(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 102264762 B
(45)授权公告日 2018.03.27

(21)申请号 200980147059.0

(22)申请日 2009.09.25

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 102264762 A

(43)申请公布日 2011.11.30

(30)优先权数据
61/100,534 2008.09.26 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2011.05.24

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2009/058475 2009.09.25

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2010/036959 EN 2010.04.01

(73)专利权人 达纳-法伯癌症研究公司
地址 美国马萨诸塞州
专利权人 埃默里大学

(72)发明人 G·J·弗里曼 R·艾哈迈德
T·D·琼斯 F·J·卡尔
J·P·格雷格森

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245
代理人 赵蓉民 陆惠中

(51)Int.Cl.
C07K 16/18(2006.01)
A61K 39/395(2006.01)
A61P 31/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

(56)对比文件
US 6495137 B1,2002.12.17,全文.
WO 2006/082406 A2,2006.08.10,对比文件2摘要,实施例.
WO 2008/083174 A2,2008.07.10,实施例1,4,10,24,25,附图11和13.
孙静.鼠抗人PD-L1单克隆抗体的研制及其生物学功能的研究.《苏州大学硕士学位论文》.2006,全文.

审查员 劳芳

权利要求书2页 说明书61页
序列表33页 附图40页

(54)发明名称

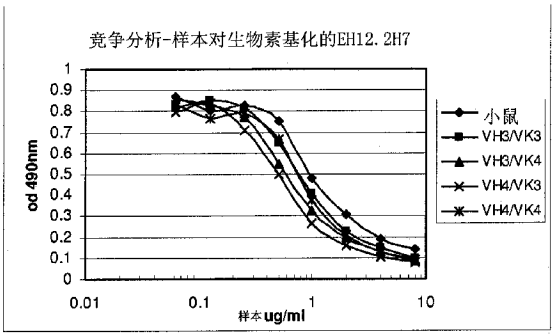
人抗PD-1、PD-L1和PD-L2的抗体及其应用

(57)摘要

本发明部分基于新型人抗PD-1、PD-L1和PD-L2抗体的确定。因此,本发明涉及利用本文所述的新型人抗PD-1、PD-L1和PD-L2抗体诊断、预后和治疗如下病症的组合物和方法:会受益于调节PD-1、PD-L1和/或PD-L2活性的病症(例如,持续性传染病、自身免疫性疾病、哮喘、移植排斥、炎性病症和肿瘤)。

图9 复合型人抗体活性与小鼠参考抗体的比较

(图9A)人PD-1的竞争ELISA:



CN 102264762 B

1.分离的抗体，其中所述分离的抗体包含：

a)选自SEQ ID NOs:34-38的重链可变区序列；和

b)选自SEQ ID NOs:39-42的轻链可变区序列，

其中所述分离的抗体结合具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的PD-L1蛋白。

2.权利要求1所述的分离的抗体，其中所述分离的抗体包含：

a)选自SEQ ID NO:35和37的重链可变区序列；和

b)选自SEQ ID NO:39、40和42的轻链可变区序列。

3.权利要求1所述的分离的抗体，其中所述分离的抗体抑制29E2A3抗体与Fc-PD-L1的结合。

4.权利要求1所述的分离的抗体，其中所述分离的抗体抑制PD-L1介导的信号。

5.权利要求2所述的分离的抗体，其中所述分离的抗体抑制29E2A3抗体与Fc-PD-L1的结合。

6.权利要求2所述的分离的抗体，其中所述分离的抗体抑制PD-L1介导的信号。

7.权利要求1所述的分离的抗体，其中所述抗体是选自Fab、Fab'-SH、Fv、scFv和$F(ab')_2$片段的抗原结合片段。

8.权利要求2所述的分离的抗体，其中所述抗体是选自Fab、Fab'-SH、Fv、scFv和$F(ab')_2$片段的抗原结合片段。

9.分离的核酸，编码权利要求1-8中任一项所述的抗体。

10.载体，包含权利要求9所述的分离的核酸。

11.宿主细胞，包含权利要求9所述的核酸。

12.权利要求11所述的宿主细胞，所述宿主细胞产生由所述核酸编码的抗体。

13.权利要求9所述的核酸在制备非人转基因动物中的用途。

14.药物组合物，包含权利要求1-8中任一项所述的分离的抗体和药学上可接受的载体。

15.权利要求1-8中任一项所述的抗体在制备用于使耗竭的T细胞重新激活的药物中的用途，其中所述使耗竭的T细胞重新激活包括用其有效量的所述抗体接触T细胞群，其中至少一些T细胞表达PD-L1。

16.权利要求15所述的用途，其中所述接触步骤在体外进行。

17.权利要求15所述的用途，其中所述接触步骤先体外后体内进行。

18.权利要求15所述的用途，其中所述接触步骤在体内进行。

19.权利要求1-8中任一项所述的分离的抗体在制备用于治疗遭受持续感染的个体的药物中的用途。

20.权利要求1-8中任一项所述的分离的抗体在制备用于治疗遭受病毒感染的个体的药物中的用途。

21.权利要求20所述的用途，其中所述病毒感染选自巨细胞病毒、EB病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、疱疹病毒、人免疫缺陷病毒、人嗜T淋巴病毒、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒、呼吸道合胞病毒和/或鼻病毒。

22.权利要求1-8中任一项所述的分离的抗体在制备用于治疗遭受细菌感染的个体的药物中的用途。

23.权利要求22所述的用途，其中所述细菌感染选自螺杆菌(Helicobacter)、分枝杆菌(Mycobacterium)、卟啉菌(Porphyromonas)和衣原体(Chlamydia)。

24.权利要求1-8中任一项所述的分离的抗体在制备用于治疗遭受蠕虫感染的个体的药物中的用途。

25.权利要求24所述的用途，其中所述蠕虫选自血吸虫(Schistosoma)和绦虫(Taenia)。

26.权利要求1-8中任一项所述的分离的抗体在制备用于治疗遭受原生动物感染的个体的药物中的用途。

27.权利要求26所述的用途，其中所述原生动物感染选自墨西哥利什曼原虫(Leishmania mexicana)和变形体(Plasmodium)。

28.权利要求1-8中任一项所述的分离的抗体在制备用于治疗患有癌症的个体的药物中的用途。

29.权利要求28所述的用途，其中所述癌症选自实体瘤、血癌、膀胱癌、脑癌、乳腺癌、结肠癌、胃癌、神经胶质瘤、头部癌、肝癌、肺癌、淋巴瘤、骨髓瘤、颈癌、卵巢癌、黑素瘤、胰腺癌、肾癌、唾腺癌、胸腺上皮癌和甲状腺癌。

30.权利要求28所述的用途，其中所述癌症是白血病或胃癌。

31.权利要求1-8中任一项所述的分离的抗体在制备用于治疗患有过表达PD-L1癌症的个体的药物中的用途。

32.权利要求31所述的用途，其中所述分离的抗体诱导抗体介导的细胞毒性。

33.权利要求32所述的用途，其中所述抗体经修饰增加了抗体诱导的细胞毒性。

34.权利要求33所述的用途，其中所述抗体与选自毒素和成像剂的药剂结合。

35.权利要求1-8中任一项所述的分离的抗体在制备用于治疗患有炎性疾病的个体的药物中的用途。

36.权利要求35所述的用途，其中所述炎性疾病选自急性播散性脑脊髓炎、阿狄森病、强直性脊柱炎、抗磷脂抗体综合征、自身免疫性溶血性贫血、自身免疫性肝炎、关节炎、贝切特病、大疱性类天疱疮、腹部疾病、恰加斯病、克罗恩病、皮肌炎、1型糖尿病、肺出血一肾炎综合征、移植物抗宿主病、格雷夫斯病、格-巴二氏综合征、桥本病、超IgE综合征、特发性血小板减少性紫癜、红斑狼疮、多发性硬化症、重症肌无力、天疱疮、恶性贫血、多肌炎、原发性胆汁性肝硬变、银屑病、类风湿关节炎、斯耶格伦综合征、颞动脉炎、血管炎、和韦格纳肉芽肿病。

37.权利要求1-8中任一项所述的分离的抗体在制备用于治疗遭受移植排斥的个体的药物中的用途。

38.权利要求37所述的用途，其中所述移植排斥选自器官排斥、骨髓移植排斥和/或非骨髓清除性骨髓移植排斥。

39.产生权利要求1-8中任一项所述的抗体的方法，包括：培养产生所述抗体的细胞；和收集由所述细胞产生的所述抗体。

人抗PD-1、PD-L1和PD-L2的抗体及其应用

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2008年9月26日提交的美国临时申请号61/100,534的优先权权益，在此引入其全部作为参考。

[0003] 发明背景

[0004] T细胞对外源多肽做出应答，必须由抗原递呈细胞(APC)向静止的T淋巴细胞提供至少两个信号(Jenkins,M.and Schwartz,R.(1987)J.Exp.Med.165:302-319;Mueller,D.L.等.(1990)J.Immunol.144:3701-3709)。第一个信号，其赋予免疫应答特异性，在识别主要组织相容性复合物(MHC)中存在的外源抗原肽后通过T细胞受体(TCR)转导。第二个信号，其被称为共刺激，诱导T细胞增殖并具有功能性(Lenschow等.(1996)Annu.Rev.Immunol.14:233)。共刺激既不具有抗原特异性，也不受MHC限制，并且由APC表达的不同细胞表面分子提供。(Jenkins,M.K.等.(1988)J.Immunol.140:3324-3330;Linsley,P.S.等.(1991)J.Exp.Med 173:721-730;Gimmi,C.D.等.(1991)Proc.Natl.Acad Sci.USA 88:6575-6579;Young,J.W.等.(1992)J.Clin.Invest.90:229-237;Koulova,L.等.(1991)J.Exp.Med.173:759-762;Reiser,H.等.(1992)Proc.Natl.Acad Sci.USA 89:271-275;van-Seventer,G.A.等.(1990)J.Immunol.144:4579-4586;LaSalle,J.M.等.(1991)J.Immunol.147:774-80;Dustin,M.I.等.(1989)J.Exp.Med.169:503;Armitage,R.J.等.(1992)Nature 357:80-82;Liu,Y.等.(1992)J.Exp.Med 175:437-445)。

[0005] 蛋白质B7-1(CD80)和B7-2(CD86)是重要的共刺激分子(Freeman等.(1991)J.Exp.Med.174:625;Freeman等.(1989)J.Immunol.143:2714;Azuma等.(1993)Nature 366:76;Freeman等.(1993)Science 262:909)。B7-2在初级免疫应答中起主要作用，而B7-1，其在免疫应答后期被上调，可能对延长初次T细胞应答或共刺激二次T细胞应答是重要的(Bluestone(1995)Immunity 2:555)。

[0006] CD28是B7-1和B7-2的配体，其被静止的T细胞组成型表达，并且在T细胞激活后表达增加。结合TCR信号的CD28的连接造成共刺激信号转导，该共刺激信号诱导T细胞增殖和分泌IL-2(Linsley,P.S.等.(1991)J.Exp.Med.173:721-730;Gimmi,C.D.等.(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:6575-6579;June,C.H.等.(1990)Immunol.Today 11:211-6;Harding,F.A.等.(1992)Nature 356:607-609)。第二个B7-1和B7-2配体——CTLA4(CD152)，与CD28同源，但不被静止的T细胞表达。CTLA4表达在T细胞激活后发生(Brunet,J.F.等.(1987)Nature 328:267-270)。CTLA4的连接造成阻止T细胞增殖和细胞因子分泌的抑制信号转导。因此，CTLA4是重要的T细胞应答负调控因子(Waterhouse等.(1995)Science 270:985)(Allison and Krummel(1995)Science 270:932)。所发现的CD28家族第三个成员是ICOS(Hutloff等.(1999)Nature 397:263;WO 98/38216)。ICOS通过其配体(ICOS-L)的连接造成高水平的细胞因子表达，但造成有限的T细胞扩张(Riley J.L.等.(2001)J.Immunol.166:4943-48;Aicher A.等.(2000)J.Immunol.164:4689-96;Mages H.W.等.(2000)Eur.J Immunol.30:1040-7;Brodie D.等.(2000)Curr.Biol.10:333-6;Ling V.等.(2000)J.Immunol.164:1653-7;Yoshinaga S.K.等.(1999)Nature 402:827-32)。如果T细

胞在共刺激信号缺失下通过T细胞受体受到刺激，其就变为无应答性、无变应性，或死亡。

[0007] 已在体外和若干体内模型系统中证明B7:CD28/CTLA4/ICOS共刺激途径的重要性。该共刺激途径的阻断造成鼠和人系统的抗原特异耐受性得到发展(Harding,F.A.等.(1992)Nature 356:607 609;Lenschow,D.J.等.(1992)Science 257:789 792;Turka,L.A.等.(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:11102 11105;Gimmi,C.D.等.(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6586 6590;Boussiotis,V.等.(1993)J.Exp.Med.178:1753 1763)。相反，B7阴性鼠肿瘤细胞的B7表达诱导T细胞介导的特异性免疫，该特异性免疫伴随肿瘤排斥和长期持续防止肿瘤侵袭(Chen,L.等.(1992)细胞71:1093 1102;Townsend,S.E.and Allison,J.P.(1993)Science 259:368 370;Baskar,S.等.(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.90:5687 5690.)。因此，共刺激的途径的控制提供巨大的潜力来刺激或抑制人免疫应答。

