



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109152798 B

(45) 授权公告日 2022. 10. 21

(21) 申请号 201680078477.9

S-O • 林 C-W • 李 M-C • 洪

(22) 申请日 2016.12.01

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所  
有限公司 11038

(65) 同一申请的已公布的文献号  
申请公布号 CN 109152798 A

专利代理师 唐宏

(43) 申请公布日 2019.01.04

(51) Int.Cl.  
C07K 16/28 (2006.01)

(30) 优先权数据  
62/262,303 2015.12.02 US

(56) 对比文件  
CN 102203125 A, 2011.09.28  
WO 2015085847 A1, 2015.06.18  
CN 104411720 A, 2015.03.11  
CN 104740610 A, 2015.07.01  
CN 101899114 A, 2010.12.01  
CN 101213297 A, 2008.07.02  
CN 103897036 A, 2014.07.02  
CN 103945867 A, 2014.07.23

(85) PCT国际申请进入国家阶段日  
2018.07.10

(86) PCT国际申请的申请数据  
PCT/US2016/064394 2016.12.01

(87) PCT国际申请的公布数据  
W02017/096026 EN 2017.06.08

(73) 专利权人 斯特库比股份有限公司  
地址 韩国首尔  
专利权人 得克萨斯大学体系董事会

审查员 沈晶晶

(72) 发明人 S • S • 刘 E • M • 钟 Y-S • 金

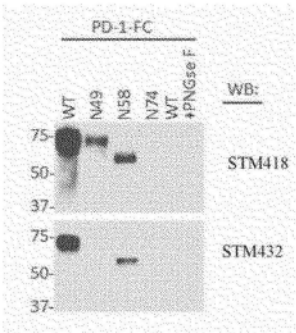
权利要求书3页 说明书59页  
序列表13页 附图6页

(54) 发明名称

特异于糖基化的PD-1的抗体及其使用方法

(57) 摘要

提供了相对于非糖基化的PD-1选择性结合糖基化的PD-1的抗体。在一些方面,还提供了包含糖基化的氨基酸位置的PD-1多肽。还提供了制备和使用此类抗体和多肽(例如,用于治疗癌症)的方法。



1. 一种结合PD-1的分离的抗体,其中所述抗体具有:  
Chothia VH结构域,其包含:  
由SEQ ID NO:6的氨基酸序列组成的CDR H1、  
由SEQ ID NO:7的氨基酸序列组成的CDR H2、和  
由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的CDR H3;  
Abm VH结构域,其包含:  
由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成的CDR H1、  
由SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成的CDR H2、和  
由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的CDR H3;  
Kabat VH结构域,其包含:  
由SEQ ID NO:11的氨基酸序列组成的CDR H1、  
由SEQ ID NO:12的氨基酸序列组成的CDR H2、和  
由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成的CDR H3;或  
Contact VH结构域,其包含:  
由SEQ ID NO:13的氨基酸序列组成的CDR H1、  
由SEQ ID NO:14的氨基酸序列组成的CDR H2、和  
由SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成的CDR H3;以及  
Chothia/Abm/Kabat VL结构域,其包含:  
由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成的CDR L1、  
由SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成的CDR L2、和  
由SEQ ID NO:18的氨基酸序列组成的CDR L3;或  
Contact VL结构域,其包含:  
由SEQ ID NO:19的氨基酸序列组成的CDR L1、  
由SEQ ID NO:20的氨基酸序列组成的CDR L2、和  
由SEQ ID NO:21的氨基酸序列组成的CDR L3。
2. 权利要求1的分离的抗体,其中  
V<sub>H</sub>结构域由SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成,并且  
V<sub>L</sub>结构域由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成。
3. 权利要求1的分离的抗体,其中V<sub>H</sub>结构域由SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成。
4. 权利要求1的分离的抗体,其中V<sub>L</sub>结构域由SEQ ID NO:5的氨基酸序列组成。
5. 权利要求1的分离的抗体,其中V<sub>H</sub>结构域由与SEQ ID NO:3的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列组成。
6. 权利要求1的分离的抗体,其中V<sub>L</sub>结构域由与SEQ ID NO:5的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列组成。
7. 结合PD-1的分离的抗体,其具有:  
Chothia V<sub>H</sub>结构域,其包含:  
由SEQ ID NO:26的氨基酸序列组成的CDR H1、  
由SEQ ID NO:27的氨基酸序列组成的CDR H2、和  
由SEQ ID NO:28的氨基酸序列组成的CDR H3;

Abm  $V_H$ 结构域,其包含:

由SEQ ID NO:29的氨基酸序列组成的CDR H1、  
由SEQ ID NO:30的氨基酸序列组成的CDR H2、和  
由SEQ ID NO:28的氨基酸序列组成的CDR H3;

Kabat  $V_H$ 结构域,其包含:

由SEQ ID NO:31的氨基酸序列组成的CDR H1、  
由SEQ ID NO:32的氨基酸序列组成的CDR H2、和  
由SEQ ID NO:28的氨基酸序列组成的CDR H3;或

Contact  $V_H$ 结构域,其包含:

由SEQ ID NO:33的氨基酸序列组成的CDR H1、  
由SEQ ID NO:34的氨基酸序列组成的CDR H2、和  
由SEQ ID NO:55的氨基酸序列组成的CDR H3;以及

Chothia/Abm/Kabat  $V_L$ 结构域,其包含:

由SEQ ID NO:36的氨基酸序列组成的CDR L1、  
由SEQ ID NO:37的氨基酸序列组成的CDR L2、和  
由SEQ ID NO:38的氨基酸序列组成的CDR L3;或

Contact  $V_L$ 结构域,其包含:

由SEQ ID NO:39的氨基酸序列组成的CDR L1、  
由SEQ ID NO:40的氨基酸序列组成的CDR L2、和  
由SEQ ID NO:41的氨基酸序列组成的CDR L3。

8. 权利要求7的分离的抗体,其中

$V_H$ 结构域由SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成,并且

$V_L$ 结构域由SEQ ID NO:25的氨基酸序列组成。

9. 权利要求7的分离的抗体,其中 $V_H$ 结构域由SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成。

10. 权利要求7的分离的抗体,其中 $V_L$ 结构域由SEQ ID NO:25的氨基酸序列组成。

11. 权利要求7的分离的抗体,其中 $V_H$ 结构域由与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列组成。

12. 权利要求7的分离的抗体,其中 $V_L$ 结构域由与SEQ ID NO:25的氨基酸序列至少90%相同的氨基酸序列组成。

13. 权利要求1和7中任一项的分离的抗体,其具有人框架区。

14. 权利要求1和7中任一项的分离的抗体,其具有重链或轻链人框架区,其中所述重链或轻链人框架区具有1、2、3、4、5或6个氨基酸取代。

15. 权利要求1至12中任一项的分离的抗体,其包含人恒定结构域。

16. 权利要求1至12中任一项的分离的抗体,其中所述抗体是IgG、IgM、IgA或其抗原结合片段。

17. 权利要求1至12中任一项的分离的抗体,其中所述抗体是Fab', F(ab')<sub>2</sub>, F(ab')<sub>3</sub>, 单价scFv或二价scFv。

18. 权利要求1和7中任一项的分离的抗体,其中所述抗体是人源化抗体。

19. 权利要求1至12中任一项的分离的抗体,其中所述抗体与显像剂、化学治疗剂或毒

素缀合。

20. 权利要求1至12中任一项的分离的抗体,其中所述抗体与放射性核素缀合。

21. 一种组合物,其包含在药学上可接受的载体中的权利要求1至20中任一项的分离的抗体。

22. 权利要求1至20中任一项的分离的抗体用于制造治疗患有对PD-L1呈阳性的癌症的受试者的药物组合物的用途,所述药物组合物包括在药学上可接受的载体中的有效量的所述分离的抗体。

23. 权利要求22的用途,其中所述癌症是乳腺癌,肺癌,头颈癌,前列腺癌,食道癌,气管癌,皮肤癌脑癌,肝癌,膀胱癌,胃癌,胰腺癌,卵巢癌,子宫癌,宫颈癌,睾丸癌,结肠癌,直肠癌或皮肤癌。

24. 权利要求22或23的用途,其中所述组合物被制成用于静脉内、皮内、肿瘤内、肌肉内、腹膜内或皮下施用。

25. 一种评估PD-1糖基化的非诊断性和非治疗性方法,包括使含PD-1的样品与权利要求1至20中任一项的抗体接触。

26. 权利要求25的方法,其中所述方法被进一步限定为体外方法。

27. 权利要求25的方法,其中所述样品是细胞样品。

## 特异于糖基化的PD-1的抗体及其使用方法

### [0001] 序列表

[0002] 本申请包含序列表,该序列表以ASCII格式电子提交,并且其全部内容通过引用并入本文。在2016年11月30日创建的所述ASCII拷贝命名为24258\_105005PCT\_SL.txt,大小为19,819字节。

### [0003] 领域

[0004] 本发明一般涉及医学、分子生物学和肿瘤学领域。更具体地,其涉及用于治疗癌症的抗体。

### [0005] 背景

[0006] T细胞活化的一直持续已经彻底改变了对广谱恶性癌症的治疗。例如,ipilimumab(第一个FDA批准的靶向T细胞应答的检查点阻断剂)的开发使得可能治疗转移性黑素瘤(Hodi等,The New England Journal of Medicine 363,711-723(2010))。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,但针对PD-1和PD-L1的第二代检查点抑制剂在III期临床试验中表现出更好的临床活性和安全性(Topalian等,The New England Journal of Medicine 366,2443-2454(2012);Brahmer等,The New England Journal of Medicine 366,2455-2465(2012))。因为PD-L1还具有诱导癌细胞进展的致癌潜力(Topalian等,The New England Journal of Medicine 366,2443-2454(2012);Page等,Annual Review of Medicine 65,185-202(2014)),除了其免疫抑制活性外,靶向PD-1/PD-L1通过由PD-1阻断免疫抑制同时由PD-L1减少细胞进展提供双重功效(Okazaki等,Nature Immunology 14,1212-1218(2013))并且预计具有更灵敏的结果(Topalian等,The New England Journal of Medicine 366,2443-2454(2012);Brahmer等,The New England Journal of Medicine 366,2455-2465(2012);Hamid等,The New England Journal of Medicine,369,134-144(2013))。在2014年,美国正在进行10多项临床试验,测试抗PD-L1和/或抗-PD-1抗体作为单一药剂或组合使用的功效(Page等,Annual Review of Medicine 65,185-202(2014))。虽然有几个成功的具有有希望的结果的临床试验,但PD-L1和PD-1的病理生理功能和调节机制仍未完全确定。

[0007] 最近,已经在手术切除、化学疗法、放射疗法和靶向疗法之后,将重新唤醒的沉默的免疫应答添加到治疗的各种选择中。虽然使用抗-CTLA-4单克隆抗体(Dunn等,Nature Immunology 3,991-998(2002);Leach等,Science 271,1734-1736(1996))最初证明成功治疗转移性黑素瘤,但其已被证明也诱导自身免疫反应。与仅影响免疫细胞的抗-CTLA-4不同,抗PD-L1和抗PD-1主要作用于肿瘤部位,从而产生癌细胞和T细胞的双重影响,因此限制了不良反应并提供更好的治疗功效(Okazaki等,Nature Immunology 14,1212-1218(2013))。然而,仍然需要用于在癌细胞中成功靶向PD-1/PD-L1途径的新治疗和方法学。

### [0008] 概述

[0009] 本文提供了分离的单克隆抗体(本文的抗-glycPD-1抗体),其相对于非糖基化的PD-1选择性结合糖基化的PD-1。在一些方面,抗体相对于非糖基化的PD-1选择性结合在位置N49、N58、N74和/或N116处糖基化的PD-1。

[0010] 在一些实施方案中,分离的抗体选择性结合具有N49糖基化的人PD-1。在一些实施方案中,分离的抗体选择性结合具有N58糖基化的人PD-1。在一些实施方案中,分离的抗体选择性结合具有N74糖基化的人PD-1。在一些实施方案中,分离的抗体选择性结合具有N116糖基化的人PD-1。在一些实施方案中,分离的抗体选择性结合具有N49和N58糖基化的人PD-1。在一些实施方案中,分离的抗体选择性结合具有N49和N74糖基化的人PD-1。在一些实施方案中,分离的抗体选择性结合具有N49和N116糖基化的人PD-1。在一些实施方案中,分离的抗体选择性结合具有N58和N74糖基化的人PD-1。在一些实施方案中,分离的抗体选择性结合具有N58和N116糖基化的人PD-1。在一些实施方案中,分离的抗体选择性结合具有N74和N116糖基化的人PD-1。在一些实施方案中,分离的抗体选择性结合具有N49,N58和N74糖基化的人PD-1。在一些实施方案中,分离的抗体选择性结合具有N49,N58和N116糖基化的人PD-1。在一些实施方案中,分离的抗体选择性结合具有N49,N74和N116糖基化的人PD-1。在一些实施方案中,分离的抗体选择性结合具有N58,N74和N116糖基化的人PD-1。在一些实施方案中,分离的抗体选择性结合具有N49、N58、N74和N116糖基化的人PD-1。

[0011] 在一些方面,抗体选择性结合一个或多个糖基化基序。在一些方面,抗体结合包含糖基化基序的糖肽和相邻肽。在一些方面,抗体与在三维中位于一个或多个糖基化基序附近的肽序列结合。在某些方面,抗体与糖基化的PD-1结合,其中 $K_d$ 小于相对于非糖基化的PD-1表现出的 $K_d$ 的一半。在其他方面,抗体与糖基化的PD-1结合的 $K_d$ 是相对于非糖基化的PD-1表现的 $K_d$ 的至多1/10。

[0012] 在某些方面,抗-glycPD-1抗体与PD-1结合并掩蔽或筛选一个或多个糖基化基序以阻断分子与该基序的结合或其他相互作用并且可以阻断在该糖基化位点的PD-1的糖基化。在具体的实施方案中,抗-glycPD-1抗体掩蔽N49、N58、N74和N116中的一个或多个处的糖基化位点。

[0013] 在特定方面,提供了具有分别具有SEQ ID NO:3和5的氨基酸序列的重链和轻链可变结构域(成熟的 $V_H$ 和 $V_L$ 区氨基酸序列,没有任何信号序列)的抗-glycPD-1单克隆抗体STM418及其抗原结合部分,及其人源化和嵌合形式。本文提供了抗-glycPD-1抗体,其与STM418MAb竞争结合糖基化的PD-1和/或与STM418结合相同的表位。STM418的表位如下,其中PD-1氨基酸序列内的接触残基用下划线表示:

[0014]  $^{34}$ PPTFSPALLV $^{44}$ ... $^{49}$ NATFTCSFSNT $^{59}$ ... $^{104}$ RDFHMSVVRARRND SGTYLCG $^{124}$

[0015] (SEQ ID NO:1的氨基酸34至44、49至59和104至124)。提供了与具有SEQ ID NO:1的糖基化的PD-1序列的氨基酸34至44、49至59和104至124的区域并且特别是具有在SEQ ID NO:1的位置T36、S38、T51、T51、S55、S109、R115、S118和Y121的一个或多个处具有接触的表位结合的抗体。在具体的实施方案中,提供了选择性结合糖基化的PD-1并且与SEQ ID NO:1的所有位置36、38、51、53、55、109、115、118和121具有结合接触的抗体。

[0016] 提供了STM418MAb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和3是STM418 $V_H$ 结构域的核苷酸和氨基酸序列、SEQ ID NO:4和5是STM418轻链 $V_L$ 可变结构域的成熟形式的核苷酸和氨基酸序列。表4提供了STM418的Chothia,AbM,Kabat和Contact重链和轻链V结构域CDR。

[0017] 在一个实施方案中,特异性且优先结合糖基化的PD-1的抗-glycPD-1抗体包含具有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的 $V_H$ 结构域和/或具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的 $V_L$ 结构域。

在一个实施方案中,抗-glycPD-1抗体与包含SEQ ID NO:3的V<sub>H</sub>结构域和SEQ ID NO:5的V<sub>L</sub>结构域的抗体竞争与糖基化的PD-1的特异性结合。在其他实施方案中,抗-glycPD-1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:5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-1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的恒定结构域。

[0018] 在一个实施方案中,特异性且优先结合糖基化的PD-1的抗-glycPD-1抗体包含V<sub>H</sub>结构域,所述V<sub>H</sub>结构域包含分别具有SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8的氨基酸序列的Chothia CDR1-3;包含分别具有SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:8的氨基酸序列的AbM CDR 1-3;包含分别具有SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:8的氨基酸序列的Kabat CDR 1-3;或包含分别具有SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的氨基酸序列的Contact CDR 1-3,或其组合。在一个实施方案中,抗-glycPD-1抗体与包含V<sub>H</sub>结构域的抗体竞争与糖基化的PD-1的特异性结合,所述V<sub>H</sub>结构域包含分别具有SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7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:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:8的氨基酸序列的AbM CDR 1-3;包含分别具有SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:8的氨基酸序列的Kabat CDR 1-3;或包含分别具有SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的氨基酸序列的Contact CDR 1-3,或其组合。在一个实施方案中,特异性且优先结合糖基化的PD-1的抗-glycPD-1抗体包含V<sub>L</sub>结构域,其包含分别具有SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的氨基酸序列的Chothia、AbM或Kabat CDR 1-3;或包含分别具有SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21的氨基酸序列的Contact CDR 1-3,或其组合。在一个实施方案中,抗-glycPD-1抗体与包含V<sub>L</sub>结构域的抗体竞争与糖基化的PD-1的特异性结合,所述V<sub>L</sub>结构域包含分别具有SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的氨基酸序列的Chothia、AbM或Kabat CDR1-3;或包含分别具有SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21的氨基酸序列的Contact CDR1-3,或其组合。在一个实施方案中,抗-glycPD-1抗体包含V<sub>H</sub>结构域和V<sub>L</sub>结构域,或竞争结合包含V<sub>H</sub>结构域和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:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8的氨基酸序列的Chothia CDR1-3;包含分别具有SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:8的氨基酸序列的AbM CDR 1-3;包含分别具有SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:8的氨基酸序列的Kabat CDR 1-3;或包含分别具有SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的氨基酸序列的Contact CDR 1-3,所述V<sub>L</sub>结构域包含分别具有SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的氨基酸序列的Chothia、AbM或Kabat CDR1-3;或包含分别具有SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21的氨基酸序列的Contact CDR 1-3。优选地,V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>结构域具有相同类别的CDR,即两者都具有Chothia、AbM、Kabat或Contact CDR。

[0019] 在其他实施方案中,抗-glycPD-1抗体具有包含CDR H1、H2和H3的V<sub>H</sub>结构域,其氨基酸序列在1、2或3个CDR中具有1、2、3、4或5个氨基酸取代,所述CDR分别具有SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8的氨基酸序列,或分别具有SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:8的氨基酸序列,或分别具有SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:8的氨基酸序列,或分别具有SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的氨基酸序列。抗-glycPD-1抗体可以具有包含CDR L1、L2和L3的V<sub>L</sub>结构域,其氨基酸序列在1、2或3个CDR中具有1、2、

3、4或5个氨基酸取代,所述CDR分别具有SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的氨基酸序列或分别具有SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21的氨基酸序列。对于V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>结构域,抗-glycPD-1抗体可以在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。

[0020] 优选地,前述抗体具有人框架区,即是人源化形式的STM418,并且任选地,包含人恒定结构域,例如,来自人IgG1,IgG2,IgG3或IgG4。

[0021] 本领域技术人员将理解,可以在人源化抗体的CDR和/或框架区中进行一个或多个氨基酸取代,以改善结合亲和力或其他参数。在实施方案中,抗-glycPD-1抗体与包含上述V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>结构域及其中的CDR的抗体竞争与糖基化的PD-1的特异性结合。在实施方案中,抗-glycPD-1抗体与糖基化的PD-1结合,其K<sub>d</sub>小于抗体与非糖基化的PD-1结合所显示的K<sub>d</sub>的一半。在一个实施方案中,抗-glycPD-1抗体与糖基化的PD-1蛋白结合,其K<sub>d</sub>是相对于非糖基化的PD-1表现出的K<sub>d</sub>的最多1/5。在一个实施方案中,抗-glycPD-1抗体与糖基化的PD-1蛋白结合,其K<sub>d</sub>是抗体与非糖基化的PD-1蛋白结合所显示的K<sub>d</sub>的最多1/10。

[0022] 在一个实施方案中,在如实施例2中所述的细胞流式细胞术结合测定中,抗体表现出的如MFI表达的与表达野生型PD-1的细胞的结合是结合表达非糖基化的PD-1的细胞的MFI的3、5、10、20、50倍或100倍。在一个实施方案中,抗体可通过荧光标记或标志物直接或间接检测。在一个实施方案中,抗体直接用荧光标记或标志物(例如FITC)标记,或通过荧光标记的第二抗体检测。在一个实施方案中,STM418MAb或其嵌合或人源化形式对糖基化的PD-1的结合亲和力为5-20nM或5-10nM,包括下限值和上限值。在一个实施方案中,抗体抑制PD-1与PD-L1的相互作用,并且特别抑制效应T细胞表达的糖基化的PD-1与肿瘤细胞表达的PD-L1的相互作用。

[0023] 在另一个特定方面,提供了具有分别具有SEQ ID NO:23和25的氨基酸序列的重链和轻链可变结构域(成熟的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>区氨基酸序列,没有任何信号序列)的抗-glycPD-1单克隆抗体STM432及其抗原结合部分,及其人源化和嵌合形式。编码STM432MAb的重链和轻链可变结构域的核酸序列SEQ ID NO:22和24分别示于下表3中。表5中还显示了STM432的Chothia、AbM、Kabat和Contact重链和轻链V结构域CDR。STM432MAb与具有序列<sup>91</sup>D<sup>91</sup>C<sup>92</sup>R<sup>93</sup>F<sup>94</sup>R<sup>95</sup>V<sup>96</sup>T<sup>97</sup>Q<sup>98</sup>L<sup>99</sup>P<sup>100</sup>N<sup>101</sup>G<sup>102</sup>R<sup>103</sup>D<sup>104</sup>F<sup>105</sup>H<sup>106</sup>M<sup>107</sup>...<sup>123</sup>C<sup>124</sup>G<sup>125</sup>A<sup>126</sup>I<sup>127</sup>S<sup>128</sup>L<sup>129</sup>A<sup>130</sup>P<sup>131</sup>K<sup>132</sup>A<sup>133</sup>Q<sup>134</sup>I<sup>135</sup>(SEQ ID NO:1的氨基酸D91至M107和C123至I134)的糖基化PD-1上的表位结合,其中接触残基R95、R103、S127和K131加下划线。因此,提供了抗-glycPD-1抗体,其与如上所述的STM432表位结合。还提供了抗-glycPD-1抗体,其与STM432MAb竞争结合糖基化的PD-1。

[0024] 在一个实施方案中,特异性且优先结合糖基化的PD-1的抗-glycPD-1抗体包含具有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的V<sub>H</sub>结构域和/或具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的V<sub>L</sub>结构域。在一个实施方案中,抗-glycPD-1抗体与包含SEQ ID NO:23的V<sub>H</sub>结构域和SEQ ID NO:25的V<sub>L</sub>结构域的抗体竞争与糖基化的PD-1的特异性结合。在一个实施方案中,特异性且优先结合糖基化的PD-1的抗-glycPD-1抗体包含与SEQ ID NO:23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:25d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-1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。

[0025] 在一个实施方案中,特异性且优先结合糖基化的PD-1的抗-glycPD-1抗体包含V<sub>H</sub>



结构域,所述 $V_H$ 结构域包含分别具有SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28的氨基酸序列的Chothia CDR 1-3;分别具有SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:28的氨基酸序列的AbM CDR 1-3;分别具有SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:28的氨基酸序列的Kabat CDR 1-3;或分别具有SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:35的氨基酸序列的Contact CDR 1-3,或其组合。在一个实施方案中,抗-glycPD-1抗体与包含 $V_H$ 结构域的抗体竞争与糖基化的PD-1的特异性结合,所述 $V_H$ 结构域包含分别具有SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28的氨基酸序列的Chothia CDR 1-3;分别具有SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:28的氨基酸序列的AbM CDR 1-3;分别具有SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:28的氨基酸序列的Kabat CDR 1-3;或分别具有SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:35的氨基酸序列的Contact CDR 1-3,或其组合。在一个实施方案中,特异性且优先结合糖基化的PD-1的抗-glycPD-1抗体包含 $V_L$ 结构域,其包含分别具有SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38的氨基酸序列的Chothia、AbM或Kabat CDR1-3或具有SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:41的氨基酸序列的Contact CDR 1-3,或其组合。在一个实施方案中,抗-glycPD-1抗体与包含 $V_L$ 结构域的抗体竞争与糖基化的PD-1的特异性结合,所述 $V_L$ 结构域包含分别具有SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38的氨基酸序列的Chothia,AbM或Kabat CDR1-3或具有SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:41的氨基酸序列的Contact CDR 1-3,或其组合。在一个实施方案中,特异性且优先结合糖基化的PD-1的抗-glycPD-1抗体包含 $V_H$ 结构域和 $V_L$ 结构域或与包含 $V_H$ 结构域和 $V_L$ 结构域的抗体竞争结合,所述 $V_H$ 结构域包含分别具有SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28的氨基酸序列的Chothia CDR 1-3;分别具有SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:28的氨基酸序列的AbM CDR 1-3,分别具有SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:28的氨基酸序列的Kabat CDR 1-3;或者分别具有SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:35的氨基酸序列的Contact CDR 1-3,并且所述 $V_L$ 结构域含有分别具有SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38的氨基酸序列的Chothia,AbM或Kabat CDR 1-3,或具有SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:41的氨基酸序列的Contact CDR 1-3。

[0026] 在某些实施方案中提供了抗-glycPD-1抗体,其具有包含CDR H1、H2和H3的 $V_H$ 结构域,其氨基酸序列在1、2或3个CDR中具有1、2、3、4或5个氨基酸取代,所述CDR分别具有SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28的氨基酸序列;或SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:28;或SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:28;或SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:35的氨基酸序列。抗-glycPD-1抗体还可以具有包含CDR L1、L2和L3的 $V_L$ 结构域,其氨基酸序列在1、2或3个CDR中具有1、2、3、4或5个氨基酸取代,所述CDR分别具有SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38的氨基酸序列或分别具有SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:41的氨基酸序列。抗-glycPD-1抗体可以在 $V_H$ 和 $V_L$ 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。

[0027] 在实施方案中,抗-glycPD-1抗体与包含上述 $V_H$ 和 $V_L$ 结构域及其中的CDR的抗体竞争与糖基化的PD-1的特异性结合。优选地,这些抗体具有人框架区,即人源化形式的STM432,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或框架区中进行一个或多个氨基酸取代,以改善结合亲和力或其他参数。在实施方案中,抗-glycPD-1抗体与糖基化的PD-1结合,其 $K_d$ 小于相对

于非糖基化的PD-1表现出的 $K_d$ 的一半。在实施方案中,抗-glycPD-1抗体与糖基化的PD-1结合,其 $K_d$ 小于相对于非糖基化的PD-1表现出的 $K_d$ 的一半。在一个实施方案中,抗-glycPD-1抗体与糖基化的PD-1蛋白结合,其 $K_d$ 是抗体与非糖基化的PD-1结合所显示的 $K_d$ 的最多1/5。在一个实施方案中,抗-glycPD-1抗体与糖基化的PD-1蛋白结合,其 $K_d$ 是抗体与非糖基化的PD-1蛋白结合所显示的 $K_d$ 的最多1/10。在一个实施方案中,在如实施例5中所述的细胞流式细胞术结合测定中,抗体表现出的如MFI表达的与表达野生型PD-1的细胞的结合是结合表达非糖基化的PD-1的细胞的MFI的3、5、10、20、30倍或50倍。在一个实施方案中,抗体可通过荧光标记或标志物直接或间接检测。在一个实施方案中,抗体直接用荧光标记或标志物如FITC标记。在一个实施方案中,STM432MAb或其结合域或人源化或嵌合形式对糖基化的PD-1的结合亲和力为5-20nM或5-10nM,包括下限值和上限值。在一个实施方案中,抗体抑制PD-1与PD-L1的相互作用,并且特别抑制效应T细胞表达的糖基化的PD-1与肿瘤细胞表达的PD-L1的相互作用。

[0028] 在一些方面,抗体是重组的。在某些方面,抗体是IgG、IgM、IgA或其抗原结合片段。在其他方面,抗体是Fab', F(ab')<sub>2</sub>, F(ab')<sub>3</sub>, 单价scFv, 二价scFv, 双特异性抗体, 双特异性scFv或单结构域抗体。在一些方面,抗体是人或人源化抗体。在其他方面,抗体与显像剂、化学治疗剂、毒素或放射性核素缀合。

[0029] 在进一步的实施方案中,本文提供了包含在药学上可接受的载体中的实施方案的抗体(例如,抗体相对于非糖基化的PD-1选择性结合糖基化的PD-1)的组合物。

[0030] 在又一个实施方案中,提供了分离的多肽,其包含人PD-1的至少7个(例如,至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个)连续氨基酸的片段,含有至少一个对应于人PD-1的位置N49、N58、N74或N116的至少一个氨基酸。在其他方面,实施方案的分离的多肽包含人PD-1的至少7个(例如,至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个)连续氨基酸的片段,包含至少一个对应于人PD-1的N49、N58、N74或N116位的氨基酸,并且其中所述氨基酸的至少一个对应于人PD-1的位置N49、N58、N74或N116的氨基酸是糖基化的。在一些方面,实施方案的多肽与免疫原性多肽(例如,匙孔血蓝蛋白, KLH)融合或缀合。在某些方面,多肽还在C-或N-末端包含Cys残基。例如,在一些方面,多肽通过Cys残基处的二硫键与免疫原性多肽缀合。

[0031] 在又一个实施方案中,提供了包含多肽的组合物,所述多肽包含人PD-1的至少7个(例如,至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个)连续氨基酸的片段,其包含至少一个对应于人PD-1的N49、N58、N74或N116位的氨基酸,并且其中所述氨基酸的至少一个对应于人PD-1的位置N49、N58、N74或N116的氨基酸是糖基化的,其中多肽配制在药学上可接受的载体中。

[0032] 在又一个实施方案中,提供了免疫原性组合物,其包含包含人PD-1的至少7个连续氨基酸的片段的多肽,其包含对应于人PD-1的N49、N58、N74或N116位的至少一个氨基酸,其中对应于人PD-1的N49、N58、N74或N116位的至少一个所述氨基酸是糖基化的,其中多肽配制在药学上可接受的载体中。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。

[0033] 在本发明的另一个实施方案中,提供了治疗患有癌症的受试者的方法,包括向受试者施用有效量的实施方案的抗体或分离的多肽。在某些方面,治疗癌症的方法包括向受

