pGIPZ-shPD-L1(Thermo Scientific, Pittsburgh, PA, USA)中。使用酶消化和DNA测序确认所有构建体。

[0238] 表4. 用于定点诱变的引物

	引物	序列(5'至3')	
[0239]	N35Q 正向(SEQ ID NO: 36)	gtgtagatgtagtgccaaatgacaattgaatgcaaa	
	反向(SEQ ID NO: 37)	tttgattcaattgtcattggctaccatactctaccac	
[0240]	N192Q	正向(SEQ ID NO: 38)	gagaggagaagctttccaggtgaccagcacactgag
		反向(SEQ ID NO: 39)	ctcagtgtgctggcactggaaaagcttctctctc
	N200Q	正向(SEQ ID NO: 40)	gaccagcacactgagaatccagacaacaactaatgagat
		反向(SEQ ID NO: 41)	atctcattagtgtgtctggattctcagtgtgctggc
	N219Q	正向(SEQ ID NO: 42)	gagagaggagaagctttccaagtgaccagcacactgaga
		反向(SEQ ID NO: 43)	tctcagtgtgctggcactggaaaagcttctctctctc

[0241] 进行qRT-PCR测定以测量mRNA的表达 (Shen等人, 2013, Nature, 497:383-7; Chang等人, 2011, Nature cell biology, 13:317-23 (见下文表5))。细胞用PBS洗涤两次, 并立即在QIAzol中裂解。裂解的样品用RNeasy Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) 进行总RNA提取。为了测量mRNA的表达, 根据制造商的说明书通过使用随机六聚体 (Life Technologies) 的SuperScript III First-Strand cDNA合成系统从1 $\mu$ g纯化的总RNA中合成cDNA。使用实时PCR机器 (iQ5, BioRad, Hercules, CA, USA) 进行qPCR。使用比较Ct法进行所有的数据分析。首先将结果相对于内部对照 $\beta$ -肌动蛋白mRNA进行归一化。

[0242] 表5.qRT-PCR的引物

	基因	序列(5'至3')	
[0243]	<i>B4GALT2</i>	正向 (SEQ ID NO: 44)	gcataacgaacctaaccctcag
		反向 (SEQ ID NO: 45)	gccaatgtccactgtgata
	<i>B4GALT3</i>	正向 (SEQ ID NO: 46)	gtaacctcagtcacctgcc
		反向 (SEQ ID NO: 47)	attccgctccacaatctctg
	<i>B3GNT3</i>	正向 (SEQ ID NO: 48)	tcttcaacctcacgctcaag
		反向 (SEQ ID NO: 49)	gtgtgcaaagacgtcatcatc
	<i>B3GAT1</i>	正向 (SEQ ID NO: 50)	caccatcaccctcctttctattc
		反向 (SEQ ID NO: 51)	gaacaacaggctctgggatttct
	<i>B3GAT2</i>	正向 (SEQ ID NO: 52)	gccttttccatcgacatg
		反向 (SEQ ID NO: 53)	agtcagattcttgcacccctg
	<i>ST6GAL1</i>	正向 (SEQ ID NO: 54)	caaggagagcattaggaccaag
		反向 (SEQ ID NO: 55)	ccccattaacctcaggactg
	<i>ST3GAL4</i>	正向 (SEQ ID NO: 56)	tcgtcatggtgtggtattcc
		反向 (SEQ ID NO: 57)	caggaagatgggctgatcc
	<i>MAN2A2</i>	正向 (SEQ ID NO: 58)	gaccgcactcatcttacacc
		反向 (SEQ ID NO: 59)	ggaggttggctgaaggaatac
	<i>MAN2B1</i>	正向 (SEQ ID NO: 60)	tcccctgctttaaccatcg

基因		序列(5'至3')
	反向 (SEQ ID NO: 61)	ttgtcacctatactggcgttg
UGGT1	正向 (SEQ ID NO: 62)	ctgagtgatggaacgagtgag
	反向 (SEQ ID NO: 63)	tagagatgaccagatgcaacg
MGAT3	正向 (SEQ ID NO: 64)	gagtccaacttcacggcttat
	反向 (SEQ ID NO: 65)	agtgggccaggaagacataga
MGAT5	正向 (SEQ ID NO: 66)	tgtgagggaaagatcaagtgg
	反向 (SEQ ID NO: 67)	gctctccaaggtaaatgaggac
MOGS	正向 (SEQ ID NO: 68)	ccactgagttcgtcaagagg
	反向 (SEQ ID NO: 69)	acttccttgccatctgtcac
GNPTAB	正向 (SEQ ID NO: 70)	tggctcgctgataagttctg
	反向 (SEQ ID NO: 71)	gtgagtctggttgggagaag
ACTB	正向 (SEQ ID NO: 72)	gcaaagacctgtacgccaaca
	反向 (SEQ ID NO: 73)	tgcacctgtcggcaatg

[0244] 抗体和化学物质。在实施例中描述的实验中使用以下抗体:Flag (F3165;Sigma-Aldrich,St.Louis,MO,USA);Myc (11667203001;Roche Diagnostics,Indianapolis,IN,USA);HA (11666606001;Roche Diagnostics);PD-L1 (13684;Cell Signaling Technology,Danvers,MA,USA);PD-L1 (329702;BioLegend,San Diego,CA,USA);PD-L1 (GTX117446;GeneTex,Irvine,CA,USA);PD-L1 (AF156;R&D Systems,Minneapolis,MN,USA);PD-1 (ab52587;Abcam,Cambridge,MA,USA); $\alpha$ -微管蛋白 (B-5-1-2;Sigma-Aldrich) 和 $\beta$ -肌动蛋白 (A2228;Sigma-Aldrich)。

[0246] 免疫印迹分析、免疫细胞化学和免疫沉淀。如前所述进行免疫印迹分析 (Lim等人,2008,Gastroenterology,135:2128-2140;和Lee等人,2007,Cell,130:440-455)。使用Odyssey®红外成像系统 (LI-COR Biosciences,Lincoln,NE,USA) 进行图像采集和条带强度的定量。对于免疫沉淀,将细胞在缓冲液 (50mM Tris-HCl,pH8.0,150mM NaCl,5mM乙二胺四乙酸 (EDTA) 和0.5%Nonidet P-40 (NP-40)) 中裂解,并以16,000 $\times$ g离心30分钟以除去碎片。用抗体对澄清的裂解物进行免疫沉淀。对于免疫细胞化学,将细胞于室温在4%多聚甲醛中固定15分钟,在5%Triton X-100中透化5分钟,然后使用一抗进行染色。使用的二抗是抗小鼠Alexa Fluor 488或594染料缀合物和/或抗兔Alexa Fluor 488或594染料缀合物 (Life Technologies)。用4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI蓝) (Life Technologies) 对核进行染色。封片后,使用多光子共聚焦激光扫描显微镜 (Carl Zeiss,Thornwood,NY,USA) 对细胞进行可视化分析。

[0247] PD-L1和PD-1 (PD-L1/DP-1) 相互作用测定。为了测量PD-1蛋白质和PD-L1蛋白质的相互作用,将细胞在室温在4%多聚甲醛中固定15分钟,然后与重组人PD-1Fc嵌合体蛋白质 (R&D Systems) 一起孵育1小时。所用的二抗是抗人的Alexa Fluor 488染料缀合物 (Life Technologies)。用4',6-二脒基-2-苯基吡啶 (DAPI蓝) (Life Technologies) 对核进行染色。然后使用酶标仪Synergy Neo (BioTeK,Winooski,VT,USA) 测量Alexa Fluor 488染料的荧光强度,并通过总蛋白质量对强度进行归一化。封片后使用共聚焦激光扫描显微镜 (Carl

Zeiss)对细胞进行可视化分析进行拍照。

[0248] PD-L1的糖基化分析。为了确认PD-L1蛋白质的糖基化,如制造商所述,用酶PNGase F、Endo H、O-糖苷酶(New England BioLabs,Ipswich,MA,USA)处理细胞裂解物。为了对糖基化的PD-L1蛋白质进行染色,如制造商所述,使用Glycoprotein Staining Kit (Peirce/Thermo Scientific)对纯化的PD-L1蛋白质进行染色。

[0249] N-糖肽的鉴定。在37°C用10mM二硫苏糖醇(DTT)对纯化的加His标签的PD-L1蛋白质还原1小时,在室温黑暗中用溶于25mM碳酸氢铵缓冲液的50mM碘乙酰胺对其烷基化1小时,然后在37°C用测序级胰蛋白酶以1:50的酶-底物比处理过夜。然后将消化的产物用甲酸稀释至终浓度0.1%,并在LC-MS/MS分析之前进一步用ZipTip C18(Millipore)进行清洁(clean up)。在IBC的Academia Sinica Mass Spectrometry获得LC-MS/MS数据。通过在偶联至具有捕获柱Acclaim PepMap 100(2cm×100μm i.d)(Dionex)的UltiMate 3000 RSLCnano系统(Dionex)的Orbitrap Fusion Tribrid(Thermo Scientific)上的纳米喷雾LC-MS/MS分析肽混合物。将肽混合物加载到Acclaim PepMap RSLC 25cm×75μm i.d.柱上(Dionex),并使用5%至35%梯度的溶剂B(100%乙腈与0.1%甲酸)以500nL/min的流速分离60分钟。溶剂A为溶于水中的0.1%甲酸。用于HCD与CID并行模式下的MS和MS/MS数据采集的参数为:最高速度模式具有3秒周期时间;FTMS:扫描范围(m/z)=400-2000;分辨率=120K;AGC目标= $2 \times 10^5$ ;最大注射时间(ms)=50;FTMSn(HCD):隔离模式=四极;隔离窗=1.6;碰撞能量(%)=30具有阶梯碰撞能量5%;分辨率=30K;AGC目标= $5 \times 10^4$ ;最大注射时间(ms)=60;ITMSn(CID):隔离模式=四极;隔离窗=1.6;碰撞能量(%)=30;AGC目标= $1 \times 10^4$ 。通过Proteome Discoverer 1.4将原始数据转换为Mascot通用格式(MGF)。对于糖肽鉴定,使用Byonic(版本2.0-25)和以下搜索参数搜索HCD MS<sup>2</sup>数据:肽容差=2ppm;片段容差=6ppm;漏切位点数=1;修饰:氨甲酰甲基半胱氨酸(固定),甲硫氨酸氧化(常见2),在N的脱酰胺(稀有1)。通过组合HCD和CID MS<sup>2</sup>结果进一步人工检查Byonic提出的糖肽命中。

[0250] 统计学分析。条形图中的数据表示相对于未经处理或对照组的平均倍数变化及三次独立实验的标准偏差。使用SPSS(Ver.20,SPSS,Chicago,IL)进行统计学分析。使用Spearman相关和Mann-Whitney检验分析蛋白质表达与BLBC亚型之间的相关性。对实验数据进行学生t检验。P值<0.05被认为具有统计学意义。

[0251] 实施例2PD-L1蛋白质表达分析

[0252] 为了揭示和阐明PD-L1的基本机制,在人肿瘤组织和癌细胞系中检测PD-L1的蛋白质表达。图1A和1B及图2A-2D通过Western印迹分析说明在肺、乳腺、结肠和卵巢癌细胞系中的蛋白质表达;图3A显示不同PD-L1抗体在细胞中对PD-L1蛋白质的结合。观察到大多数PD-L1蛋白质在~45kDa(黑色圆圈)处检测到,但在33kDa(黑色箭头)处也出现一小部分。通过靶向编码序列(shPD-L1#1)或3'UTR(shPD-L1#5)的慢病毒短发夹RNA(shRNA)敲低PD-L1下调了PD-L1的33-和45-kDa形式的表达(图3B)。PD-L1的重建恢复了shPD-L1#5克隆中两种形式的表达(图1C、图3C显示载体设计)。这些结果表明,Western印迹上的两个条带均为PD-L1蛋白质,PD-L1的更高分子量形式指示有翻译后修饰。

[0253] 糖基化的蛋白质经常在Western印迹中产生异质的条带模式,如观察到的PD-L1的更高分子量(~45kDa)。为了测试对PD-L1观察到的糖基化模式是否对应于糖基化的形式,用重组糖苷酶(肽-N-糖苷酶F;PNGase F)处理MDA-MB 231和HeLa细胞以去除N-聚糖结构,

然后进行Western印迹分析。如图3D所示,当用PNGase F处理时,45-kDa PD-L1中显著部分被还原为33-kDa形式的PD-L1。与此一致,在纯化的加His-标签的PD-L1中观察到聚糖结构的阳性染色,但在PNGase F存在下没有观察到(图1D)。这些结果表明PD-L1的更高分子量确实是PD-L1蛋白质的糖基化形式。

[0254] 为了重述PD-L1蛋白质在细胞中的表达,生成多种过表达构建体以模拟蛋白质的内源性表达。为了避免在N-末端信号传导肽处可能的裂解,将不同的标签序列融合在N末端或C末端(图4A和4B,印迹上方)。与来自内源性PD-L1表达分析的结果相似,所有加GFP-、HA-、Flag-或Myc-标签的PD-L1的瞬时转染在Western印迹上具有相对其实际大小的约15kDa的分子量偏移(图1E、4A和4B)。与去除PD-L1蛋白质上所有N-聚糖结构的PNGase F处理相反,加入重组糖苷酶—糖苷内切酶H(Endo H)仅部分地减少PD-L1糖基化,表明复合型N-连接的聚糖结构(含有高甘露糖和混合型)主要存在于PD-L1上(Stanley, P., 2011, Cold Spring Harbor perspectives in biology, 3)。此外,当用N-连接的糖基化抑制剂衣霉素(TM), (图1F和4A-4D), 但不用O-糖苷酶(图4E)处理细胞时,PD-L1的糖基化被完全抑制。结合来看,这些结果表明在所测试的细胞中PD-L1受到广泛N-连接糖基化(Heifetz, A., 等人, 1979, Biochemistry, 18:2186-2192)。