[0008] B7-1和CD28家族更多成员的发现已经揭示了另外的向T细胞提供共刺激性第二信号和抑制性第二信号的途径。该更新途径其中之一由程序性死亡1(programmed death 1)(PD-1;也被称为CD279)受体及其配体PD-L1(B7-H1;CD274)和PD-L2(B7-DC;CD273)代表。PD-1是CD28/CTLA4家族的成员，其在激活而非静止的T细胞上表达(Nishimura等.(1996)Int.Immunol.8:773)。通过其配体的PD-1连接介导了抑制信号，该抑制信号造成细胞因子的生成减少和T细胞的存活减少(Nishimura等.(1999)Immunity 11:141;Nishimura等.(2001)Science 291:319;Chemnitz等.(2004)J.Immunol.173:945)。

[0009] PD-L1是B7家族成员，其在多种细胞类型上表达，包括APC和激活的T细胞(Yamazaki等.(2002)J.Immunol.169:5538)。PD-L1与PD-1和B7-1结合。通过PD-L1结合T细胞表达的B7-1和通过B7-1结合T细胞表达的PD-L1导致T细胞的抑制(Butte等.(2007)Immunity 27:111)。也有这样的证据：与其他B7家族成员一样，PD-L1也可向T细胞提供共刺激信号(Subudhi等.(2004)J.Clin.Invest.113:694;Tamura等.(2001)Blood 97:1809)。

[0010] PD-L2是在不同APC上表达的B7家族成员，包括树突细胞、巨噬细胞和骨髓源性肥大细胞(Zhong等.(2007)Eur.J.Immunol.37:2405)。APC表达的PD-L2能通过PD-1的连接抑制T细胞激活和通过PD-1独立机制共刺激T细胞激活(Shin等.(2005)J.Exp.Med.201:1531)。此外，树突细胞表达的PD-L2的连接导致树突细胞细胞因子表达和存活提高(Radhakrishnan等.(2003)J.Immunol.37:1827;Nguyen等.(2002)J.Exp.Med.196:1393)。PD-1、PD-L1和PD-L2的结构和表达以及这些分子在调控T细胞激活和耐受性情况中的信号传导特征和功能(例如，治疗效果)在Kier等.(2008)Ann.Rev.Immunol.26:677中得到更详细地评述，在此引入其全部作为参考。对这种和其他共刺激途径的控制为刺激或抑制人免疫应答提供巨大的潜力，并且对用于实现这种控制的组合物和方法存在需要。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明基于与人PD-1、人PD-L1和人PD-L2特异性结合的新型复合型人单克隆抗体的产生和分离、以及这种新型抗体的表征及其治疗多种由PD-1、PD-L1和/或PD-L2介导的病症的治疗价值的证明。用于人源化鼠抗体的常用技术通常生成这样的人源化抗体：相比原鼠抗体具有降低的抗原结合亲和力(Almagro and Fransson(2008)Frontiers in Bioscience 13:1619-1633;Foote and Winter(1992)J.Mol.Biol.224:487-499;Hwang等.(2005)Methods 36:35-42)。惊奇的是，本发明的复合型人抗体(composite,human

antibody)已经显示出以非常接近鼠抗体的亲和力结合PD-1、PD-L1或PD-L2。此外，常规的人源化技术生成保留一些鼠序列的人源化抗体。因此，这种抗体在被给予人类时可保留免疫原性。例如，人源化抗体CAMPATH®在约50％患者中诱发出免疫原性。另一方面，本发明的复合型人抗体完全得自人源序列。因此，其可能具有显著降低的免疫原性，并且在被给予人类患者时比其他抗人PD-1、PD-L1和/或PD-L2抗体在治疗上更有效和更有用。因此，本发明的复合型人抗体为治疗和预防由PD-1、PD-L1和/或PD-L2介导的疾病提供了改善的方法，部分归因于其独特的特异性、亲和力、结构、功能活性及其得自人抗体序列的事实。本发明也基于新治疗应用的发现，包括通过给予本文所述的复合型人抗体，治疗持续性传染病、哮喘、炎性疾病和癌症。

[0013] 本发明的一个实施方式是如下分离的抗体或其抗原结合片段：其结合PD-1蛋白质、PD-L1蛋白质或PD-L2蛋白质(如人PD-1、PD-L1或PD-L2蛋白质)，其中分离的抗体或其抗原结合片段是嵌合的、人源化的、复合的、人或人的，并且含有一个、两个、三个、四个、五个或六个选自SEQ ID NO:7-24的CDR序列。

[0014] 本发明也提供如下分离的抗体或其抗原结合片段：其结合PD-1蛋白质(如包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的PD-1蛋白质)，其中分离的抗体或其抗原结合片段是嵌合的、人源化的、复合的、人或人的，并且含有包含SEQ ID NO:7-9(SEQ ID NO:7的CDR1序列、SEQ ID NO:8的CDR2序列和SEQ ID NO:9的CDR3序列)的重链可变区序列和/或包含SEQ ID NO:10-12(SEQ ID NO:10的CDR1序列、SEQ ID NO:11的CDR2序列和SEQ ID NO:12的CDR3序列)的轻链可变区序列。

[0015] 本发明也提供如下分离的抗体或其抗原结合片段：其结合PD-L1蛋白质(如，包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的PD-L1蛋白质)，其中分离的抗体或其抗原结合片段是嵌合的、人源化的、复合的、人或人的，并且含有包含SEQ ID NO:13-15(SEQ ID NO:13的CDR1序列、SEQ ID NO:14的CDR2序列和SEQ ID NO:15的CDR3序列)的重链可变区序列和/或包含SEQ ID NO:16-18(SEQ ID NO:16的CDR1序列、SEQ ID NO:17的CDR2序列和SEQ ID NO:18的CDR3序列)的轻链可变区序列。

[0016] 本发明也提供如下分离的抗体或其抗原结合片段：其结合PD-L2蛋白质(如，包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的PD-L2蛋白质)，其中分离的抗体或其抗原结合片段是嵌合的、人源化的、复合的、人或人的，并且含有包含SEQ ID NO:19-21(SEQ ID NO:19的CDR1序列、SEQ ID NO:20的CDR2序列和SEQ ID NO:21的CDR3序列)的重链可变区序列和/或包含SEQ ID NO:22-24(SEQ ID NO:22的CDR1序列、SEQ ID NO:23的CDR2序列和SEQ ID NO:24的CDR3序列)的轻链可变区序列。

[0017] 本发明也包括如下分离的抗体或其抗原结合片段：其结合PD-1蛋白质、PD-L1蛋白质或PD-L2蛋白质(如，人PD-1、PD-L1或PD-L2蛋白质)，其中分离的抗体或其抗原结合片段是嵌合的、人源化的、复合的、和/或人的，并且含有选自SEQ ID NO:25-29、34-38或43-47的重链序列、或者与SEQ ID NO:25-29、34-38或43-47具有至少约95％、96％、97％、98％、99％、99.5％、99.9％或以上相同同源性的序列；和/或选自SEQ ID NO:30-33、39-42或48-51的轻链序列、或者与SEQ ID NO:30-33、39-42或48-51具有至少约95％、96％、97％、98％、99％、99.5％、99.9％或以上相同同源性的序列。

[0018] 本发明也提供如下分离的抗体或其抗原结合片段：其结合包含SEQ ID NO:2的氨

基酸序列的PD-1蛋白质，其中分离的抗体或其抗原结合片段是嵌合的、人源化的、复合的或人的，并且含有选自SEQ ID NO:25-29的重链序列、或者与SEQ ID NO:25-29具有至少约95％、96％、97％、98％、99％、99.5％、99.9％或以上同一性或同源性的序列；和/或选自SEQ ID NO:30-33的轻链序列、或者与SEQ ID NO:30-33具有至少约95％、96％、97％、98％、99％、99.5％、99.9％或以上同一性或同源性的序列。例如，抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:27或28的重链可变区序列和SEQ ID NO:32或33的轻链可变区序列。在一些实施方式中，抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:28的重链可变区序列和SEQ ID NO:32的轻链可变区序列。

[0019] 本发明也提供如下分离的抗体或其抗原结合片段：其结合包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的PD-L1蛋白质，其中分离的抗体或其抗原结合片段是嵌合的、人源化的、复合的或人的，并且含有选自SEQ ID NO:34-38的重链序列、或者与SEQ ID NO:34-38具有至少约95％、96％、97％、98％、99％、99.5％、99.9％或以上同一性或同源性的序列；和/或选自SEQ ID NO:39-42的轻链序列、或者与SEQ ID NO:39-42具有至少约95％、96％、97％、98％、99％、99.5％、99.9％或以上同一性或同源性的序列。例如，抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:35或37的重链可变区序列和SEQ ID NO:39、40或42的轻链可变区序列。在一些实施方式中，抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:35的重链可变区序列和SEQ ID NO:42的轻链可变区序列。

[0020] 本发明也提供如下分离的抗体或其抗原结合片段：其结合包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的PD-L2蛋白质，其中分离的抗体或其抗原结合片段是嵌合的、人源化的、复合的或人的，并且含有选自SEQ ID NO:43-47的重链序列、或者与SEQ ID NO:43-47具有至少约95％、96％、97％、98％、99％、99.5％、99.9％或以上同一性或同源性的序列；和/或选自SEQ ID NO:48-51的轻链序列、或者与SEQ ID NO:48-51具有至少约95％、96％、97％、98％、99％、99.5％、99.9％或以上同一性或同源性的序列。例如，抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:44或46的重链可变区序列和SEQ ID NO:49、50或51的轻链可变区序列。在一些实施方式中，抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:46的重链可变区序列和SEQ ID NO:51的轻链可变区序列。

[0021] 本发明的另一个实施方式是本文所述的如下分离的抗体或其抗原结合片段：其结合PD-1蛋白质，其中分离的抗体在竞争ELISA分析中抑制生物素化的EH12.2H7抗体与Fc-PD-1的结合。另一个实施方式是本文所述的如下分离的抗体或其抗原结合片段：其结合PD-L1蛋白质，其中分离的抗体在竞争ELISA分析中抑制生物素化的29E2A3抗体与Fc-PD-L1的结合。另一个实施方式是本文所述的如下分离的抗体或其抗原结合片段：其结合PD-L2蛋白质，其中分离的抗体在竞争ELISA分析中抑制生物素化的24F.10C12抗体与Fc-PD-L2的结合。

[0022] 本发明的另一个实施方式是本文所述的如下分离的抗体或其抗原结合片段：其结合PD-1蛋白质，其中分离的抗体抑制PD-1介导的信号。另一个实施方式是本文所述的如下分离的抗体或其抗原结合片段：其结合PD-L1蛋白质，其中分离的抗体抑制PD-L1介导的信号。另一个实施方式是本文所述的如下分离的抗体或其抗原结合片段：其结合PD-L2蛋白质，其中分离的抗体抑制PD-L2介导的信号。

[0023] 特别地，本发明的实施方式是编码多肽的分离的核酸，其中多肽包含选自SEQ ID

NO:25-51的序列、或者与SEQ ID NO:25-51具有至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或以上同一性或同源性的序列。另一个实施方式是包含这些核酸中一个或多个的载体、宿主细胞或动物。另一方面是在严格的条件下与下述核酸的互补序列(complement)杂交的核酸:所述核酸编码选自SEQ ID NO:25-51的多肽或与SEQ ID NO:25-51具有至少约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或以上相同同源性的序列。

[0024] 本发明也提供编码本文所述抗体或其抗原结合片段中任一个的重链可变区和/或轻链可变区的分离的核酸。在一些实施方式中,核酸在载体——如,表达载体——中。本发明也提供宿主细胞,其含有一种或多种编码本文所述抗体或抗原结合片段的重链和/或轻链的核酸。在一些实施方式中,宿主细胞产生抗体或抗原结合片段。本发明也提供产生本文所述抗体或抗原结合片段的方法,包括培养产生抗体或抗原结合片段的细胞和从细胞培养物中回收抗体或抗原结合片段。

[0025] 本发明进一步包括药物组合物,包含本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段以及药学上可接受的载体。

[0026] 本发明包括使耗竭的T细胞重新激活的方法,包括用本文所述的抗体或其抗原结合片段在体外、离体或或体内接触T细胞群——其中至少一些细胞表达PD-、PD-L1和/或PD-L2。

[0027] 本发明进一步涉及治疗遭受持续感染——包括病毒感染、细菌感染、蠕虫感染或原生动物感染——的个体的方法,包括向个体给予包含有效量本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段的组合物。

[0028] 本发明进一步包括治疗癌症的方法,包括向个体给予包含有效量本文所述的分离的抗体或其抗原结合片段的组合物,包括其中分离的抗体诱导出抗体介导的细胞毒性,或经修饰诱导出抗体介导的细胞毒性,或与选自毒素和成像剂的药剂(试剂)结合。在一些实施方式中,与PD-L1结合的抗体或抗原结合片段被给予患有过表达PD-L1癌症的个体。在一些实施方式中,与PD-L2结合的抗体或抗原结合片段被给与患有过表达PD-L2癌症的个体。

[0029] 本发明进一步涉及治疗遭受哮喘的个体的方法,包括向个体给予组合物,该组合物包含有效量本文所述的结合PD-L2蛋白质的分离的抗体或其抗原结合片段。

[0030] 本发明也包括治疗遭受炎性疾病或移植排斥的个体的方法,包括向个体给予组合物,该组合物包含有效量本文所述的结合PD-L1蛋白质或PD-L2蛋白质的分离的抗体或其抗原结合片段。

[0031] 本发明也包括用于本文所述方法的任一个中的本文所述的抗体、抗原结合片段或多肽。本发明也包括本文所述的抗体、抗原结合片段或多肽对于药物——如用于治疗个体中的本文所述疾病中任一种疾病的药物——制造的应用。

[0032] 附图简述

[0033] 图1显示本发明所述用于克隆组装的人免疫球蛋白序列的表达载体的示意图。

[0034] 图2A-2E显示复合型人重链(图2A,VH1;图2B,VH2;图2C,VH3;和图2D,VH4;图2E,VH5)可变区序列,其被设计为相应于鼠抗人PD-1抗体EH12.2H7的重链可变区序列。

