



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117586412 A

(43) 申请公布日 2024. 02. 23

(21) 申请号 202311512592.0

(22) 申请日 2019.03.14

(30) 优先权数据

62/647,407 2018.03.23 US

62/755,408 2018.11.02 US

(62) 分案原申请数据

201980020951.6 2019.03.14

(71) 申请人 得克萨斯州大学系统董事会

地址 美国得克萨斯州

(72) 发明人 迈克尔·A·库兰

阿什温·R·雅伊瓦尔 查东兴

卡洛·托尼亚蒂 比昂卡·普林茨

纳德他干·博兰 埃里克·克劳兰

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227

专利代理师 张福誉 吴晓静

(51) Int. Cl.

C07K 16/46 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

G01N 33/569 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

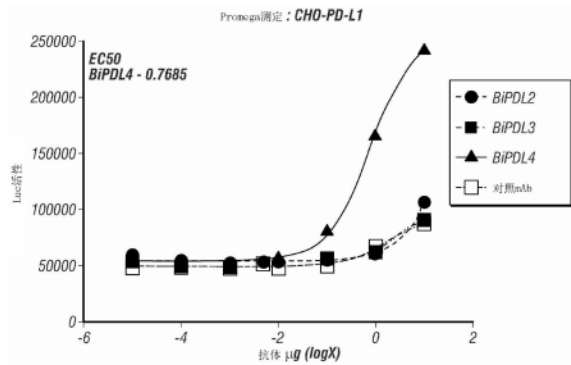
权利要求书3页 说明书41页
序列表(电子公布) 附图25页

(54) 发明名称

针对人PD-L1和PD-L2的双重特异性抗体及其使用方法

(57) 摘要

本申请涉及针对人PD-L1和PD-L2的双重特异性抗体及其使用方法。本公开内容涉及与PD-L1和PD-L2二者结合的双特异性抗体,以及使用这样的抗体来治疗癌症,例如表达或过表达PD-L1、PD-L2或二者的那些癌症的方法。



1. 抗体或抗体片段,其包含分别来自表3和表4的克隆配对的重链和轻链CDR序列。
2. 权利要求1所述的抗体或抗体片段,其中所述抗体或抗体片段由根据来自表1的克隆配对序列的轻链和重链可变序列编码。
3. 权利要求1所述的抗体或抗体片段,其中所述抗体或抗体片段由与来自表1的克隆配对序列具有至少70%、80%或90%同一性的轻链和重链可变序列编码。
4. 权利要求1所述的抗体或抗体片段,其中所述抗体或抗体片段由与来自表1的克隆配对序列具有至少95%同一性的轻链和重链可变序列编码。
5. 权利要求1所述的抗体或抗体片段,其中所述抗体或抗体片段包含根据来自表2的克隆配对序列的轻链和重链可变序列。
6. 权利要求1所述的抗体或抗体片段,其中所述抗体或抗体片段包含与来自表2的克隆配对序列具有70%、80%或90%同一性的轻链和重链可变序列。
7. 权利要求1所述的抗体或抗体片段,其中所述抗体或抗体片段包含与来自表2的克隆配对序列具有95%同一性的轻链和重链可变序列。
8. 权利要求1至7所述的抗体或抗体片段,其中所述抗体片段是重组scFv(单链可变片段)抗体、Fab片段、F(ab')₂片段或Fv片段。
9. 权利要求1至7所述的抗体或抗体片段,其中所述抗体是嵌合抗体。
10. 权利要求1至9所述的抗体或抗体片段,其中所述抗体是IgG。
11. 权利要求1至10所述的抗体或抗体片段,其中所述抗体或抗体片段还包含细胞穿透肽和/或是胞内抗体。
12. 权利要求1至11所述的抗体或片段,其中所述抗体或抗体片段是人抗体。
13. 权利要求1至11所述的抗体或片段,其中所述抗体或抗体片段是人源化抗体。
14. 治疗患有癌症的对象的方法,其包括向所述对象递送具有分别来自表3和表4的克隆配对的重链和轻链CDR序列的抗体或抗体片段。
15. 权利要求14所述的方法,所述抗体或抗体片段由表1中所示的克隆配对的轻链和重链可变序列编码。
16. 权利要求14至15所述的方法,其中所述抗体或抗体片段由与来自表1的克隆配对序列具有至少70%、80%或90%同一性的轻链和重链可变序列编码。
17. 权利要求14至15所述的方法,所述抗体或抗体片段由与表1中所示的克隆配对序列具有至少95%同一性的克隆配对的轻链和重链可变序列编码。
18. 权利要求14所述的方法,其中所述抗体或抗体片段包含根据来自表2的克隆配对序列的轻链和重链可变序列。
19. 权利要求14所述的方法,其中所述抗体或抗体片段包含与来自表2的克隆配对序列具有70%、80%或90%同一性的轻链和重链可变序列。
20. 权利要求14所述的方法,由与来自表2的克隆配对序列具有95%同一性的轻链和重链可变序列编码。
21. 权利要求14至20所述的方法,其中所述抗体片段是重组scFv(单链可变片段)抗体、Fab片段、F(ab')₂片段或Fv片段。
22. 权利要求14至21所述的方法,其中所述抗体是IgG。
23. 权利要求14至20所述的方法,其中所述抗体是嵌合抗体。

24. 权利要求14至23所述的方法,其中递送包括抗体或抗体片段施用,或用编码所述抗体或抗体片段的RNA或DNA序列或载体进行的遗传递送。

25. 编码抗体或抗体片段的杂交瘤或经改造的细胞,其中所述抗体或抗体片段的特征在于分别来自表3和表4的克隆配对的重链和轻链CDR序列。

26. 权利要求25所述的杂交瘤或经改造的细胞,其中所述抗体或抗体片段由根据来自表1的克隆配对序列的轻链和重链可变序列编码。

27. 权利要求25所述的杂交瘤或经改造的细胞,其中所述抗体或抗体片段由与来自表1的克隆配对的可变序列具有至少70%、80%或90%同一性的轻链和重链可变序列编码。

28. 权利要求25所述的杂交瘤或经改造的细胞,其中所述抗体或抗体片段由与来自表1的克隆配对的可变序列具有95%同一性的轻链和重链可变序列编码。

29. 权利要求25所述的杂交瘤或经改造的细胞,其中所述抗体或抗体片段包含根据来自表2的克隆配对序列的轻链和重链可变序列。

30. 权利要求25所述的杂交瘤或经改造的细胞,其中所述抗体或抗体片段由与来自表2的克隆配对的可变序列具有至少70%、80%或90%同一性的轻链和重链可变序列编码。

31. 权利要求25所述的杂交瘤或经改造的细胞,其中所述抗体或抗体片段包含与来自表2的克隆配对序列具有95%同一性的轻链和重链可变序列。

32. 权利要求25至31所述的杂交瘤或经改造的细胞,其中所述抗体片段是重组scFv(单链可变片段)抗体、Fab片段、F(ab')₂片段或Fv片段。

33. 权利要求25至32所述的杂交瘤或经改造的细胞,其中所述抗体是嵌合抗体。

34. 权利要求25至32所述的杂交瘤或经改造的细胞,其中所述抗体是IgG。

35. 权利要求25至34所述的杂交瘤或经改造的细胞,其中所述抗体或抗体片段还包含细胞穿透肽和/或是胞内抗体。

36. 疫苗制剂,其包含一种或更多种以分别来自表3和表4的克隆配对的重链和轻链CDR序列为特征的抗体或抗体片段。

37. 权利要求36所述的疫苗制剂,其中至少一种抗体或抗体片段由根据来自表1的克隆配对序列的轻链和重链可变序列编码。

38. 权利要求36所述的疫苗制剂,其中至少一种抗体或抗体片段由与来自表1的克隆配对序列具有至少70%、80%或90%同一性的轻链和重链可变序列编码。

39. 权利要求38所述的疫苗制剂,其中至少一种抗体或抗体片段由与来自表1的克隆配对序列具有至少95%同一性的轻链和重链可变序列编码。

40. 权利要求36所述的疫苗制剂,其中至少一种抗体或抗体片段包含根据来自表2的克隆配对序列的轻链和重链可变序列。

41. 权利要求36所述的疫苗制剂,其中至少一种抗体或抗体片段包含与来自表2的克隆配对序列具有95%同一性的轻链和重链可变序列。

42. 权利要求36至41所述的疫苗制剂,其中至少一种抗体片段是重组scFv(单链可变片段)抗体、Fab片段、F(ab')₂片段或Fv片段。

43. 权利要求36至41所述的疫苗制剂,其中至少一种抗体是嵌合抗体。

44. 权利要求36至43所述的疫苗制剂,其中至少一种抗体是IgG。

45. 权利要求36至44所述的疫苗制剂,其中至少一种抗体或抗体片段还包含细胞穿透

肽和/或是胞内抗体。

46. 在对象中检测表达PD-L1或PD-L2的细胞的方法,其包括:

(a) 使来自所述对象的样品与具有分别来自表3和表4的克隆配对的重链和轻链CDR序列的抗体或抗体片段接触;以及

(b) 通过使所述抗体或抗体片段与所述样品中的细胞结合来检测所述样品中表达PD-L1或PD-L2的细胞。

47. 权利要求46所述的方法,其中所述样品是体液。

48. 权利要求46至47所述的方法,其中所述样品是组织样品。

49. 权利要求46至47所述的方法,其中检测包括ELISA、RIA或Western印迹。

50. 权利要求46至49所述的方法,其还包括再次进行步骤(a)和(b),并确定与第一次测定相比正痘病毒抗原水平的变化。

51. 权利要求46至50所述的方法,其中所述抗体或抗体片段由表1中所示的克隆配对的可变序列编码。

52. 权利要求46至50所述的方法,其中所述抗体或抗体片段由与表1中所示的克隆配对的可变序列具有70%、80%或90%同一性的轻链和重链可变序列编码。

53. 权利要求46至50所述的方法,其中所述抗体或抗体片段由与表1中所示的克隆配对序列具有95%同一性的轻链和重链可变序列编码。

54. 权利要求46至50所述的方法,其中所述抗体或抗体片段包含根据来自表2的克隆配对序列的轻链和重链可变序列。

55. 权利要求46至50所述的方法,其中所述抗体或抗体片段包含与来自表2的克隆配对序列具有70%、80%或90%同一性的轻链和重链可变序列。

56. 权利要求46至50所述的方法,其中所述抗体或抗体片段包含与来自表2的克隆配对序列具有95%同一性的轻链和重链可变序列。

57. 权利要求46至56所述的方法,其中所述抗体片段是重组scFv(单链可变片段)抗体、Fab片段、F(ab')₂片段或Fv片段。

58. 权利要求46至57所述的方法,其中所述细胞是癌细胞。

59. 权利要求58所述的方法,其中所述癌细胞是淋巴瘤细胞、乳腺癌细胞或肾细胞癌细胞。

60. 权利要求46至57所述的方法,其中所述细胞是与免疫抑制相关的细胞。

61. 权利要求60所述的方法,其中所述与免疫抑制相关的细胞是在肿瘤微环境中的非癌细胞。

62. 权利要求61所述的方法,其中所述在肿瘤微环境中的非癌细胞是基质细胞或内皮细胞。

63. 处理肿瘤微环境中免疫抑制的方法,其包括:向所述对象递送具有分别来自表3和表4的克隆配对的重链CDR序列和轻链CDR序列的抗体或抗体片段。

针对人PD-L1和PD-L2的双重特异性抗体及其使用方法

[0001] 本申请是申请日为2019年3月14日、申请号为“201980020951.6”、发明名称为“针对人PD-L1和PD-L2的双重特异性抗体及其使用方法”的中国专利申请的分案申请,原申请是国际申请PCT/US2019/022295的中国国家阶段申请。

[0002] 优先权要求

[0003] 本申请分别要求2018年3月23日提交的美国临时申请序列号62/647,407和2018年11月2日提交的美国临时申请序列号62/755,408的优先权权益,每个申请的全部内容在此通过引用并入。

[0004] 序列表的并入

[0005] 包含在为49KB(如在Microsoft **Windows**®中测量的)并且于2019年3月14日创建的名为“UTFC_P1338W0_ST25”的文件中的序列列表通过电子提交随同提交,并且通过引用并入本文。

[0006] 发明背景

技术领域

[0007] 本公开内容总体上涉及医学、肿瘤学和免疫学领域。更特别地,其涉及与PD-L1和PD-L2结合的双特异性人抗体及其在癌症治疗中的用途。

背景技术

[0008] 对T细胞共抑制受体PD-1与其配体PD-L1的相互作用的阻断已经成为现代肿瘤学的支柱,这现今对于一些黑素瘤和肺癌患者亚群而言甚至可在一线环境中实现(Boussiotis,2016)。许多靶向PD-1或PD-L1的抗体目前已被FDA批准或处于临床试验中;然而,尚无靶向第二PD-1配体,PD-L2的药剂在临床研究之中。PD-L2与PD-L1相比以高约3倍的亲和力与PD-1结合,并且像PD-L1一样,发送减弱T细胞功能的抑制信号(Cheng et al.,2013;Latchman et al.,2001;Lee et al.,2016;Li et al.,2017;Youngnak et al.,2003)。历史上,认为PD-L2多是表达局限于肿瘤基质的诱导型共抑制分子;然而,改进的PD-L2检测试剂揭示了在肿瘤微环境中肿瘤细胞自身均存在广泛PD-L2表达(Baptista et al.,2016;Danilova et al.,2016;Derks et al.,2015;Dong et al.,2016;Howitt et al.,2016;Kim et al.,2015;Kim et al.,2015;Nomi et al.,2007;Obeid et al.,2016;Ohigashi et al.,2005;Roemer et al.,2016;Shi et al.,2014;Shin et al.,2015;Xu et al.,2016)。最近,已表明PD-L2在多种癌症中是针对PD-1抗体派姆单抗(pembrolizumab)的响应的独立预测因子(Yearley et al.,2017)。

[0009] 首次在大多数经典型霍奇金淋巴瘤(classical Hodgkin's Lymphoma,cHL)中描述,染色体区域9p24.1的扩增导致PD-L1和PD-L2(其存在于染色体区域9p24.1中)直接上调,以及通过增强JAK2活性间接诱导(Roemer et al.,2016;Shi et al.,2014;Green et al.,2010;Van Roosbroeck et al.,2016)。除cHL之外,高PD-L1/PD-L2共表达的这种遗传驱动也见于大多数原发性纵隔大B细胞淋巴瘤(Primary Mediastinal Large B-Cell

Lymphoma, PMBL)、T细胞淋巴瘤以及多种组织细胞和树突细胞恶性病中。并不意外地,这些癌症中的许多已显示对PD-1阻断作出响应。最近,在例如三阴性乳腺癌(triple-negative breast cancer, TNBC)的实体瘤中已证实了9p24.1扩增(Howitt et al., 2016; Barrett et al., 2015)。相对高的PD-L1和PD-L2共表达也已在多种其他癌症中观察到,例如胃癌、黑色素瘤、鳞状肺癌、头颈癌、宫颈癌和外阴癌、膀胱癌和肝细胞癌,等等(Baptista et al., 2016; Danilova et al., 2016; Derks et al., 2015; Dong et al., 2016; Howitt et al., 2016; Kim et al., 2015; Nomi et al., 2007; Obeid et al., 2016; Xu et al., 2016; Yearley et al., 2017; Van Roosbroeck et al., 2016; Barrett et al., 2015; Shin et al., 2016; Inoue et al., 2016; Wang et al., 2011)。除这些肿瘤本身的表达之外,已记载这些肿瘤中的许多具有PD-L2的基质和内皮表达(Yearley et al., 2017)。这些发现表明PD-L1阻断在这些癌症中的治疗性潜力受到限制。

[0010] PD-1共抑制受体主要由活化的T细胞和NK细胞表达,并且因此可最好地被与之结合并防止PD配体接合的抗体靶向。相比之下,PD-L1由肿瘤细胞和抑制性基质群体表达,并且可被能够进行细胞毒性效应物功能的抗体靶向。尽管可在体外表明这些有抗体依赖性细胞毒性(antibody-dependent cellular cytotoxicity, ADCC)能力的PD-L1抗体的理论优势,但尚不存在患者数据证实在患者中具有实际的效应物功能或相对于纯阻断型变体而言改善结局(Boyerinas et al., 2015)。

[0011] PD-L1和PD-L2仅共有约40%的同一性,因为其各自与不同于PD-1的另外的受体结合(Latchman et al., 2001)。PD-L1还以另外的负T细胞调节相互作用与B7-1结合(Butte et al., 2007; Butte et al., 2008)。在小鼠中,PD-L2可与骨髓细胞或者T细胞上的RGMb结合,并调节对吸入抗原的耐受(Xiao et al., 2014; Nie et al., 2017)。在肿瘤中PD-L2与RGMb结合的作用有待描述,这种相互作用在人中的相关性也如此。从治疗观点来看,可表明具有针对PD-L1和PD-L2的双特异性抗体是极其有利的。

发明内容

[0012] 因此,根据本公开内容,提供了选择性地与PD-L1和PD-L2二者结合的抗体或抗体片段,其具有分别来自表3和表4的克隆配对的重链和轻链CDR序列。所述抗体或抗体片段可由表1中所示的克隆配对的可变序列编码,可由与表1中所示的克隆配对的可变序列具有70%、80%或90%同一性的轻链和重链可变序列编码,或者可由与表1中所示的克隆配对序列具有95%或更大同一性的轻链和重链可变序列编码。所述抗体或抗体片段可包含根据来自表2的克隆配对序列的轻链和重链可变序列,可包含与来自表2的克隆配对序列具有70%、80%或90%同一性的轻链和重链可变序列,或者可包含与来自表2的克隆配对序列具有95%或更大同一性的轻链和重链可变序列。

[0013] 还提供了在对象中治疗癌症的方法,其包括使对象中的PD-L1或PD-L2阳性癌细胞与如上所述的抗体接触。PD-L1或PD-L2阳性癌细胞可以是实体瘤细胞,例如肺癌细胞、脑癌细胞、头颈癌细胞、乳腺癌细胞、皮肤癌细胞、肝癌细胞、胰腺癌细胞、胃癌细胞、结肠癌细胞、直肠癌细胞、子宫癌细胞、宫颈癌细胞、卵巢癌细胞、睾丸癌细胞、皮肤癌细胞、食管癌细胞、淋巴瘤细胞、肾细胞癌细胞,或者可以是白血病或骨髓瘤,例如急性髓细胞白血病、慢性髓细胞源性白血病或多发性骨髓瘤。

[0014] 该方法还可包括使PD-L1或PD-L2阳性癌细胞与第二抗癌剂或抗癌治疗例如化学治疗、放射治疗、免疫治疗、激素治疗或毒素治疗接触。第二抗癌剂或抗癌治疗可抑制胞内PD-L1或PD-L2功能。第二抗癌剂或抗癌治疗可与第一药剂同时给予,或者在第一药剂之前和/或之后给予。PD-L1或PD-L2阳性癌细胞可以是转移性癌细胞、多重抗药性癌细胞或复发性癌细胞。

[0015] 抗体可以是单链抗体、单域抗体、嵌合抗体或Fab片段。抗体可以是人抗体、鼠抗体、IgG、人源化抗体或人源化IgG。抗体或抗体片段还可包含标记,例如肽标签、酶、磁性颗粒、发色团、荧光分子、化学发光分子或染料。抗体或抗体片段还可包含与其连接的抗肿瘤药物,例如通过光不稳定的接头或可酶促切割接头与抗体或抗体片段连接的抗肿瘤药物。抗肿瘤药物可以是毒素、放射性同位素、细胞因子或酶。抗体或抗体片段可与纳米粒或脂质体缀合。

[0016] 在另一个实施方案中,提供了在对象中治疗癌症的方法,其包括向对象递送具有分别来自表3和表4的克隆配对的重链和轻链CDR序列的抗体或抗体片段。抗体片段可以是重组scFv(单链可变片段(single chain fragment variable))抗体、Fab片段、F(ab')₂片段或Fv片段。抗体可以是IgG。抗体可以是嵌合抗体。递送可包括抗体或抗体片段施用,或用编码所述抗体或抗体片段的RNA或DNA序列或载体进行遗传递送。

[0017] 抗体或抗体片段可由表1中所示的克隆配对的轻链可变序列和重链可变序列编码,可由与表1中所示的具有95%同一性的克隆配对的轻链和重链可变序列编码,以及可由与来自表1的克隆配对序列具有70%、80%或90%同一性的轻链和重链可变序列编码。抗体或抗体片段可包含根据来自表2的克隆配对序列的轻链和重链可变序列,可包含与来自表2的克隆配对序列具有70%、80%或90%同一性的轻链和重链可变序列,或者可包含与来自表2的克隆配对序列具有95%同一性的轻链和重链可变序列。

[0018] 还提供了单克隆抗体,其中抗体或抗体片段以分别来自表3和表4的克隆配对的重链和轻链CDR序列为特征。抗体片段可以是重组scFv(单链可变片段)抗体、Fab片段、F(ab')₂片段或Fv片段。抗体可以是嵌合抗体或IgG。

[0019] 抗体或抗体片段可由表1中所示的克隆配对的轻链和重链可变序列编码,可由与表1中所示的具有95%同一性的克隆配对的轻链和重链可变序列编码,以及可由与来自表1的克隆配对序列具有70%、80%或90%同一性的轻链和重链可变序列编码。抗体或抗体片段可包含根据来自表2的克隆配对序列的轻链和重链可变序列,可包含与来自表2的克隆配对序列具有70%、80%或90%同一性的轻链和重链可变序列,或者可包含与来自表2的克隆配对序列具有95%同一性的轻链和重链可变序列。

[0020] 在另一个实施方案中,提供了编码抗体或抗体片段的杂交瘤或经改造的细胞,其中所述抗体或抗体片段以分别来自表3和表4的克隆配对的重链和轻链CDR序列为特征。抗体片段可以是重组scFv(单链可变片段)抗体、Fab片段、F(ab')₂片段或Fv片段。抗体可以是嵌合抗体或IgG。

[0021] 抗体或抗体片段可由表1中所示的克隆配对的轻链和重链可变序列编码,可由与表1中所示的具有95%同一性的克隆配对的轻链和重链可变序列编码,以及可由与来自表1的克隆配对序列具有70%、80%或90%同一性的轻链和重链可变序列编码。抗体或抗体片段可包含根据来自表2的克隆配对序列的轻链和重链可变序列,可包含与来自表2的克隆配

对序列具有70%、80%或90%同一性的轻链和重链可变序列,或者可包含与来自表2的克隆配对序列具有95%同一性的轻链和重链可变序列。

[0022] 另一个实施方案包括含有一种或更多种抗体或抗体片段的癌症疫苗,所述抗体或抗体片段以分别来自表3和表4的克隆配对的重链和轻链CDR序列为特征。至少一种抗体片段可以是重组scFv(单链可变片段)抗体、Fab片段、F(ab')₂片段或Fv片段。至少一种抗体可以是嵌合抗体或IgG。至少一种抗体或抗体片段可由表1中所示的克隆配对的轻链和重链可变序列编码,可由与表1中所示的具有95%同一性的克隆配对的轻链和重链可变序列编码,以及可由与来自表1的克隆配对序列具有70%、80%或90%同一性的轻链和重链可变序列编码。至少一种抗体或抗体片段可包含根据来自表2的克隆配对序列的轻链和重链可变序列,可包含与来自表2的克隆配对序列具有70%、80%或90%同一性的轻链和重链可变序列,或者可包含与来自表2的克隆配对序列具有95%同一性的轻链和重链可变序列。

[0023] 在另一个实施方案中,提供了在对象中检测表达PD-L1或PD-L2的细胞的方法,其包括:使来自所述对象的样品与以分别来自表3和表4的克隆配对的重链CDR序列和轻链CDR序列为特征的抗体或抗体片段接触,以及通过使所述抗体或抗体片段与所述样品中的细胞结合来检测所述样品中表达PD-L1或PD-L2的细胞。样品可以是体液或组织样品。细胞可以是癌细胞,例如淋巴瘤细胞、乳腺癌细胞或肾细胞癌细胞。细胞可以是与免疫抑制相关的细胞。与免疫抑制相关的细胞可以在肿瘤微环境中的非癌细胞,例如基质细胞或内皮细胞。检测可包括ELISA、RIA或Western印迹。该方法还可包括再次进行该方法,并确定与第一次测定相比正痘病毒(orthopoxvirus)抗原水平的变化。抗体或抗体片段可由表1中所示的克隆配对的轻链可变序列和重链可变序列编码,可由与表1中所示的具有95%同一性的克隆配对的轻链和重链可变序列编码,以及可由与来自表1的克隆配对序列具有70%、80%或90%同一性的轻链和重链可变序列编码。抗体或抗体片段可包含根据来自表2的克隆配对序列的轻链和重链可变序列,可包含与来自表2的克隆配对序列具有70%、80%或90%同一性的轻链和重链可变序列,或者可包含与来自表2的克隆配对序列具有95%同一性的轻链和重链可变序列。

[0024] 可预期的是,本文中所述的任何方法或组合物可相对于本文中所述的任何其他方法或组合物来实施。通过以下详细描述,本公开内容的其他目的、特征和优点将显而易见。然而,应理解的是,详细描述和具体实例尽管指出了本公开内容的一些具体实施方案但是仅以举例说明的方式给出,因为根据该详细描述,在本公开内容的精神和范围内的多种改变和修改对于本领域技术人员将显而易见。

[0025] 如本文中使用的“基本上不含”就指定组分而言在本文中用于意指该指定组分未被有目的地配制到组合物中和/或仅作为污染物或以微量(trace amount)存在。由组合物中的任何意外污染引起的指定组分的总量优选低于0.01%。最优选的是其中用标准分析方法不能检测到指定组分的量的组合物。

[0026] 如本文在说明书和权利要求书中所使用的,没有数量词修饰的名词可意指一个/种或更多个/种。如本文在说明书和权利要求书中所使用的,当与词语“包含/包括”联合使用时,没有数量词修饰的名词可意指一个/种或多于一个/种。如本文中所使用,在说明书和权利要求书中,“另一”或“又一”可意指至少第二个/种或更多个/种。

[0027] 如本文在说明书和权利要求书中所使用的,术语“约”用于指示:值包括用于确定

所述值而使用的装置、方法之误差的固有变化,或者在研究对象之间存在的变化。

[0028] 通过以下详细描述,本发明的其他目的、特征和优点将显而易见。然而,应理解的是,详细描述和具体实例尽管指出了本发明的一些实施方案但是仅以举例说明的方式给出,因为根据该详细描述,在本发明的精神和范围内的多种改变和修改对于本领域技术人员将显而易见。

附图说明

[0029] 以下附图构成本说明书的一部分,并且被包括在内以进一步说明本发明的某些方面。通过参照这些附图中的一个或多个并结合本文中给出的具体实施方案的详细描述可更好地理解本发明。

[0030] 图1A至1C-阻断PD-L1/PD-L2与PD-1结合的双特异性PD-L1/PD-L2 (bispecific PD-L1/PD-L2, BiPDL) 抗体的鉴定。测试如实施例中所鉴定的抗体候选物的结合PD-L1或PD-L2并阻断其与PD-1结合的能力。使5 μ g/mL的抗体与CHO-PD-L1或CHO-PD-L2细胞结合,并随后添加经Alexafluor 532标记的重组PD-1 1小时。(图1A) 示出了PD-1+细胞的百分比。(图1B) 测量了经Alexafluor 532标记的PD-1的最大荧光强度,其中在FACS分析中,PD-L1或PD-L2阻断被视为Alexa532荧光降低。针对未染色的细胞、对照抗体、德瓦鲁单抗(Durvalumab) (抗PD-L1) 和市售的抗PD-L2抗体,评价了BiPDL抗体克隆1至4(ADI-16413、-16414、-16415和-16418)。(图1C) 使用Promega PD-L1:PD-1阻断系统测定了候选BiPDL单克隆抗体。

[0031] 图2A至2D-与PD-L1和PD-L2结合的双特异性抗体亚克隆的鉴定。测定双特异性抗体BiPDL3或BiPDL4的亚克隆与CHO-PD-L1(图2A和2C) 或CHO-PD-L2细胞(图2B和2D) 的结合。将指定浓度的BiPDL(人IgG1) 抗体添加至指定细胞,并通过添加与PE缀合的抗人IgG1第二抗体来检测结合。反应在ForteBio Octet[®]平台上进行。

[0032] 图3-与FDA批准的抗体治疗剂相比对双特异性抗体的评价。使用Promega PD-L1:PD-1阻断系统和PD-L2:PD-1阻断系统二者对候选BiPDL单克隆抗体进行测定。将不同浓度的抗体添加至能够刺激稳定表达PD-1的Jurkat T细胞的CHO-PD-L1或CHO-PD-L2(CHO-PD-L1/2) 细胞。当共培养时,CHO-PD-L1/2细胞与Jurkat T细胞之间的相互作用抑制发光。在通过添加PD-L1、PD-L2、PD-1或BiPDL抗体破坏该激活之后,诱导了发光。将Jurkat T细胞与指定浓度的抗体(规定抗体) 和CHO-PD-L1/2细胞孵育6小时。使用Bio-Glo[™]测定试剂盒(Promega) 产生结果。

[0033] 图4A至4F-第二代、第三代和第四代BiPDL抗体的评价。再次使用Promega PD-L1/PD-L2:PD-1阻断系统测定了第二代(图4A至4B)、第三代(图4C至4D) 和第四代(图4E至4F) 候选BiPDL单克隆抗体。使用可瑞达(Keytruda) 作为阳性对照抗PD-L2抗体(图4B至4D),而使用德瓦鲁单抗作为对照抗PD-L1抗体(图4C至4D)。也使用针对PD-1的Promega对照mAb作为对照(图4C至4D)。

[0034] 图5A至5C-候选BiPDL抗体在多种人混合淋巴细胞反应中具有活性。在存在诱导型树突细胞和来自不同供体的T细胞的情况下,对候选抗体、FDA批准抗体或对照抗体进行评价,并通过ELISA评价IL-2或IFN- γ 产生。(图5A) 通过流式细胞术分析经磁性分选iDC的人PD-L1和PD-L2的表达。(图5B) 在添加至CD4+T细胞之前,将可瑞达(抗PD-1)、阿特殊单抗

(Atezolizumab) (抗PD-L1)、第4代BiPDL抗体和同种型对照添加至IDC。(图5C)将不同的第四代BiPDL抗体与阿特殊单抗和同种型对照一起进行评价。在添加至CD4+T细胞之前,将每种抗体添加至IDC。

[0035] 图6-BiPDL抗体介导有效的针对人PD-L1/PD-L2⁺淋巴瘤的ADCC。按效应物与靶标之比为15:1,将不同浓度的BiPDL抗体(小鼠IgG2a)与体外扩增的鼠NK细胞添加至经钙黄绿素标记的U2940 PMBL细胞。根据在荧光读板仪上测量的钙黄绿素的实验释放与自发释放之间的差异计算特异性裂解百分比。

[0036] 图7A至7C-具有ADCC的候选抗体在体内针对人U2940淋巴瘤具有高活性。在SCID小鼠中建立PBML异种移植肿瘤,并允许其达到150mm³。(图7A)通过流式细胞术分析细胞的PD-L1或PD-L2表达。(图7B至7C)用mIgG2a对照抗体、赫赛汀(Herceptin)、美罗华(Rituxan)或指定BiPDL抗体以10mg/kg、2×/周处理小鼠,持续3周,并在指定日通过卡尺评估肿瘤体积。

[0037] 图8A至8B-候选抗体针对MDA-MB-231具有活性。在SCID小鼠中建立MDA-MB-231三阴性乳腺癌异种移植肿瘤,并允许其达到150mm³。(图8A)通过流式细胞术分析细胞的PD-L1或PD-L2表达。(图8B)然后用指定抗体以10mg/kg、2×/周处理小鼠,持续3周。示出的数据来自每组9只小鼠的单实验,并且在指定日评估肿瘤体积。