试者施用有效量的多肽(例如,糖基化的PD-1多肽)。在其他方面,治疗癌症的方法包括向受试者施用有效量的实施方案的抗体(例如,抗体相对于非糖基化的PD-1选择性结合糖基化的PD-1),例如但不限于人源化的或嵌合形式的STM418或STM432,或与STM418或STM432竞争结合糖基化的PD-1的抗体。在某些方面,癌症是乳腺癌,肺癌,头颈癌,前列腺癌,食道癌,气管癌,皮肤癌,肝癌,膀胱癌,胃癌,胰腺癌,卵巢癌,子宫癌,宫颈癌,睾丸癌,结肠癌,直肠癌或皮肤癌。在某些方面,癌症是肾上腺癌,肛门癌,胆管癌,膀胱癌,骨癌,成人脑/CNS肿瘤,儿童脑/CNS肿瘤,乳腺癌,男性乳腺癌,青少年癌症,儿童癌症,年轻人癌症,原发灶未知的癌症,Castleman病,宫颈癌,结肠/直肠癌,子宫内膜癌,食道癌,尤文氏族肿瘤,眼癌症,胆囊癌,胃肠道类癌,胃肠道间质瘤(GIST),妊娠滋养细胞疾病,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(ALL),急性髓细胞癌(AML),慢性淋巴细胞(CLL),慢性粒细胞白血病(CML),慢性粒单核细胞(CMML),儿童白血病),肝癌,肺癌(如非小细胞,小细胞),肺类癌,淋巴瘤,皮肤淋巴瘤,恶性间皮瘤,多发性骨髓瘤,骨髓增生异常综合征,海军腔癌,鼻窦癌,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,黑色素瘤,merkel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,瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症或肾母细胞瘤。在某些方面,抗体是药学上可接受的组合物。在其他方面,全身施用抗体。在特定方面,抗体静脉内、皮内、肿瘤内、肌肉内、腹膜内、皮下或局部施用。

[0034] 在一些方面,该方法还包括向受试者施用至少第二抗癌疗法。在某些方面,其中第二抗癌疗法是手术疗法,化学疗法,放射疗法,冷冻疗法,激素疗法,免疫疗法或细胞因子疗法。

[0035] 在本文提供的另一个实施方案中,是用于评估PD-1糖基化、N-连接糖基化或N-糖基化的方法,包括使含PD-1的样品与实施方案的抗体(例如,抗体相对于非糖基化的PD-1选择性结合糖基化的PD-1)接触。在一些方面,该方法是体外方法。在某些方面,样品是细胞样品。

[0036] 在又一个实施方案中,提供了制备抗体的方法,其包括向动物施用根据实施方案的多肽(例如,具有包含至少一个对应于人PD-1的N49、N58、N74或N116位的氨基酸的人PD-1的至少7个连续氨基酸的片段的多肽,其中对应于人PD-1的N49、N58、N74和N116位的至少一个所述氨基酸是糖基化的)并分离来自动物的抗体。例如,动物可以是小鼠,大鼠,兔或人。在某些方面,方法还包括鉴定抗体的CDR并使CDR周围的序列人源化以产生人源化抗体。在更进一步的方面,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,本文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,本文提供了相对于非糖基化的PD-1选择性结合实施方案的多肽的分离的抗体(例如,包含人PD-1的至少7个连续氨基酸的片段的多肽,其包含对应于人PD-1的N49、N58、N74或N116位置的至少一个氨基酸,其中,对应于人PD-1的位置N49、N58、N74或N116的至少一个所述氨基酸是糖基化的)。

## 附图说明

[0037] 图1A-1D。PD-L1与PD-1的结合是糖基化特异性的。(A和B)时间推移显微镜图像(在24小时时间点)显示在最后时间点PD-L1与表达野生型PD-1和4NQ PD-1突变体(即,非糖基

化的PD-1)的293T细胞之间的动态相互作用。显示了表达PD-1WT (A) 或4NQ PD-1突变体 (B) 的细胞的绿色荧光 (绿色荧光标记的PD-1/Fc蛋白) 合并图像 (20x)。(C) 该图显示了在每小时时间点PD-L1/Fc蛋白与表达PD-1WT或PD-1 4NQ的HEK293T细胞的定量结合。(D) 通过共免疫沉淀和蛋白质印迹分析测定PD-L1/Fc融合体与表达野生型PD-1或4NQ突变体PD-1的293T细胞的结合。WB:抗hIgG-HRP表示在蛋白质印迹分析中被抗hIgG-HRP抗体识别的结合的PD-L1/Fc;WB:抗FLAG表明通过蛋白质印迹分析检测PD-1;IP:FLAG中的抗FLAG表示通过免疫沉淀检测PD-L1/Fc输入和用抗FLAG抗体检测。

[0038] 图2.抗-glycPD-1抗体与PD-1-Fc蛋白结合的蛋白质印迹分析。在蛋白质印迹中显示了STM418和STM432MAb与野生型 (WT)、突变体 (N49,N58和N74) 和用PNGase处理的野生型的结合。

[0039] 图3A-3C.使用流式细胞术测量标记的抗-glyPD-1和对照抗体与表达野生型和突变体PD-1蛋白的293T细胞的结合,突变体PD-1蛋白为具有在PD-1 (SEQ ID NO:1) 的位置49的取代N的Q的N49,具有在位置58的取代N的Q的N58,具有在位置74的取代N的Q的N74,具有在位置116的取代N的Q的N116,和具有位置49、58、74和116的每一个处用Q取代N的4NQ或对照293T细胞。A.抗-glycPD-1抗体STM418与表达野生型和突变体PD-1蛋白的293T细胞和对照293T细胞的结合。B.抗-glycPD-1抗体STM432与表达野生型和突变体PD-1蛋白的293T细胞和对照293T细胞的结合。C.对照小鼠IgG与表达野生型和突变体PD-1蛋白的293T细胞和对照293T细胞的结合。

[0040] 图4A和4B.抗-glyPD-1抗体STM418的中和活性和 $EC_{50}$ 。A.通过抗体浓度阻断PD-L1-Fc蛋白与表达PD-1的细胞的结合的STM418的活性。B.作为STM418浓度的函数的PD-1-PD-L1结合的抑制。 $EC_{50}$ 为0.132 $\mu$ g/ml。

[0041] 图5A和5B.抗-glyPD-1抗体STM432的中和活性和 $EC_{50}$ 。A.通过抗体浓度阻断PD-L1-Fc蛋白与表达PD-1的细胞结合的STM432的活性。B.作为STM432浓度的函数的PD-1-PD-L1结合的抑制。 $EC_{50}$ 为0.110 $\mu$ g/ml。

[0042] 图6. STM418和STM432对T细胞杀伤癌细胞的影响。图表显示在存在STM418和STM432抗体和对照鼠IgG的情况下,表示为红色图像检测到的癌细胞的水平的癌细胞增殖。

[0043] 详述

[0044] N-糖基化是翻译后修饰,其在内质网 (ER) 中起始并随后在高尔基体中加工 (Schwarz&Aebi,Current Opinion in Structural Biology21,576-582 (2011))。这种类型的修饰首先由膜相关的寡糖基转移酶 (OST) 复合物催化,该复合物将由寡糖组成的预形成的聚糖转移到位于NXT基序内的天冬酰胺 (Asn) 侧链受体 (-Asn-X-Ser/Thr-) (Cheung和Reithmeier,Methods 41 (4):451-59 (2007);Helenius和Aebi,Science 291 (5512):2364-69 (2001))。从预形成的聚糖中添加或去除糖分别由一组糖转移酶和糖苷酶介导,其以细胞和位置依赖性方式紧密调节N-糖基化的级联。

[0045] 程序性死亡配体-1 (PD-L1) 和程序性死亡 (PD-1) 之间的细胞外相互作用对肿瘤相关的免疫逃逸具有显著影响。尽管使用抗PD-1或PD-L1抗体对免疫检查点阻断的临床成功,但PD-L1和PD-1相互作用的潜在调节机制仍然很大程度上未知。PD-1的N-连接糖基化的可以增强其与PD-L1的结合,从而抑制T细胞介导的免疫应答。因此,相对于更一般的PD-1抗体,抗-glyGDD-1抗体可以表现出增强的抑制效果。

[0046] 如本文所用,除非另有说明,术语“程序性死亡-1”或“PD-1”是指来自任何脊椎动物来源的PD-1,包括哺乳动物如灵长类动物(例如人,食蟹猴(cyno)),狗和啮齿动物(例如,小鼠和大鼠)。除非另有说明,否则PD-1还包括各种PD-1同种型,相关的PD-1多肽,包括其SNP变体,以及PD-1的不同修饰形式,包括但不限于磷酸化的PD-1,糖基化的PD-1,泛素化PD-1。

[0047] 以下提供了人PD-1的示例性氨基酸序列,其中N-连接糖基化位点用粗体和下划线标出(N49、N58、N74或N116):

[0048] **MQIPQAPWPV VWAVLQLGWR PGWFLDSPDR PWNPPTFSPA**  
**LLVVTEGDNA TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA**  
**AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT**  
**YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPSP**  
**RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI**  
[0049] **GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP**  
**CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE**  
**DGHCSWPL (SEQ ID NO: 1)**

[0050] 如下表1中所示,所有四个N-糖基化位点都位于PD1的细胞外结构域中。

功能键	位置	长度	说明
[0051] 拓扑结构域	<b><u>21 – 170</u></b>	<b>150</b>	细胞外
跨膜	<b><u>171 – 191</u></b>	<b>21</b>	螺旋
拓扑结构域	<b><u>192 – 288</u></b>	<b>97</b>	胞质

[0052] 特定PD-1同种型或变体的特定糖基化位点可以在该特定PD-1同种型或变体的第49、58、74或116位的氨基酸上不同。

[0053] 在那些情况下,基于序列比对和本领域的其他常识,本领域普通技术人员将能够确定对应于上文例举的人PD-1的N49、N58、N74和N116的任何特定PD-1同种型或变体的糖基化位点。因此,本文提供的抗体相对于非糖基化的PD-1同种型或变体选择性结合PD-1同种型或变体的糖基化的形式。PD-1同种型或变体的糖基化位点可以是如上提供的人PD-1序列的N49、N58、N74和N116的相应位点。本文还提供了包含含有至少一个对应于如上提供的示例性人PD-1序列的N49、N58、N74或N116位的氨基酸的PD-1同种型或变体的至少7个(例如,至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20或更多个)连续氨基酸的片段的多肽。

[0054] 如本文所使用的,并且除非另有说明,否则冠词“一种”,“一个”和“该”指的是该冠词的一个或多于一个的语法对象。举例来说,一个/种抗体是指一个/种抗体或多于一个/种抗体。

[0055] 如本文所用,除非另有说明,否则术语“或”可与“和/或”互换使用,除非明确指出仅指代替代物或替代物是相互排斥的。如本文所用,除非另有说明,否则“另一个”是指至少

第二个或更多个。

[0056] 如本文所用,并且除非另有说明,术语“约”表示值包括装置的误差、用于确定值的方法或研究对象之间存在的变化的固有变化。

[0057] 如本文所用,并且除非另有说明,术语“抗体”是指免疫球蛋白(或“Ig”)类多肽中能够结合特定分子抗原的B细胞的多肽产物,例如IgG、IgM、IgA、IgD、IgE,以及具有其抗原结合片段的其他分子。抗体可以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),并且每条链的每个氨基末端部分包括约100至约130或更多个氨基酸的可变区,每条链的每个羧基末端部分包括恒定区(参见Borrebaeck (ed.) (1995) *Antibody Engineering*, Second Edition, Oxford University Press.; Kuby (1997) *Immunology*, Third Edition, W.H. Freeman and Company, New York)。这里,特定分子抗原包括糖基化的人PD-1。本文提供的抗体包括但不限于多克隆抗体,单克隆抗体,合成抗体,重组产生的抗体,双特异性抗体,多特异性抗体,人抗体,人源化抗体,骆驼抗体,嵌合抗体,胞内抗体,抗独特型(抗Id)抗体。

[0058] 如本文所用,并且除非另有说明,否则当用于提及抗体,抗原结合片段或多核苷酸时,术语“分离的”是指所提及的分子不含其在自然界中的至少一种组分。该术语包括除去从其天然环境中发现的一些或所有其他组分的抗体、抗原结合片段或多核苷酸。抗体的天然环境的组分包括例如红细胞,白细胞,血小板,血浆,蛋白质,核酸,盐和营养素。抗原结合片段或多核苷酸的天然环境的组分包括例如脂质膜,细胞器,蛋白质,核酸,盐和营养素。本发明的抗体,抗原结合片段或多核苷酸也可以是游离的或一直到基本上不含所有这些组分或从中分离或重组产生它的细胞的任何其他组分。

[0059] 如本文所用,除非另有说明,术语“单克隆抗体”是指作为单细胞克隆或杂交瘤或源自单细胞的细胞群的产物的抗体。单克隆抗体还意指通过重组方法从用于产生单分子免疫球蛋白物种的重链和轻链编码免疫球蛋白基因产生的抗体。单克隆抗体制剂中抗体的氨基酸序列基本上是同源的,并且这种制剂中抗体的结合活性表现出基本相同的抗原结合活性。相反,多克隆抗体获自群体内的不同B细胞,其是结合特定抗原的免疫球蛋白分子的组合。多克隆抗体的每种免疫球蛋白可以结合相同抗原的不同表位。产生单克隆抗体和多克隆抗体的方法是本领域熟知的(Harlow and Lane., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) 和Borrebaeck (ed.), *Antibody Engineering: A Practical Guide*, W.H. Freeman and Co., Publishers, New York, pp.103-120 (1991))。

[0060] 如本文所用,除非另有说明,术语“人抗体”是指具有人可变区和/或人恒定区或其对应于人种系免疫球蛋白序列的部分的抗体。Kabat等人(1991) *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, U.S. Department of Health and Human Services, NIH Publication No.91-3242描述了这种人种系免疫球蛋白序列。此处,人抗体可包括与糖基化的人PD-1结合的抗体,并由作为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。

[0061] 如本文所用,并且除非另有说明,术语“嵌合抗体”是指重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源的抗体,而链的其余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同

源,以及此类抗体的片段,只要它们表现出所需的生物活性(参见美国专利No.4,816,567;和Morrison等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851-6855(1984))。

[0062] 如本文所用,并且除非另有说明,术语“人源化抗体”是指嵌合抗体,其包括人免疫球蛋白(例如,受体抗体),其中天然互补决定区(“CDR”)残基被具有所需特异性、亲和力和能力的来自非人类物种(例如供体抗体)(例如小鼠,大鼠,兔或非人灵长类动物)的相应CDR取代。在一些情况下,人免疫球蛋白的一个或多个FR区残基被相应的非人残基取代。此外,人源化抗体可具有在受体抗体或供体抗体中未发现的残基。进行这些修饰以进一步改善抗体性能。人源化抗体重链或轻链可具有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CDR对应于非人免疫球蛋白的CDR,并且所有或基本上所有FR均为非人免疫球蛋白序列的那些。人源化抗体可以具有免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白的恒定区。进一步的细节参见Jones等人,Nature,321:522-525(1986);Riechmann等人,Nature,332:323-329(1988);and Presta,Curr.Op.Struct.Biol.,2:593-596(1992);Carter等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA89:4285-4289(1992);和美国专利号6,800,738,6,719,971,6,639,055,6,407,213,和6,054,297。

[0063] 如本文所用,除非另有说明,术语“重组抗体”是指通过重组方法制备、表达、产生或分离的抗体。重组抗体可以是使用转染到宿主细胞中的重组表达载体表达的抗体,从重组组合抗体文库分离的抗体,从其对人免疫球蛋白基因是转基因和/或转染色体的动物(例如小鼠或牛)分离的抗体(参见,例如,Taylor,LD等,Nucl.Acids Res.20:6287-6295(1992))或通过涉及将免疫球蛋白基因序列剪接到其他DNA序列的任何其他方式制备、表达、产生或分离的抗体。此类重组抗体可具有可变区和恒定区,包括源自人种系免疫球蛋白序列的那些(参见Kabat,E.A.等人(1991)Sequences of Proteins of Immunological Interest,Fifth Edition,U.S.Department of Health and Human Services,NIH Publication No.91-3242)。重组抗体也可以进行体外诱变(或者,当使用转基因人Ig序列的动物时,进行体内体细胞诱变),因此重组抗体的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>区的氨基酸序列可以是虽然衍生自和与人种系V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>序列有关,但在体内人抗体种系库中不天然存在。

[0064] 如本文所用,除非另有说明,术语“抗原结合片段”和类似术语是指抗体的一部分,其包括免疫特异性结合抗原的氨基酸残基并赋予抗体对于其抗原的特异性和亲和力。抗原结合片段可以称为抗体的功能片段。抗原结合片段可以是单价的,二价的或多价的。

[0065] 具有抗原结合片段的分子包括,例如,Fd,Fv,Fab,F(ab'),F(ab)2,F(ab')2,F(ab)3,F(ab')3,单链Fv(scFv),双链体,三聚体抗体,四聚体抗体,微抗体或单结构域抗体。scFv可以是单价scFv或二价scFv。具有抗原结合片段的分子可包括例如重链或轻链多肽,可变区多肽或CDR多肽或其部分,只要这些抗原结合片段保留结合活性即可。这种抗原结合片段可以例如描述于Harlow and Lane,Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,New York(1989);Myers(ed.),Molec.Biology and Biotechnology:A Comprehensive Desk Reference,New York:VCH Publisher,Inc.;Huston等人,Cell Biophysics,22:189-224(1993);Plückthun and Skerra,Meth.Enzymol.,178:497-515(1989)和Day,E.D.,Advanced Immunochemistry,Second Ed.,Wiley-Liss,Inc.,New York,NY(1990)。抗原结合片段可以是具有至少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个连续氨基酸序列,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,至少100个连续氨基酸残基,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,或至少250个连续氨基酸残基的多肽。

[0066] 抗体的重链是指约50-70kDa的多肽链,其中氨基末端部分包括约120-130或更多个氨基酸的可变区和羧基末端部分包含恒定区。基于重链恒定区的氨基酸序列,恒定区可以是五种不同类型中的一种,称为alpha ( $\alpha$ ),delta ( $\delta$ ),epsilon ( $\epsilon$ ),gamma ( $\gamma$ )和mu ( $\mu$ )。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五种众所周知的抗体,IgA,IgD,IgE,IgG和IgM,包括IgG的四个亚类,即IgG1,IgG2,IgG3和IgG4。重链可以是人重链。

[0067] 抗体的轻链是指约25kDa的多肽链,其中氨基末端部分包括约100至约110或更多个氨基酸的可变区和羧基末端部分包含恒定区的。轻链的近似长度为211至217个氨基酸。有两种不同的类型,称为基于恒定域的氨基酸序列的lambda ( $\lambda$ )和kappa ( $\kappa$ )。轻链氨基酸序列是本领域熟知的。轻链可以是人轻链。

[0068] 抗体的可变结构域或可变区是指抗体的轻链或重链的一部分,其通常位于轻链或重链的氨基末端并且具有重链中约120至130个氨基酸和轻链中约100至110个氨基酸的长度,并用于每种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。可变结构域在不同抗体之间的序列差异很大。序列的可变性集中在CDR中,而可变域中可变性较小的部分称为框架区(FR)。轻链和重链的CDR主要负责抗体与抗原的相互作用。本文使用的氨基酸位置的编号是根据Kabat等人(1991) Sequences of proteins of immunological interest. (U.S.Department of Health and Human Services,Washington,D.C.) 5<sup>th</sup> ed所述的EU Index进行的。可变区可以是人类可变区。

[0069] CDR指免疫球蛋白(Ig或抗体) $V_H$  $\beta$ -片框架的非框架区内的三个高变区(H1、H2或H3)之一,或在抗体 $V_L$  $\beta$ -片框架的非框架区内的三个高变区(L1、L2或L3)之一。因此,CDR是散布在框架区序列内的可变区序列。CDR区是本领域技术人员公知的,并且已经由例如Kabat定义为抗体可变结构域内大多数高变异性的区域(Kabat等,J.Biol.Chem.252:6609-6616(1977);Kabat,Adv.Prot.Chem.32:1-75(1978))。CDR区序列也已被Chothia在结构上定义为不属于保守 $\beta$ -折叠框架的那些残基,因此能够适应不同的构象(Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917(1987))。这两个术语在本领域中都是公认的。通过比较多种结构确定了经典抗体可变结构域内CDR的位置(Al-Lazikani等,J.Mol.Biol.273:927-948(1997);Morea等,Methods 20:267-279(2000))。因为高变区内残基的数量在不同的抗体中不同,所以相对于经典位置的额外残基通常用与经典可变域编号方案中的残基数相邻a、b、c等编号(Al-Lazikani等人,同上(1997))。这种命名法同样为本领域技术人员所熟知。

[0070] 已经开发并广泛采用通用编号系统,ImMunoGeneTics (IMGT) Information **System**<sup>®</sup> (Lafranc等,2003,Dev.Comp.Immunol,27(1):55-77)。IMGT是一个综合信息系统,专门研究免疫球蛋白(Ig),T细胞受体(TR)和人类及其他脊椎动物的主要组织相容性复合体(MHC)。本文中,CDR是指氨基酸序列和轻链或重链内的位置。由于免疫球蛋白V结构域内的CDR的“位置”在物种之间是保守的并且存在于称为环的结构中,通过使用根据结构特征、CDR和框架残基对齐可变结构域序列的编号系统,并且易于鉴定。该信息可用于移植和



将来自一个物种的免疫球蛋白的CDR残基替换为通常来自人抗体的受体框架。Honegger等人,2001,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关系,包括例如Kabat编号和IMGT唯一编号系统,是本领域技术人员公知的(参见,例如,Kabat,Id;Chothia等人,Id.;Martin,2010,Antibody Engineering,Vol.2,Chapter 3, Springer Verlag;和Lefranc等人,1999,Nuc.Acids Res.,27:209-212)。

[0071] CDR区序列也已由AbM和Contact方法定义。AbM高变区代表Kabat CDR和Chothia结构环之间的折衷,并且由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 Verlag)。“接触”高变区基于可用的复杂晶体结构的分析。来自这些高变区或CDR中的每一个的残基如下所述。

[0072] CDR区序列的示例性描绘在下表2中说明。通过比较多种结构确定了经典抗体可变区内CDR的位置(Al-Lazikani等,1997,J.Mol.Biol,273:927-948;Morea等,2000,Methods,20:267-279)。因为高变区内残基的数量在不同的抗体中不同,所以相对于经典位置的额外残基通常用与经典可变区编号方案中的残基数相邻的a、b、c等编号(Al-Lazikani等人,同上)。这种命名法同样为本领域技术人员所熟知。

[0073] 表2.CDR区序列的示例性划分

[0074]

	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

[0075] 还可以将一个或多个CDR共价或非共价地掺入分子中以使其成为免疫粘附素。免疫粘附素可以掺入CDR作为较大多肽链的一部分,可以将CDR共价连接至另一条多肽链,或者可以非共价地掺入CDR。CDR允许免疫粘附素结合特定的目标抗原。

[0076] 如本文所用并且除非另有说明,术语“结合”或“接合”是指分子之间的相互作用。相互作用可以是,例如,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。抗体与靶分子(例如糖基化的人PD-1)的单个表位之间的总非共价相互作用的强度是抗体对该表位的亲和力。“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。

[0077] 结合分子X(例如抗体)对其结合配偶体Y(例如抗体的同源抗原)的亲和力通常可以通过解离常数( $K_d$ )或平衡解离常数( $K_D$ )来表示。低亲和力抗体通常缓慢地结合抗原并且易于解离,而高亲和力抗体通常更快地结合抗原并且倾向于保持更长时间的结合。测量结合亲和力的各种方法是本领域已知的,其中任何方法都可用于本公开的目的。“ $K_D$ ”或“ $K_D$ 值”可以通过本领域已知的测定法测量,例如通过结合测定法。 $K_D$ 可以在放射性标记的抗原结合测定(RIA)中测量,例如,用目的抗体的Fab版本及其抗原进行测定(Chen等人,(1999) J.Mol.Biol.293:865-881)。 $K_D$ 或 $K_D$ 值也可以通过使用Biacore的表面等离子共振测定法,使用例如BIAcoreTM-2000或BIAcoreTM-3000Biacore,Inc.,Piscataway,NJ),或通过使用例如生物层干涉测量法测量,OctetQK384系统(ForteBio, Menlo Park,CA)。如本文所用,并且

除非另有说明,如果抗体以比第二分子抗原更高的亲和力结合第一分子抗原,则认为该抗体能够相对于第二分子抗原“选择性地结合”第一分子抗原。抗体通常不与完全不相关的抗原结合。

[0078] 除非另有说明,本文所用的术语“多肽”包括寡肽,其具有2至30个氨基酸(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、16、18、20、25或30个氨基酸)以及更长的氨基酸链,例如,超过30个氨基酸,超过50个氨基酸,超过100个氨基酸,超过150种氨基酸,200多个氨基酸,300多个氨基酸,400多个氨基酸,500多个氨基酸,或600多个氨基酸。可以产生多肽,例如,重组表达,或通过化学合成。本发明的多肽可以是翻译后或化学修饰的(例如,糖基化的,氨基甲酰化,磷酸化,生物素化,荧光染料附着的等)。多肽可以在特定位点糖基化。多肽可包括不由天然遗传密码编码的非天然氨基酸。例如,多肽可包括甲基化骨架结构,拟肽骨架结构(聚-N-取代的甘氨酸),L-氨基酸,R-氨基酸等。多肽可具有野生型序列,天然存在的变体序列,突变序列(例如点突变体,缺失突变体)等。

[0079] 抗glycPD-1抗体

[0080] 本文提供了相对于非糖基化的PD-1选择性结合糖基化的PD-1的分离的抗体。PD-1可以是人PD-1。糖基化的PD-1可以是PD-1的特异性N-聚糖结构或PD-1的糖肽。在一些实施方案中,本文提供的抗体是抗原结合片段,其相对于非糖基化的PD-1选择性结合糖基化的PD-1。

[0081] 在一些实施方案中,相对于非糖基化的PD-1,本文提供的分离的抗体选择性结合在N49、N58、N74、N116或其任何组合糖基化的人PD-1。在一些实施方案中,分离的抗体选择性结合具有N49糖基化的人PD-1。在一些实施方案中,分离的抗体选择性结合具有N58糖基化的人PD-1。在一些实施方案中,分离的抗体选择性结合具有N74糖基化的人PD-1。在一些实施方案中,分离的抗体选择性结合具有N116糖基化的人PD-1。在一些实施方案中,分离的抗体选择性结合具有N49和N58糖基化的人PD-1。在一些实施方案中,分离的抗体选择性结合具有N49和N74糖基化的人PD-1。在一些实施方案中,分离的抗体选择性结合具有N49和N116糖基化的人PD-1。在一些实施方案中,分离的抗体选择性结合具有N58和N74糖基化的人PD-1。在一些实施方案中,分离的抗体选择性结合具有N58和N116糖基化的人PD-1。在一些实施方案中,分离的抗体选择性结合具有N74和N116糖基化的人PD-1。在一些实施方案中,分离的抗体选择性结合具有N49、N58和N74糖基化的人PD-1。在一些实施方案中,分离的抗体选择性结合具有N49、N58和N116糖基化的人PD-1。在一些实施方案中,分离的抗体选择性结合具有N49、N74和N116糖基化的人PD-1。在一些实施方案中,分离的抗体选择性结合具有具有N58、N74和N116糖基化的人PD-1。在一些实施方案中,分离的抗体选择性结合具有具有N49、N58、N74和N116糖基化的人PD-1。

[0082] 在某些方面,抗-glycPD-1抗体与PD-1结合并掩蔽或筛选一个或多个糖基化基序以阻断分子与该基序的结合或其他相互作用,并且可以阻断在该糖基化位点的PD-1的糖基化。在具体的实施方案中,抗-glycPD-1抗体掩蔽N49、N58、N74和N116中的一个或多个处的糖基化位点。

[0083] 在一些实施方案中,本文提供的抗体选择性结合PD-1的一个或多个糖基化基序。在一些实施方案中,抗体选择性结合具有糖基化基序的糖肽和相邻的肽。在一些实施方案中,抗体选择性结合糖基化的PD-1,其 $K_d$ 小于相对于非糖基化的PD-1表现出的 $K_d$ 的至少

30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80% 或 90%。在某些实施方案中, 抗原结合片段与糖基化的 PD-1 结合, 其中  $K_d$  小于相对于非糖基化的 PD-1 表现出的  $K_d$  的 50%。在一些实施方案中, 抗体与糖基化的 PD-1 结合,  $K_d$  小于相对于非糖基化的 PD-1 表现出的  $K_d$  的 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%。在进一步的方面, 抗体与糖基化的 PD-1 结合, 其中  $K_d$  是相对于非糖基化的 PD-1 表现出的  $K_d$  的最多 1/10。

[0084] 提供了优先结合糖基化的 PD-1 的单克隆抗体, 特别是本文所述的 STM418 和 STM432。还提供了人源化和嵌合形式的 STM418 和 STM432 以及竞争结合 STM418 和 STM432 的抗体。STM418 和 STM432 的重链和轻链可变结构域提供于下表 3 中。

[0085] 在特定方面提供了抗-glycPD-1 单克隆抗体 STM418 及其抗原结合部分, 及其人源化和嵌合形式, 其具有分别具有 SEQ ID NO: 3 和 5 的氨基酸序列的重链和轻链可变结构域 (成熟的  $V_H$  和  $V_L$  区氨基酸序列, 无任何信号序列)。本文提供抗-glycPD-1 抗体, 其与 STM418MAb 竞争结合 PD-1 和/或与 STM418 结合相同的表位。

[0086] 提供了单克隆的 STM418MAb 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, 示于下表 3 中。SEQ ID NO: 2 和 3 是 STM418  $V_H$  结构域的核苷酸和氨基酸序列、SEQ ID NOS: 4 和 5 是成熟形式的 STM418  $V_L$  结构域的核苷酸和氨基酸序列。表 4 提供了 STM418 的 Chothia, AbM, Kabat 和 Contact 重链和轻链 V 结构域 CDR。

[0087] 已经确定 STM418 在糖基化的 PD-1 上的表位如下, 其中 PD-1 位置如 SEQ ID NO: 1 中所示, 并且如通过抗原-抗体交联实验所确定的接触残基通过下划线表示:

[0088]  $^{34}$ PPTFSPALLV $^{44}$ ... $^{49}$ NATFTCSFSNT $^{59}$ ... $^{104}$ RDFHMSVVRARRNDSGTYLCG $^{124}$

[0089] (SEQ ID NO: 1 的氨基酸 34 至 44、49 至 59 和 104 至 124)。因此, 提供了与具有 SEQ ID NO: 1 的糖基化的 PD-1 序列的氨基酸 34 至 44、49 至 59 和 104 至 124 的区域并且特别是具有在 SEQ ID NO: 1 的位置 T36、S38、T51、T51、S55、S109、R115、S118 和 Y121 的一个或多个处具有接触的表位结合的抗体。在具体的实施方案中, 提供了选择性结合糖基化的 PD-1 并且与 SEQ ID NO: 1 的所有位置 36、38、51、53、55、109、115、118 和 121 具有结合接触的抗体。

[0090] 在一个实施方案中, 特异性且优先结合糖基化的 PD-1 的抗-glycPD-1 抗体包含具有 SEQ ID NO: 3 的氨基酸序列的  $V_H$  结构域和/或具有 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列的  $V_L$  结构域。在一个实施方案中, 抗-glycPD-1 抗体与包含 SEQ ID NO: 3 的  $V_H$  结构域和 SEQ ID NO: 5 的  $V_L$  结构域的抗体竞争与糖基化的 PD-1 的特异性结合。在其他实施方案中, 抗-glycPD-1 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  $V_H$  结构域和/或与 SEQ ID NO: 5 的氨基酸序列至少 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% 或 99% 相同的  $V_L$  结构域。这些抗-glycPD-1 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 的恒定结构域。