[0035] 图3A-3D显示复合型人轻链(图3A,Vκ1;图3B,Vκ2;图3C,Vκ3;图3D,Vκ4)可变区序列,其被设计为相应于鼠抗人PD-1抗体EH12.2H7的轻链可变区序列。

[0036] 图4A-4E显示复合型人重链(图4A,VH1;图4B,VH2;图4C,VH3;图4D,VH4;图4E,VH5)可变区序列,其被设计为相应于鼠抗人PD-L1抗体29E.2A3的重链可变区序列。

[0037] 图5A-5D显示复合型人轻链(图5A,Vκ1;图5B,Vκ2;图5C,Vκ3;图5D,Vκ4)可变区序列,其被设计为相应于鼠抗人PD-L1抗体29E.2A3的轻链可变区序列。

[0038] 图6A-6E显示复合型人重链(图6A,VH1;图6B,VH2;图6C,VH3;图6D,VH4;图6E,VH5)可变区序列,其被设计为相应于鼠抗人PD-L2抗体24F.10C12的重链可变区序列。

[0039] 图7A-7D显示复合型人轻链(图7A,Vκ1;图7B,Vκ2;图7C,Vκ3;图7D,Vκ4)可变区序列,其被设计为相应于鼠抗人PD-L2抗体24F.10C12的轻链可变区序列。

[0040] 图8A-8C显示分别相应于鼠抗人抗体EH12.2H7、29E.2A3、和24F.10C12的1μg复合型人抗体的SDS-PAGE结果。

[0041] 图9A-9C显示分别相应于和相对于鼠抗人抗体EH12.2H7、29E.2A3和24F.10C12的人抗体的ELISA竞争结果。在图9A中,通过竞争ELISA检验纯化的抗体与人PD-1的结合。将不同浓度的各个抗体(0.06μg/ml至8μg/ml)与固定浓度的生物素化的EH12.2H7(40ng/ml)混合,并结合于PD-1涂布的immulon maxisorb板。通过链霉抗生物素蛋白-HRP和OPD底物检测结合。在板读数仪(plate reader)上测量490nm下的吸光度,并将其相对于检验抗体浓度作图。在图9B中,通过竞争ELISA检验纯化的抗体与人PD-L1的结合。将不同浓度的各个抗体(0.02μg/ml至8μg/ml)与固定浓度的生物素化的29E.2A3(40ng/ml)混合,并结合于PD-L1涂布的immulon maxisorb板。通过链霉抗生物素蛋白-HRP和OPD底物检测结合。在板读数仪上测量490nm下的吸光度,并将其相对于检验抗体浓度作图。在图9C中,通过竞争ELISA检验纯化的抗体与人PD-L2的结合。将不同浓度的各个抗体(0.02μg/ml至8μg/ml)与固定浓度的生物素化的24F.10C12(40ng/ml)混合,并结合于PD-L2涂层的immulon maxisorb板。通过链霉抗生物素蛋白-HRP和OPD底物检测结合。在板读数仪上测量490nm下的吸光度,并将其相对于检验抗体浓度作图。

[0042] 图10A-10C显示由复合型人抗体的ELISA竞争分析产生的IC_{50}结合数据,该复合型人抗体根据分别被设计为相应于鼠抗人抗体EH12.2H7(图10A)、29E.2A3(图10B)和24F.10C12(图10C)的那些重链和轻链的复合型人重链和轻链的不同组合而形成。该分析如图3所示进行。重链和轻链的每一种组合的IC_{50}相对于鼠抗体的IC_{50}标准化。ND=无数据。

[0043] 图11显示PD-1、PD-L1和PD-L2的氨基酸序列。

[0044] 图12显示本文所述复合型人抗体其中一些的CDR区的氨基酸序列。

[0045] 图13显示本文所述复合型人抗体其中一些的可变区的氨基酸序列。

[0046] 图14A和14B显示在体外人源化抗PD-1抗体和人源化抗PD-L1抗体对SIV Gag特异性CD8 T细胞的增殖能力的影响。每一个标记表示一个猕猴。括号中的数表示在阻断Ab存在下相对于无阻断Ab时的增殖增加倍数。

[0047] 图15显示PD-L1的阻断使肝内CD8 T细胞抗原驱动的增殖恢复(代表性数据来自动物1564)。

[0048] 发明详述

[0049] 本发明提供了基于新型抗体的用于治疗和诊断多种由PD-1、PD-L1和/或PD-L2介导的疾病的治疗剂(例如,持续性传染病、哮喘、炎性疾病、移植排斥和癌症的治疗)。

[0050] 为了使本发明更易于理解,首先定义某些术语。另外的定义在通篇细述中提出。

[0051] 如本文所用，除非另外明确定义，术语“PD-1”、“PD-L1”和“PD-L2”包括由细胞自然表达的任何变体或同种型和/或其片段，该片段具有全长多肽的至少一种生物活性。此外，术语“PD-1配体”包括PD-L1(Freeman等.(2000)J.Exp.Med.192:1027)和PD-L2(Latchman等.(2001)Nat.Immunol.2:261)其中一种或二者以及由细胞自然表达的任何变体或同种型和/或其片段，该片段具有全长多肽的至少一种生物活性。例如，来自不同物种——包括人——的PD-1、PD-L1和PD-L2序列在本领域中被公知(参见，例如，在此引入其全部作为参考，Honjo等，美国专利号5,629,204，其公开了人和小鼠PD-1序列；Wood等，美国专利7,105,328，其公开了人PD-1序列；Chen等，美国专利6,803,192，其公开了人和小鼠PD-L1序列；Wood等，美国专利7,105,328，其公开了人PD-L1序列；Freeman等，美国专利公开20020164600，其公开了人和小鼠PD-L2序列)。

[0052] 如本文所用，术语“抗体”包括整个抗体及其任意抗原结合片段(即，“抗原结合部分”)或单链。“抗体”指包含由二硫键相互连接的至少两条重(H)链和两条轻(L)链的糖蛋白或其抗原结合部分。各重链由重链可变区(本文中简称为V_H)和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域CH1、CH2和CH3组成。各轻链由轻链可变区(本文中简称为V_L)和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域CL组成。V_H区和V_L区可被进一步细分为高变区，称为互补决定区(CDR)，与较保守区穿插，该较保守区被称为框架区(FR)。各V_H和V_L由三个CDR和四个FR组成，从氨基末端向羧基末端以下列顺序排列：FR1，CDR1，FR2，CDR2，FR3，CDR3，FR4。重链和轻链的可变区包含与抗原相互作用的结合结构域。“失活抗体”指不诱导补体系统的抗体。

[0053] 术语“高变区”、“HVR”或“HV”在本文中使用时指抗体可变结构域的区域，该区域的序列高变和/或形成结构上限定的环。一般，抗体包含六个HVR；三个在VH(H1、H2、H3)中和三个在VL(L1、L2、L3)中。在天然抗体中，H3和L3在六个HVR中显示最具多样性，尤其认为H3在赋予抗体细微特异性中具有独一无二的作用。参见，例如，Xu等，Immunity 13:37-45(2000)；Johnson and Wu in Methods in Molecular Biology 248:1-25(Lo,ed.,Human Press,Totowa,NJ,2003)。事实上，天然存在的仅由重链组成的骆驼(camelid)抗体在轻链的缺失下具有功能性和稳定性。参见，例如，Hamers-Casterman等，Nature 363:446-448(1993)和Sheriff等，Nature Struct.Biol.3:733-736(1996)。

[0054] 本文应用和包括大量高变区描述。Kabat互补决定区(CDR)基于序列可变性，并且最常用(Kabat等，Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.(1991))。Chothia相反指结构环的位置(Chothia and Lesk J.Mol.Biol.196:901-917(1987))。Chothia CDR-H1环的末端在利用Kabat编号规则编号时取决于环长在H32和H34(参见以下)之间变化(这是因为Kabat编号方案着点于在H35A和H35B的插入；如果35A和35B均不存在，环在32结束；如果仅35A存在，环在33结束；如果35A和35B均存在，环在34结束)。AbM高变区表示Kabat CDR和Chothia结构环之间的折中，并且通过Oxford Molecular's AbM抗体模拟软件应用。“Contact”高变区基于可用复杂晶体结构的分析。这些高变区中每一个的残基记录在下。

环	Kabat	AbM	Chothia	Contact
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32, 33 或 34	H30-H35B (Kabat 编号)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (Chothia 编号)
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102	H93-H101

[0055]

[0056] 高变区可包含如下“延伸高变区”：VL中的24-36或24-34(L1)、46-56或50-56(L2)和89-97(L3)和VH中的26-35B(H1)、50-65、47-65或49-65(H2)和93-102、94-102或95-102(H3)。这些延伸高变区是Kabat和Chothia定义的典型组合，其可任选地进一步包含利用Contact定义鉴定的残基。对这些定义中的每一个，根据上述Kabat等，将可变结构域残基编号。

[0057] “框架”或“FR”残基是除本文所定义的HVR残基外的那些可变结构域残基。

[0058] 表达“如Kabat中的的可变结构域残基编号”或“如Kabat中的氨基酸位置编号”及其变体指上述Kabat等中的用于抗体编译中重链可变结构域或轻链可变结构域的编号系统。利用该编号系统，实际的线性氨基酸序列相应于可变结构域的FR或HVR缩短或插入可包含较少的氨基酸或另外的氨基酸。例如，重链可变结构域可在H2的残基52后包含一个插入氨基酸(根据Kabat的残基52a)，可在重链FR残基82后包含插入的残基(例如，根据Kabat的残基82a、82b和82c等)。通过将抗体序列的同源区与“标准”Kabat编号序列比对可确定给定抗体的Kabat残基编号。

[0059] 本文中术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的C端区域，包括天然序列Fc区和变种Fc区。虽然免疫球蛋白重链的Fc区的边界可以发生改变，但通常限定人IgG重链Fc区从Cys226或从Pro230位的氨基酸残基延伸至其羧基末端。Fc区的C端赖氨酸(根据EU编号系统的残基447)可被去除，例如，在抗体生成或纯化过程中，或通过重组地改造编码抗体重链的核酸。因此，完整抗体的组成可包含全部K447残基被去除的抗体群、无K447残基被去除的抗体群、和具有含K447残基和无K447残基的抗体混合物的抗体群。用于本发明所述抗体的适当的天然序列Fc区包括人IgG1、IgG2(IgG2A、IgG2B)、IgG3和IgG4。

[0060] “Fc受体”或“FcR”描述了结合抗体Fc区的受体。优选的FcR是天然序列人FcR。此外，优选的FcR是结合IgG抗体的FcR(γ受体)，并且包括FcγRI、FcγRII和FcγRIII亚类的受体，包括等位基因变体和这些受体可选的剪接形式。FcγRII受体包括FcγRIIA(“激活受体”)和FcγRIIB(“抑制受体”)，其具有主要在其细胞质结构域不同的相似氨基酸序列。激活受体FcγRIIA在其细胞质结构域中包含免疫受体酪氨酸基激活基序(ITAM)。抑制受体FcγRIIB在其细胞质结构域中包含免疫受体酪氨酸基抑制基序(ITIM)。(参见M. **Daëron,** Annu.Rev.Immunol.15:203-234(1997))。FcR在Ravetch和Kinet，Annu.Rev.Immunol.9:457-92(1991)；Capel等，Immunomethods 4:25-34(1994)；和de Haas等，J.Lab.Clin.Med.126:330-41(1995)中得到评述。其他FcR，包括未来将鉴定的FcR，也被本

文中的术语“FcR”包含在内。

[0061] 术语“CDR”及其复数“CDRs”指互补决定区(CDR),其中三个构成轻链可变区的结合特征(CDRL1、CDRL2和CDRL3),三个构成重链可变区的结合特征(CDRH1、CDRH2和CDRH3)。CDRs有助于抗体分子的功能活性,并被包含支架区或框架区的氨基酸序列分开。确切的限定CDR边界和长度经受不同的分类和编号系统。CDRs由此可被Kabat、Chothia、contact或任何其他边界定义——包括本文所述的编号系统——指代。尽管边界不同,这些系统中的每一个于可变序列内在所谓“高变区”的构成中具有一定程度的重叠。根据这些系统的CDR定义由此关于相邻框架区在长度和边界区域上可不同。参见,例如Kabat、Chothia,和/或MacCallum等(Kabat等,于“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”5th Edition,U.S.Department of Health and Human Services,1992;Chothia等,J.Mol.Biol.,1987,196:901;和MacCallum等,J.Mol.Biol.,1996,262:732,在此引入其每一个全部作为参考)。

[0062] 如本文所用,术语抗体的“抗原结合部分”(或简化为“抗体部分”)指保留特异性结合抗原(例如,PD-1、PD-L1和/或PD-L2)的能力的抗体的一个或多个片段。已显示抗体的抗原结合功能可由全长抗体的片段进行。包含在术语抗体的“抗原结合部分”内的结合片段实例包括(i)Fab片段,由V_H、V_L、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii)$F(ab')_2$片段,包含由二硫桥在绞链区连接的两个Fab片段的二价片段;(iii)Fd片段,由V_H和CH1结构域组成;(iv)Fv片段,由抗体单臂的V_H和V_L结构域组成;(v)dAb片段(Ward等,(1989)Nature 341:544546),其由V_H结构域组成;和(vi)分离的互补决定区(CDR)或(vii)两个或更多个分离的CDRs的组合,其可任选地通过合成的连接体连接。此外,虽然Fv片段的两个结构域V_H和V_L被单独的基因编码,但可利用重组方法将其通过合成的连接体连接,该合成的连接体使其能形成单个的蛋白质链,其中V_H和V_L区配对形成单价分子(被称为单链Fv(scFv));参见,例如,Bird等.(1988)Science 242:423 426;和Huston等.(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879 5883)。这种单链抗体也意为被包含在术语抗体的“抗原结合部分”内。利用本领域技术人员已知的常规技术得到这些抗体片段,并且以与完整抗体相同的方式筛选可用的片段。