[0038] 图9A至9C-BiPDL抗体比PD-L1抗体更有效地治疗同质MC38-PD-L2结肠癌。将5×10⁵MC38-PDL2肿瘤细胞皮下植入C57BL/6J小鼠中。在第3、6、9、12和15天用100μg指定抗体处理小鼠。(图9A)针对每组10只小鼠的单实验示出了存活(通过Gehran-Breslow-Wilcoxon检验的p值)。(图9B)用卡尺测量胸部MC-38-PD-L2肿瘤的生长,并示出所有组的肿瘤体积,直到例如测量的任何肿瘤≥1000mm³的时间为止。(图9C)通过流式细胞术评价PD-L1和PD-L2的存在。

[0039] 图10A至10B-具有抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的BiPDL抗体在MC38-PD-L2小鼠中产生有利的CD8与Treg之比。将1.5×10⁶MC38-PDL2肿瘤细胞在30% Matrigel (Corning)中皮下植入C57BL/6J小鼠中,并在第7、10和13天用腹膜内注射100μg指定抗体来处理。在第15天,收获肿瘤。(图10A)通过流式细胞术评价PD-L1和PD-L2的存在。(图10B)通过流式细胞术测量浸润CD8T细胞相对于FoxP3+Treg之比。

[0040] 图11A至11B-BiPDL抗体比PD-L1或PD-L2阻断更有效地治疗全身性EL4 T细胞淋巴瘤。将1.5×10⁵EL4-PD-L2细胞(其也表达萤光素酶以促进生物发光成像)植入在C57BL/6J小鼠中以建立全身性疾病。在第3、6、9、12和15天,使小鼠接受100μg指定抗体的注射。(图11A)使用流式细胞术评估PD-L1和PD-L2的存在。(图11B)针对1至3个每组5只小鼠的独立实验(取决于组)示出了存活。使用Gehran-Breslow-Wilcoxon检验计算存活统计学。

[0041] 图12:在Promega PD-L1/PD-L2测定中与PD-1阻断的等同性和相对于PD-L1阻断的优越性。BiPDL3-1₄完全阻断PD-1接合。使用由表达T细胞激活元件以及人PD-L1和PD-L2的CHO细胞和具有NFAT-萤光素酶报道基因的Jurkat T细胞组成的Promega PD-1测定测试可瑞达、泰圣奇(Tecentriq)和BiPDL阻断PD-1介导的T细胞抑制的能力。

[0042] 图13:F16-F10-PDL2数据表明效应物BiPDL3抗体在“冷”肿瘤中具有前景。BiPDL3可治愈PD-1抗性B16黑素瘤。在第3、6、9、12天用指定抗体腹膜内处理在胸部植入5×10⁴B16.F10黑素瘤的小鼠。GASDIE=增强ADCC/P的具有T236A、S239D、I332E突变的hIgG1。

具体实施方式

[0043] 本发明人已经产生了对人PD-L1和PD-L2蛋白二者均具有结合特异性的单克隆抗体。由于已经证明这些抗体与PD-L1和PD-L2二者结合,因此其为阻断PD-L1或PD-L2与PD-1结合提供了机会。其还可用于将治疗有效载荷递送至表达PD-L1或PD-L2的癌细胞。以下甚至更详细地描述本公开内容的这些和其他方面。

[0044] I. PD-L1

[0045] A. 结构

[0046] 程序性死亡配体1(programmed death-ligand 1,PD-L1)是由CD274基因编码的蛋白质。PD-L1是40kDa的1型跨膜蛋白,其可在多个事件例如妊娠、组织同种异体移植、自身免疫病、癌症及其他疾病状态期间在免疫抑制中起主要作用。人PD-L1蛋白由以下所示的氨基酸序列编码:

```
MRIFAVFIFMTYWHLNNAFTVTVPKDLYVVEYGSNMTIECKFPVEKQLDLAALIVYWEMEDK
NI IQFVHGEE DLKVQHSSYRQRARLLKDQLSLGNAALQITDVKLQDAGVYRCMISYGGADYK
```

[0047] RITVKVNAPY NKINQRILVVD PVTSEHELT CQAEGYPKAEVIWTS SDHQVLSGKTTTTNSKR
EEKLFNVTSTLRINTTTNEIFYCTFRRLDPEENHTAELVIPELPLAHPNERTHLVILGAIL
LCLGVALTFIFRLRKGRMMDVKKCGIQDTNSKKQSDTHLEET (SEQ ID NO: 1)

[0048] B. 功能

[0049] PD-L1是其受体PD-1的配体。PD-1可存在于活化的T细胞、B细胞和骨髓细胞上。PD-L1与PD-1的结合调节T细胞和B细胞的激活或抑制,传递降低抗原特异性CD8+T细胞和CD4+辅助性T细胞的增殖的抑制信号。PD-L1与PD-1的结合还诱导凋亡。CD8+T细胞和CD4+辅助性T细胞的这种降低被认为帮助表达PD-L1的癌细胞逃脱抗肿瘤免疫(Dong et al.,2002)。PD-L1的上调与逃脱宿主免疫系统相关,并且被认为是肿瘤侵袭性提高的一个原因(Thompson et al.,2004)。PD-L1在逃脱抗肿瘤免疫中的作用使其成为用于治疗性干预的有吸引力的靶标。

[0050] II. PD-L2

[0051] A. 结构

[0052] 程序性死亡配体2(programmed death-ligand 2,PD-L2)是由CD273基因编码的蛋白质。PD-L2是31kDa的蛋白质,其可在多个事件例如妊娠、组织异体移植、自身免疫病、癌症及其他疾病状态期间在免疫抑制中起主要作用。人PD-L2蛋白由以下所示的氨基酸序列编码:

```
MIFLLLMLSLLELQLHQIAALFTVTVPKELYIIIEHGSNVTLECNFDTGSHVNLGAITASLQKV
ENDTSPHRERATLLEEQLPLGKASFHQPQVQRDEGQYQCI IYGVAWDYKYLT LKVKASYR
```

[0053] KINTHILKVPETDEVELTCQATGYPLAEVSWPNVSV PANTSHSRTPEGLYQVTSVLR LKPPP
GRNFSCVFWNTHVRELTLASIDLQSQMEPRTHPTWLLHIFIPFCIIAFIFIATVIALRKQLC
QKLYSSKDTTKRPVTTTKREVNSAI (SEQ ID NO: 2)

[0054] PD-L2最初产生时具有对应于SEQ ID NO.2的第1至19位氨基酸的信号肽,其随后被去除而产生成熟蛋白。成熟PD-L2蛋白(对应于SEQ ID NO.2的第20至273位氨基酸)包含Ig样V结构域、Ig样C2型结构域、跨膜结构域和胞质尾区。

[0055] B. 功能

[0056] PD-L2是其受体PD-1的配体。PD-1可存在于活化的T细胞、B细胞和骨髓细胞上。PD-L2与PD-1的结合开始了损害T细胞的增殖、细胞因子产生、细胞溶解功能和存活的免疫级联。PD-1传递降低抗原特异性CD8⁺T细胞和CD4⁺辅助性T细胞的增殖的抑制信号。PD-L2还已表明在多种癌症中是针对PD-1抗体派姆单抗 (pembrolizumab) 的响应的独立预测因子 (Yearley et al., 2017)。

[0057] III. 单克隆抗体及其产生

[0058] A. 一般方法

[0059] 针对PD-L1和PD-L2的抗体可通过本领域中公知的标准方法产生 (参见, 例如, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988; 美国专利4, 196, 265)。用于产生单克隆抗体 (MAb) 的方法通常沿着与用于制备多克隆抗体的那些路线相同的路线开始。这两种方法的第一步是对合适的宿主进行免疫接种或鉴定由于之前的自然感染而免疫接种的对象。如本领域中公知的, 用于免疫接种的给定组合物的免疫原性可不同。因此, 通常有必要加强宿主的免疫系统, 如可通过使肽或多肽免疫原与载体偶联来实现。示例性且优选的载体是钥孔戚血蓝蛋白 (keyhole limpet hemocyanin, KLH) 和牛血清白蛋白 (bovine serum albumin, BSA)。其他白蛋白例如卵白蛋白、小鼠血清白蛋白或兔血清白蛋白也可用作载体。用于使多肽与载体蛋白缀合的方式是本领域中公知的, 并且包括戊二醛、间马来酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基琥珀酰亚胺酯 (m-maleimidobencoyl-N-hydroxysuccinimide ester)、碳二亚胺和双-重氮联苯胺 (bis-biazotized benzidine)。同样如本领域中公知的, 特定免疫原组合物的免疫原性可通过使用称为佐剂的免疫应答的非特异性刺激剂来增强。示例性且优选的佐剂包括完全弗氏佐剂 (包含经杀伤结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 的免疫应答的非特异性刺激剂)、不完全弗氏佐剂和氢氧化铝佐剂。

[0060] 用于产生多克隆抗体的免疫原组合物的量根据免疫原的性质以及用于免疫接种的动物而变化。可使用多种途径来施用免疫原 (皮下、肌肉、皮内、静脉内和腹膜内)。可通过在免疫接种之后的不同点对经免疫接种的动物采血来监测多克隆抗体的产生。也可给予第二、加强注射。重复加强免疫和滴定过程直到达到合适的效价。当获得期望的免疫原性水平时, 可对经免疫接种的动物取血, 分离血清并储存, 和/或可将动物用于产生单克隆抗体。

[0061] 在免疫接种之后, 选择具有产生抗体之潜力的体细胞, 特别是B淋巴细胞 (B细胞) 用于mAb产生方案。这些细胞可从活检脾或淋巴结或者从循环血液中获得。然后, 使来自经免疫接种动物之产生抗体的B淋巴细胞与永生生化骨髓瘤细胞的细胞融合, 其通常是与经免疫接种动物为同一物种的永生生化骨髓瘤细胞或者是人或人/小鼠嵌合细胞。适合用于产生杂交瘤的融合程序的骨髓瘤细胞系优选地不产生抗体、具有高融合效率且具有酶缺陷, 这随后使其不能在仅支持期望的融合细胞 (杂交瘤) 生长的某些选择培养基中生长。

[0062] 如本领域技术人员已知的, 可使用多种骨髓瘤细胞中的任一种 (Goding, 第65至66页, 1986; Campbell, 第75至83页, 1984)。例如, 在免疫接种动物为小鼠的情况下, 可使用P3-X63/Ag8、X63-Ag8.653、NS1/1.Ag 4 1、Sp210-Ag14、F0、NS0/U、MPC-11、MPC11-X45-GTG 1.7和S194/5XX0 Bu1; 对于大鼠, 可使用R210.RCY3、Y3-Ag 1.2.3、IR983F和4B210; 并且U-266、GM1500-GRG2、LICR-LON-HMy2和UC729-6全部均可与人细胞融合联合使用。一种特定的鼠骨髓瘤细胞是NS-1骨髓瘤细胞系 (也称为P3-NS-1-Ag4-1), 其容易地可通过请求细胞系储库

号GM3573从NIGMS人遗传突变细胞储库(Human Genetic Mutant Cell Repository)获得。另一种可使用的小鼠骨髓瘤细胞系是8-氮杂鸟嘌呤抗性小鼠鼠骨髓瘤SP2/0非生产细胞系。最近,已经描述了用于人B细胞的另外的融合配偶体谱系,包括KR12(ATCC CRL-8658; K6H6/B5(ATCC CRL-1823SHM-D33(ATCC CRL-1668)和HMMA2.5(Posner et al.,1987)。本公开内容中的抗体使用SP2/0/mIL-6细胞系(SP2/0系的分泌IL-6的衍生物)产生。

[0063] 用于产生抗体产生脾细胞或淋巴结细胞与骨髓瘤细胞的杂合体的方法通常包括:在存在促进细胞膜融合的一种或更多种试剂(化学或电学)的情况下使体细胞与骨髓瘤细胞以2:1的比例混合,但是该比例可分别为约20:1至约1:1而不等。Kohler和Milstein(1975;1976)已经描述了使用仙台病毒(Sendai virus)的融合方法,并且Geftter et al.(1977)已经描述了使用聚乙二醇(PEG)例如37%(v/v)PEG的融合方法。使用电诱导融合方法也是合适的(Goding,第71至74页,1986)。

[0064] 融合操作通常以约 1×10^{-6} 至 1×10^{-8} 的低频率产生活的杂合体。然而,这并不造成问题,因为通过在选择培养基中培养,活的融合杂合体与亲本未融合细胞(特别是在正常情况下将持续无限分裂的未融合骨髓瘤细胞)区分开来。选择培养基通常是在组织培养基中包含阻断核苷酸从头合成的试剂的培养基。示例性且优选的试剂是氨基蝶呤、甲氨蝶呤和重氮丝氨酸。氨基蝶呤和甲氨蝶呤阻断嘌呤和嘧啶二者的从头合成,而重氮丝氨酸仅阻断嘌呤合成。当使用氨基蝶呤或甲氨蝶呤时,向培养基中补充次黄嘌呤和胸苷作为核苷酸的来源(HAT培养基)。当使用重氮丝氨酸时,向培养基中补充次黄嘌呤。如果B细胞来源是EB病毒(Epstein Barr virus,EBV)转化的人B细胞系,则添加乌本苷(ouabain)以清除未与骨髓瘤融合的EBV转化系。

[0065] 优选的选择培养基是HAT或具有乌本苷的HAT。只有能够进行核苷酸补救途径的细胞才能在HAT培养基中存活。骨髓瘤细胞在补救途径的关键酶(例如,次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶(hypoxanthine phosphoribosyl transferase,HPRT))中有缺陷,因此其不能存活。B细胞可进行该途径,但是其在培养中具有有限的寿命并且通常在约2周内死亡。因此,只有可在选择培养基中存活的细胞才是由骨髓瘤和B细胞形成的那些杂合体。当用于融合的B细胞的来源是EBV转化的B细胞系时,此时还将乌本苷用于杂合体的药物选择,因为EBV转化的B细胞对药物杀伤敏感,而选择所使用的骨髓瘤配偶体对乌本苷具有抗性。

[0066] 培养提供了从中选择特定杂交瘤的杂交瘤群体。通常如下进行杂交瘤的选择:通过在微量滴定板中进行单克隆稀释来培养细胞,随后针对期望反应性测试单个克隆上清液(在约2至3周之后)。测定应灵敏、简单并且迅速,例如放射免疫测定、酶免疫测定、细胞毒性测定、噬菌斑测定、斑点免疫结合测定等。

[0067] 然后将选择的杂交瘤连续稀释或通过流式细胞术分选进行单细胞分选,并克隆到单独抗体产生细胞系中,所述克隆然后可无限增殖以提供mAb。细胞系可以以两种基本方式用于MAb产生。可将杂交瘤样品注射(通常注射到腹腔中)到动物(例如,小鼠)中。任选地,在注射之前将动物用烃,特别是油(例如,姥鲛烷(四甲基十五烷))致敏(prime)。当以这种方式使用人杂交瘤时,注射免疫缺损的小鼠(例如SCID小鼠)是最佳的,以防止肿瘤排斥。经注射动物出现分泌由融合细胞杂合体产生的特异性单克隆抗体的肿瘤。然后,可放出动物的体液例如血清或腹水以提供高浓度mAb。也可在体外培养单个细胞系,其中mAb自然地分泌到培养基中,从中可容易地获得高浓度的mAb。或者,可在体外使用人杂交瘤细胞系以在

细胞上清液中产生免疫球蛋白。可将细胞系调整为在不含血清的培养基中生长,以优化回收高纯度人单克隆免疫球蛋白的能力。

[0068] 如果期望的话,以任一种方式产生的单克隆抗体可进一步使用过滤、离心和多种色谱方法(例如FPLC或亲和色谱)纯化。本公开内容的单克隆抗体的片段可通过以下方法由经纯化的单克隆抗体获得:其包括用酶(例如胃蛋白酶或木瓜蛋白酶)消化,和/或通过经化学还原切割二硫键。或者,本公开内容所涵盖的单克隆抗体片段可使用自动化肽合成仪合成。

[0069] 还在考虑之中的是,可使用分子克隆方法来产生单克隆抗体。为此,可从杂交瘤系分离RNA,通过RT-PCR获得抗体基因,并将其克隆到免疫球蛋白表达载体中。或者,由从细胞系分离的RNA制备组合的免疫球蛋白噬菌粒文库,并使用病毒抗原通过淘选选择表达合适抗体的噬菌粒。这种方法相对于常规杂交瘤技术的优点是:可在单轮中产生和筛选多达约 10^4 倍的抗体,并且通过H链和L链组合产生了新的特异性,这进一步提高了发现合适抗体的机会。

[0070] 可合理地设计基于酵母的抗体文库,并且可从这样的基于酵母的抗体展示文库中选择和/或分离抗体,如在例如,W02012/009568;W02009/036379;W02010/105256;W02003/074679;美国专利8,691,730;和美国专利9,354,228中所公开的。抗体可从任何如上公开的期望的细胞类型表达为全长IgG并进行纯化。

[0071] 教导产生可用于本公开内容的抗体的其他美国专利(各自通过引用并入本文)包括美国专利5,565,332,其描述了使用组合方法产生嵌合抗体;美国专利4,816,567,其描述了重组免疫球蛋白制备;以及美国专利4,867,973,其描述了抗体-治疗剂缀合物。

[0072] B. 本公开内容的抗体

[0073] 根据本公开内容的抗体可在第一种情况下通过其结合特异性,即与PD-L1和PD-L2结合来定义。通过使用本领域技术人员公知的技术评估给定抗体的结合特异性/亲和力,本领域技术人员可确定这样的抗体是否落入本发明权利要求书的范围内。在一方面中,提供了具有分别如表3和表4中所示的来自重链和轻链的克隆配对CDR的单克隆抗体。这样的抗体可使用本文中所述的方法通过以下在实施例部分中讨论的克隆产生。

[0074] 在第二方面中,抗体可通过其包括另外的“框架”区的可变序列定义。这些在表1和表2中提供,其编码或代表完整的可变区。此外,抗体序列可不同于这些序列,任选地使用以下更详细讨论的方法。例如,核酸序列可在以下方面不同于上述那些:(a) 可变区可与轻链和重链的恒定结构域分离;(b) 核酸可不同于上述那些同时不影响由其编码的残基;(c) 核酸可以以给定百分比,例如70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源性不同于上述核酸;(d) 核酸可由于在高严格性条件下进行杂交的能力而不同于上述核酸,如通过低盐和/或高温条件所例示的,例如由约50°C至约70°C的温度下约0.02M至约0.15M NaCl提供的;(e) 氨基酸可以以给定百分比,例如80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同源性不同于上述氨基酸;或者(f) 氨基酸可通过允许保守替换(以下讨论)而不同于上述那些。前述各项均适用于如表1所示的核酸序列和表2的氨基酸序列。

[0075] C. 抗体序列的改造

[0076] 在多个实施方案中,可出于多种原因,例如改善表达、改善交叉反应性或降低脱靶

结合而选择对所鉴定抗体的序列进行改造。以下是用于抗体改造的相关技术的一般讨论。

[0077] 可培养杂交瘤,然后裂解细胞,并提取总RNA。可使用随机六聚体和RT一起来产生RNA的cDNA拷贝,并随后使用预期扩增所有人可变基因序列的PCR引物的多重混合物进行PCR。可将PCR产物克隆到pGEM-T Easy载体中,然后使用标准载体引物通过自动化DNA测序进行测序。可使用从杂交瘤上清液收集并使用G蛋白柱通过FPLC纯化的抗体进行结合和中和的测定。

[0078] 可如下产生重组全长IgG抗体:将来自克隆载体的重链和轻链Fv DNA亚克隆到IgG质粒载体中,转染到293Freestyle细胞或CHO细胞中,并从293或CHO细胞上清液中收集和纯化抗体。

[0079] 与最终cGMP生产过程在相同宿主细胞和细胞培养过程中产生的抗体的迅速可用性具有降低过程开发计划的持续时间的潜力。Lonza已经开发了使用在CDACF培养基中培养的合并转染子用于在CHO细胞中迅速产生少量(多至50g)抗体的一般方法。尽管比真正的瞬时系统稍慢,但是其优点包括更高的产物浓度和与生产细胞系使用相同的宿主和过程。在一次性生物反应器中表达模型抗体之GS-CHO库的生长和生产力的实例为:在以补料分批模式进行的一次性袋状生物反应器培养(5L工作体积)中,在转染后9周内达到了2g/L的收获抗体浓度。

[0080] 可合理地设计和合成抗体以及可从中选择和/或分离这样的抗体的抗体文库,例如通过 **Adimab**[®] 技术,如在例如W02012/009568;W02009/036379;W02010/105256;W02003/074679;美国专利8,691,730;和美国专利9,354,228中所公开的。这种合成抗体的方法需要将编码期望的或设计的抗体的核苷酸序列插入到用于异位表达的载体中。然后,期望的抗体可作为全链IgG分子表达并进行纯化。

[0081] 抗体分子将包含例如通过mAb的蛋白水解切割产生的片段(例如F(ab')₂)或者例如可通过重组方式产生的单链免疫球蛋白。这样的抗体衍生物是单价的。在一个实施方案中,这样的片段可彼此组合,或者与其他抗体片段或受体配体组合以形成“嵌合”结合分子。明显地,这样的嵌合分子可包含能够与同一分子的不同表位结合的取代基。

[0082] 在一些相关实施方案中,抗体是所公开抗体的衍生物,例如,包含与所公开抗体中CDR序列相同的CDR序列的抗体(例如,嵌合抗体或CDR接枝抗体)。或者,可希望进行修饰,例如向抗体分子中引入保守变化。在进行这种变化时,可考虑氨基酸的亲水指数(hydrophatic index)。氨基酸亲水指数在赋予蛋白质以相互作用生物学功能中的重要性是本领域中通常了解的(Kyte和Doolittle,1982)。已接受的是,氨基酸的相对亲水特性有助于所得蛋白质的二级结构,其转而限制了蛋白质与其他分子(例如酶、底物、受体、DNA、抗体、抗原等)的相互作用。

[0083] 本领域中还应理解的是,可基于亲水性有效地进行类似氨基酸的替换。美国专利4,554,101(通过引用并入本文)声称:蛋白质的最大局部平均亲水性(如受其邻近氨基酸的亲水性支配)与蛋白质的生物学特性相关。如美国专利4,554,101中所详述的,已向氨基酸残基分配了以下亲水性值:碱性氨基酸:精氨酸(+3.0)、赖氨酸(+3.0)和组氨酸(-0.5);酸性氨基酸:天冬氨酸(+3.0±1)、谷氨酸(+3.0±1)、天冬酰胺(+0.2)和谷氨酰胺(+0.2);亲水性非离子氨基酸:丝氨酸(+0.3)、天冬酰胺(+0.2)、谷氨酰胺(+0.2)和苏氨酸(-0.4);含硫氨基酸:半胱氨酸(-1.0)和甲硫氨酸(-1.3);疏水性非芳族氨基酸:缬氨酸(-1.5)、亮氨

酸(-1.8)、异亮氨酸(-1.8)、脯氨酸(-0.5±1)、丙氨酸(-0.5)和甘氨酸(0);疏水性芳族氨基酸:色氨酸(-3.4)、苯丙氨酸(-2.5)和酪氨酸(-2.3)。

[0084] 应理解的是,氨基酸可被替换为具有类似亲水性的另一氨基酸,并且产生在生物学或免疫学上修饰的蛋白质。在这样的变化中,优选亲水性值在±2内的氨基酸的替换,特别优选在±1内的那些,并且甚至更特别优选在±0.5内的那些。

[0085] 如上文概括的,氨基酸替换通常基于氨基酸侧链取代基的相对类似性,例如,其疏水性、亲水性、电荷、大小等。考虑多个前述特征的示例性替换是本领域技术人员公知的,并且包括:精氨酸和赖氨酸;谷氨酸和天冬氨酸;丝氨酸和苏氨酸;谷氨酰胺和天冬酰胺;以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。

[0086] 本公开内容还考虑了同种型修饰。通过修饰Fc区域以具有不同同种型,可实现不同功能。例如,改变为IgG₁可提高抗体依赖性细胞细胞毒性,转换为A类可改善组织分布,以及转换为M类可改善价位。

[0087] 可通过本领域技术人员已知的任何技术制备经修饰的抗体,包括通过标准分子生物学技术进行表达,或者化学合成多肽。用于重组表达的方法在本文其他地方涉及。

[0088] D. 单链抗体

[0089] 单链可变片段(scFv)是用短(通常丝氨酸、甘氨酸)接头连接在一起的免疫球蛋白重链和轻链可变区的融合物。这种嵌合分子虽然去除了恒定区并且引入了接头肽但是保留了原始免疫球蛋白的特异性。这种修饰通常不改变特异性。历史上产生这些分子是为了有利于噬菌体展示,其中将抗原结合结构域表达为单个肽非常方便。或者,可由来源于杂交瘤的亚克隆重链和轻链直接产生scFv。单链可变片段缺少存在于完全抗体分子中的恒定Fc区,并且因此缺少用于纯化抗体的常见结合位点(例如,蛋白A/G)。这些片段通常可使用蛋白L纯化/固定,因为蛋白L与κ轻链的可变区相互作用。

[0090] 柔性接头通常由促进螺旋和转角的氨基酸残基(例如丙氨酸、丝氨酸和甘氨酸)构成。然而,其他残基也可很好地作用。Tang et al. (1996)使用噬菌体展示作为从蛋白质接头文库中快速选择用于单链抗体(scFv)的专用接头的方式。构建随机接头文库,其中用于重链和轻链可变结构域的基因通过编码具有可变组成的18-氨基酸多肽的区段连接。在丝状噬菌体上展示scFv库(约 5×10^6 个不同成员)并且用半抗原进行亲和选择。所选择变体的群体表现出结合活性显著提高,但是保留了相当大的序列多样性。随后筛选1054个单独变体产生了以可溶性形式有效产生的催化活性scFv。序列分析揭示,所选择栓链(tether)的仅有的共同特征是: V_H C末端之后的2个残基是接头中的保守脯氨酸以及在其他位置处有大量的精氨酸和脯氨酸。

[0091] 本公开内容的重组抗体还可涉及允许受体二聚化或多聚化的序列或部分。这样的序列包括来源于IgA的那些,其允许与J链联合形成多聚体。另一个多聚化结构域是Ga14二聚化结构域。在另一些实施方案中,可用允许两个抗体组合的试剂(例如生物素/抗生物素蛋白)对链进行修饰。

[0092] 在一个独立的实施方案中,可通过使用非肽接头或化学单元连接受体轻链和重链来产生单链抗体。通常来说,使轻链和重链在不同细胞中产生,纯化,并且随后以合适的方式连接在一起(即,通过合适的化学桥将重链的N末端与轻链的C末端连接)。

[0093] 使用交联试剂形成将两个不同分子的官能团系住的分子桥,例如,稳定和凝结剂。

然而,可预期的是,可产生相同类似物的二聚体或多聚体或者包含不同类似物的异聚复合体。为了以逐步方式连接两个不同化合物,可使用异-双官能交联剂,其消除了不想要的均聚物形成。

[0094] 一种示例性的异-双官能交联剂包含两个反应性基团:一个与伯胺基(例如,N-羧基琥珀酰亚胺)反应并且另一个与硫醇基团(例如,吡啶基二硫化物、马来酰亚胺、卤素等)反应。通过伯胺反应基,交联剂可与一个蛋白质(例如,所选择的抗体或片段)的赖氨酸残基反应,并且通过硫醇反应基,已经系在第一蛋白质上的交联剂与另一蛋白质(例如,选择剂的半胱氨酸残基(游离巯基)反应。

[0095] 优选地,使用在血液中具有合理稳定性的交联剂。已知多种类型含二硫键的接头可成功用于使靶向剂和治疗剂/预防剂缀合。包含在空间上受阻之二硫键的接头可证明在体内提供更高稳定性,从而防止靶向肽在到达作用位点之前释放。因此,这些接头是一组连接剂。

[0096] 另一种交联试剂是SMPT,这是一种包含二硫键的双官能交联剂,该二硫键由于邻近的苯环和甲基而在“空间上受阻”。认为二硫键的空间位阻发挥了保护键不被可存在于组织和血液中的硫醇盐阴离子(例如谷胱甘肽)攻击的功能,并且从而有助于防止缀合物在连接的药剂递送到靶部位之前解偶联。

[0097] 与许多其他已知的交联试剂一样,SMPT交联试剂也能够使官能团例如半胱氨酸的SH或伯胺(例如,赖氨酸的 ϵ 氨基)交联。另一种可能的交联剂类型包括含有可切割二硫键的异-双官能光反应性叠氮基苯,例如磺基琥珀酰亚胺基-2-(对叠氮基水杨酰氨基)乙基-1,3'-二硫代丙酸酯。N-羧基-琥珀酰亚胺基与伯氨基反应,并且叠氮基苯(光分解之后)非选择性地与任何氨基酸残基反应。

[0098] 除了受阻交联剂,非受阻交联剂也可据此使用。不考虑包含或产生被保护的二硫化物的话,其他有用的交联剂包括SATA、SPDP和2-亚氨基硫烷(Wawrzynczak&Thorpe, 1987)。这样的交联剂的使用是本领域中非常了解的。另一个实施方案涉及使用柔性接头。

[0099] 美国专利4,680,338描述了可用于产生配体与含胺聚合物和/或蛋白质的缀合物,特别是用于与螯合剂、药物、酶、可检测标记等形成抗体缀合物的双官能接头。美国专利5,141,648和5,563,250公开了包含在多种温和条件下可切割之不稳定键的可切割缀合物。这种接头特别可用,因为目的药剂可直接与接头键合,并且其切割导致活性剂的释放。特别的用途包括向蛋白质例如抗体或药物添加游离氨基或游离巯基。

[0100] 美国专利5,856,456提供了用于连接多肽成分以制备融合蛋白(例如,单链抗体)的肽接头。接头的长度为多至约50个氨基酸;包含带电氨基酸(优选精氨酸或赖氨酸)接着是脯氨酸,出现至少一次;并且以更高的稳定性和聚集降低为特征。美国专利5,880,270公开了可用于多种免疫诊断和分离技术的包含氨基氧基的接头。

[0101] E. 纯化

[0102] 在某些实施方案中,本公开内容的抗体可以是经纯化的。如本文中使用的术语“纯化的”意在指可与其他组分分离的组合物,其中蛋白质被纯化至相对于其可天然获得状态的任何程度。因此,经纯化的蛋白质也指这样的蛋白质,其脱离了其可天然存在的环境。当使用术语“基本上纯化的”时,该指定是指这样的组合物,其中蛋白质或肽形成该组合物的主要组分,例如构成组合物中蛋白质的约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%或

更多。

[0103] 蛋白质纯化技术是本领域技术人员公知的。这些技术在一个水平上涉及将细胞环境粗分级至多肽级分和非多肽级分。在使多肽与其他蛋白质分离之后,可使用色谱和电泳技术进一步纯化目的多肽以实现部分纯化或完全纯化(或纯化至均质)。特备适合制备纯肽的分析方法是离子交换色谱、排阻色谱;聚丙烯酰胺凝胶电泳;等电聚集。其他用于蛋白质纯化的方法包括用硫酸铵、PEG、抗体等或通过热变性进行沉淀,然后进行离心;凝胶过滤、反相、羟基磷灰石和亲和色谱;以及这些技术与其他技术的组合。

[0104] 在纯化本公开内容的抗体中,可需要在原核或真核表达系统中表达多肽并使用变性条件提取蛋白质。可使用与多肽的标记部分结合的亲和柱从其他细胞组分纯化多肽。如本领域中通常已知的,认为进行各纯化步骤的顺序可改变,或者可省略某些步骤,并且仍然获得适合制备基本上纯化的蛋白质或肽的方法。

[0105] 通常,使用与抗体的Fc部分结合的试剂(即,蛋白A)对完全抗体进行分级。或者,可使用抗原以同时纯化和选择合适的抗体。这样的方法通常使用结合在支持物(例如柱、过滤器或珠)上的选择剂。使抗体与支持物结合,除去(例如,冲洗掉)污染物,并通过施加条件(盐、热等)释放抗体。