[0091] 在一个实施方案中, 特异性且优先结合糖基化的 PD-1 的抗-glycPD-1 抗体包含  $V_H$  结构域, 所述  $V_H$  结构域包含分别具有 SEQ ID NO: 6、SEQ ID NO: 7 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: 9、SEQ ID NO: 10 和 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列的 AbM CDR 1-3; 包含分别具有 SEQ ID NO: 11、SEQ ID NO: 12 和 SEQ ID NO: 8 的氨基酸序列的 Kabat CDR 1-3; 或包含分别具有 SEQ ID NO: 13、SEQ ID NO: 14 和 SEQ ID NO: 15 的氨基酸序列的 Contact CDR 1-3, 或其组合。在一个实施方案中, 抗-glycPD-1 抗体与包含  $V_H$  结构域的抗体竞争与糖基化的 PD-1 的特异性结合, 所述  $V_H$  结构域包含分别具有 SEQ ID NO: 6、

SEQ ID NO:7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:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:8的氨基酸序列的AbM CDR 1-3;包含分别具有SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:8的氨基酸序列的Kabat CDR 1-3;或包含分别具有SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的氨基酸序列的Contact CDR 1-3,或其组合。在一个实施方案中,特异性且优先结合糖基化的PD-1的抗-glycPD-1抗体包含 $V_L$ 结构域,其包含分别具有SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的氨基酸序列的Chothia、AbM或Kabat CDR 1-3;或包含分别具有SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21的氨基酸序列的Contact CDR 1-3,或其组合。在一个实施方案中,抗-glycPD-1抗体与包含 $V_L$ 结构域的抗体竞争与糖基化的PD-1的特异性结合,所述 $V_L$ 结构域包含分别具有SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的氨基酸序列的Chothia,AbM或Kabat CDR1-3;或包含分别具有SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21的氨基酸序列的Contact CDR1-3,或其组合。在一个实施方案中,抗-glycPD-1抗体包含 $V_H$ 结构域和 $V_L$ 结构域,或竞争结合包含 $V_H$ 结构域和 $V_L$ 结构域的抗体,所述 $V_H$ 结构域包含分别具有SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8的氨基酸序列的Chothia CDR1-3;包含分别具有SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:8的氨基酸序列的AbM CDR 1-3;包含分别具有SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:8的氨基酸序列的Kabat CDR 1-3;或包含分别具有SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的氨基酸序列的Contact CDR 1-3,所述 $V_L$ 结构域包含分别具有SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的氨基酸序列的Chothia,AbM或Kabat CDR1-3;或包含分别具有SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21的氨基酸序列的Contact CDR 1-3。优选地, $V_H$ 和 $V_L$ 结构域具有相同类别的CDR,即两者都具有Chothia、AbM、Kabat或Contact CDR。

[0092] 在其他实施方案中,抗-glycPD-1抗体具有包含CDR H1、H2和H3的 $V_H$ 结构域,其氨基酸序列在1、2或3个CDR中具有1、2、3、4或5个氨基酸取代,所述CDR分别具有SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8的氨基酸序列,或分别具有SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10和SEQ ID NO:8的氨基酸序列,或分别具有SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:8的氨基酸序列,或分别具有SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的氨基酸序列。抗-glycPD-1抗体可以具有包含CDR L1、L2和L3的 $V_L$ 结构域,其氨基酸序列在1、2或3个CDR中具有1、2、3、4或5个氨基酸取代,所述CDR分别具有SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的氨基酸序列或分别具有SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:21的氨基酸序列。对于 $V_H$ 和 $V_L$ 结构域,抗-glycPD-1抗体可以在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。

[0093] 优选地,前述抗体具有人框架区,即是人源化形式的STM418,并且任选地,包含人恒定结构域,例如,来自人IgG1, IgG2, IgG3或IgG4。

[0094] 本领域技术人员将理解,可以在人源化抗体的CDR和/或框架区中进行一个或多个氨基酸取代,以改善结合亲和力或其他参数。在实施方案中,抗-glycPD-1抗体与包含上述 $V_H$ 和 $V_L$ 结构域的抗体及其中的CDR竞争与糖基化的PD-1的特异性结合。在实施方案中,抗-glycPD-1抗体与糖基化的PD-1结合,其 $K_d$ 小于抗体与非糖基化的PD-1结合所显示的 $K_d$ 的一半。在一个实施方案中,抗-glycPD-1抗体与糖基化的PD-1蛋白结合,其 $K_d$ 是相对于非糖基化的PD-1表现出的 $K_d$ 的最多1/5。在一个实施方案中,抗-glycPD-1抗体与糖基化的PD-1蛋白结合,其 $K_d$ 是抗体与非糖基化的PD-1蛋白结合所显示的 $K_d$ 的最多1/10。在一个实施方案

中,在如实施例2中所述的细胞流式细胞术结合测定中,抗体表现出的如MFI表达的与表达野生型PD-1的细胞的结合是结合表达非糖基化的PD-1的细胞的MFI的5、10、20、30、50、70倍或100倍。在一个实施方案中,抗体可通过荧光标记或标记直接或间接检测。在一个实施方案中,抗体直接用荧光标记或标记物标记,例如FITC。在一个实施方案中,STM418MAb或其嵌合或人源化形式对糖基化的PD-1的结合亲和力为5-20nM或5-10nM,包括下限值和上限值。在一个实施方案中,抗体抑制PD-1与PD-L1的相互作用,并且特别抑制效应T细胞表达的糖基化的PD-1与肿瘤细胞表达的PD-L1的相互作用。

[0095] 在另一个特定方面,提供了具有分别具有SEQ ID NO:23和25的氨基酸序列的重链和轻链可变结构域(成熟的V<sub>H</sub>和V<sub>L</sub>区氨基酸序列,没有任何信号序列)的抗-glycPD-1单克隆抗体STM432及其抗原结合部分,及其人源化和嵌合形式。编码STM432MAb的重链和轻链可变结构域的核酸序列SEQ ID NO:22和24分别示于下表3中。表5中还显示了STM432的Chothia、AbM、Kabat和Contact重链和轻链V结构域CDR。

[0096] 已经确定STM432结合对应于序列<sup>91</sup>DCRFRVTQLPNGRDFHM<sup>107</sup>...<sup>123</sup>CGAISLAPKAQI<sup>134</sup>的糖基化的PD-1上的表位(SEQ ID NO:1的PD-1氨基酸序列的氨基酸D91至M107和C123至I134。如本文所示,包含MAb STM432识别的表位的氨基酸残基R95、R103、S127和K131与结合PD-1的mAb接触,其标有下划线。因此,提供了结合本文定义的STM432表位的抗-glycPD-1抗体。还提供抗-glycPD-1抗体,其与STM432MAb竞争结合糖基化的PD-1和/或与STM432结合相同的表位。

[0097] 在一个实施方案中,特异性且优先结合糖基化的PD-1的抗-glycPD-1抗体包含具有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的V<sub>H</sub>结构域和/或具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的V<sub>L</sub>结构域。在一个实施方案中,抗-glycPD-1抗体与包含SEQ ID NO:23的V<sub>H</sub>结构域和SEQ ID NO:25的V<sub>L</sub>结构域的抗体竞争与糖基化的PD-1的特异性结合。在一个实施方案中,特异性且优先结合糖基化的PD-1的抗-glycPD-1抗体包含与SEQ ID NO:23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:25d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-1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。

[0098] 在一个实施方案中,特异性且优先结合糖基化的PD-1的抗-glycPD-1抗体包含V<sub>H</sub>结构域,所述V<sub>H</sub>结构域包含分别具有SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28的氨基酸序列的Chothia CDR 1-3;分别具有SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:28的氨基酸序列的AbM CDR 1-3;分别具有SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:28的氨基酸序列的Kabat CDR 1-3;或分别具有SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:35的氨基酸序列的Contact CDR 1-3,或其组合。在一个实施方案中,抗-glycPD-1抗体与包含V<sub>H</sub>结构域的抗体竞争与糖基化的PD-1的特异性结合,所述V<sub>H</sub>结构域包含分别具有SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28的氨基酸序列的Chothia CDR 1-3;分别具有SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:28的氨基酸序列的AbM CDR 1-3;分别具有SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:28的氨基酸序列的Kabat CDR 1-3;或分别具有SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:35的氨基酸序列的Contact CDR 1-3,或其组合。在一个实施方案中,特异性且优先结合糖基化的PD-1的抗-glycPD-1抗体包含V<sub>L</sub>结构域,其包含分别具有SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38的氨基酸序列的Chothia、AbM或Kabat CDR1-3或具有

SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:41的氨基酸序列的Contact CDR 1-3,或其组合。在一个实施方案中,抗-glycPD-1抗体与包含 $V_L$ 结构域的抗体竞争与糖基化的PD-1的特异性结合,所述 $V_L$ 结构域包含分别具有SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38的氨基酸序列的Chothia, AbM或Kabat CDR1-3或具有SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:41的氨基酸序列的Contact CDR 1-3,或其组合。在一个实施方案中,特异性且优先结合糖基化的PD-1的抗-glycPD-1抗体包含 $V_H$ 结构域和 $V_L$ 结构域或与包含 $V_H$ 结构域和 $V_L$ 结构域的抗体竞争结合,所述 $V_H$ 结构域包含分别具有SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28的氨基酸序列的Chothia CDR 1-3;分别具有SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:28的氨基酸序列的AbM CDR 1-3,分别具有SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:28的氨基酸序列的Kabat CDR 1-3;或者分别具有SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:35的氨基酸序列的Contact CDR 1-3,并且所述 $V_L$ 结构域含有分别具有SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:38的氨基酸序列的Chothia, AbM或Kabat CDR 1-3,或具有SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:41的氨基酸序列的Contact CDR 1-3。

[0099] 在某些实施方案中提供了抗-glycPD-1抗体,其具有包含CDR H1、H2和H3的 $V_H$ 结构域,其氨基酸序列在1、2或3个CDR中具有1、2、3、4或5个氨基酸取代,所述CDR分别具有SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28的氨基酸序列;或SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:28;或SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32和SEQ ID NO:28;或SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:35的氨基酸序列。抗-glycPD-1抗体还可以具有包含CDR L1、L2和L3的 $V_L$ 结构域,其氨基酸序列在1、2或3个CDR中具有1、2、3、4或5个氨基酸取代,所述CDR分别具有SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38的氨基酸序列或分别具有SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40和SEQ ID NO:41的氨基酸序列。抗-glycPD-1抗体可以在 $V_H$ 和 $V_L$ 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。

[0100] 在实施方案中,抗-glycPD-1抗体与包含上述 $V_H$ 和 $V_L$ 结构域及其中的CDR的抗体竞争与糖基化的PD-1的特异性结合。优选地,这些抗体具有人框架区,即人源化形式的STM432,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或框架区中进行一个或多个氨基酸取代,以改善结合亲和力和其他参数。在实施方案中,抗-glycPD-1抗体与糖基化的PD-1结合,其 $K_d$ 小于相对于非糖基化的PD-1表现出的 $K_d$ 的一半。在实施方案中,抗-glycPD-1抗体与糖基化的PD-1结合,其 $K_d$ 小于相对于非糖基化的PD-1表现出的 $K_d$ 的一半。在一个实施方案中,抗-glycPD-1抗体与糖基化的PD-1蛋白结合,其 $K_d$ 是抗体与非糖基化的PD-1结合所显示的 $K_d$ 的最多1/5。在一个实施方案中,抗-glycPD-1抗体与糖基化的PD-1蛋白结合,其 $K_d$ 是抗体与非糖基化的PD-1蛋白结合所显示的 $K_d$ 的最多1/10。在一个实施方案中,在如实施例5中所述的细胞流式细胞术结合测定中,抗体表现出的如MFI表达的与表达野生型PD-1的细胞的结合是结合表达非糖基化的PD-1的细胞的MFI的3、5、10、20、30倍或50倍。在一个实施方案中,抗体可通过荧光标记或标志物直接或间接检测。在一个实施方案中,抗体直接用荧光标记或标志物如FITC标记。在一个实施方案中,STM432MAb或其结合域或人源化或嵌合形式对糖基化的PD-1的结合亲和力为5-20nM或5-10nM,包括下限值和上限值。在一个实施方案中,抗体抑制PD-1与PD-L1的相互作用,并且特别抑制效应T细胞表达的糖基化的PD-1与肿瘤细胞表达的PD-L1的相互作用。

[0101] 在一个实施方案中,抗体抑制PD-1与PD-1的相互作用,并且特别抑制效应T细胞表达的糖基化的PD-1与肿瘤细胞表达的PD-L1的相互作用。

[0102] 另一个实施方案提供了编码抗-glycPD-1V<sub>H</sub>结构域的分离的核酸分子,其包含与SEQ ID NO:2或22至少90-98%相同的核苷酸序列和/或编码抗-glycPD-1抗体V<sub>L</sub>结构域的分离的核酸分子,其包含分别与SEQ ID NO:4或24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22或SEQ ID NO:4或24 90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或更多相同。

[0103] 下表3提供了STM418和STM432的重链和轻链可变结构域的核苷酸和氨基酸序列。

[0104] 表3.STM418和STM432的重链和轻链可变区核苷酸和氨基酸序列

[0105]	描述	序列
--------	----	----

[0106]

描述	序列
<b>MAb STM418 成熟重链 V 结构域核苷酸序列</b>	<b>gaagtgatgctggtggagctctgggggaggcttagtgaagcctggagg gtccctgaaactctcctgtgcagcctctggattcactttcagtagctatg gcatgtcttgggttcgtcagactccggagaagaggctggagtgggtcg caaccattagtggtggtggtgtaacacctactatccagacactgtga agggccgattcaccatctccagagacaatgccagaacaccctgtac ctgcaaatgagcagctctgaggtctgaggacaggccttgattattgta caagctattactacgggattgactactggggccaaggcaccactctca cagtctctca (SEQ ID NO: 2)</b>
<b>MAb STM418 成熟重链 V 结构域氨基酸序列</b>	<b>EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSS YGMSWVRQTPEKRLEWVATISGGGGNTYYP DTVKGRTISRDNKNTLYLQMSSLRSEDAL YYCTSYYYGIDYWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO: 3)</b>
<b>单抗 STM418 成熟 κ 轻链 V 结构域的核苷酸序列</b>	<b>gacattgtgatgaccagttctcacaattcatgtccacatcagtagga gacagggtcagcatcacctgcaaggccagtcaggatgtgagtactgc tgtagcctggtatcaacaaaaaccagggaatctcctaaattactgat ttactgggcatccacccggcaactggagtccttgatcgcttcacagg cagtggatctgggacagagtatactctcaccatcagcagtggtgcagc tgaagacctggcactttattactgtcagcaacattatagcattccgtgg acgttcggtggaggcaccaagctggaaatcaaacgg (SEQ ID NO: 4)</b>
<b>MAb STM418 成熟 Kappa 轻链 V 结构域氨基酸序列</b>	<b>DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTA VAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRQTGVPDRFT GSGSGTEYTLTISSVQAEDLALYYCQQHYSIP WTFGGGTKLEIKR (SEQ ID NO: 5)</b>



[0107]

描述	序列
<b>MAb STM432 成熟重链 V 结构域核苷酸序列</b>	<b>gaagtgatgctggtggagcctgggggaggettagtgaagcctggagggtccctgaaactctctgtgcagcctctggattcactttcagtagctatggcatgtcttgggttcgccagactccggagaagaggctggagtgggtcgcaaccattagtggtggtggtgctaacacctactatccagacactgtgaagggccgattcaccatctccagagacaatgccaagaacacctgtacctgcaaataaacagtctgaggctctgaggacacggccttgattactgtgcaagatatggttacgacaagggtctttgcttactggggccaagggactctggtcactgtctctgca (SEQ ID NO: 22)</b>
<b>MAb STM418 成熟重链 V 结构域氨基酸序列</b>	<b>EVMLVEPGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSS YGMSWVRQTPEKRLEWVATISGGGANTYYP DTVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRSEDTA LYVCARYGYDTVFAYWGQGTLVTVSA (SEQ ID NO: 23)</b>
<b>MAb STM418 成熟 kappa 轻链 V 结构域核苷酸序列</b>	<b>gacattgtgtgacccaatctccagcttctttggtgtgtctctagggcagaagggccaccatctctgcagagccagcgaaagtgttgatgattatggcattggttttatgaactggttccaacagaaaccaggtcagccacccaaactctcatctatactacatccaaccaaggatccgggggtccctgccaggtttagtggcagtggttctgggacagacttcagcctcaacatccatctatggtggaggatgatactgcaatgtatttctgtcagcaaagtaaggaggttccgtggacgttcggtggcgccaccaagctggaaatcaaa (SEQ ID NO: 24)</b>
<b>MAb STM418 成熟重链 V 结构域核苷酸 (DNA) 序列</b>	<b>DIVLTQSPASLAVSLGQKATISCRASESVDDYG IGFMNWFQQKPGQPPKLLIYTTSNQGSGVPA RFSGSGSGTDFSLNIHPMVEDDTAMYFCQQS KEVPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 25)</b>

[0108] 下表4和5中提供了根据Chothia, AbM, Kabat和Contact CDR的STM418和STM432抗体的CDR序列。因此, 提供了与非糖基化的PD-1相比优先结合糖基化的PD-1的人源化形式的STM418和STM432, 其包含下文表4和5的CDR植入人框架区。

[0109] 表4. STM418的CDR序列

[0110]

	区域定义	CDRI	CDR2	CDR3
STM418 重链	Chothia	GFTFSSY (SEQ ID NO: 6)	SGGGGN (SEQ ID NO: 7)	YYYGIDY (SEQ ID NO: 8)
	AbM	GFTFSSYGMS (SEQ ID NO: 9)	TISGGGGNTY (SEQ ID NO: 10)	YYYGIDY (SEQ ID NO: 8)
	Kabat	SYGMS (SEQ ID NO: 11)	TISGGGGNTYYPDTV (SEQ ID NO: 12)	YYYGIDY (SEQ ID NO: 8)
	Contact	SSYGMS (SEQ ID NO: 13)	WVATISGGGGNTY (SEQ ID NO: 14)	TSYYYGID (SEQ ID NO: 15)
STM418 Kappa 轻链	Chothia	KASQDYSTAV A (SEQ ID NO: 16)	WASTRQT (SEQ ID NO: 17)	QQHYSIPW T (SEQ ID NO: 18)
	AbM	KASQDYSTAV A (SEQ ID NO: 16)	WASTRQT (SEQ ID NO: 17)	QQHYSIPW T (SEQ ID NO: 18)

[0111]

	Kabat	KASQDYSTAV A (SEQ ID NO: 16)	WASTRQT (SEQ ID NO: 17)	QQHYSIPW T (SEQ ID NO: 18)
	Contact	STAVAWY (SEQ ID NO: 19)	LLIYWASTRQ (SEQ ID NO: 20)	QQHYSIPW (SEQ ID NO: 21)

[0112] 表5.STM432的CDR序列

[0113]

	区域 定义	CDRI	CDR2	CDR3
STM4 32 重 链	Chothia	GFTFSSAY (SEQ ID NO: 26)	SGGGAN (SEQ ID NO: 27)	YGYDTVFA Y (SEQ ID NO: 28)
	AbM	GFTFSSAYGMS (SEQ ID NO: 29)	TISGGGANTY (SEQ ID NO: 30)	YGYDTVFA Y (SEQ ID NO: 28)
	Kabat	SYGMS (SEQ ID NO: 31)	TISGGGANTYYPDT VKG (SEQ ID NO: 32)	YGYDTVFA Y (SEQ ID NO: 28)
	Contact	SSYGMS (SEQ ID NO: 33)	WVATISGGGANTY (SEQ ID NO: 34)	ARYGYDTV FA (SEQ ID NO: 35)
STM4	Chothia	RASESVDDYGIG	TTSNQGS	QQSKEVP

[0114]

	区域 定义	CDRI	CDR2	CDR3
<b>32</b> <b>Kappa</b> <b>轻链</b>	<b>ia</b>	<b>FMN</b> <b>(SEQ ID NO:36)</b>	<b>(SEQ ID NO: 37)</b>	<b>WT</b> <b>(SEQ ID NO: 38)</b>
	<b>AbM</b>	<b>RASESVDDYGIG</b> <b>FMN</b> <b>(SEQ ID NO: 36)</b>	<b>TTSNQGS</b> <b>SEQ ID NO: 37)</b>	<b>QQSKEVP</b> <b>WT</b> <b>(SEQ ID NO: 38)</b>
	<b>Kabat</b>	<b>RASESVDDYGIG</b> <b>FMN</b> <b>(SEQ ID NO: 36)</b>	<b>TTSNQGS</b> <b>SEQ ID NO: 37)</b>	<b>QQSKEVP</b> <b>WT</b> <b>(SEQ ID NO: 38)</b>
	<b>Cont ct</b>	<b>DDYGIGFMNWF</b> <b>(SEQ ID NO: 39)</b>	<b>LLIYTTSNQG</b> <b>(SEQ ID NO: 40)</b>	<b>QQSKEVP</b> <b>W</b> <b>(SEQ ID NO: 41)</b>

[0115] 在一些实施方案中,本文提供的抗-glycPD-1抗体可以是IgG、IgM、IgA、IgD或IgE。抗-glycPD-1抗体也可以是嵌合抗体,亲和力成熟抗体,人源化抗体或人抗体。抗-glycPD-1抗体也可以是骆驼抗体,胞内抗体,抗独特型(抗Id)抗体。在一些实施方案中,抗-glycPD-1抗体可以是多克隆抗体或单克隆抗体。

[0116] 在一些实施方案中,本文提供的抗体是抗原结合片段,其相对于非糖基化的PD-1选择性结合糖基化的PD-1。抗原结合片段可以是Fd,Fv,Fab,F(ab'),F(ab)<sub>2</sub>,F(ab')<sub>2</sub>,F(ab)<sub>3</sub>,F(ab')<sub>3</sub>,单链Fv(scFv),双抗体,三抗体,四抗体,微抗体或单结构域抗体。scFv可以是单价scFv或二价scFv。

[0117] 通过已知的方法并如本文所述,可以产生对糖基化的PD-1具有特异性的多克隆或单克隆抗体,抗原结合片段和结合结构域和CDR(包括任何前述的工程化形式),一种或多种其各自的表位或任何前述的缀合物,无论这些抗原或表位是从天然来源分离还是天然化合物的合成衍生物或变体。

[0118] 抗体可以从任何动物来源产生,包括鸟类和哺乳动物。在一些实施方案中,抗体是绵羊,鼠(例如小鼠和大鼠),兔,山羊,豚鼠,骆驼,马或鸡。此外,较新的技术允许从人组合抗体文库开发和筛选人抗体。例如,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No.6,946,546中所述,该专利通过引用整体并入本文。这些技术在Marks等人,Bio/Technol.,10:779-783(1992);Stemmer,Nature,370:389-391(1994);Gram等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,89:3576-3580(1992);Barbas等人,

Proc.Natl.Acad.Sci.USA,91:3809-3813(1994);和Schier等人,Gene,169(2):147-155(1996)中进一步描述;其全部内容在此引入作为参考。

[0119] 用于在各种动物物种中产生多克隆抗体以及用于产生各种类型的单克隆抗体(包括人源化,嵌合和完全人)的方法是本领域熟知的。例如,以下美国专利提供了对这些方法的可行描述,并且在此引入作为参考:美国专利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,其全部内容在此引入作为参考。

[0120] 在一些实施方案中,抗-glycPD-1抗体可以是单克隆抗体。在一些实施方案中,抗-glycPD-1可以是多克隆抗体。可以用抗原(例如糖基化的PD-1多肽)接种动物,以产生对糖基化的PD-1多肽特异的抗体。通常,抗原与另一分子结合或缀合以增强免疫应答。缀合物可以是与抗原结合的任何肽,多肽,蛋白质或非蛋白质物质,其用于在动物中引发免疫应答。响应于抗原接种在动物中产生的抗体具有多种不同的分子(多克隆抗体),其由多种单独的抗体产生性B淋巴细胞制成。鉴于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识别动物已经免疫的抗原化合物上的集合表位。

[0121] 通过亲和纯化可以进一步增强这种特异性,以选择仅识别目标抗原或表位的那些抗体。产生单克隆抗体(MAb)的方法可以与制备多克隆抗体的方法相同。在一些实施方案中,啮齿动物如小鼠和大鼠用于产生单克隆抗体。在一些实施方案中,兔,绵羊或青蛙细胞用于产生单克隆抗体。大鼠的使用是众所周知的并且可以提供某些优点。常规使用小鼠(例如,BALB/c小鼠)并且通常给出高百分比的稳定融合。

[0122] 杂交瘤技术涉及将来自先前用糖基化的PD-1多肽免疫的小鼠的单个B淋巴细胞与永生化骨髓瘤细胞(通常是小鼠骨髓瘤)融合。该技术提供了将单个抗体产生细胞繁殖无限代的方法,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(单克隆抗体)。

[0123] 抗-glycPD-1抗体可以通过本领域已知的任何可用于产生多肽的方法产生,例如体外合成,重组DNA产生等。人源化抗体可以通过重组DNA技术产生。本文描述的抗体也可以使用重组免疫球蛋白表达技术产生。免疫球蛋白分子的重组产生,包括人源化抗体,描述于美国专利No.5,671,808中。美国专利No.4,816,397(Boss等人),美国专利No.4,816,397。美国专利6,331,415和4,816,567(均为Cabilly等人),英国专利GB 2,188,638(Winter等人)和英国专利GB2,209,757;其全部内容在此引入作为参考。用于重组表达免疫球蛋白(包括人源化免疫球蛋白)的技术也可以发现于Goeddel等人,Gene Expression Technology Methods in Enzymology Vol.185Academic Press(1991),和Borreback,Antibody Engineering,W.H.Freeman(1992);其全部内容在此引入作为参考。关于重组抗体的产生,设计和表达的其他信息可以在Mayforth,Designing Antibodies,Academic Press,San Diego(1993)中找到。

[0124] 已经开发了用人源的类似结构域取代单克隆抗体的轻链和重链恒定结构域的方法,其中使外源抗体的可变区保持完整。或者,在人免疫球蛋白基因转基因小鼠或大鼠中产生完全人单克隆抗体。还开发了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将单克隆抗体的可变结构域转化为更多人形式的方法。在人源化单克隆抗体中,只有高变CDR来自非人(例如小鼠,大鼠,鸡,美洲驼)单克隆抗体,并且框架区来源于人氨基酸序列。据认为,用在人抗体的相应位置中发现的氨基酸序列替换抗体中具有啮齿动物特征的氨基酸序列将降低治疗使用期间不良免疫反应的可能性。产生抗体的杂交瘤或其他细胞也可以经历遗传突变或其他变化,其可以改变或不改变由杂交瘤产生的抗体的结合特异性。

[0125] 可以通过使用单克隆和其他抗体和重组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特异性的其他抗体或嵌合分子,即该分子具有结合结构域。此类技术可涉及将编码免疫球蛋白可变区的DNA或抗体的CDR引入遗传物质中,用于不同抗体的构架区,恒定区或恒定区加框架区。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。

[0126] 在某些实施方案中,抗-glycPD-1抗体是人抗体。人抗体可以通过本领域已知的多种方法制备,包括使用衍生自人免疫球蛋白序列的抗体文库的上述噬菌体展示方法(参见美国专利号4,444,887和4,716,111;和国际公开号W0 98/46645,W098/50433,W0 98/24893,W0 98/16654,W0 96/34096,W0 96/33735和W0 91/10741)。可以使用不能表达功能性内源免疫球蛋白但可以表达人免疫球蛋白基因的转基因小鼠来产生人抗体。例如,人重链和轻链免疫球蛋白基因复合物可以随机或通过同源重组引入小鼠胚胎干细胞中。或者,除人重链和轻链基因外,还可将人可变区,恒定区和多样性区引入小鼠胚胎干细胞中。通过同源重组引入人免疫球蛋白基因座,可以使小鼠重链和轻链免疫球蛋白基因单独或同时失去功能。特别地,JH区域的纯合缺失阻止了内源性抗体的产生。将修饰的胚胎干细胞扩增并显微注射到胚泡中以产生嵌合小鼠。然后繁殖嵌合小鼠以产生表达人抗体的纯合子代。使用常规方法用选择的抗原免疫转基因小鼠,例如全部或部分糖基化的PD-1多肽。可以使用常规杂交瘤技术从免疫的转基因小鼠获得针对抗原的单克隆抗体(参见,例如,美国专利号5,916,771)。转基因小鼠携带的人免疫球蛋白转基因在B细胞分化期间重排,随后进行类别转换和体细胞突变。因此,使用这种技术,可以产生治疗上有用的IgG,IgA,IgM和IgE抗体。关于用于产生人抗体的该技术的概述,参见Lonberg和Huszar(1995,Int.Rev.Immunol.13:65-93,其通过引用整体并入本文)。关于用于产生人抗体和人单克隆抗体的该技术的详细讨论以及用于产生这种抗体的方案,参见例如国际公开号W0 98/24893,W0 96/34096和W0 96/33735;和美国专利美国专利5,413,923,5,625,126,5,633,425,5,569,825,5,661,016,5,545,806,5,814,318,和5,939,598,它们通过引用整体并入本文。此外,诸如Abgenix, Inc.(Freemont,CA)和Medarex(Princeton,N.J.)的公司可以参与使用与上述类似的技术提供针对所选抗原的人抗体。

[0127] 在一个实施方案中,抗体是嵌合抗体,例如,包含移植到异源非人、人或人源化序列(例如,框架和/或恒定结构域序列)的来自非人供体的抗原结合序列的抗体。在一个实施方案中,非人供体是大鼠。在一个实施方案中,抗原结合序列是合成的,例如通过诱变获得(例如,噬菌体展示筛选人噬菌体文库等)。在一个实施方案中,本文提供的嵌合抗体具有鼠V区和人C区。在一个实施方案中,鼠轻链V区与人κ轻链融合。在一个实施方案中,鼠重链V区

与人IgG1C区融合。

[0128] 产生嵌合抗体的方法是本领域已知的。参见,例如,Morrison,Science 229:1202 (1985); Oi等人,BioTechniques 4:214 (1986); Gillies等人,J.Immunol.Methods 125:191-202 (1989); 和美国专利号6,311,415,5,807,715,4,816,567,和4,816,397;所有这些通过引用整体并入本文。包含来自非人物种的一个或多个CDR和来自人免疫球蛋白分子的框架区的嵌合抗体可以使用本领域已知的多种技术产生,包括例如CDR-移植(EP 239,400;国际公开号W091/09967;和美国专利5,225,539、5,530,101和5,585,089),饰面或表面重修(EP 592,106;EP 519,596;Padlan,Molecular Immunology 28(4/5):489-498(1991); Studnicka等,Protein Engineering 7:805(1994);和Roguska等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:969(1994))和链改组(美国专利号5,565,332);所有这些都通过引用整体并入本文。