#### [0255] 实施例3糖基化分析

[0256] 使用两种PD-L1特异性抗体(抗PD-L1和抗hB7-H1)进行的Western印迹分析表明PD-L1糖基化发生在其细胞外结构域(ECD, 由抗hB7-H1识别)但是不在其细胞内结构域(ICD, 由抗PD-L1识别)(图1F和4C)。为了确定糖基化位点,对来自不同物种的PD-L1氨基酸序列进行序列比对以搜索进化上保守的NXT基序,共有的N-糖基化识别序列(Schwarz, F. 等人, 2011, Current opinion in structural biology, 21, 576-582)。与先前的预测(Cheng 等人, 2013, The Journal of biological chemistry, 288:11771-85; 和Vigdorovich 等人, 2013, Structure, 21:707-17)相一致,鉴定了四种NXT基序(图1G和图5A及5B)。为了确认这些序列是否确实是糖基化的,通过纳米LC-MS/MS分析纯化的人PD-L1的胰蛋白酶裂解肽。对这4个N-糖基化位点中的每个都鉴定出了携带复杂型N聚糖的糖肽(图6A-6H),这与对Endo H处理明显抗性一致(图1E)。生成一系列谷氨酰胺(Q)取代天冬酰胺(N)以确定PD-L1蛋白上的特异性糖基化位点。所有四个突变体N35Q、N192Q、N200Q和N219Q与WT PD-L1相比,显示糖基化的一定程度的降低(图1H,泳道2、3、4和5)。对于三种非NXT NQ PD-L1突变体,没有观察到糖基化有可检测的差异(图1H,泳道11、12和13)。此外,PD-L1糖基化在PD-L1 4NQ突变体中完全消融,其中所有四个天门冬酰胺突变为谷氨酰胺,如不存在相应于45kDa处的糖基化形式的信号所指示的(图1H,泳道10(4NQ)和泳道14(WT))。基于PD-1/PD-L1复合物的晶体结构(Lin, DY等, 2008, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 105, 3011-3016), PD-L1的这四个糖基化位点(N35、N192、N200和N219)暴露于蛋白质的表面。基于预测,PD-L1糖基化位点(PD-L1 4NQ)的突变不影响整体结构。这些结果表明PD-L1在细胞中仅以N-糖基化的糖蛋白形式存在,并且所有四个NXT基序都被糖基化。

#### [0257] 实施例4PD-L1糖表型的功能

[0258] 在内源性PD-L1耗尽的MDA-MB-468和BT549细胞中稳定表达PD-L1 WT和4NQ突变体。使用这些细胞系分析PD-1和PD-L1的结合亲和力。如图所示,糖基化变体PD-L1 4NQ和

PD-1之间的结合降低(图7A)。体外结合实验进一步证明了PD-L1和PD-1结合需要糖基化(图7B)。通过将稳定表达PD-L1 WT和PD-L1 4NQ的BT549细胞系与人原代T细胞共同培养,体外测定T细胞介导的肿瘤细胞杀伤(延时成像显微镜)。与PD-1结合的丧失一致,PD-L1 4NQ稳定细胞系显示更多的T细胞介导的癌细胞杀伤(图7C)。此外,在同基因4T1小鼠模型中体内测量PD-L1的免疫抑制功能,其中在接受了表达PD-L1 WT或PD-L1 4NQ 4T1的细胞的BALB/c小鼠中测量肿瘤生长。与具有表达PD-L1 WT的细胞的小鼠相比,具有表达PD-L1 4NQ的细胞的小鼠显示出减小的肿瘤大小和更多的活化的细胞毒性T细胞(图7D和7E)。总之,这些数据表明,PD-L1糖基化的丧失损害了其PD-1的相互作用,并且损害了PD-1/PD-L1相互作用使肿瘤细胞逃避T细胞免疫监视的能力。因此,其中PD-L1未被糖基化或异常糖基化的肿瘤细胞提供了易于被功能性效应T细胞杀伤的靶标。通过肿瘤细胞膜表达的PD-L1的糖基化受损以防止或阻断肿瘤细胞逃避T细胞免疫监视的这种机制进一步证实了其免疫抑制功能需要PD-L1糖表型的完整性。

[0259] 实施例5糖基化的PD-L1结合单克隆抗体的制备和筛选

[0260] 根据标准操作规程,通过将SP2/0小鼠骨髓瘤细胞与从经人PD-L1免疫的BALB/c小鼠(n=6)分离的脾细胞(Antibody Solution, Inc.)融合以获得产生针对糖基化的人PD-L1的单克隆抗体的杂交瘤。在融合前,使用FACS分析验证来自经免疫的小鼠的血清对于结合PD-L1免疫原的情况。生成产生单克隆抗体(MAb)的杂交瘤。所有MAb的同种型均为IgG1。再次测试产生抗体的杂交瘤的特异性。

[0261] 为了鉴定相比于非糖基化的PD-L1,特异于并优先地结合糖基化的PD-L1抗原的抗glycPD-L1 MAb(即,糖基化的PD-L1特异性MAb),进行不同类型的测定。在一项检测MAb与糖基化的PD-L1优先地结合的筛选测定中,基于通过(使用细胞膜结合蛋白)FACS分析测量荧光强度来确定抗体结合。举例来说,使用BT549人乳腺癌细胞系进行测定。说明性地,根据常规方法用生物素标记过表达PD-L1W1(完全糖基化)的BT549细胞,然后与过表达PD-L1 4NQ(完全未糖基化的PD-L1变体)的BT549细胞混合。将混合的细胞与抗PD-L1抗体(例如,抗glycPD-L1抗体)一起温育,并与作为检测剂的与FITC缀合的二抗进一步孵育。洗涤后,通过FACS/流式细胞术分析测量荧光强度(测量的荧光强度,MFI)以评估抗PD-L1抗体与(细胞上)膜结合的PD-L1 WT或与(细胞上)4NQ PD-L1的相对结合(在细胞上)。选择在WT PD-L1上显示相对对4NQ PD-L1显著更高MFI的抗体进行进一步评估。STM004和STM115 MAb的荧光结合分析结果列于下表6,其显示抗体结合表达野生型(糖基化)PD-L1的BT549细胞(BT549PD-L1WT细胞)相对抗体结合表达变体(非糖基化4NQ)PD-L1的BT549细胞(BT549PD-L1 4NQ细胞)的MFI值。表6中的实验结果显示,STM004MAb与BT549PD-L1 WT细胞(表达糖基化的PD-L1的细胞)结合相比于与BT549PD-L1 4NQ细胞(表达非糖基化的PD-L1的细胞)结合是约5倍高的MFI值。所测定的STM115与BT549PD-L1WT细胞结合相比于与BT549PD-L1 4NQ细胞结合是超过2倍高的MFI值。

[0262] 表6. 测定的抗glycPD-L1 MAb的荧光强度值

[0263]	MAb	MFI (BT549PD-L1WT 细胞)	MFI (BT549PD-L1 4NQ 细胞)
	STM004	42.53	8.70
STM115	51.14	21.31	

[0264] 基于结合分析,选择了四十二个候选的产生MAb的杂交瘤,在ADCF培养基中生长,并将其含有单克隆抗体的上清进行浓缩和纯化。

[0265] 在一些情况下,使用活细胞成像测定法Incucyte™(Essen Bioscience)进一步测试纯化的MAb的中和或抑制PD-L1和PD-1之间相互作用(PD-L1/PD-1相互作用)的能力。对于该测定法,将表达PD-L1的BT-549细胞与抗人PD-L1抗体和与加荧光标签的PD-1-Fc融合蛋白一起温育。根据制造商的说明,每小时通过Incucyte™Zoom定量配体和受体的结合情况。基于该测定法,发现在测试的42个MAb中,有15个MAb完全阻断PD-L1与PD-1的结合。显示强阻断功效的15种MAb中的一些也一定程度地结合非糖基化的PD-L1。

[0266] 在另一个测定中,将糖基化的人PD-L1蛋白质和非糖基化的PD-L1(即,用PNGase F处理的PD-L1蛋白质)都包被在固相上并测试MAb与PD-L1抗原的结合亲和力。可以看出,“PD-L1抗原”与“PD-L1蛋白质”是同义的。十二(12)个MAb对糖基化的PD-L1蛋白质表现出比非糖基化的PD-L1蛋白质(PNGase F处理的蛋白质)更高亲和力的相互作用。为了进行进一步的特异性分析,通过Western印迹和FACS流式细胞术分析对所选择的MAb进行分析。通过多种分析发现MAb,如STM004和STM115,相比PD-L1的非糖基化形式特异性结合PD-L1的糖基化形式,进一步验证了这些MAb对糖基化的PD-L1抗原的特异性。

[0267] 实施例6特异性糖基化的PD-L1结合抗体的结合区的鉴定

[0268] 为了鉴定的单克隆抗glycPD-L1抗体中与糖基化的PD-L1结合的区域,将野生型(糖基化的)PD-L1(PD-L1 WT)和糖基化变体蛋白质N35/3NQ、N192/3NQ、N200/3NQ和N219/3NQ(其中35、192、200或219位置的糖基化位点之一是在该位置的野生型天冬酰胺(N),其它三个位置已经突变为谷氨酰胺(Q),因此不被糖基化)(图8A)在PD-L1敲低的BT549细胞中过表达。如通过Western印迹确定的,一些MAb以相比其他PD-L1突变体以更高的结合水平识别特定的PD-L1突变体,证明这些MAb是位点特异性的。例如,MAb STM004识别并结合N35/3NQ突变体,但不结合N192/3NQ、N200/3NQ或N219/3Q突变体,证明该抗体结合到PD-L1的N35区域(图8B)。此外,用肝癌细胞裂解物进行的Western印迹分析还揭示了PD-L1糖基化对代表性的抗glycPD-L1抗体如STM004有差异模式(图8C)。

[0269] 通过免疫组织化学(IHC)染色进一步证实了这些MAb的组织病理学相关性。在对细胞离心物的染色分析中,抗glycPD-L1单克隆抗体一致地识别并结合PD-L1蛋白质的糖基化部分,但不识别和结合未糖基化的PD-L1蛋白质。在人类三阴性乳腺癌患者样品中,抗glycPD-L1单克隆抗体也显示了1:30比例的膜和细胞质染色。这些数据表明,抗glycPD-L1单克隆抗体可用于生物标记物分析,用于检测作为生物标记物的糖基化的PD-L1。

[0270] 实施例7糖基化的PD-L1结合抗体的表位作图

[0271] 由CovalX AG(瑞士)进行小鼠单克隆抗glycPD-L1抗体STM004的表位作图。为了确定通常被抗glycPD-L1抗体(特别是STM004MAb)识别的表位的性质,例如是线性的或是构象型,进行研究以评估作为靶抗原的PD-L1蛋白质与抗glycPD-L1抗体的相互作用是否可以被

PD-L1抗原的蛋白质水解产生的非结构肽所抑制。如果通过PD-L1抗原的完全蛋白水解产生的肽能够抑制抗原被抗体结合,则相互作用不是基于构象,并且表位是线性的。使用由抗原序列生成的重叠肽的库进行简单竞争测定法足以确定表位的序列。备选地,如果通过PD-L1抗原的完全蛋白水解产生的肽不能抑制抗原被抗体结合,则确定靶标的构象对于相互作用是必需的,并且表位是构象的,例如连续的(具有特殊构象,例如环)或不连续的(由于三级结构形成表位)。为了进一步阐明与构象表位的结合,还采用了加共价标签、肽作图和高分质谱法。

[0272] 竞争测定显示,从PD-L1抗原生成的肽不抑制如本文所述的抗glycPD-L1单克隆抗体(例如代表性的MAb STM004)与PD-L1抗原的结合,证实了由这些抗体和代表性的STM004MAb识别的PD-L1的表位区是构象的而不是线性的。使用化学交联、高质量MALDI质谱和nLC-Orbitrap质谱,对PD-L1蛋白质与抗体之间的相互作用界面进行了表征。使用胃蛋白酶水解PD-L1进行竞争测定法,所得到的胃蛋白酶生成的PD-L1肽与抗体及完整的PD-L1蛋白质混合物,以及通过已知方法对抗原/抗体相互作用的分析,显示这些PD-L1肽对STM004单克隆抗体与PD-L1抗原的结合没有可检测的抑制作用。因此,被抗PD-L1MAb STM004识别的PD-L1上的表位被确定为构象的而不是线性的。

[0273] 确定STM004与PD-L1上的表位结合,其中它与SEQ ID NO:1的残基48至78内Y56、K62和K75位置的氨基酸残基(如SEQ ID NO:1中的编号)相接触。

[0274] 测定STM115与PD-L1上的表位结合,其中它与SEQ ID NO:1的残基61至78内K62、H69和K75位置的氨基酸残基(如SEQ ID NO:1中编号)相接触。