[0106] 根据本公开内容,本领域技术人员将知道多种用于对蛋白质或肽之纯化程度进行定量的方法。这些包括例如确定活性级分的比活性,或者通过SDS/PAGE分析来评估级分中多肽的量。另一种用于评估级分纯度的方法是计算级分的比活性,将其与初始提取物的比活性比较,并且因此计算纯度。当然,用于表示活性量的实际单位将取决于根据纯化而选择的特定测定技术,以及所表达蛋白质或肽是否表现出可检测活性。

[0107] 已知多肽的迁移可随着不同的SDS/PAGE条件而改变,有时候显著地改变(Capaldi et al., 1977)。因此,应理解的是,在不同的电泳条件下,纯化的或部分纯化的表达产物的表观分子量可改变。

[0108] IV. 药物制剂和癌症治疗

[0109] A. 癌症

[0110] 癌症由来自组织之细胞的克隆群的过度生长造成。癌症的发生(称为致癌作用)可以以多种方式建模和表征。很早以前就已经理解了癌症发生与炎症之间的联系。炎性应答参与针对微生物感染的宿主防御,并且还驱动组织修复和再生。大量证据指出了炎症与癌症发生风险之间的联系,即,慢性炎症可导致发育异常。

[0111] 可应用本公开内容的方法的癌细胞一般地包括表达PD-L1或PD-L2并且更特别地过表达PD-L1或PD-L2的任何细胞。合适的癌细胞可以是乳腺癌、肺癌、结肠癌、胰腺癌、肾癌、胃癌、肝癌、骨癌、血液学癌症(例如,白血病或淋巴瘤)、神经组织癌症、黑素瘤、卵巢癌、睾丸癌、前列腺癌、宫颈癌、阴道癌或膀胱癌的细胞。另外,本公开内容的方法可应用于多种物种,例如人、非人灵长类(例如,猴、狒狒或黑猩猩)、马、牛、猪、绵羊、山羊、狗、猫、兔、豚鼠、沙鼠、仓鼠、大鼠和小鼠。癌症还可以是复发性的、转移性的和/或多种抗药性的,并且本公开内容的方法可特别地应用于这样的癌症以使其可切除、延长或重新诱导缓解、抑制血管生成、阻止或限制转移、和/或治疗多种抗药性癌症。在细胞水平上,这可转化为杀伤癌细胞、抑制癌细胞生长或以其他方式逆转或降低肿瘤细胞的恶性表型。

[0112] B. 制剂和施用

[0113] 本公开内容提供了包含针对PD-L1和PD-L2的双特异性抗体 (BiPDL) 的药物组合物。在一个具体实施方案中,术语“可药用的”意指由联邦或州政府的监管机构批准或者在美国药典或其他公认的药典中列出用于动物并且更特别地用于人。术语“载体”是指与治疗剂一起施用的稀释剂、赋形剂或载剂。这样的药用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、豆油、矿物油、芝麻油等。另一些合适的药用赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、盐水、右旋糖、明胶、麦芽、稻、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂乳粉、甘油、丙二醇、水、乙醇等。

[0114] 所述组合物可被配制为中性或盐形式。可药用盐包括与阴离子形成的那些,所述阴离子例如来源于盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的那些;以及与阳离子形成的那些,所述阳离子例如来源于钠、钾、铵、钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、2-乙基氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等的那些。

[0115] 本公开内容的抗体可包括经典药物制剂。根据本公开内容的这些组合物的施用将通过任何常用途径进行,只要通过该途径能够到达靶组织即可。这包括经口、经鼻、口含、直肠、阴道或表面。或者,可通过皮内、皮下、肌肉、腹膜内或静脉内注射施用。这样的组合物将通常作为上述可药用组合物施用。特别感兴趣的是直接瘤内施用、肿瘤灌注或者向肿瘤局部或区域性施用,例如施用在局部或区域性血管系统或淋巴系统中,或者切除的肿瘤床中。

[0116] 活性化合物还可肠胃外或腹膜内施用。作为游离碱或者药理学上可接受的盐的活性化合物的溶液可在与表面活性剂(例如羟丙基纤维素)适当混合的水中制备。也可在甘油、液体聚乙二醇、及其混合物中、以及在油中制备分散体。在普通的储存和使用条件下,这些制剂包含防腐剂以防止微生物的生长。

[0117] C. 组合治疗

[0118] 在本公开内容的上下文中,还可预期的是,本文中所述的针对PD-L1和PD-L2的双特异性抗体 (BiPDL) 可类似地与化学或放射治疗干预或其他治疗联合使用。特别地,将双特异性PD-L1和PD-L2抗体与靶向PD-L1或PD-L2功能不同方面的其他治疗(例如靶向PD-L1或PD-L2胞质结构域的肽和小分子)进行组合也可证明是有效的。

[0119] 为了使用本公开内容的方法和组合物来杀伤细胞、抑制细胞生长、抑制转移、抑制血管生成或以其他方式逆转或降低肿瘤细胞的恶性表型,通常将使“靶”细胞与根据本公开内容的双特异性抗PD-L1且抗PD-L2抗体和至少一种其他药剂接触。这些组合物将以有效杀伤细胞或抑制细胞增殖的组合物提供。该过程可包括使细胞与根据本公开内容的双特异性抗PD-L1且抗PD-L2抗体和另外药剂或因子同时接触。这可通过使细胞与包含这两种药剂的单一组合物或药理制剂接触来实现,或者通过使细胞与两种不同的组合物或制剂同时接触来实现,其中一种组合物包含根据本公开内容的双特异性抗PD-L1且抗PD-L2抗体并且另一种包含另外药剂。

[0120] 或者,双特异性抗PD-L1且抗PD-L2抗体治疗可在另外药剂治疗之前或之后,间隔数分钟至数周进行。在另外药剂和双特异性抗PD-L1且抗PD-L2抗体单独施加于细胞的一些实施方案中,通常应确保每次递送之间不超过很长时间,使得药剂和表达构建体仍能够对细胞发挥有利组合作用。在这种情况下,考虑在彼此的约12至24小时内并且更优选在彼此的约6至12小时内使细胞与这两种形式接触,其中最优选延迟时间为仅约12小时。然而,在一些情况下,可期望显著延长治疗时间,其中各施用之间相隔数天(2、3、4、5、6或7天)至数

周(1、2、3、4、5、6、7或8周)。

[0121] 还可考虑期望将双特异性抗PD-L1且抗PD-L2抗体或另外药剂施用多于一次。如下所示,可使用多种组合,其中根据本公开内容的双特异性抗PD-L1且抗PD-L2抗体的治疗是“A”,另外治疗是“B”:

A/B/A B/A/B B/B/A A/A/B B/A/A A/B/B B/B/B/A B/B/A/B

[0122] A/A/B/B A/B/A/B A/B/B/A B/B/A/A B/A/B/A B/A/A/B B/B/B/A

A/A/A/B B/A/A/A A/B/A/A A/A/B/A A/B/B/B B/A/B/B B/B/A/B

[0123] 考虑到抗体治疗的毒性(如果有的话),向患者施用本发明的治疗剂将遵循施用特定第二治疗的一般方案。预期将根据需要重复治疗周期。还可预期的是,可将多种标准治疗以及手术干预与所述癌症治疗组合应用。

[0124] 技术人员受“Remington’s Pharmaceutical Sciences”第15版,第33章,特别是第624-652页指导。根据被治疗对象的病症,将有必要对剂量进行一些改变。在任何情况下,负责施用的人员将决定用于个体对象的合适剂量。此外,对于人施用,制剂应满足FDA生物学标准办公室所要求的无菌性、热原性、一般安全性及纯度的标准。

[0125] 1. 化学治疗

[0126] 癌症治疗还包括多种与化学治疗和基于放射的治疗二者的组合治疗。组合化学治疗包括例如顺铂(CDDP)、卡铂、丙卡巴肼、氮芥、环磷酰胺、喜树碱、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、白消安、亚硝基脲、更生霉素、柔红霉素、多柔比星、博来霉素、普卡霉素、丝裂霉素、依托泊苷(VP16)、他莫昔芬、雷洛昔芬、雌激素受体结合剂、紫杉醇、吉西他滨、诺维本、法呢基蛋白转移酶抑制剂、反式铂剂(transplatinum)、5-氟尿嘧啶、长春新碱、长春碱和甲氨蝶呤、替莫唑胺(Temazolomide)(DTIC的水溶液形式)、或者前述物质的任何类似物或衍生物变体。化学治疗与生物治疗的组合被称为生化治疗。本发明考虑了可在本领域中使用或已知用于治疗或预防癌症的任何化学治疗剂。

[0127] 2. 放射治疗

[0128] 其他造成DNA损伤并且已经广泛使用的因素包括通常已知的 γ -射线、X-射线和/或向肿瘤细胞定向递送放射性同位素。还考虑了其他形式的DNA损伤因素,例如微波和UV辐照。最可能的是所有这些因素对DNA、DNA前体、DNA的复制和修复以及染色体的组装和维持造成广泛的损伤。X-射线的剂量范围为从50至200伦琴的日剂量持续延长的一段时间(3至4周)到2000至6000伦琴的单剂量。放射性同位素的剂量范围变化很大,并且取决于同位素的半衰期、发射的放射的强度和类型以及赘生性细胞的摄取。

[0129] 术语“接触”和“暴露”当应用于细胞时在本文中用于描述将治疗剂和化学治疗剂或放射治疗剂递送至靶细胞或与靶细胞直接并置放置的过程。为了实现细胞杀伤或停滞,将这两种药剂以有效杀伤细胞或阻止细胞分裂的组合量递送至细胞。

[0130] 3. 免疫治疗

[0131] 通常来说,免疫治疗依赖于使用免疫效应细胞和分子来靶向和破坏癌细胞。免疫效应物可以是例如对肿瘤细胞表面上的一些标志物具有特异性的抗体。单独的抗体可用作治疗的效应物或者其可募集其他实际上实现细胞杀伤的细胞。抗体还可与药物或毒素(化学治疗剂、放射性核素、蓖麻毒蛋白A链、霍乱毒素、百日咳毒素等)缀合并且仅用作靶向剂。或者,效应物可以是携带直接或间接地与肿瘤细胞靶标相互作用的表面分子的淋巴细胞。

多种效应细胞包括细胞毒性T细胞和NK细胞。治疗模式(即,直接的细胞毒性活性和抑制或降低Fortilin)的组合将在治疗癌症中提供治疗益处。

[0132] 免疫治疗也可用作组合治疗的一部分。下面讨论组合治疗的一般方法。在免疫治疗的一个方面中,肿瘤细胞必须携带适用于靶向(即,不存在于大多数其他细胞上)的一些标志物。存在许多肿瘤标志物,并且这些中的任一种可适于本发明背景下的靶向。常见的肿瘤标志物包括癌胚抗原、前列腺特异性抗原、泌尿系统肿瘤相关抗原(urinary tumor associated antigen)、胎儿抗原、酪氨酸酶(p97)、gp68、TAG-72、HMFg、唾液酸路易斯抗原(Sialyl Lewis Antigen)、MucA、MucB、PLAP、雌激素受体、层黏连蛋白受体、erb B和p155。免疫治疗的另一个方面是具有免疫刺激效应的抗癌效应。还存在免疫刺激分子,其包括:细胞因子,例如IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、 γ -IFN;趋化因子,例如MIP-1、MCP-1、IL-8以及生长因子,例如FLT3配体。使免疫刺激分子组合(无论作为蛋白质还是与肿瘤抑制因子(例如mda-7)组合使用基因递送)已经显示增强抗肿瘤作用(Ju et al.,2000)。

[0133] 如前所述,目前正在研究或使用的免疫治疗的一些实例是免疫佐剂(例如,牛分枝杆菌(*Mycobacterium bovis*)、恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)、二硝基氯苯和芳族化合物)(美国专利5,801,005;美国专利5,739,169;Hui和Hashimoto,1998;Christodoulides et al.,1998);细胞因子治疗(例如,干扰素和;IL-1、GM-CSF和TNF)(Bukowski et al.,1998;Davidson et al.,1998;Hellstrand et al.,1998);基因治疗(例如,TNF、IL-1、IL-2、p53)(Qin et al.,1998;Austin-Ward和Villaseca,1998;美国专利5,830,880和美国专利5,846,945)以及单克隆抗体(例如,抗神经节苷脂GM2、抗HER-2、抗p185)(Pietras et al.,1998;Hanibuchi et al.,1998;美国专利5,824,311)。赫赛汀(曲妥珠单抗)是阻断HER2-neu受体的嵌合(小鼠-人)单克隆抗体。其具有抗肿瘤活性并且已被批准用于治疗恶性肿瘤(Dillman,1999)。已经显示用赫赛汀和化学治疗对癌症进行组合治疗比单独治疗更有效。因此,考虑一种或更多种抗癌治疗可与本文中所述的肿瘤相关HLA限制性肽治疗一起使用。

[0134] 在过继性免疫治疗中,在体外分离患者的循环淋巴细胞或肿瘤浸润的淋巴细胞,通过淋巴因子(例如IL-2)激活或用肿瘤坏死基因转导,并再施用(Rosenberg et al.,1988;1989)。为了实现这一点,将免疫有效量的活化淋巴细胞与如本文中所述的佐剂并入抗原肽组合物组合施用于动物或人患者。活化的淋巴细胞最优选地是早期从血液或肿瘤样品分离并在体外活化(或“扩增”)的患者自身的细胞。这种免疫治疗形式已经产生了数个黑色素瘤和肾癌消退的病例,但响应者的百分比与没有响应的那些相比而言较低。

[0135] 存在许多用于癌症的被动免疫治疗的不同方法。其可大致分类为以下:注射单独抗体;注射与毒素或化学治疗剂偶联的抗体;注射与放射性同位素偶联的抗体;注射抗独特型抗体;以及最后,清除骨髓中的肿瘤细胞。

[0136] 将人单克隆抗体应用于被动免疫治疗,因为其在患者中产生很少或不产生副作用。然而,它们的应用在某种程度上由于其稀缺性而受到限制,并且迄今为止仅病灶内施用。已经将针对神经节苷脂抗原的人单克隆抗体病灶内施用于患有皮肤复发性黑色素瘤的患者(Irie&Morton,1986)。在每日或每周病灶内注射之后,在10名患者中的6名中观察到消退。在另一项研究中,由两种人单克隆抗体的病灶内注射实现了适度成功(Irie et al.,1989)。可能的治疗性抗体包括抗TNF、抗CD25、抗CD3、抗CD20、CTLA-4-IG和抗CD28。

[0137] 施用针对两种不同抗原的多于一种单克隆抗体或甚至具有多种抗原特异性的抗体可以是有利的。治疗方案还可包括施用淋巴因子或其他免疫增强剂,如Bajorin et al. (1988)所述的。在本说明书的其他部分中进一步详细描述了人单克隆抗体的开发。

[0138] 4. 基因治疗

[0139] 在另一个实施方案中,第二治疗是基因治疗,其中在施用肿瘤相关HLA限制性肽之前、之后或相同时间施用治疗性多核苷酸。将编码肿瘤相关HLA限制性肽的载体与编码以下基因产物之一的第二载体联合递送将对靶组织具有组合的抗过度增殖作用。或者,可使用编码两个基因的单一载体。多种蛋白质涵盖在本发明内,其中一些描述如下。与本发明组合的一些形式的基因治疗可靶向的多种基因是本领域普通技术人员公知的,并且可包括与癌症相关的任何基因。

[0140] 细胞增殖的诱导剂:诱导细胞增殖的蛋白质根据功能进一步分为多种类别。所有这些蛋白质的共性是其调节细胞增殖的能力。例如,PDGF的一种形式,sis癌基因,是一种分泌型生长因子。癌基因很少来自编码生长因子的基因,并且目前,sis是唯一已知天然存在的致癌性生长因子。在本发明的一个实施方案中,可预期的是,使用针对细胞增殖的特定诱导剂的反义mRNA来防止细胞增殖诱导剂的表达。

[0141] 蛋白质FMS、ErbA、ErbB和neu是生长因子受体。这些受体的突变导致可调节功能的丧失。例如,影响Neu受体蛋白的跨膜结构域的点突变导致neu癌基因。erbA癌基因来源于甲状腺激素的胞内受体。认为经修饰的致癌性ErbA受体与内源性甲状腺激素受体竞争,导致生长不受控制。

[0142] 最大的癌基因类别包括信号转导蛋白(例如,Src、Abl和Ras)。蛋白质Src是胞质蛋白酪氨酸激酶,并且其从原癌基因向癌基因的转变在一些情况下是通过酪氨酸残基527处的突变而导致的。相比之下,在一个实例中,GTPase蛋白ras从原癌基因向癌基因的转变是由序列中第12位氨基酸处的缬氨酸突变为甘氨酸从而降低ras GTPase活性而导致的。蛋白质Jun、Fos和Myc是作为转录因子直接对核功能发挥其作用的蛋白质。

[0143] 细胞增殖的抑制剂:肿瘤抑制因子癌基因的功能是抑制过度细胞增殖。这些基因的失活破坏了它们的抑制活性,导致不受调节的增殖。最常见的肿瘤抑制因子是Rb、p53、p21和p16。根据本发明可使用的其他基因包括APC、DCC、NF-1、NF-2、WT-1、MEN-I、MEN-II、zac1、p73、VHL、C-CAM、MMAC1/PTEN、DBCCR-1、FCC、rsk-3、p27、p27/p16融合物和p21/p27融合物。

[0144] 程序性细胞死亡的调节因子:细胞凋亡或程序性细胞死亡是正常胚胎发育、维持成体组织内稳态和抑制致癌作用的必需过程(Kerr et al., 1972)。已经证明了Bcl-2蛋白质家族和ICE样蛋白酶是其他系统中细胞凋亡的重要调节因子和效应因子。发现与滤泡性淋巴瘤相关的Bcl-2蛋白在响应于不同凋亡刺激控制细胞凋亡和增强细胞存活中起着重要的作用(Bakhshi et al., 1985; Cleary和Sklar, 1985; Cleary et al., 1986; Tsujimoto et al., 1985; Tsujimoto和Croce, 1986)。现在认识到在进化上保守的Bcl-2蛋白是可归类为死亡激动剂或死亡拮抗剂的相关蛋白质的家族的成员。

[0145] 在Bcl-2的发现之后,已经表明Bcl-2用于抑制由多种刺激触发的细胞死亡。同样,现在显而易见的是,存在享有共同结构和序列同源性的Bcl-2细胞死亡调节蛋白的家族。这些不同的家族成员已经显示出与Bcl-2具有类似的功能(例如,Bcl_{XL}、Bcl_W、Bcl_S、Mcl-1、A1、

Bf1-1) 或抵消Bcl-2功能并促进细胞死亡(例如,Bax、Bak、Bik、Bim、Bid、Bad、Harakiri)。

[0146] 5. 手术

[0147] 约60%患有癌症的人将经历某种类型的手术,其包括预防性、诊断性或分期、治愈性和姑息性手术。治愈性手术是可与其他治疗(例如本发明的治疗、化学治疗、放射治疗、激素治疗、基因治疗、免疫治疗和/或替代治疗)联合使用的癌症治疗。

[0148] 治愈性手术包括其中物理去除、切除和/或破坏全部或部分癌组织的切除术。肿瘤切除术是指物理去除至少一部分肿瘤。除肿瘤切除术之外,通过手术的治疗还包括激光手术、冷冻手术、电外科手术和用显微控制的手术(莫氏手术(Mohs' surgery))。还预期的是,本发明可与浅表癌、初癌或伴随量的正常组织的去除联合使用。

[0149] 在切除一部分或所有癌细胞、组织或肿瘤之后,可在体内形成腔。治疗可通过向该区域灌注、直接注射或局部施用另外的抗癌治疗来完成。可重复这样的治疗,例如每1、2、3、4、5、6或7天,或者每1、2、3、4和5周或者每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月重复。这些治疗也可具有多种剂量。

[0150] V. 抗体缀合物

[0151] 抗体可与至少一种试剂连接以形成抗体缀合物。为了提高抗体分子作为诊断剂或治疗剂的效力,常规地与至少一种期望的分子或部分连接或共价结合或复合。这样的分子或部分可以是但不限于至少一种效应分子或报道分子。效应分子包括具有期望活性,例如免疫抑制/抗炎的分子。这样的分子的一些非限制性实例在上文描述。这样的分子任选地通过设计为允许该分子在靶位点或邻近靶位点释放的可切割接头连接。

[0152] 相比之下,报道分子被定义为可使用测定检测的任何部分。已经与抗体缀合的报道分子的一些非限制性实例包括酶、放射性标记、半抗原、荧光标记、磷光分子、化学发光分子、发色团、光亲和分子、着色颗粒或配体,例如生物素。

[0153] 通常优选使用抗体缀合物作为诊断剂。抗体诊断剂通常属于两类:用于体外诊断例如用于多种免疫测定的那些,以及用于通常称为“抗体指导的成像”的体内诊断方案的那些。许多合适的显像剂是本领域中已知的,其与抗体连接的方法也如此(参见,例如,美国专利5,021,236、4,938,948和4,472,509)。所使用的成像部分可以是顺磁性离子、放射性同位素、荧光染料、可NMR检测物质和X-射线显像剂。

[0154] 在顺磁性离子的情况下,可通过以下示例性离子来提及:例如铬(III)、锰(II)、铁(III)、铁(II)、钴(II)、镍(II)、铜(II)、钆(III)、钆(II)、钆(III)、钆(II)、钆(III)、镧(III)、铈(III)和/或铈(II),其中特别优选钆。在另一些情况(例如X-射线成像)下可用的离子包括但不限于镧(III)、金(III)、铅(II)和特别是铋(III)。

[0155] 在用于治疗 and/或诊断应用的放射性同位素的情况下,可提及砷²¹¹、¹⁴碳、⁵¹铬、³⁶氯、⁵⁷钴、⁵⁸钴、铜⁶⁷、¹⁵²Eu、镓⁶⁷、³氢、碘¹²³、碘¹²⁵、碘¹³¹、铟¹¹¹、⁵⁹铁、³²磷、铯¹⁸⁶、铯¹⁸⁸、⁷⁵硒、³⁵硫、铟^{99m}和/或铟⁹⁰。在某些实施方案中通常优选使用¹²⁵I,并且也通常优选铟^{99m}和/或铟¹¹¹,因为其能量低和适用于长距离检测。放射性标记的单克隆抗体可根据本领域公知的方法产生。例如,可通过与碘化钠和/或碘化钾和化学氧化剂(例如次氯酸钠)或酶促氧化剂(例如乳过氧化物酶)接触来使单克隆抗体碘化。单克隆抗体可通过配体交换过程用铟^{99m}标记,例如,通过用亚锡溶液还原高铟酸盐,将还原的铟螯合到Sephadex柱上,并将抗体施加于该柱。或者,可使用直接标记技术,例如通过孵育高铟酸盐、还原剂(例如SNC1₂)、缓冲溶液(例如邻

苯二甲酸钠钾溶液)和抗体进行。中间官能团通常用于使放射性同位素与抗体结合并且作为金属离子存在,其是二乙烯三胺五乙酸(DTPA)或乙二胺四乙酸(EDTA)。

[0156] 在考虑作为缀合物使用的荧光标记之中包括Alexa 350、Alexa 430、AMCA、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、Cascade Blue、Cy3、Cy5、6-FAM、异硫氰酸荧光素、HEX、6-JOE、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514、Pacific Blue、REG、罗丹明绿、罗丹明红、肾造影剂(Renographin)、ROX、TAMRA、TET、四甲基罗丹明和/或德克萨斯红(Texas Red)。

[0157] 所考虑的另一类型抗体缀合物是主要意图体外使用的那些,其中抗体与第二结合配体和/或在与显色底物接触之后产生着色产物的酶(酶标签)连接。合适的酶的一些实例包括脲酶、碱性磷酸酶、(辣根)过氧化氢酶或葡萄糖氧化酶。优选的第二结合配体是生物素以及抗生物素蛋白和链霉抗生物素蛋白化合物。这样的标记的使用对于本领域技术人员是公知的,并且在例如美国专利3,817,837、3,850,752、3,939,350、3,996,345、4,277,437、4,275,149和4,366,241中描述。

[0158] 分子与抗体的位点特异性连接的另一种已知方法包括使抗体与基于半抗原的亲标记反应。实质上,基于半抗原的亲标记与抗原结合位点中的氨基酸反应,从而破坏该位点并阻断特异性抗原反应。然而,这可能是不利的,因为其导致通过抗体缀合物的抗原结合丧失。

[0159] 包含叠氮基的分子也可用于经由通过低强度紫外光产生的反应性氮宾中间体来与蛋白质形成共价键(Potter和Haley,1983)。特别地,已经使用嘌呤核苷酸的2-叠氮类似物和8-叠氮类似物作为定点光探针以鉴定粗制细胞提取物中的核苷酸结合蛋白(Owens&Haley,1987;Atherton et al.,1985)。2-叠氮核苷酸和8-叠氮核苷酸还已被用于对经纯化蛋白质的核苷酸结合结构域进行图谱绘制(Khatoun et al.,1989;King et al.,1989;Dholakia et al.,1989)并且可用作抗体结合剂。

[0160] 用于使抗体与其缀合部分连接或缀合的数种方法是本领域中已知的。一些连接方法涉及使用金属螯合物复合物,其使用例如与抗体连接的有机螯合剂,例如二乙烯三胺五乙酸酐(DTPA);亚乙基三胺四乙酸;N-氯-对-甲苯磺酰胺;和/或四氯-3 α -6 α -二苯基甘脲-3(tetrachloro-3 α -6 α -diphenylglycouril-3)(美国专利4,472,509和4,938,948)。单克隆抗体还可在存在偶联剂例如戊二醛或高碘酸盐的情况下与酶反应。与荧光素标记的缀合物在存在这些偶联剂的情况下或通过与异硫氰酸酯反应来制备。在美国专利4,938,948中,使用单克隆抗体实现了乳腺肿瘤的成像并且使用接头例如甲基-对羟基苯甲亚氨酸酯或N-琥珀酰亚胺基-3-(4-羟基苯基)丙酸酯使可检测成像部分与抗体结合。

[0161] 在另一些实施方案中,考虑通过使用不改变抗体结合位点的反应条件选择性地使巯基引入免疫球蛋白的Fc区中来使免疫球蛋白衍生化。据公开,根据这种方法产生的抗体缀合物表现出改善的寿命、特异性和灵敏度(美国专利5,196,066,其通过引用并入本文)。在文献中也已经公开了效应分子或报道分子的位点特异性连接,其中报道分子或效应分子与Fc区中的糖残基缀合(O'Shannessy et al.,1987)。已经报道该方法产生目前处于临床评价之中的在诊断和治疗方面有希望的抗体。

[0162] VI. 免疫检测方法

[0163] 在另一些实施方案中,存在用于结合、纯化、去除、定量和以其他方式通常检测PD-

L1或PD-L2及其相关抗原的免疫检测方法。一些免疫检测方法包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、免疫放射测定、荧光免疫测定、化学发光测定、生物发光测定和Western印迹等。特别地,还提供了用于检测和定量PD-L1和PD-L2抗体的竞争性测定。在科学文献中已经描述了多种可用免疫检测方法的步骤,例如,如Doolittle和Ben-Zeev(1999);Gulbis和Galand(1993);De Jager et al.(1993);以及Nakamura et al.(1987)。通常来说,免疫结合方法包括获得样品并根据本文中所讨论的一些实施方案使样品与第一抗体接触,视情况而定,这在有效允许免疫复合物形成的条件下进行。

[0164] 使所选生物样品与抗体在有效条件下接触并持续足以允许形成免疫复合物(初级免疫复合物)的时间通常是简单地将抗体组合物添加至样品并将混合物孵育足够长的时间以使抗体与存在的PD-L1和PD-L2形成免疫复合物(即与之结合)的问题。在该时间之后,通常对样品-抗体组合物,例如组织切片、ELISA板、斑点印迹或Western印迹进行洗涤以去除任何非特异性结合的抗体种类,从而允许只有特异性结合在初级免疫复合物中的那些抗体被检测到。

[0165] 通常来说,免疫复合物形成的检测是本领域中公知的,并且可通过应用多种方法来实现。这些方法通常基于标记或标志物(例如那些放射性标签、荧光标签、生物标签和酶标签中的任一种)的检测。有关使用这样的标记的专利包括美国专利3,817,837、3,850,752、3,939,350、3,996,345、4,277,437、4,275,149和4,366,241。当然,如本领域中已知的,通过使用第二结合配体例如第二抗体和/或生物素/抗生物素蛋白配体结合布置,可发现另外的优点。

[0166] 用于检测的抗体可本身与可检测标记连接,其中然后将简单地检测该标记,从而允许确定组合物中初级免疫复合物的量。或者,可通过对第一抗体具有结合亲和力的第二结合配体来检测结合在初级免疫复合物中的该抗体。在这些情况下,第二结合配体可与可检测标记连接。第二结合配体本身通常是抗体,其因此可称为“第二”抗体。使初级免疫复合物与经标记的第二结合配体或抗体在有效条件下接触并持续足以允许形成次级免疫复合物的时间。然后,通常洗涤次级免疫复合物以去除任何非特异性结合的经标记的第二抗体或配体,并且随后检测次级免疫复合物中的剩余标记。

[0167] 另一些方法包括通过两步法检测初级免疫复合物。如上所述,将对抗体具有结合亲和力的第二结合配体(例如抗体)用于形成次级免疫复合物。在洗涤之后,再次使次级免疫复合物与对第二抗体具有结合亲和力的第三结合配体或抗体在有效条件下接触并持续足以允许形成免疫复合物(三级免疫复合物)的时间。第三配体或抗体与可检测标记连接,从而允许检测由此形成的三级免疫复合物。如果期望的话,该系统可提供信号放大。

[0168] 一种免疫检测方法使用两种不同的抗体。将第一生物素化抗体用于检测靶抗原,并且然后将第二抗体用于检测与复合生物素连接的生物素。在该方法中,首先将待测试样品在包含第一步抗体的溶液中孵育。如果存在靶抗原,则一些抗体与抗原结合形成生物素化抗体/抗原复合物。然后通过链霉抗生物素蛋白(或抗生物素蛋白)、生物素化DNA和/或互补生物素化DNA的连续溶液中孵育来扩大抗体/抗原复合物,其中每个步骤向抗体/抗原复合物添加另外的生物素位点。重复扩大步骤直至达到合适的扩大水平,此时将样品在包含针对生物素的第二步抗体的溶液中孵育。该第二步抗体是经标记的,如例如经酶标记的,所述酶可用于使用色原底物通过组织酶学来检测抗体/抗原复合物的存在。经过适当扩大,

可产生宏观可见的缀合物。

[0169] 另一种已知的免疫检测方法利用免疫PCR (聚合酶链反应) 方法。在与生物素化DNA一起孵育之前,PCR方法类似于Cantor方法,然而,作为使用多轮链霉抗生物素蛋白和生物素化DNA孵育的替代,将DNA/生物素/链霉抗生物素蛋白/抗体复合物用低pH或高盐缓冲液洗掉,这释放抗体。然后将所得洗涤溶液用于用合适的引物与合适的对照进行PCR反应。至少在理论上,PCR的巨大扩增能力和特异性可用于检测单抗原分子。

[0170] A. ELISA

[0171] 免疫测定最简单而言是结合测定。某些优选的免疫测定是本领域中已知的多种类型的酶联免疫吸附测定 (ELISA) 和放射免疫测定 (RIA)。使用组织切片的免疫组织化学检测也特别有用。然而,将容易理解的是,检测不限于此类技术,并且也可使用western印迹、斑点印迹、FACS分析等。

[0172] 在一种示例性ELISA中,将本公开内容的抗体固定在表现出蛋白质亲和力的所选表面上,例如聚苯乙烯微量滴定板中的孔上。然后,向孔添加怀疑包含PD-L1和/或PD-L2的受试组合物。在结合并洗涤以去除非特异性结合的免疫复合物之后,可检测结合的抗原。检测可通过添加与可检测标记连接的另一种针对PD-L1和PD-L2的双特异性抗体,或者通过与可检测标记连接的抗PD-L1或抗PD-L2抗体来实现。这种类型的ELISA是简单的“夹心ELISA”。检测也可通过添加第二针对PD-L1和PD-L2的双特异性抗体,或者是抗PD-L1或抗PD-L2抗体,随后添加对该第二抗体具有结合亲和力的第三抗体来实现,其中该第三抗体与可检测标记连接。