[0063] 抗体可以是多克隆或单克隆的;异种的、同种异基因的或同种同基因的;或其改性形式(例如,人源化的、嵌合的等)。抗体也可以是全人类的。优选地,本发明的抗体特异性结合或基本特异性结合PD-1、PD-L1或PD-L2多肽。本文所用的术语“单克隆抗体”指对特定的表位显示单一结合特异性和亲和力的抗体。因此,术语“人单克隆抗体”指显示单一结合特异性并具有得自人生殖系或非生殖系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。在一个实施方式中,由杂交瘤生成人单克隆抗体,该杂交瘤包含得自转基因非人动物——例如,转基因小鼠,其具有包含融合到永生细胞的人重链转基因和轻链转基因的基因组——的B细胞。

[0064] 如本文所用,术语“分离的抗体”意图指基本不含其他具有不同抗原特异性的抗体的抗体(例如,特异性结合PD-1、PD-L1或PD-L2的分离的抗体基本不含不分别结合PD-1、PD-L1或PD-L2的抗体)。然而,特异性结合PD-1、PD-L1和/或PD-L2表位的分离的抗体可以具有分别与不同物种的其他PD-1、PD-L1和/或PD-L2蛋白质的交叉反应性。但是,抗体总是优选结合人PD-1、PD-L1和/或PD-L2。此外,分离的抗体一般基本不含其他细胞物质和/或化学物质。在本发明的一个实施方式中,对PD-1、PD-L1和/或PD-L2具有不同特异性的“分离的”单

克隆抗体的组合被组合在明确限定的组合物中。

[0065] 如本文所用，术语“人源化抗体”指由得自除人类外哺乳动物的抗体CDR和人抗体的FR区和恒定区组成的抗体。人源化抗体可用作根据本发明治疗剂的有效组分，因为人源化抗体在人体中的抗原性降低。

[0066] 如本文所用，术语“复合型抗体(复合抗体，composite antibody)”指这样的抗体：其具有包含来自两个或更多个不相关可变区的生殖系或非生殖系免疫球蛋白序列的可变区。此外，术语“复合型人抗体”指这样的抗体：其具有得自人生殖系或非生殖系免疫球蛋白序列的恒定区和包含来自两个或更多个不相关人可变区的人生殖系或非生殖系序列的可变区。复合型人抗体可用作根据本发明的治疗剂的有效组分，因为复合型人抗体在人体中的抗原性降低。

[0067] 如本文所用，术语“重组的人抗体”包括通过重组手段制备、表达、生成或分离的全部人抗体，如：(a)从人免疫球蛋白基因的转基因或转染色体动物(例如，小鼠)分离的抗体或由其制成的杂交瘤(下文第I节中进一步说明)；(b)从经转化以表达抗体的宿主细胞——例如，从转染瘤——分离的抗体；(c)从重组的组合人抗体库分离的抗体；和(d)通过任意其他手段制备、表达、生成或分离的抗体，包括将人免疫球蛋白基因序列剪接至其他DNA序列。这种重组的人抗体具有得自人生殖系和/或非生殖系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而在某些实施方式中，这种重组的人抗体可进行体外诱变(或在应用人Ig序列转基因动物时的体内体细胞诱变)，因此重组的抗体的V_H和V_L区的氨基酸序列是这样的序列：虽然得自人生殖系V_H和V_L序列并与人生殖系V_H和V_L序列相关，但可不在人抗体生殖系组库系统中体内天然存在。

[0068] 如本文所用，术语“异源抗体”被定义为与转基因非人生物体生成这种抗体有关。此术语指这样的抗体：具有与非由转基因非人动物组成的生物体中所发现的序列相应的氨基酸序列或编码核酸序列，并且一般来自除转基因非人动物外的物种。

[0069] 如本文所用，术语“K_D”意指特定抗体抗原相互作用的解离平衡常数。

[0070] 如本文所用，术语“特异性结合”指抗体与预定抗原结合。一般，在将重组的人PD-1、PD-L1或PD-L2用作分析物和将抗体用作配体，于BIACORE 3000仪器中通过表面等离子体共振(SPR)技术进行测定时，抗体以约小于10^{-7}M——如约小于10^{-8}M、10^{-9}M或10^{-10}M或更低——的亲和力(K_D)结合，并且以如下亲和力与预定抗原结合：比其与除预定抗原或密切相关抗原外的非特异性抗原(例如，BSA、酪蛋白)结合的亲和力大至少1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0、或10.0倍。短语“识别抗原的抗体”和“对抗原具有特异性的抗体”在本文中可与术语“特异性地结合抗原的抗体”互换使用。

[0071] 如本文所用，术语“同种型”指由重链恒定区基因编码的抗体种类(例如，IgM或IgG1)。

[0072] 如本文所用，术语“糖基化模式”被定义为与蛋白质——更具体地与免疫球蛋白蛋白质——共价连接的糖单位模式。异源抗体的糖基化模式可被表征为与非人转基因动物物种产生的抗体上天然存在的糖基化模式基本相似，此时本领域技术人员会知道异源抗体的糖基化模式与非人转基因动物物种中所述的糖基化模式比与得到转基因的CH基因的物种更为相似。

[0073] 如本文所用，被用于物质的术语“天然存在”指这样的事实：可在自然中发现该物质。例如，生物体(包括病毒)中存在、可从天然来源分离并且未被人类在实验室中有目的地修饰的多肽或多核苷酸序列就是天然存在的。

[0074] 如本文所用，术语“重排的”指这样的重链或轻链免疫球蛋白基因座的构型：其中V区段位于与分别实质上编码完整的V_H和V_L结构域的构象的D-J或J区段直接相邻。通过与生殖系DNA比较，可确认重排的免疫球蛋白基因基因座；重排的基因座会具有至少一个重组的七聚物/九聚物同源性成分。

[0075] 如本文所用，关于V区段的术语“未重排的”或“生殖系构型”指这样的构型：其中V区段没有重组，从而与D或J区段直接相邻。

[0076] 如本文所用，术语“核酸分子”意为包括DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是单链或双链，但优选是双链DNA。

[0077] 如本文所用，关于编码与PD-1、PD-L1或PD-L2结合的抗体或抗体部分(例如，V_H、V_L、CDR3)的核酸的术语“分离的核酸分子”意指这样的核酸分子：其中编码抗体或抗体部分的核苷酸序列不含编码与除PD-1、PD-L1或PD-L2外的抗原分别结合的抗体或抗体部分的其他核苷酸序列，该其他序列可天然地侧接(flank)人基因组DNA中的核酸。图2-7分别相应于包含本发明的人抗PD-1、PD-L1或PD-L2抗体的重链(V_H)和轻链(V_L)可变区的核苷酸和氨基酸序列。

[0078] 本发明也包括图(例如，图2-7)中所示的序列的“保守序列修饰”，包括核苷酸和氨基酸序列修饰，该修饰不显著影响或改变由核苷酸序列编码的抗体或含有所述氨基酸序列的抗体的结合特征。这种保守序列修饰包括核苷酸和氨基置换、增加和剔除。通过本领域已知的标准技术——如定点诱变和PCR介导的诱变——可将修饰引入图(例如，图2-7)中所示的序列中。保守的氨基酸置换包括其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基取代的置换。本领域已定义具有相似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如，赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链的氨基酸(例如，天冬氨酸、谷氨酸)、不带电极性侧链的氨基酸(例如，甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、非极性侧链的氨基酸(例如，丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸)、β-分支侧链的氨基酸(例如，苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香族侧链的氨基酸(例如，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此，人抗PD-1、抗PD-L1或抗PD-L2抗体中预期的非关键氨基酸残基优选被相同侧链家族的另一种氨基酸残基替换。

[0079] 或者，在另一个实施方式中，如通过饱和诱变，可沿全部或部分人抗PD-1、PD-L1或PD-L2抗体编码序列随机引入突变，并且由结合活性筛选由此产生的改性人抗PD-1、抗PD-L1或抗PD-L2抗体。

[0080] 因此，由本文所公开的重链和轻链可变区核苷酸序列编码和/或包含本文所公开的重链和轻链可变区氨基酸序列(例如，图2-7)的抗体包括基本相似的抗体，该基本相似的抗体由经保守修饰的相似序列编码或包含经保守修饰的相似序列。下面提供关于如何可以基于本文所公开的序列(即，重链和轻链可变区)(例如，图2-7)生成这种基本相似的抗体的进一步讨论。

[0081] 此外，如通过遗传密码(以下所示)所限定，特定蛋白质的氨基酸序列与可编码该蛋白质的核苷酸序列之间具有已知和明确的相应性。同样，如通过遗传密码所限定，特定核

酸的核苷酸序列与由该核酸编码的氨基酸序列之间具有已知和明确的相应性。

[0082] 遗传密码

丙氨酸 （Ala，A）	GCA、GCC、GCG、GCT
精氨酸 （Arg，R）	AGA、ACG、CGA、CGC、CGG、CGT
天冬酰胺 （Asn，N）	AAC、AAT
天冬氨酸 （Asp，D）	GAC、GAT
半胱氨酸 （Cys，C）	TGC、TGT
谷氨酸 （Glu，E）	GAA、GAG
谷氨酰胺 （Gln，Q）	CAA、CAG
甘氨酸 （Gly，G）	GGA、GGC、GGG、GGT
组氨酸 （His，H）	CAC、CAT
异亮氨酸 （Ile，I）	ATA、ATC、ATT
亮氨酸 （Leu，L）	CTA、CTC、CTG、CTT、TTA、TTG
赖氨酸（Lys，K）	AAA、AAG
蛋氨酸 （Met，M）	ATG
苯丙氨酸 （Phe，F）	TTC、TTT
脯氨酸 （Pro，P）	CCA、CCC、CCG、CCT
丝氨酸 （Ser，S）	AGC、AGT、TCA、TCC、TCG、TCT
苏氨酸 （Thr，T）	ACA、ACC、ACG、ACT
色氨酸 （Trp，W）	TGG
酪氨酸 （Tyr，Y）	TAC、TAT
缬氨酸 （Val，V）	GTA、GTC、GTG、GTT
终止信号（终）	TAA、TAG、TGA

[0083]

[0084] 遗传密码的重要和公知的特征是其冗余性，即，对于大多数用于构成蛋白质的氨基酸来说，可利用一个以上的编码核苷酸三联体(以上所述)。因此，多个不同的核苷酸序列可编码给定的氨基酸序列。这种核苷酸序列被认为在功能上是等效的，因为其造成在所有生物体中生成相同的氨基酸序列(虽然某些生物体翻译一些序列可能比翻译其他序列更有效)。此外，有时可在给定的核苷酸序列中发现嘌呤或嘧啶的甲基化变体。这种甲基化作用不影响三核苷酸密码子与相应氨基酸之间的编码关系。

[0085] 对于核酸，术语“基本同源性”指带有适当的核苷酸插入或删除的两个核酸或其指定的序列在最优化比对和比较时，至少约80％核苷酸，通常至少约90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％或以上的核苷酸，更优选至少约97％、98％、99％或以上的核苷酸是相同的。或者，在该区段将在选择性杂交条件下与补链杂交时，存在基本同源性。

[0086] 两个序列之间的同一性百分数是序列所共有的相同位置数目的函数(即，同一性％＝相同位置#/总位置#×100)，考虑空位数和各空位的长度，需要将其引入以对两个序列进行最优化比对。可利用数学算法实现两序列间的序列比较和同一性百分数确定，如下列非限制性实例所述。

[0087] 可应用GCG软件包(得自万维网GCG公司网站)的GAP程序、应用NWSgapdna.CMP矩阵以及空位权重(gap weight)40、50、60、70或80和长度权重(length weight)1、2、3、4、5或6确定两个核苷酸序列间的同一性百分数。也可应用已被并入ALIGN程序(2.0版)的E.Meyers and W.Miller(CABIOS,4:11 17(1989))算法、应用PAM120权重残基表(weight residue table)、空位长度罚值12和空位罚值4确定两个核苷酸或氨基酸序列间的同一性百分数。此外,可应用已被并入GCG软件包(得自万维网GCG公司网站)中的GAP程序的Needleman and Wunsch(J.Mol.Biol.(48):444 453(1970))算法、应用Blosum 62矩阵或PAM250矩阵以及空位权重16、14、12、10、8、6或4和长度权重1、2、3、4、5或6确定两个氨基酸序列间的同一性百分数。

[0088] 本发明所述的核酸和蛋白质序列可进一步用作"查询序列",从而进行对公共数据库的搜索,例如,鉴定相关的序列。这种搜索可应用Altschul,等.(1990)J.Mol.Biol.215:403 10的NBLAST和XBLAST程序(2.0版)进行。BLAST核苷酸搜索可以以NBLAST程序、分值=100、字长=12进行,得到与本发明所述的核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST蛋白质搜索可以以XBLAST程序、分值=50、字长=3进行,得到与本发明所述的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为以比较为目的得到空位比对,可以如Altschul等,(1997)Nucleic Acids Res.25(17):3389 3402所述,应用Gapped BLAST。当应用BLAST和Gapped BLAST程序时,可使用各程序(例如,XBLAST和NBLAST)的默认参数(得自万维网NCBI网站)。