[0275] 实施例8 T细胞杀伤测定法

[0276] T细胞杀伤测定法用于确定如本文所述的抗glycPD-L1单克隆抗体对肿瘤细胞的细胞毒活性。所遵循的操作流程如下:在第0天,从表达糖基化的野生型PD-L1-(PD-L1 WT)的BT549 RFP靶细胞培养物中去除含血清培养基,并用PBS轻轻冲洗两次。收获细胞并计数。对细胞悬浮液离心(1000RPM,4分钟),并将细胞沉淀以50,000个细胞/mL重悬于培养基中。使用手动多通道移液器,将细胞接种到平底微孔板的每个孔中(100 $\mu$ L/孔,即5000个细胞/孔)。将板在环境温度下静置30分钟,然后置于IncuCyte ZOOM<sup>®</sup>活细胞成像仪中,在其中平衡20分钟,然后实施第一次扫描。安排24小时(24hr)的重复扫描,每3小时重复一次(10x物镜),其中第一次扫描是立即开始的。在接下来的18小时(过夜)中监测细胞汇合度,直至达到所需的汇合(例如20%)。

[0277] 第二天早晨,即测定当天(即第1天),在测定培养基中制备IncuCyte<sup>™</sup> Caspase 3/7细胞凋亡绿色荧光检测试剂(Essen BioScience4440)的10 $\mu$ M溶液(2.5 $\mu$ M为4 $\times$ 最终测定浓度),并在培养箱中加温至37 $^{\circ}$ C。在测定培养基中以4x最终测定浓度制备抗CD3抗体(100ng/mL)+IL-2(10ng/mL)T细胞活化处理剂,并加温至37 $^{\circ}$ C。还制备了测试MAb。从培养箱中取出靶细胞板,吸出培养基,注意不要破坏细胞层。使用多通道移液器,将25 $\mu$ L加温的半胱天冬酶3/7溶液转移到每个孔中。此后,将25 $\mu$ L加温的抗CD3抗体+IL-2和抗体置于细胞板的合适孔中。加入另外50 $\mu$ L含有效应细胞(PBMC或总T细胞)的培养基以形成100 $\mu$ L的总测定体积。将去气泡的细胞板置于IncuCyte ZOOM<sup>®</sup>仪器中,并使之在第一次扫描之前平衡20分钟。安排24-hr的重复扫描,每2至3小时扫描一次,进行长达5天。(目镜10x;容器类型:Corning 3596;扫描模式:标准;扫描图案模式:每孔2个图像;通道:相差+“绿色”(如果使用

NucLight™红色靶细胞,则为+“红色”)。

[0278] 为进行分析,在IncuCyte™软件中通过对视野中的“大的”绿色荧光目标(核)随时间的总数量进行计数来定量靶细胞凋亡。从红色目标的计数来测量靶细胞的增殖,其对应于红色细胞核的数量。数据表示为每mm<sup>2</sup>荧光目标的数量。数据显示加入本文所述的抗体,特别是STM004,会增强肿瘤细胞杀伤(图9)。

[0279] 实施例9结合测定法

[0280] 为了确定本文所述的抗glycPD-L1单克隆抗体是否特异性抑制PD-1和PD-L1的相互作用,进行以下结合测定法。在测定的第0天,从表达PD-L1的BT549靶细胞培养物中去除含血清培养基,并用D-PBS轻轻冲洗两次。收获细胞并计数。对细胞悬浮液离心(1000RPM,5分钟),并将细胞沉淀以50,000个细胞/mL重悬于培养基中。使用手动多通道移液器将细胞(100μL/孔,即5000个细胞/孔)接种到平底微孔板的每个孔中。将板在环境温度静置30分钟。此后,将含有细胞的平板在5%CO<sub>2</sub>培养箱中孵育过夜。

[0281] 在测定法的第1天(即,第二天早晨),制备含有1μg/mL PD-1/Fc和1:400稀释的Alex Fluor 488-山羊抗人IgG的培养基,并在培养箱中加温至37°C。从培养箱中取出细胞板,并吸出培养基,注意不要损伤细胞层。以剂量依赖的方式向每个孔中加入50μL测试抗体。向每个孔中加入50μL含有PD-1/Fc和Alex Fluor 488-山羊抗人IgG的培养基。将细胞板置于IncuCyte ZOOM®仪器中,并在第一次扫描之前平衡20分钟。安排24-hr的自动重复扫描(10x),每1-2小时扫描一次,长达24小时。目镜:10x;容器类型:Corning 3596;扫描模式:标准;扫描图案形式:每孔4张图像;通道:相差+“绿色”。

[0282] 图10A显示代表性的MAb STM004以剂量依赖性方式抑制PD-1/Fc与表达PD-L1的细胞的结合。对照测定的结果示于图10B。

[0283] 本文公开的所有方法和权利要求可以根据本公开在无需过度实验的情况下进行和执行。虽然已经根据实施方案和优选实施方案描述了组合物和方法,但是对于本领域技术人员显而易见的是,可以将变动应用于本文所述的方法和步骤的顺序而不脱离所描述的概念、精神和范围。更具体地,显而易见的是,化学和生理相关的某些试剂可以代替本文所述的试剂,同时获得相同或相似的结果。对于本领域技术人员显而易见的有这样的类似替代和修饰都被认为在由所附权利要求限定的所描述的实施方案的精神,范围和概念之内。

[0284] 本文引用的所有专利,公开的专利申请和其它出版物通过引用并入本申请中。

## 序列表

<110> STCUBE & CO., INC.

BOARD OF REGENTS, THE UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM

<120> 特异性针对糖基化的PD-L1的抗体及其使用方法

<130> 24258.105003PCT

<140>

<141>

<150> 62/140,135

<151> 2015-03-30

<160> 100

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 290

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

```

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

```

Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn  
 180 185 190  
 Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr  
 195 200 205  
 Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu  
 210 215 220  
 Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His  
 225 230 235 240  
 Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr  
 245 250 255  
 Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys  
 260 265 270  
 Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu  
 275 280 285

Glu Thr  
 290

<210> 2

<211> 342

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多核苷酸

<400> 2

caggttcagc tgcaacagtc tgacgctgag ttggtgaaac ctggggcttc agtgaagata 60  
 tcctgcaagg cttctggcta caccttcagt gaccatgcta ttcactgggt gaaacagagg 120  
 cctgaacagg gcctggaatg gattggatgt atttctcccg gaagtgggtga tattacttat 180  
 aatgagaaat tcaagggcaa ggccaccctg actgcagaca aatcctccag cactgcctac 240  
 atgcagctca acagcctgac atctgaggat tctgcagtgt atttctgtaa aagatggggg 300  
 cttgactact ggggccaagg aaccactctc acagtctcct ca 342

<210> 3

<211> 114

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 3

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala  
 1 5 10 15  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asp His

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

Ser Ser

<210> 4

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 4

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp His

1 5

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 5

Asp His Ala Ile His

1 5

<210> 6

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 6

Ser Pro Gly Ser Gly Asp

1 5

<210> 7  
 <211> 17  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 人工序列的描述:合成的肽  
 <400> 7  
 Cys Ile Ser Pro Gly Ser Gly Asp Ile Thr Tyr Asn Glu Lys Phe Lys  
 1                   5                   10                   15  
 Gly  
 <210> 8  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 人工序列的描述:合成的肽  
 <400> 8  
 Trp Gly Leu Asp Tyr  
 1                   5  
 <210> 9  
 <211> 6  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 人工序列的描述:合成的肽  
 <400> 9  
 Lys Arg Trp Gly Leu Asp  
 1                   5  
 <210> 10  
 <211> 333  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 人工序列的描述:合成的多核苷酸  
 <400> 10  
 gacattgtgc tcaccaate tccagettct ttggctgtgt ctctaggcca gagagccacc       60  
 atctcctgca gagccagtga aagtgttgaa ttttatggca caactttaat gcagtgttac       120  
 caacagaaac caggacagcc acccagactc ctcatctatg ctgcatccaa cgtagaatct       180  
 ggggtccctg ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcagcct caacatccat       240

cctgtggagg acgatgatat tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaggaa ggttccgtac	300
acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaa	333
<210> 11	
<211> 111	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的多肽	
<400> 11	
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly	
1                   5                   10                   15	
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Phe Tyr	
20                   25                   30	
Gly Thr Thr Leu Met Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro	
35                   40                   45	
Arg Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala	
50                   55                   60	
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His	
65                   70                   75                   80	
Pro Val Glu Asp Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg	
85                   90                   95	
Lys Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
100                   105                   110	
<210> 12	
<211> 15	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的肽	
<400> 12	
Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Phe Tyr Gly Thr Thr Leu Met Gln	
1                   5                   10                   15	
<210> 13	
<211> 15	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的肽	
<400> 13	

Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Phe Tyr Gly Thr Thr Leu Met Gln  
1                   5                   10                   15  
<210> 14  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 人工序列的描述:合成的肽  
<400> 14  
Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser  
1                   5  
<210> 15  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 人工序列的描述:合成的肽  
<400> 15  
Ala Ala Ser Asn Val Glu Ser  
1                   5  
<210> 16  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 人工序列的描述:合成的肽  
<400> 16  
Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Tyr Thr  
1                   5  
<210> 17  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
<220>  
<223> 人工序列的描述:合成的肽  
<400> 17  
Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Tyr Thr  
1                   5  
<210> 18

<211> 363	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的多核苷酸	
<400> 18	
gaagtgatgc tggaggagtc tgggggagcc ttagtggagc ctggagggtc cctgaaactc	60
tcctgtgtag cctctggatt cactttcagt aactatgcca tgtcttgggt tcgccagact	120
ccagagagga ggctggagtg ggtcgcatec attactaatg gtggtactta cacctactat	180
ccagacagtg tgaagggtcg attcaccate tccagagaca atgccaggaa caccctgtac	240
ctccaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccatgt atttctgtgc aagaccgctc	300
cattactacg gtggtagcca ctttgactac tggggccaag gcaccactct cacggtctcc	360
tca	363
<210> 19	
<211> 121	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的多肽	
<400> 19	
Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Val Glu Pro Gly Gly	
1                    5                    10                    15	
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr	
20                    25                    30	
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Arg Arg Leu Glu Trp Val	
35                    40                    45	
Ala Ser Ile Thr Asn Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val	
50                    55                    60	
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Thr Leu Tyr	
65                    70                    75                    80	
Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys	
85                    90                    95	
Ala Arg Pro Leu His Tyr Tyr Gly Gly Ser His Phe Asp Tyr Trp Gly	
100                    105                    110	
Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser	
115                    120	
<210> 20	
<211> 7	
<212> PRT	



<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 24

Pro Leu His Tyr Tyr Gly Gly Ser His Phe Asp Tyr

1                    5                    10

<210> 25

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 25

Pro Leu His Tyr Tyr Gly Gly Ser His Phe Asp Tyr

1                    5                    10

<210> 26

<211> 324

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多核苷酸

<400> 26

gaaattgtgc tcaccagtc tccagcactc atggctgcat ctccagggga gaaggtcacc	60
atcacctgca gtgtcagttc aagtataagt tccaacactt tgactggta ccagcagaag	120
tcagaaattt cccccaacc ctggatttat ggcacatcca acctggcttc tggagtcct	180
gttcgcttca gtggcagtgg atctgggacc tcttattctc tcacaatcag cagcatggag	240
gctgaagatg ctgccactta ttactgtcaa cagtggagta gttaccact cacgttcgga	300
ggggggacca agctggaaat aaaa	324

<210> 27

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 27

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

1                    5                    10                    15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Asn

                  20                    25                    30

Thr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Glu Ile Ser Pro Lys Pro Trp

                  35                    40                    45

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

<210> 28

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 28

Ser Val Ser Ser Ile Ser Ser Asn Thr Leu His  
 1 5 10

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 29

Ser Val Ser Ser Ile Ser Ser Asn Thr Leu His  
 1 5 10

<210> 30

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 30

Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
 1 5

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 31

Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 32

Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 33

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的肽

<400> 33

Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 34

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<400> 34

tcaattgtca tattgctac

19

<210> 35

<211> 19

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的寡核苷酸

<400> 35

ttgactccat ctttcttca

19

<210> 36	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的引物	
<400> 36	
gtggtagagt atggtagcca aatgacaatt gaatgcaaa	39
<210> 37	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的引物	
<400> 37	
tttgcattca attgtcattt ggctaccata ctctaccac	39
<210> 38	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的引物	
<400> 38	
gagaggagaa gcttttccag gtgaccagca cactgag	37
<210> 39	
<211> 37	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的引物	
<400> 39	
ctcagtgtgc tggtcacctg gaaaagcttc tectetc	37
<210> 40	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的引物	
<400> 40	

gaccagcaca ctgagaatcc agacaacaac taatgagat	39
<210> 41	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的引物	
<400> 41	
atctcattag ttgttgctctg gattctcagt gtgctggtc	39
<210> 42	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的引物	
<400> 42	
gagagaggag aagcttttcc aagtgaccag cacactgaga	40
<210> 43	
<211> 40	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的引物	
<400> 43	
tctcagtgctg ctggtcactt ggaaaagctt ctctctctc	40
<210> 44	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的引物	
<400> 44	
gcataacgaa cctaaccctc ag	22
<210> 45	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的引物	

<400> 45	
gcccaatgtc cactgtgata	20
<210> 46	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的引物	
<400> 46	
gtaacctcag tcacctgcc	19
<210> 47	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的引物	
<400> 47	
attccgctcc acaatctctg	20
<210> 48	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的引物	
<400> 48	
tcttcaacct cacgctcaag	20
<210> 49	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的引物	
<400> 49	
gtgtgcaaag acgtcatcat c	21
<210> 50	
<211> 23	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	



<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的引物	
<400> 55	
ccccattaaa cctcaggact g	21
<210> 56	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的引物	
<400> 56	
tcgtcatggg gtggattcc	20
<210> 57	
<211> 19	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的引物	
<400> 57	
caggaagatg ggctgatcc	19
<210> 58	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的引物	
<400> 58	
gaccgcactc atcttacacc	20
<210> 59	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的引物	
<400> 59	
ggaggttggc tgaaggaata c	21
<210> 60	
<211> 19	
<212> DNA	