[0173] 在另一种示例性ELISA中,将怀疑包含PD-L1和/或PD-L2抗原的样品固定在孔表面上,并随后与双特异性抗PD-L1且抗PD-L2抗体接触。在结合并洗涤以去除非特异性结合的免疫复合物之后,检测结合的双特异性抗PD-L1且抗PD-L2抗体。当初始双特异性抗PD-L1且抗PD-L2抗体与可检测标记连接时,可直接检测免疫复合物。同样,可使用对第一双特异性抗PD-L1且抗PD-L2抗体具有结合亲和力的第二抗体来检测免疫复合物,其中第二抗体与可检测标记连接。

[0174] 不论使用何种形式,ELISA都具有某些共同特征,例如包被、孵育和结合、洗涤以去除非特异性结合的物质以及检测结合的免疫复合物。以下对这些进行描述。

[0175] 在用抗原或抗体包被板中,通常用抗原或抗体的溶液孵育板的孔过夜或持续指定的一段时间。然后对板的孔进行洗涤以去除不完全吸附的物质。然后,将孔的任何剩余可用表面用相对于受试抗血清为抗原中性的非特异性蛋白质“包被”。这些包括牛血清白蛋白 (BSA)、酪蛋白或乳粉溶液。包被允许封闭固定表面上的非特异性吸附位点,并且因此降低由抗血清在表面上的非特异性结合引起的背景。

[0176] 在ELISA中,可更习惯于使用二级或三级检测方法而不是直接操作。因此,在蛋白质或抗体与孔结合,用非反应性物质包被以降低背景,并洗涤以去除未结合的物质之后,使固定表面与待测试的生物样品在有效允许免疫复合物 (抗原/抗体) 形成的条件下接触。然后,免疫复合物的检测需要经标记的第二结合配体或抗体,以及与经标记的第三抗体或第三结合配体联合的第二结合配体或抗体。

[0177] “在有效允许免疫复合物 (抗原/抗体) 形成的条件下”意指该条件优选包括用溶液 (例如BSA、牛丙种球蛋白 (bovine gamma globulin, BGG) 或磷酸缓冲盐水 (phosphate

buffered saline, PBS) /吐温) 来稀释抗原和/或抗体。这些添加的试剂还倾向于有助于降低非特异性背景。

[0178] “合适的”条件还意指孵育在足以允许有效结合的温度或时间下进行。孵育步骤通常在优选为约25℃至27℃的温度下进行约1至2至4小时左右,或者可在约4℃左右下过夜进行。

[0179] 在ELISA中所有孵育步骤之后,洗涤接触的表面以去除未复合的物质。一个优选的洗涤过程包括用溶液例如PBS/吐温或硼酸盐缓冲液洗涤。在受试样品与最初结合物质之间形成特异性免疫复合物并随后进行洗涤之后,可确定甚至是微量的免疫复合物的出现。

[0180] 为了提供检测手段,第二或第三抗体具有缔合的标记以允许检测。优选地,这是在与合适的显色底物孵育之后产生显色的酶。因此,例如,期望在有利于发生进一步的免疫复合物形成的时间和条件下使初级和次级免疫复合物与脲酶、葡萄糖氧化酶、碱性磷酸酶或过氧化氢酶缀合的抗体接触或孵育(例如,在室温下在含有PBS的溶液(例如PBS-吐温)中孵育2小时)。

[0181] 在与经标记的抗体孵育并随后进行洗涤以去除未结合的物质之后,对标记的量进行定量,例如通过与显色底物(例如尿素或溴甲酚紫或2,2'-联氨基-二-(3-乙基-苯并噻唑啉-6-磺酸)(ABTS)或H₂O₂(在过氧化物酶作为酶标记的情况下))一起孵育进行。然后通过测量产生的颜色的程度,例如使用可见光谱分光光度计实现定量。

[0182] B. Western印迹

[0183] Western印迹(或者,蛋白质免疫印迹)是用于在给定的组织匀浆或提取物样品中检测特定蛋白质的分析技术。其使用凝胶电泳通过多肽的长度(变性条件)或通过蛋白质的3-D结构(天然/非变性条件)来分离天然或变性的蛋白质。然后将蛋白质转移到膜(通常是硝酸纤维素或PVDF)上,在膜上使用对靶蛋白具有特异性的抗体对其进行探测(检测)。

[0184] 样品可取自整个组织或来自细胞培养物。在大多数情况下,首先使用搅拌器(用于较大的样品体积)、使用均化器(较小的体积)或通过声处理将实体组织机械破碎。细胞也可通过上述机械方法之一破裂。然而,应注意的是,细菌、病毒或环境样品可以是蛋白质的来源,并且因此Western印迹不仅仅限于细胞研究。可使用多种洗涤剂、盐和缓冲液来促进细胞裂解和使蛋白质溶解。通常添加蛋白酶和磷酸酶抑制剂以防止样品被其自身的酶消化。组织制备通常在低温下进行以避免蛋白质变性。

[0185] 使用凝胶电泳分离样品的蛋白质。蛋白质的分离可通过等电点(pI)、分子量、电荷或这些因素的组合来进行。分离的本质取决于样品的处理和凝胶的性质。这是确定蛋白质的非常有用的方法。也可使用二维(two-dimensional, 2-D)凝胶,其将来自单个样品的蛋白质以两个维度散布。在第一维度中根据等电点(蛋白质具有中性净电荷时的pH)分离蛋白质,而在第二维度中根据其分子量分离蛋白质。

[0186] 为了使蛋白质易于进行抗体检测,将其从凝胶中移动到由硝酸纤维素或聚偏二氟乙烯(PVDF)制成的膜上。将膜放置在凝胶的顶部,并在其顶部放置一叠滤纸。将整叠放置在缓冲溶液中,该缓冲溶液通过毛细作用移动至纸上,从而使蛋白质随之移动。用于转移蛋白质的另一种方法称为电印迹,并且使用电流将蛋白质从凝胶拉到PVDF或硝酸纤维素膜中。蛋白质在维持其在凝胶中具有的组织的同时从凝胶中移动到膜上。作为该印迹过程的结果,蛋白质被暴露在薄的表面层上用于检测(参见下文)。选择这两种膜是因为其非特异性

的蛋白质结合特性(即,同等良好地结合所有蛋白质)。蛋白质结合基于疏水性相互作用以及膜与蛋白质之间的带电相互作用。硝酸纤维素膜比PVDF便宜,但更加易脆而不能良好地经受反复探测。蛋白质从凝胶转移到膜上的均匀性和整体有效性可通过用考马斯亮蓝或丽春红S(Ponceau S)染料对膜进行染色来检查。一旦转移,就使用经标记的初级抗体或未经标记的初级抗体并随后使用经标记蛋白A或与初级抗体的Fc区结合的第二经标记抗体进行间接检测来检测蛋白质。

[0187] C. 免疫组织化学

[0188] 抗体还可与新鲜冷冻和/或福尔马林固定石蜡包埋的组织块二者联合使用,所述组织块为了通过免疫组织化学(immunohistochemistry, IHC)进行研究而制备。由这些颗粒状样本制备组织块的方法已成功用于多种预后因子的先前IHC研究中,并且是本领域技术人员公知的(Brown et al., 1990; Abbondanzo et al., 1990; Allred et al., 1990)。

[0189] 简言之,冷冻切片可通过以下来制备:在室温下在小塑料囊中的磷酸缓冲盐水(PBS)中将50ng冷冻的“粉碎”组织再水合;通过离心使颗粒沉淀;将其重悬在黏性包埋介质(OCT)中;将囊倒置和/或通过离心再次沉淀;在-70°C异戊烷中速冻;切割塑料囊和/或取出冷冻的组织圆柱状物;将组织圆柱状物固定在低温恒温切片卡盘上;和/或从囊上切下25至50个连续切片。或者,可将整个冷冻的组织样品用于连续切片切割。

[0190] 可通过类似的方法制备永久切片,其包括在塑料微量离心管中将50mg样品再水合;沉淀;重悬于10%福尔马林中固定4小时;洗涤/沉淀;重悬于温热的2.5%琼脂中;沉淀;在冰水中冷却以使琼脂硬化;从管中取出组织/琼脂块;将块浸入和/或包埋在石蜡中;和/或切割多至50个连续的永久切片。同样,整个组织样品可替换。

[0191] D. 免疫检测试剂盒

[0192] 在另一些实施方案中,存在与上述免疫检测方法一起使用的免疫检测试剂盒。免疫检测试剂盒因此在合适的容器装置中包含与PD-L1和/或PD-L2抗原结合的第一双特异性抗体和任选地免疫检测试剂。

[0193] 在某些实施方案中,针对PD-L1和PD-L2的双特异性抗体可与固体支持物,例如柱基质和/或微量滴定板的孔预先结合。试剂盒的免疫检测试剂可采取多种形式中的任一种,包括与给定抗体缔合或连接的那些可检测标记。与第二结合配体缔合或连接的可检测标记也在考虑之中。示例性的第二配体是对第一抗体具有结合亲和力的那些第二抗体。

[0194] 用于本发明试剂盒的其他合适的免疫检测试剂包括双组分试剂,其包含对第一抗体具有结合亲和力的第二抗体,以及对第二抗体具有结合亲和力的第三抗体,所述第三抗体与可检测标记连接。如上所述,许多示例性的标记在本领域中是已知的,并且所有这样的标记均可结合本文中讨论的实施方案使用。

[0195] 试剂盒还可包含适当等分的PD-L1和PD-L2抗原组合物,无论是标记的还是未标记的,如可用于制备用于检测测定的标准曲线那样。试剂盒可包含以完全缀合形式、以中间体形式或作为将由试剂盒使用者进行缀合的独立部分的抗体-标记缀合物。试剂盒的组分可包装在水性介质中或以冻干形式包装。

[0196] 试剂盒的容器装置通常包括至少一个小瓶、试管、烧瓶、瓶、注射器或其他容器装置,其中可放置抗体,或者优选将抗体适当地等分。试剂盒还包括用于封闭限制式容纳抗体、抗原和任何其他试剂容器以用于商业销售的装置。这样的容器可包括其中保持期望小

瓶的注塑或吹塑的塑料容器。

[0197] VII. 实施例

[0198] 包括以下实施例以表明本发明的一些优选实施方案。本领域技术人员应理解,以下实施例中公开的技术代表了本发明人发现在本发明的实施中良好发挥作用的技术,并且因此可被认为构成了用于其实践的优选模式。然而,本领域技术人员应理解,根据本公开内容,可对公开的具体实施方案进行许多改变并且仍然获得相同或类似的结果,而不脱离本发明的精神和范围。

[0199] 实施例1-材料和方法

[0200] 抗体选择、产生和生产:尽管可在后续实施例中提供另外的细节,但是所公开抗体的选择、产生和生产通常如下进行。

[0201] 抗原制备-使用来自Pierce的EZ-Link Sulfo-NHS-生物素化试剂盒对抗原进行生物素化。山羊F(ab')₂抗人κ-FITC(LC-FITC)、ExtrAvidin-PE(EA-PE)和链霉抗生物素蛋白-AF633(SA-633)分别从Southern Biotech、Sigma和Molecular Probes获得。链霉抗生物素蛋白微珠和MACS LC分离柱购自Miltenyi Biotec。山羊抗人IgG-PE(人-PE)从Southern Biotech获得。

[0202] 初始发现-如先前所述,生成了八个初始人合成酵母文库(每个约10⁹多样性)(参见,例如,Xu et al.,2013;W02009036379;W02010105256和W02012009568)。对于前两轮选择,如先前所描述进行利用Miltenyi MACS系统的磁珠分选技术(参见,例如,Siegel et al.,2004)。简言之,将酵母细胞(约10¹⁰个细胞/文库)与3ml的10nM生物素化Fc融合抗原在洗涤缓冲液(磷酸缓冲盐水(PBS)/0.1%牛血清白蛋白(BSA))中在30°C下孵育15分钟。在用40ml冰冷的洗涤缓冲液洗涤一次之后,将细胞沉淀重悬于20mL洗涤缓冲液中,向酵母添加链霉抗生物素蛋白微珠(500μl),并在4°C下孵育15分钟。接下来,将酵母沉淀,重悬于20mL洗涤缓冲液中,并装到Miltenyi LS柱上。在装载20mL之后,将柱用3ml洗涤缓冲液洗涤3次。然后从磁场中取出柱,并将酵母用5mL生长培养基洗脱,并随后生长过夜。随后的几轮选择使用流式细胞术进行。沉淀了约2×10⁷酵母,用洗涤缓冲液洗涤3次,并在30°C下与10nM Fc融合抗原孵育或者在后面的几轮中与递降浓度的生物素化抗原(100至1nM)在平衡条件下孵育、与100nM不同物种(小鼠)的生物素化抗原孵育以获得物种交叉反应性或或多特异性耗竭试剂(poly-specificity depletion reagent,PSR)孵育以从选择中去除非特异性抗体。对于PSR耗竭,如先前所述将文库与1:10稀释的生物素化PSR试剂一起孵育(参见,例如,Xu et al.,2013)。然后,将酵母用洗涤缓冲液洗涤两次,并用LC-FITC(1:100稀释)与SA-633(1:500稀释)或EAPE(1:50稀释)第二试剂在4°C下染色15分钟。在用洗涤缓冲液洗涤两次之后,将细胞沉淀重悬于0.3mL洗涤缓冲液中,并转移至罩有滤器的分选管中。使用FACS ARIA分选仪(BD Biosciences)进行分选,并确定分选门以选择具有期望特征的抗体。重复选择轮次直至获得具有所有期望特征的群体。

[0203] 为了产生交叉反应性抗体,逐轮交替独立地使用每种靶抗原如上所述进行选择以富集双重特异性。在最后一轮分选之后,将酵母平板接种并挑选单个菌落用于进行表征。

[0204] 轻链分批混编(Light chain batch shuffle,LCBS)-主要发现还包括来自初始选择之重链质粒的轻链分批多样化方案:从酵母中提取来自初始第四轮选择输出的重链质粒并转化到多样性为5×10⁶的轻链文库中。与初始发现使用相同的条件,用一轮MACS和三轮

FACS进行选择。

[0205] 抗体优化-如下所述通过将多样性引入重链和轻链可变区中进行抗体的优化。这些方法中一些的组合用于每种抗体。

[0206] CDRH1和CDRH2选择:将单一抗体的CDRH3重组到具有多样性为 1×10^8 的CDRH1和CDRH2变体的预制文库中,并如在初始发现中所述用一轮MACS和四轮FACS进行选择。在FACS轮次中,研究文库的PSR结合、物种交叉反应性、抗原交叉反应性和亲和力压力,并进行分选以获得具有期望特征的群体。对于这些选择,通过以下施加亲和力压力:滴定生物素化单体抗原,或者将生物素化抗原与亲本Fab一起预孵育30分钟并随后将该预复合的混合物施加于酵母文库持续允许该选择达到平衡的时长。然后,能够分选出亲和力更高的抗体。

[0207] VH Mut选择:重链可变区(VH)通过易错PCR进行诱变。然后,通过将该诱变的VH和重链表达载体转化到已经包含亲本的轻链质粒的酵母中创建文库。选择与先前的循环类似地,使用FACS分选进行三轮来进行。在FACS轮次中,研究文库的交叉反应性和亲和力压力,并进行分选以获得具有期望特征的群体。

[0208] CDRL1、CDRL2和CDRL3选择:寡聚物是从IDT订购的,其包含CDRL3,并且通过NNK多样性而多样化。使用与CDRL3的侧翼区退火的引物将CDRL3寡聚物双链化。然后将这些双链化的CDRL3寡聚物重组到具有多样性为 3×10^5 的CDRL1和CDRL2变体的预制文库中,并如初始发现中所述用一轮MACS和三轮FACS进行选择。在FACS轮次中,研究文库的PSR结合、交叉反应性和亲和力压力,并进行分选以获得具有期望特征的群体。如上文在CDRH1和CDRH2选择中所述进行这些选择的亲和力压力,并施加逐轮交替的抗原以富集双重结合剂。

[0209] 抗体产生和纯化-使酵母克隆生长至饱和并随后在 30°C 下振荡诱导48小时。诱导之后,使酵母细胞沉淀,并收获上清液用于纯化。使用蛋白A柱纯化IgG,并用乙酸pH 2.0洗脱。Fab片段通过木瓜蛋白酶消化产生,并通过KappaSelect (GE Healthcare LifeSciences)纯化。

[0210] ForteBio K_D 测量-一般地如先前所述,在Octet RED384上进行ForteBio亲和力测量(参见,例如,Estep et al., 2013)。简言之,通过将IgG在线装载到AHQ传感器上进行ForteBio亲和力测量。将传感器在测定缓冲液中离线平衡30分钟,并随后在线监测60秒以进行基线建立。将装载有IgG的传感器暴露于100nM抗原3分钟,并随后转移到测定缓冲液中3分钟以进行解离率(off-rate)测量。对于单价亲和力评估,使用Fab代替IgG。对于该评估,将未生物素化Fc融合抗原在线装载到AHQ传感器上。将传感器在测定缓冲液中离线平衡30分钟,并随后在线监测60秒以进行基线建立。将装载有抗原的传感器暴露于100nM Fab 3分钟,并随后将其转移到测定缓冲液中3分钟以进行解离率测量。使用1:1结合模型分析所有动力学。

[0211] ForteBio表位分箱/配体阻断-使用标准夹心形式交叉阻断测定进行表位分箱/配体阻断。将对照抗靶标IgG装载到AHQ传感器上,并用不相关的人IgG1抗体封闭传感器上未被占据的Fc结合位点。然后将传感器暴露于100nM靶抗原,随后暴露于第二抗靶标抗体或配体。在抗原缔合之后第二抗体或配体另外结合指示未被占据的表位(非竞争者),而没有结合指示表位阻断(竞争者或配体阻断)。

[0212] MSD-SET K_D 测量-一般地如先前所述进行选定高亲和力抗体的平衡亲和力测量(Estep et al., 2013)。简言之,在抗原在50pM保持恒定下在PBS+0.1%无IgG BSA(PBSF)中

进行溶液平衡滴定 (solution equilibrium titration, SET), 并从20nM开始与3至5倍连续稀释的Fab孵育。将抗体 (PBS中20nM) 包被到标准结合MSD-ECL板上在4°C下过夜或在室温下持续30分钟。然后在700rpm振荡下通过BSA封闭板30分钟, 随后用洗涤缓冲液 (PBSF+0.05%吐温20) 洗涤3次。施加SET样品, 并在700rpm振荡下在板上孵育150秒, 随后洗涤一次。用PBSF中250ng/mL经碘基标签标记的链霉抗生物素蛋白通过在板上孵育3分钟检测捕获在板上的抗原。将板用洗涤缓冲液洗涤3次, 并随后在MSD Sector Imager 2400仪器上使用具有表面活性剂的1x读取缓冲液T读取。将游离抗原百分比作为滴定抗体的函数在Prism中作图, 并拟合二次方程以提取 K_D 。为了改善工作量, 在整个MSD-SET实验中使用液体处理机器人, 包括SET样品制备。

[0213] 细胞结合分析-用洗涤缓冲液洗涤约100,000个过表达抗原的细胞, 并在室温下与100 μ l 100nM IgG孵育5分钟。然后将细胞用洗涤缓冲液洗涤两次, 并与100 μ l的1:100人-PE在冰上孵育15分钟。然后用洗涤缓冲液将细胞洗涤两次, 并在FACS Canto II分析仪 (BD Biosciences) 上进行分析。

[0214] 抗体筛选和表征: 测试由上述展示方法产生的抗体候选物与PD-L1和PD-L2结合并阻断其与PD1结合的能力。使5 μ g/mL抗体与CHO-PD-L1或CHO-PD-L2细胞结合, 并随后添加经Alexa 532 (ThermoFisher) 标记的重组PD-1 (RnD Systems) 1小时。测量PD-1最大荧光强度。通过流式细胞术通过Alexa 532荧光的降低测量PD-1结合的阻断。为了产生针对人PD-L1或PD-L2的亲和力 K_D , 将BiPDL Ab以100nM (15 μ g/mL) 装载到抗人Fc捕获 (AHC) 生物传感器上, 并在30至0.37nM的稀释系列中测试人PD-L1或PD-L2蛋白缔合和解离。分析物 (PD-L2) 的结合和释放通过Octet仪器实时记录, 并随后用于计算 K_d 、 K_{on} 和 K_{dis} ; 结果来源于减去参考孔的2:1全局拟合建模 (Global Fit Modeling)。为了产生针对鼠PD-L1或PD-L2的亲和力 K_D , 将BiPDL Ab以100nM (15 μ g/mL) 共价固定到活化胺反应性第二代 (AR2G) 生物传感器 (在蛋白质装载之后用1M乙醇胺pH 8.5淬灭) 上, 并在300至1nM的稀释系列中测试小鼠PD-L1和PD-L2蛋白缔合和解离。分析物的结合和释放通过Octet仪器实时记录, 并随后用于计算 K_d 、 K_{on} 和 K_{dis} ; 结果来源于减去参考孔的2:1全局拟合建模。

[0215] 抗体活性: 将不同浓度的具有人IgG1骨架的BiPDL抗体添加至表达人或鼠PD-L1或PD-L2的CHO细胞 (CHO-PD-L1或CHO-PD-L2细胞)。通过添加与藻红蛋白 (phycoerythrin, PE) 缀合的抗人IgG1第二抗体检测结合。进行FACS分析, 检测藻红蛋白以确定不同抗体浓度下的荧光活性。使用GraphPad Prism[®]软件计算EC50。

[0216] 候选抗体阻止PD-1/PD-L2结合: 使用Promega PD-L1/PD-L2双重表达: PD-1阻断系统测定了候选BiPDL抗体和FDA批准抗体。将不同浓度的抗体添加至CHO-PD-L1/L2细胞。PD-1效应细胞是可被CHO-PD-L1/L2细胞刺激的Jurkat T细胞。将响应于激活而产生萤火虫萤光素酶的PD-1效应细胞与抗体和CHO细胞孵育6小时, 并随后使用Bio-Glo[™]测定试剂盒 (Promega) 根据制造商的说明在光度计上读出结果。对于竞争测定, 将生物素-rhPD-1-Fc蛋白添加至细胞和抗体, 随后添加链霉抗生物素蛋白-APC缀合物。阻断被评估为萤光素酶信号增加。使用GraphPad Prism[®]软件进行分析。对于竞争测定, 将X转化为LogX, 并通过非线性回归 (曲线拟合)、剂量响应抑制和Log (抑制) vs. 响应进行分析。

[0217] 在混合淋巴细胞反应中的BiPDL活性: 使用CD14微珠从外周血单个核细胞分离

CD14+单核细胞。将细胞以100万/ml接种在10%FCS/RPMI/P/S细胞培养基中,并在其中用IL-4和GM-CSF刺激。将细胞培养7天,以分化为未成熟树突细胞(imature dendritic cell, IDC),并添加不同浓度的BiPDL或市售抗体。然后使用IDC以10:1CD4:IDC的比例刺激CD4+T细胞。通过ELISA按照由R&D系统提供的方案测定IL-2和IFN- γ 。

[0218] 针对异种移植肿瘤的抗体活性:在免疫缺陷小鼠中建立了U2940PMBL或MDA-MB-231三阴性乳腺癌异种移植肿瘤。允许肿瘤达到150mm³的体积。在达到150mm³之后,每周用所示的抗体治疗剂处理小鼠两次,每个处理组9只小鼠,以10mg/kg进行处理,持续3周。肿瘤宽度、长度和深度的卡尺测量结果用于计算肿瘤体积。

[0219] 注射MC38-PD-L2小鼠的存活和肿瘤生长:测量了植入有MC38-PD-L2肿瘤细胞的C57BL/6J小鼠的存活。皮下植入 5×10^5 MC38-PD-L2肿瘤细胞,并在第3、6、9、12和15天用100 μ g指定抗体或缓冲液腹膜内处理。使用肿瘤宽度、长度和深度的卡尺测量结果计算肿瘤体积。使用Gehran-Breslow-Wilcoxon检验计算存活统计学。为了确定CD8/Treg比,将 1.5×10^6 MC38-PDL2肿瘤细胞在30% Matrigel (Corning) 中皮下植入C57BL/6J小鼠中,并在第7、10和13天用100 μ g指定抗体腹膜内处理。在第15天,收获肿瘤并通过流式细胞术测量浸润CD8⁺T细胞相对于FoxP3⁺Treg的比率。

[0220] EL4淋巴瘤小鼠模型的存活:EL4 T细胞淋巴瘤细胞内源性表达PD-L1,并且经逆转录病毒改造以表达小鼠PD-L2。通过流式细胞术验证PD-L1和PD-L2二者的表达。测量了注射有表达PD-L2和荧光素酶的EL4细胞的小鼠的存活。将 1.5×10^5 个也表达荧光素酶的EL4-PD-L2细胞注射到小鼠尾静脉中,以建立C57BL/6J小鼠的全身性疾病。在第3、6、9、12和15天用100 μ g指定抗体腹膜内处理小鼠。

[0221] BiPDL抗体的表位分箱:使用利用ForteBio Octet[®]平台进行的结合竞争测定比较了多种BiPDL抗体的结合特异性。将经His标记的靶蛋白(人PD-L1或PD-L2)以1 μ g/mL装载到预带电荷的镍NTA生物传感器上。第一抗体Ab1在100nM在装载了靶标的生物传感器上饱和,并且包括参考(仅缓冲液)孔以确定最大Ab2结合信号。同样在100nM时筛选第二抗体的结合信号,并且包括Ab1以确定背景自阻断信号。数据分析HT 9.0软件用于生成Ab2结合的原始信号响应的矩阵,然后将其转换为以未阻断的Ab2结合信号的百分比表示。少于15%响应被认为是竞争性阻断。

[0222] 实施例2-结果

[0223] 与人PD-L1和PD-L2二者均结合的BiPDL抗体的选择:鉴于PD-L1和PD-L2二者均与PD-1结合并且共有约40%的氨基酸同一性,假设可获得与两种配体结合并防止其接合T细胞共抑制受体PD-1的抗体。由于预期很少发现能够与两种配体进行二价结合的高亲和力抗体,这些抗体如上所述是由基于酵母的、完全人抗体文库展示系统进行迭代选择的过程发现的。首先使用二聚化的与人IgG1 Fc恒定区融合的重组配体如上在实施例1中所述选择与PD-L1和PD-L2二者结合的抗体(即,亲合结合),然后通过选择能够与单体PD配体结合的那些进一步富集最高亲和力命中物(hit)。最初的这轮筛选产生了四个不同谱系的能够与PD-L1和PD-L2二者结合并阻断其与PD-1结合的抗体(图1A至1B)。抗体被称为BiPDL,并且使用命名法BiPDLX-Y_Z,其中X是BiPDL家族(Boussiotis, 2016; Cheng et al., 2013; Latchman et al., 2001; Lee et al., 2016), Y是在该家族中给定代中的克隆编号,并且Z是代表亲和力成熟的连续轮次的代数(Boussiotis, 2016; Cheng et al., 2013; Latchman et al.,

2001; Lee et al., 2016)。单独抗体克隆也以实验克隆编号作为参考。表5提供了BiPDL命名法以及各自的克隆编号二者。尽管这些抗体中的每一种都表明对PD-L2具有相当高的亲合力(avidity) (使用二聚体配体) ($K_d \leq 2 \times 10^{-9}$), 但只有BiPDL4对人PD-L1具有可定量的亲合力 ($K_d \leq 1 \times 10^{-9}$), 如通过Octet (ForteBio) 测量的。使用Promega PD-1测定系统在一系列抗体浓度下进一步测试了数种抗体减轻PD-1的Jurkat T细胞抑制的能力, 并且发现只有BiPDL4可阻断PD-L1诱导的T细胞抑制(图1C)。

[0224] 亲和力成熟提高了BiPDL逆转T细胞激活的PD-L1和PD-L2抑制的功能性能力: 使第一代先导物BiPDL1-1₁、BiPDL2-1₁、BiPDL3-1₁和BiPDL4-1₁各自使用如上在实施例1中所述的过程通过选择经优化的CDR1和CDR2序列经受重链亲和力成熟以富集与PD-L1和PD-L2二者结合的克隆。将不同浓度的BiPDL3和BiPDL4抗体(人IgG1)添加至CHO-PD-L1或CHO-PD-L2细胞。经亲和力成熟的BiPDL3和BiPDL4的结合通过添加与PE缀合的抗人IgG1第二抗体检测(图2A至2D)。BiPDL3和BiPDL4抗体所有都保留了其结合PD-L1的能力(图2A和2C), 但是BiPDL3-1₂表现出很低的PD-L2结合活性(图2B)。

[0225] 使用Promega PD-L1/PD-L2双重表达: PD-1测定系统评估第四代BiPDL4克隆恢复Jurkat T细胞活性的能力(图3)。BiPDL4-1₁、-1₄、-2₄、-3₄、-4₄均显示与可瑞达(抗PD1)具有类似的活性水平, 并且优于阿特殊单抗和阿维鲁单抗(Avelumab)。还评估了其他独立家族的结合(图4A至4F)。相对于亲代BiPDL4, 在Promega系统中BiPDL4-1₂逆转Jurkat T细胞抑制的能力对于PD-L1和PD-L2二者均提高, 然而BiPDL4-2₂没有获得任何逆转PD-L1介导的抑制的能力, 但可完全逆转PD-L2介导的抑制(图4E至4F)。针对BiPDL3-1₂的Octet亲和力测量结果为 $K_d = 2.71 \times 10^{-8}$ PD-L1和 8.85×10^{-8} PD-L2(二聚体配体)(表5)。BiPDL4-1₂对于PD-L1测得 6.22×10^{-10} 且对于PD-L2测得 1.74×10^{-9} , 然而BiPDL4-2₂对于PD-L1测得 8.42×10^{-9} 且对于PD-L2测得 3.5×10^{-10} (表5)。

[0226] 尽管与第一代BiPDL相比有所改善, 但是BiPDL3-1₂、BiPDL4-1₂和BiPDL4-2₂均未展示出对PD-L1和PD-L2二者的临床上相关亲和力。由于这个原因, 集中于BiPDL3-1₂和BiPDL4-2₂进行了第三轮重链亲和力成熟。该过程产生了对两种配体具有显著增强的亲和力的第三代BiPDL抗体。针对BiPDL3-1₃的Octet亲和力测量结果对于PD-L1为 $K_d = 3.28 \times 10^{-9}$ 且对于PD-L2为 4.31×10^{-10} (二聚体配体)。BiPDL4-1₃对于PD-L1测得 6.9×10^{-10} 且对于PD-L2测得 4.9×10^{-10} , 然而BiPDL4-2₃对于PD-L1测得 1.12×10^{-9} 且对于PD-L2测得 3.4×10^{-10} 。BiPDL4-1₃也对单价PD-L1 ($K_d = 5.04 \times 10^{-8}$) 和对单价PD-L2 ($K_d = 8.36 \times 10^{-9}$) 展示出可测量的亲和力。BiPDL4-2₃的单价亲和力对于PD-L1为 $K_d = 8.4 \times 10^{-8}$ 且对于PD-L2为 $K_d = 1.66 \times 10^{-9}$ 。所有第三代先导物都可有效地逆转由PD-L2接合导致的Jurkat T细胞抑制; 然而, BiPDL4抗体表现出显著更高的逆转PD-L1诱导的抑制的能力(图2C)。

[0227] 如上在实施例1中所述进行最后一轮轻链亲和力成熟以试图提高BiPDL4-1₃和BiPDL4-2₃的PD-L1亲和力。该筛选产生了多种对两种配体具有临床上相关亲和力的BiPDL先导物, 其中最重要的是BiPDL4-1₄、BiPDL4-2₄、BiPDL4-3₄和BiPDL4-4₄。通过Octet测量的这些抗体针对经HIS标记的单价PD-L1的亲和力对于PD-L1为 2.26×10^{-9} 至 7.9×10^{-9} , 且对于PD-L2为 4.98×10^{-10} 至 9.3×10^{-10} 。当在具有表达PD-L1和PD-L2二者的刺激型CHO细胞的Promega系统中测试它们恢复受抑制Jurkat T细胞的能力时, 这些第四代BiPDL4抗体的表现与可瑞达类似(图2D)。此外, 相对于BiPDL4的前几代以及FDA批准的PD-L1抗体(阿特殊单