[0129] 用于产生重组嵌合抗-glyGDD-1抗体的示例性方法可包括以下:a)通过常规分子生物学方法构建编码和表达抗体重链的表达载体,其中CDR和将鼠抗-glycPD-1单克隆抗体的可变区与来自人免疫球蛋白的Fc区融合,从而产生用于表达嵌合抗体重链的载体;b)通过常规分子生物学方法构建编码和表达鼠抗-glycPD-1单克隆抗体的抗体轻链的表达载体,从而产生用于表达嵌合抗体轻链的载体;c)通过常规分子生物学方法将表达载体转移至宿主细胞,以产生用于表达嵌合抗体的转染宿主细胞;d)通过常规细胞培养技术培养转染的细胞,以产生嵌合抗体。

[0130] 用于产生重组人源化抗-glycPD-1抗体的示例性方法可包括以下:a)通过常规分子生物学方法构建编码和表达抗体重链的表达载体,其中CDR和保留供体抗体结合特异性所需的可变区框架的最小部分衍生自非人免疫球蛋白,例如鼠抗-glycPD-1单克隆抗体,并且抗体的其余部分衍生自人免疫球蛋白,从而产生用于表达人源化抗体重链的载体;b)通过常规分子生物学方法构建编码和表达抗体轻链的表达载体,其中保留供体抗体结合特异性所需的CDR和可变区框架的最小部分源自非人免疫球蛋白,例如鼠抗-glycPD-1单克隆抗体,抗体的其余部分衍生自人免疫球蛋白,从而产生用于表达人源化抗体轻链的载体;c)通过常规分子生物学方法将表达载体转移至宿主细胞,以产生用于表达人源化抗体的转染宿主细胞;d)通过常规细胞培养技术培养转染的细胞,以产生人源化抗体。

[0131] 关于任一示例性方法,宿主细胞可与这样的表达载体共转染,所述表达载体可含有不同的选择标记,但除重链和轻链编码序列外,优选相同。该方法提供重链和轻链多肽的相等表达。或者,可以使用单一载体,其编码重链和轻链多肽。重链和轻链的编码序列可包含cDNA或基因组DNA或两者。用于表达重组抗体的宿主细胞可以是细菌细胞如大肠杆菌,或更优选真核细胞(例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或HEK-293细胞)。表达载体的选择取决于宿主细胞的选择,并且可以选择以便在所选宿主细胞中具有所需的表达和调节特征。可以使用的其他细胞系包括但不限于CHO-K1,NS0和PER.C6(Crucell,Leiden,Netherlands)。此外,当选择宿主细胞以考虑物种特异性密码子使用偏倚和增强蛋白质表达时,可以优化密码子使用。例如,对于CHO细胞表达,编码抗体的DNA可以包含优先使用灰仓鼠(*Cricetulus griseus*)的密码子(来自中国仓鼠卵巢细胞的来源。密码子优化的方法可用于促进所需宿主细胞的表达改善(参见例如,Wohlgemuth等,Philos.Trans.R.Soc.Lond.B Biol.Sci.366(1580):2979-2986(2011);Jestin等,J.Mol.Evol.69(5):452-457(2009);Bollenbach等,

Genome Res.17 (4):401-404 (2007);Kurland等,Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Biol.31:191-219 (1984);Grosjean等,Gene 18 (3):199-209 (1982))。

[0132] 在一个实施方案中,抗体是衍生自骆驼科动物抗体的免疫球蛋白单可变结构域,优选来自缺乏轻链的重链骆驼科动物抗体,其被称为 $V_H$ 结构域序列或Nanobodies<sup>TM</sup>。纳米抗体(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( $V_H$ ),并且是本领域技术人员已知的。它们衍生自在骆驼科动物中看到的仅有重链的抗体(Hamers-Casterman等,Nature 363:446-448 (1993);Desmyter等,Nat.Struct.Biol,803-811 (1996))。在“骆驼科动物”家族中,发现缺乏轻链多肽链的免疫球蛋白。“骆驼科动物”包括旧世界骆驼科动物(Camelus bactrianus和Camelus dromedarius)和新世界骆驼科动物(例如,Lama paccos,Lama glama,Lama guanicoe和Lama vicugn)。单可变结构域重链抗体在本文中称为Nanobody<sup>TM</sup>或 $V_H$ 抗体。Nbs的小尺寸和独特的生物物理特性优于常规抗体片段,用于识别不常见或隐藏的表位以及结合到蛋白质靶标的空腔或活性位点。此外,Nbs可以设计为多特异性和多价抗体,附着于报告分子或人源化。Nbs是稳定的,在胃肠系统中存活并且可以容易地制造。

[0133] 将具有不同特异性的两个抗原结合位点统一到单个构建体中,双特异性抗体具有将两个具有精确特异性的离散抗原聚集在一起的能力,因此具有作为治疗剂的巨大潜力。双特异性抗体最初可以通过融合两个杂交瘤制备,每个杂交瘤能够产生不同的免疫球蛋白。双特异性抗体也可以通过连接两个scFv抗体片段同时省略完整免疫球蛋白中存在的Fc部分来产生。这种构建体中的每个scFv单元可以由来自每个重( $V_H$ )和轻( $V_L$ )抗体链的一个可变结构域组成,通过合成多肽接头彼此连接,后者通常经基因工程改造以便最低限度免疫原性,同时保持对蛋白水解的最大抗性。各个scFv单元可以通过许多技术连接,包括掺入桥接两个scFv单元的短(通常少于10个氨基酸)多肽间隔区,从而产生双特异性单链抗体。因此,所得双特异性单链抗体是在单一多肽链上含有两个不同特异性的 $V_H/V_L$ 对的物种,其中各个scFv单元中的 $V_H$ 和 $V_L$ 结构域被多肽接头分开足够长的时间以允许它们之间的分子内缔合。两个结构域,并且其中由此形成的scFv单元通过保持足够短的多肽间隔物彼此连续地连接,以防止例如一个scFv单元的 $V_H$ 结构域和另一个scFv单元的 $V_L$ 之间的不希望的结合。

[0134] 抗原结合片段的实例包括但不限于:(i) Fab片段,由 $V_L$ 、 $V_H$ 、CL和CH1结构域组成;(ii) 由 $V_H$ 和CH1结构域组成的“Fd”片段;(iii) 由单一抗体的 $V_L$ 和 $V_H$ 结构域组成的“Fv”片段;(iv) “dAb”片段,其由 $V_H$ 结构域组成;(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 $V_L$ 结构域通过肽接头连接,所述肽接头允许两个结构域缔合以形成结合结构域;(viii) 双特异性单链Fv二聚体(美国专利号5,091,513);(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)。可以通过掺入连接 $V_H$ 和 $V_L$ 结构域的二硫键来稳定Fv,scFv或双抗体分子。还可以制备具有与CH3结构域连接的scFv的微抗体(Hu等,Cancer Res,56:3055-3061 (1996))。

[0135] 在实施方案中还考虑了抗体样结合肽模拟物。Liu等,Cell Mol.Biol,49:209-216 (2003)描述了“抗体样结合肽模拟物”(ABiPs),其是作为减少的抗体起作用的肽,并且具有较长血清半衰期的某些优点以及较不麻烦的合成方法。

[0136] 糖基化的PD-1多肽



[0137] 在又一个实施方案中,提供了包含多肽的组合物,所述多肽包含人PD-1的至少7个(例如,至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个)连续氨基酸的片段,其包含至少一个对应于人PD-1的N49、N58、N74或N116位的氨基酸,并且其中所述氨基酸的至少一个对应于人PD-1的位置N49、N58、N74或N116的氨基酸是糖基化的,其中多肽配制在药学上可接受的载体中。

[0138] 在一些实施方案中,本文提供的还是人PD-1的至少7个连续氨基酸的多肽,其具有对应于人PD-1的N49、N58、N74或N116位的至少一个氨基酸,其中至少一个对应于人PD-1的位置N49、N58、N74或N116的所述氨基酸是糖基化。在一些实施方案中,所述多肽具有人PD-1的至少7个连续氨基酸,其具有对应于糖基化的N49位的氨基酸。在一些实施方案中,所述多肽具有人PD-1的至少7个连续氨基酸,其具有对应于糖基化的N58位的氨基酸。在一些实施方案中,所述多肽具有人PD-1的至少7个连续氨基酸,其具有对应于糖基化的N74位的氨基酸。在一些实施方案中,所述多肽具有人PD-1的至少7个连续氨基酸,其具有对应于糖基化的N116位的氨基酸。

[0139] 例如,多肽可以是人PD-1的氨基酸44-50的片段,其中N49是糖基化的。又例如,多肽可以是人PD-1的氨基酸70-80的片段,其中N74是糖基化的。对于又一个实例,多肽可以是人PD-1的氨基酸50-80的片段,其中N58和N74是糖基化的。本领域普通技术人员将理解本文所考虑的多肽包括具有人PD-1的至少7个连续氨基酸的任何和所有多肽,包括对应于人PD-1的N49、N58、N74或N116位的至少一个氨基酸,其中对应于人PD-1的N49、N58、N74或N116位的至少一个所述氨基酸是糖基化的。

[0140] 在一些实施方案中,所述多肽具有人PD-1的至少8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个连续氨基酸。在一些实施方案中,所述多肽具有人PD-1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或270、280个连续氨基酸。在一些实施方案中,本文提供了具有至少两种本文提供的多肽的组合物。所述至少两种多肽可以是分开的分子或作为一个分子连接。在一些实施方案中,组合物具有至少三种多肽,至少四种多肽或至少五种多肽。在一些实施方案中,组合物具有两种多肽,三种多肽,四种多肽或五种多肽。

[0141] 在一些实施方案中,本文提供的多肽包括非天然氨基酸。在一些实施方案中,非天然氨基酸在 $\alpha$ -氨基基团被甲基化以产生具有甲基化主链的肽。在一些实施方案中,非天然氨基酸是D-氨基酸。在一些实施方案中,非天然氨基酸可包括染料(例如荧光染料)或亲和标签。在一些实施方案中,本文提供的多肽包括化学修饰。化学修饰包括例如用生物素,荧光染料进行化学修饰。技术人员将认识到,将非天然氨基酸引入多肽和化学修饰多肽的方法是本领域熟知的。

[0142] 在一些实施方案中,实施方案的多肽与免疫原性多肽(例如,匙孔血蓝蛋白,KLH)融合或缀合。在某些方面,多肽还在C-或N-末端包含Cys残基。例如,在某些方面,多肽通过Cys残基处的二硫键与免疫原性多肽缀合。

[0143] 在又一个实施方案中,本文提供了免疫原性组合物,其具有包含人PD-1的至少7个连续氨基酸的片段的多肽,其包含对应于人PD-1的N49、N58、N74或N116位的至少一个氨基酸,其中对应于人PD-1的N49、N58、N74或N116位的至少一个所述氨基酸是糖基化的,其中所

述多肽配制在药学上可接受的载体中。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。

[0144] 在一些实施方案中,提供了制备抗体的方法,其包括向动物施用多肽并从动物中分离抗体,其中所述多肽具有人PD-1的至少7个连续氨基酸的片段,其具有至少一个对应于人PD-1的N49、N58、N74或N116位的氨基酸,并且其中对应于人PD-1的位置N49、N58、N74和N116的至少一个所述氨基酸是糖基化的。动物可以是小鼠,大鼠,兔子或人。在某些方面,方法还包括鉴定抗体的CDR并使CDR周围的序列人源化以产生人源化抗体。在更进一步的方面,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,本文提供了相对于非糖基化的PD-1选择性结合实施方案的多肽的分离的抗体(例如,包含人PD-1的至少7个连续氨基酸的片段的多肽,其包含对应于人PD-1的N49、N58、N74或N116位置的至少一个氨基酸,其中对应于人PD-1的位置N49、N58、N74或N116的至少一个所述氨基酸是糖基化的)。

[0145] 本文提供的多肽可通过本领域已知的任何方法制备。例如,多肽可以通过化学合成或重组生产来制备。用于表达和纯化重组多肽的示例性方法可以发现于例如Scopes R.K., *Protein Purification-Principles and Practice*, Springer Advanced Texts in Chemistry, 3<sup>rd</sup> Edition (1994); Simpson R.J.等人, *Basic Methods in Protein Purification and Analysis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1<sup>st</sup> Edition (2008); Green M.R. and Sambrook J., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 4<sup>th</sup> Edition (2012); Jensen K.J.等人, *Peptide Synthesis and Applications (Methods in Molecular Biology)*, Humana Press, 2<sup>nd</sup> Edition (2013)。化学合成多肽可以通过使用本领域熟知的方法完成(参见Kelley and Winkler, 1990, In: *Genetic Engineering Principles and Methods*, Setlow J.K, ed., Plenum Press, N.Y., Vol. 12, pp 1-19; Stewart等人, 1984, J.M. Young, J.D., *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Co., Rockford, Ill; Marglin and Merrifield, *Ann. Rev. Biochem.*, 39: 841-866, at 862 (1970). Merrifield, R.B., 1963, *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149-2154; *Chemical Approaches to the Synthesis of Peptides and Proteins*, Williams等人, Eds., 1997, CRC Press, Boca Raton Fla.; *Solid Phase Peptide Synthesis: A Practical Approach*, Atherton & Sheppard, Eds., 1989, IRL Press, Oxford, England; see also USPNs. 4,105,603; 3,972,859; 3,842,067; and 3,862,925)。

#### [0146] 修饰和衍生物

[0147] 无论动物物种,单克隆细胞系或抗体的其他来源如何,糖基化的PD-1的抗体都能够中和或抵消糖基化的PD-1的作用。某些动物物种可能不太适合产生治疗性抗体,因为它们更可能由于通过抗体的Fc部分激活补体系统而引起过敏反应。然而,可以将完整抗体酶促消化成Fc(补体结合)片段,并成为具有结合结构域或CDR的抗体片段。去除Fc部分降低了抗体片段引发不希望的免疫应答的可能性,因此,没有Fc的抗体可用于预防性或治疗性治疗。如上所述,抗体也可以构建成嵌合的、部分或完全人的,以减少或消除由于给动物施用已在其他物种中产生或具有来自其序列的抗体而导致的不良免疫后果。

[0148] 通过筛选表现出所需特性的变体,可以进一步改善抗-glycPD-1抗体的结合特性。例如,可以使用本领域已知的各种噬菌体展示方法进行这种改进。在噬菌体展示方法中,功

能性抗体结构域展示在噬菌体颗粒的表面上,其携带编码它们的多核苷酸序列。在一个具体实施方案中,这种噬菌体可用于展示抗原结合片段,例如Fab和Fv或二硫键稳定的Fv,其表达自库或组合抗体文库(例如人或鼠)。可以用抗原选择或鉴定表达结合目标抗原的抗原结合片段的噬菌体,例如使用结合或捕获到固体表面或珠子的标记抗原或抗原。在这些方法中使用的噬菌体通常是丝状噬菌体,包括fd和M13。抗原结合片段表达为与噬菌体基因III或基因VIII蛋白重组融合的蛋白。可用于制备如本文所述的抗体或多肽的噬菌体展示方法的实例包括例如以下中公开的那些Brinkman等人,J Immunol Methods,182:41-50 (1995);Ames等人,J.Immunol.Methods,184:177-186 (1995);Kettleborough等人,Eur.J.Immunol.,24:952-958 (1994);Persic等人,Gene,187:9-18 (1997);Burton等人,Adv.Immunol.57:191-280 (1994);PCT Publications WO 92/001047;WO 90/02809;WO 91/10737;WO 92/01047;WO 92/18619;WO 93/11236;WO 95/15982;WO 95/20401;和美国专利号5,698,426;5,223,409;5,403,484;5,580,717;5,427,908;5,750,753;5,821,047;5,571,698;5,427,908;5,516,637;5,780,225;5,658,727;5,733,743和5,969,108;所有这些都通过引用整体并入本文。

[0149] 如上述参考文献中所述,在噬菌体选择后,可以分离来自噬菌体的抗体编码区并用于产生完整抗体,包括人源化抗体或任何其他所需片段,并在任何所需宿主中表达,包括哺乳动物细胞,昆虫细胞,植物细胞,酵母和细菌,例如,如下面详细描述。例如,也可以使用本领域已知的方法使用重组产生Fab、Fab' 和F(ab')<sub>2</sub>片段的技术,例如以下中公开的那些方法PCT公开WO 92/22324;Mullinax,R.L.等人,BioTechniques,12(6):864-869 (1992);和Sawai等人,Am.J.Reprod.Immunol.34:26-34 (1995);和Better,M.等人Science240:1041-1043 (1988);所有这些都通过引用整体并入本文。可用于产生单链Fv和抗体的技术的实例包括以下中所述的那些美国专利号4,946,778和5,258,498;Huston,J.S.等人,Methods in Enzymology203:46-88 (1991);Shu,L.等人,Proc.Natl.Acad.Sci. (USA) 90:7995-7999;和Skerra,A.等人,Science 240:1038-1040 (1988);所有这些都通过引用整体并入本文。

[0150] 噬菌体展示技术可用于增加如本文所述的抗-glycPD-1抗体的亲和力。该技术可用于获得可用于本文所述组合方法的高亲和力抗体。这种被称为亲和力成熟的技术采用诱变或CDR步移和使用此类受体或配体(或其细胞外结构域)或其抗原片段进行重新选择,以鉴定与初始抗体或亲本抗体相比与对抗原具有更高亲和力的抗体(参见,例如,Glaser,SM等,J.Immunol.149:3903-3913 (1992))。诱变整个密码子而不是单个核苷酸导致半随机化的氨基酸突变库。可构建由一组变体克隆组成的文库,每个变体克隆在单个CDR中通过单个氨基酸改变而不同,并且其含有代表每个CDR残基的每个可能的氨基酸取代的变体。可以通过使固定的突变体与标记的抗原接触来筛选对抗原具有增加的结合亲和力的突变体。本领域已知的任何筛选方法可用于鉴定对抗原具有增加的亲和力的突变体抗体(例如,ELISA)(参见,例如,Wu,H.等,Proc.Natl.Acad.Sci. (USA) 95(11):6037-6042 (1998);Yelton,DE等,J.Immunol.155:1994-2004 (1995))。也可以使用随机化轻链的CDR步移(参见Schier等,J.Mol.Biol.263:551-567 (1996))。

[0151] 随机诱变可与噬菌体展示方法一起使用以鉴定改善的CDR和/或可变区。或者,噬菌体展示技术可用于通过定向诱变(例如,亲和力成熟或“CDR行走”)来增加(或降低)CDR亲

和力。该技术使用靶抗原或其抗原片段来鉴定与初始或亲本抗体相比具有与抗原更高(或更低)亲和力结合的CDR的抗体(参见,例如,Glaser,SM等,J.Immunol.149:3903-3913(1992))。

[0152] 实现这种亲和力成熟的方法描述于例如:Krause,J.C.等人,MBio.2(1)pii:e00345-10.doi:10.1128/mBio.00345-10(2011);Kuan,C.T.等人,Int.J.Cancer 10.1002/ijc.25645;Hackel,B.J.等人,J.Mol.Biol.401(1):84-96(2010);Montgomery,D.L.等人,MAbs1(5):462-474(2009);Gustchina,E.等人,Virology 393(1):112-119(2009);Finlay,W.J.等人,J.Mol.Biol.388(3):541-558(2009);Bostrom,J.等人,Methods Mol.Biol.525:353-376(2009);Steidl,S.等人,Mol.Immunol.46(1):135-144(2008);和Barderas,R.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.(USA)105(26):9029-9034(2008);所有这些都通过引用整体并入本文。

[0153] 本文还提供了抗-glycPD-1抗体或糖基化的PD-1多肽的衍生物,其相对于“亲本”(或野生型)分子具有一个,两个,三个,四个,五个或更多个氨基酸取代、添加、缺失或修饰。这种氨基酸取代或添加可以引入天然存在的(即DNA编码的)或非天然存在的氨基酸残基。这些氨基酸可以被糖基化的(例如、具有改变的甘露糖,2-N-乙酰葡萄糖胺,半乳糖,岩藻糖,葡萄糖,唾液酸,5-N-乙酰神经氨酸,5-乙醇神经氨酸等含量),乙酰化,聚乙二醇化,磷酸化,酰胺化,通过已知的保护/封闭基团衍生化,蛋白水解切割,与细胞配体或其他蛋白质连接等。在一些实施方案中,改变的碳水化合物修饰调节以下一种或多种:抗体的溶解,促进亚细胞转运和抗体的分泌,抗体装配的促进,构象完整性和抗体介导的效应子功能。在一些实施方案中,相对于缺乏碳水化合物修饰的抗体,改变的碳水化合物修饰增强抗体介导的效应子功能。导致抗体介导的效应子功能改变的碳水化合物修饰是本领域熟知的(例如,参见Shields,R.L.等人,J.Biol.Chem.277(30):26733-26740(2002);Davies J.等人Biotechnology&Bioengineering74(4):288-294(2001);所有这些文献都通过引用整体并入本文。改变碳水化合物含量的方法是本领域技术人员已知的,参见例如Wallick,S.C.等人,J.Exp.Med.168(3):1099-1109(1988);Tao,M.H.等人,J.Immunol.143(8):2595-2601(1989);Routledge,E.G.等人,Transplantation 60(8):847-53(1995);Elliott,S.等人,Nature Biotechnol.21:414-21(2003);Shields,R.L.等人,J.Biol.Chem.277(30):26733-26740(2002);所有这些都通过引用整体并入本文。

[0154] 取代变体可以包含在本文提供的抗体或多肽内的一个或多个位点处一种氨基酸与另一种氨基酸的交换,并且可以设计为调节抗体或多肽的一种或多种性质,有或没有其他功能或属性的损失。取代可以是保守的,即,一个氨基酸被相似的形状和电荷之一取代。保守取代是本领域熟知的,包括例如丙氨酸变为丝氨酸;精氨酸到赖氨酸;天冬酰胺对谷氨酰胺或组氨酸;天冬氨酸到谷氨酸;半胱氨酸至丝氨酸;谷氨酰胺与天冬酰胺;谷氨酸与天冬氨酸;甘氨酸到脯氨酸;组氨酸与天冬酰胺或谷氨酰胺;异亮氨酸与亮氨酸或缬氨酸;亮氨酸到缬氨酸或异亮氨酸;赖氨酸与精氨酸;蛋氨酸为亮氨酸或异亮氨酸;苯丙氨酸为酪氨酸,亮氨酸或蛋氨酸;丝氨酸与苏氨酸;苏氨酸与丝氨酸;色氨酸转化为酪氨酸;酪氨酸与色氨酸或苯丙氨酸;和缬氨酸到异亮氨酸或亮氨酸。或者,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用化学上不相似的残基取代残基,例如用于非极性或不带电荷的氨基酸的极性或带电氨基酸,反之亦然。

[0155] 在一些实施方案中,人源化抗体是衍生抗体。这种人源化抗体包括一个或多个非人CDR中的氨基酸残基取代,缺失或添加。与非衍生的人源化抗体相比,人源化抗体衍生物可具有基本相同的结合,更好的结合或更差的结合。在一些实施方案中,CDR的一个,两个,三个,四个或五个氨基酸残基已经突变,例如被取代,缺失或添加。

[0156] 在一些实施方案中,多肽是衍生多肽。与野生型人PD-1相比,这种多肽包括氨基酸残基取代,缺失或添加。与非衍生多肽相比,衍生多肽可以与抗-glycPD-1抗体具有基本相同的结合,更好的结合或更差的结合。在一些实施方案中,人PD-1的一个,两个,三个,四个或五个氨基酸残基已经突变,例如被取代,缺失或添加。

[0157] 可以使用本领域技术人员已知的技术通过化学修饰来修饰如本文所述的抗体或多肽,包括但不限于特定的化学切割,乙酰化,制剂,衣霉素的代谢合成等。在一个实施方案中,衍生多肽或衍生抗体具有与亲本多肽或抗体相似或相同的功能。在另一个实施方案中,衍生多肽或衍生抗体相对于亲本多肽或亲本抗体表现出改变的活性。例如,衍生抗体(或其片段)可以比亲本抗体更紧密地结合其表位或对蛋白水解更具抗性。

[0158] 衍生化抗体中的取代,添加或缺失可以在抗体的Fc区中,并且因此可以用于修饰抗体与一种或多种Fc $\gamma$ R的结合亲和力。用于修饰与一种或多种Fc $\gamma$ R的修饰结合的抗体的方法是本领域已知的,参见例如PCT公开号WO 04/029207,WO 04/029092,WO 04/028564,WO99/58572,WO 99/51642,WO 98/23289,WO 89/07142,WO 88/07089,和美国专利5,843,597和5,642,821;所有这些都通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,抗体或其他分子可具有对活化Fc $\gamma$ R(例如Fc $\gamma$ RIIIA)的改变的亲和力。优选地,此类修饰还具有改变的Fc介导的效应子功能。影响Fc介导的效应子功能的修饰是本领域熟知的(参见美国专利号6,194,551和WO 00/42072)。在一些实施方案中,Fc区的修饰导致抗体具有改变的抗体介导的效应功能,与其他Fc受体(例如,Fc活化受体)的改变的结合,改变的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)活性,改变的C1q结合活性,改变的补体依赖性细胞毒活性(CDC),吞噬活性或其任何组合。

[0159] 衍生抗体或多肽还可以在哺乳动物,优选人中具有改变的亲本分子或抗体的半衰期(例如,血清半衰期)。在一些实施方案中,这种改变导致半衰期大于15天,优选大于20天,大于25天,大于30天,大于35天,大于40天,大于45天,更大超过2个月,超过3个月,超过4个月,或超过5个月。人源化抗体或多肽在哺乳动物(优选人)中的半衰期延长导致哺乳动物中所述抗体或多肽的血清滴度更高,因此降低了所述抗体或多肽的施用频率和/或降低所述抗体或多肽的浓度。具有增加的体内半衰期的抗体或多肽可以通过本领域技术人员已知的技术产生。例如,通过修饰(例如,取代,缺失或添加)鉴定为参与Fc结构域和FcRn受体之间的相互作用的氨基酸残基,可以产生具有增加的体内半衰期的抗体或多肽。可以改造如本文所述的人源化抗体以增加生物半衰期(参见例如美国专利号6,277,375)。例如,如本文所述的人源化抗体可以在Fc-铰链结构域中工程化以具有增加的体内或血清半衰期。

[0160] 通过附着于所述抗体或多肽聚合物分子如高分子量聚乙二醇(PEG),可以产生具有增加的体内半衰期的如本文所述的抗体或多肽。PEG可以通过PEG与所述分子或抗体的N-或C-末端的位点特异性缀合或通过赖氨酸残基上存在的 $\epsilon$ -氨基连接到具有或不具有多功能接头的抗体或多肽。可以使用导致最小生物活性损失的线性或支化聚合物衍生化。可以通过SDS-PAGE和质谱法密切监测缀合程度,以确保PEG分子与抗体的正确缀合。可通过例如

大小排阻或离子交换色谱法将未反应的PEG与抗体-PEG缀合物分离。

[0161] 如本文所述的抗体或多肽还可以通过Davis等人描述的方法和偶联剂进行修饰。(参见美国专利No.4,179,337),以提供可以注射到哺乳动物循环系统中而基本上没有免疫原性反应的组合物。去除Fc部分可以降低抗体片段引发不希望的免疫应答的可能性,因此,没有Fc的抗体可以用于预防性或治疗性治疗。如上所述,抗体也可以构建成嵌合的,部分或完全的人,以减少或消除由于给动物施用已在其他种类中产生或具有其序列的抗体而导致的不良免疫后果。

#### [0162] 融合和缀合

[0163] 本文提供的抗-glycPD-1抗体或糖基化的PD-1多肽还可以表达为与其他蛋白质的融合蛋白质或与另一部分化学缀合的表达。

[0164] 在一些实施方案中,本文提供了具有Fc部分的抗体或多肽,其中Fc部分可以通过同种型或亚类改变,可以是嵌合的或杂合的,和/或可以被修饰,例如以改善效应子功能,控制半衰期,组织可及性,增强稳定性等生物物理特性,提高生产效率(成本更低)。用于构建公开的融合蛋白的许多修饰及其制备方法是本领域已知的,参见例如Mueller,J.P.等人,Mol.Immun.34(6):441-452(1997),Swann,P.G.,Curr.Opin.Immun.20:493-499(2008),和Presta,L.G.,Curr.Opin.Immun.20:460-470(2008)。在一些实施方案中,Fc区是天然IgG1,IgG2或IgG4Fc区。在一些实施方案中,Fc区是杂合体,例如具有IgG2/IgG4Fc恒定区的嵌合体。对Fc区的修饰包括但不限于经修饰以防止与Fc $\gamma$ 受体和补体结合的IgG4,经修饰以改善与一种或多种Fc $\gamma$ 受体结合的IgG1,经修饰以最小化效应子功能的IgG1(氨基酸变化)、具有改变的/无聚糖的IgG1(通常通过改变表达宿主)和具有改变的pH依赖性与FcRn结合的IgG1。Fc区可包括整个铰链区,或小于整个铰链区。

[0165] 另一个实施方案包括IgG2-4杂合体和IgG4突变体,其具有降低与FcR的结合,这增加了它们的半衰期。代表性的IG2-4杂合体和IgG4突变体描述于Angal等人,Molec.Immunol.30(1):105-108(1993);Mueller等人,Mol.Immun.34(6):441-452(1997);和美国专利第6,982,323号;所有这些都通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,IgG1和/或IgG2结构域缺失,例如Angal等描述了用脯氨酸取代丝氨酸241的IgG1和IgG2。

[0166] 在一些实施方案中,本文提供了具有至少10,至少20,至少30,至少40,至少50,至少60,至少70,至少80,至少90或至少100个氨基酸的融合蛋白或多肽。

[0167] 在一些实施方案中,本文提供抗-glycPD-1抗体或糖基化的PD-1多肽,其与至少一个部分连接或共价结合或形成复合物。这种部分可以是但不限于增加分子作为诊断剂或治疗剂的功效的部分。在一些实施方案中,该部分可以是图像试剂,毒素,治疗性酶,抗生素,放射性标记的核苷酸等。

[0168] 在一些实施方案中,该部分可以是酶,激素,细胞表面受体,毒素(例如相思豆毒素,蓖麻毒素A,假单胞菌外毒素(即PE-40),白喉毒素,蓖麻毒蛋白,gelolin或商陆抗病毒蛋白),蛋白质(如肿瘤坏死因子,干扰素(如 $\alpha$ -干扰素, $\beta$ -干扰素),神经生长因子,血小板衍生长因子,组织纤溶酶原激活物或凋亡因子(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(如,生长激素("GH"))),细胞毒素

(例如,细胞生长抑制剂或杀细胞剂,如紫杉醇,细胞松弛素B,短杆菌肽D,溴化乙锭,emetine,mitomycin,依托泊苷,tenoposide,长春新碱,长春碱,秋水仙碱,多柔比星,柔红霉素,二羟基蒽二酮,米托蒽醌,光霉素,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,心得安,单甲基奥瑞他汀F (MMAF),单甲基奥瑞他汀E (MMAE;例如,vedotin)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-硫鸟嘌呤,阿糖胞苷,5-氟尿嘧啶,十噻),烷化剂(例如,melphalan,mechlorethamine,thioepa chlorambucil,melphalan,**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和顺二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂),蒽环霉素(如柔红霉素(以前称道诺霉素)和多柔比星),抗生素(如,放线菌素(原放线菌素),博来霉素,光霉素和安定霉素(AMC)),或抗有丝分裂剂(如长春新碱和长春碱)。