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的引物	
<400> 60	
tcccctgctt taaccatcg	19
<210> 61	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的引物	
<400> 61	
ttgtcaccta tactggcgtt g	21
<210> 62	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的引物	
<400> 62	
ctgagtgatg gaacgagtga g	21
<210> 63	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的引物	
<400> 63	
tagagatgac cagatgcaac g	21
<210> 64	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的引物	
<400> 64	
gagtccaact tcacggetta t	21
<210> 65	
<211> 21	

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的引物	
<400> 65	
agtgggccag gaagacatag a	21
<210> 66	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的引物	
<400> 66	
tgtgagggaa agatcaagtg g	21
<210> 67	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的引物	
<400> 67	
gctctccaag gtaaagagg ac	22
<210> 68	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的引物	
<400> 68	
ccactgagtt cgtcaagagg	20
<210> 69	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的引物	
<400> 69	
acttccttgc catctgtcac	20
<210> 70	

<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的引物	
<400> 70	
tggtctgctg ataagttctg	20
<210> 71	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的引物	
<400> 71	
gtgagtctgg tttgggagaa g	21
<210> 72	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的引物	
<400> 72	
gcaaagacct gtacgccaac a	21
<210> 73	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的引物	
<400> 73	
tgcattcctgt cggcaatg	18
<210> 74	
<211> 53	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 人工序列的描述:合成的共有序列	
<220>	
<221> MOD_RES	

<222> (21) .. (21)

<223> Ile, Met或Leu

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (32) .. (32)

<223> Asp或Asn

<400> 74

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

<210> 75

<211> 53

<212> PRT

<213> 人

<400> 75

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

<210> 76

<211> 53

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 76

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

Gln Phe Val Ala Gly

50

<210> 77

<211> 53

<212> PRT

<213> 大鼠

<400> 77

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

1                    5                    10                    15

Ser Asn Val Thr Met Glu Cys Arg Phe Pro Val Glu Gln Lys Leu Asp

20                    25                    30

Leu Leu Ala Leu Val Val Tyr Trp Glu Lys Glu Asp Lys Glu Val Ile

35                    40                    45

Gln Phe Val Glu Gly

50

<210> 78

<211> 53

<212> PRT

<213> 牛

<400> 78

Ala Phe Thr Ile Thr Val Ser Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly

1                    5                    10                    15

Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Arg Phe Pro Val Asp Lys Gln Leu Asn

20                    25                    30

Leu Leu Val Leu Val Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Lys Ile Ile

35                    40                    45

Gln Phe Val Asn Gly

50

<210> 79

<211> 53

<212> PRT

<213> 猪

<400> 79

Ala Phe Thr Ile Thr Val Pro Lys Asp Met Tyr Glu Val Glu Tyr Gly

1                    5                    10                    15

Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Arg Phe Pro Val Asp Lys Gln Leu Asn

20                    25                    30

Leu Leu Ala Leu Val Val Tyr Trp Glu Met Lys Asp Lys Lys Ile Ile

35                    40                    45

Gln Phe Val Asn Gly

50

<210> 80

<211> 53

<212> PRT

<213> 马

<400> 80

Ala Phe Thr Ile Thr Val Thr Lys Asp Leu Tyr Val Val Asp Tyr Gly

1                    5                    10                    15

Ser Asn Val Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Glu Pro Leu Asn

20                    25                    30

Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asn Lys Lys Ile Ile

35                    40                    45

Gln Phe Val Asn Gly

50

<210> 81

<211> 23

<212> PRT

<213> 人

<400> 81

Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys

1                    5                    10                    15

Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln

20

<210> 82

<211> 11

<212> PRT

<213> 人

<400> 82

Lys Leu Phe Asn Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile

1                    5                    10

<210> 83

<211> 16

<212> PRT

<213> 人

<400> 83

Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr Phe Arg Arg

1                    5                    10                    15

<210> 84

<211> 28

<212> PRT

<213> 人

<400> 84

Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile Pro

1                    5                    10                    15

Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr

20                    25

<210> 85

<211> 398

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多核苷酸

<400> 85

atggaatgca gctgggttat tctcttcttc ctgtcagtac tacaggtgtc cactcccagg 60

ttcagctgca acagtctgac gctgagttgg tgaacctgg ggcttcagtg aagatatacct 120

gcaaggcttc tggctacacc ttcagtgacc atgctattca ctgggtgaaa cagaggcctg 180

aacagggcct ggaatggatt ggatgtattt ctcccgaag tggatgatt attataatg 240

agaaattcaa gggcaaggcc accctgactg cagacaaatc ctccagcact gcctacatgc 300

agctcaacag cctgacatct gaggattctg cagtgtattt ctgtaaaaga tgggggcttg 360

actactgggg ccaaggaacc actctcacag tctctca 398

<210> 86

<211> 133

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 86

Met Glu Cys Ser Trp Val Ile Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly

1                    5                    10                    15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Asp Ala Glu Leu Val Lys

20                    25                    30

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

35                    40                    45

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

50                    55                    60

Glu Trp Ile Gly Cys Ile Ser Pro Gly Ser Gly Asp Ile Thr Tyr Asn

65                    70                    75                    80





Ser Asn Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Arg Arg Leu  
 50 55 60  
 Glu Trp Val Ala Ser Ile Thr Asn Gly Gly Thr Tyr Thr Tyr Tyr Pro  
 65 70 75 80  
 Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn  
 85 90 95  
 Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met  
 100 105 110  
 Tyr Phe Cys Ala Arg Pro Leu His Tyr Tyr Gly Gly Ser His Phe Asp  
 115 120 125  
 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 130 135 140

<210> 91

<211> 390

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多核苷酸

<400> 91

atggattttc atgtgcagat tttcagcttc atgctaataca gtgtcacagt catttcgtcc 60  
 agtggagaaa ttgtgctcac ccagctctcca gcactcatgg ctgcatctcc aggggagaag 120  
 gtcacatca cctgcagtgt cagttaagt ataagttcca aactttgca ctggtaccag 180  
 cagaagtcag aaatttcccc caaacctgg atttatggca catccaacct ggcttctgga 240  
 gtccctgttc gcttcagtgg cagtggatct gggacctctt attctctcac aatcagcagc 300  
 atggaggctg aagatgctgc cacttattac tgtcaacagt ggagtagtta cccactcacg 360  
 ttcggagggg ggaccaagct ggaaataaaa 390

<210> 92

<211> 130

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的多肽

<400> 92

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

Ser Ser Ile Ser Ser Asn Thr Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Glu  
 50 55 60  
 Ile Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly  
 65 70 75 80  
 Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu  
 85 90 95  
 Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln  
 100 105 110  
 Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu  
 115 120 125

Ile Lys  
 130

<210> 93

<211> 31

<212> PRT

<213> 人

<400> 93

Leu Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn  
 1 5 10 15

Ile Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His  
 20 25 30

<210> 94

<211> 53

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述:合成的共有序列

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (12) .. (12)

<223> Ile或Val

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (44) .. (44)

<223> Leu, Ala, Val或Tyr

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (45) .. (45)

<223> Ala, Thr, Pro, Leu, Val或Ile

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (46) .. (46)

<223> His, Arg, Asp或Val

<220>

<221> MOD\_RES

<222> (48) .. (48)

<223> Pro或Ala

<400> 94

Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Arg	Xaa	Asn	Ala	Thr	Ala
1				5					10					15	
Asn	Glu	Ile	Phe	Tyr	Cys	Thr	Phe	Arg	Arg	Leu	Gly	Pro	Glu	Glu	Asn
			20					25					30		
His	Thr	Ala	Glu	Leu	Val	Ile	Pro	Glu	Ile	Pro	Xaa	Xaa	Xaa	Pro	Xaa
			35					40					45		
Asn	Lys	Arg	Thr	His											
				50											

<210> 95

<211> 53

<212> PRT

<213> 人

<400> 95

Glu	Lys	Leu	Phe	Asn	Val	Thr	Ser	Thr	Leu	Arg	Ile	Asn	Thr	Thr	Thr
1				5					10					15	
Asn	Glu	Ile	Phe	Tyr	Cys	Thr	Phe	Arg	Arg	Leu	Asp	Pro	Glu	Glu	Asn
			20					25					30		
His	Thr	Ala	Glu	Leu	Val	Ile	Pro	Glu	Leu	Pro	Leu	Ala	His	Pro	Pro
			35					40				45			
Asn	Glu	Arg	Thr	His											
				50											

<210> 96

<211> 53

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 96

Gly	Met	Leu	Leu	Asn	Val	Thr	Ser	Ser	Leu	Arg	Val	Asn	Ala	Thr	Ala
1				5					10					15	
Asn	Asp	Val	Phe	Tyr	Cys	Thr	Phe	Trp	Arg	Ser	Gln	Pro	Gly	Gln	Asn
			20					25					30		

His Thr Ala Glu Leu Ile Ile Pro Glu Leu Pro Ala Thr His Pro Pro  
 35 40 45

Gln Asn Arg Thr His  
 50

<210> 97

<211> 53

<212> PRT

<213> 大鼠

<400> 97

Glu Lys Leu Leu Asn Val Thr Ser Val Leu Arg Val Asn Ala Thr Ala  
 1 5 10 15

Asn Asp Val Phe His Cys Thr Phe Trp Arg Val His Ser Gly Glu Asn  
 20 25 30

His Thr Ala Glu Leu Ile Ile Pro Glu Leu Pro Val Pro Arg Leu Pro  
 35 40 45

His Asn Arg Thr His  
 50

<210> 98

<211> 52

<212> PRT

<213> 牛

<400> 98

Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Ala  
 1 5 10 15

Asp Lys Ile Phe Tyr Cys Thr Phe Arg Arg Leu Gly His Glu Glu Asn  
 20 25 30

Asn Thr Ala Glu Leu Val Ile Pro Glu Pro Tyr Leu Asp Pro Ala Lys  
 35 40 45

Lys Arg Asn His  
 50

<210> 99

<211> 52

<212> PRT

<213> 猪

<400> 99

Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr Ser Thr Leu Arg Val Asn Ala Thr Thr  
 1 5 10 15

Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr Phe Arg Arg Leu Gly Pro Glu Glu Asn  
 20 25 30

Ser Thr Ala Val Leu Val Ile Pro Glu Pro Tyr Val Asp Pro Ala Arg

35

40

45

Lys Arg Thr His

50

<210> 100

<211> 52

<212> PRT

<213> 马

<400> 100

Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Ala Thr Ala

1

5

10

15

Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr Phe Arg Arg Ser Gly Leu Glu Glu Asn