抗和阿维鲁单抗)二者,这些完全成熟的BiPDL4均表现出显著的优越性。

[0228] 第四代BiPDL4接合先前未描述过的PD-L1上表位:这些第四代BiPDL4抗体与人和食蟹猴PD-L1和PD-L2均以高亲和力结合,并且也与小鼠配体显著交叉反应(表5和6)。所有四种第四代BiPDL4抗体共有相同的重链CDR3,但在其他重链CDR序列和轻链CDR序列上显著不同(表1至4)。值得注意的是,与任何FDA批准的PD-L1抗体不存在显著的相似性。这种序列同源性缺乏表明这些PD-L1和PD-L2结合抗体可能具有独特的结合特异性,因此将其相对于已知的PD-L1和PD-L2抗体进行“分箱”以确定其比较性表位结合。

[0229] 抗体分箱表明所有四种第四代BiPDL4抗体与阿维鲁单抗和阿特殊单抗与PD-L1上完全不同的表位结合(表7)。与德瓦鲁单抗结合的PD-L1表位存在部分重叠,如由中等干扰水平证明的。相对于市售克隆24F.10C12和MIH18,所有BiPDL4与PD-L2上不同的表位结合(表8)。

[0230] BiPDL抗体在原代人混合淋巴细胞反应(MLR)中恢复效应物细胞因子产生:在存在诱导型树突细胞和来自不同供体的T细胞的情况下,对候选抗体、FDA批准抗体或对照抗体进行评价,并通过ELISA评价IL-2或IFN- γ 产生。通过流式细胞术验证iDC的PD-L1和PD-L2表达(图5A)。与FDA批准的PD-L1和PD-1抗体相比,BiPDL4-1₄和BiPDL4-3₄二者均表现出类似的恢复人原代T细胞的IFN- γ 分泌的能力(图5B和5C)。尽管在这些测定中存在PD-L2,但发现在这种环境中PD-L1的作用是主要的。

[0231] 具有效应物功能的BiPDL抗体介导有效的针对表达PD-L1和PD-L2的肿瘤细胞的ADCC:U2940是人原发性纵隔B淋巴瘤(PMBL)异种移植细胞系,其表达高PD-L1(每个细胞约50,000个分子)和低至中等水平的PD-L2(每个细胞约7,000个分子)。体外扩增鼠NK细胞,并用钙黄绿素-AM(ThermoFisher)标记的U9240 PMBL靶细胞以效应物与靶标之比为15:1和指定浓度的抗体孵育4小时。作为实验释放与无抗体的自发释放之间的差异计算特异性裂解百分比。BiPDL3和BiPDL4的所有代都能够介导针对U2940的ADCC(图6)。BiPDL4-12和BiPDL4-13在驱动U2940杀伤方面特别有效。

[0232] 有效效应物能力的BiPDL控制SCID小鼠中U2940 PMBL和MDA-MB-231肿瘤异种移植生长:将 1×10^6 U2940 PMBL细胞植入SCID小鼠中,并允许其建立,直至肿瘤达到 150mm^3 。对细胞的PD-L1和PD-L2表达进行评价(图7A)。然后,用10mg/kg的mIgG2a对照抗体、赫赛汀、美罗华(U2940是CD20+)、BiPDL4-1₂-mIgG2a或BiPDL4-2₂-mIgG2a每周两次处理小鼠。两种BiPDL4抗体相对于对照mAb均显著延迟了肿瘤生长,并且也优于美罗华(图7B)。用BiPDL3-1₃-mIgG2a和BiPDL4-1₃-mIgG2a重复相同的实验,并且再次证明:相对于对照,两种BiPDL抗体具有显著的治疗益处(图7C)。在这种情况下,两种抗体都没有显著优于美罗华;然而,仅有的两只在研究结束时保持没有肿瘤(肿瘤体积 $\leq 20\text{mm}^3$)的小鼠在BiPDL4-1₃-mIgG2a组中。

[0233] MDA-MB-231三阴性乳腺癌异种移植细胞(TNBC)也表达PD-L1和PD-L2二者,其比例类似于U2940(图8A)。将 1×10^7 MDA-MB-231TNBC细胞植入SCID小鼠中,并允许其建立,直至肿瘤达到 150mm^3 。然后用10mg/kg的mIgG2a对照抗体、美罗华(人IgG1对照)、阿维鲁单抗(人IgG1)、BiPDL4-1₄-hIgG1或为了增强ADCC而改造的BiPDL4-1₄-hIgG1[S239D/I332E]每周两次处理小鼠。在这种环境下,与有ADCC能力的PD-L1抗体阿维鲁单抗相比,BiPDL抗体以类似的能力减慢了MDA-MB-231异种移植物的进展(图8B)。鉴于MDA-MB-231相对于PD-L2高表达PD-L1,这种类似性不足为奇。

[0234] BiPDL比任何PD-L1抗体都更有效地治疗同质MC38-PD-L2结肠癌:MC38结肠癌细胞内源性表达PD-L1,并且经逆转录病毒改造以表达小鼠PD-L2。通过流式细胞术验证PD-L1和PD-L2二者的表达(图9C)。将 5×10^5 MC38-PD-L2植入C57BL/6J小鼠中。在第3、6、9、12和15天,使小鼠接受100 μ g PBS、大鼠抗小鼠PD-L1抗体10F.9G2、FDA批准的PD-L1抗体阿特殊单抗和阿维鲁单抗、或者BiPDL4-1₄-hIgG1[S239D/I332E]的注射。相对于阿特殊单抗($p=0.026$)和PBS($p=0.004$),在BiPDL4抗体的情况下,存活更加优异(图9A)。在用BiPDL4-1₄-hIgG1[S239D/I332E]处理的小鼠中,肿瘤的生长也是最慢的(图9B)。

[0235] 在MC38-PD-L2中BiPDL产生最有利的瘤内CD8与Treg之比。将 1.5×10^6 MC38-PD-L2在30% Matrigel (Corning)中植入C57BL/6J小鼠中,以促进浸润淋巴细胞的恢复。通过流式细胞术验证PD-L1和PD-L2的表达(图10A)。除第7、10和13天之外,对小鼠进行上述处理,然后在第15天收获肿瘤并通过流式细胞术分析浸润淋巴细胞。在这种情况下,使用BiPDL4-14-mIgG2a代替效应物增强型人IgG1变体。CD8细胞毒性T细胞相对于抑制性FoxP3+调节T细胞(Treg)的瘤内比已被确定为免疫治疗干预成功的可靠生物标志。经BiPDL4-1₄-mIgG2a处理的小鼠的平均CD8与Treg之比为10,显著高于抗PD-L1、抗PD-L2、抗PD-1或对照动物中的任一种(图10B)。

[0236] BiPDL比PD-L1或PD-L2抗体阻断更有效地治疗同质EL4-PD-L2 T细胞淋巴瘤:EL4 T细胞淋巴瘤细胞也内源性表达PD-L1,并且经逆转录病毒改造以表达小鼠PD-L2。通过流式细胞术验证PD-L1和PD-L2二者的表达(图11A)。将 1.5×10^5 EL4-PD-L2细胞(其也表达萤光素酶以促进生物发光成像)植入C57BL/6J小鼠中以建立全身性疾病。在第3、6、9、12和15天,使小鼠接受100 μ g PBS、大鼠抗小鼠PD-L1抗体10F.9G2、大鼠抗小鼠PD-L2抗体TY25、10F.9G2与TY25的组合、FDA批准的PD-L1抗体阿特殊单抗、或者BiPDL4-1₄-mIgG2a的注射。PD-L1和PD-L2阻断在该模型中是无效的;然而,BiPDL4抗体显著延长了存活(相对于未处理, $p=0.002$;相对于阿特殊单抗, $p=0.01$) (图11B)。在这种环境下,BiPDL4抗体的效应物功能显示对效力特别重要,因为PD-L1和PD-L2阻断抗体(10F.9G2和TY25)的组合没有效力。

[0237] 表1-抗体可变区的核酸序列

克隆	可变序列区	SEQ ID NO:
27869 重链 BiPDL4-1 ₄	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCGATGAGT ATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGG GTGGCAGTTATAGGGTATGATGGACTGAATAAATACTATGCAGACTC CGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGC TGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCGGTGTAC TACTGCGCCAGAGCTGGAATAGAATACAGCTACGCCTATACTGATTA CTGGGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA	3
27869 轻链 BiPDL4-1 ₄	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGG GGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGTTCGTTTACAGCA GCGACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTC CTCATCTATGGTGCATCCACCAGGAAAACCTGGCATCCCAGACAGGTT CAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGAC TGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTCTGCAGTTCGGATGG TGGCCTCCTAGGACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA	4
27893 重链 BiPDL4-2 ₄	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAG GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCGATGAGT ATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGG GTGGCAGTTATAGGGTATGATGGACTGAATAAATACTATGCAGACTC CGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGC TGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCGGTGTAC TACTGCGCCAGAGCTGGAATAGAATACAGCTACGCCTATACTGATTA CTGGGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA	5
[0238] 27893 轻链 BiPDL4-2 ₄	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGG GGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTAACAGTGTGTGTCAGCA GCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTC CTCATCTATGGTGCAGCCAGCAGGGCCAACGGCATCCCAGACAGGTT CAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGAC TGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTGTTTTCAGTTCGGATGG TGGCCTCCTAGGACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA	6
27907 重链 BiPDL4-3 ₄	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGATCCAGCCTGGGAG GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTGCCT ATCTTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGG GTGGCAGCTATAGGTTATGATGGAATGAATAAATACTATGCAGACTC CGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGC TGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCGGTGTAC TACTGCGCCAGAGCTGGAATAGAATACAGCTACGCCTATACTGATTA CTGGGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA	7
27907 轻链 BiPDL4-3 ₄	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGG GGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGTTCGTTTACAGCA GCGACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTC CTCATCTATGGTGCATCCGCCAGGGCCGCCGGCATCCCAGACAGGTT CAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGAC TGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTATGCAGTTCGGATGG TGGCCTCCTAGGACTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA	8

	27924 重链 BiPDL4-4 ₄	CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGATCCAGCCTGGGAG GTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTACCTTCAGTGCCT ATCTTATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGG GTGGCAGCTATAGGTTATGATGGAATGAATAAATACTATGCAGACTC CGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGC TGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCGGTGTAC TACTGCGCCAGAGCTGGAATAGAATACAGCTACGCCTATACTGATTA CTGGGGACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA	9
	27924 轻链 BiPDL4-4 ₄	GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGG GGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCACAGTGTTCAGCA GCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTC CTCATCTATGGTGCATCCAGCAGGGAAGACGGCATCCCAGACAGGTT CAGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGAC TGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTGTATTACTGTGTGCAGTTCCGGATGG TGGCCTCCTAGGACTTTTCGGCGGAGGGACCAAGGTGGAGATCAAA	10
	21680 重链 BiPDL3-1 ₃	CAAGTACAATTACAACAGTGGGGAGCTGGTATTATAAAGCCTTCAGA AACTTTAAGTTTGACCTGTGCTGTTACGGTGGATCATTATCTGGTT ATCCTTGGTCTTGGATTCTCAACCACCAGGCAAAGGATTGGAGTGG ATCGGTGAGACAGACGTGTCAGGCTGGACTGACTACAATCCAAGTTT AAAATCCAGGGTTACTATCTCCGTAGACACGTCCAAGAACCAGTTCT CCCTGAAGCTGAGTTCTGTGACCGCCGAGACACGGCGGTGTACTAC TGCGCCAGAGACGGCAGAAGGATGGGTACCCCTTCATTTCGACATATG GGGCCAGGGTACAATGGTCACCGTCTCCTCA	11
[0239]	21680 轻链 BiPDL3-1 ₃	GACATCCAGTTGACCCAGTCTCCATCTTCCGTGTCTGCATCTGTAGG AGACAGAGTCACCATCACTTGTTCGGCGAGTCAGGGTATTAGCAGCT GGTTAGCCTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTG ATCTATGCTGCATCAAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGTTTCAG CGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGCCTGC AGCCTGAAGATTTTGCAACTTATTACTGTCAGCAGTACGTCTACTTC CCTCCTACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA	12
	20786 重链 BiPDL2-1 ₂	CAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGCTGAGGTGAAGAAGCCTGGGTC CTCGGTGAAGTCTCCTGCAAGGCTTCTGGAGGCACCTTCAGCAGCT GGTTGATCAGCTGGGTGCGACAGGCCCTGGACAAGGGCTTGAGTGG ATGGGAGGGATCATCCCTATCCTGGGTACAGCACGGTACGCACAGAA GTTCCAGGGCAGAGTCACGATTACCGCGGACGAATCCACGAGCACAG CCTACATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCGGTGTAC TACTGCGCCAGAGTGTACAGAGCTGCTTCTTGGTTTGATCCCTGGGG ACAGGGTACATTGGTCACCGTCTCCTCA	13
	20786 轻链 BiPDL2-1 ₂	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGG AGACAGAGTCACCATCACTTGCCAGGCGAGTCAGGACATTAGCAACT ATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTG ATCTACGATGCATCCAATTTGGAAACAGGGGTCCCATCAAGTTTCAG TGGAAGTGGATCTGGGACAGATTTTACTTTTACCATCAGCAGCCTGC AGCCTGAAGATATTGCAACATATTACTGTCAGCAGCCCTTCCACCTC ATCACTTTTGGCGGAGGGACCAAGGTTGAGATCAAA	14

[0240] 表2-抗体可变区的蛋白质序列

克隆	可变序列	SEQ ID NO:
27869 重链 BiPDL4-1 ₄	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFDEYGMHWVRQAPGKLEW VAVIGYDGLNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARAGIEYSYAYTDYWGQGLTVTVSS	15
27869 轻链 BiPDL4-1 ₄	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQFVYSSDLAWYQQKPGQAPRL LIYGASTRKTGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCLQFGW WPPRTFGGGTKVEIK	16
27893 重链 BiPDL4-2 ₄	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGFTFDEYGMHWVRQAPGKLEW VAVIGYDGLNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARAGIEYSYAYTDYWGQGLTVTVSS	17
27893 轻链 BiPDL4-2 ₄	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASNSVSSYLAWYQQKPGQAPRL LIYGAASTRANGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCVQFGW WPPRTFGGGTKVEIK	18
27907 重链 BiPDL4-3 ₄	QVQLVESGGGVIQGRSLRLS CAASGFTFSAYLMHWVRQAPGKLEW VAAIGYDGMNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARAGIEYSYAYTDYWGQGLTVTVSS	19
27907 轻链 BiPDL4-3 ₄	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQFVYSSDLAWYQQKPGQAPRL LIYGASARAAGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCMQFGW WPPRTFGGGTKVEIK	20
27924 重链 BiPDL4-4 ₄	QVQLVESGGGVIQGRSLRLS CAASGFTFSAYLMHWVRQAPGKLEW VAAIGYDGMNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCARAGIEYSYAYTDYWGQGLTVTVSS	21
[0241] 27924 轻链 BiPDL4-4 ₄	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASHSVSSYLAWYQQKPGQAPRL LIYGASSREDGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCVQFGW WPPRTFGGGTKVEIK	22
21680 重链 BiPDL3-1 ₃	QVQLQQWGAGLLKPKSETLSLTC AVYGGSLSGYPWSWIRQPPGKLEW IGETDVSGWTDYNPSLKSRTISVDT SKNQFSLKLSVTAADTAVYY CARDGRRMGTPSFDIWGQGMVTVSS	23
21680 轻链 BiPDL3-1 ₃	DIQLTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIS SWLAWYQQKPGKAPKLL IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQQYVYF PPTFGGGTKVEIK	24
20786 重链 BiPDL2-1 ₂	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKV SCKASGGTFSSWLIISWVRQAPGQGLEW MGGIIPILGTARYAQKFQGRVITADE STSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARVYRAASWFDWPWGQGLTVTVSS	25
20786 轻链 BiPDL2-1 ₂	DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCQASQDIS NYLNWYQQKPGKAPKLL IYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTFT ISSLQPEDIATYYCQQPFHL ITFGGGTKVEIK	26
37464 重链 BiPDL3-1 ₄	QVQLQQWGAGLLKPKSETLSLTC AVYGGSLSGYPWSWIRQPPGKLEW IGETDVSGWTDYNPSLKSRTISVDT SKNQFSLKLSVTAADTAVYY CARDGRRMGTPSFDIWGQGMVTVSS	63
37464 轻链 BiPDL3-1 ₄	DIQMTQSPSSVSASVGDRTITCRASQGIN SFLAWYQQKPGKAPKLL IYAASSLNSGVPSRFSGSGSGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQKAVYF PPTFGGGTKVEIK	64

	37465	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSLSGYPWSWIRQPPGKGLEW	
	重链	IGETDVSGWTDYNPSTLKRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY	
	BiPDL3-2 ₄	CARDGRRMGTPSFDIWGQGMVTVSS	65
	37465	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISNQLAWYQQKPKAPKLL	
	轻链	IYAASSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQKAVYF	
	BiPDL3-2 ₄	PPTFGGGTKVEIK	66
	37468	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSLSGYPWSWIRQPPGKGLEW	
	重链	IGETDVSGWTDYNPSTLKRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY	
	BiPDL3-3 ₄	CARDGRRMGTPSFDIWGQGMVTVSS	67
[0242]	37468	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDISFLAWYQQKPKAPKLL	
	轻链	IYAASSLQDGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQKSVYF	
	BiPDL3-3 ₄	PPTFGGGTKVEIK	68
	37475	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSLSGYPWSWIRQPPGKGLEW	
	重链	IGETDVSGWTDYNPSTLKRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY	
	BiPDL3-4 ₄	CARDGRRMGTPSFDIWGQGMVTVSS	69
	37475	DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQGISSTFLAWYQQKPKAPKLL	
	轻链	IYAASALHSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQRAVYF	
	BiPDL3-4 ₄	PPTFGGGTKVEIK	70
	37477	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSLSGYPWSWIRQPPGKGLEW	
	重链	IGETDVSGWTDYNPSTLKRVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY	
	BiPDL3-5 ₄	CARDGRRMGTPSFDIWGQGMVTVSS	71

[0243] 表3-CDR重链序列

抗体	CDRH1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)
27869	FTFDEYGMH	VIGYDGLNKYYADSVKG	ARAGIEYSYAYTDY
BiPDL4-1 ₄	(27)	(28)	(29)
27893	FTFDEYGMH	VIGYDGLNKYYADSVKG	ARAGIEYSYAYTDY
BiPDL4-2 ₄	(30)	(31)	(32)
27907	FTFSAYLMH	AIGYDGMNKYYADSVKG	ARAGIEYSYAYTDY
BiPDL4-3 ₄	(33)	(34)	(35)
27924	FTFSAYLMH	AIGYDGMNKYYADSVKG	ARAGIEYSYAYTDY
BiPDL4-4 ₄	(36)	(37)	(38)
21680	GSLSGYPWS	ETDVSGWTDYNPSTLKS	ARDGRRMGTPSFDI
[0244] BiPDL3-1 ₃	(39)	(40)	(41)
20786	GTFSSWLIS	GIIPILGTARYAQKFQG	ARVYRAASWFDP
BiPDL2-1 ₂	(42)	(43)	(44)
37464	GSLSGYPWS	ETDVSGWTDYNPSTLKS	ARDGRRMGTPSFDI
BiPDL3-1 ₄	(72)	(73)	(74)
37465	GSLSGYPWS	ETDVSGWTDYNPSTLKS	ARDGRRMGTPSFDI
BiPDL3-2 ₄	(75)	(76)	(77)
37468	GSLSGYPWS	ETDVSGWTDYNPSTLKS	ARDGRRMGTPSFDI
BiPDL3-3 ₄	(78)	(79)	(80)
37475	GSLSGYPWS	ETDVSGWTDYNPSTLKS	ARDGRRMGTPSFDI
BiPDL3-4 ₄	(81)	(82)	(83)
37477	GSLSGYPWS	ETDVSGWTDYNPSTLKS	ARDGRRMGTPSFDI
BiPDL3-5 ₄	(84)	(85)	(86)

[0245] 表4-CDR轻链序列

抗体	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
27869	RASQFVYSSDLA	GASTRKT	LQFGWWPPRT
BiPDL4-1 ₄	(45)	(46)	(47)
27893	RASNSVSSSYLA	GAASRAN	VQFGWWPPRT
BiPDL4-2 ₄	(48)	(49)	(50)
27907	RASQFVYSSDLA	GASARAA	MQFGWWPPRT
BiPDL4-3 ₄	(51)	(52)	(53)
27924	RASHSVSSSYLA	GASSRED	VQFGWWPPRT
BiPDL4-4 ₄	(54)	(55)	(56)
21680	RASQGISSWLA	AASSLQS	QQYVYFPPT
BiPDL3-1 ₃	(57)	(58)	(59)
20786	QASQDISNYLN	DASNLET	QQPFHLIT
BiPDL2-1 ₂	(60)	(61)	(62)
37464	RASQGINSFLA	AASSLNS	QKAVYFPPT
BiPDL3-1 ₄	(87)	(88)	(89)
37465	RASQGISNFLA	AASSLQS	QKAVYFPPT
BiPDL3-2 ₄	(90)	(91)	(92)
37468	RASQDISSFLA	AASSLQD	QKSVYFPPT
BiPDL3-3 ₄	(93)	(94)	(95)
37475	RASQGISTFLA	AASALHS	QRAVYFPPT
BiPDL3-4 ₄	(96)	(97)	(98)
37477	RASKGISSFLA	AADSIQS	QSAVYFPPT
BiPDL3-5 ₄	(99)	(100)	(101)

[0247] 表5-BiPDL命名法

BiPDL 命名法	ADI 实验编号
BiPDL1	16413
BiPDL2	16414
BiPDL2-1 ₂	20786
BiPDL3	16415
BiPDL3-1 ₂	20780
BiPDL3-1 ₃	21680
BiPDL4-1 ₁	16418
BiPDL4-1 ₂	20769
BiPDL4-2 ₂	20775
BiPDL4-1 ₃	21661
BiPDL4-1 ₄	27869
BiPDL4-2 ₄	27893
BiPDL4-3 ₄	27907
BiPDL4-4 ₄	27924
BiPDL3-1 ₄	37464
BiPDL3-2 ₄	37465
BiPDL3-3 ₄	37468
BiPDL3-4 ₄	37475
BiPDL3-5 ₄	37477

[0249] 表5-与PD-L1和PD-L2结合的抗体的亲和力测量结果

克隆家族	靶标	ADI名称	IgG K _o 人		Fab K _o 人		IgG K _o 小鼠		Fab K _o 小鼠		MSD Fab K _o 人		MSD Fab K _o 小鼠	
			PD-L1-Fc (M)	PD-L1-HIS (M)	PD-L1-Fc (M)	PD-L1-HIS (M)	PD-L2-Fc (M)	PD-L2-HIS (M)	Cyno PD-L1-Fc (M)	Cyno PD-L1-HIS (M)	Cyno PD-L2-Fc (M)	Cyno PD-L2-HIS (M)	b-PD-L1-HIS (M)	b-PD-L1-HIS (M)
52	PD-L1 ₂	ADI-164-13	7.23E-09	N.D.	N.B.	7.37E-10	1.07E-07	3.34E-08	N.B.	N.B.	8.24E-10	N.B.	N.B.	N.B.
52-g1	PD-L1 ₂	ADI-20780	2.71E-08	N.D.	N.B.	8.85E-06	N.D.	N.B.	N.B.	N.B.	4.87E-08	N.B.	N.B.	N.B.
52-g2	PD-L1 ₂	ADI-21680	3.28E-08	N.D.	N.B.	4.31E-10	N.D.	1.80E-08	2.44E-09	N.B.	6.88E-10	1.22E-09	N.B.	N.B.
53	PD-L1 ₂	ADI-164-18	8.88E-10	7.88E-08	7.80E-08	2.47E-09	N.D.	1.18E-07	1.71E-06	8.48E-10	8.64E-08	N.B.	N.B.	N.B.
53-g1	PD-L1 ₂	ADI-20769	8.22E-10	N.D.	2.79E-06	1.74E-08	N.D.	8.84E-08	8.05E-10	4.30E-10	3.22E-09	N.B.	N.B.	N.B.
53-g1	PD-L1 ₂	ADI-20775	8.42E-08	N.D.	N.B.	3.50E-10	N.D.	1.11E-08	7.33E-09	4.57E-09	8.55E-10	1.36E-05	N.B.	N.B.
53-g2	PD-L1 ₂	ADI-21681	8.38E-10	N.D.	8.04E-05	3.39E-10	N.D.	8.38E-09	7.12E-10	8.29E-10	8.18E-10	N.B.	N.B.	N.B.
53-g3	PD-L1 ₂	ADI-27888	N.D.	8.92E-10	3.28E-09	N.D.	7.38E-10	4.03E-10	5.08E-10	4.03E-10	8.40E-10	7.88E-09	N.B.	1.20E-10 1.1E-10
53-g3	PD-L1 ₂	ADI-27907	N.D.	8.17E-09	6.85E-09	N.D.	9.32E-10	3.69E-10	4.08E-10	5.44E-10	7.30E-10	5.86E-09	N.B.	8.80E-10 5.2E-11

[0251] 表6-与PD-L1和PD-L2结合的抗体的亲和力测量结果

BIPDL名称	ForteBio IgG K _o 人 PD-L1-His (M)		ForteBio Fab K _o 人 PD-L1-Fc (M)		ForteBio IgG K _o 人 PD-L2-His (M)		ForteBio Fab K _o 人 PD-L2-Fc (M)		ForteBio IgG K _o 小鼠 Cyno PD-L1-Fc (M)		ForteBio IgG K _o 小鼠 Cyno PD-L2-Fc (M)		ForteBio IgG K _o 小鼠 PD-L1-Fc (M)		ForteBio IgG K _o 小鼠 PD-L2-Fc (M)		MSD Fab K _o 人 b-PD-L1-His (M)		MSD Fab K _o 小鼠 b-PD-L2-His (M)	
	单价	单价	单价	单价	单价	单价	单价	单价	单价	单价	单价	单价	单价	单价	单价	单价	单价	单价	单价	单价
BIPDL4-1 ₁	2.28E-09	8.82E-10	7.39E-10	4.02E-10	5.08E-10	6.40E-10	4.00E-10	7.88E-08	1.20E-10	1.1E-10										
BIPDL4-2 ₁	7.24E-09	6.57E-09	4.97E-10	4.75E-10	8.38E-10	4.58E-10	6.77E-10	8.77E-08	N.D.											
BIPDL4-3 ₁	6.85E-09	2.17E-09	9.32E-10	5.60E-10	4.08E-10	7.38E-10	5.44E-10	5.89E-08	9.60E-10											
BIPDL4-4 ₁	7.89E-09	6.00E-09	8.80E-10	4.37E-10	5.55E-10	4.17E-10	7.93E-10	4.14E-08	N.D.											

[0253] 表7-通过分箱的抗体重叠确定

抗体	PDL1-3 ₁	PDL1-4 ₁	PDL1-1 ₂	BIPDL4-1 ₁	BIPDL4-1 ₂	BIPDL4-1 ₃	BIPDL4-1 ₄	MedImmune	泰圣奇	阿维鲁单抗
PDL1-3 ₁	6.88%	9.67%	2.86%	1.53%	5.82%	1.40%	3.61%	1.03%	0.75%	2.39%
PDL1-4 ₁	8.27%	4.13%	8.60%	17.19%	8.14%	8.21%	8.42%	0.82%	0.32%	0.27%
PDL1-1 ₂	2.03%	8.01%	2.94%	3.31%	1.63%	2.13%	1.62%	2.38%	1.86%	1.14%
BIPDL4-1 ₁	1.71%	28.31%	1.93%	2.43%	0.99%	1.08%	0.76%	2.12%	81.12%	78.93%
BIPDL4-1 ₂	3.83%	15.84%	5.48%	7.53%	1.81%	1.60%	2.04%	4.47%	83.74%	83.62%
BIPDL4-1 ₃	2.68%	20.71%	4.31%	6.57%	1.25%	1.97%	1.08%	1.85%	82.45%	80.17%
BIPDL4-1 ₄	4.85%	15.88%	5.90%	8.58%	2.61%	3.02%	1.63%	5.17%	81.58%	82.53%
MedImmune	1.31%	7.75%	1.60%	4.37%	0.72%	1.23%	0.93%	0.81%	0.60%	1.98%
泰圣奇	1.17%	8.57%	2.98%	84.41%	87.62%	84.48%	80.13%	1.89%	0.31%	1.80%
阿维鲁单抗	8.52%	7.39%	1.67%	85.15%	85.69%	84.99%	81.03%	1.52%	0.67%	1.88%

[0255] 表8-通过分箱的抗体重叠确定

抗体	PDL2-2 ₁	BIPDL4-1 ₁	BIPDL4-1 ₂	BIPDL4-1 ₃	BIPDL4-1 ₄	PDL2-1 ₂	PDL2-2 ₂	MH18	24F.10C12	PDL2-1 ₁
PDL2-2 ₁	3.94%	61.81%	60.34%	58.36%	61.98%	1.87%	1.22%		57.40%	1.92%
BIPDL4-1 ₁	78.16%	6.34%	7.10%	6.50%	5.65%	67.19%	66.57%		15.10%	51.91%
BIPDL4-1 ₂	71.50%	4.58%	4.61%	4.60%	3.48%	58.76%	65.25%		12.56%	54.25%
BIPDL4-1 ₃	73.23%	4.17%	5.12%	5.22%	4.00%	69.12%	64.56%		15.16%	60.38%
BIPDL4-1 ₄	73.14%	6.90%	7.31%	8.06%	5.22%	58.78%	64.87%		17.88%	58.89%
PDL2-1 ₂	6.06%	68.20%	65.56%	66.74%	70.90%	5.10%	5.81%		65.85%	7.44%
PDL2-2 ₂	2.27%	58.34%	59.37%	60.54%	65.75%	4.19%	1.54%		63.79%	4.19%
MH18	74.65%	47.83%	60.62%	57.01%	63.38%	73.65%	70.26%		3.78%	71.41%
24F.10C12	5.24%	50.48%	57.49%	56.82%	62.64%	7.11%	5.98%		63.75%	4.99%
PDL2-1 ₁	5.84%	87.97%	88.71%	87.48%	73.22%	6.40%	6.25%		66.70%	8.29%

[0257] 表9-抗体结合与竞争

ADI名称	请系名称	IgG KD 人 PD-L1-HIS (M)		IgG KD 人 PD-L2-HIS (M)		IgG KD Cyno PD-L1-Fc (M)		IgG KD Cyno PD-L2-Fc (M)		IgG KD 小鼠 PD-L1-Fc (M)		IgG KD 小鼠 PD-L2-Fc (M)		PD-1 竞争者		CD80 竞争者	
		单价	单价	单价	单价	单价	单价	单价	单价	单价	单价	人 PD-L1	小鼠 PD-L1	人 PD-1	小鼠 PD-1	人 CD80	小鼠 CD80
AD-37464	BIPDL3-1 ₁	3.95E-09	6.84E-10	3.71E-10	5.43E-10	2.34E-09	5.33E-10	是	是								
AD-37465	BIPDL3-2 ₁	1.54E-08	8.88E-10	3.96E-10	6.06E-10	2.65E-09	5.53E-10	是	是								
AD-37468	BIPDL3-3 ₁	1.78E-08	8.44E-10	4.31E-10	6.77E-10	3.16E-08	4.84E-10	是	是								
AD-37475	BIPDL3-4 ₁	3.02E-08	1.45E-09	4.56E-10	6.03E-10	4.20E-08	5.52E-10	是	是								
AD-37477	BIPDL3-5 ₁	1.55E-08	2.20E-09	4.42E-10	6.21E-10	2.97E-09	6.94E-10	是	是								

[0259] ***

[0260] 根据本公开内容,不需要过度实验就可进行和实施本文公开和要求保护的所有方法。尽管已经按照一些优选实施方案描述了本发明的组合物和方法,然而对于本领域技术人员显而易见的是,可对本文中所述方法以及方法的步骤或步骤的顺序进行改变,而不脱

离本发明的概念、精神和范围。更具体地,显而易见的是,可用某些在化学和生理学两个方面均相关的试剂替代本文中所述的试剂,同时实现相同或类似的结果。对于本领域技术人员显而易见的所有这些类似替代和修改被认为在由所附权利要求书限定的本发明的精神、范围和概念内。

[0261] VIII. 参考文献

[0262] 以下参考文献就其提供补充本文中所阐述的那些操作或细节的示例性操作或其他细节而言特别地通过引用并入本文。

[0263] “Antibodies:A Laboratory Manual,”Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,NY,1988.