[0169] 将这些治疗性部分与抗体缀合的技术是众所周知的;参见,例如,Amon等人,“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”,in MONOCLONAL ANTIBODIES AND CANCER THERAPY,Reisfeld等人(eds.),1985,pp.243-56,Alan R.Liss,Inc.);Hellstrom等人,“Antibodies For Drug Delivery”,in CONTROLLED DRUG DELIVERY (2nd Ed.),Robinson等人(eds.),1987,pp.623-53,Marcel Dekker,Inc.);Thorpe,“Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review”,in 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”,in 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,Bioconj Chem.21(1):5-13(2010);Senter,Curr.Opin.Chem.Biol.13(3):235-244(2009);和Teicher,Curr Cancer Drug Targets.9(8):982-1004(2009).auristatin E (MMAE),例如vedotin;或其组合。

[0170] 在优选的实施方案中,抗体与美登素缀合,是首先从埃塞俄比亚灌木马蹄莲(Maytenus ovatus)的树皮中分离的苯并山卡马胂。该细胞毒性剂及其衍生物(例如美登木素生物碱)与长春花生物碱结合位点附近的微管蛋白结合。它们被认为对位于微管末端的微管蛋白具有高亲和力,对分布在整个微管中的位点具有较低的亲和力。抑制微管动力学导致细胞停滞在细胞周期的G2/M期,最终导致细胞凋亡导致细胞死亡。(Oroudjev等,Mol.Cancer Ther,10L2700-2713(2010))。两种美登素衍生物(含巯基的美登木素生物碱)包括DM1和DM4(ImmunoGen,Inc.,Waltham,MA)已广泛用于与不可逆和可逆接头组合。特别地,与具有硫醚连接基的抗体连接的DM1称为“emtansine”;附着于具有SPP接头的抗体的DM1称为“mertansine”。附着有SPDB接头的DM4称为“ravtansine”;附着有sSPDB接头的DM4称为“soravtansine”。(ImmunoGen,Inc.,Waltham,MA)。在一个实施方案中,抗-glycPD-1抗体-ADC包含微管蛋白作用的美登木素生物碱有效负载DM1。在一个实施方案中,抗-glycPD-1抗体-ADC包含微管蛋白作用的美登木素生物碱有效负载DM4。在一个实施方案中,抗-

glycPD-1抗体-ADC包含DNA作用有效负载,例如DGN462 (ImmunoGen, Inc., Waltham, MA)。在一个实施方案中,抗-glycPD-1抗体-ADC的抗-glycPD-1抗体组分是STM418的嵌合或人源化形式,或其结合部分。在一个实施方案中,抗-glycPD-1抗体-ADC的抗-glycPD-1抗体组分是STM432的嵌合或人源化形式,或其结合部分。

[0171] 在一个具体实施方案中,与抗-glycPD-1抗体缀合的细胞毒性剂是MMAE (单甲基auristatin E (或去甲基-auristatin E)), 一种高毒性抗肿瘤剂,其抗有丝分裂活性涉及通过阻断抑制细胞分裂。微管蛋白的聚合。Vedotin是一种国际非专利名称,是指MMAE加上其与MMAE-抗体偶联物中抗体的连接结构。在更具体的实施方案中,ADC是STM418 (嵌合或人源化形式)-MMAE或STM432 (嵌合或人源化形式)-MMAE。

[0172] 已知许多化学接头用于将细胞毒性或DNA作用药物有效负载与抗体缀合以产生ADC。某些接头单独或组合用于产生包含抗-glycPD-1抗体的ADC,特别是在如本文所述结合其靶标后内化的那些接头包括SMCC (4- (N-马来酰亚胺基甲基) 环己烷羧酸N-羟基琥珀酰亚胺酯); SPDB (N-琥珀酰亚胺基3- (2-吡啶基二硫代) 丁酸酯); SPP (N-琥珀酰亚胺基4- (2-吡啶基二硫代) 戊酸酯); sulfo-SPDB或sSPDB (N-琥珀酰亚胺基-4- (2-吡啶基二硫代) -2-磺酸丁酯); 硫醚连接基琥珀酰亚胺基-4- (N-马来酰亚胺基) 环己烷-1-羧酸酯 (MCC); 和vc (缬氨酸-瓜氨酸二肽接头)。举例来说,工程接头 (例如, SMCC, SPDB, S-SPDB), (Immunogen, Inc.) 已被设计成在ADC与肿瘤结合之前是稳定的,然后在ADC一旦优化有效载荷效力内化在癌细胞内。其他接头,例如二肽vc接头,其是组织蛋白酶可切割接头,可用于将抗体与细胞毒性剂缀合,例如auristatin,其是源自多拉司他汀10的有丝分裂抑制剂,例如单甲基尿嘧啶E (MMAE)。), 例如, vedotin。细胞毒素可以与抗体缀合,使得一个以上的毒素分子与每个抗体分子连接,例如,每个抗体平均可以有2、3、4、5、6、7或8个毒素分子。

[0173] 在一个具体实施方案中,MMAE通过马来酰亚胺己酰基 (MC) 连接基团与抗体半胱氨酸间接连接,其与缬氨酸-瓜氨酸-对氨基苄氧基羰基-MMAE (MC-vc-PAB-MMAE) 偶联。在“MC-vc-PAB-MMAE”线性结构中,“MC”由马来酰亚胺和己酸组成,并且是通常通过H链上的半胱氨酸基团连接抗体的部分。反过来,“MC”连接到“vc”接头,其由缬氨酸 (Val) 和瓜氨酸 (Cit) 组成,并且是组织蛋白酶可切割的接头,其被肿瘤或癌细胞内的组织蛋白酶切割。“vc”连接于间隔区“PAB”,即与氨基脲细胞毒素连接的对氨基苯甲酸。MC-vc-PAB-MMAE ADC在被蛋白酶例如组织蛋白酶B切割时释放游离的膜渗透性MMAE。在一个实施方案中,抗体的接头在细胞外液中是稳定的,但是一旦ADC进入,就被组织蛋白酶切割。肿瘤或癌细胞,从而激活MMAE或其他毒素药物的抗有丝分裂机制。在另一个实施方案中,单甲基尿嘧啶F (MMAF) 通过马来酰亚胺己酰基 (MC-MMAF) 与抗体半胱氨酸连接。与MC-vc-PAB-MMAE ADC相比,MC-MMAF ADC是不可切割的,如MCC-DM1ADC,必须在细胞内内化和降解,释放半胱氨酸-MC-MMAF作为细胞内的活性药物。

[0174] 在一个实施方案中,在将ADC内化到细胞中后,细胞毒性有效负载在溶酶体中释放。在溶酶体中,溶酶体酶消化ADC的抗体组分。在溶酶体降解后,药物 (和药物-接头) 有效负载被释放到细胞质中,其中药物结合细胞内靶标,最终导致细胞死亡。最佳地,释放的有效负载是完全活动的,链接器仍然连接。在与ADC结合的靶标导致溶酶体运输不良的其他实施方案中,在靶细胞外稳定但在细胞内部从抗体组分切割有效负载的接头提供了内部有效负载释放的替代模式。细胞,但在溶酶体外面。在其他实施方案中,接头在细胞外液中是稳



定的,但是一旦ADC进入肿瘤或癌细胞就被组织蛋白酶切割,从而激活毒素药物的抗有丝分裂或其他细胞毒性机制。在其他实施方案中,通过可切割接头的作用释放的有效负载能够进入邻近的癌细胞并通过旁观者效应杀死它们,从而增强ADC的靶向和肿瘤杀伤活性。

[0175] 在一些实施方案中,如本文所述的抗体和多肽可以与标记物(例如肽)缀合,以促进纯化。在一些实施方案中,标记是六组氨酸肽(SEQ ID NO:42),血凝素“HA”标签,其对应于源自流感血凝素蛋白的表位(Wilson, IA等, Cell, 37:767-778 (1984))或“flag”标签(Knappik, A.等, Biotechniques 17(4):754-761 (1994))。

[0176] 在一些实施方案中,该部分可以是可以在测定中检测的图像试剂。这种图像试剂可以是酶,辅助基团,放射性标记,非放射性顺磁性金属离子,半抗原,荧光标记,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,有色颗粒或配体,例如生物素。

[0177] 在一些实施方案中,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;假体组复合物包括但不限于链霉抗生物素蛋白/生物素和抗生物素蛋白/生物素;荧光材料包括但不限于伞形酮,荧光素,异硫氰酸荧光素,罗丹明,二氯三嗪基胺荧光素,丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料,例如但不限于鲁米诺;生物发光材料包括但不限于荧光素酶,荧光素和水母发光蛋白;放射性物质包括但不限于铋( $^{213}\text{Bi}$ ),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( $^{131}\text{I}$ ,  $^{125}\text{I}$ ,  $^{123}\text{I}$ ,  $^{121}\text{I}$ ),镱( $^{140}\text{La}$ ),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( $^{105}\text{Rh}$ ),ruthenium( $^{97}\text{Ru}$ ),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( $^{133}\text{Xe}$ ),铈( $^{169}\text{Yb}$ ,  $^{175}\text{Yb}$ ),钇( $^{90}\text{Y}$ ),锌( $^{65}\text{Zn}$ );正电子发射金属使用各种正电子发射断层扫描和非放射性顺磁金属离子。

[0178] 可以使用本领域已知的技术将图像试剂直接或间接地通过中间体(例如,本领域已知的接头)与本文提供的抗体或多肽缀合。参见,例如,美国专利No. 金属离子的美国专利号4,741,900,其可以与本文所述的抗体和其他分子缀合,用作诊断剂。一些缀合方法涉及使用金属螯合物,例如使用有机螯合剂如二亚乙基三胺五乙酸酐(DTPA);乙烯三胺四乙酸;N-氯-对甲苯磺酰胺;和/或与抗体连接的四氯-3,6 $\alpha$ -二苯基甘氨酸-3。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。可以在这些偶联剂的存在下或通过与异硫氰酸酯反应制备具有荧光素标记物的缀合物。

[0179] 在一些实施方案中,如Segal在美国专利No. 4,676,980中所述,可以将如本文所述的抗体或多肽与第二抗体缀合以形成抗体杂合物。此类异源偶联抗体可另外结合半抗原(例如,荧光素)或细胞标记物(例如,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(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)。

[0180] 在一些实施方案中,本文所述的抗-glycPD-1抗体或糖基化的PD-1多肽也可以附着于固体支持物,其可用于免疫测定或纯化靶抗原或其他能够分子的分子。通过与本文所述的抗体或抗原结合片段结合,与已固定在支持物上的靶抗原结合。这种固体载体包括但不限于玻璃,纤维素,聚丙烯酰胺,尼龙,聚苯乙烯,聚氯乙烯或聚丙烯。

### [0181] 蛋白质纯化

[0182] 蛋白质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将细胞，组织或器官均质化和粗分级成多肽和非多肽级分。除非另有说明，否则可以使用色谱和电泳技术进一步纯化目的蛋白质或多肽以实现部分或完全纯化(或纯化至同质性)。特别适用于制备纯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，认为可以改变进行各种纯化步骤的顺序，或者可以省略某些步骤，并且仍然产生用于制备基本上纯化的多肽的合适方法。

[0183] 纯化的多肽意指可与其他组分分离的组合物，其中多肽相对于其天然可获得的状态被纯化至任何程度。因此，分离的或纯化的多肽也指不含天然存在的环境的多肽。通常，“纯化的”是指已经过分级分离以除去各种其他组分的多肽组合物，并且该组合物基本上保留其表达的生物活性。当使用术语“基本上纯化的”时，该名称是指多肽形成组合物的主要组分的组合物，例如构成组合物中约50%，约60%，约70%，约80%，约90%，约95%或更多的蛋白质。

[0184] 根据本公开内容，用于量化多肽纯化程度的各种方法是本领域技术人员已知的。这些包括，例如，确定活性级分的比活性，或通过SDS/PAGE分析评估级分内多肽的量。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“倍数纯化数”评估。当然，用于表示活性量的实际单位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。

[0185] 一般不要求多肽总是以其最纯化的状态提供。实际上，预期较少基本上纯化的产物可在某些实施方案中具有效用。部分纯化可以通过组合使用较少的纯化步骤，或通过使用不同形式的相同的一般纯化方案来完成。例如，应当理解，利用HPLC装置进行的阳离子交换柱层析通常比使用低压色谱系统的相同技术产生更大的“倍数”纯化。表现出较低程度的相对纯化的方法可能在蛋白质产物的总回收率或维持表达蛋白质的活性方面具有优势。

[0186] 亲和色谱法是一种色谱方法，其依赖于待分离物质与其可特异性结合的分子之间的特异性亲和力。这是受体-配体类型的相互作用。通过将一个结合配偶体共价偶联到不溶性基质上来合成柱材料。然后柱材料能够特异性地从溶液中吸附物质。通过将条件改变为不发生结合的条件(例如，改变的pH，离子强度，温度等)来进行洗脱。基质应该是一种物质，它不会在很大程度上吸附分子，并且具有广泛的化学，物理和热稳定性。配体应以不影响其结合特性的方式偶联。配体还应提供相对紧密的结合。应该可以在不破坏样品或配体的情况下洗脱物质。

[0187] 尺寸排阻色谱(SEC)是一种色谱方法，其中溶液中的分子基于它们的尺寸或更技术术语的流体动力学体积而分离。它通常应用于大分子或大分子复合物，如蛋白质和工业聚合物。通常，当使用水溶液将样品输送通过柱时，该技术称为凝胶过滤色谱，而不是名称凝胶渗透色谱，其在有机溶剂用作流动相时使用。SEC的基本原理是不同大小的颗粒将以不同的速率通过固定相洗脱(过滤)。这导致基于尺寸分离颗粒溶液。如果所有颗粒同时或几乎同时加载，则相同尺寸的颗粒应一起洗脱。

[0188] 高效液相色谱(或高压液相色谱，HPLC)是在生物化学和分析化学中经常用于分

离,鉴定和定量化合物的柱色谱形式。HPLC使用保持色谱填料(固定相)的色谱柱,将流动相移动通过色谱柱的泵,以及显示分子保留时间的检测器。保留时间取决于固定相,被分析的分子和所用溶剂之间的相互作用。

[0189] 本文还提供了用于评估PD-1糖基化的,N-连接糖基化的或N-糖基化的方法,包括使含PD-1的样品与实施方案的抗体接触(例如,抗体选择性结合糖基化的PD-1相对于非糖基化的PD-1)。在一些方面,该方法是体外方法。在某些方面,样品是细胞样品。

#### [0190] 核酸

[0191] 本公开还涵盖编码如本文所述的任何抗-glycPD-1抗体或糖基化的PD-1多肽的核酸分子(DNA或RNA)。本文还提供了能够传递或复制这种核酸分子的载体分子(例如质粒)。核酸可以是单链,双链的,并且可以包含单链和双链部分。

#### [0192] 药物制剂

[0193] 当进行含有抗体的药物组合物的临床应用时,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,药物组合物可以具有有效量的如本文所述的抗-glycPD-1抗体或糖基化的PD-1多肽,或者具有溶解或分散在药学上可接受的载体中的其他试剂。

[0194] 本文还提供了具有如本文所述的抗-glycPD-1抗体或糖基化的PD-1多肽的组合物。在一些实施方案中,组合物可具有至少0.1重量%的抗体或多肽。在一些实施方案中,组合物可具有抗-glycPD-1抗体或糖基化的PD-1多肽重量的至少0.5%,1%,2%,3%,4%,5%,6%,7%,8%,9%,10%,15%,20%,25%,30%,35%,40%,45%,50%,55%,60%,65%,70%,75%,80%,85%,90%或更多。在其他实施方案中,例如,抗-glycPD-1或糖基化的PD-1多肽可构成组合物重量的约2%至约75%,约25%至约60%,约30%至约50%,或其中的任何范围。每种治疗上有用的组合物中活性化合物的量可以这样的方式制备,即在任意给定单位剂量的化合物中获得合适的剂量。制备此类药物制剂的领域的技术人员将考虑诸如溶解度,生物利用度,生物半衰期,施用途径,产品保质期以及其他药理学考虑因素等因素,并且因此,各种各样的剂量和治疗方案可能是理想的。

[0195] 组合物可以是具有抗-glycPD-1抗体或糖基化的PD-1多肽作为活性成分的药物组合物以及药学上可接受的载体。药物组合物可进一步包括一种或多种另外的活性成分。药学上可接受的载体可以由联邦或州政府的管理机构批准的载体,或在美国药典,欧洲药典或其他公认的药典中列出的用于动物,更特别是人类的载体。

[0196] 如本文所用,除非另有说明,术语“载体”是指与治疗剂一起施用的稀释剂,佐剂(例如弗氏佐剂(完全或不完全)),赋形剂,稳定剂或载体。“药学上可接受的载体”是在所用剂量和浓度下对暴露于其中的细胞或哺乳动物无毒的载体,其可以是无菌液体,例如水和油,包括石油,动物,植物或合成来源的那些。例如花生油,大豆油,矿物油,芝麻油等。当适当地施用于动物(例如人)时,药学上可接受的分子实体或组合物不产生不利的,过敏的或其他不良反应。根据本公开内容、具有抗体或另外的活性成分的药物组合物的制备是本领域技术人员已知的,例如Remington's Pharmaceutical Sciences,18th Ed,1990,通过引用并入本文。此外,对于动物(例如人)施用,应理解制剂应满足FDA生物标准办公室所要求的无菌,致热原性,一般安全性和纯度标准。

[0197] 预期组合物包含每毫升约0.001mg和约10mg的总抗体或多肽。因此,组合物中抗体或多肽的浓度可为约,至少约或至多约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或更高(或其中可衍生的任何范围)。其中,约,至少约,或至多约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、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%可以是抗-glycPD-1抗体或糖基化的PD-1多肽。

[0198] 具有本文所述的抗体或其他多肽作为活性成分的药物组合物的制备是本领域技术人员根据本公开内容已知的,例如Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed, 1990,通过引用并入本文。此外,对于动物(包括人)施用,应理解制剂应满足FDA生物标准办公室要求的无菌,致热原性,一般安全性和纯度标准。

[0199] 药学上可接受的载体包括液体,半固体,即糊剂或固体载体。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。药学上可接受的载体可包括含水溶剂(例如水,醇/水溶液,乙醇,盐溶液,肠胃外载体,例如氯化钠,林格氏葡萄糖等),非水溶剂(例如丙二醇,聚乙二醇),植物油和可注射的有机酯,如乙基油酸酯),分散介质,涂料(如卵磷脂),表面活性剂,抗氧化剂,防腐剂(如抗菌剂或抗真菌剂,抗氧化剂,螯合剂,惰性气体,对羟基苯甲酸酯类(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(如糖,氯化钠),吸收延迟剂(如单硬脂酸铝,明胶),盐,药物,药物稳定剂(如缓冲剂,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,山梨糖醇,甘露醇等),凝胶,粘合剂,赋形剂,崩解剂,润滑剂,如本领域普通技术人员所知,甜味剂,调味剂,染料,流体和营养补充剂,如类似材料及其组合。除非任何常规介质,试剂,稀释剂或载体对接受者或其中所含组合物的治疗有效性有害,否则其在可施用组合物中的用途适合用于实施该方法。根据众所周知的参数调节药物组合物中各种组分的pH和精确浓度。根据本发明的某些方面,组合物可以以任何方便和实用的方式与载体组合,即通过溶液,悬浮,乳化,混合,包封,吸收,研磨等。这些程序对于本领域技术人员来说是常规的。

[0200] 在一些实施方案中,药学上可接受的载体可以是含水pH缓冲溶液。实例包括缓冲剂,例如磷酸盐,柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸;低分子量((例如,少于约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,精氨酸或赖氨酸;单糖,二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖,甘露糖或糊精;螯合剂如EDTA;糖醇如甘露醇或山梨糖醇;成盐抗衡离子如钠;和/或非离子表面活性剂如TWEEN™,聚乙二醇(PEG)和PLURONICS™。

[0201] 在一些实施方案中,药学上可接受的载体可以是无菌液体,例如水和油,包括石油,动物,植物或合成来源的那些,例如花生油,大豆油,矿物油,芝麻油等。水可以是载体,特别是当静脉内施用药物组合物时。盐水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。合适的药物赋形剂包括淀粉,葡萄糖,乳糖,蔗糖,明胶,麦芽,大米,面粉,白垩,硅胶,硬脂酸钠,甘油单硬脂酸酯,滑石,氯化钠,脱脂乳,甘油,丙烯,乙二醇,水,乙醇,聚山梨醇酯-80等。该组合物还可含有少量润湿剂或乳化剂,或pH缓冲剂。这些组合物可以采用溶液,悬浮液,乳液,片剂,丸剂,胶囊,粉末,缓释制剂等形式

[0202] 本公开的某些实施方案可以具有不同类型的载体,这取决于它是以固体,液体还是气溶胶形式施用,以及它是否需要对于施用途径(例如注射)是无菌的。该组合物可以配制成静脉内,皮内,透皮,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,局部,局部,通过吸入(例如,气溶胶吸入),通过注射,通过连续输注,通过局部灌注沐浴靶细胞,通过导管,通过灌洗,在脂质组合物(例如,脂质体)中,或通过其他方法或本领域普通技术人员已知的任何前述组合,输注在本领域中(参见,例如,Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed, 1990, 通过引用并入本文)。通常,这种组合物可以制成液体溶液或悬浮液;也可以制备适合用于在注射前加入液体溶液或悬浮液的固体形式;并且,制剂也可以乳化。

[0203] 可以将抗-glycPD-1抗体或糖基化的PD-1多肽配制成游离碱,中性或盐形式的组合物。药学上可接受的盐包括酸加成盐,例如与蛋白质组合物的游离氨基形成的酸加成盐,或与无机酸形成的盐,例如盐酸或磷酸,或诸如乙酸,草酸等有机酸,酒石酸或扁桃酸。用游离羧基形成的盐也可以衍生自无机碱,例如氢氧化钠,氢氧化钾,氢氧化铵,氢氧化钙或氢氧化铁;或有机碱如异丙胺,三甲胺,2-乙氨基乙醇,组氨酸或普鲁卡因。

[0204] 在进一步的实施方案中,本文提供了具有脂质的药物组合物。脂质可以广泛地包括一类特征性地不溶于水并且可以用有机溶剂提取的物质。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(即由人设计或生产)。脂质可以是生物物质。生物脂质是本领域公知的,包括例如中性脂肪,磷脂,磷酸甘油酯,类固醇,萜烯,溶血脂,糖鞘脂,糖脂,硫酸盐、具有醚-和酯-连接的脂肪酸的脂质,可聚合的脂质,及其组合。也可以使用除本文具体描述的那些之外的化合物,这些化合物是本领域技术人员理解的脂质。

[0205] 本领域普通技术人员熟悉可用于将组合物分散在脂质载体中的技术范围。例如,抗体或多肽可以分散在含有脂质的溶液中,用脂质溶解,用脂质乳化,与脂质混合,与脂质结合,与脂质共价键合,作为脂质中的悬浮液包含,通过本领域普通技术人员已知的任何方式,包含或与胶束或脂质体复合,或以其他方式与脂质或脂质结构缔合。分散体可能会或可能不会导致脂质体的形成。

[0206] 通常,组合物的成分单独或以单位剂量形式混合在一起供应,例如,作为干燥的冻干粉末或无水浓缩物,在密封容器如安瓿或小药囊中,表明活性剂的量。当组合物通过输注施用时,可以用含有无菌药用级水或盐水的输液瓶分配。当通过注射施用组合物时,可以提供一安瓿的无菌注射用水或盐水,以便可以在施用前混合成分。

[0207] 可以在任何给定单位剂量的化合物中获得合适剂量的方式制备每种治疗上有用的组合物中活性成分的量。制备此类药物制剂的领域的技术人员可以考虑诸如溶解度,生物利用度,生物半衰期,施用途径,产品保质期以及其他药理学考虑因素,因此,各种各样的剂量和治疗方案可能是理想的。

[0208] 单位剂量或剂量是指适用于受试者的物理上离散的单位,每个单位含有预定量的药物组合物,经计算可产生上述与其施用相关的所需反应,即适当的途径和治疗方案。根据治疗次数和单位剂量,施用量取决于所需的效果。给予患者或受试者的本发明实施方案的组合物的实际剂量可以通过物理和生理因素来确定,例如体重,受试者的年龄,健康和性别,所治疗疾病的类型,疾病渗透程度,先前或同时的治疗干预,患者的特发性疾病,施用途

径以及特定治疗物质的效力,稳定性和毒性。在其他非限制性实例中,剂量可具有约1微克/kg/体重,约5微克/kg/体重,约10微克/kg/体重,约50微克/kg/体重,约100。微克/kg/体重,约200微克/kg/体重,约350微克/kg/体重,约500微克/kg/体重,约1毫克/kg/体重,约5毫克/kg/体重量计,约10毫克/kg/体重,约50毫克/kg/体重,约100毫克/kg/体重,约200毫克/kg/体重,约350毫克/kg/体重,约500毫克/kg/体重,每次施用约1000毫克/kg/体重或更多,以及其中可衍生的任何范围。在非限制性的实施例可衍生范围从本文列出的电话号码,一个范围在约5毫克/kg/体重至约100毫克/kg/体重,约5微克/kg/体重至大约500毫克/kg可以基于上述数量给予/体重等。在任何情况下,负责施用的从业者将确定组合物中活性成分的浓度和个体受试者的适当剂量。

[0209] 如本领域普通技术人员所理解的,本文所述的组合物不受治疗制剂的特定性质的限制。例如,这种组合物可以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制剂中。这些治疗制剂可以施用于哺乳动物用于兽医用途,例如用于家畜,以及以类似于其他治疗剂的方式在人体中的临床应用。通常,治疗功效所需的剂量根据使用类型和施用方式以及个体受试者的特殊要求而变化。施用于动物患者(包括人类患者)的组合物实际剂量可以通过物理和生理因素来确定,例如体重,病症的严重程度,所治疗疾病的类型,先前或同时的治疗干预,特发性疾病。患者和施用途径。取决于剂量和施用途径,优选剂量和/或有效量的施用次数可根据受试者的反应而变化。在任何情况下,负责施用的从业者将确定组合物中活性成分的浓度和个体受试者的适当剂量

#### [0210] 治疗疾病

[0211] 如本文所用,除非另有说明,术语“受试者”是指作为治疗,观察和/或实验对象的动物。“动物”包括脊椎动物和无脊椎动物,例如鱼类,贝类,爬行动物,鸟类,特别是哺乳动物。“哺乳动物”包括但不限于小鼠,大鼠,兔,豚鼠,狗,猫,绵羊,山羊,牛,马,灵长类动物,例如猴子,黑猩猩,猿和人。在一些实施方案中,受试者是人。

[0212] 如本文所用,除非另有说明,术语“癌症”或“癌性”是指哺乳动物中通常以不受调节的细胞生长为特征的生理状况。癌症的实例包括但不限于血液癌症和实体瘤。

[0213] 如本文所用,并且除非另有说明,术语“治疗”,“诊治”或“医治”是指向受试者施用或施用治疗剂或者对受试者施用治疗剂或方式。获得疾病或健康相关病症的治疗益处的目的。例如,治疗可包括向受试者施用治疗有效量的抗-glycPD-1抗体。当用于提及癌症患者时,术语“治疗”,“诊治”或“医治”是指可能降低癌症严重程度,或延缓或减缓癌症进展的作用,包括(a)抑制癌症生长,降低癌症生长速度,阻止发展,降低癌症侵袭性或预防癌症转移,以及(b)导致癌症消退,延迟或减少与癌症存在相关的一种或多种症状,或延长癌症患者的生存。

[0214] 如本文所用,并且除非另有说明,术语“治疗有效量”是指足以减少和/或的药剂(例如,本文所述的抗体或多肽或本文所述的任何其他药剂)的量。或改善给定疾病,病症或病症的严重性和/或持续时间,和/或与其相关的症状。治疗有效量的药剂,包括治疗剂,可以是(i)减少或改善给定疾病,病症或病症的进展或进展,(ii)减少或改善复发所必需的量,发展或发作给定的疾病,病症或病症,和/或(iii)改善或增强另一种疗法的预防或治疗效果(例如,除了施用本文提供的抗体之外的疗法)。治疗有效量的本公开的物质/分子/药剂(例如,抗-glycPD-1抗体或糖基化的PD-1多肽)可以根据诸如个体的疾病状态,年龄,性

别和体重等因素而变化,以及物质/分子/药剂在个体中引起所需反应的能力。治疗有效量包括其中物理/分子/药剂的任何毒性或有害作用超过治疗有益效果的量。

[0215] 如本文所用,并且除非另有说明,术语“施用”或“施用”是指将物质存在于体外时注射或以其他方式物理递送至患者体内的行为,例如通过粘膜,皮内,静脉内,肌肉内递送和/或本文所述或本领域已知的任何其他物理递送方法。当正在治疗疾病,病症或病症或其症状时,通常在疾病,病症或病症或其症状发作后施用该物质。当预防疾病,病症或病症或其症状时,该物质的施用通常在疾病,病症或病症或其症状发作之前发生。

[0216] 本文还提供了抗-glycPD-1抗体和糖基化的PD-1多肽的治疗用途。这些抗体或多肽可用于调节PD-1/PD-L1信号传导的活性。这些抗体或多肽也可用于通过抑制T细胞活化或增殖中PD-1的抑制活性来治疗疾病。因此,本文提供了此类抗体或多肽通过抑制或阻断PD-1信号传导而上调受试者免疫系统的用途。在一些实施方案中,本文提供了抗体或多肽用于阻断PD-1结合PD-L1的用途。

[0217] 在一些实施方案中,本文提供的还有抗-glycPD-1抗体和糖基化的PD-1多肽在治疗癌症中的治疗用途。免疫系统的上调在癌症的治疗中是特别理想的,因此本文提供的也是癌症治疗的方法。癌症是指由细胞不正常的不受控制的生长引起的肿瘤或肿瘤。癌症可以是原发性癌症或转移性癌症。在具体的实施方案中,癌细胞对PD-L1呈阳性。

[0218] 在某些方面,可施用实施方案的多肽或抗体(例如,糖基化的PD-1多肽或结合糖基化的PD-1的抗体)以治疗癌症。在具体的实施方案中,抗-glycPD-1抗体是STM418或STM432的嵌合或人源化形式。本发明治疗方法有用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。示例性实体瘤可包括但不限于选自胰腺,结肠,盲肠,胃,脑,头,颈,卵巢,肾,喉,肉瘤,肺,膀胱,黑素瘤的器官的肿瘤,前列腺和乳房。示例性血液肿瘤包括骨髓肿瘤,T或B细胞恶性肿瘤,白血病,淋巴瘤,胚细胞瘤,骨髓瘤等。可使用本文提供的方法治疗的癌症的其他实例包括但不限于癌,淋巴瘤,胚细胞瘤,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)。癌症,肺腺癌和肺鳞癌),腹膜癌,肝细胞癌,胃癌或胃癌(包括胃肠癌和胃肠道间质癌),胰腺癌,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,子宫内膜癌或子宫癌,唾液腺癌,肾癌或肾癌,前列腺癌,外阴癌,甲状腺癌,各种类型的头颈癌,黑色素瘤,浅表性扩散黑素瘤,lentigo恶性黑色素瘤,肢端黑色素瘤,结节性黑色素瘤,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/滤泡性NHL;中级弥漫性NHL;高级免疫母细胞NHL;高级淋巴细胞NHL;高级小型非裂解细胞NHL;体积庞大的疾病NHL;套细胞淋巴瘤;艾滋病相关淋巴瘤;和Waldenstrom的巨球蛋白血症),慢性淋巴细胞白血病(CLL),急性淋巴细胞白血病(ALL),毛细胞白血病,多发性骨髓瘤,急性髓性白血病(AML)和慢性髓细胞白血病。