20

25

30

Ser Thr Ala Glu Leu Val Ile Pro Glu Pro Leu Ile Val Pro Ala Asn

35

40

45

Lys Arg Thr His

50

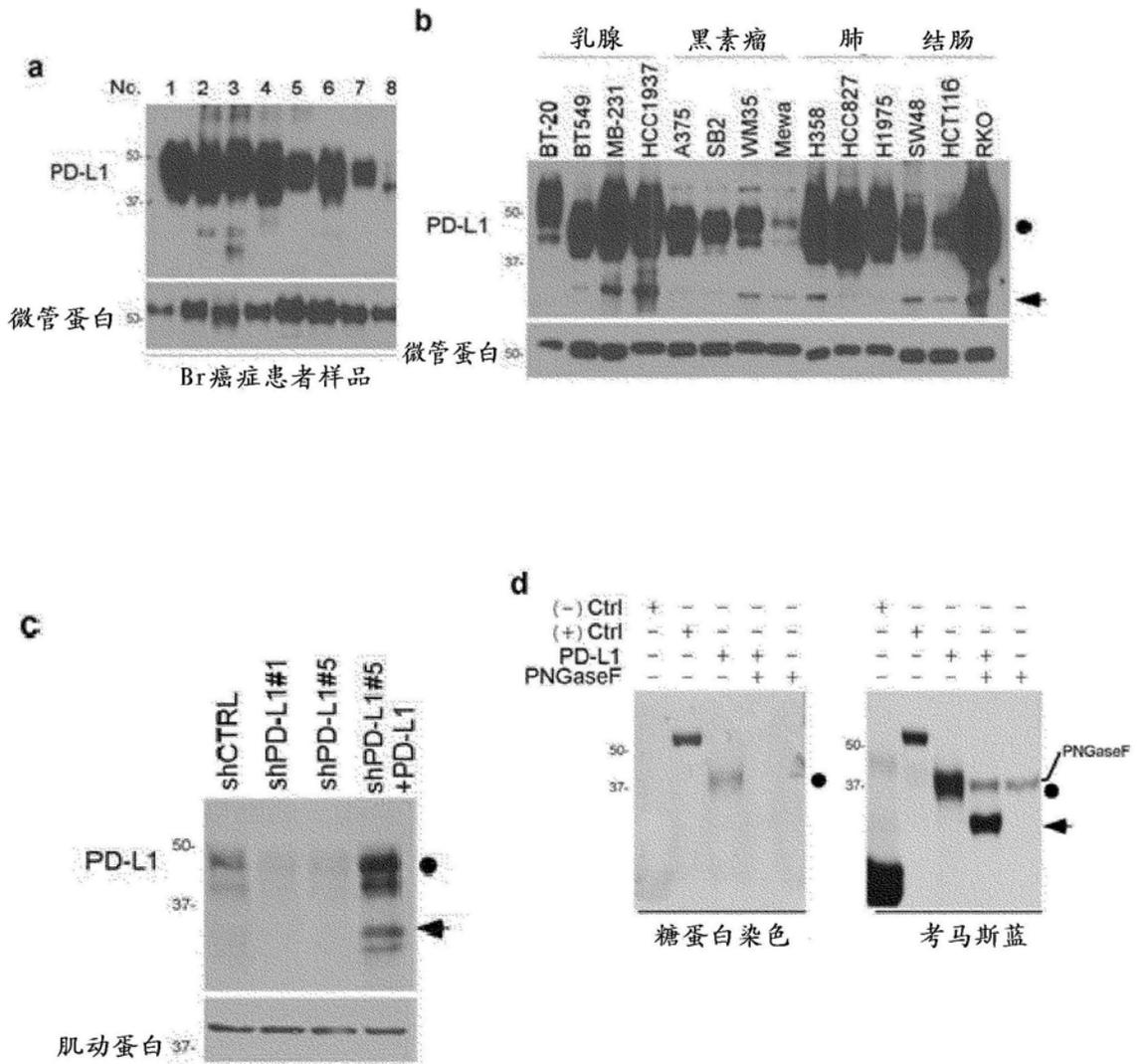


图1A-1H

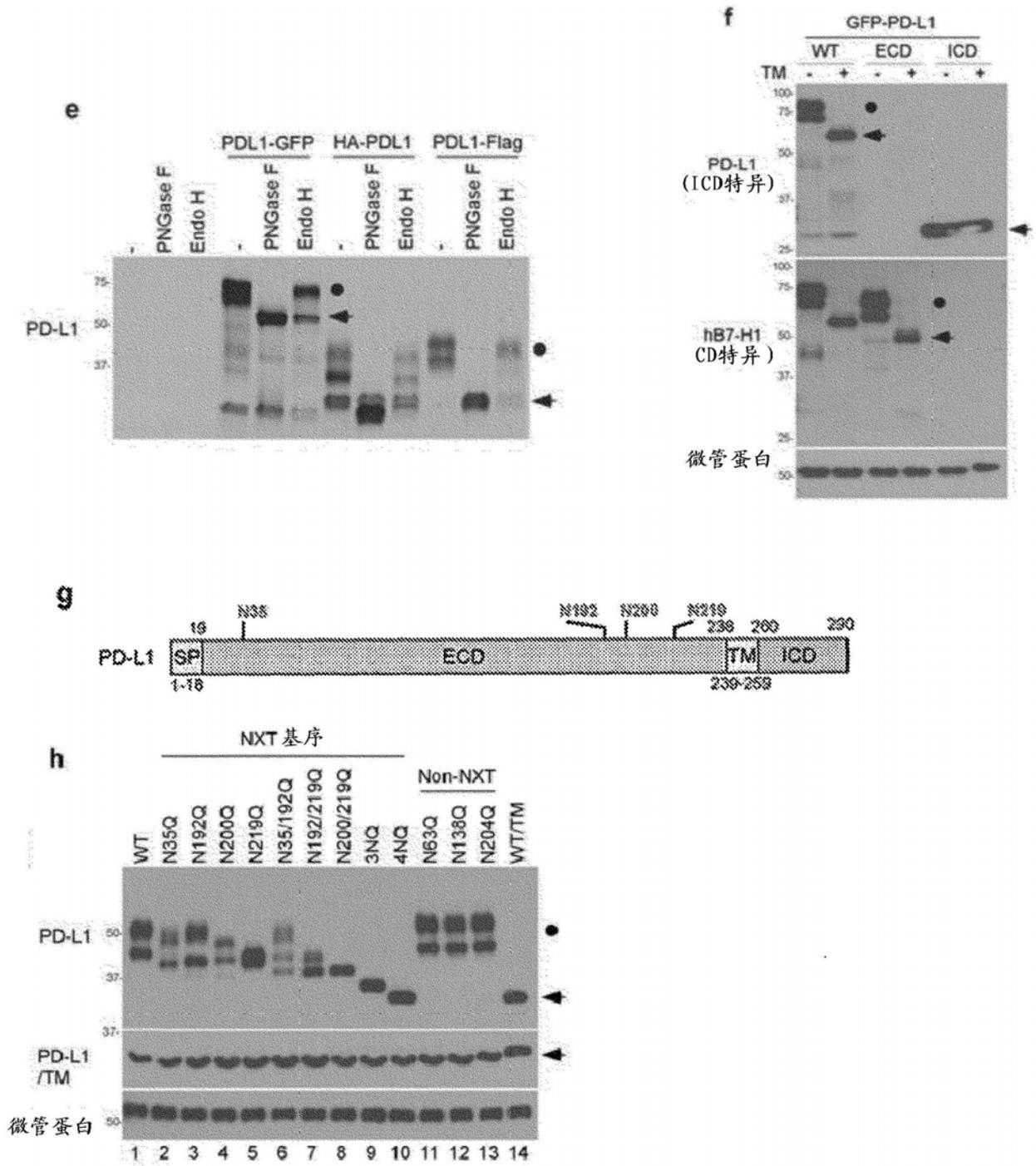


图1A-1H(续)