[0089] 核酸可存在于整个细胞、细胞溶胞产物或者部分纯化或基本纯形式中。在通过标准技术——包括碱/SDS处理、CsCl显带、柱层析、琼脂糖凝胶电泳及本领域公知的其他技术——从其他细胞组分或其他杂质——例如,其他细胞核酸或蛋白质——被提纯出时,核酸是"分离的"或"呈基本纯的"。参见,F.Ausubel,等,ed.Current Protocols in Molecular Biology,Greene Publishing and Wiley Interscience,New York(1987)。

[0090] 本发明所述的来自cDNA、基因组或其混合物的核酸组分——通常在天然序列(除了修饰的酶切位点及类似位点)中——可按照标准技术进行突变,以提供基因序列。对于编码序列,这些突变可如所需地影响氨基酸序列。特别地,考虑与天然V、D、J、恒定序列(constant)、转换序列(switches)和本文所述的其他这种序列基本同源或从天然V、D、J、恒定序列(constant)、转换序列(switches)和本文所述的其他这种序列得到的DNA序列(其中"得到"指序列与另一个序列相同或从另一个序列修饰的)。

[0091] 当其处于与另一个核酸序列的功能关系中时,核酸被"可操作地连接"。例如,如果其影响序列转录,则启动子或增强子被可操作地连接于编码序列。关于转录调节序列,可操作地连接意指被连接的DNA序列相邻,并且在必要时结合相邻且在读码框中的两个蛋白质编码区。对于转换序列,可操作地连接指序列能够影响转换重组。

[0092] 如本文所用,术语"载体"意指能运输已与其所连接的另一个核酸的核酸分子。一类载体是"质粒",其指环状双链DNA环,其中可连接另外的DNA区段。另一类载体是病毒载体,其中另外的DNA区段可被连接到病毒基因组中。某些载体能在其所引入的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其他载体(例如,非附加型哺乳动物载体)可在被引入宿主细胞时被整合到宿主细胞的基因组中,从而随宿主基因组复制。此外,某些载体能够指导与其可操作地连接的基因的表达。这种载体在本文中被称为"重组表达载体"(或简化为"表达载体")。一般,重组DNA技术中有用的表达载体通常

是以质粒的形式。在本说明书中，“质粒”和“载体”可互换使用，因为质粒是载体的最常用形式。但是，本发明意图包括表达载体的这种其他形式，如具有同等功能的病毒载体(例如，复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0093] 如本文所用，术语“重组的宿主细胞”(或简化为“宿主细胞”)意指重组的表达载体已被引入其中的细胞。应当理解的是，这种术语不仅意指特定的对象细胞，也指这种细胞的子代。由于某些修饰可由于突变或环境影响存在于后代中，这样的子代事实上可不与亲代细胞一致，但仍被包含在本文所用术语“宿主细胞”的范围内。

[0094] 如本文所用，术语“对象(受试者)”包括任何人或非人动物。例如，本发明所述的方法和组合物可用于治疗患有炎性疾病——如关节炎，例如，类风湿关节炎——的对象。术语“非人动物”包括所有脊椎动物，例如，哺乳动物和非哺乳动物，如非人灵长类动物、羊、狗、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。

[0095] 如本文所用，术语“调节”包括上调和下调，例如，增强或抑制应答。

[0096] 如本文所用，术语“抑制”包括例如特定作用、功能或相互作用的降低、限制或阻断。

[0097] 如本文所用，术语“免疫细胞”指在免疫应答中起作用的细胞。免疫细胞具有造血来源，包括：淋巴细胞，如B细胞和T细胞；天然的杀伤细胞；骨髓细胞，如单核细胞、巨噬细胞、嗜酸性细胞、肥大细胞、嗜碱性细胞和粒细胞。

[0098] 如本文所用，术语“T细胞”包括CD4+T细胞和CD8+T细胞。术语T细胞也包括T辅助1型T细胞、T辅助2型T细胞、T辅助17型T细胞和抑制性T细胞。术语“抗原递呈细胞”包括专用的抗原递呈细胞(例如，B淋巴细胞、单核细胞、树突细胞、郎格罕细胞)和其他抗原递呈细胞(例如，角质化细胞、上皮细胞、星形胶质细胞、成纤维细胞、少突胶质细胞)。

[0099] 如本文所用，术语“免疫应答”包括由T细胞共刺激的调节所影响的T细胞介导的和/或B细胞介导的免疫应答。示例性免疫应答包括T细胞应答——例如，细胞因子生成——和细胞毒性。此外，术语免疫应答包括由T细胞激活间接影响的免疫应答，例如，抗体的生成(体液应答)和细胞因子应答细胞——例如，巨噬细胞——的激活。

[0100] 如本文所用，关于激活的免疫细胞所使用的术语“共刺激”包括共刺激性多肽提供诱导增殖和/或效应子作用的第二非激活受体介导的信号(“共刺激信号”)的能力。例如，共刺激信号——例如，在已接收到T细胞受体介导的信号的T细胞中——可导致细胞因子分泌。例如通过激活受体接收细胞受体介导的信号的免疫细胞在本文中被称为“激活的免疫细胞”。

[0101] 如本文所用，术语“抑制信号”指通过免疫细胞上多肽的抑制受体(例如，CTLA4或PD-1)传导的信号。这种信号拮抗通过激活受体(例如，通过TCR或CD3多肽)传导的信号，并且可导致——例如，第二信使生成的抑制；增殖抑制；免疫细胞中效应子作用的抑制，例如，吞噬作用降低、抗体生成减少、细胞毒性减少、免疫细胞不生成介质(如细胞因子(例如，IL-2)和/或变应性反应介质)；或无反应性的发展。

[0102] 如本文所用，术语“无应答性”包括免疫细胞对刺激——例如，通过激活受体或细胞因子的刺激——的折射本领。例如，由于暴露于免疫抑制剂或暴露于高剂量抗原，可存在无应答性。如本文所用，术语“无反应性”或“耐受性”包括对激活受体介导的刺激的折射本领。这种折射本领一般具有抗原特异性，并且在停止暴露于耐受(tolerizing)抗原后持续

存在。例如，T细胞的无反应性(相对于无应答性)被表征为没有细胞因子——例如，IL-2——生成。T细胞的无反应性在T细胞暴露于抗原并在第二信号(共刺激信号)缺失下接收到第一信号(T细胞受体或CD-3介导的信号)时存在。在这些条件下，细胞再次暴露于同一抗原(即使在共刺激的多肽存在下发生再次暴露)造成不产生细胞因子，从而不发生增殖。然而如果与细胞因子(例如，IL-2)一起培养，无变应性T细胞则能够增殖。例如，T细胞的无反应性也可通过T淋巴细胞不生成IL-2而观察到，这是利用指示细胞系通过ELISA或通过增殖分析测定的。或者，可利用报道基因构建体。例如，无变应性T细胞不能启动由异源启动子在5' IL-2基因增强子的控制下诱导的IL-2基因转录或由可在增强子中发现的AP1序列的多聚体诱导的IL-2基因转录(Kang等.(1992)Science 257:1134)。

[0103] 如本文所用，在关于多肽——例如，PD-1、PD-L1或PD-L2多肽——应用时，术语“活性”包括蛋白质结构中固有的活性。例如，关于PD-1配体，术语“活性”包括调节免疫细胞共刺激(例如，通过调节激活的免疫细胞中的共刺激信号)的能力或通过调节免疫细胞中的抑制信号调节抑制(例如，通过使天然受体连接在免疫细胞上)的能力。本领域技术人员会知道当PD-1配体多肽结合共刺激的受体时，共刺激信号可在免疫细胞中生成。当PD-1配体多肽结合抑制受体时，抑制信号在免疫细胞中生成。同样，当PD-1配体结合B7-1多肽时，抑制信号可生成(Butte等.(2007)Immunity 27:111)。

[0104] 关于PD-1，术语“活性”包括PD-1多肽——例如，通过使天然的PD-1配体连接在抗原递呈细胞上——调节免疫细胞中的抑制信号的能力。PD-1以类似CTLA4的方式将抑制信号传至免疫细胞。调节免疫细胞中抑制信号导致免疫细胞的增殖和/或由免疫细胞进行的细胞因子分泌受到调节。因此，术语“PD-1活性”包括PD-1多肽结合其天然配体(一个或多个)的能力、调节免疫细胞共刺激信号或抑制信号的能力和调节免疫应答的能力。

[0105] 如本文所用，在涉及两种分子间的相互作用时，术语“相互作用”指分子相互的物理接触(例如，结合)。一般，这种相互作用产生所述分子其中一个或二者的活性(其产生生物作用)。该活性可以是所述分子其中一个或二者的直接活性(例如，信号转导)。或者，相互作用中的分子一个或二者可阻碍结合配体，从而对于配体结合活性(例如，结合其配体，并且引发或抑制共刺激)呈无活性。抑制这种相互作用造成相互作用中所涉及的一种或多种分子的活性被破坏。增强这种相互作用是延长或增大所述物理接触的可能性以及延长或增大所述活性的可能性。

[0106] 如本文所用，除非文中明确另外表示，单数形式“一(a)”、“一(an)”和“该(所述，the)”)包括复数表示。

[0107] 要理解的是，本文所述的本发明方面和实施方式包括“由方面和实施方式组成”和/或“基本由方面和实施方式组成”。

[0108] 以下子章节中对本发明所述的各个方面进行更详细地说明。

[0109] I.分离的核酸分子

[0110] 本发明的一方面涉及编码本发明所述多肽(例如，图2-7中的多肽)或其生物活性部分的分离的核酸分子以及足以用作杂交探针以鉴定编码这些多肽和片段的核酸分子的核酸片段，用作PCR引物以进行核酸分子的扩增或突变。如本文所用，术语“核酸分子”意为包括DNA分子(例如，cDNA或基因组DNA)和RNA分子(例如，mRNA)及利用核苷酸类似物生成的DNA或RNA类似物。核酸分子可以是单链或双链的，但优选是双链DNA。

[0111] 术语“分离的核酸分子”包括从核酸天然来源中存在的其他核酸分子中分离的核酸分子。例如，关于基因组DNA，术语“分离的”包括从基因组DNA天然相关的染色体中分离的核酸分子。优选地，“分离的”核酸分子不含这样的序列：其天然地侧接获得核酸的生物体基因组DNA中的核酸(即，位于核酸分子5’和3’末端的序列)。例如，“分离的”核酸分子——如cDNA分子，通过重组的技术生成时可基本不含其他细胞物质或培养基，或者在化学合成时可基本不含化学前体或其他化学物质。

[0112] 可利用标准的分子生物技术和本文所提供的序列信息分离本发明的核酸分子(例如，图2-7中的核酸分子)或其部分。例如，可利用基于图2-7所示序列设计的合成寡核苷酸引物，通过聚合酶链式反应(PCR)分离包含全部或部分图2-7所示序列的核酸分子。

[0113] 可根据标准PCR扩增技术，利用cDNA、mRNA或可选地基因组DNA作模板和适当的寡核苷酸引物扩增本发明的核酸分子。可将如此扩增的核酸分子克隆到适当的载体中，并通过DNA序列分析表征。此外，通过标准合成技术——例如，利用自动化DNA合成仪，可制备相应于本发明所述核酸序列的寡核苷酸。

[0114] 在另一个实施方式中，本发明的分离的核酸分子包括本发明核酸分子(例如，图2-7中的核酸分子)或其部分的互补核酸分子。与本发明所述核酸分子(例如，图2-7中的核酸分子)或其部分互补的核酸分子是与图2-7所示核苷酸序列充分互补的核酸分子，以使其可与图2-7所示各核苷酸序列杂交，从而形成稳定的双链体。

[0115] 还有另一个实施方式中，本发明所述的分离的核酸分子包括与图2-7所示核苷酸序列的全长或这些核苷酸序列中的任一个的部分至少约70％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或以上相同的核苷酸序列。

[0116] 此外，本发明所述的核酸分子可仅包括本发明所述的核酸分子(例如，图2-7中的核酸分子)的一部分或其部分，例如，可用作探针或引物的片段或编码本发明所述多肽例如图2-7中的多肽的一部分的片段。探针/引物一般包括基本纯化的寡核苷酸。寡核苷酸一般包括这样的核苷酸序列区域：其在严格的条件下与本发明核酸分子(例如，图2-7中的核酸分子)；本发明核酸分子(例如，图2-7中的核酸分子)的反义序列；或本发明核酸分子(例如，图2-7中的核酸分子)的突变体的至少约12或15个，优选约20或25个，更优选约30、35、40、45、50、55、60、65或75个连续核苷酸杂交。

[0117] 可利用基于本发明核酸分子(例如，图2-7中的核酸分子)的探针检测转录物或者编码相同或同源多肽的基因组序列。在一个实施方式中，探针进一步包括连至其上的标记组，例如，标记组可以是放射性同位素、荧光化合物、酶或酶辅因子。

[0118] 通过以下可制备编码“本发明所述多肽的生物活性部分”的核酸片段：分离本发明所述核酸分子(例如，图2-7中的核酸分子)的部分核苷酸序列，该部分序列编码具有本发明所述多肽生物活性(例如，结合其抗原目标的能力)的多肽；表达本发明所述多肽被编码的部分(例如，通过体外重组表达)；和评价本发明所述多肽被编码部分的活性。

[0119] 本发明进一步包括这样的的核酸分子：由于遗传密码简并性而不同于图2-7所示核苷酸序列(一种或多种)，并因此编码与图2-7所示各核苷酸序列编码的多肽相同的多肽。在另一个实施方式中，本发明所述的分离的核酸分子具有编码本发明所述多肽(例如，图2-7中的多肽)的核苷酸序列。