[0264] Abbondanzo et al.,Am.J.Pediatr.Hematol.Oncol.,12(4),480-489,1990.

[0265] Allred et al.,Arch.Surg.,125(1),107-113,1990.

[0266] Atherton et al.,Biol.of Reproduction,32,155-171,1985.

[0267] Austin et al.,PLoS Pathog 8,e1002930,2012.

[0268] Baptista et al.,Hum.Pathol.,47:78-84,2016.

[0269] Barrett et al.,Oncotarget,6:26483-26493,2015.

[0270] Boussiotis,N Enl J Med,375:1767-1778,2016.

[0271] Boyerinas et al.,Cancer Immunol.Res.,3:1148-1157,2015.

[0272] Brahmer et al.,J.Clin.Oncolo.,28:3167-3175,2010.

[0273] Brahmer et al.,N.Eng.J.Med,366:2455-2465;2012.

[0274] Brehin,et al.,Virology 371:185-195,2008.

[0275] Brown et al.,J.Immunol.Meth.,12;130(1):111-121,1990.

[0276] Butte et al.,Immunity,27:111-122,2007.

[0277] Butte et al.,Mol.Immunol.,45:3567-3572,2008.

[0278] Campbell,In:Monoclonal Antibody Technology,Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology,Vol.13,Burden and Von Knippenberg, Eds.pp.75-83,Amsterdam,Elsevier,1984.

[0279] Capaldi et al.,Biochem.Biophys.Res.Comm.,74(2):425-433,1977.

[0280] Cheng et al.,J.Biol.Chem.,288:11771-11785,2013.

[0281] Christian et al.,Proc Natl Acad Sci USA,110:18662-18667,2013.

[0282] Danilova et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,113:E7769-E7777,2016.

[0283] De Jager et al.,Semin.Nucl.Med.23(2):165-179,1993.

[0284] Derks et al.,Cancer.Immunol.Res.,3:1123-1129,2015.

[0285] Dholakia et al.,J.Biol.Chem.,264,20638-20642,1989.

[0286] Doolittle and Ben-Zeev,Methods Mol.Biol.,109,215-237,1999.

[0287] Dong et al.,Hum.Pathol.,2016.

[0288] Dong et al,Nat.Medicine,8:793-800,2002.

[0289] Estep et al.,Mabs,5(2):270-278,2013.

[0290] Fric et al.,J.Infect.Dis.207:319-322,2013.

[0291] Gefter et al.,Somatic Cell Genet.,3:231-236,1977.

- [0292] Goh et al.,*Clin.Immunol.*149:487-497,2013.
- [0293] Green et al.,*Blood*,116:3268-3277,2010.
- [0294] Gulbis and Galand,*Hum.Pathol.*24(12),1271-1285,1993.
- [0295] Guo et al.,*Sci.Transl.Med.*3:99ra85,2001.
- [0296] Howitt et al.,*J.A.M.A.Oncol.*,2:518-522,2016.
- [0297] Inoue et al.,*Oncotarget*,7:32113-32128,2016.
- [0298] Kam et al.,*EMBO Mol.Med.*4,330-343,2012b.
- [0299] Kam et al.,*J.Virol.*86,13005-13015,2012a.
- [0300] Kam et al.,*PLoS One* 9,e95647,2014.
- [0301] Khatoun et al.,*Ann.of Neurology*,26,210-219,1989.
- [0302] Kim et al.,*Lung Cancer*,88:24-33,2015.
- [0303] Kim et al.,*Eur.J.Cancer*,51:2698-2707,2015.
- [0304] King et al.,*J.Biol.Chem.*,269,10210-10218,1989.
- [0305] Kohler and Milstein,*Eur.J.Immunol.*,6,511-519,1976.
- [0306] Kohler and Milstein,*Nature*,256,495-497,1975.
- [0307] Kyte and Doolittle,*J.Mol.Biol.*,157(1):105-132,1982.
- [0308] Lanciotti&Valadere,*Emerg Infect Dis* 20,2014.
- [0309] Latchman et al.,*Nat.Immunol.*,2:261-268,2001.
- [0310] Lee et al.,*Nat.Commun.*,7:12220,2016.
- [0311] Lee et al.,*PLoS Pathog.*7:e1002390,2011.
- [0312] Levitt et al.,*Vaccine* 4,157-162,1986.
- [0313] Li et al.,*J.Biol.Chem.*,292:6799-6809,2017.
- [0314] Lum et al.,*J.Immunol.*190:6295-6302,2013.
- [0315] Mainou et al.,*MBio* 4,2013.
- [0316] Masrinoul et al.,*Virology* 464-465,111-117,2014.
- [0317] Messer et al.,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 111:1939-1944,2014.
- [0318] Morrison et al.,*Am J Pathol*,178:32-40,2011.
- [0319] Nakamura et al.,*In:Enzyme Immunoassays:Heterogeneous and Homogeneous Systems*,Chapter 27,1987.
- [0320] Nazareth et al.,*J.Immunology*,178(9):5552-5562,2007.
- [0321] Nie et al.,*Cell Mol.Immunol.*,2017.
- [0322] Nomi et al.,*Clin.Cancer Res.*,13:2151-2157,2007.
- [0323] Obeid et al.,*Oncoimmunology*,5:e1235107,2016.
- [0324] Ohigashi et al.,*Clin.Cancer Res.*,11:2947-2953,2005.
- [0325] O'Shannessy et al.,*J.Immun.Meth.*,99,153-161,1987.
- [0326] Paes et al.,*J.Am.Chem.Soc.*,131:6952-6954,2009.
- [0327] Pal et al.,*PLoS Pathog* 9,e1003312,2013.
- [0328] Persic et al.,*Gene* 187:1,1997
- [0329] Pinchuk et al.,*Gastroenterology*,135(4):1228-1237,2008.

- [0330] Potter and Haley, *Meth. Enzymol.*, 91, 613-633, 1983.
- [0331] Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 15th Ed., 3:624-652, 1990.
- [0332] Roemer et al., *J. Clin. Oncol.*, 2016.
- [0333] Rozali et al., *Clinical and Developmental Immunology*; 2012:656340, 2012.
- [0334] R.C.Team, R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2014.
- [0335] Schilte et al., *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7:e2137, 2013.
- [0336] Selvarajah et al., *PLoS Negl. Trop. Dis.* 7:e2423, 2013.
- [0337] Siegel et al., *J Immunol Methods*, 286(1-2):141-153, 2004.
- [0338] Shi et al., *Am. J. Surg. Pathol.*, 38:1715-1723, 2014.
- [0339] Shin et al., *Ann. Surg. Oncol.*, 2015.
- [0340] Shin et al., *Ann. Surg. Oncol.*, 23:694-702, 2016.
- [0341] Sissoko et al., *PLoS Negl. Trop. Dis.* 3:e389, 2009.
- [0342] Smith et al., *MBio* 4, e00873-00813, 2013a.
- [0343] Sun et al., *Elife* 2:e00435, 2013.
- [0344] Sun et al., *J. Steroid Biochem.*, 26(1):83-92, 1987.
- [0345] Sunshine and Taube, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 23:32-38, 2015.
- [0346] Tang et al., *J. Biol. Chem.*, 271:28324-28330, 1996.
- [0347] Thompson et al., *Proceedings of the National Academy of Sciences of the U.S.A.*, 101(49):17174-17179, 2004.
- [0348] Thornburg et al., *J. Clin. Invest.*, 123:4405-4409, 2013.
- [0349] 美国专利3,817,837
- [0350] 美国专利3,850,752
- [0351] 美国专利3,939,350
- [0352] 美国专利3,996,345
- [0353] 美国专利4,196,265
- [0354] 美国专利4,275,149
- [0355] 美国专利4,277,437
- [0356] 美国专利4,366,241
- [0357] 美国专利4,472,509
- [0358] 美国专利4,554,101
- [0359] 美国专利4,680,338
- [0360] 美国专利4,816,567
- [0361] 美国专利4,867,973
- [0362] 美国专利4,938,948
- [0363] 美国专利5,021,236
- [0364] 美国专利5,141,648
- [0365] 美国专利5,196,066
- [0366] 美国专利5,563,250
- [0367] 美国专利5,565,332

- [0368] 美国专利5,856,456
- [0369] 美国专利5,880,270
- [0370] Vander Veen et al.,Anim Health Res Rev,13:1-9,2012.
- [0371] Van Deventer and Wittrup,Methods Mol.Biol.,1131:151-181,2014.
- [0372] Van Roosbroeck et al.,Genes Chromosomes Cancer,55:428-441,2016.
- [0373] Voss et al.,Nature,468:709-712,2010.
- [0374] Wang et al.,World J.Gastroenterol.,17:3322-3329,2011.
- [0375] Warter et al.,J.Immunol.,186:3258-3264,2011.
- [0376] Wawrzynczak&Thorpe,In:Immunoconjugates,Antibody Conjugates In Radioimaging And Therapy Of Cancer,Vogel(Ed.),NY,Oxford University Press,28, 1987.
- [0377] Xiao et al.,J.Exp.Med.,211:943-959,2014.
- [0378] Xu et al.,PEDS 26.10:663-70,2013.
- [0379] Yearley et al.,Clin.Cancer.Res.,23:3158-3167,2017.
- [0380] Yu et al.,Nature 455:532-536,2008.