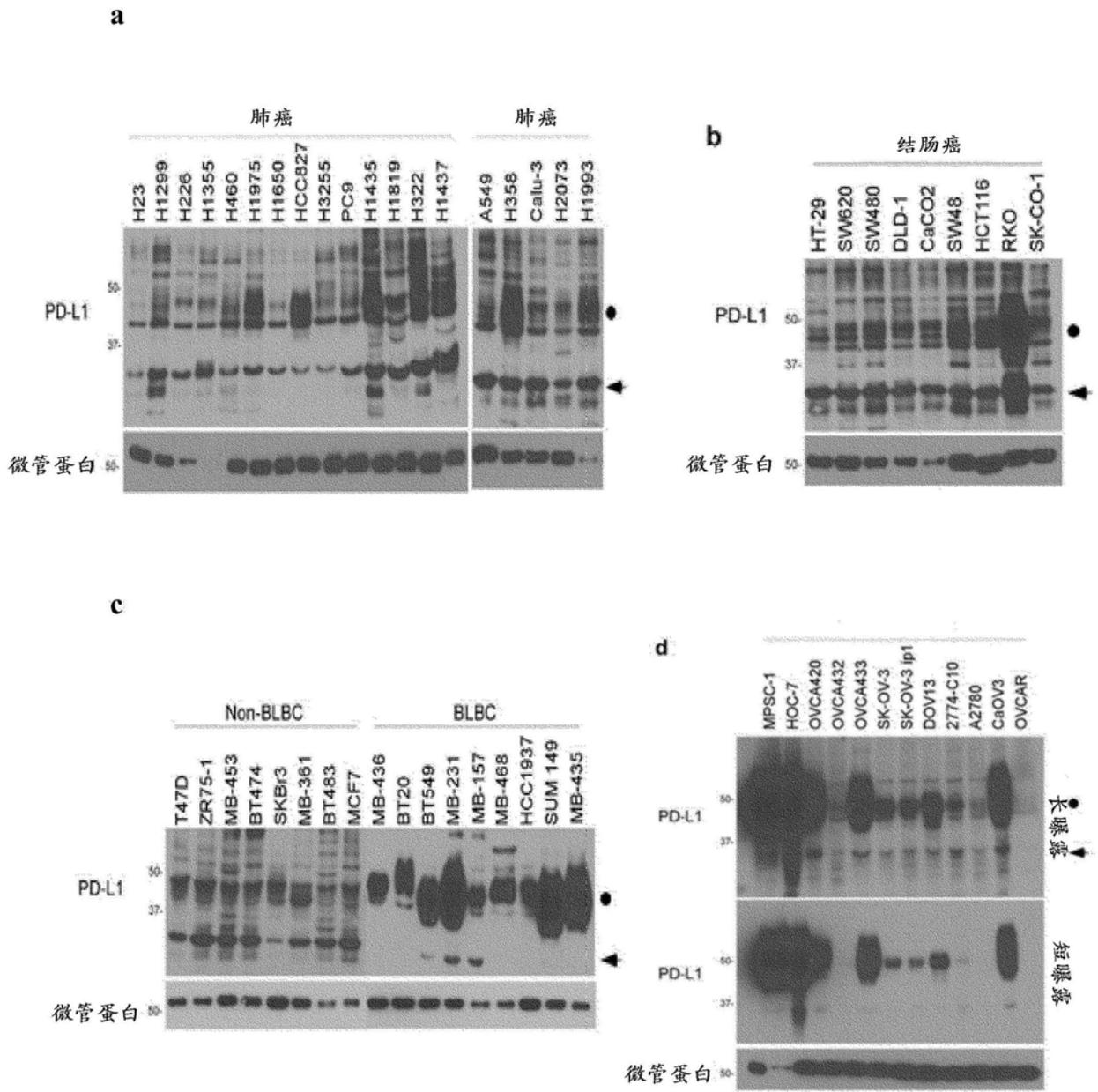


图2A-2D

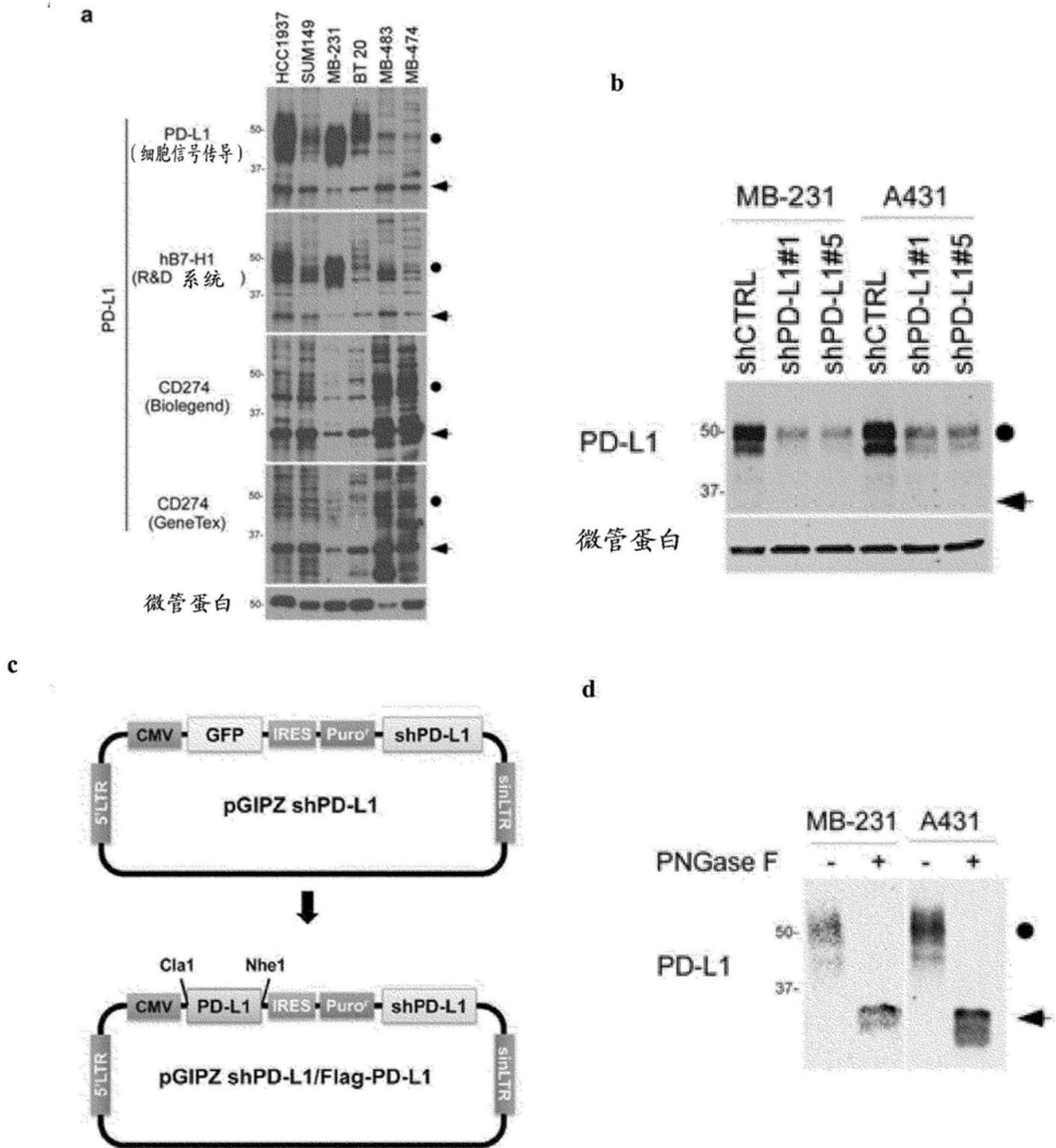


图3A-3D

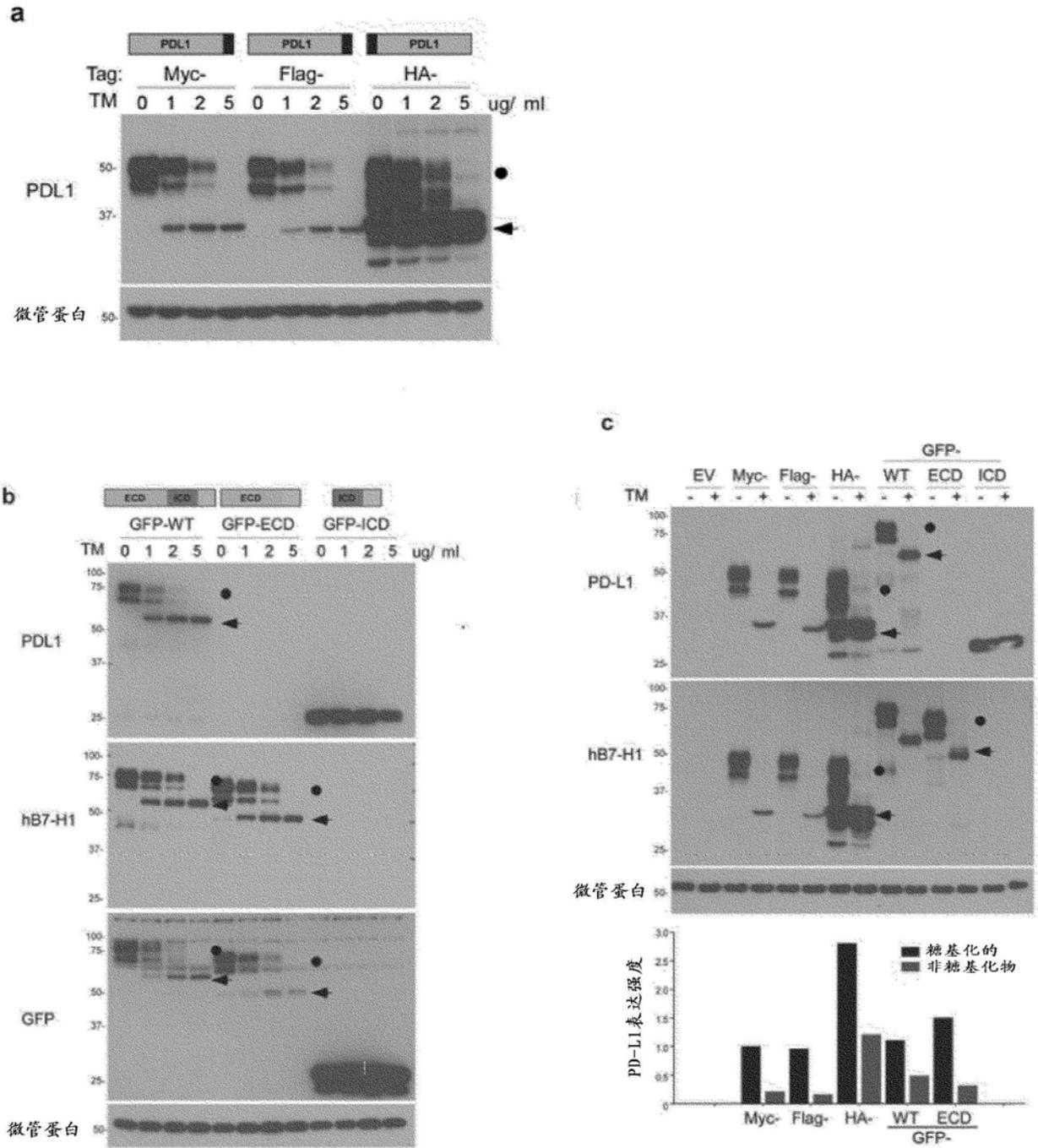


图4A-4E

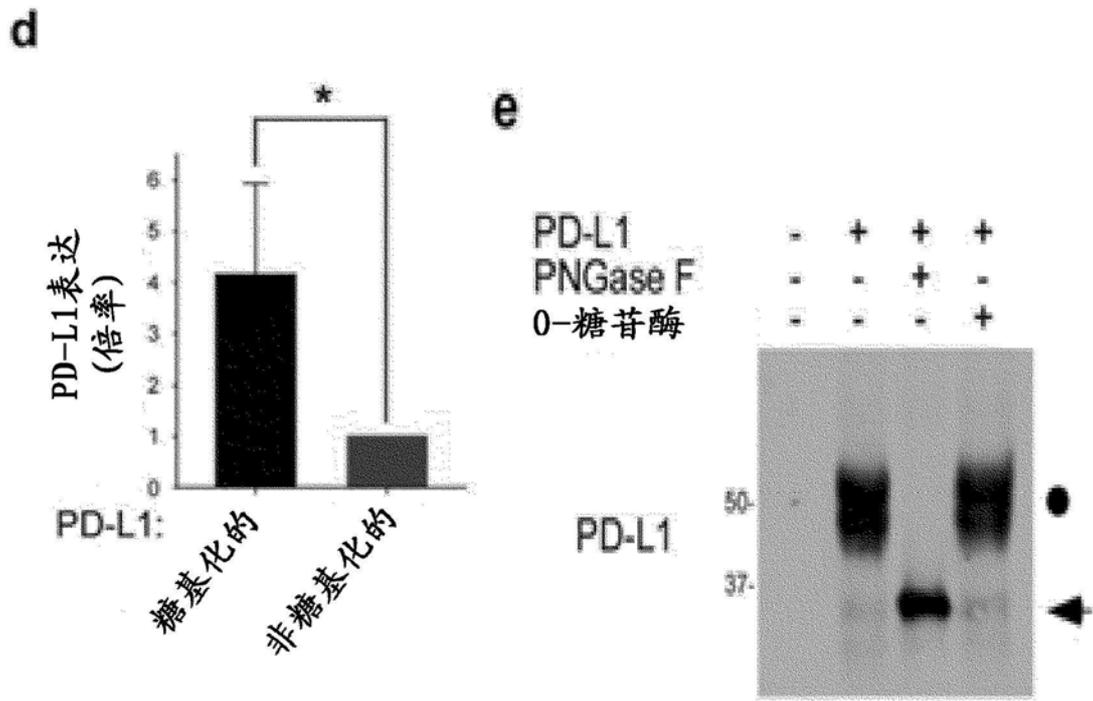
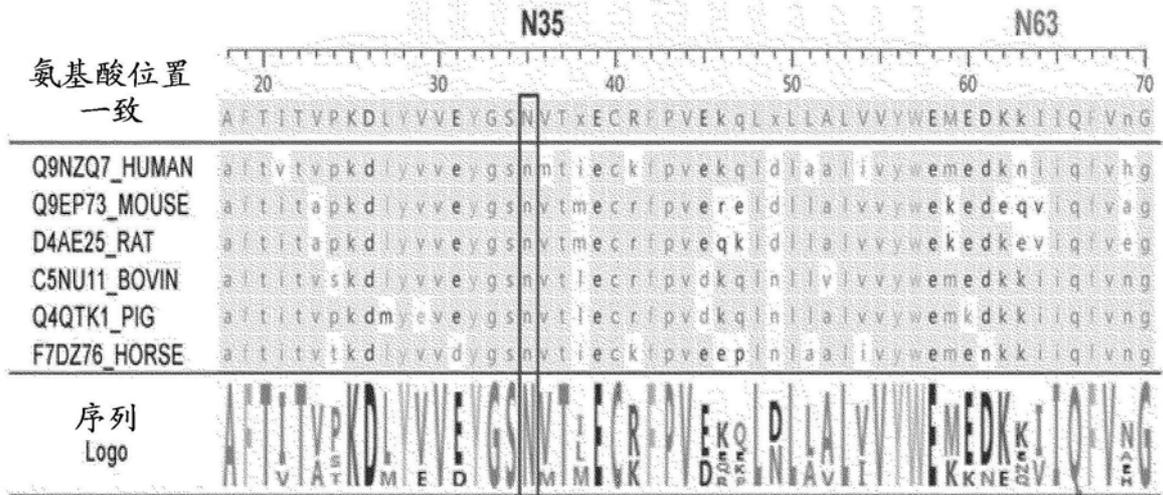
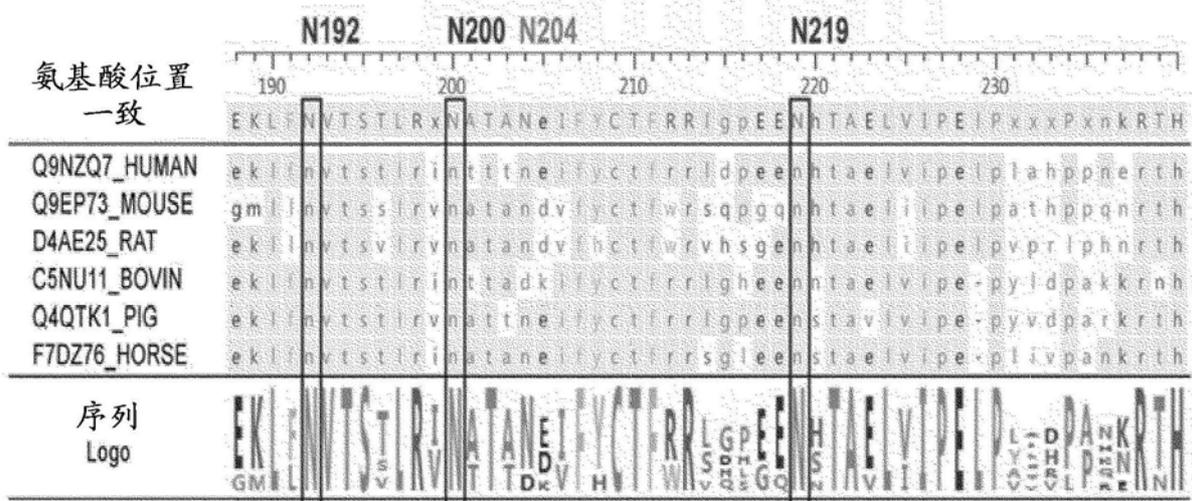


图4A-4E (续)

**A**



**B**



**FIG. 5A:**

一致 (SEQ ID NO: 74)

Q9NZQ7\_HUMAN (SEQ ID NO: 75)

Q9EP73\_MOUSE (SEQ ID NO: 76)

D4AE25\_RAT (SEQ ID NO: 77)

C5NU11\_BOVIN (SEQ ID NO: 78)

Q4QTK1\_PIG (SEQ ID NO: 79)

F7DZ76\_HORSE (SEQ ID NO: 80)

**FIG. 5B:**

一致 (SEQ ID NO: 94)

Q9NZQ7\_HUMAN (SEQ ID NO: 95)

Q9EP73\_MOUSE (SEQ ID NO: 96)

D4AE25\_RAT (SEQ ID NO: 97)

C5NU11\_BOVIN (SEQ ID NO: 98)

Q4QTK1\_PIG (SEQ ID NO: 99)

F7DZ76\_HORSE (SEQ ID NO: 100)