[0120] 可根据标准杂交技术在严格的杂交条件下将本文公开的cDNA或其部分用作杂交

探针，基于其与本文所公开核酸的同源性，分离与本发明所述核酸分子(例如，图2-7中的核酸分子)的同源体(homologue)相应的核酸分子。

[0121] 因此，在另一个实施方式中，本发明所述的分离的核酸分子的长度至少为15、20、25、30个或更多核苷酸，并且在严格的条件下与包含本发明核酸分子(例如，图2-7中的核酸分子)的核酸分子杂交。

[0122] 如本文所用，术语“在严格的条件下杂交”意为说明杂交和洗涤的条件，在该条件下，彼此显著相同或同源的核苷酸序列保持相互杂交。优选地，该条件是这样的：彼此至少约70％，更优选至少约80％，甚至更优选至少约85％或90％相同的序列保持相互杂交。这种严格条件本领域技术人员公知，并且可在Current Protocol in Molecular Biology，Ausubel等，eds.，John Wiley & Sons，Inc.(1995)，第2、4和6节中查找到。另外的严格条件可在Molecular Cloning：A Laboratory Manual，Sambrook等，Cold Spring Harbor Press，Cold Spring Harbor，N.Y.(1989)，第7、9和11章中查找到。严格的杂交条件的非限制性实例包括：在约65-70℃下，4×或6×氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中进行杂交(或在约42-50℃下，4×SSC和50％甲酰胺中进行杂交)，然后在约65-70℃下，1×SSC中进行一次或多次洗涤。严格的杂交条件的进一步非限制性实例包括：在45℃下，6×SSC中进行杂交，然后在65℃下，0.2×SSC、0.1％SDS中进行一次或多次洗涤。高严格的杂交条件的非限制性实例包括：在约65-70℃下，1×SSC中进行杂交(或在约42-50℃下，1×SSC和50％甲酰胺中进行杂交)，然后在约65-70℃下，0.3×SSC中进行一次或多次洗涤。降低严格性的杂交条件的非限制性实例包括：在约50-60℃下，4×或6×SSC中进行杂交(或者可选地在约40-45℃下，6×SSC和50％甲酰胺中进行杂交)，然后在约50-60℃下，2×SSC中进行一次或多次洗涤。上述取值的中间范围，例如，在65-70℃下或在42-50℃下，也被意为涵盖在本发明中。在杂交和洗涤缓冲液中，SSPE(1×SSPE是0.15M NaCl、10mM NaH_2PO_4和1.25mM EDTA，pH 7.4)可替代SSC(1×SSC是0.15M NaCl和15mM柠檬酸钠)；杂交完成后，洗涤各自进行15分钟。预期长度小于50个碱基对的杂交分子的杂交温度应比杂交分子的熔解温度(T_m)低5-10℃，其中根据下列方程式确定T_m。对于长度小于18个碱基对的杂交分子，T_m(℃)＝2(A+T碱基的#)+4(G+C碱基的#)。对于长度在18和49个碱基对之间的杂交分子，T_m(℃)＝81.5+16.6($\log_{10}[Na^+]$)+0.41(％G+C)-(600/N)，其中N是杂交分子中的碱基数，$[Na^+]$是杂交缓冲液中的钠离子浓度(1×SSC的$[Na^+]$＝0.165M)。技术人员也将知道的是，可向杂交和/或洗涤缓冲液添加另外的试剂，从而降低核酸分子与膜——例如，硝化纤维或尼龙膜——的非特异性杂交，包括但不限于阻断剂(例如，BSA或三文鱼或鲱鱼精子载体DNA)、洗涤剂(例如，SDS)、螯合剂(例如，EDTA)、Ficoll、PVP及类似试剂。特别是当使用尼龙膜时，严格的杂交条件的另一个非限制性实例是在约65℃下，0.25-0.5M NaH_2PO_4、7％SDS中进行杂交，然后在65℃下，0.02M NaH_2PO_4、1％SDS中进行一次或多次洗涤，参见：例如，Church and Gilbert(1984) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81：1991-1995(或者可选地，0.2×SSC、1％SDS)。

[0123] 技术人员将进一步知道通过突变可向本发明所述的核酸分子(例如，图2-7中的核酸分子)中引入改变，从而导致本发明编码多肽的氨基酸序列发生改变，而不改变多肽的功能性能力。例如，可在本发明的核酸分子(例如，图2-7中的核酸分子)中进行核苷酸替换，该核苷酸替换导致在“非必需”氨基酸残基上的氨基酸替换。“非必需”氨基酸残基是可以在不改变生物活性的情况下从本发明的核酸分子(例如，图2-7中的核酸分子)转变的残基，但生

物活性需要“必需”氨基酸残基。例如，预计本发明所述多肽中保守的氨基酸残基——例如，多肽与其目标抗原结合所需的氨基酸残基——特别不宜发生改变。

[0124] 因此，本发明的另一方面涉及编码本发明多肽(例如，图2-7中的多肽)的核酸分子，其包含活性非必需的氨基酸残基改变。这种多肽的氨基酸序列与图2-7中的序列不同，仍保持生物活性。在一个实施方式中，分离的核酸分子包含编码多肽的核苷酸序列，其中多肽包含与图2-7中的序列至少约71％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或以上相同的氨基酸序列。

[0125] 通过在图2-7中核酸分子的核苷酸序列中引入一个或多个核苷酸替换、添加或删除——从而在被编码的多肽中引入一个或多个氨基酸替换、添加或删除，可生成编码与图2-7中核酸分子的多肽相同的多肽的分离的核酸分子。通过标准技术——如定点诱变和PCR介导的诱变，可在本发明所述的核酸分子(例如，图2-7中的核酸分子)中引入突变。在一个实施方式中，在一个或多个预测的非必需氨基酸残基上进行保守氨基酸替换。“保守氨基酸替换”是氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基替代的替换。具有相似侧链的氨基酸残基家族在本领域中已被定义。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如，赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸(例如，天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电极性侧链的氨基酸(例如，天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸(例如，甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸)、具有β-分支侧链的氨基酸(例如，苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳香族侧链的氨基酸(例如，酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此，本发明多肽(例如，图2-7中的多肽)中预期的非必需氨基酸残基可被同一侧链家族的另一种氨基酸残基取代。或者，在另一个实施方式中，如通过饱和诱变，可沿全部或部分本发明所述的核酸分子(一种或多种)(例如，图2-7中的核酸分子)随机引入突变，可由生物活性筛选产生的突变体，从而鉴定到保留活性的突变体。本发明的核酸分子(例如，图2-7中的核酸分子)发生诱变后，可重组地表达被编码的多肽，并可测定多肽的活性。

[0126] 在一个实施方式中，可分析本发明的突变多肽的如下能力：结合和/或调节天然PD-1(例如，PD-1配体)或PD-1配体的配偶体(例如，PD-1和B7-1)的活性，调节细胞内或细胞间信号传导，调节T淋巴细胞的激活和/或调节生物体免疫应答。

[0127] 还有本发明的另一方面涉及编码融合蛋白质的分离的核酸分子。通过标准重组DNA技术，可制备这种核酸分子，该核酸分子至少包含编码本发明多肽(例如，图2-7中的多肽)的第一核苷酸序列，该第一核苷酸序列可操作地连接于编码本发明多肽(例如，图2-7中的多肽)的第二核苷酸序列。

[0128] 通过在稳定细胞系或克隆微生物的基因组中插入异源DNA调节元件——从而将被插入的调节元件与本发明的核酸分子(例如，图2-7中的核酸分子)可操作地连接，可改变本发明的核酸分子(例如，图2-7中的核酸分子)在细胞系或微生物中的表达特征。例如，可利用如靶向同源重组的技术，将异源调节元件插入稳定细胞系或克隆微生物，以使其与本发明的核酸分子(例如，图2-7中的核酸分子)可操作地连接，该技术为本领域技术人员公知，并在如下中被述及：例如，Chappel，美国专利号5,272,071；PCT公开号WO 91/06667，于1991年5月16日公开。

[0129] II.分离的多肽分子

[0130] 本发明的一方面涉及本发明的分离的多肽(包括本文所述的抗体及其抗原结合片段和图2-7中的多肽)以及其生物活性部分。在一个实施方式中,利用标准蛋白质纯化技术,通过适当的纯化方案可从细胞或组织来源分离本发明的多肽(例如,图2-7中的多肽)及其生物活性部分。在另一个实施方式中,通过重组DNA技术生成本发明的多肽(例如,图2-7中的多肽)及其生物活性部分。或者,利用标准肽合成技术,可化学合成本发明所述的多肽(例如,图2-7中的多肽)及其生物活性部分。

[0131] "分离的"或"纯化的"多肽或其生物活性部分基本不含获得本发明所述多肽(例如,图2-7中的多肽)的细胞或组织来源的细胞物质或其他杂质蛋白质,或者在被化学合成时基本不含化学前体或其他化学物质。"基本不含细胞物质"的表述包括本发明多肽(一种或多种)(例如,图2-7中的多肽)及其生物活性部分的制备物,其中多肽是从分离到该多肽的细胞的细胞组分分离的或重组生成的。在一个实施方式中,"基本不含细胞物质"的表述包括这样的本发明多肽(一种或多种)(例如,图2-7中的多肽)及其生物活性部分的制备物:其具有小于约30%(干重)的非本发明蛋白质(在本文中也被称为"杂质蛋白质"),更优选小于约20%的非本发明蛋白质,还更优选小于约10%的非本发明蛋白质,最优选小于约5%的非本发明蛋白质。当重组地制备本发明的多肽(例如,图2-7中的多肽)或其生物活性部分时,同样优选基本不含培养基,即,培养基占蛋白质制备物体积小于约20%,更优选小于约10%,最优选小于约5%。

[0132] "基本不含化学前体或其他化学物质"的表述包括本发明多肽(一种或多种)(例如,图2-7中的多肽)或其生物活性部分的制备物,其中多肽被从多肽合成涉及的化学前体或其他化学物质中分离。在一个实施方式中,"基本不含化学前体或其他化学物质"的表述包括这样的本发明多肽(一种或多种)(例如,图2-7中的多肽)或其生物活性部分的制备物:具有小于约30%(干重)化学前体或非本发明的蛋白质,更优选小于约20%化学前体或非本发明的蛋白质,还更优选小于约10%化学前体或非本发明的蛋白质,最优选小于约5%化学前体或非本发明的蛋白质。

[0133] 如本文所用,本发明多肽(一种或多种)(例如,图2-7中的多肽)的"生物活性部分"包括分别参与PD-1与非PD-1分子之间、PD-L1与非PD-L1分子之间或PD-L2与非PD-L2分子之间相互作用的多肽,例如:PD-1的天然配体——例如,PD-1配体;或PD-1配体的天然配体——例如,PD-1或B7-1。本发明多肽(一种或多种)(例如,图2-7中的多肽)的生物活性部分包括这样的肽:其含有与本发明多肽(一种或多种)(例如,图2-7中的多肽)的氨基酸序列足够相同或得自本发明多肽(一种或多种)(例如,图2-7中的多肽)的氨基酸序列的氨基酸序列,其包含比本发明的各个全长多肽(一种或多种)(例如,图2-7中的多肽)更少的氨基酸,并呈现本发明的各个多肽(一种或多种)(例如,图2-7中的多肽)的至少一种活性。在一个实施方式中,生物活性部分包含这样的结构域或模体:具有根据其所被提出或设计结合的抗原分别特异性地结合PD-1或PD-L1配体的能力。本发明多肽(一种或多种)(例如,图2-7中的多肽)的生物活性部分可用作展开剂的目标,该展开剂调节由PD-1、PD-L1或PD-L2介导的活性,例如,免疫细胞激活或抑制。

[0134] 在另一个实施方式中,本发明多肽(一种或多种)(例如,图2-7中的多肽)具有图2-7所示的氨基酸序列。在其他实施方式中,多肽与图2-7所示的多肽(一种或多种)基本相同,并保留图2-7所示各个多肽(一种或多种)的功能活性但氨基酸序列由于诱变而不同,如以

上小节I所详细描述。因此，在另一个实施方式中，本发明的多肽(一种或多种)是这样的多肽：其包含与图2-7所示的多肽(一种或多种)至少约71％、75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％97％、98％、99％、99.5％或99.9％或以上相同的氨基酸序列。

[0135] 为确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的同一性百分数，比对序列以进行最优化比较(例如，可以在第一和第二氨基酸或核酸序列其中之一或二者中引入空位，以进行最优化比对，和可以为进行比较而忽略不相同的序列)。在一个实施方式中，为进行比较而比对的参考序列长度为参考序列长度的至少30％，优选至少40％，更优选至少50％，甚至更优选至少60％，以至更优选至少70％、80％、90％、95％、96％、97％、98％、99％、99.5％或99.9％。然后比较相应氨基酸位点或核苷酸位点上的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列的位点被与第二序列相应位点上相同的氨基酸残基或核苷酸占据时，那么分子在该位点相同(如本文所用，氨基酸或核酸“同一性”等同于氨基酸或核酸“同源性”)。两个序列间的同一性百分数是两序列所共有的相同位点数目的函数，其考虑为两序列最优化比对而需要引入的空位数和各空位的长度。

[0136] 本发明也提供嵌合或融合蛋白质。如本文所用，“嵌合蛋白质”或“融合蛋白质”包含与非本发明多肽可操作地连接的本发明多肽(一种或多种)(例如，图2-7中的多肽)。“本发明的多肽(一种或多种)”指具有相应于图2-7所示多肽的氨基酸序列的多肽，而“非本发明多肽”指这样的多肽：不具有相应于与图2-7所示多肽非基本同源的多肽的氨基酸序列，例如，与图2-7所示多肽不同、得自相同或不同生物体的多肽。在融合蛋白质中，术语“可操作地连接”意指本发明的多肽(一种或多种)与非本发明的多肽(一种或多种)彼此框内融合。非本发明的多肽(一种或多种)可被融合至本发明多肽(一种或多种)的N端或C端，相应于改变本发明所述多肽(一种或多种)的溶解性、结合亲和力、稳定性或效价(valency)的部分。