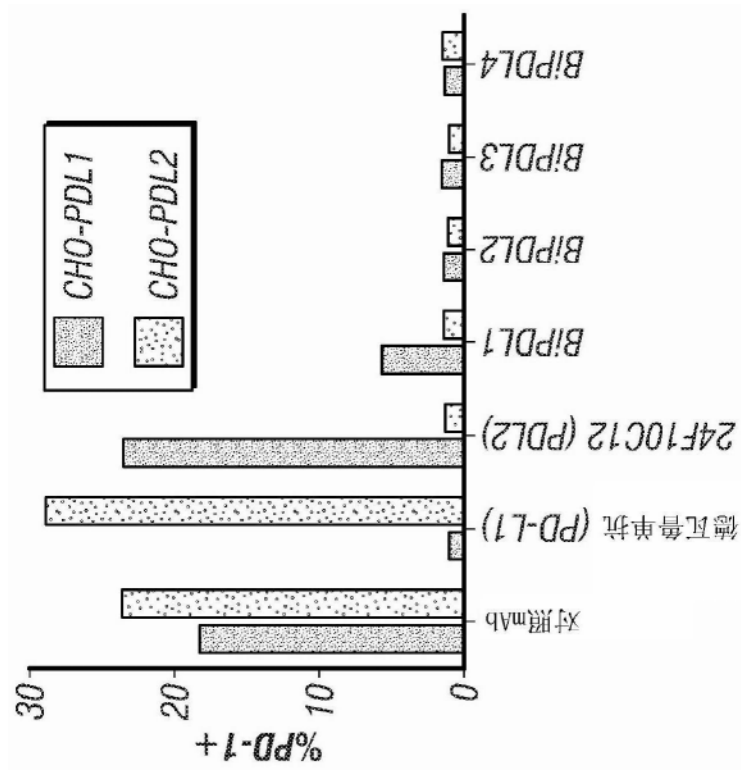


图1A

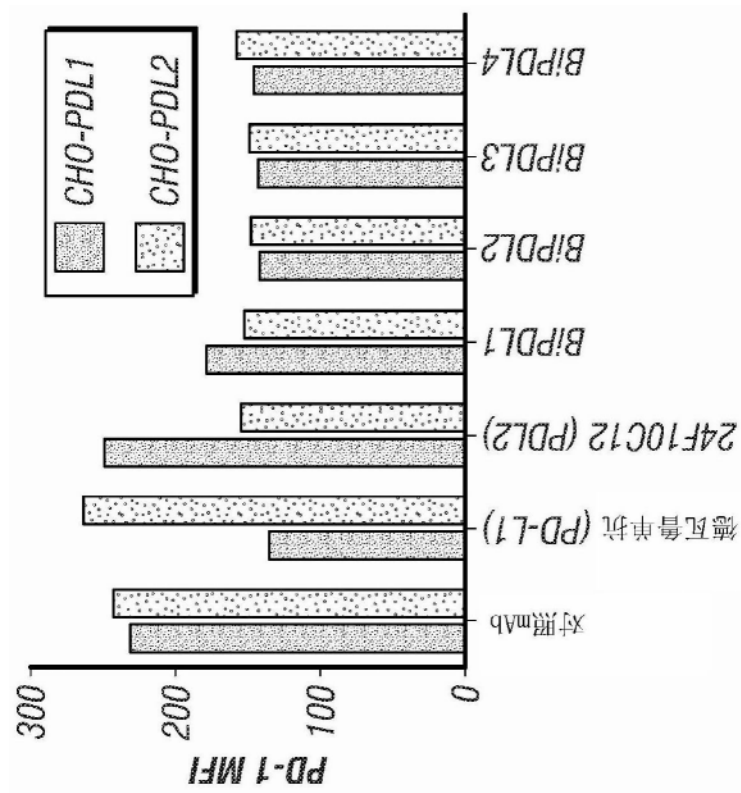


图1B

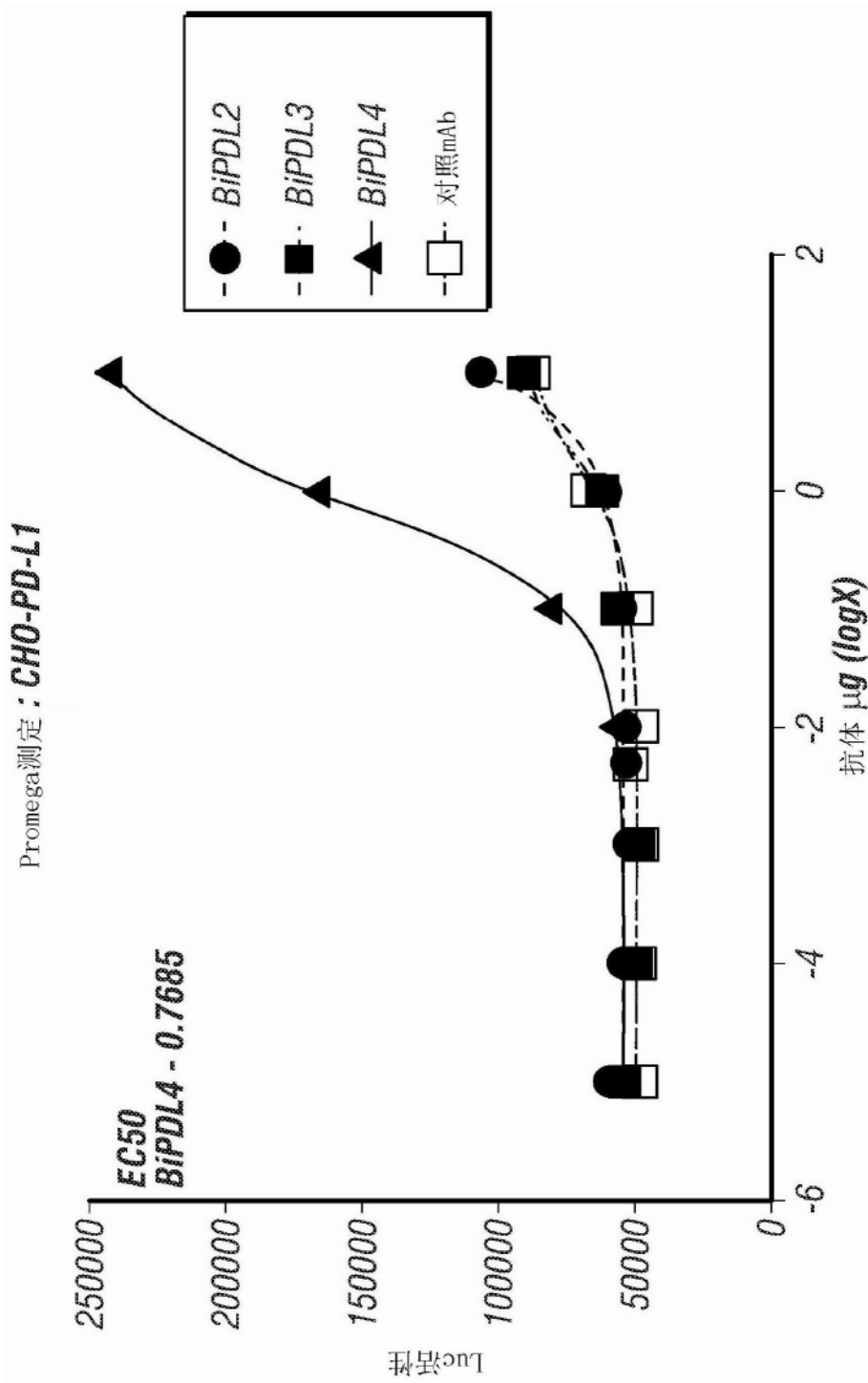


图1C

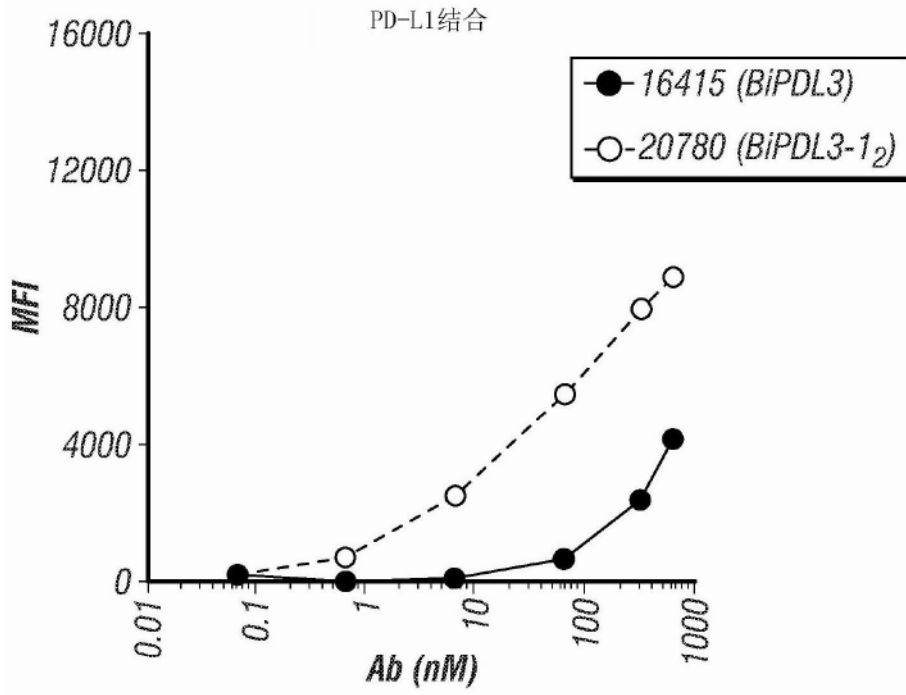


图2A

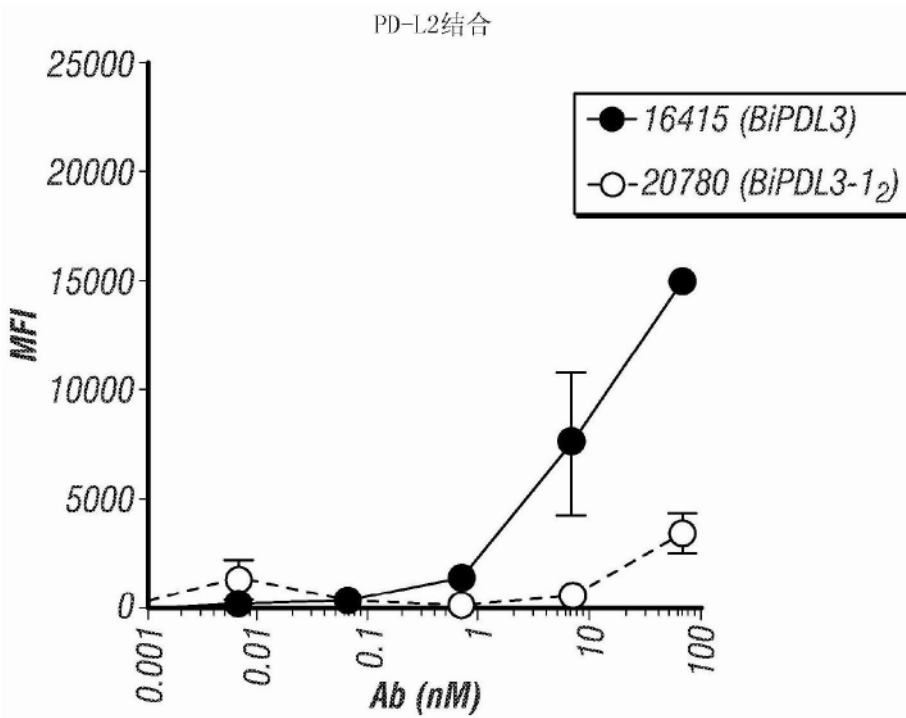


图2B

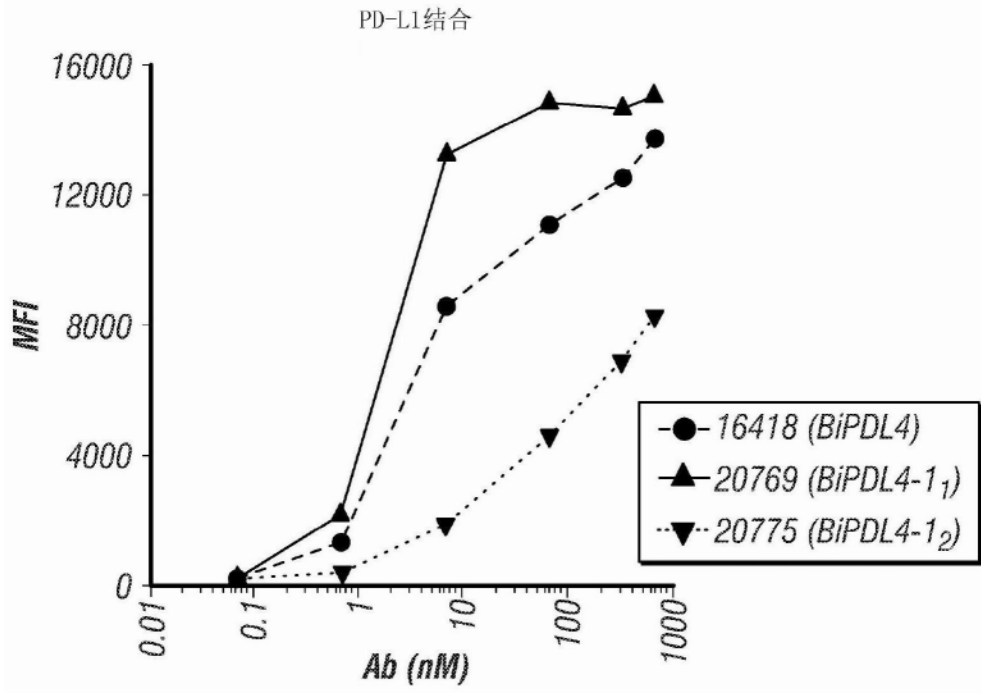


图2C

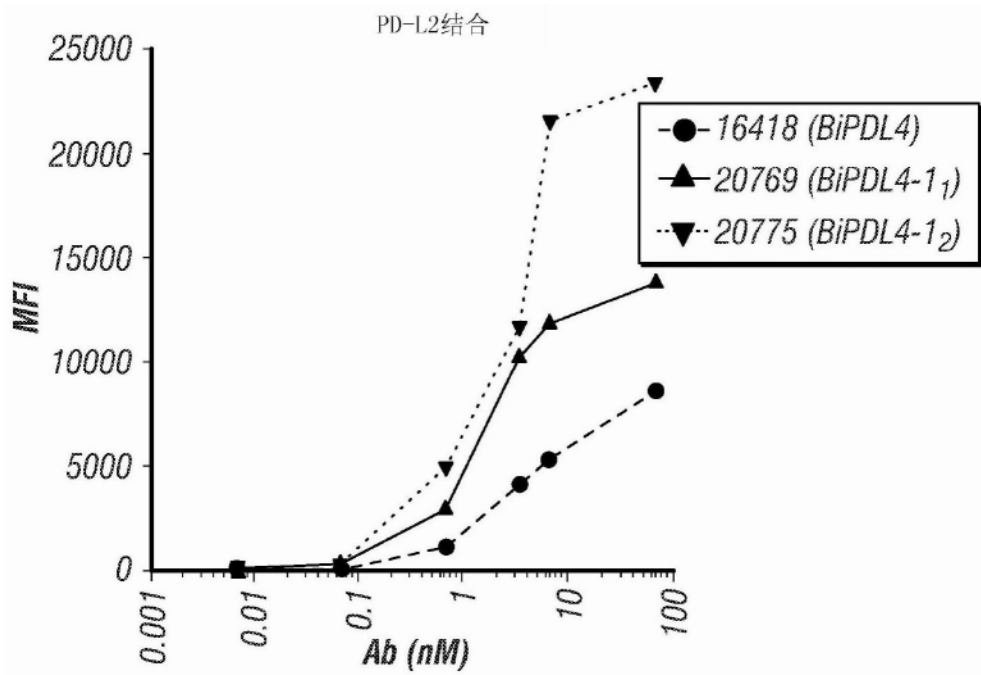


图2D

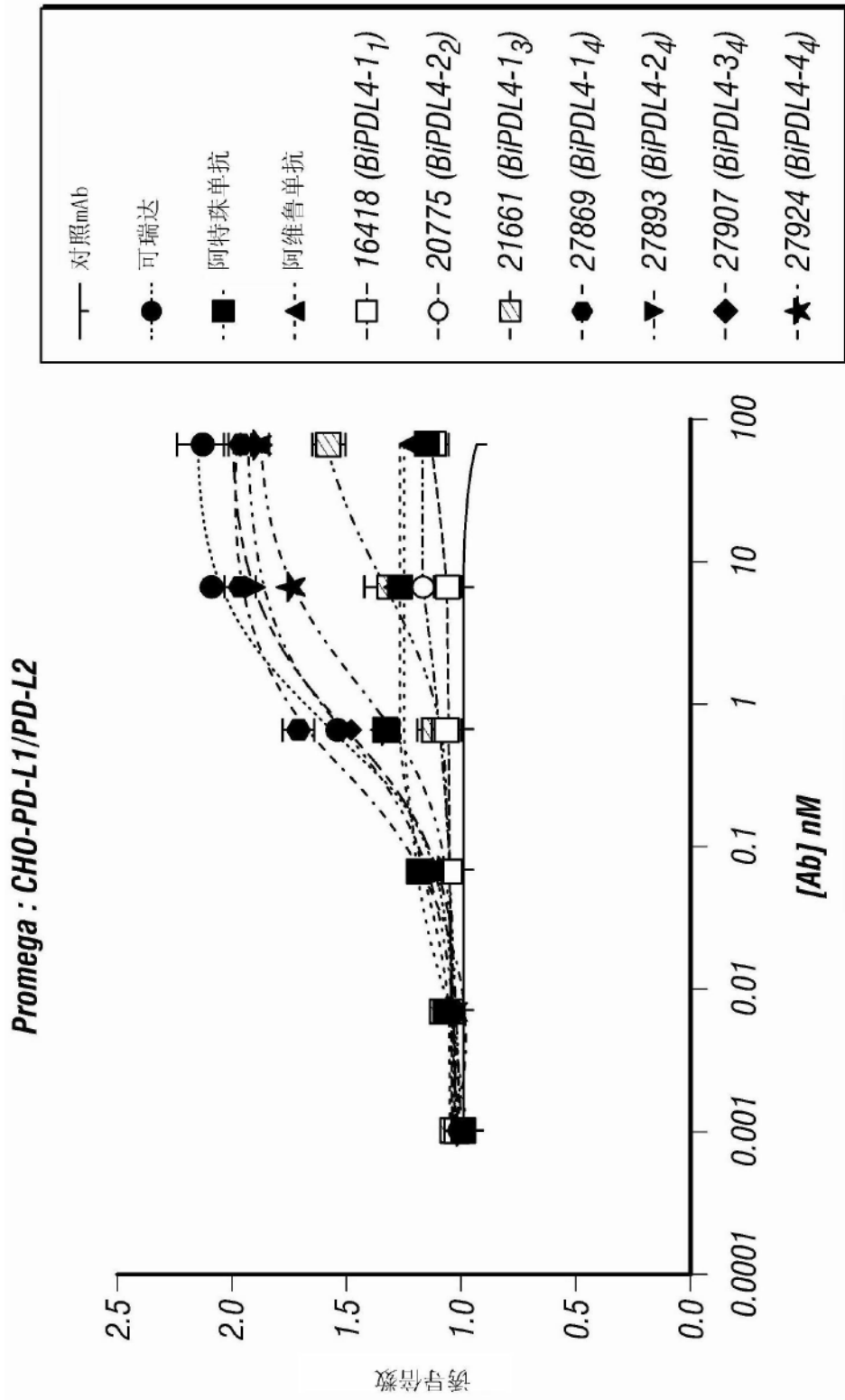


图3

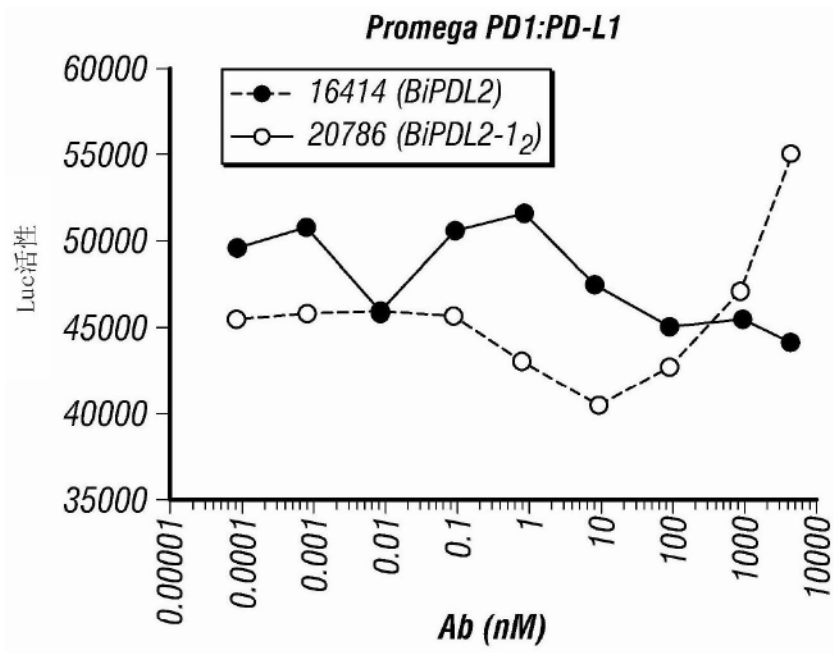


图4A

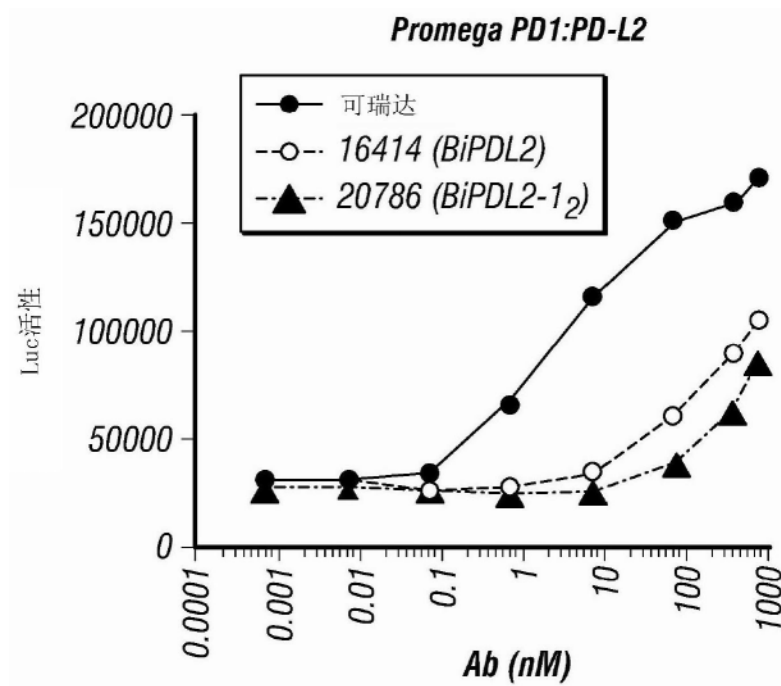


图4B

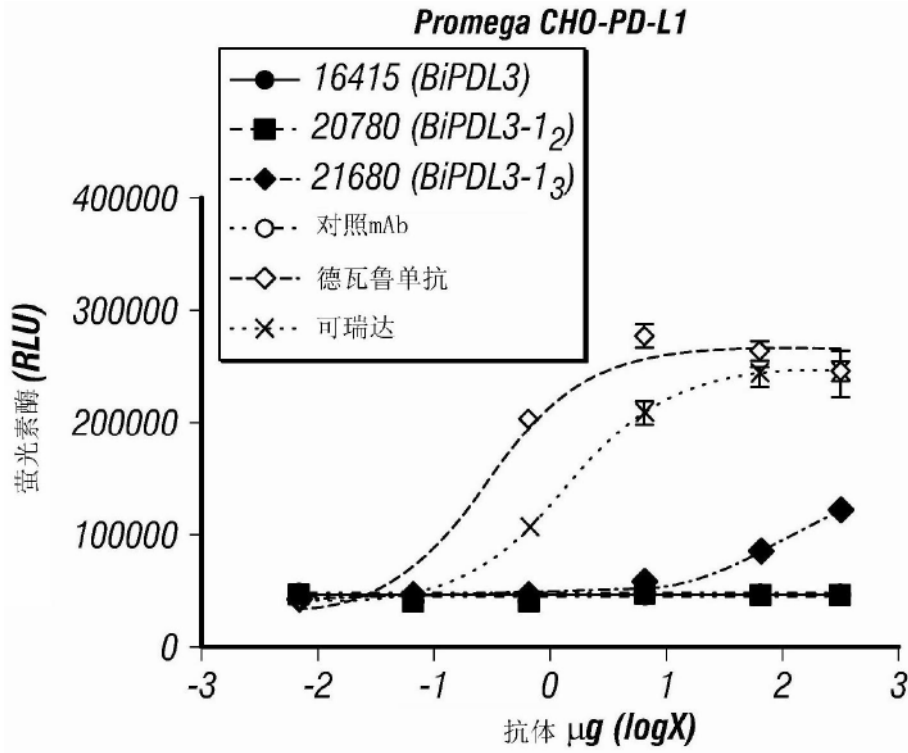


图4C

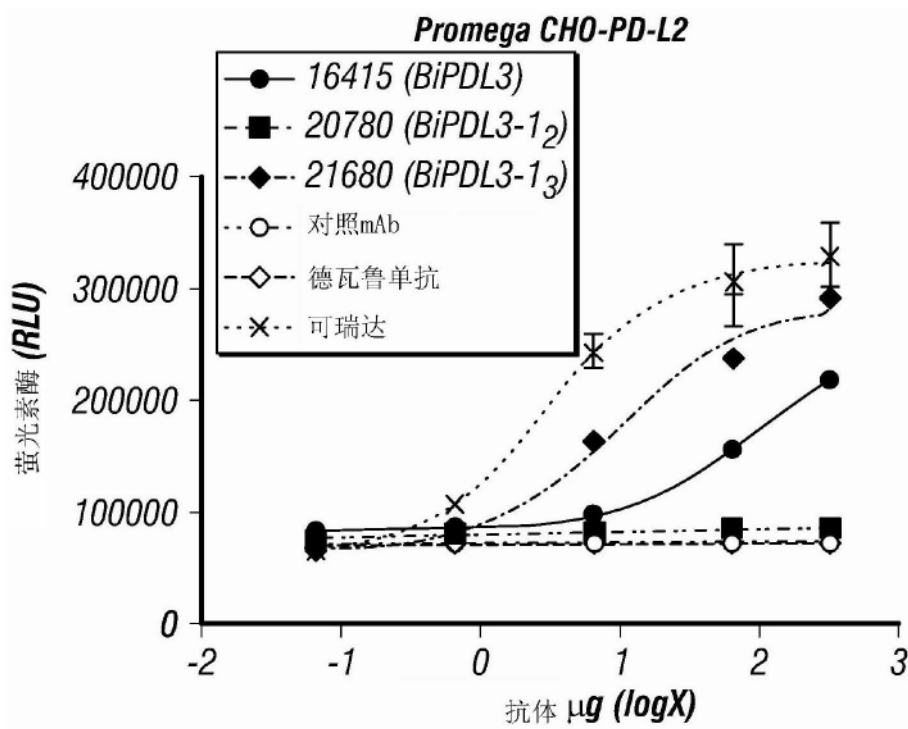


图4D

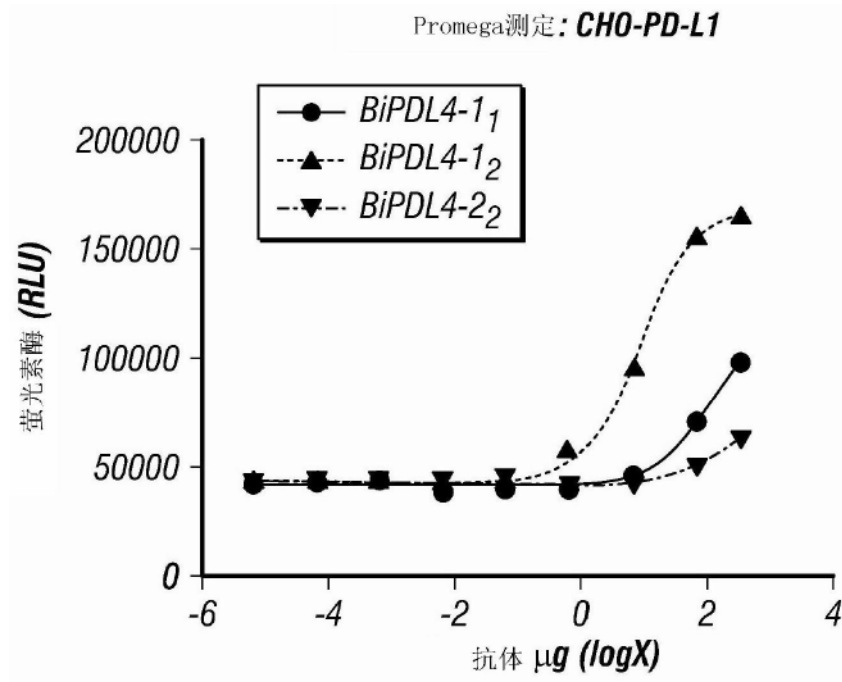


图4E

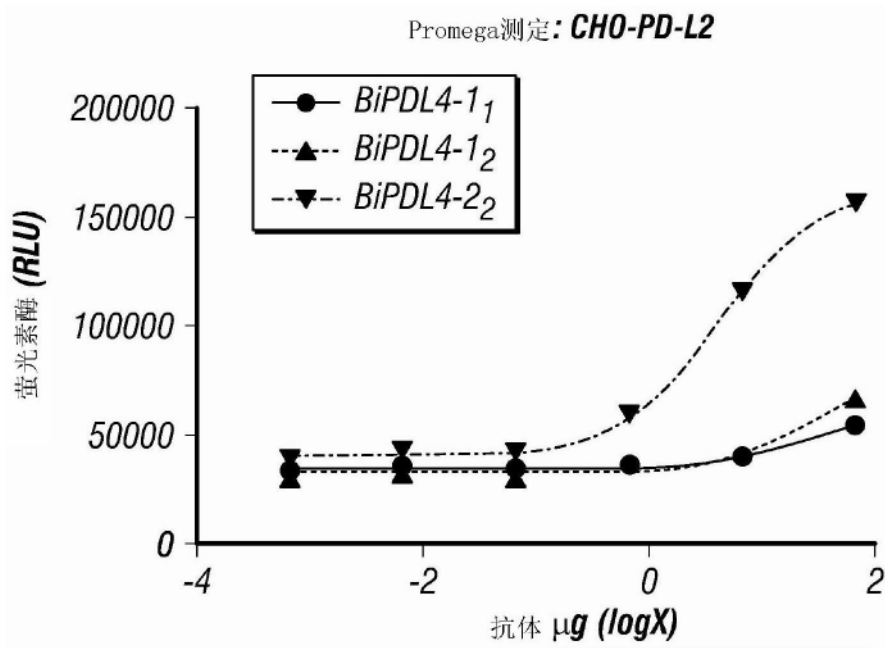


图4F

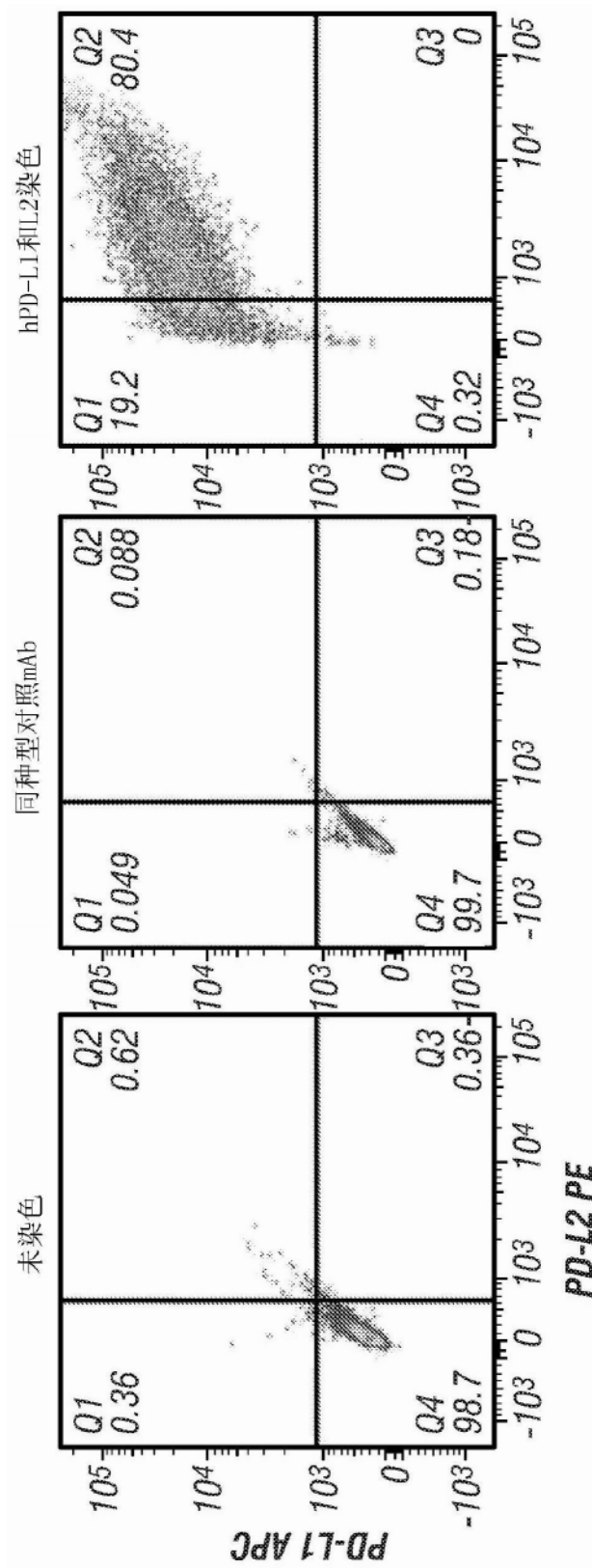


图5A

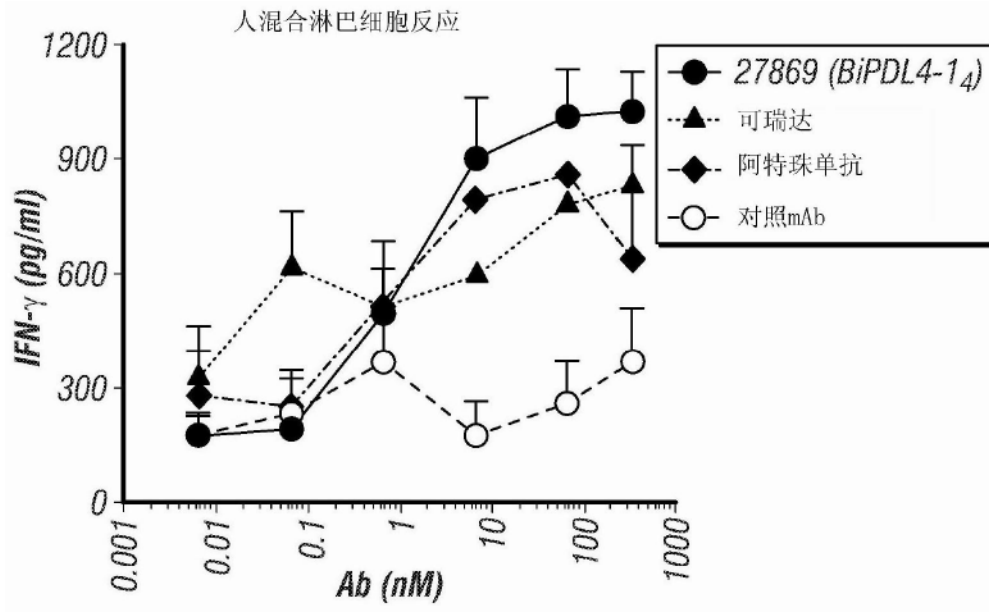


图5B

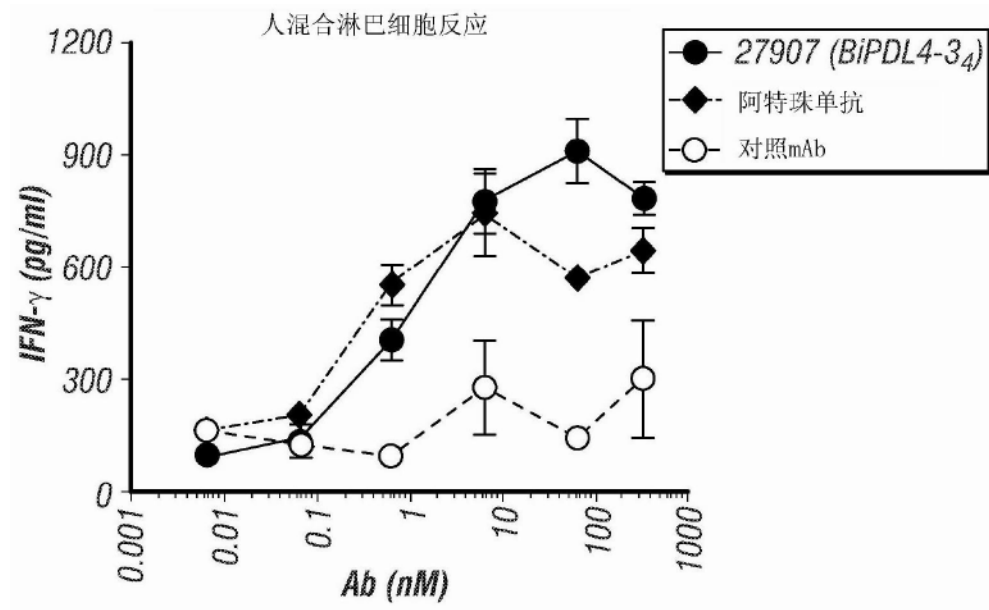


图5C

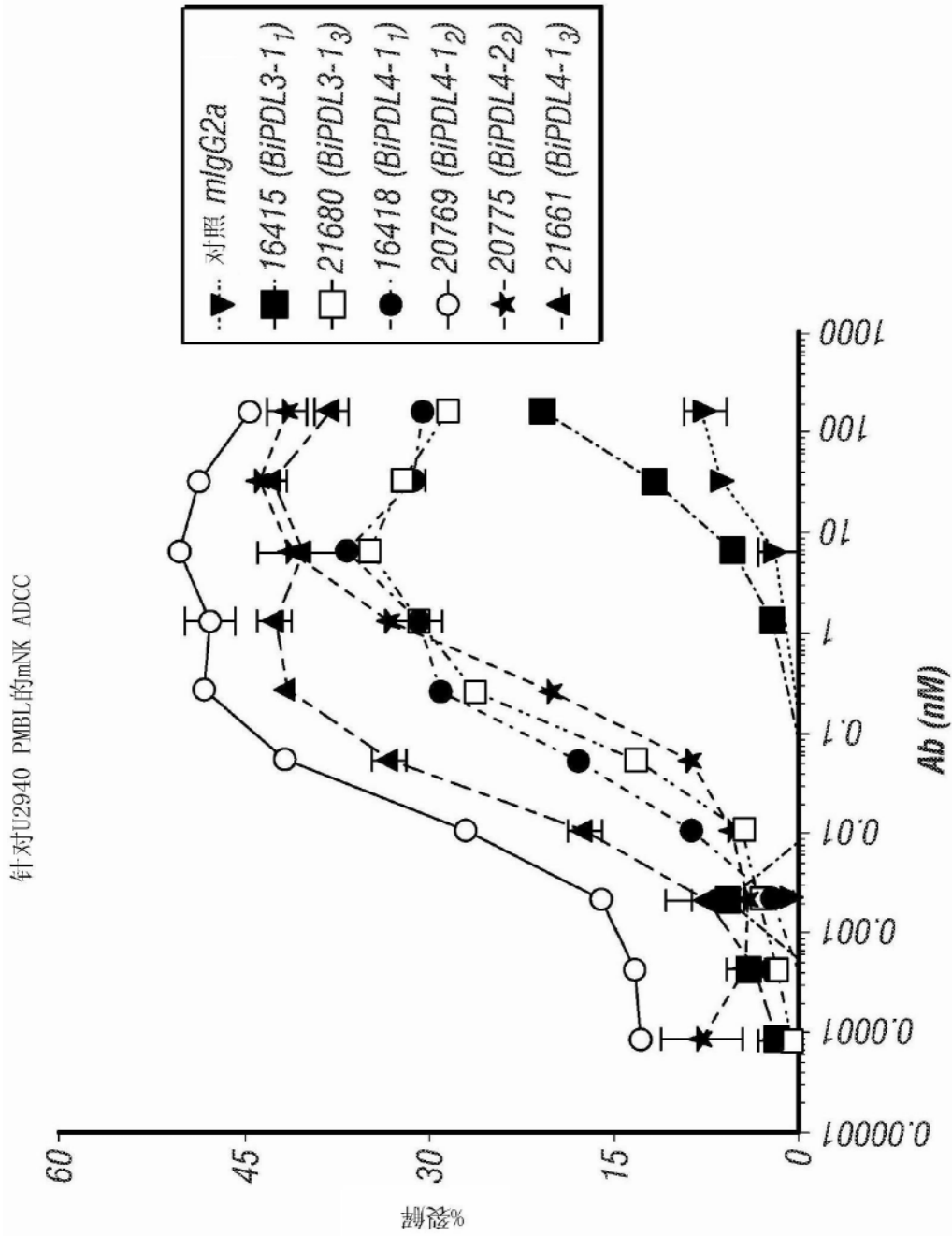


图6

	<i>BiPDL3-1₁</i>	<i>BiPDL3-1₃</i>	<i>BiPDL4-1₁</i>	<i>BiPDL4-1₂</i>	<i>BiPDL4-2₂</i>	<i>BiPDL4-1₃</i>
<i>EC₅₀ (nM, 10⁻⁹)</i>	P.F.	0.08	0.038	0.014	0.43	0.014
%杀伤	20%	33%	36%	35%	40%	40%

图6(续)