[0219] 癌症可以具体地具有以下组织学类型,但不限于这些: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;町



贮腺癌;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。

[0220] 在一些实施方案中,本文提供的抗体或多肽可用于治疗癌症,所述癌症是乳腺癌,肺癌,头颈癌,前列腺癌,食道癌,气管癌,皮肤癌脑癌,肝癌,膀胱癌,胃癌,胰腺癌,卵巢癌,子宫癌,宫颈癌,睾丸癌,结肠癌,直肠癌或皮肤癌。

[0221] 多肽或抗体在本文中可以采用多种形式用作抗肿瘤剂。在一个具体实施方案中,本文提供了使用多肽或抗体作为抗肿瘤剂的方法,因此包括使肿瘤细胞群与治疗有效量的多肽或抗体接触足以抑制肿瘤细胞生长的时间。

[0222] 各种递送系统也是已知的并且可用于施用抗-glycPD-1抗体或糖基化的PD-1多肽的相关分子,或相关的药物组合物,例如包封在脂质体,微粒,微胶囊,能够重组的细胞中。表达抗体或融合蛋白,受体介导的内吞作用(参见,例如,Wu和Wu,1987,J.Biol.Chem.262:4429-4432),构建核酸作为逆转录病毒或其他载体的一部分,等等

[0223] 本文提供的施用方法包括但不限于注射,例如通过肠胃外施用(例如,皮内,肌肉内,腹膜内,静脉内和皮下),硬膜外和粘膜(例如,鼻内和口腔途径)。在一些实施方案中,本文提供的抗体,其他分子或药物组合物通过肌内,静脉内,皮下,静脉内,腹膜内,口服,肌肉内,皮下,腔内,透皮或皮肤施用。组合物可以通过任何方便的途径施用,例如通过输注或推注,通过上皮或粘膜皮肤衬里(例如,口腔粘膜,直肠和肠粘膜等)吸收,并且可以与其他生物活性剂一起施用。施用可以是系统的或局部的。此外,还可以使用肺部施用,例如,通过使用吸入器或雾化器,以及使用雾化剂的制剂。参见,例如,美国专利No.6,019,968;5,985,



20;5,985,309;5,934,272;5,874,064;5,855,913;5,290,540;和4,880,078;和PCT公开号WO 92/19244;WO 97/32572;WO 97/44013;WO 98/31346;和WO 99/66903;所有这些都通过引用整体并入本文。在一些实施方案中,本文提供的抗体,其他分子或药物组合物局部施用于需要治疗的区域,这可以通过例如局部输注,通过注射或通过植入物实现,所述植入物它是多孔的,无孔的或凝胶状的材料,包括膜,例如弹性膜或纤维。在一些实施方案中,当施用如本文所述的抗体或其他分子时,注意使用抗体或其他分子不吸收的材料。

[0224] 在一些实施方案中,将本文提供的抗体或多肽配制在脂质体中用于靶向递送。脂质体是由同心有序的磷脂双层组成的囊泡,其包封水相。脂质体通常具有各种类型的脂质,磷脂和/或表面活性剂。脂质体的组分以双层构型排列,类似于生物膜的脂质排列。脂质体可以有用的递送载体,部分原因在于它们的生物相容性,低免疫原性和低毒性。用于制备脂质体的方法是本领域已知的并且在本文中提供,参见例如Epstein等人,1985, Proc.Natl.Acad.Sci.USA,82:3688;Hwang等人,1980Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77:4030-4;美国专利4,485,045和4,544,545;所有这些都通过引用整体并入本文。

[0225] 本发明还提供了制备具有延长的血清半衰期,即增强的循环时间的脂质体的方法,例如美国专利No.4,522,588中公开的那些。美国专利号5,013,556。在一些实施方案中,本文提供的方法中使用的脂质体不能快速从循环中清除,即不被摄入单核吞噬细胞系统(MPS)。本文提供了空间稳定的脂质体,其使用本领域技术人员已知的常规方法制备。空间稳定的脂质体可含有具有庞大且高度柔性的亲水部分的脂质组分,其减少脂质体与血清蛋白的不希望的反应,减少与血清组分的opsonization并降低MPS的识别。可以使用聚乙二醇制备空间稳定的脂质体。为了制备脂质体和空间稳定的脂质体,参见,例如,Bendas等人,2001BioDrugs,15(4):215-224;Allen等人,1987FEBS Lett.223:42-6;Klibanov等人,1990FEBS Lett.,268:235-7;Blum等人,1990,Biochim.Biophys.Acta.,1029:91-7;Torchilin等人,1996,J.Liposome Res.6:99-116;Litzinger等人,1994,Biochim.Biophys.Acta,1190:99-107;Maruyama等人,1991,Chem.Pharm.Bull.,39:1620-2;Klibanov等人,1991,Biochim Biophys Acta,1062:142-8;Allen等人,1994,Adv.Drug Deliv.Rev,13:285-309,其全部内容在此引入作为参考。

[0226] 本文还提供了适用于特定器官靶向的脂质体,参见,例如,美国专利No.4,522,517,美国专利No.美国专利号4,544,545,或特定细胞靶向,参见例如美国专利申请公开号2005/0074403,其通过引用整体并入本文。用于本文提供的组合物和方法的特别有用的脂质体可以通过反相蒸发法用包含磷脂酰胆碱,胆固醇和PEG衍生的磷脂酰乙醇胺(PEG-PE)的脂质组合物产生。脂质体可以通过具有确定孔径的过滤器挤出,以产生具有所需直径的脂质体。在一些实施方案中、具有抗原结合片段的分子,例如F(ab'),可以使用先前描述的方法与脂质体缀合,参见例如Martin等人,1982,J.Biol.Chem.257:286-288,其全部内容通过引用并入本文。

[0227] 如本文所述的人源化或嵌合抗体也可以配制为免疫脂质体。免疫脂质体是指脂质体组合物,其中抗体或其片段与脂质体表面共价或非共价连接。将抗体与脂质体表面连接的化学反应是本领域已知的,参见,例如,美国专利No.4,522,517,美国专利No.第6,787,153号;Allen等人,1995,Stealth Liposomes,Boca Roton:CRC Press,233-44;Hansen等人,1995,Biochim.Biophys.Acta,1239:133-144,其全部内容在此引入作为参考。在一些实

施方案中,用于本文提供的方法和组合物的免疫脂质体进一步在空间上稳定。在一些实施方案中,如本文所述的人源化抗体共价或非共价地连接至疏水锚,其在脂质体的脂质双层中稳定生根。疏水性锚的实例包括但不限于磷脂,例如磷脂酰乙醇胺(PE),磷脂酰肌醇(PI)。为了实现抗体和疏水锚之间的共价连接,可以使用本领域任何已知的生物化学策略,参见例如J.Thomas August ed,1997,Gene Therapy:Advances in Pharmacology, Volume40,Academic Press,San Diego,Calif,p.399-435,其全部内容在此引入作为参考。例如,抗体分子上的官能团可以与脂质体相关的疏水锚上的活性基团反应,例如,抗体上赖氨酸侧链的氨基可以与脂质体相关的N-戊二酰基-磷脂酰乙醇胺与水活化。-可溶性碳二亚胺;或者,还原抗体的硫醇基团可以通过硫醇反应性锚定剂与脂质体偶联,例如吡啶基硫代丙酰基磷脂酰乙醇胺。参见,例如,Dietrich等人,1996,Biochemistry,35:1100-1105; Loughrey等人,1987,Biochim.Biophys.Acta,901:157-160;Martin等人,1982,J.Biol.Chem.257:286-288;Martin等人,1981,Biochemistry,20:4429-38,其全部内容在此引入作为参考。具有抗糖基化的PD-1抗体的免疫脂质体制剂作为治疗剂可以特别有效,因为它们将活性成分递送至靶细胞的细胞质,即包含抗体结合的受体的细胞。在一些实施方案中,免疫脂质体可以在血液中具有增加的半衰期,特别是靶细胞,并且可以内化到靶细胞的细胞质中,从而避免治疗剂的损失或内溶酶体途径的降解。

[0228] 本文提供的免疫脂质体组合物可具有一种或多种形成囊泡的脂质,本发明的抗体或其他分子或其片段或衍生物,和任选的亲水性聚合物。形成囊泡的脂质可以是具有两个烃链的脂质,例如酰基链和极性头部基团。囊泡形成脂质的实例包括磷脂,例如磷脂酰胆碱,磷脂酰乙醇胺,磷脂酸,磷脂酰肌醇,鞘磷脂和糖脂,例如脑苷脂,神经节苷脂。可用于本文提供的制剂中的其他脂质是本领域技术人员已知的并且包括在说明书内。在一些实施方案中,免疫脂质体组合物还包含亲水性聚合物,例如聚乙二醇和神经节苷脂GM1,其增加脂质体的血清半衰期。将亲水性聚合物与脂质体缀合的方法是本领域熟知的并且包括在说明书中。另外的示例性免疫脂质体及其制备方法可参见例如美国专利申请公开号2003/0044407;PCT国际公开号W0 97/38731,Vingerhoads等人,1994,Immunomethods,4:259-72;Maruyama,2000,Biol.Pharm.Bull.23(7):791-799;Abra等人,2002,Journal of Liposome Research,12(1&2):1-3;Park,2002,Bioscience Reports,22(2):267-281;Bendas等人,2001BioDrugs,14(4):215-224,J.Thomas August ed.,1997,Gene Therapy:Advances in Pharmacology,Volume 40,Academic Press,San Diego,Calif.,p.399-435;所有这些都通过引用整体并入本文。

[0229] 本文还提供了通过向患者施用抗-glycPD-1抗体的单位剂量来治疗癌症患者的方法。本文还提供了通过向患者糖基化的PD-1多肽施用单位剂量来治疗癌症患者的方法。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,每个单位含有预定量的活性物质,经计算可产生与所需稀释剂(即载体或载体)相关的所需治疗效果。

[0230] 抗体,多肽或组合物以与剂量制剂相容的方式施用,并且以治疗有效量施用。施用量取决于待治疗的受试者,受试者体系利用活性成分的能力和所需治疗效果的程度。需要施用的精确量的活性成分取决于从业者的判断并且是每个个体受试者所特有的。然而,本文公开了用于全身应用的合适剂量范围,并且取决于施用途径。还考虑了用于初始和加强施用的合适方案,并且通常包括初始施用,然后通过随后的注射或其他施用以一个或多个

小时间隔重复施用。本文描述了示例性的多次施用,并且其可用于维持多肽或抗体的连续高血清和组织水平。或者,考虑足以维持血液中浓度在体内治疗指定范围内的连续静脉内输注。

[0231] 治疗有效量是计算的预定量以实现期望的效果。通常,剂量将随患者的年龄,病症,性别和疾病程度而变化,并且可由本领域技术人员确定。如果出现任何并发症,可由个体医生调整剂量。

[0232] 在一些实施方案中,本文提供的抗体,多肽或药物组合物包装在气密封的容器中,例如安瓿或小药囊。在一个实施方案中,本文提供的抗体,多肽或药物组合物作为干燥灭菌的冻干粉末或无水浓缩物在密封容器中提供,并且可以例如用水或盐水重构至适当的浓度以施用于学科。在一些实施方案中,本文提供的抗体,多肽或药物组合物作为干燥无菌冻干粉末在密封容器中以至少5mg,更优选至少10mg,至少15mg,至少25mg,至少35mg,至少45mg,至少50mg,或至少75mg的单位剂量提供。本文提供的冻干抗体,多肽或药物组合物应在其原始容器中在2-8℃下储存,并应在重建后12小时内,优选在6小时内,5小时内,3小时内或1小时内施用。在另一个实施方案中,本文提供的抗体,多肽或药物组合物以液体形式提供在密封容器中,表明抗体,多肽或药物组合物的量和浓度。在一些实施方案中,本文提供的抗体,多肽或药物组合物的液体形式在密封容器中提供至少1mg/ml,更优选至少2.5mg/ml,至少5mg/ml,至少8mg/ml,至少10mg/ml,至少15mg/ml,至少25mg/ml,至少50mg/ml,至少100mg/ml,至少150mg/ml,至少200mg/ml。

[0233] 在制剂中使用的精确剂量还取决于施用途和病症的严重程度,并且应根据从业者的判断和每个患者的情况来决定。可以从源自体外或动物模型测试系统的剂量-反应曲线外推有效剂量。对于抗-glycPD-1抗体或糖基化的PD-1多肽,给予患者的剂量通常为0.01mg/kg至100mg/kg患者体重。在一些实施方案中,给予患者的剂量为0.01mg/kg至20mg/kg,0.01mg/kg至10mg/kg,0.01mg/kg和5mg/kg,0.01至2mg/kg,0.01至1mg/kg,0.01mg/kg至0.75mg/kg,0.01mg/kg至0.5mg/kg,0.01mg/kg至0.25mg/kg,0.01至0.15mg/kg,0.01至0.10mg/kg,为0.01至0.05mg/kg,或0.01至0.025mg/kg患者体重。特别地,给予患者的剂量可以是0.2mg/kg,0.3mg/kg,1mg/kg,3mg/kg,6mg/kg或10mg/kg。预计低至0.01mg/kg的剂量显示出明显的药效学效应。预计剂量水平为0.10-1mg/kg是最合适的。还可以预期更高的剂量(例如,1-30mg/kg)是有效的。通常,由于对外来多肽的免疫应答,人抗体在人体内具有比来自其他物种的抗体更长的半衰期。因此,可以实施较低剂量的人抗体和较低频率的施用。此外,本文提供的抗体或多肽的施用剂量和频率可以通过修饰(例如脂化)增强抗体的摄取和组织穿透来降低。

[0234] 在另一个实施方案中,组合物可以在控释或持续释放系统中递送。可以使用本领域技术人员已知的任何技术来生产具有一种或多种本文提供的抗体,分子或药物组合物的持续释放制剂。参见,例如,美国专利No. 第4,526,938号;PCT公开W0 91/05548;PCT公布W096/20698;Ning等人,Radiotherapy&Oncology 39:179-189(1996),Song等人,PDA Journal of Pharmaceutical Science&Technology50:372-397(1995);Cleek等人,Pro.Int'l.Symp.Control.Rel.Bioact.Mater.24:853-854(1997);and Lam等人,Proc.Int'l.Symp.Control Rel.Bioact.Mater.24:759-760(1997);所有这些都通过引用整体并入本文。在一个实施方案中,泵可用于控释系统(参见Langer,同上;Sefton,1987,

CRC Crit.Ref Biomed.Eng.14:20;Buchwald等,1980,Surgery88:507;和Saudek等人,1989,N.Engl.J.Med.321:574)。在另一个实施方案中,聚合物材料可用于实现抗体或多肽的受控释放(参见例如Medical Applications of Controlled Release,Langer and Wise (eds.),CRC Pres.,Boca Raton,Fla.(1974);Controlled Drug Bioavailability,Drug Product Design and Performance,Smolen and Ball(eds.),Wiley,New York(1984);Ranger and Peppas,1983,J.,Macromol.Sci.Rev.Macromol.Chem.23:61;see also Levy等人,1985,Science 228:190;During等人,1989,Ann.Neurol.25:351;Howard等人,1989,J.Neurosurg.7 1:105);美国专利号5,679,377;美国专利号5,916,597;美国专利号5,912,015;美国专利号5,989,463;美国专利号5,128,326;PCT公开号WO 99/15154;和PCT公开号WO 99/20253;所有这些都通过引用整体并入本文。

[0235] 可用于持续释放制剂的聚合物的实例包括但不限于聚(甲基丙烯酸羟乙酯),聚(甲基丙烯酸甲酯),聚(丙烯酸),聚(乙烯-共-乙酸乙烯酯),聚(甲基丙烯酸),聚乙交酯(PLG),聚酸酐,聚(N-乙烯基吡咯烷酮),聚(乙醇醇),聚丙烯酰胺,聚(乙二醇),聚交酯(PLA),聚(丙交酯-共-乙交酯)(PLGA)和聚原酸酯。在另一个实施方案中,控释系统可以放置在治疗靶标(例如,肺)附近,因此仅需要全身剂量的一小部分(参见,例如,Goodson,in Medical Applications of Controlled Release,supra,vol.2,pp.115-138(1984))。在另一个实施方案中,根据Dunn等人(参见美国专利No.5,945,155),其全部内容通过引用并入本文,使用可用作控释植入物的聚合物组合物。基于从聚合物系统原位控制释放生物活性材料的治疗效果,植入通常可发生在需要治疗的患者体内的任何地方。

[0236] 在另一个实施方案中,使用非聚合物持续递送系统,由此将受试者体内的非聚合物植入物用作药物递送系统。在植入体内后,植入物的有机溶剂将从组合物中消散,分散或浸出到周围的组织液中,并且非聚合物材料将逐渐凝结或沉淀以形成固体微孔基质(参见美国专利No.4,522,517)。美国专利号5,888,533)。控制释放系统也在Langer的综述(1990,Science 249:1527-1533)中讨论。可以使用本领域技术人员已知的任何技术来生产包含一种或多种本文提供的治疗剂的持续释放制剂。参见,例如,美国专利No.第4,526,938号;国际公开号WO 91/05548和WO 96/20698;Ning等人,1996,Radiotherapy&Oncology 39:179-189;Song等人,1995,PDA Journal of Pharmaceutical Science&Technology 50:372-397;Cleek等人,1997,Pro.Int'l.Symp.Control.Rel.Bioact.Mater.24:853-854;and Lam等人,1997,Proc.Int'l.Symp.Control Rel.Bioact.Mater.24:759-760;所有这些都通过引用整体并入本文。

[0237] 本文还提供了其中组合物具有编码本文提供的抗体或多肽的核酸的实施方案,其中核酸可以在体内施用以促进其编码的抗体或多肽的表达,通过将其构建为合适的核酸的一部分。酸性表达载体并使其进入细胞内,例如,通过使用逆转录病毒载体(参见美国专利号4,980,286),或通过直接注射,或通过使用微粒轰击(例如,基因枪;Biolistic,Dupont),或用脂质或细胞表面受体或转染剂包被,或通过已知进入细胞核的同源框样肽连接施用(参见例如Joliot等人,1991,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:1864-1868)。或者,可以在细胞内引入核酸并将其掺入宿主细胞DNA中以通过同源重组进行表达。

[0238] 用本文提供的治疗有效量的抗体,多肽或药物组合物治疗受试者可包括单次治疗或一系列治疗。预期本文提供的抗体,多肽或药物组合物可全身或局部施用以治疗疾病,例

如抑制肿瘤细胞生长或杀死患有局部晚期或转移性癌症的癌症患者中的癌细胞。它们可以静脉内,鞘内和/或腹膜内施用。它们可以单独施用或与抗增殖药物联合施用。在一个实施方案中,施用它们以在手术或其他手术之前减少患者的癌症负荷。或者,它们可以在手术后施用以确保任何剩余的癌症(例如,手术未能消除的癌症)不能存活。在一些实施方案中,它们可以在原发性癌症消退后施用以预防转移。

#### [0239] 联合治疗

[0240] 在某些实施方案中,实施方案的组合物和方法包括施用糖基化的PD-1多肽或选择性结合糖基化的PD-1的抗体,以及第二种或另外的疗法。此类疗法可用于治疗与PD-1或糖基化的PD-1相关的任何疾病。例如,该疾病可以是癌症,并且第二种疗法是抗癌或抗过度增殖疗法。

[0241] 所述方法和组合物,包括组合疗法,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的组合量提供,例如杀死癌细胞和/或抑制细胞过度增殖。该过程可涉及施用多肽或抗体和第二种疗法。第二种疗法可能具有或不具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药剂。组织,肿瘤或细胞可以暴露于一种或多种组合物或包含一种或多种试剂(例如抗体或抗癌剂)的药理制剂,或通过暴露组织,肿瘤和/或具有两种或更多种不同组合物或制剂的细胞,其中一种组合物提供1)多肽或抗体,2)抗癌剂,或3)多肽或抗体和抗癌剂。而且,预期这种组合疗法可以与化学疗法,放射疗法,手术疗法或免疫疗法结合使用。

[0242] 当应用于细胞时,术语“接触”和“暴露”在本文中用于描述将治疗性多肽或抗体和化学治疗剂或放射治疗剂递送至靶细胞或直接放置的过程。与目标细胞并置。例如,为了实现细胞杀伤,将两种药剂以有效杀死细胞或防止其分裂的组合量递送至细胞

[0243] 抗-glycPD-1抗体或糖基化的PD-1多肽可以在相对于第二种或另外的抗癌治疗之前,期间,之后或以各种组合施用。主管部门可以间隔从几分钟到几分钟到几天到几周不等。在抗体或多肽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的时间之间相当长的一段时间不会到期,这样两种化合物仍然能够对患者施加有利的组合效果。在这种情况下,预期可以为患者提供抗-glycPD-1抗体或糖基化的PD-1多肽,并且在彼此约12至24或72小时内,更具体地,在彼此约6-12小时内提供第二种疗法。在某些情况下,治疗的时间可以延长,各施用之间几天(2、3、4、5、6或7)到几周(1、2、3、4、5、6、7或8)。

[0244] 在具体的实施方案中,抗-glycPD-1抗体与一种或多种其他抗PD-1抗体组合施用,包括与pembrolizumab,nivolumab或pidilizumab组合施用于患者以治疗癌症。在其他实施方案中,抗-glycPD-1抗体与一种或多种抗PD-L1抗体组合施用于患者以治疗癌症。在具体的实施方案中,抗-glycPD-1抗体与atezolizumab,durvalumab或avelumab组合施用。在其他实施方案中,抗-glycPD-1抗体与一种或多种抗-CTLA-4抗体组合施用,并且在一个具体实施方案中,抗-CTLA-4抗体是ipilimumab。在其他实施方案中,抗-glycPD-1抗体与抑制PD-1,PD-L1或CTLA-4活性的药剂一起施用,例如具有与Fc结构域融合的PD-1、PD-L1或CTLA-4蛋白的细胞外受体或配体结合部分的免疫粘附素。

[0245] 在具体的实施方案中,与非糖基化的PD-L1相比,抗-glycPD-1抗体与优先结合糖基化的PD-L1的抗体组合施用。特别地,抗-glycPD-1抗体可以与抗PD-L1抗体STM004或

STM115的嵌合或人源化形式组合施用,其与非糖基化的PD-L1和氨基酸相比优先结合糖基化的PD-L1。重链和轻链可变结构域的氨基酸序列(和编码核苷酸序列)公开于2016年10月6日公开的题为“特异性抗糖基化的PD-L1的抗体及其使用方法”的PCT公开W02016/160792,其被引入在此引用作为参考。抗-gly-PD-1抗体还与嵌合或人源化形式的抗PD-L1抗体STM073和SMT108组合施用,其与非糖基化的PD-L1相比优先结合糖基化的PD-L1,重链和轻链可变结构域的氨基酸序列(和编码核苷酸序列)公开于2016年3月29日提交的题为“特异于糖基化的PD-L1的双功能抗体及其使用方法”的美国临时专利申请62/314,652,其通过引用并入本文。

[0246] 在某些实施方案中,治疗过程可持续1-90天或更长时间(此范围包括中间天数)。预期可以在第1天至第90天的任何一天(这个范围包括间隔天)或其任何组合给予一种药剂,并且在第1天至第90天的任何一天给予另一种药剂(这样的范围包括干预日)或其任何组合。在一天(24小时)内,可以给患者一次或多次施用药剂。此外,在治疗过程之后,预期存在不施用抗癌治疗的一段时间。这段时间可能持续1-7天,和/或1-5周,和/或1-12个月或更长时间(此范围包括干预日),具体取决于患者的状况,如预后、力量、健康等。必要时可以重复治疗周期。

[0247] 可以采用各种组合。下面列出的是用抗-glycPD-1抗体或糖基化的PD-1多肽作为“A”处理和作为“B”的第二种抗癌疗法的一些实例: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。

[0248] 本文提供的任何抗体,多肽或药物组合物与患者的第二疗法的组合将遵循用于第二疗法的一般方案,考虑到第二疗法的毒性(如果有的话)。因此,在一些实施方案中,存在监测可归因于组合疗法的毒性的步骤。

#### [0249] 化疗

[0250] 根据本发明的实施方案,可以使用多种化学治疗剂作为第二种治疗。化学治疗剂可以是在癌症治疗中施用的化合物或组合物。这些药剂或药物可以通过它们在细胞内的活性模式来分类,例如,它们是否以及在何种阶段它们影响细胞周期。或者,可以基于其直接交联DNA,嵌入DNA或通过影响核酸合成诱导染色体和有丝分裂畸变的能力来表征试剂。

[0251] 化学治疗剂的实例包括烷化剂,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、三亚乙基硫代磷酰胺(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、多西他滨、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; 地吡啶; 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; 硝胺醇; 喷司他丁; 蛋氨酸芥; 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。

#### [0252] 放射治疗

[0253] 可以与本文描述的方法和组合物组合使用的另一种常规抗癌疗法是放射疗法或放射治疗。放射疗法包括使用  $\gamma$  射线, X 射线和/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, 质子束辐射 (美国专利号 5,760,395 和 4,870,287; 所有这些均通过引用整体并入本文) 和紫外线照射。所有这些因素很可能影响 DNA 的广泛损伤, DNA 的前体, DNA 的复制和修复, 以及染色体的组装和维持。

[0254] 肿瘤微环境本质上是抑制性的, 因为存在髓样来源的抑制细胞和调节性 T 细胞, 其浸润肿瘤并起到抑制免疫应答的作用。此外, 某些抑制性分子在 T 细胞和抗原呈递细胞 (APC) 上的表达可以限制有效的免疫应答。辐射通过诱导肿瘤细胞凋亡, 衰老, 自噬来介导抗肿瘤作用, 并且在某些情况下, 可以刺激更有效的免疫应答。

[0255] 吸收效应是一种生理过程, 其中原发性肿瘤的靶向放射在不在放射野的远处部位诱导抗肿瘤反应。负责远隔效应的机制被认为是免疫介导的并且涉及肿瘤抗原向 T 细胞的

增强呈递以及细胞因子和刺激局部和全身免疫应答的其他促炎因子的释放。由于远隔效应影响远离接受放射治疗的原发肿瘤的肿瘤,因此可以引发远隔效应的药物在治疗转移性肿瘤方面特别有利,转移性肿瘤一旦扩散到身体中的次要部位,从而通常更难以治疗。

[0256] 本文所述的抗-glycPD-1抗体或糖基化的PD-1多肽可刺激局部和全身免疫应答。在一些实施方案中,在放射疗法之前,同时或之后施用治疗有效量的如本文所述的抗体,多肽或药物组合物,以实现协同的远隔效应。

[0257] 在一些实施方案中,施用治疗有效量的本文所述的抗体,多肽或药物组合物,其有效地使宿主中的肿瘤对辐射敏感。照射可以是电离辐射,特别是 $\gamma$ 辐射。在一些实施例中,伽马辐射由线性加速器或放射性核素发射。放射性核素对肿瘤的照射可以是外部的或内部的。

[0258] 在一些实施方案中,本文所述的抗体,多肽或药物组合物的施用在肿瘤照射之前开始长达一个月,特别是长达10天或一周。另外,分割肿瘤的照射,本文所述的抗体,多肽或药物组合物的施用维持在第一次和最后一次照射期之间的间隔。

[0259] 照射也可以是X射线辐射。X射线的剂量范围从50至200伦琴的日剂量延长的时间段(3至4周),到单剂量的2000至6000伦琴。放射性同位素的剂量范围变化很大,取决于同位素的半衰期,发射的辐射强度和类型以及肿瘤细胞的摄取。

#### [0260] 免疫治疗

[0261] 技术人员将理解,免疫疗法可以与实施方案的方法组合使用或与其结合使用。在癌症治疗的背景下,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®**)就是这样一个例子。检查点抑制剂,例如ipilimumab, pembrolizumab, nivolumab和atezolizumab是其他实例。免疫效应物可以是,例如,对肿瘤细胞表面上的某些标记物具有特异性的抗体。单独的抗体可以作为治疗的效应物,或者它可以募集其他细胞以实际影响细胞杀伤。抗体还可以与药物或毒素(例如,化学治疗剂,放射性核素,蓖麻毒蛋白A链,霍乱毒素,百日咳毒素)缀合,并且仅用作靶向剂。或者,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。各种效应细胞包括细胞毒性T细胞和NK细胞。

[0262] 在免疫疗法的一个方面,肿瘤细胞具有一些易于靶向的标记,即不存在于大多数其他细胞上。存在许多肿瘤标志物,并且这些中的任何一种都适合于在本发明实施方案的背景下靶向。常见的肿瘤标志物包括CD20,癌胚抗原,酪氨酸酶(p97),gp68,TAG-72,HMFG,唾液酸Lewis抗原,MucA,MucB,PLAP,层粘连蛋白受体,erb B和p155。免疫疗法的另一方面是将抗癌作用与免疫刺激作用相结合。还存在免疫刺激分子,包括:细胞因子,例如IL-2, IL-4, IL-12, GM-CSF,  $\gamma$ -IFN,趋化因子,例如MIP-1, MCP-1, IL-8和生长因子,例如FLT3配体。

[0263] 目前正在研究或使用的免疫疗法的实例是免疫佐剂,例如牛分枝杆菌,恶性疟原虫,二硝基氯苯和芳族化合物(美国专利号5,801,005和5,739,169;Hui and Hashimoto, Infect Immun., 66(11):5329-36(1998);Christodoulides等人, Microbiology, 66(11):5329-36(1998));细胞因子治疗,例如干扰素 $\alpha$ ,  $\beta$ 和 $\gamma$ , IL-1, GM-CSF和TNF(Bukowski等, Clin Cancer Res, 4(10):2337-47(1998);Davidson等, J Immunother, 21(5):389-98(1998);Hellstrand等, Acta Oncol. 37(4):347-53(1998));基因治疗,例如TNF, IL-1, IL-2



和p53 (Qin等, Proc Natl Acad Sci USA, 95 (24):14411-6 (1998); Austin-Ward和Villaseca, Rev Med Chil, 126 (7):838-45 (1998); 美国专利号5,830,880和5,846,945); 和单克隆抗体, 例如抗PD1, 抗PDL1, 抗CD20, 抗神经节苷脂GM2和抗p185 (Topalian等, The New England journal of medicine, 366:2443-2454 (2012); Brahmer等, The New England journal of medicine 366:2455-2465 (2012); Hollander, Front Immunol (2012):3:3.doi:10.3389/fimmu.2012.00003; Hanibuchi等, Int J Cancer, 78 (4):480-5 (1998); 美国专利号5,824,311); 所有这些都通过引用整体并入本文。预期一种或多种抗癌疗法可与本文所述的治疗一起使用, 其涉及使用抗-glycPD-1抗体或糖基化的PD-1多肽。