[0137] 例如，在一个实施方式中，融合蛋白质是具有本发明多肽(一种或多种)的GST融合蛋白质。这种融合蛋白质可促进本发明重组多肽的纯化。在另一个实施方式中，融合蛋白质在其N端包含异源信号序列。在某些宿主细胞(例如，哺乳动物宿主细胞)中，通过利用异源信号序列可提高本发明多肽(一种或多种)的表达和/或分泌。

[0138] 通过标准重组DNA技术可生成本发明的嵌合或融合多肽(一种或多种)(例如，图2-7中的多肽)。例如，根据常规技术——例如，通过利用平末端或参差末端进行连接，利用限制性酶消化提供适当的末端，利用粘性末端充填作为适当的碱性磷酸酶处理以防止不需要的连接，以及利用酶促连接——将编码不同多肽序列的DNA片段在框内连接在一起。在另一个实施方式中，通过常规技术——包括自动化DNA合成器——可合成融合基因。或者，利用锚定引物可进行基因片段的PCR扩增，该引物使随后可经退火和再扩增生成嵌合基因序列的两个连续基因片段之间产生互补突出端(参见，例如，Current Protocols in Molecular Biology，Ausubel等，eds.，John Wiley & Sons：1992)。此外，市售多种已编码融合部分(例如，GST多肽)的表达载体。

[0139] 本文中鉴定的本发明多肽(一种或多种)(例如，图2-7中的多肽)的氨基酸序列使本领域技术人员能制备相应于本发明多肽(一种或多种)(例如，图2-7中的多肽)的多肽。通过编码本发明所述多肽(一种或多种)(例如，图2-7中的多肽)的多核苷酸的表达，可在原核或真核宿主细胞中制备这种多肽。或者，通过化学方法可合成这种肽。重组宿主中表达异源

多肽的方法、多肽化学合成的方法和体外翻译的方法在本领域中公知，并在Maniatis等，Molecular Cloning:A Laboratory Manual(1989)，2nd Ed.,Cold Spring Harbor,N.Y.;Berger and Kimmel,Methods in Enzymology,Volume 152,Guide to Molecular Cloning Techniques(1987)，Academic Press,Inc.,San Diego,Calif.;Merrifield,J.(1969)J.Am.Chem.Soc.91:501;Chaiken I.M.(1981)CRC Crit.Rev.Biochem.11:255;Kaiser等.(1989)Science 243:187;Merrifield,B.(1986)Science 232:342;Kent,S.B.H.(1988)Annu.Rev.Biochem.57:957;和Offord,R.E.(1980)Semisynthetic Proteins,Wiley Publishing中被进一步述及，在此将这些引入作为参考。

[0140] III.PD-1、PD-L1和/或PD-L2抗体

[0141] 利用本文所述或本领域已知的的任何方法可制备本文所述的PD-1、PD-L1或PD-L2的抗体。利用多种已知技术可制备本发明的单克隆抗体(例如，人抗体)，如由Kohler and Milstein,Nature 256:495(1975)所述的标准体细胞杂交技术。虽然优选体细胞杂交程序，原则上用于制备单克隆抗体的其他技术也可应用，例如，B淋巴细胞的病毒或致癌转化、利用人抗体基因库的噬菌体展示技术(phage display technique)。

[0142] 产生本发明单克隆抗体的一种杂交瘤生成方法是小鼠系统。杂交瘤在小鼠中的生成在本领域公知，包括用于分离和融合免疫脾细胞的免疫方案和技术。

[0143] 通过用多肽免疫原使适当的对象免疫，可如上所述制备多克隆抗体。利用固定化的多肽，通过标准技术——如，用酶联免疫吸附法(ELISA)，可随时间监测免疫对象中多肽抗体的滴定度。如需要，通过公知技术——如蛋白质A层析，可从哺乳动物(例如，从血液)中分离针对抗原的抗体，并进行进一步纯化，从而得到IgG部分。在免疫后合适的时间，例如，在抗体滴定度最高时，产生抗体的细胞可从对象中得到，并通过标准技术用于制备单克隆抗体，如最初由Kohler and Milstein(1975)Nature 256:495-497)(同样参见Brown等.(1981)J.Immunol.127:539-46;Brown等.(1980)J.Biol.Chem.255:4980-83;Yeh等.(1976)Proc.Natl.Acad.Sci.76:2927-31;和Yeh等.(1982)Int.J.Cancer 29:269-75)描述的杂交瘤技术、较近期的人B细胞杂交瘤技术(Kozbor等.(1983)Immunol.Today 4:72)、EBV-杂交瘤技术(Cole等.(1985)Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,Inc.,pp.77-96))或三源杂交瘤(trioma)技术。用于制备单克隆抗体杂交瘤的技术公知(一般参见Kenneth,R.H.in Monoclonal Antibodies:A New Dimension In Biological Analyses,Plenum Publishing Corp.,New York,New York(1980);Lerner,E.A.(1981)Yale J.Biol.Med.54:387-402;Gefter,M.L.等.(1977)Somatic Cell Genet.3:231-36)。简要地来说，尤其优选地，将永生细胞系(一般是骨髓瘤)与如上所述的用免疫原免疫的哺乳动物的淋巴细胞(一般是脾细胞)融合，筛选所产生的杂交瘤细胞的培养上清液，从而鉴定出生成与多肽抗原结合的单克隆抗体的杂交瘤。

[0144] 可利用多种用于融合淋巴细胞和永生细胞系的公知方案中的任一种以生成抗PD-1、PD-L1或PD-L2的单克隆抗体(参见，例如，Galfre,G.等.(1977)Nature 266:55052;上述Gefter等.(1977)；上述Lerner(1981)；上述Kenneth(1980))。此外，普通技术人员会理解这种方法的多种变型也将可用。一般，永生细胞系(例如，骨髓瘤细胞系)得自与淋巴细胞相同的哺乳动物物种。例如，通过将淋巴细胞——其来自用本发明的免疫原性制备物免疫的鼠——与永生的鼠细胞系融合，可制备鼠杂交瘤。优选的永生细胞系是对含有次黄嘌呤、氨

喋呤和胸啶的培养基(“HAT培养基”)敏感的小鼠骨髓瘤细胞系。根据标准技术,多种骨髓瘤细胞系中的任一种可用作融合配偶体,例如,P3-NS1/1-Ag4-1、P3-x63-Ag8.653或Sp2/0-Ag14骨髓瘤系。这些骨髓瘤系可得自American Type Culture Collection(ATCC),Rockville,Md。一般,利用聚乙二醇(“PEG”)将HAT敏感的小鼠骨髓瘤细胞与小鼠脾细胞融合。然后利用HAT培养基选择由融合产生的杂交瘤细胞,该培养基杀死未融合和低效融合的骨髓瘤细胞(未融合的脾细胞在若干天后由于其未被转化而死亡)。例如,利用标准ELISA分析,通过筛选结合给定多肽的抗体的杂交瘤培养上清液,检测产生本发明单克隆抗体的杂交瘤细胞。

[0145] 或者,对于制备分泌单克隆抗体的杂交瘤,通过用适当的多肽筛选重组的组合免疫球蛋白库(例如,抗体噬菌体展示库)——从而分离结合多肽的免疫球蛋白库成员,可鉴定和分离对上述多肽其中之一特异性的单克隆。市售生成和筛选噬菌体展示库的试剂盒(例如,Pharmacia Recombinant Phage Antibody System,Catalog No.27-9400-01;和Stratagene SurfZAP™ Phage Display Kit,Catalog No.240612)。此外,尤其易用于生成和筛选抗体展示库的方法和试剂的实例可见于:例如,Ladner等,美国专利号5,223,409;Kang等,国际公开号WO 92/18619;Dower等,国际公开号WO 91/17271;Winter等,国际公开WO 92/20791;Markland等,国际公开号WO 92/15679;Breitling等,国际公开WO 93/01288;McCafferty等,国际公开号WO 92/01047;Garrard等,国际公开号WO 92/09690;Ladner等,国际公开号WO 90/02809;Fuchs等(1991)Biotechnology(NY)9:1369-1372;Hay等.(1992)Hum.Antibod.Hybridomas 3:81-85;Huse等.(1989)Science 246:1275-1281;Griffiths等.(1993)EMBO J.12:725-734;Hawkins等.(1992)J.Mol.Biol.226:889-896;Clarkson等.(1991)Nature 352:624-628;Gram等.(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:3576-3580;Garrard等.(1991)Biotechnology(NY)9:1373-1377;Hoogenboom等.(1991)Nucleic Acids Res.19:4133-4137;Barbas等.(1991)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:7978-7982;和McCafferty等.(1990)Nature 348:552-554中。

[0146] 此外,可生成可利用标准重组DNA技术制备的重组抗PD-1、PD-L1或PD-L2抗体,如嵌合、复合和人源化的单克隆抗体。通过本领域已知的重组DNA技术可制备这种嵌合、复合和人源化的单克隆抗体,例如,利用以下中所述的方法:Robinson等,国际专利公开PCT/US86/02269;Akira等,欧洲专利申请184,187;Taniguchi,M.欧洲专利申请171,496;Morrison等,欧洲专利申请173,494;Neuberger等,PCT申请WO 86/01533;Cabilly等,美国专利号4,816,567;Cabilly等,欧洲专利申请125,023;Better等.(1988)Science 240:1041-1043;Liu等.(1987)Proc.Natl.Acad Sci.USA 84:3439-3443;Liu等.(1987)J.免疫1.139:3521-3526;Sun等.(1987)Proc.Natl.Acad.Sci.84:214-218;Nishimura等.(1987)Cancef Res.47:999-1005;Wood等.(1985)Nature 314:446-449;和Shaw等.(1988)J.Natl.Cancer Inst.80:1553-1559);Morrison,S.L.(1985)Science 229:1202-1207;Oi等.(1986)Biotechniques 4:214;Winter美国专利5,225,539;Jones等.(1986)Nature 321:552-525;Verhoeyan等.(1988)Science 239:1534;和Beidler等.(1988)J.Immunol.141:4053-4060。

[0147] 此外,根据标准方案——如美国专利5,565,332所公开的方案,可制备人源化抗体。在另一个实施方式中,利用本领域已知的技术,通过载体——其包含编码特异性结合对

成员多肽链与可复制的种属显示包(generic display package)组分的融合物的核酸分子——和载体——其包含编码单个结合对成员第二多肽链的核酸分子——之间的重组,可制备抗体链或特异性结合对成员,所述技术例如,如以下所述:美国专利5,565,332、5,871,907或5,733,743。本领域也已知胞内抗体在细胞内抑制蛋白质功能的应用(参见,例如,Carlson,J.R.(1988)Mol.Cell.Biol.8:2638-2646;Biocca,S.等.(1990)EMBO J.9:101-108;Werge,T.M.等.(1990)FEBS Lett.274:193-198;Carlson,J.R.(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:7427-7428;Marasco,W.A.等.(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:7889-7893;Biocca,S.等.(1994)Biotechniques(NY)12:396-399;Chen,S-Y.等.(1994)Hum.Gene Ther.5:595-601;Duan,L等.(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:5075-5079;Chen,S-Y.等.(1994)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:5932-5936;Beerli,R.R.等.(1994)J.Biol.Chem.269:23931-23936;Beerli,R.R.等.(1994)Biochem.Biophys.Res.Commun.204:666-672;Mhashilkar,A.M.等.(1995)EMBO J.14:1542-1551;Richardson,J.H.等.(1995)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 92:3137-3141;Marasco等,PCT公开号WO 94/02610;和Duan等,PCT公开号WO 95/03832)。

[0148] 在另一个实施方式中,利用携带部分人免疫系统而非小鼠系统的转基因或转染色体小鼠,可生成针对PD-1、PD-L1或PD-L2的人单克隆抗体。在一个实施方式中,转基因小鼠,在本文中也被称为“HuMAb小鼠”,其包含编码未重排的人重链(μ和γ)及κ轻链免疫球蛋白序列的人免疫球蛋白基因迷你位点,与使内源性μ和κ链位点失活的目标突变在一起(Lonberg,N.等.(1994)Nature 368(6474):856 859)。因此,小鼠呈现小鼠IgM或κ的表达减少,并且在对免疫的应答中,被引入的人重链和轻链转基因经历类型转换和体细胞突变,从而生成高亲和力人IgGκ单克隆抗体(上述Lonberg,N.等.(1994);Lonberg,N.(1994)Handbook of Experimental Pharmacology 113:49 101中述及;Lonberg,N.和Huszar,D.(1995)Intern.Rev.Immunol.Vol.13:65 93和Harding,F.和Lonberg,N.(1995)Ann.N.Y Acad.Sci 764:536 546)。HuMAb小鼠的制备在以下中被述及:Taylor,L.等.(1992)Nucleic Acids Research 20:6287 6295;Chen,J.等.(1993)International Immunology 5:647 656;Tuaillon等.(1993)Proc.Natl.Acad.Sci USA 90:3720 3724;Choi等.(1993)Nature Genetics 4:117 123;Chen,J.等.(1993)EMBO J.12:821 830;Tuaillon等.(1994)J.Immunol.152:2912 2920;Lonberg等,(1994)Nature 368(6474):856 859;Lonberg,N.(1994)Handbook of Experimental Pharmacology 113:49 101;Taylor,L.等.(1994)International Immunology 6:579 591;Lonberg,N.和Huszar,D.(1995)Intern.Rev.Immunol.Vol.13:65 93;Harding,F.和Lonberg,N.(1995)Ann.N.Y.Acad.Sci 764:536 546;Fishwild,D.等.(1996)Nature Biotechnology 14:845 851。进一步参见,美国专利号5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;5,789,650;5,877,397;5,661,016;5,814,318;5,874,299;和5,770,429,全部属于Lonberg and Kay,and GenPharm International;美国专利号5,545,807,属于Surani等;国际公开号WO 98/24884,于1998年6月11日公开;WO 94/25585,于1994年11月10日公开;WO 93/1227,于1993年6月24日公开;WO 92/22645,于1992年12月23日公开;WO 92/03918,于1992年3月19日公开。