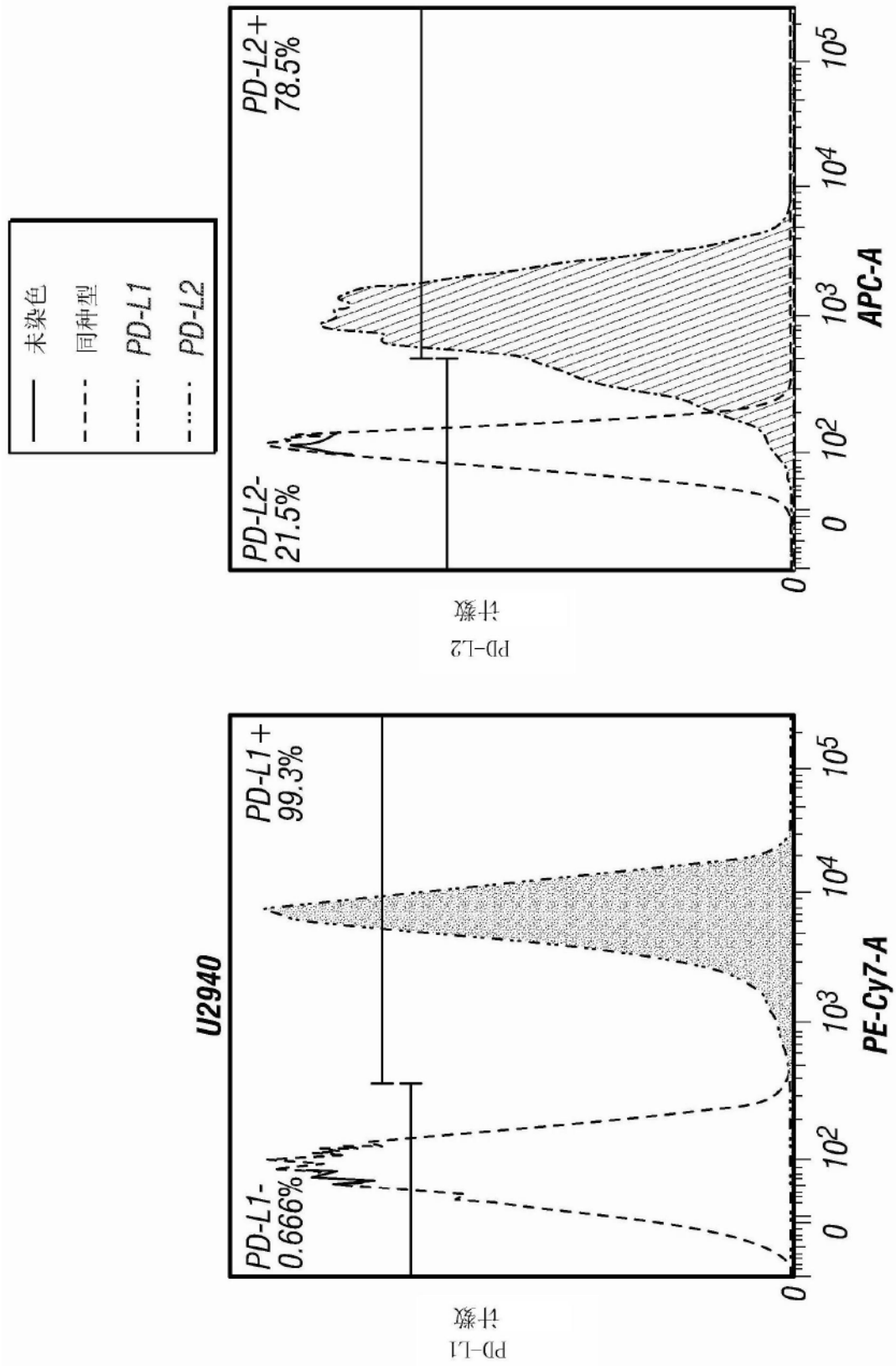


图7A

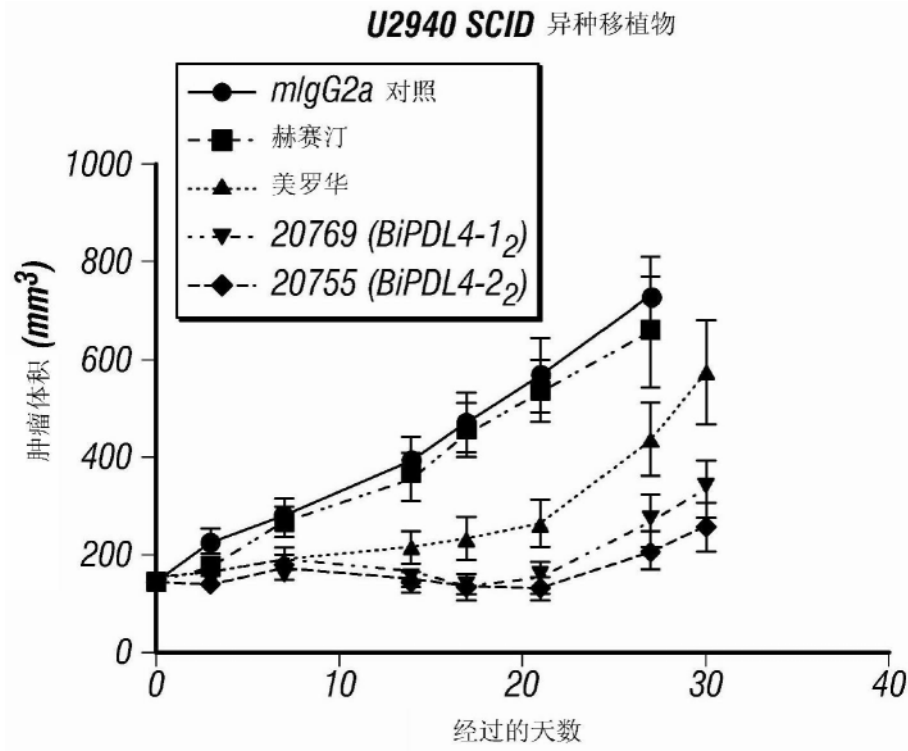


图7B

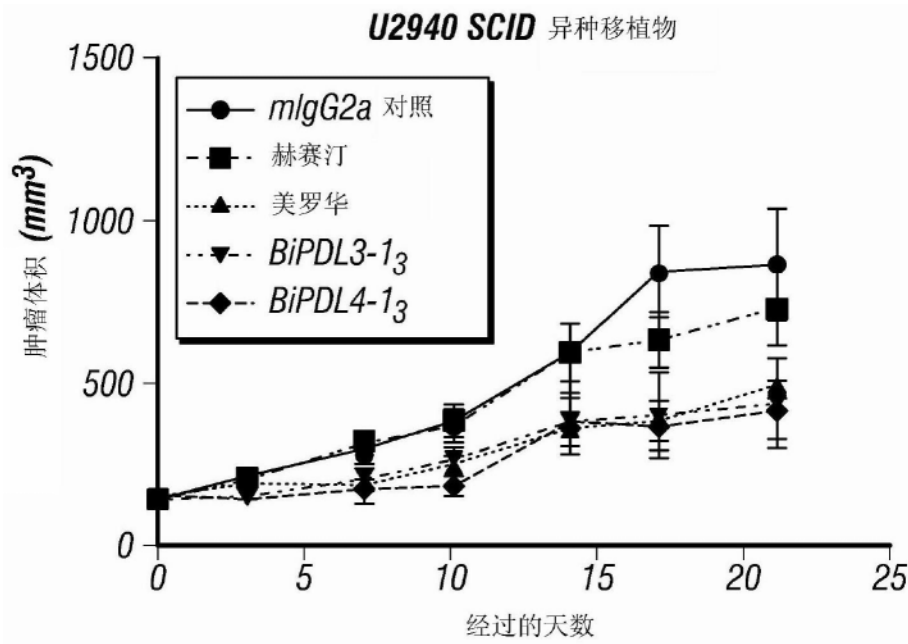


图7C

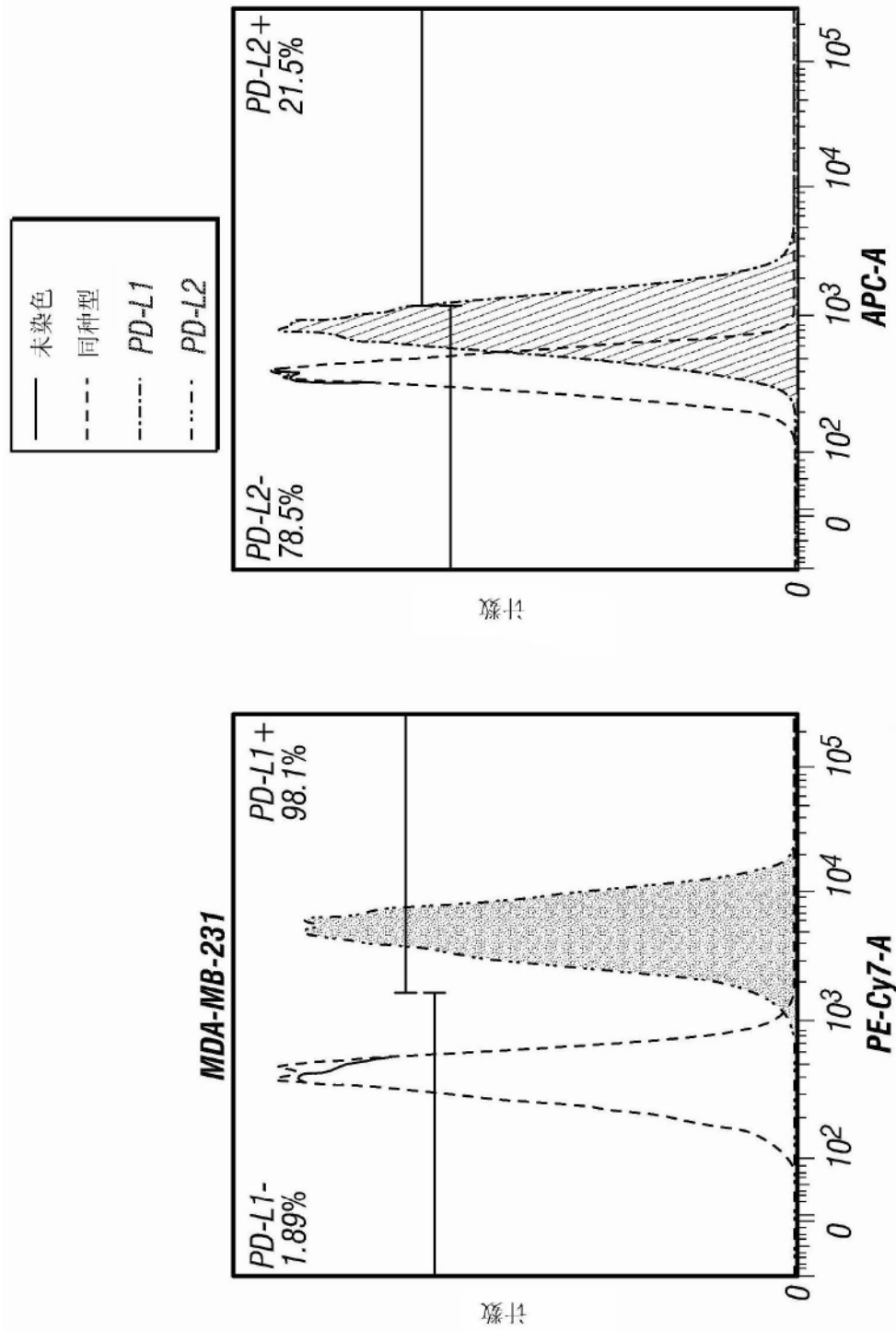


图8A

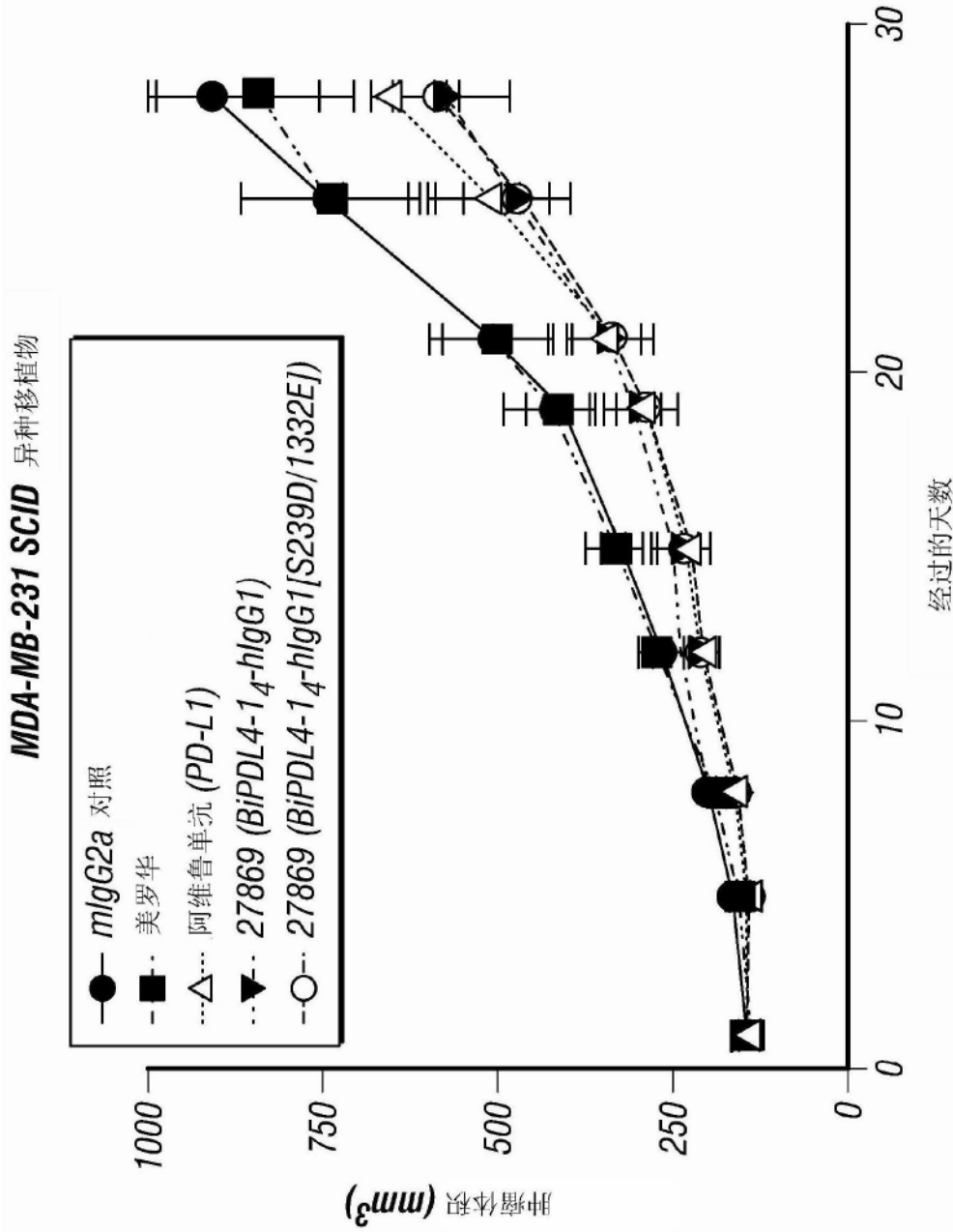


图8B

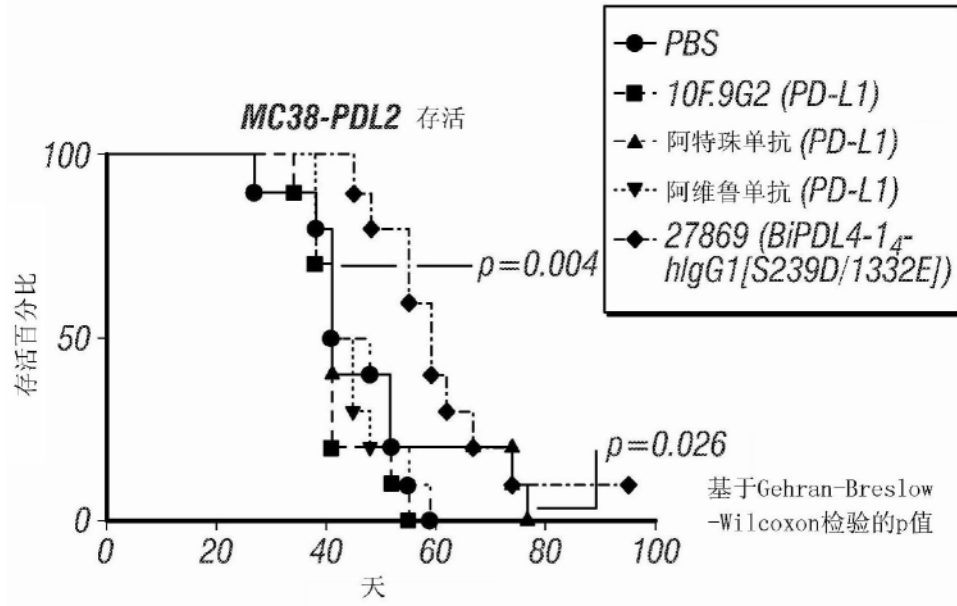


图9A

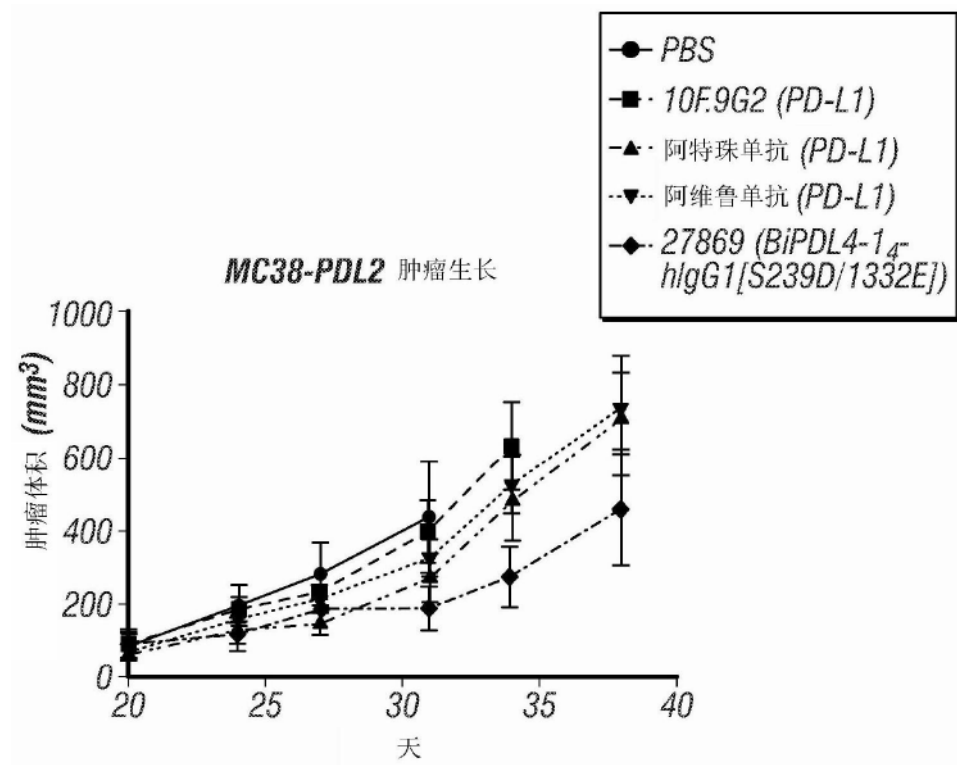


图9B

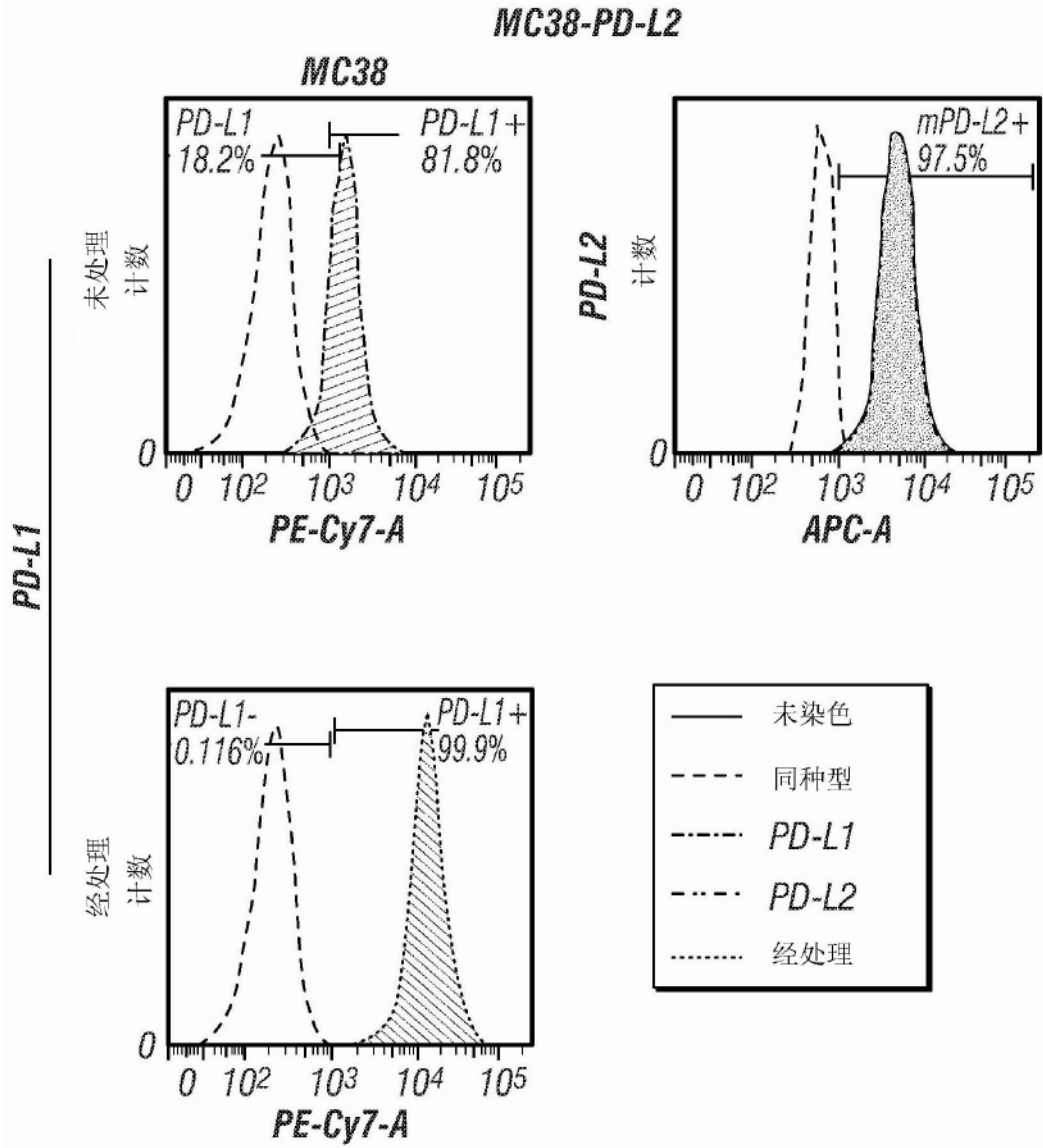


图9C

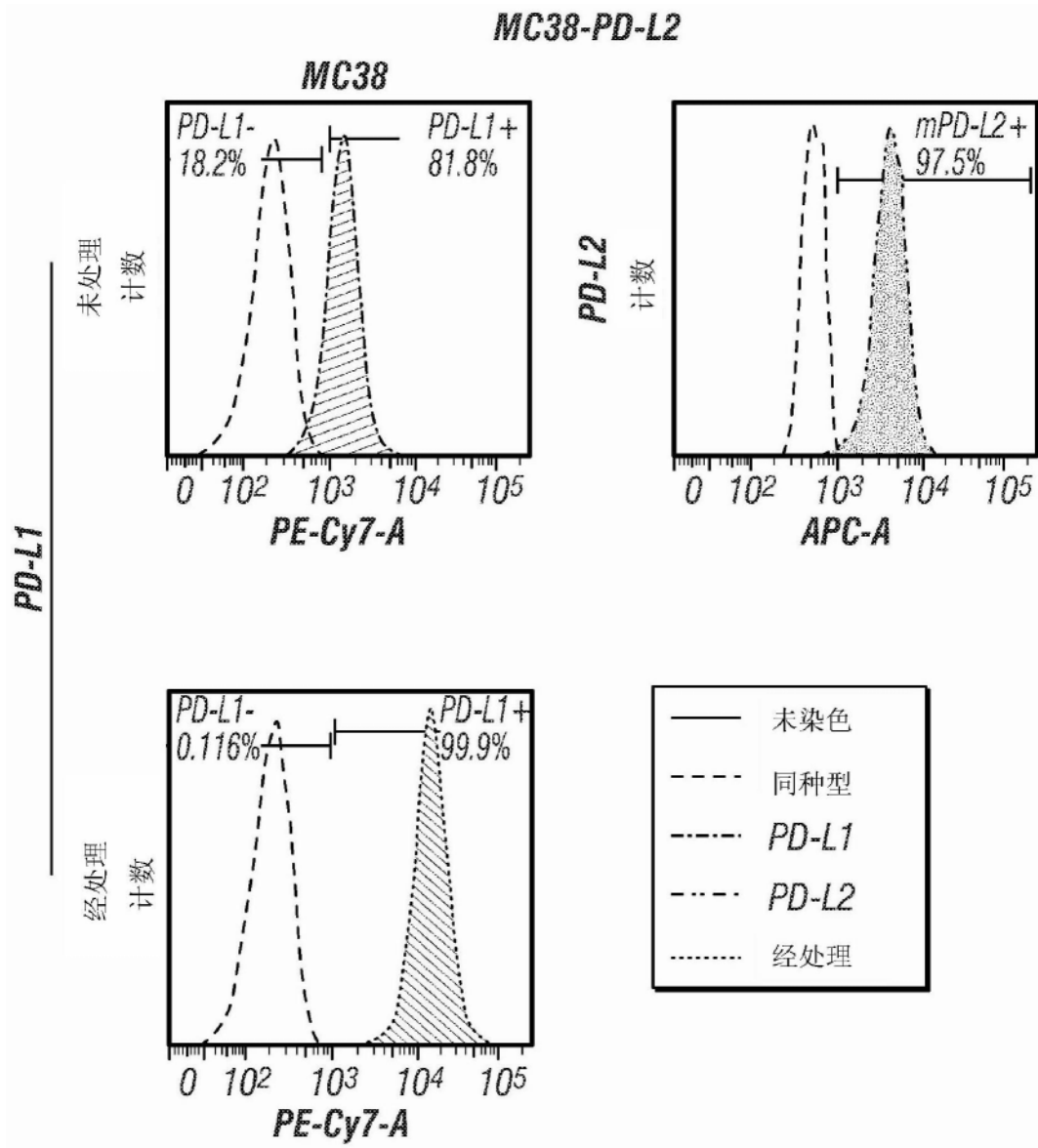


图10A

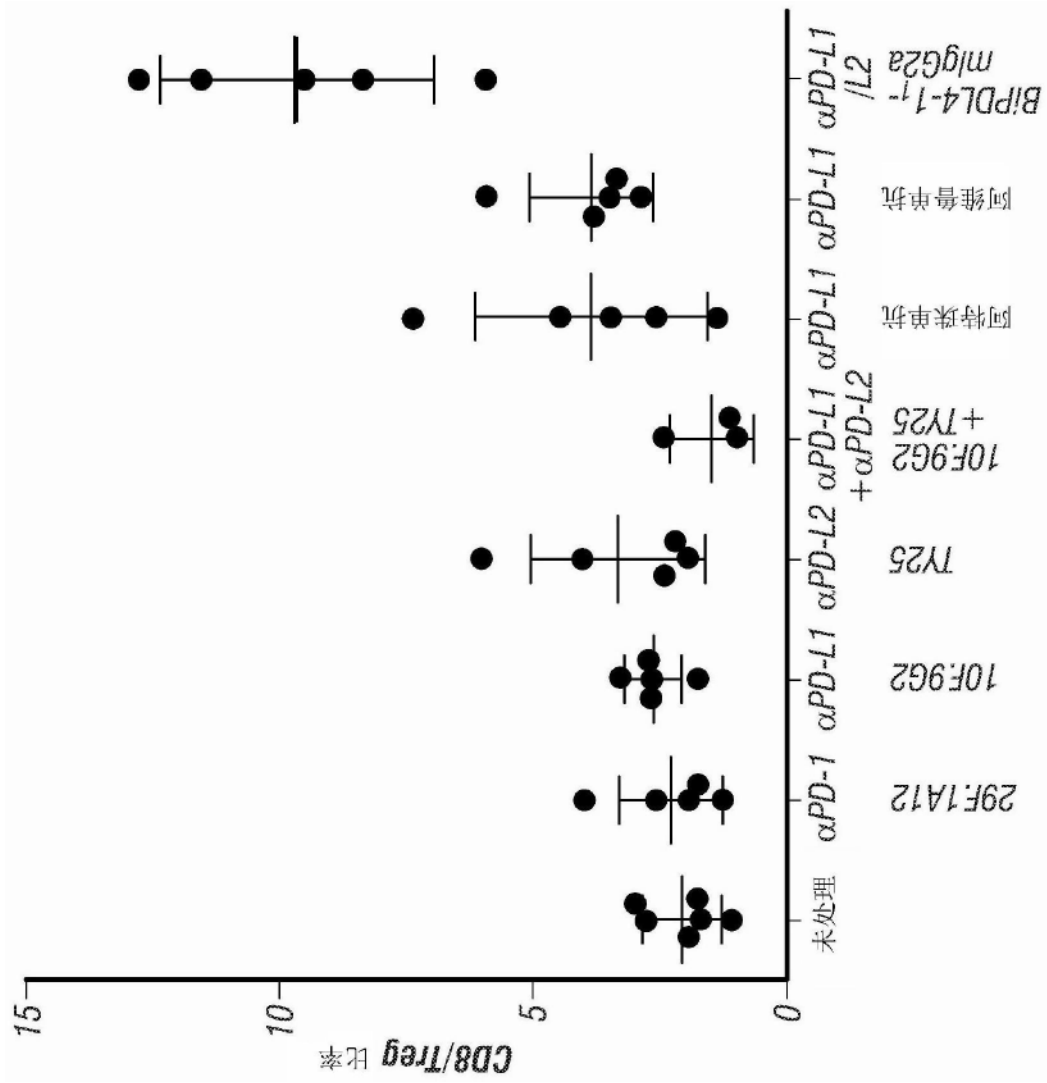


图10B

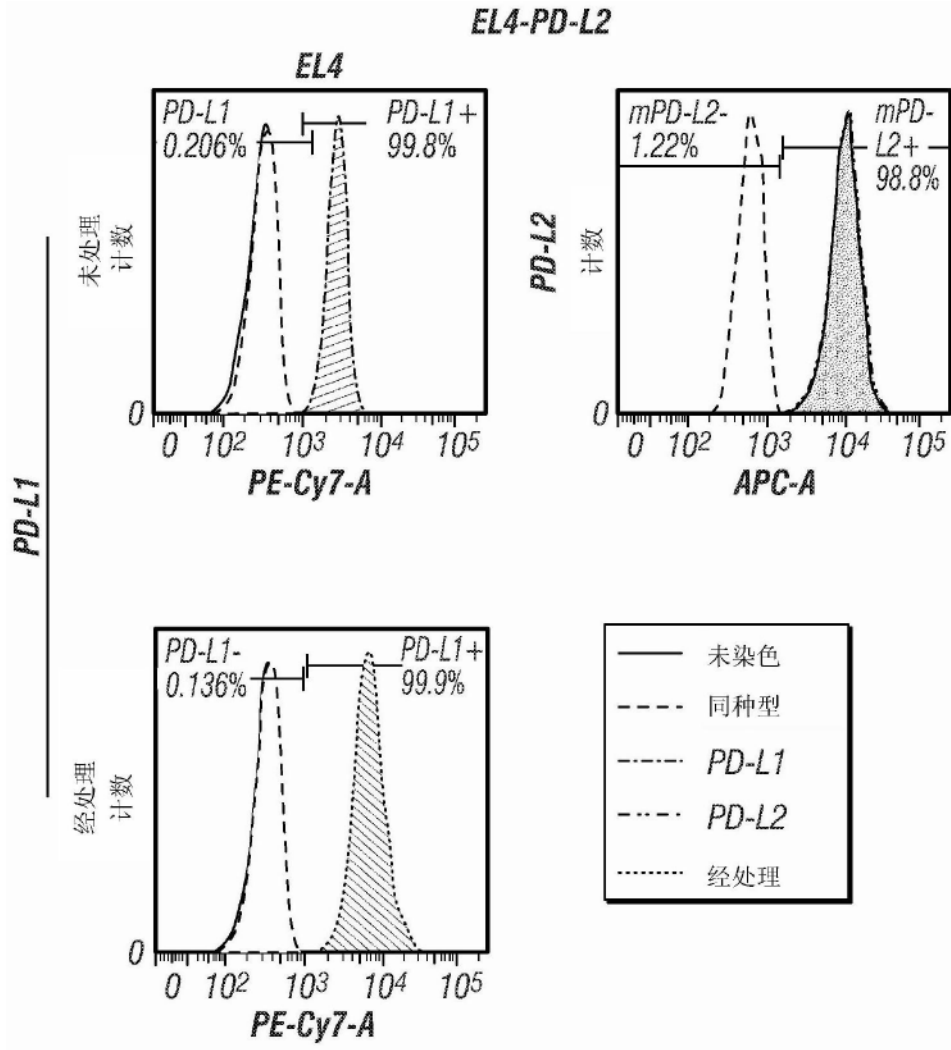


图11A

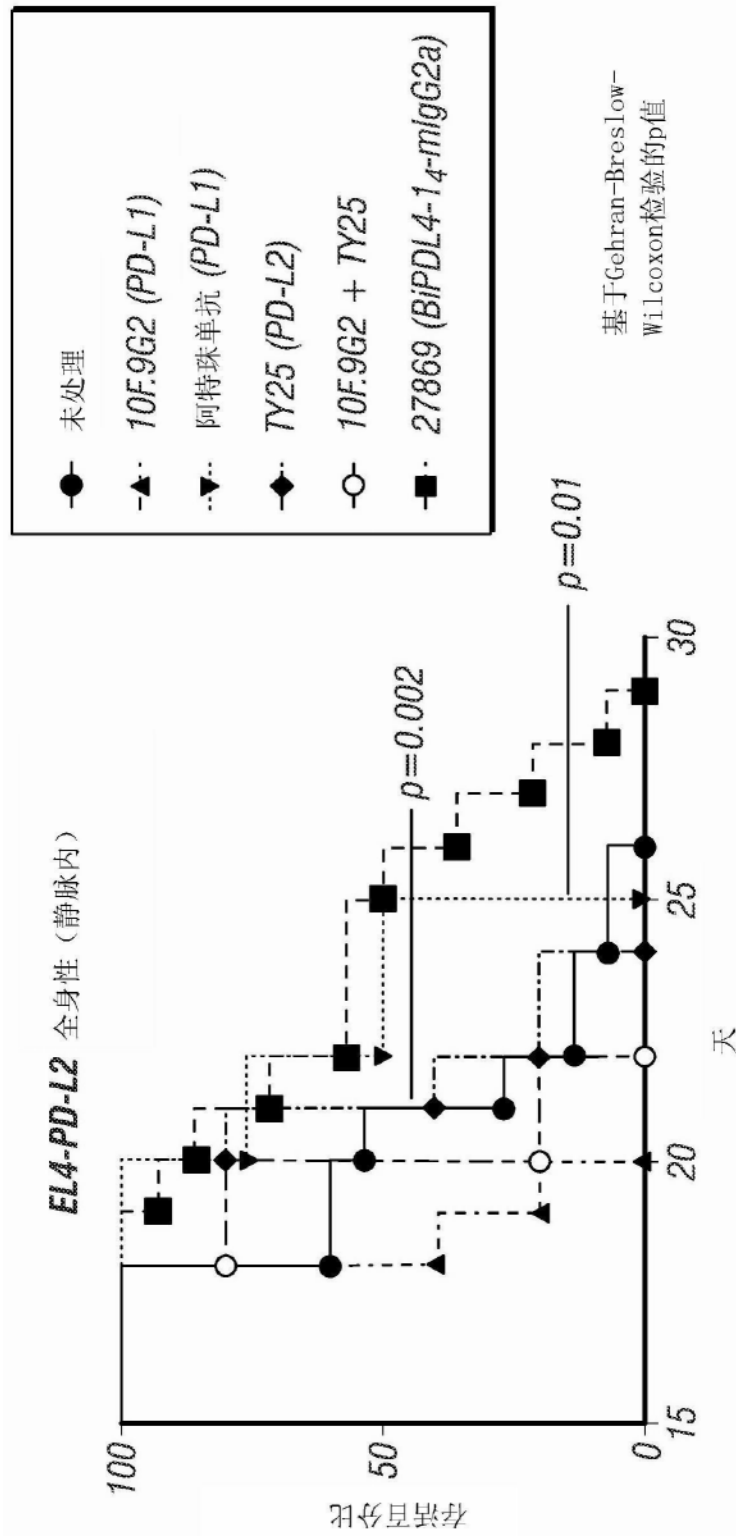


图11B

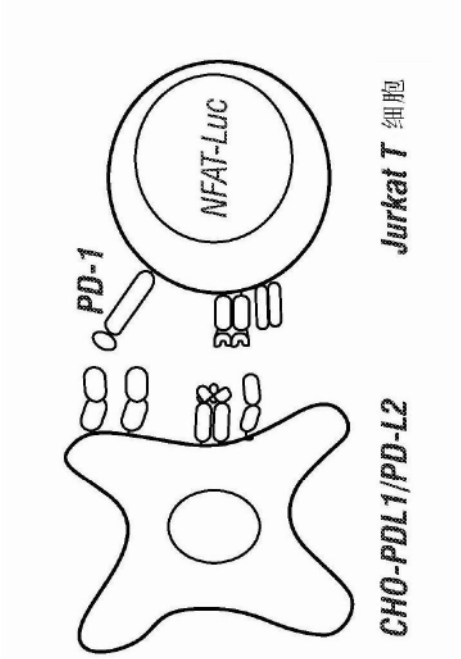
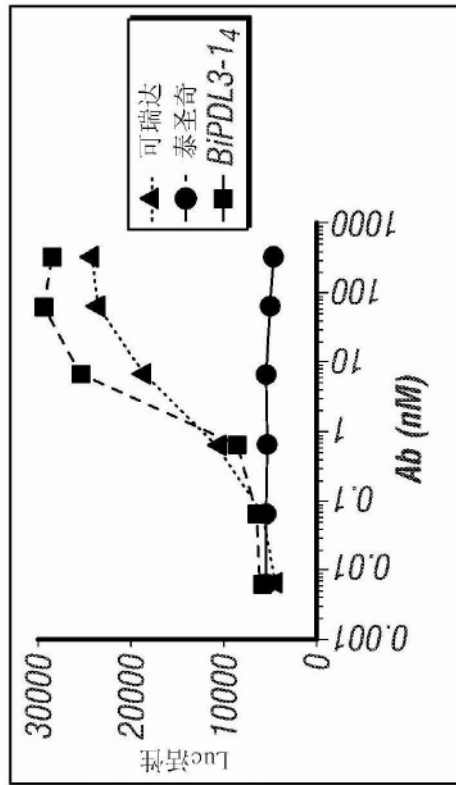


图12



图13

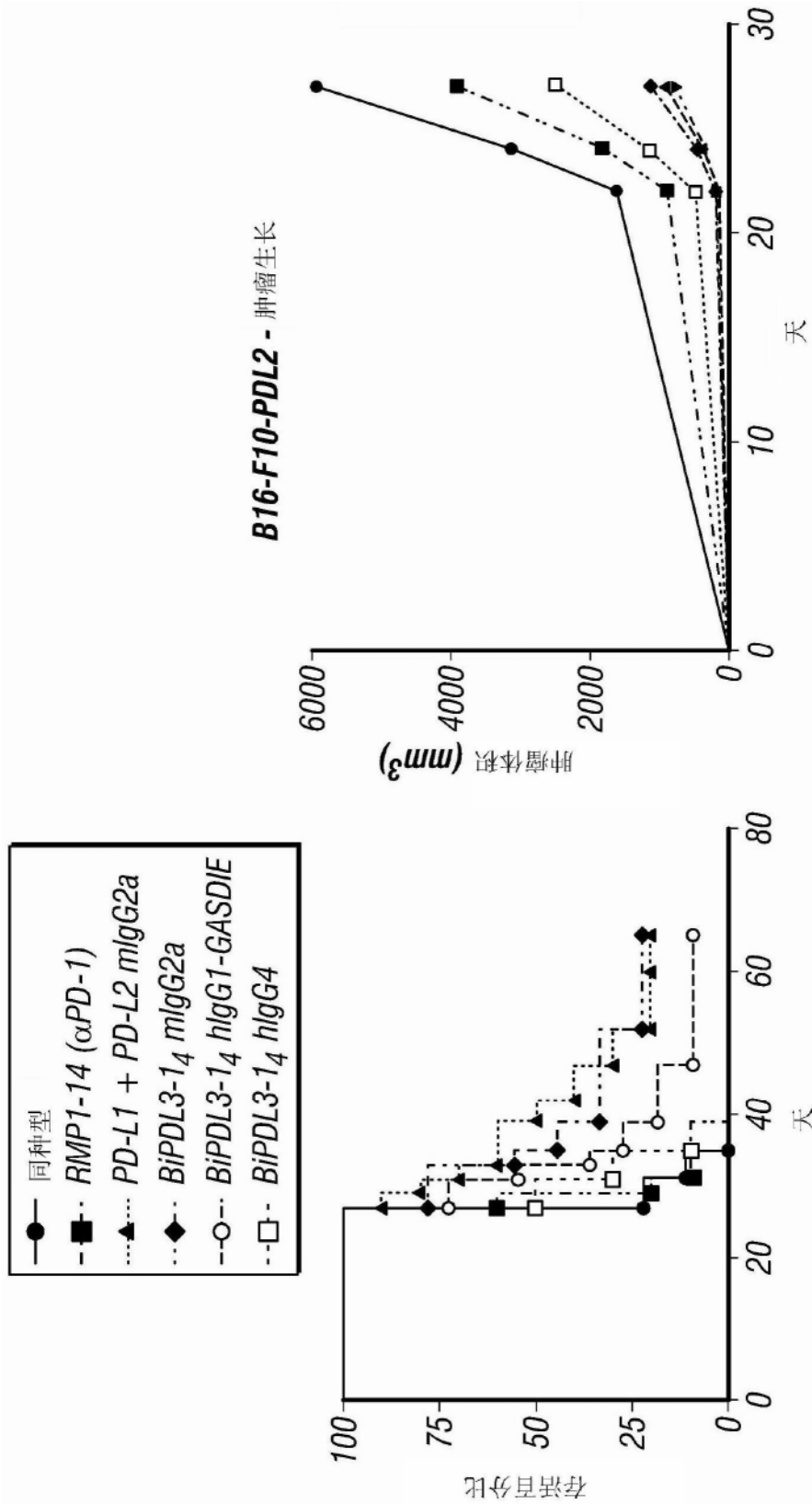


图13(续)