#### [0264] 手术

[0265] 大约60%的患有癌症的人将接受某种类型的手术, 包括预防性, 诊断性或分期, 治愈性和姑息性手术。治愈性手术包括切除, 其中全部或部分癌组织被物理移除, 切除和/或破坏, 并且可以与其他疗法结合使用, 例如本实施方案的治疗, 化学疗法, 放射疗法, 激素疗法, 基因疗法, 免疫疗法和/或替代疗法。肿瘤切除是指至少部分肿瘤的物理移除。除肿瘤切除外, 手术治疗包括激光手术, 冷冻手术, 电外科手术和显微外科手术 (莫氏手术)。

[0266] 在切除部分或全部癌细胞, 组织或肿瘤后, 可在体内形成腔。可以通过灌注, 直接注射或局部施用该区域以及另外的抗癌疗法来完成治疗。这种治疗可以重复, 例如, 每1、2、3、4、5、6或7天, 或每1、2、3、4和5周或每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月重复一次。这些治疗也可以是不同的剂量。

#### [0267] 其他药剂

[0268] 预期其他药剂可以与本发明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连接上调的试剂, 细胞抑制和分化试剂, 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, 或其他生物试剂。通过提高GAP连接的数量来增加细胞间信号传导可以增加对邻近的过度增殖细胞群的抗过度增殖作用。在其他实施方案中, 细胞抑制剂或分化剂可以与本发明实施方案的某些方面组合使用, 以改善治疗的抗过度增殖功效。预期细胞粘附的抑制剂可改善本发明实施方案的功效。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。进一步预期增加过度增殖细胞对细胞凋亡的敏感性的其他试剂, 例如抗体c225, 可以与本发明实施方案的某些方面组合使用以改善治疗功效。

#### [0269] 试剂盒和诊断

[0270] 在各个方面, 本文提供了包含治疗剂和/或其他治疗剂和递送剂的试剂盒。在一些实施方案中, 预期试剂盒用于制备和/或施用本文提供的疗法。试剂盒可包含一个或多个密封的小瓶, 其含有本文提供的任何药物组合物。试剂盒可包括, 例如, 至少抗-glycPD-1抗体, 或糖基化的PD-1多肽, 以及制备、配制和/或施用本文提供的组分或进行本文提供的方法一个或多个步骤的试剂。

[0271] 在一些实施方案中, 试剂盒可包括抗-glycPD-1抗体和至少一种辅助试剂。在一些实施方案中, 试剂盒可包括糖基化的PD-1多肽和至少一种辅助试剂。

[0272] 在一些实施方案中, 试剂盒还包含第二抗癌剂。第二种抗癌剂可以是化学治疗剂, 免疫治疗剂, 激素治疗剂或细胞因子。

[0273] 在一些实施方案中, 试剂盒还可以包括合适的容器装置, 其是不与试剂盒的组分

反应的容器,例如eppendorf管,测定板,注射器,瓶子或管。容器可由可消毒的材料制成,例如塑料或玻璃。

[0274] 试剂盒可以进一步包括说明书,其概述了本文所述方法的程序步骤,并且将遵循与本文所述或本领域普通技术人员已知的基本相同的程序。指令信息可以在包含机器可读指令的计算机可读介质中,当使用计算机执行时,所述机器可读指令使得显示递送药理学有效量的本文提供的抗体或多肽的真实或虚拟程序。该试剂盒还可以包括由管理药品或生物制品的制造、使用或销售的政府机构规定的形式的通知,该通知反映了制造、使用或销售机构对人类施用的批准。

## 实施例

[0275] 应理解,还考虑了不会实质上改变本文所述各种实施方案的性质和精神的修改。因此,以下实施例旨在举例说明而不以任何方式进行限制。

### [0276] 材料和方法

[0277] 细胞培养,稳定的转染子和转染。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/F I 2或RPMI I 640培养基中生长。使用嘌呤霉素(InvivoGen, San Diego, CA, USA)选择HEK293T细胞中的PD-1稳定转染子。对于瞬时转染,使用SN脂质体(Hu, MC等, 2004, Cell, 117:225-237) lipofectamine<sup>TM</sup> 2000和 lipofectamine LTX (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), 用DNA (例如编码PD-1的DNA) 瞬时转染细胞。。

[0278] 使用慢病毒感染产生稳定细胞。PD-1基因购自Origene (rockville, MD, USA), 并克隆到pCDH慢病毒表达载体中,以使用已知的分子生物学技术建立PD-1-Flag表达细胞系。使用pCDHI PD-1-Flag表达载体作为模板,通过进行定点诱变产生PD-1-Flag NQ突变体N49Q, N58Q, N74Q, N116Q和4NQ (N49Q/N58Q/N79Q/N116Q)。使用酶消化和DNA测序确认所有构建体。为了产生稳定表达PD-1的细胞,用lipofectamin LTX转染试剂将质粒转染到293T细胞中。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离心以消除细胞碎片,并通过0.45- $\mu$ m过滤器过滤。在感染前12小时以50%汇合接种细胞,并用含有慢病毒的培养基替换培养基。感染24小时后,用新鲜培养基替换培养基,用1 $\mu$ g/ml嘌呤霉素(InvivoGen)选择感染细胞。

[0279] 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, 2008, Gastroenterology, 135:2I 28-40; 和Lee等, 2007, Cell, 130:440-455)。使用Bio-Rad ChemiDoc成像系统(Bio-Rad, Hercules, CA, USA)进行谱带强度的图像采集和定量。对于免疫细胞化学,将细胞在室温下在4%多聚甲醛中固定15分钟,在5%Triton X-100中透化5分钟,然后使用第一抗体染色。使用的第二抗体是抗小鼠AlexaFluor 488或594染料缀合物和/或抗兔Alexa Fluor 488或594染料缀合物(Life Technologies)。细胞核用4', 6-二苯基-2-苯基吡啶(DAPI蓝)(Life Technologies)染色。安装后,使用多光子共聚焦激光扫描显微镜(Nikon A1+, Melville, NY, USA)使细胞可视化。

[0280] 流式细胞术。通过胰蛋白酶消化分离过表达PD-1野生型和突变蛋白或对照载体的细胞,并以 $2 \times 10^6$ 个细胞/mL收集在细胞染色缓冲液(CSB)(BioLegend, San Diego, CA, US)中。将50 $\mu$ L细胞等分至96孔圆底板,向其中加入50 $\mu$ L 20 $\mu$ g/mL一抗,然后温和混合并在4 $^{\circ}$ C

在黑暗中孵育1小时。用CSB洗涤细胞,与抗小鼠IgG-PE缀合物(10 $\mu$ g/mL)与DAPI(1:100)在黑暗中于21 $^{\circ}$ C孵育30分钟。洗涤细胞并使用Guava EasyCyte HT (Millipore Darmstadt, DE)或FACS Celesta (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, US)流式细胞仪获得数据。

[0281] PD-L1和PD-1 (PD-L1/PD-1)相互作用测定。为了测量PD-1蛋白和PD-L1蛋白的相互作用,将表达PD-1的细胞在室温下在4%多聚甲醛中固定15分钟,然后与重组人PD-L1-Fc嵌合蛋白(R&D Systems)一起孵育1小时。使用的二抗是抗人Alexa Fluor 488染料缀合物(Life Technologies)。然后使用实时显微镜IncuCyte (Essen BioScience, Ann Arbor, Michigan, USA)监测Alexa Fluor 488染料的荧光强度。

[0282] 通过Octet进行 $K_d$ 测定和分仓。对于高通量 $K_d$ 筛选,通过20nM溶液将抗体配体加载到传感器。在含有1mg/ml牛血清白蛋白的PBS(测定缓冲液)中建立基线,通过将传感器浸没在测定缓冲液中的单一浓度的分析物中进行结合步骤。进行解离并在新鲜测定缓冲液中监测。所有实验均在1,000rpm振荡下以传感器进行。ForteBio的数据分析软件用于将数据拟合到1:1结合模型,以提取缔合率和解离率。使用比率 $K_d/k_a$ 计算 $K_d$ 。在典型的表位分仓测定中,将抗原PD-1-His(10nM)与第二抗体(10nM)在室温下预孵育1小时。将对照抗体(20nM)加载到AMC传感器(ForteBio)上,并用全小鼠IgG抗体(Jackson ImmunoResearch)阻断传感器上剩余的Fc结合位点。将传感器暴露于预孵育的抗原-第二抗体混合物。使用ForteBio数据分析软件7.0处理原始数据,并评估抗体对的竞争性结合。第二抗体的额外结合表明未占据的表位(非竞争者),而没有结合表明表位阻断(竞争者)。

[0283] PD-1的糖基化的分析。为了证实PD-1蛋白的糖基化,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。

[0284] 统计分析。条形图中的数据表示相对于未处理组或对照组的平均倍数变化,具有三个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和BLBC亚群之间的相关性。对实验数据进行学生t检验。AP值<0.05被认为具有统计学意义。

[0285] 实施例1:糖基化的PD-1与PD-L1结合。

[0286] PD-1糖基化在PD-L1结合中的作用用PD-1/PD-L1结合试验测试,其中使用表达在N49, N58, N79和N116具有糖基化的野生型PD-1的293T细胞,和使用表达突变体PD-1的293T细胞,其中天冬酰胺在所有这些位置被谷氨酰胺取代以阻断糖基化。因此,突变体4NQ是N49Q/N58Q/N79Q/N116Q。将细胞与荧光标记的PD-L1-Fc融合蛋白一起孵育。根据制造商的说明,每小时通过IncuCyte<sup>TM</sup>Zoom量化配体和受体结合。图1A显示表达野生型(即糖基化的)PD-1的细胞被PD-L1-Fc融合蛋白染成绿色。另一方面,图1B显示标记的PD-L1-Fc融合体不结合表达未被糖基化的4NQ突变体PD-1的细胞。图1C描绘了在24小时内野生型,糖基化的PD-1表达细胞和4NQ突变体,非糖基化的PD-1表达细胞的绿色染色水平。PD-L1-Fc与野生型,糖基化的PD-1表达细胞的结合在24小时内增加,而PD-L1-Fc与4NQ,非糖基化的突变体PD-1表达细胞的结合可忽略不计。该实验表明PD-L1与糖基化的PD-1的结合比对非糖基化的PD-1的亲合力大得多。

[0287] 为了确定PD-1-PD-L1接合是否需要糖基化,进行免疫共沉淀和蛋白质印迹分析以评估表达PD-1WT或4NQ的293T细胞中PD-1和PD-L1的相互作用。将表达PD-1WT和4NQ的293T细胞的裂解物与或不与PD-L1/Fc融合蛋白一起孵育,然后用抗Flag树脂免疫沉淀PD-1蛋

白,并通过蛋白质印迹分析,用抗人IgG-HRP检测PD-L1/Fc和抗Flag抗体以检测PD-1蛋白。如图1D所示,当PD-L1/Fc与野生型糖基化的PD-1孵育时,观察到PD-L1与PD-1结合(如通过顶行上的抗hIgG-HRP抗体检测),但是当PD-L1/Fc与非糖基化的4NQ PD-1突变体一起孵育时,未观察到结合。抗FLAG抗体检测野生型和4NQ PD-1蛋白以及PD-L1/Fc作为对照。结果支持PD-L1和PD-1缔合需要糖基化。

[0288] 实施例2:抗PD-1抗体的产生。

[0289] 根据标准方案,通过将SP2/0鼠骨髓瘤细胞与分离自人PD-1免疫的BALB/c小鼠(n=6)(Antibody Solutions, Inc., Sunnyvale, CA, USA)的脾细胞融合,获得产生针对糖基化的人PD-1产生的单克隆抗体的杂交瘤。在融合之前,使用FACS分析验证来自免疫小鼠的血清与PD-1免疫原的结合。生成产生单克隆抗体(MAb)的杂交瘤。再次测试产生抗体的杂交瘤的特异性。

[0290] 为此,选择超过100个产生MAb的候选杂交瘤,在ADCF培养基中生长,并浓缩和纯化其含有单克隆抗体的上清液。与非糖基化的PD-1相比,筛选候选单克隆抗体与糖基化的PD-1的优先结合。过表达PD-1WT(完全糖基化的)的T293细胞用生物素标记,然后与过表达完全非糖基化的PD-1的T293细胞混合。将混合细胞用针对PD-1的一抗孵育,并进一步用缀合有FITC的二抗洗涤。洗涤后,测量荧光强度(MFI)以评估抗体与膜结合的糖基化的或非糖基化的PD-1的相对结合。与非糖基化的PD-1相比,在糖基化的PD-1上表现出显著更高的MFI的抗体被鉴定为抗-glycPD-1抗体。

[0291] 使用活细胞成像测定Incucyte™(Essen Bioscience)测试纯化的MAb中和或抑制PD-L1和PD-1之间的相互作用(PD-L1/PD-1结合相互作用)的能力。对于该测定,将表达PD-1的293T细胞与抗人PD-1抗体和荧光标记的PD-L1-Fc融合蛋白一起孵育。根据制造商的说明,每小时通过Incucyte™Zoom量化配体和受体结合。

[0292] 与非糖基化的PD-1相比,鉴定出两种优选与糖基化的PD-1结合的抗-glycPD-1抗体,STM413和STM432。表3中提供了单克隆抗体的重链和轻链可变结构域的序列。使用**BIACORE®**测定法表征抗体与糖基化的PD-1的结合动力学。结果提供于下表6中。

[0293] 表6. 与PD-1结合的抗-glycPD-1抗体的BIACORE测定。

抗原	抗原	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	$K_D$ (M)
STM418	PD-1-His	$8.44 \times 10^4$	$7.78 \times 10^{-6}$	$9.22 \times 10^{-11}$
STM432	PD-1-His	$1.79 \times 10^4$	$5.30 \times 10^{-3}$	$2.96 \times 10^{-7}$

[0295] 使用抗体-抗原交联的针对糖基化的PD-1肽片段的高质量MALDI分析来测定糖基化的PD-1上的STM418表位。确定抗体的表位包括来自SEQ ID NO:1的氨基酸34至44、49至59和104至124的糖基化的PD-1区域:

[0296]  $^{34}$ PPTESPALLV $^{44}$ ... $^{49}$ NATFTCSFSNT $^{59}$ ... $^{104}$ RDFHMSVVRARRNDSGYLCG $^{124}$

[0297] (SEQ ID NO:1的氨基酸34至44、49至59和104至124)其中通过抗体-抗原交联实验鉴定的结合接触在SEQ ID NO:1的位置36、38、51、53、55、109、115、118和121用下划线标出。

[0298] 使用抗体-抗原交联的高质量MALDI分析测定糖基化的PD-1上的STM432表位。在人PD-1序列中如下鉴定表位。

[0299]  $^{91}$ D $\underline{C}$ RERVTQLPNGR $\underline{D}$ FHM $^{107}$ ----- $^{123}$ CGAISLAPKAQI $^{134}$

[0300] (SEQ ID NO:1的氨基酸91至107和123至134)。表位从SEQ ID NO:1的PD-1的氨基

酸序列的位置D91延伸到位置M107,然后从位置C123延伸到位置I134。加下划线的位置R95, R103, S127和K131是显示与PD-1抗原交联的位置。

[0301] 通过蛋白质免疫印迹分析测试单克隆抗体STM418和STM432与糖基化的野生型和突变体PD-1-Fc的结合,其中突变体PD-1蛋白通过突变天冬酰胺(N)为谷氨酰胺(Q)除去一个或多个糖基化位点和用PNGase F处理野生型PD-1以促去除糖基化。通过蛋白质印迹分析分析0.5μg各PD-1-Fc蛋白(野生型和突变体N49Q, N58Q和N74Q)和PNGase F处理的野生型PD-1,并用STM418和STM432探测,如用山羊抗小鼠二抗检测的。图2显示STM418结合糖基化的野生型PD-1和其在49和58位糖基化位点的突变体的PD-1(即在74和116位是糖基化的),但不与具有74位的突变糖基化位点的PD-1或已通过PNGase F处理而去糖基化的野生型PD-1结合。STM432与野生型糖基化的PD-1和在58位具有突变糖基化位点的PD-1结合,但不与具有在49或74位置的突变糖基化位点的PD-1或通过用PNGase F处理而去糖基化的野生型PD-1结合。

[0302] 使用流式细胞术测定抗-glycPD-1抗体与表达野生型PD-1、突变体PD-1蛋白的293T细胞或对照293T细胞的结合。测定STM418和STM432与表达野生型PD-1, N49Q PD-1, N58Q PD-1, N74Q PD-1, N116Q PD-1和4NQ PD-1(在49、58、74和116位具有N至Q取代的突变)的293T细胞和不表达PD-1的对照293T细胞的结合。图3A和3B显示了与抗-glycPD-1抗体或对照和荧光标记的第二抗体孵育后细胞的流式细胞术结果,并测量为MFI或测量的荧光强度。图3C显示了对照小鼠IgG孵育的结果。抗-glycPD-1抗体和对照抗体与表达野生型和突变PD-1蛋白的细胞和对照细胞的结合的MFI在下表7中给出。数据显示STM418结合野生型、糖基化的PD-1,其MFI是结合非糖基化的4NQ突变体PD-1的MFI的大约128倍,并且STM432与野生型、糖基化的PD-1结合,其MFI是结合非糖基化的4NQ突变体PD-1的MFI的大约43倍。

[0303] 表7. 与表达PD-1的细胞结合的抗GlycPD-1抗体的MFI值。

[0304]

MAb	293T WTPD -1 MFI	293T N49PD -1 MFI	293T N58PD -1 MFI	293T N74PD -1 MFI	293T N116PD -1 MFI	293T 4NQPD -1 MFI	293 T 空 白 MF I
STM4 18	3610	607	880	971	108	28	27
STM4 32	1136	32	413	29	31	26	29
小 鼠	52	31	106	26	28	26	27

[0305]

IgG							
-----	--	--	--	--	--	--	--

[0306] 实施例3. 抗GlycPD-1抗体中和活性

[0307] 为了测量抗体对PD-1和PD-L1蛋白相互作用的抑制,将过表达PD-1的293T细胞接

种到96孔板中并与STM418或STM432抗体、重组人PD-L1-Fc蛋白和抗人Fc-Alexa Fluor 488染料缀合物(Life Technologies, Carlsbad, CA, US)一起孵育。通过IncuCyte™Zoom装置每2小时测量绿色荧光,并通过IncuCyte™Zoom Software (Essen BioScience, Ann Arbor, MI, USA)定量。图4A显示了在18小时内,在抗-glycPD-1抗体STM418浓度为0.03μg/ml至4.0μg/ml的情况下,PD-L1-Fc与表达PD-1的细胞的结合。STM418以浓度依赖性方式抑制PD-L1-Fc与表达PD-1的细胞的结合。图4B绘制了STM418的浓度相对PD-1-PD-L1结合的活性百分比,以计算EC<sub>50</sub>为0.132μg/ml。图5A显示了在18小时内,在浓度为0.03μg/ml至4.0μg/ml的抗-glycPD-1抗体STM432存在下,PD-L1-Fc与表达PD-1的细胞的结合。STM432以浓度依赖性方式抑制PD-L1-Fc与表达PD-1的细胞的结合。图5B绘制了STM432的浓度相对PD-1-PD-L1结合的活性百分比,以计算EC<sub>50</sub>为0.110μg/ml。

[0308] 实施例4. 抗GlycPD-1抗体对T细胞杀伤的影响。

[0309] 为了在T细胞存在下测定抗-glycPD-1抗体对癌细胞的作用,通过磁性αCD3-分离抗体试剂盒从人PBMC分离T细胞,然后通过100ng/mL αCD3抗体和10ng/mL IL-2孵育72小时来活化。将活化的T细胞加入在具有RPMI 1640和10μg/mL STM418、STM432抗体或作为对照的mIgG1同种型的96孔板中的预先接种的用NucLight Red Lentivirus试剂(Essen BioScience, Ann Arbor, MI, USA)标记的BT549癌细胞。使用Incucyte Zoom (Essen Biosciences)通过Incucyte Zoom 2016软件计算的红核图像计数(增殖)随时间过去检测癌细胞的T细胞杀伤。图6显示与在对照鼠IgG同种型孵育的活化T细胞存在下的癌细胞相比,在活化T细胞和STM418或STM432抗体存在下90小时内癌细胞增殖的减少。

[0310] 实施例5: 抗体人源化

[0311] 如上所述,出于某些目的,包括例如,用于人体疾病的体内治疗,优选使用小鼠单克隆抗体的人源化衍生物。为了形成这种人源化抗体,首先将小鼠单克隆抗体的框架序列(“亲本”序列)与一组“受体”人抗体的框架序列比对,以鉴定框架序列的差异。通过替换亲本和受体之间的非匹配框架残基来实现人源化。分析潜在重要位置的取代,例如游标区、V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>链间界面或CDR典型类别确定位置的取代,以进行预期的回复突变(参见, Foote, J.等, J. Molec. Biol. 224:487-499 (1992))。

[0312] 保守结构域数据库(COD) (Marchler-Bauer, 等人(2011) Nucleic Acids Res. 39: D225-D229)可用于确定每个氨基酸链的结构域含量和每个结构域的近似边界。根据几种常用定义(Kabat, EA等人(1991) “Sequences of Proteins of Immunological Interest”, 第五版. NIH Publication No. 91-3242; Chothia, C.等, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Honegger, A.等, J. Molec. Biol. 309 (3):657-670 (2001)), 可沿着CDR的边界精确确定可变结构域边界。

[0313] 使用MAFFT (Kato, K.等, Nucleic Acids Res. 30:3059-3066 (2002))产生亲本序列与小鼠和人种系序列的多重比对,并且每个比对中的条目根据与亲本序列的序列同一性进行排序。通过以100%序列同一性聚类并排除冗余条目,将参考集简化为唯一的序列集。

[0314] 最优受体框架选择基于在两条链的框架上与受体的总体亲本抗体序列同一性;然而,组成V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>链间界面的位置特别令人感兴趣。另外,将负责已经为5个CDR所定义的离散的典型结构集的CDR环长度和CDR位置(Chothia, C.等, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Martin, A. C.等人, J. Molec. Biol. 263:800-815 (1996); Al-Laziniki, B.等人,

J.Molec.Biol.273:927-948 (1997)) 与种系进行比较,以确定哪些种系框架具有相同的界面残基并且已知支持相似的CDR-环构象。

[0315] 基于亲本抗体序列与人种系的比对,鉴定最接近的匹配条目。优选的人种系的选择基于有序标准:(1) 整个框架的序列同一性;(2) 相同或相容的链间界面残基;(3) 具有亲本CDR典型构象的支撑环;(4) 在表达的抗体中发现重链和轻链种系的组合;(5) 必须除去的N-糖基化位点的存在。

[0316] 产生人源化抗体的Fv区的结构模型。FR和CDR以及完整Fv的候选结构模板片段基于它们与靶标的序列同一性以及模板结构的定性结晶学测量例如分辨率、埃(Å)从抗体数据库进行评分、排序和选择,。

[0317] 为了使CDR与FR模板在结构上对齐,CDR的任一侧上的5个残基包括在CDR模板中。基于重叠区段产生片段的比对,并产生结构序列比对。模板片段连同比对由MODELLER处理(Sali,A.等人;J.Molec.Biol.234:779-815 (1993))。该方案产生从对齐的结构模板集合导出的构象约束。通过缀合梯度和模拟退火优化程序产生满足约束的结构集合。基于能量分数从该集合中选择模型结构,所述能量分数源自蛋白质结构的得分和构象约束的满足。检查模型,并使用侧链优化算法优化目标和模板之间不同位置的侧链,并最小化能量。一套可视化和计算工具用于评估CDR构象变异性,局部包装和表面分析以选择一种或多种优选模型。

[0318] 构建亲本抗体的结构模型并检查缺陷,例如差的原子堆积,键长、键角或二面角的应变。这些缺陷可能表明抗体结构稳定性的潜在问题。建模方案旨在最小化这种缺陷。人源化Fv的初始结构模型包含所有安全取代(即,不应影响结合亲和力或稳定性的取代)和谨慎取代(即,进行位置取代,但该位置对于结合亲和力可能是重要的)。被认为与降低结合亲和力或降低稳定性的风险相关的位置处的取代不会改变。模板搜索和选择与亲本模板搜索分开执行,以便创建一个良好的独立模型,而不是亲本的紧密匹配的变体模型。随着对潜在取代的评估,更新模型以反映优选的取代和反向突变的影响。

[0319] 在整个申请中,已经引用了各种出版物。这些出版物的公开内容通过引用整体并入本申请中,以便更全面地描述本公开所属领域的现有技术。虽然本文提供了某些特定实施方案的实例,但是对于本领域技术人员显而易见的是,可以进行各种改变和修改。这些修改也旨在落入所附权利要求的范围内。

[0001]	序列表															
[0002]	<110> 斯特库比股份有限公司															
[0003]	德克萨斯大学体系董事会															
[0004]	<120>特异于糖基化的PD-1的抗体及其使用方法															
[0005]	<130> 24258.105005PCT															
[0006]	<140>															
[0007]	<141>															
[0008]	<150> 62/262,303															
[0009]	<151> 2015-12-02															
[0010]	<160> 42															
[0011]	<170> PatentIn version 3.5															
[0012]	<210> 1															
[0013]	<211> 288															
[0014]	<212> PRT															
[0015]	<213> 智人															
[0016]	<400> 1															
[0017]	Met	Gln	Ile	Pro	Gln	Ala	Pro	Trp	Pro	Val	Val	Trp	Ala	Val	Leu	Gln
[0018]	1				5					10					15	
[0019]	Leu	Gly	Trp	Arg	Pro	Gly	Trp	Phe	Leu	Asp	Ser	Pro	Asp	Arg	Pro	Trp
[0020]					20					25					30	
[0021]	Asn	Pro	Pro	Thr	Phe	Ser	Pro	Ala	Leu	Leu	Val	Val	Thr	Glu	Gly	Asp
[0022]					35					40					45	
[0023]	Asn	Ala	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Asn	Thr	Ser	Glu	Ser	Phe	Val
[0024]					50					55					60	
[0025]	Leu	Asn	Trp	Tyr	Arg	Met	Ser	Pro	Ser	Asn	Gln	Thr	Asp	Lys	Leu	Ala
[0026]																
[0027]	Ala	Phe	Pro	Glu	Asp	Arg	Ser	Gln	Pro	Gly	Gln	Asp	Cys	Arg	Phe	Arg
[0028]																
[0029]	Val	Thr	Gln	Leu	Pro	Asn	Gly	Arg	Asp	Phe	His	Met	Ser	Val	Val	Arg
[0030]																
[0031]	Ala	Arg	Arg	Asn	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Leu	Cys	Gly	Ala	Ile	Ser	Leu
[0032]																
[0033]	Ala	Pro	Lys	Ala	Gln	Ile	Lys	Glu	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Leu	Arg	Val
[0034]																
[0035]	Thr	Glu	Arg	Arg	Ala	Glu	Val	Pro	Thr	Ala	His	Pro	Ser	Pro	Ser	Pro
[0036]																
[0037]	Arg	Pro	Ala	Gly	Gln	Phe	Gln	Thr	Leu	Val	Val	Gly	Val	Val	Gly	Gly
[0038]																



[0039]	Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
[0040]	180 185 190
[0041]	Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
[0042]	195 200 205
[0043]	Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
[0044]	210 215 220
[0045]	Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
[0046]	225 230 235 240
[0047]	Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
[0048]	245 250 255
[0049]	Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
[0050]	260 265 270
[0051]	Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
[0052]	275 280 285
[0053]	<210> 2
[0054]	<211> 348
[0055]	<212> DNA
[0056]	<213> 人工序列
[0057]	<220>
[0058]	<223> 人工序列的描述:合成的多核苷酸
[0059]	<400> 2
[0060]	gaagtgatgc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
[0061]	tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgtcagact 120
[0062]	ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtgggt gtggtggtaa cacctactat 180
[0063]	ccagacactg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
[0064]	ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccttgt attattgtac aagctattac 300
[0065]	tacgggattg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctca 348
[0066]	<210> 3
[0067]	<211> 116
[0068]	<212> PRT
[0069]	<213> 人工序列
[0070]	<220>
[0071]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽
[0072]	<400> 3
[0073]	Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
[0074]	1 5 10 15
[0075]	Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[0076]	20 25 30
[0077]	Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val

[0078]	35	40	45
[0079]	Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val		
[0080]	50	55	60
[0081]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr		
[0082]	65	70	75
[0083]	Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys		
[0084]	85	90	95
[0085]	Thr Ser Tyr Tyr Tyr Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu		
[0086]	100	105	110
[0087]	Thr Val Ser Ser		
[0088]	115		
[0089]	<210> 4		
[0090]	<211> 324		
[0091]	<212> DNA		
[0092]	<213> 人工序列		
[0093]	<220>		
[0094]	<223> 人工序列的描述:合成的多核苷酸		
[0095]	<400> 4		
[0096]	gacattgtga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60		
[0097]	atcacctgca aggccagtca ggatgtgagt actgctgtag cctggtatca acaaaaacca 120		
[0098]	gggcaatctc ctaaattact gatttactgg gcatccaccc ggcaaactgg agtcacctgat 180		
[0099]	cgcttcacag gcagtggatc tgggacagag tatactctca ccatcagcag tgtgcaggct 240		
[0100]	gaagacctgg cactttatta ctgtcagcaa cattatagca ttccgtggac gttcggtgga 300		
[0101]	ggcaccaagc tggaaatcaa acgg 324		
[0102]	<210> 5		
[0103]	<211> 108		
[0104]	<212> PRT		
[0105]	<213> 人工序列		
[0106]	<220>		
[0107]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽		
[0108]	<400> 5		
[0109]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly		
[0110]	1 5 10 15		
[0111]	Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala		
[0112]	20 25 30		
[0113]	Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile		
[0114]	35 40 45		
[0115]	Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Gln Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly		
[0116]	50 55 60		

[0117]	Ser Gly Ser Gly Thr Glu Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
[0118]	65 70 75 80
[0119]	Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Ile Pro Trp
[0120]	85 90 95
[0121]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
[0122]	100 105
[0123]	<210> 6
[0124]	<211> 7
[0125]	<212> PRT
[0126]	<213> 人工序列
[0127]	<220>
[0128]	<223> 人工序列的描述:合成的肽
[0129]	<400> 6
[0130]	Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
[0131]	1 5
[0132]	<210> 7
[0133]	<211> 6
[0134]	<212> PRT
[0135]	<213> 人工序列
[0136]	<220>
[0137]	<223> 人工序列的描述:合成的肽
[0138]	<400> 7
[0139]	Ser Gly Gly Gly Gly Asn
[0140]	1 5
[0141]	<210> 8
[0142]	<211> 7
[0143]	<212> PRT
[0144]	<213> 人工序列
[0145]	<220>
[0146]	<223> 人工序列的描述:合成的
[0147]	肽
[0148]	<400> 8
[0149]	Tyr Tyr Tyr Gly Ile Asp Tyr
[0150]	1 5
[0151]	<210> 9
[0152]	<211> 10
[0153]	<212> PRT
[0154]	<213> 人工序列
[0155]	<220>