图5A和5B

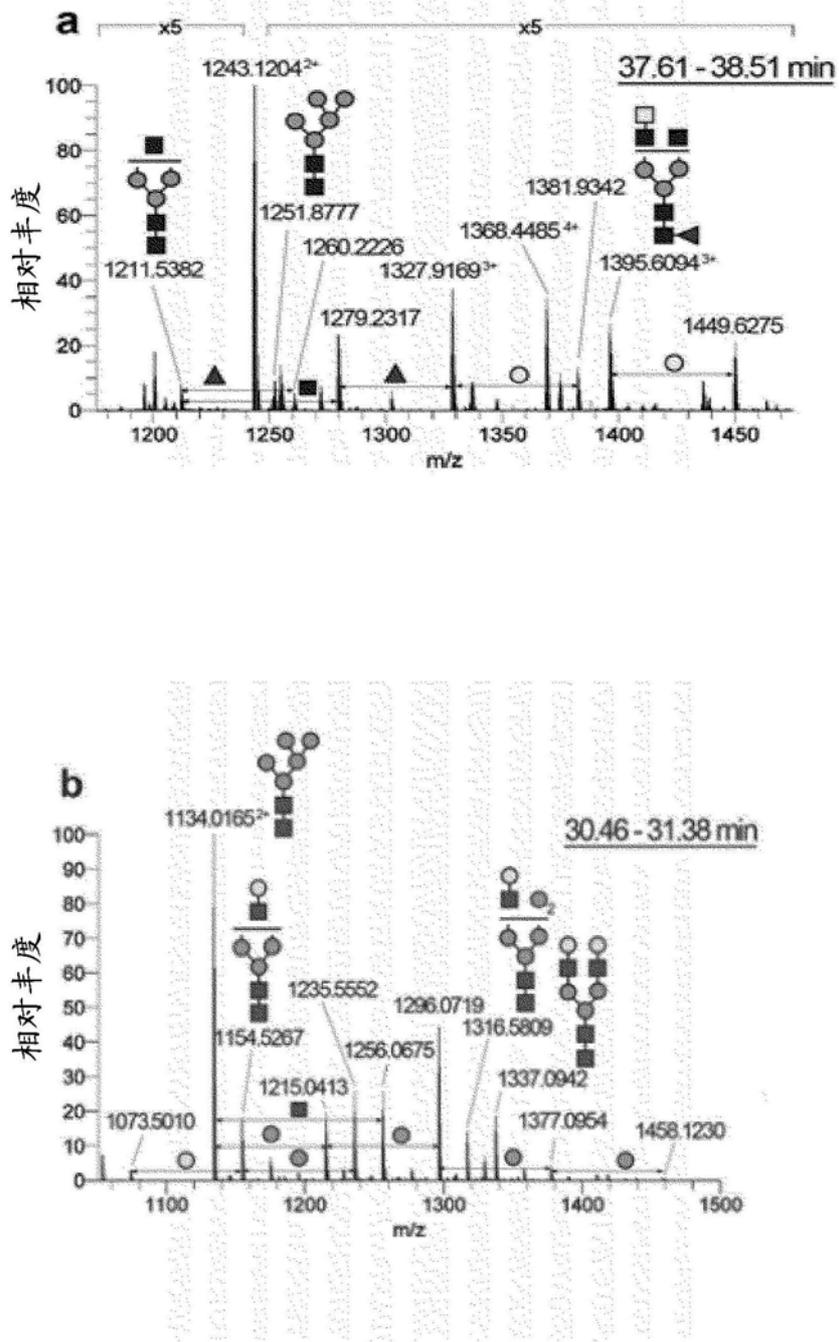


图6A-6H

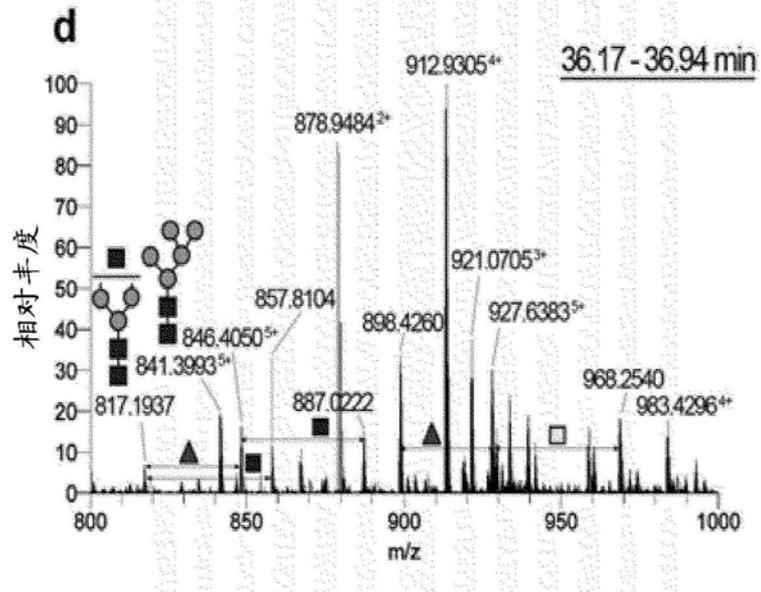
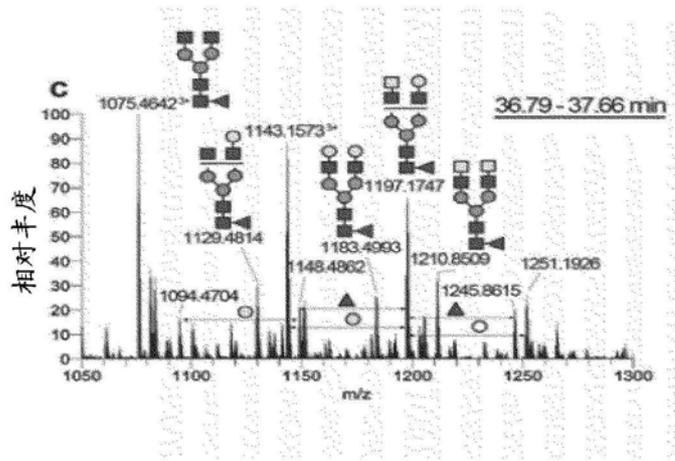


图6A-6H(续)

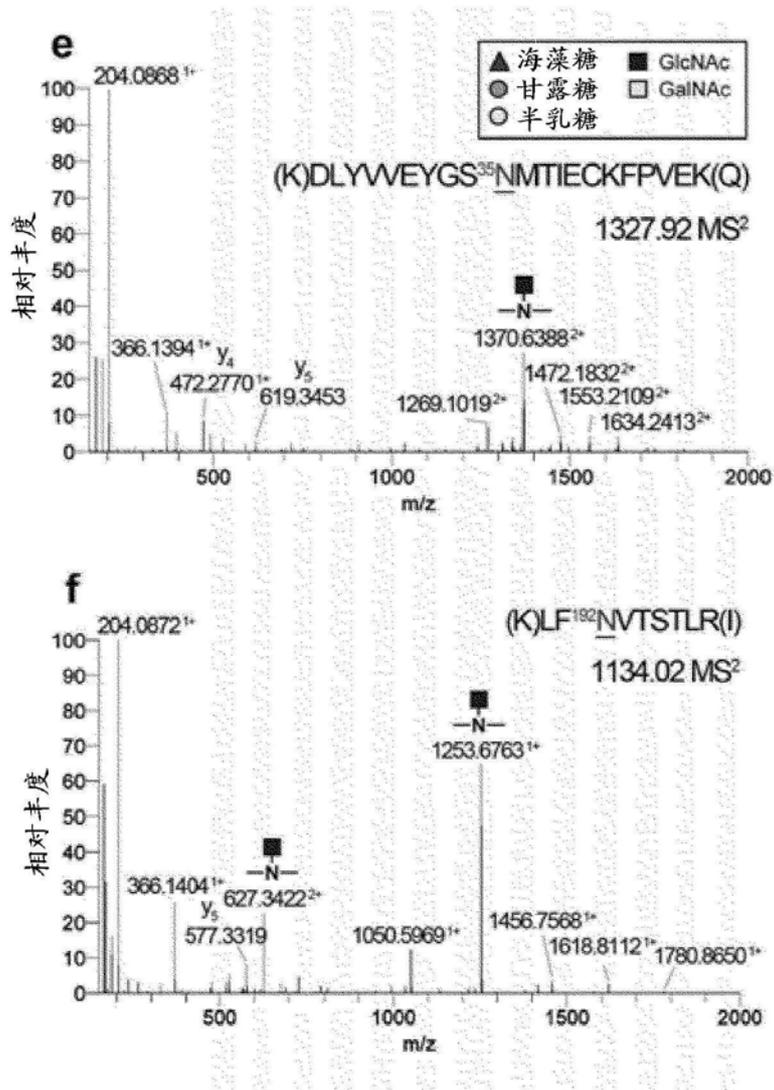


图6A-6H(续)

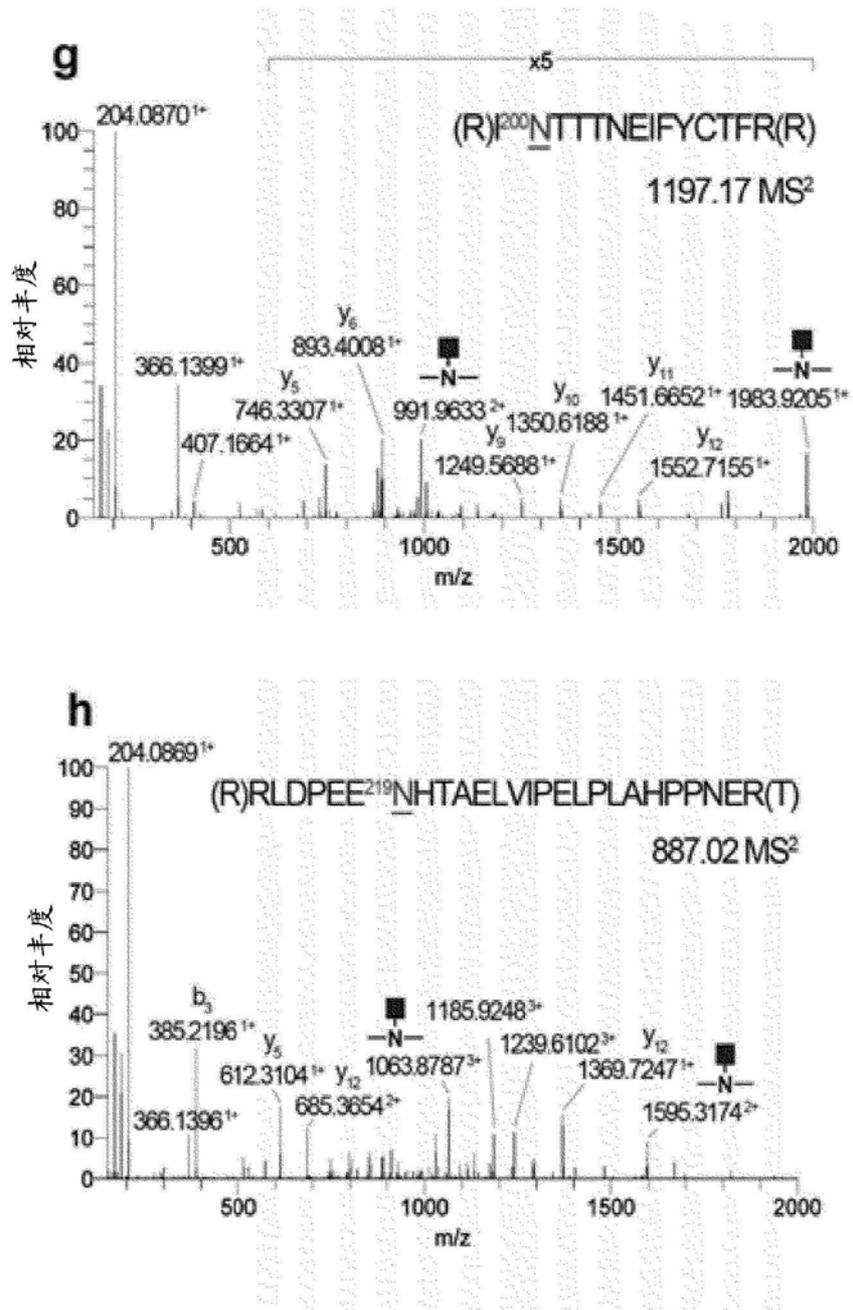


图6A-6H(续)

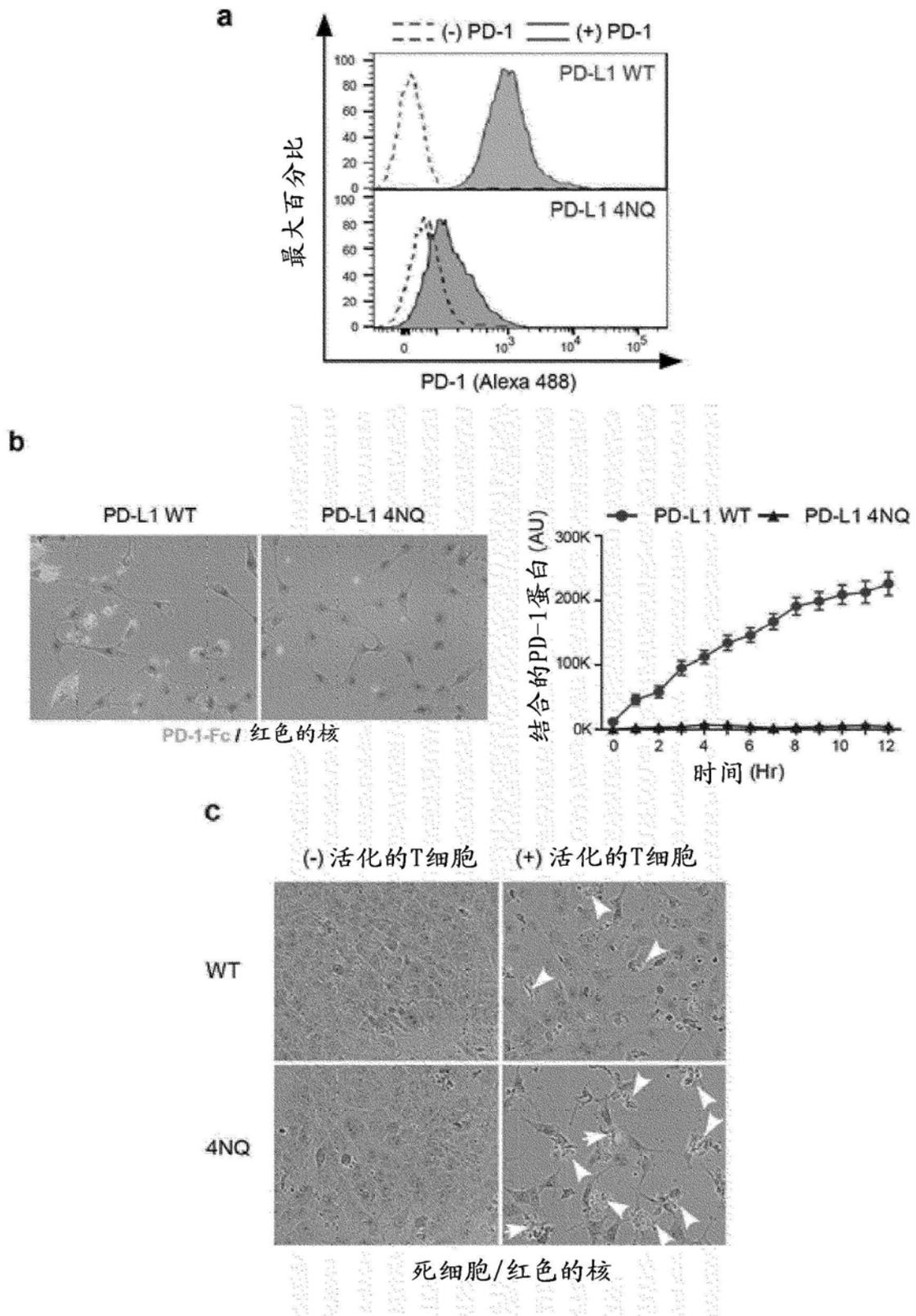


图7A-7E

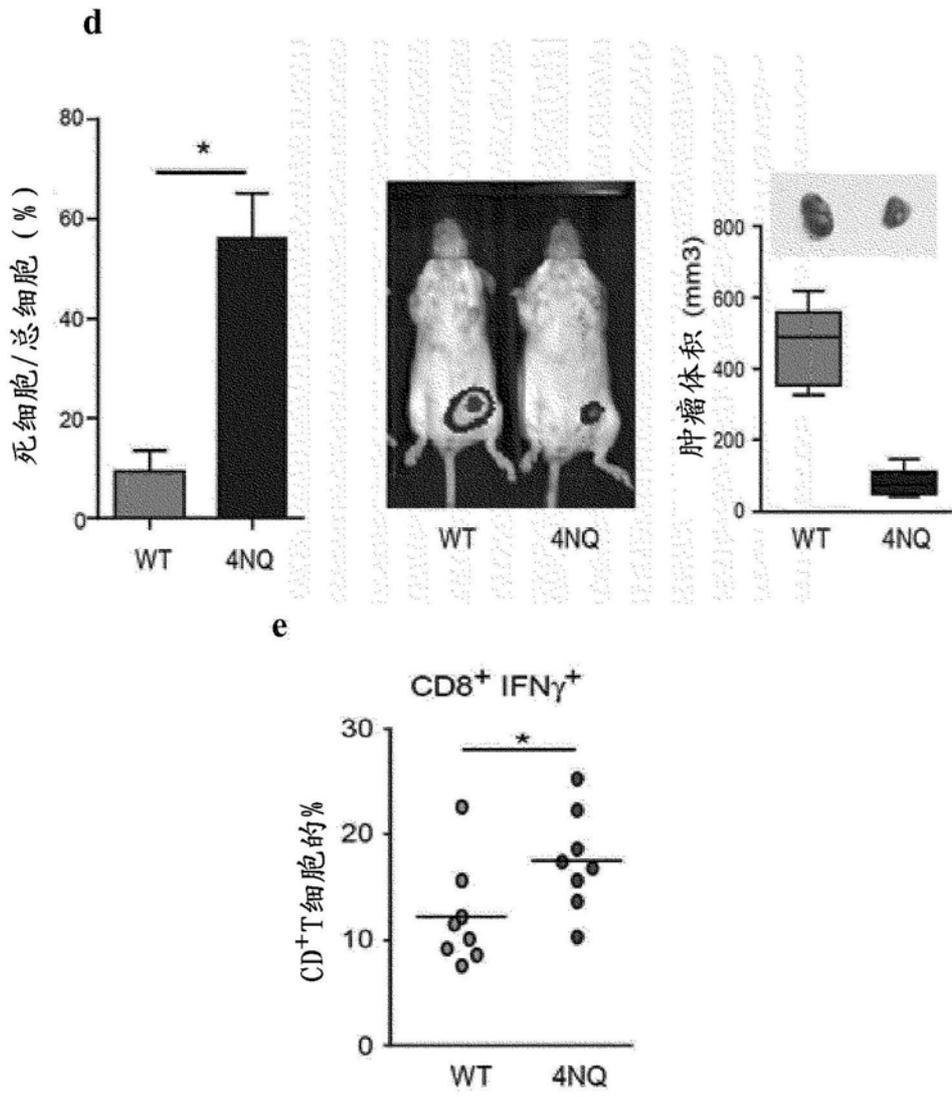


图7A-7E (续)

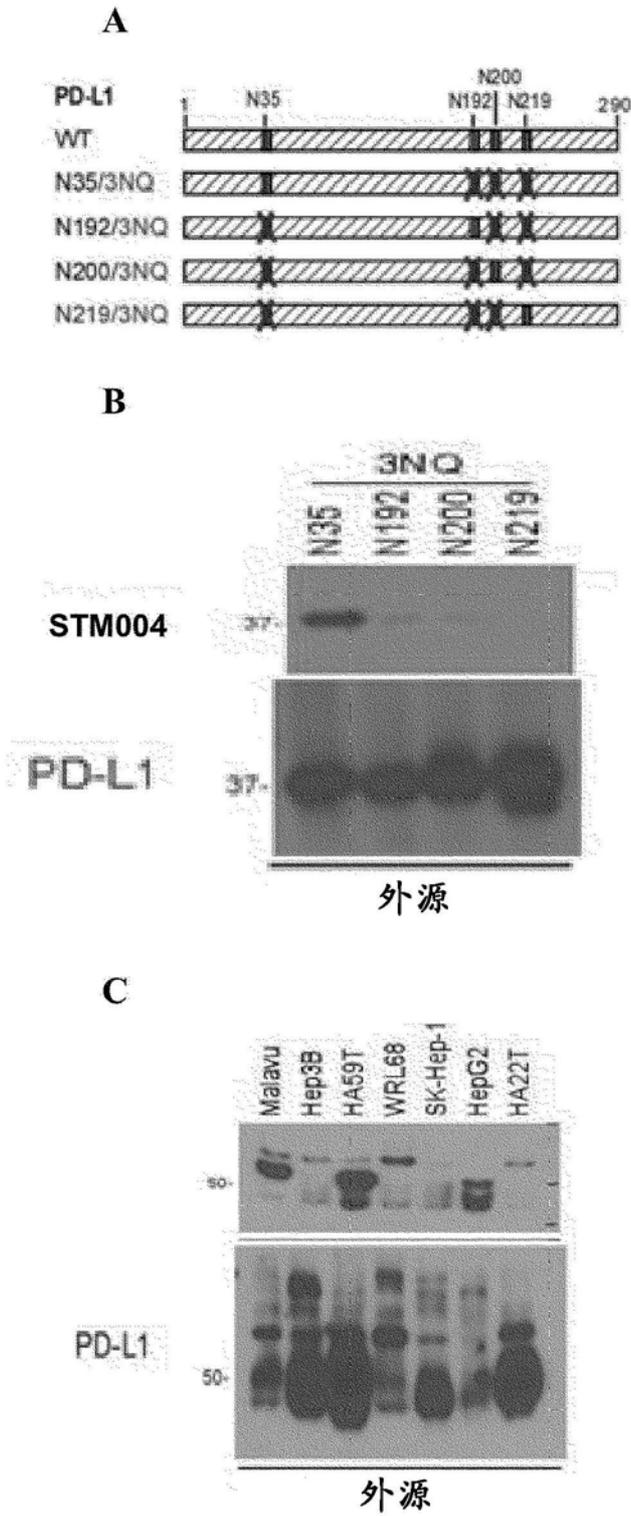


图8A-8C

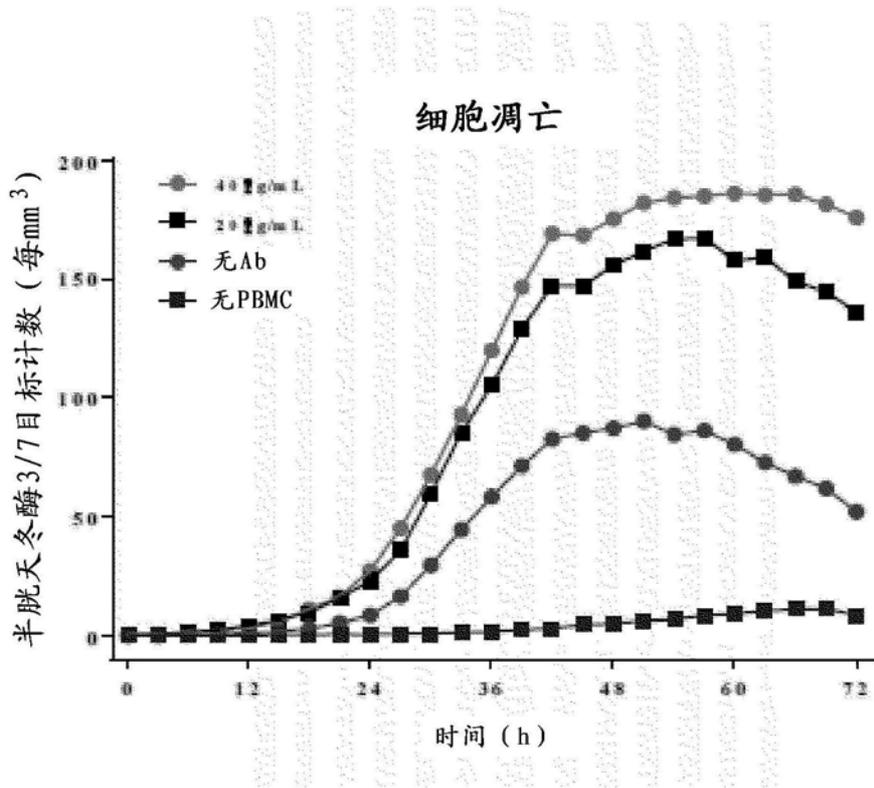


图9

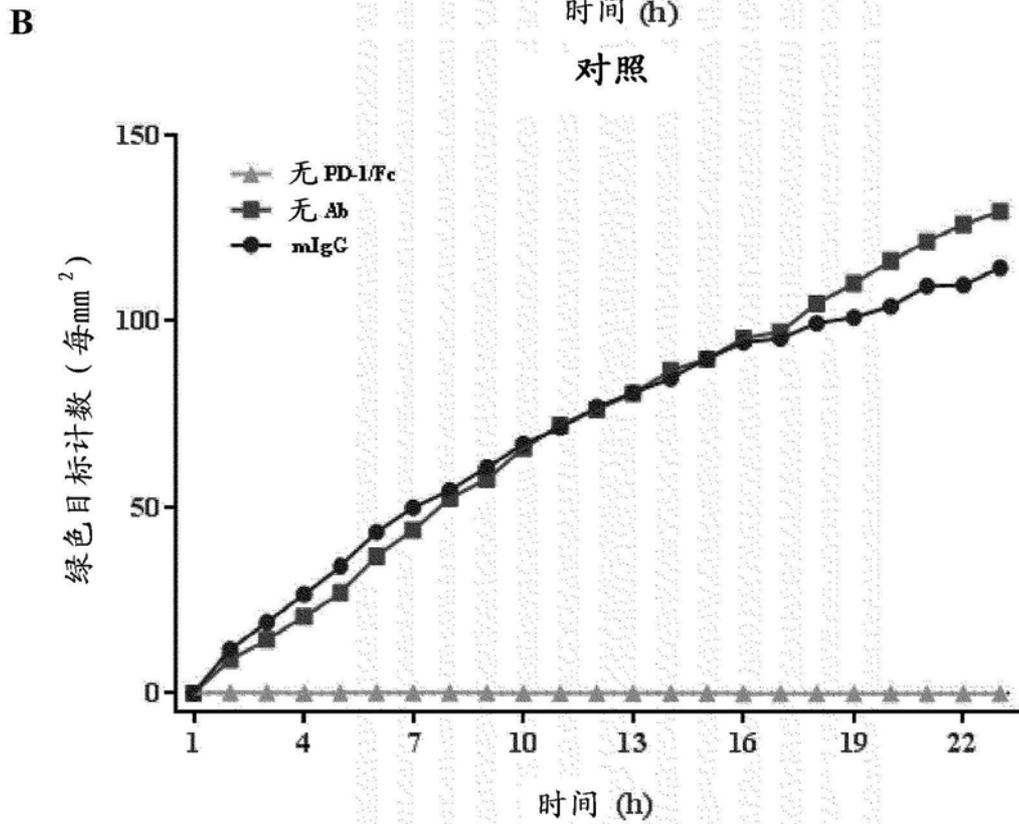
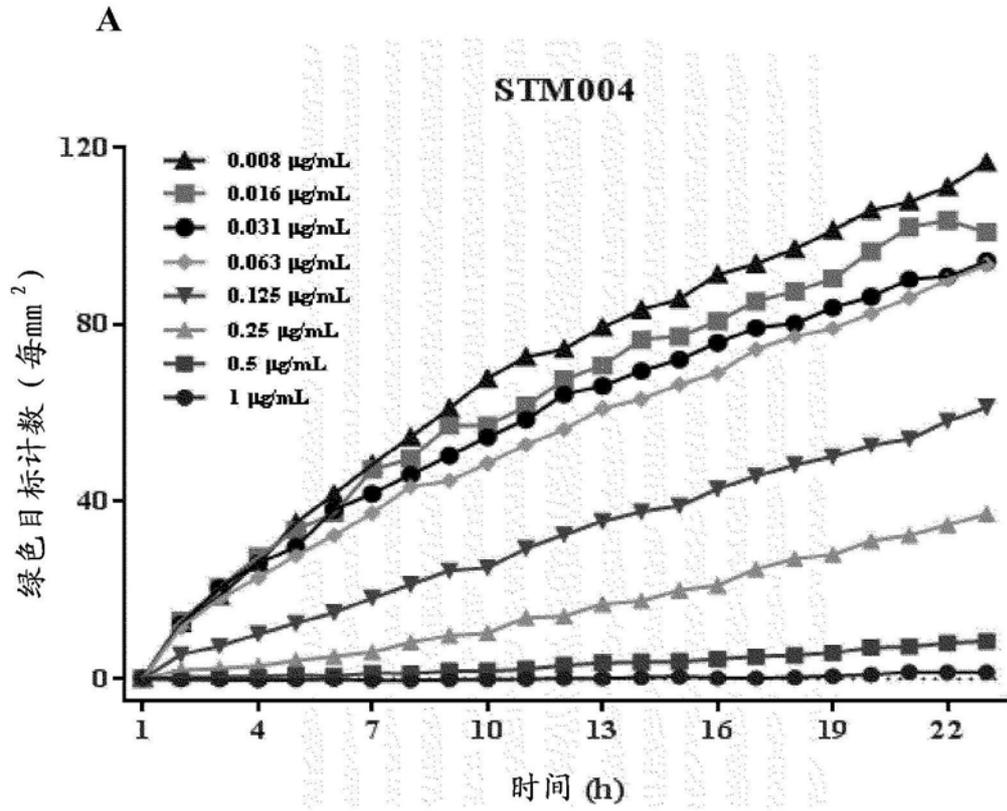


图10A和10B