[0156] <223> 人工序列的描述:合成的肽  
[0157] <400> 9  
[0158] Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly Met Ser  
[0159] 1 5 10  
[0160] <210> 10  
[0161] <211> 10  
[0162] <212> PRT  
[0163] <213> 人工序列  
[0164] <220>  
[0165] <223> 人工序列的描述:合成的肽  
[0166] <400> 10  
[0167] Thr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asn Thr Tyr  
[0168] 1 5 10  
[0169] <210> 11  
[0170] <211> 5  
[0171] <212> PRT  
[0172] <213> 人工序列  
[0173] <220>  
[0174] <223> 人工序列的描述:合成的肽  
[0175] <400> 11  
[0176] Ser Tyr Gly Met Ser  
[0177] 1 5  
[0178] <210> 12  
[0179] <211> 17  
[0180] <212> PRT  
[0181] <213> 人工序列  
[0182] <220>  
[0183] <223> 人工序列的描述:合成的肽  
[0184] <400> 12  
[0185] Thr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys  
[0186] 1 5 10 15  
[0187] Gly  
[0188] <210> 13  
[0189] <211> 6  
[0190] <212> PRT  
[0191] <213> 人工序列  
[0192] <220>  
[0193] <223> 人工序列的描述:合成的肽  
[0194] <400> 13

[0195]	Ser Ser Tyr Gly Met Ser
[0196]	1 5
[0197]	<210> 14
[0198]	<211> 13
[0199]	<212> PRT
[0200]	<213> 人工序列
[0201]	<220>
[0202]	<223> 人工序列的描述:合成的肽
[0203]	<400> 14
[0204]	Trp Val Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Gly Asn Thr Tyr
[0205]	1 5 10
[0206]	<210> 15
[0207]	<211> 8
[0208]	<212> PRT
[0209]	<213> 人工序列
[0210]	<220>
[0211]	<223> 人工序列的描述:合成的肽
[0212]	<400> 15
[0213]	Thr Ser Tyr Tyr Tyr Gly Ile Asp
[0214]	1 5
[0215]	<210> 16
[0216]	<211> 11
[0217]	<212> PRT
[0218]	<213> 人工序列
[0219]	<220>
[0220]	<223> 人工序列的描述:合成的肽
[0221]	<400> 16
[0222]	Lys Ala Ser Gln Asp Tyr Ser Thr Ala Val Ala
[0223]	1 5 10
[0224]	<210> 17
[0225]	<211> 7
[0226]	<212> PRT
[0227]	<213> 人工序列
[0228]	<220>
[0229]	<223> 人工序列的描述:合成的肽
[0230]	<400> 17
[0231]	Trp Ala Ser Thr Arg Gln Thr
[0232]	1 5
[0233]	<210> 18

[0234] <211> 9  
[0235] <212> PRT  
[0236] <213> 人工序列  
[0237] <220>  
[0238] <223> 人工序列的描述:合成的肽  
[0239] <400> 18  
[0240] Gln Gln His Tyr Ser Ile Pro Trp Thr  
[0241] 1 5  
[0242] <210> 19  
[0243] <211> 7  
[0244] <212> PRT  
[0245] <213> 人工序列  
[0246] <220>  
[0247] <223> 人工序列的描述:合成的肽  
[0248] <400> 19  
[0249] Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr  
[0250] 1 5  
[0251] <210> 20  
[0252] <211> 10  
[0253] <212> PRT  
[0254] <213> 人工序列  
[0255] <220>  
[0256] <223> 人工序列的描述:合成的肽  
[0257] <400> 20  
[0258] Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Gln  
[0259] 1 5 10  
[0260] <210> 21  
[0261] <211> 8  
[0262] <212> PRT  
[0263] <213> 人工序列  
[0264] <220>  
[0265] <223> 人工序列的描述:合成的肽  
[0266] <400> 21  
[0267] Gln Gln His Tyr Ser Ile Pro Trp  
[0268] 1 5  
[0269] <210> 22  
[0270] <211> 354  
[0271] <212> DNA  
[0272] <213> 人工序列

- [0273] <220>
- [0274] <223> 人工序列的描述:合成的多核苷酸
- [0275] <400> 22
- [0276] gaagtgatgc tgggtggagcc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
- [0277] tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact 120
- [0278] ccggagaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attagtgggt gtggtgctaa cacctactat 180
- [0279] ccagacactg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
- [0280] ctgcaaataa acagtctgag gtctgaggac acggccttgt attactgtgc aagatatggt 300
- [0281] tacgacacgg tctttgctta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc tgca 354
- [0282] <210> 23
- [0283] <211> 118
- [0284] <212> PRT
- [0285] <213> 人工序列
- [0286] <220>
- [0287] <223> 人工序列的描述:合成的多肽
- [0288] <400> 23
- [0289] Glu Val Met Leu Val Glu Pro Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
- [0290] 1 5 10 15
- [0291] Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
- [0292] 20 25 30
- [0293] Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
- [0294] 35 40 45
- [0295] Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
- [0296] 50 55 60
- [0297] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
- [0298] 65 70 75 80
- [0299] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
- [0300] 85 90 95
- [0301] Ala Arg Tyr Gly Tyr Asp Thr Val Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
- [0302] 100 105 110
- [0303] Leu Val Thr Val Ser Ala
- [0304] 115
- [0305] <210> 24
- [0306] <211> 333
- [0307] <212> DNA
- [0308] <213> 人工序列
- [0309] <220>
- [0310] <223> 人工序列的描述:合成的多核苷酸
- [0311] <400> 24

[0312]	gacattgtgc tgaccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctagggca gaaggccacc 60
[0313]	atctcctgca gagccagcga aagtgttgat gattatggca ttggttttat gaactgggtc 120
[0314]	caacagaaac caggtcagcc acccaaactc ctcactata ctacatccaa ccaaggatcc 180
[0315]	ggggtccctg ccaggttttag tggcagtggg tctgggacag acttcagcct caacatccat 240
[0316]	cctatggtgg aggatgatac tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga gggtccgtgg 300
[0317]	acgttcggtg gcggcaccaa gctggaaatc aaa 333
[0318]	<210> 25
[0319]	<211> 111
[0320]	<212> PRT
[0321]	<213> 人工序列
[0322]	<220>
[0323]	<223> 人工序列的描述:合成的多肽
[0324]	<400> 25
[0325]	Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
[0326]	1 5 10 15
[0327]	Gln Lys Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asp Tyr
[0328]	20 25 30
[0329]	Gly Ile Gly Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
[0330]	35 40 45
[0331]	Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Ala
[0332]	50 55 60
[0333]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His
[0334]	65 70 75 80
[0335]	Pro Met Val Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys
[0336]	85 90 95
[0337]	Glu Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0338]	100 105 110
[0339]	<210> 26
[0340]	<211> 8
[0341]	<212> PRT
[0342]	<213> 人工序列
[0343]	<220>
[0344]	<223> 人工序列的描述:合成的肽
[0345]	<400> 26
[0346]	Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ala Tyr
[0347]	1 5
[0348]	<210> 27
[0349]	<211> 6
[0350]	<212> PRT



[0351] <213> 人工序列  
[0352] <220>  
[0353] <223> 人工序列的描述:合成的肽  
[0354] <400> 27  
[0355] Ser Gly Gly Gly Ala Asn  
[0356] 1 5  
[0357] <210> 28  
[0358] <211> 9  
[0359] <212> PRT  
[0360] <213> 人工序列  
[0361] <220>  
[0362] <223> 人工序列的描述:合成的肽  
[0363] <400> 28  
[0364] Tyr Gly Tyr Asp Thr Val Phe Ala Tyr  
[0365] 1 5  
[0366] <210> 29  
[0367] <211> 11  
[0368] <212> PRT  
[0369] <213> 人工序列  
[0370] <220>  
[0371] <223> 人工序列的描述:合成的肽  
[0372] <400> 29  
[0373] Gly Phe Thr Phe Ser Ser Ala Tyr Gly Met Ser  
[0374] 1 5 10  
[0375] <210> 30  
[0376] <211> 10  
[0377] <212> PRT  
[0378] <213> 人工序列  
[0379] <220>  
[0380] <223> 人工序列的描述:合成的肽  
[0381] <400> 30  
[0382] Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asn Thr Tyr  
[0383] 1 5 10  
[0384] <210> 31  
[0385] <211> 5  
[0386] <212> PRT  
[0387] <213> 人工序列  
[0388] <220>  
[0389] <223> 人工序列的描述:合成的肽

[0390] <400> 31  
 [0391] Ser Tyr Gly Met Ser  
 [0392] 1 5  
 [0393] <210> 32  
 [0394] <211> 17  
 [0395] <212> PRT  
 [0396] <213> 人工序列  
 [0397] <220>  
 [0398] <223> 人工序列的描述:合成的肽  
 [0399] <400> 32  
 [0400] Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys  
 [0401] 1 5 10 15  
 [0402] Gly  
 [0403] <210> 33  
 [0404] <211> 6  
 [0405] <212> PRT  
 [0406] <213> 人工序列  
 [0407] <220>  
 [0408] <223> 人工序列的描述:合成的肽  
 [0409] <400> 33  
 [0410] Ser Ser Tyr Gly Met Ser  
 [0411] 1 5  
 [0412] <210> 34  
 [0413] <211> 13  
 [0414] <212> PRT  
 [0415] <213> 人工序列  
 [0416] <220>  
 [0417] <223> 人工序列的描述:合成的肽  
 [0418] <400> 34  
 [0419] Trp Val Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ala Asn Thr Tyr  
 [0420] 1 5 10  
 [0421] <210> 35  
 [0422] <211> 10  
 [0423] <212> PRT  
 [0424] <213> 人工序列  
 [0425] <220>  
 [0426] <223> 人工序列的描述:合成的肽  
 [0427] <400> 35  
 [0428] Ala Arg Tyr Gly Tyr Asp Thr Val Phe Ala

[0429]	1	5	10
[0430]	<210> 36		
[0431]	<211> 15		
[0432]	<212> PRT		
[0433]	<213> 人工序列		
[0434]	<220>		
[0435]	<223> 人工序列的描述:合成的肽		
[0436]	<400> 36		
[0437]	Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asp Tyr Gly Ile Gly Phe Met Asn		
[0438]	1	5	10 15
[0439]	<210> 37		
[0440]	<211> 7		
[0441]	<212> PRT		
[0442]	<213> 人工序列		
[0443]	<220>		
[0444]	<223> 人工序列的描述:合成的肽		
[0445]	<400> 37		
[0446]	Thr Thr Ser Asn Gln Gly Ser		
[0447]	1	5	
[0448]	<210> 38		
[0449]	<211> 9		
[0450]	<212> PRT		
[0451]	<213> 人工序列		
[0452]	<220>		
[0453]	<223> 人工序列的描述:合成的肽		
[0454]	<400> 38		
[0455]	Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp Thr		
[0456]	1	5	
[0457]	<210> 39		
[0458]	<211> 11		
[0459]	<212> PRT		
[0460]	<213> 人工序列		
[0461]	<220>		
[0462]	<223> 人工序列的描述:合成的肽		
[0463]	<400> 39		
[0464]	Asp Asp Tyr Gly Ile Gly Phe Met Asn Trp Phe		
[0465]	1	5	10
[0466]	<210> 40		
[0467]	<211> 10		

[0468] <212> PRT  
[0469] <213> 人工序列  
[0470] <220>  
[0471] <223> 人工序列的描述:合成的肽  
[0472] <400> 40  
[0473] Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Gln Gly  
[0474] 1 5 10  
[0475] <210> 41  
[0476] <211> 8  
[0477] <212> PRT  
[0478] <213> 人工序列  
[0479] <220>  
[0480] <223> 人工序列的描述:合成的肽  
[0481] <400> 41  
[0482] Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Trp  
[0483] 1 5  
[0484] <210> 42  
[0485] <211> 6  
[0486] <212> PRT  
[0487] <213> 人工序列  
[0488] <220>  
[0489] <223> 人工序列的描述:合成的6xHis标签  
[0490] <400> 42  
[0491] His His His His His His  
[0492] 1 5

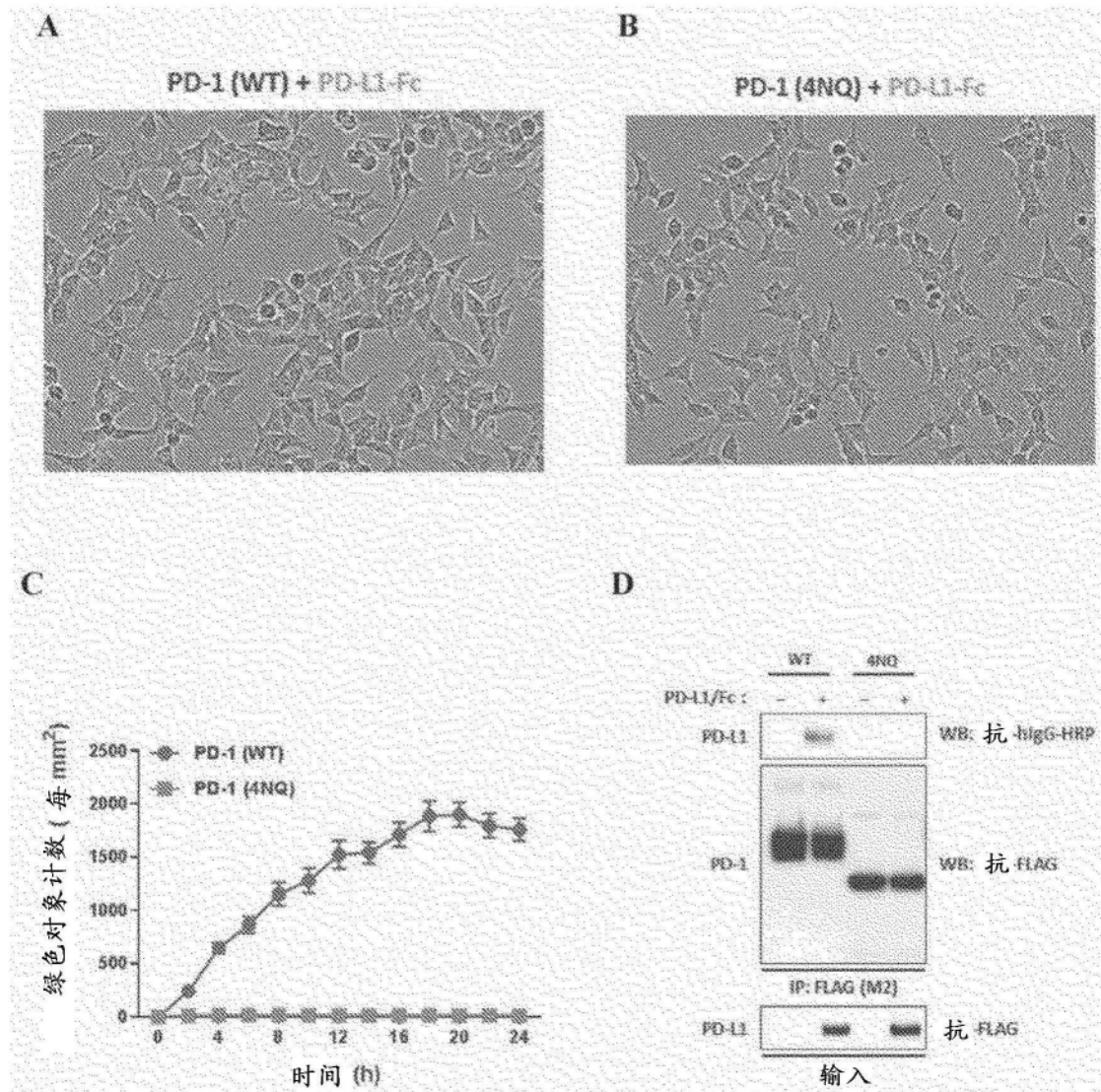


图1

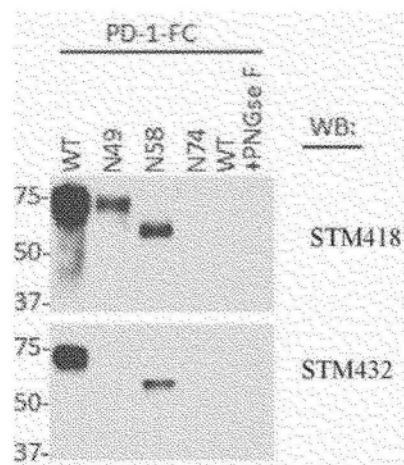


图2

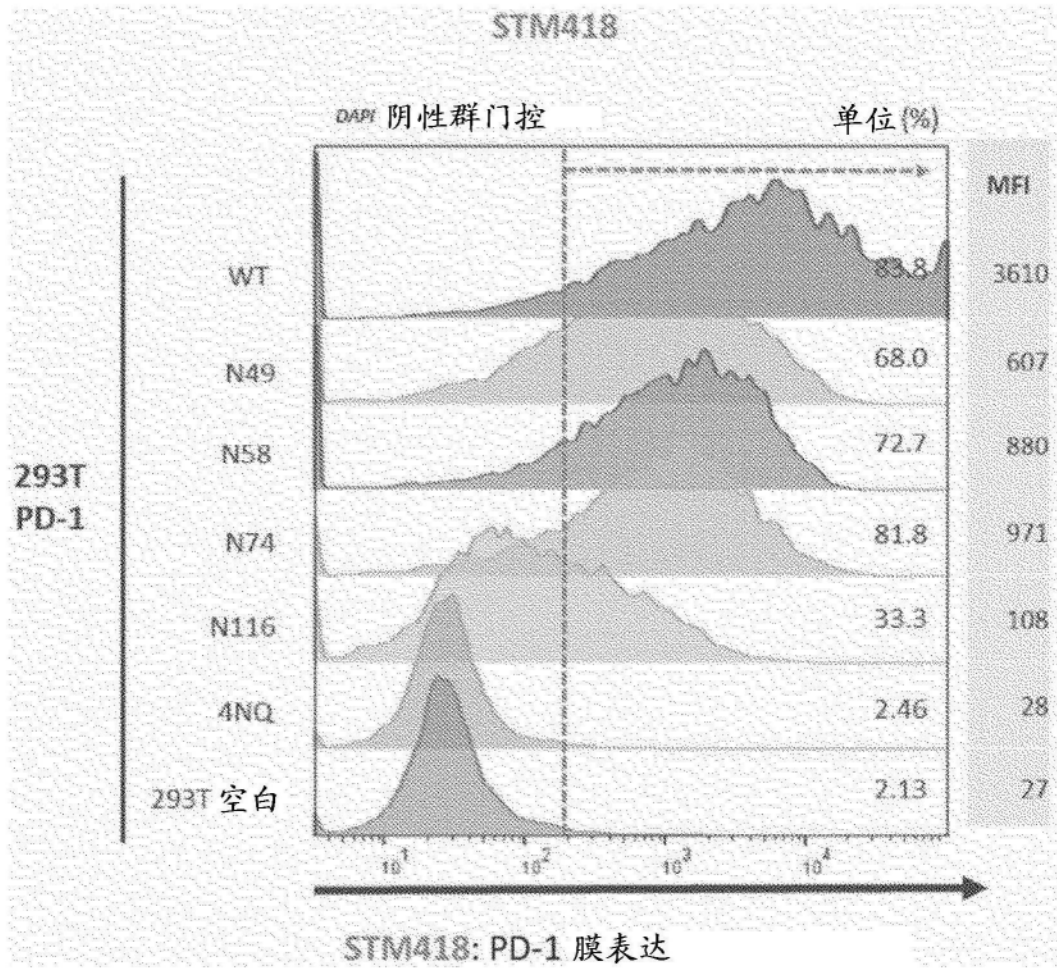


图3A

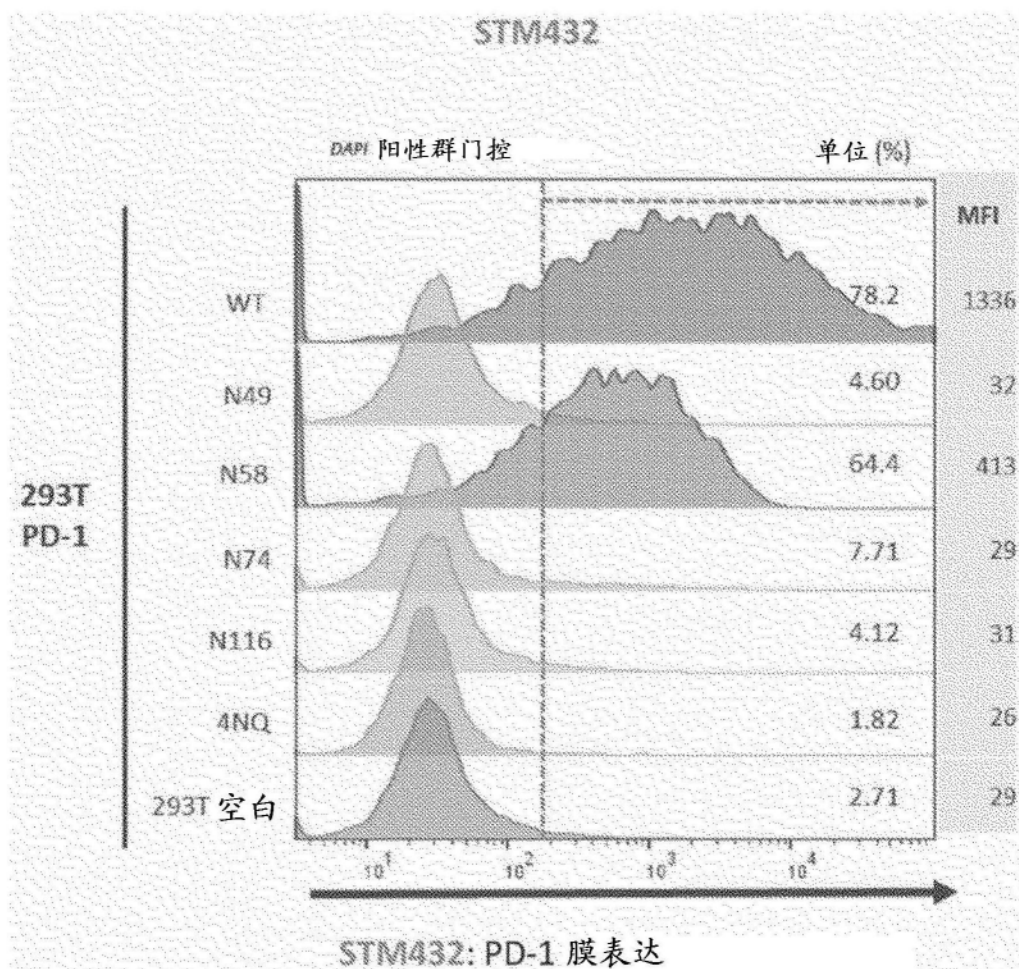


图3B

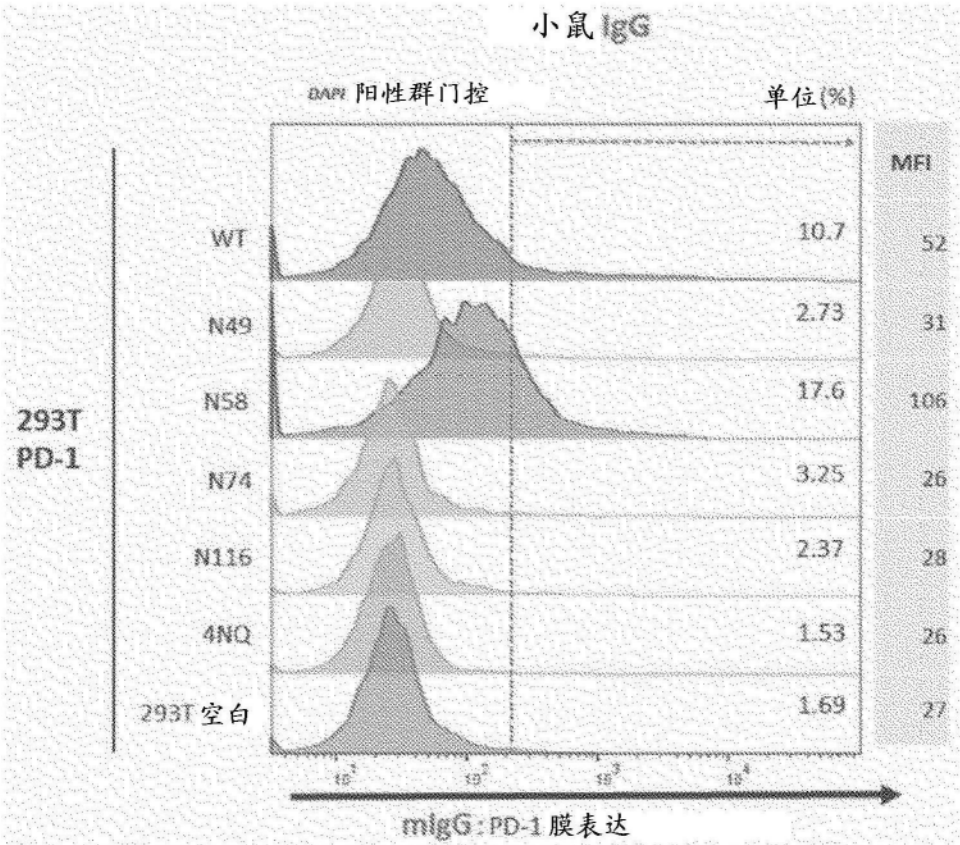


图3C

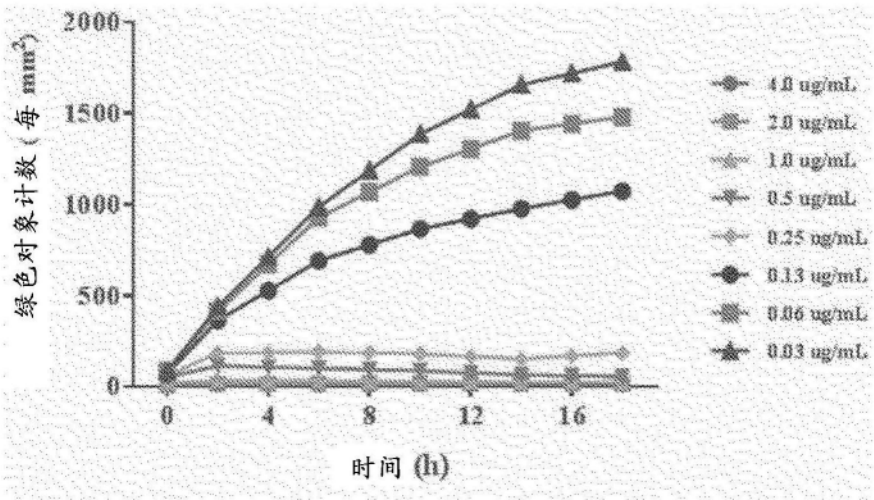


图4A



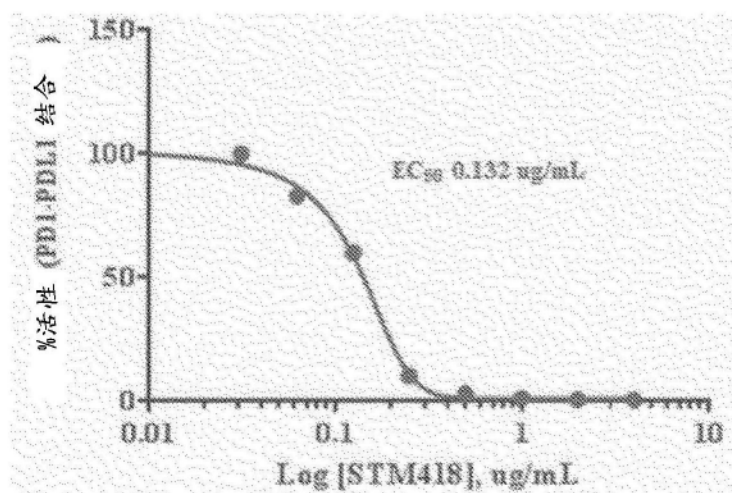


图4B

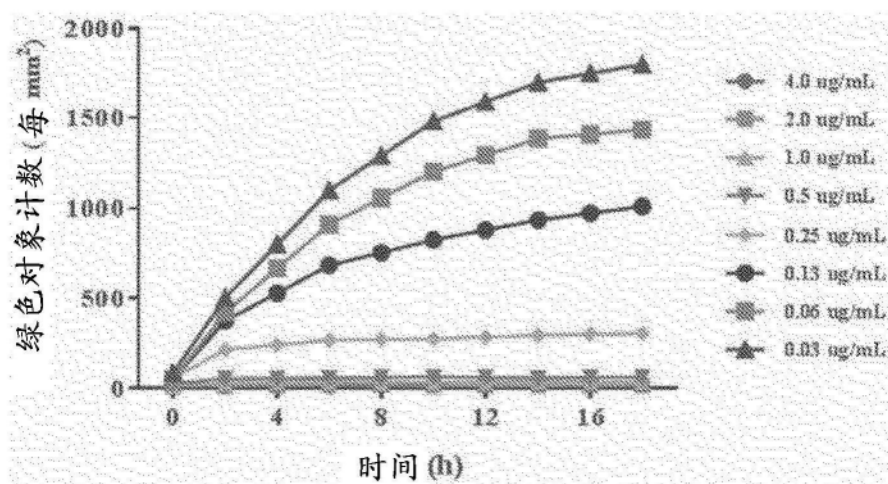


图5A

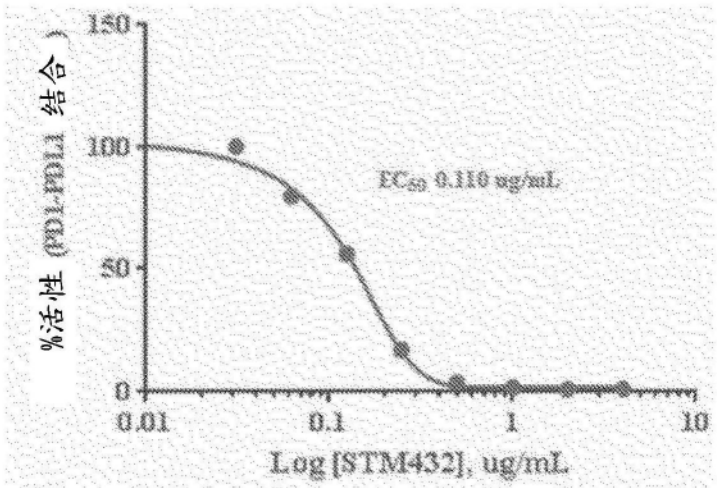


图5B

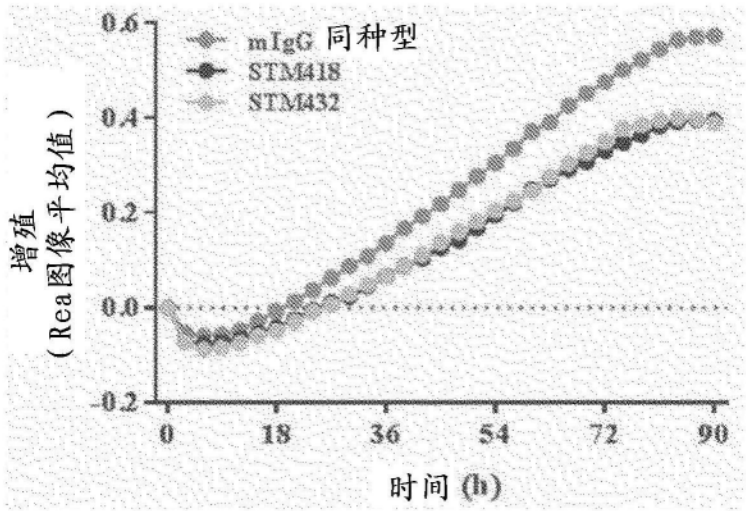


图6