[0149] 在另一个实施方式中,本发明所应用的抗体是双特异性抗体。双特异性抗体在一个抗体多肽中具有两个不同抗原的结合位点。抗原结合可以同时或相继进行。三源杂交瘤

(trioma)和混合杂交瘤是可分泌双特异性抗体的细胞系的两个实例。美国专利4,474,893公开了由混合杂交瘤或三源杂交瘤产生的双特异性抗体的实例。已通过化学方法(Staerz等.(1985)Nature 314:628;和Perez等.(1985)Nature 316:354)和杂交瘤技术(Staerz和Bevan(1986)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,83:1453;和Staerz和Bevan(1986)Immunol.Today 7:241)构建双特异性抗体。美国专利5,959,084也述及双特异性抗体。美国专利5,798,229述及双特异性抗体片段。双特异性剂可通过以下生成:通过使制备不同抗体的杂交瘤或其他细胞融合而制成异质杂交瘤(heterohybridoma),然后鉴定生成和共同组装两抗体的克隆。其也可通过完全免疫球蛋白链或其部分——如Fab和Fv序列——的化学或遗传结合而生成。抗体组分可结合PD-1、PD-L1和/或PD-L2多肽。在一个实施方式中,双特异性抗体可特异性结合PD-1配体和PD-1多肽。

[0150] 还有本发明的另一方面涉及通过以下方法可得到的抗PD-1、PD-L1或PD-L2多肽抗体:包括——分别用免疫原性PD-1、PD-L1或PD-L2多肽或其免疫原性部分使动物免疫;以及然后从动物分离特异性结合该多肽的抗体。

[0151] 还有本发明另一方面中,部分或已知的抗体序列可用于生成和/或表达新型抗体。主要通过位于六个重链和轻链互补决定区(CDRs)中的氨基酸残基,使抗体与目标抗原进行相互作用。因此,各个抗体间CDRs中的氨基酸序列比CDRs外的序列更具多样性。由于CDR序列引起大多数抗体抗原相互作用,通过构建表达载体——该表达载体包含被移植到具有不同特性的不同抗体的框架序列上的具体天然存在抗体的CDR序列——表达模仿具体天然存在抗体特性的重组抗体是可能的(参见,例如,Riechmann,L.等,1998,Nature 332:323 327;Jones,P.等,1986,Nature 321:522 525;和Queen,C.等,1989,Proc.Natl.Acad.参见美国86:10029 10033)。这种框架序列可得自公开的DNA数据库,该数据库包括生殖系或非生殖系抗体基因序列。这些生殖系序列将不同于成熟的抗体基因序列,因为其将不包括完全组装的可变基因,该可变基因在B细胞成熟过程中通过V(D)J连接生成。生殖系基因序列也将不同于各自均匀分布在可变区中的高亲和力二级组库抗体的序列。例如,体细胞突变在框架区的氨基末端部分中相对少见。例如,体细胞突变在框架区1的氨基末端部分和框架区4的羧基末端部分中相对少见。此外,多种体细胞突变没有显著改变抗体的结合特性。因此,没有必要得到特定抗体的整个DNA序列以再建具有与原抗体相似的结合特性的整个重组抗体(参见1999年3月12日提交的PCT/US99/05535)。涵盖CDR区的部分重链和轻链序列一般足以满足该目的。利用该部分序列确定哪个生殖系和/或非生殖系可变并且连接有助于重组抗体可变基因的基因片段。然后利用该生殖系和/或非生殖系序列填充可变区的缺失部分。重链和轻链前导序列在蛋白质成熟过程中被切割,并且无助于最终抗体的特性。为添加缺失的序列,可通过连接或PCR扩增将克隆cDNA序列与合成的寡核苷酸组合。或者,可合成整个可变区作为短重叠寡核苷酸组,并通过PCR扩增组合,从而生成完全合成的可变区克隆。该方法具有一定的优势,如消除或内含或特定限制位点,或优化特定密码子。该方法也可用于筛选一个物种(例如,人)的特定免疫球蛋白编码序列库,从而从另一物种(例如,小鼠)的已知抗体序列设计同源免疫球蛋白编码序列(参见,例如,以下实施例节)。

[0152] 利用杂交瘤重链和轻链转录物的核苷酸序列设计合成寡核苷酸的重叠组,从而生成与天然序列具有相同氨基酸编码能力的合成V序列。合成的重链和κ链序列可以以三种方式不同于天然序列,该三种方式为:中断重复的核苷酸碱基串,以促进寡核苷酸合成和PCR

扩增;根据Kozak's规则(Kozak,1991,J.Biol.Chem.266L19867019870)整合最优的翻译起始位点;和改造翻译起始位点上游的HindIII位点。

[0153] 对于重链和轻链可变区,在相应非编码寡核苷酸的近似中点将最优化编码和相应的非编码链序列分解开为30-50个核苷酸。因此,对于每一条链,寡核苷酸可被组装到涵盖150-400个核苷酸的片段的重叠双链组中。然后可将该集合体(pool)用作模板以生成150-400个核苷酸的PCR扩增产物。一般,一个可变区寡核苷酸组会分开为两个集合体,该集合体分别被扩增以生成两个重叠的PCR产物。然后通过PCR扩增将这些重叠产物组合形成完整的可变区。PCR扩增中也可需要包括重链或轻链恒定区的重叠片段,以生成可易于被克隆到表达载体构建体中的片段。

[0154] 然后将重新构建的重链和轻链可变区与克隆启动子、前导序列、翻译起始、前导序列、恒定区、3'未翻译序列、多腺苷酸化序列和转录终止序列组合,形成表达载体构建体。重链和轻链表达构建体可被组合到单独的载体中,共转染、相继转染或分别转染到宿主细胞中,其然后被融合,从而生成表达两链的宿主细胞。

[0155] 该用途的质粒在本领域已知,并且包括以下实施例节中所提供的质粒。本发明的全人抗体和嵌合抗体也包括IgG2、IgG3、IgE、IgA、IgM和IgD抗体。可构建相似的质粒,以表达其他重链同种型或表达含λ轻链的抗体。

[0156] 因此,在本发明另一方面中,利用已知的非人抗体或人抗体(例如,小鼠抗人抗PD-1、PD-L1或PD-L2抗体,分别如抗体EH12.2H7、29E.2A3和24F.10C12)的结构特征生成结构上相关的人抗人PD-1、PD-L1或PD-L2抗体,该抗体保留至少一种本发明抗体的功能特性,如结合PD-1、PD-L1或PD-L2。另一功能特性包括在竞争ELISA分析中抑制EH12.2H7结合PD-1、29E.2A3结合PD-L1或24F.10C12结合PD-L2。在一些实施方式中,如实施例2所述IC50值所测,结构上相关的抗人PD-1、PD-L1或PD-L2抗体比抗体EH12.2H7、29E.2A3或24F.10C12对抗原具有更低的结合亲和力(例如,鼠参考抗体的亲和力不比结构上相关的抗体的3.0、2.0、1.9、1.8、1.7、1.6、1.5、1.4、1.3、1.2或1.1倍中的任一倍数大)。在一些实施方式中,如实施例2所述IC50值所测,结构上相关的抗人PD-1、PD-L1或PD-L2抗体比抗体EH12.2H7、29E.2A3或24F.10C12对抗原具有更高的亲和力(如,结构上相关抗体的亲和力为参考抗体的至少1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9或2.0倍)。此外,可将本发明的一个或多个CDR或可变区(例如,图2-7)与已知的人框架区和CDRs重组地组合,从而生成本发明的另外重组改造的人抗PD-1、PD-L1或PD-L2抗体。

[0157] 由于本领域公知抗体重链和轻链CDR3结构域在抗体对抗原的结合特异性/亲和力中具有特别重要的作用,如上所述制备的本发明的重组抗体优选包含本发明可变区的重链和轻链CDR3s(例如,图2-7)。抗体进一步可包含本发明可变区的CDR2s(例如,图2-7)。抗体进一步可包含本发明可变区的CDR1s(例如,图2-7)。抗体可进一步包含CDRs的任意组合。

[0158] 上述工程抗体的CDR1、CDR2和/或CDR3区可包含如本文所公开的本发明可变区的氨基酸序列那样确切的氨基酸序列(一种或多种)(例如,图2-7)。但是,普通技术人员会理解,在仍保持抗体有效结合PD-1、PD-L1或PD-L2的能力的同时,与确切的CDR序列有一些偏差是可能的(例如,保守序列改变)。因此,在另一个实施方式中,工程抗体可由一个或多个CDRs组成,该CDRs与本发明的一个或多个CDRs(例如,图2-7)例如50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%相同。

[0159] 除简单结合PD-1、PD-L1或PD-L2外，可由本发明抗体的如下其他功能特性的保持力来选择工程抗体——如上述抗体：

[0160] (1)结合人PD-1、PD-L1或PD-L2；

[0161] (2)抑制EH12.2H7结合PD-1、29E.2A3结合PD-L1或24F.10C12结合PD-L2；

[0162] (3)结合人PD-1，和抑制所结合的PD-1结合PD-1配体(例如，PD-L1和/或PD-L2)的能力；

[0163] (4)结合人PD-L1，和抑制所结合的PD-L1结合PD-L1配体(例如，PD-1和/或B7-1)的能力；

[0164] (5)结合人PD-L2，和抑制所结合的PD-L2结合PD-L2配体(例如，PD-1)的能力。

[0165] 以下显示抗体EH12.2H7、29E.2A3和24F.10C12的重链和轻链可变区氨基酸序列。

[0166] EH12.2H7重链可变区

[0167]

QVQLQQSGAELAKPGASVQMSCKASGYSFTSSWIHWVKQRPGQGLEWIGYIYPSTGFTEYNQKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARWRDSSGYHAMDYWGQGTSVTVSS(SEQ ID NO:76)

[0168] EH12.2H7轻链可变区

[0169]

DIVLTQSPASLTVSLGQRATISCRASQSVSTSGYSYMHWYQQKPGQPPKLLIKFGSNLESGIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYCQHSWEIPYTFGGGTKLEIK(SEQ ID NO:77)

[0170] 29E.2A3重链可变区

[0171]

EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQKPGQGLEWIGYVNPFNDGTKYNEMFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARQAWGYPWGQGTLVTVSA(SEQ ID NO:78)

[0172] 29E.2A3轻链可变区

[0173]

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRATESVEYYGTSLVQWYQQKPGQPPKLLIYAASSVDSGVPARFSGSGSGTDFSLTIHPVEEDDIAMYFCQQSRRVPYTFGGGTKLEIK(SEQ ID NO:79)

[0174] 24F.10C12重链可变区

[0175]

QVQLQQSAAELARPGASVKMSCKASGYTFTGYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPRSGYTEYNQKFKDKTTLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARPWFAYWGQGTLVTVSA(SEQ ID NO:80)

[0176] 24F.10C12轻链可变区

[0177]

DIVMTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLAVYYCQNDYSYPLTFGAGTKLELK(SEQ ID NO:81)

[0178] 通过检验抗体阻断PD-1、PD-L1或PD-L2与其配体结合的能力，可确定抗体抑制PD-1、PD-L1或PD-L2结合其配体(一种或多种)的活性。可应用标记配体和抗体存在下的竞争ELISA分析。例如，为确定抗PD-L1抗体是否可以阻断PD-1与PD-L1之间的相互作用，进行竞争性结合实验。用抗PD-L1抗体预温育表达PD-L1的细胞，然后添加生物素化的PD-1-Ig融合蛋白质。如果抗PD-L1抗体以剂量依赖性方式和高亲合力阻断PD-1-Ig的结合，则认为抗PD-L1抗体有效抑制PD-1与PD-L1之间的相互作用。可进行类似的检验以检验有效抑制PD-1与

PD-L2的相互作用的抗体。

[0179] IV.重组的表达载体和宿主细胞

[0180] 本发明另一方面涉及载体，优选表达载体，其包含编码本发明一种或多种多肽(例如，图2-7)(或其部分)的一种、两种或更多种核酸分子。如本文所用，术语“载体”指能运输与其所连接的另一种核酸的核酸分子。一类载体是“质粒”，其指环状双链DNA环，其中可连接另外的DNA片段。另一类载体是病毒载体，其中另外的DNA片段可连接到病毒基因组中。某些载体能在其所引入的宿主细胞中自主复制(例如，具有细菌复制起点的细菌载体和附加型哺乳动物载体)。其他载体(例如，非附加型哺乳动物载体)在被引入宿主细胞时整合到宿主细胞的基因组中，从而随宿主基因组复制。此外，某些载体能引导其所可操作地连接的基因的表达。这种载体在本文中也被称为“表达载体”。一般，可用于重组DNA技术的表达载体通常是质粒形式。在本说明书中，“质粒”和“载体”可互换使用，因为质粒是载体的最常用形式。但是，本发明意图包括这样的其他形式表达载体，如病毒载体(例如，复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)，其具有同等功能。

[0181] 本发明的重组表达载体包括适于在宿主细胞中表达核酸的形式的本发明核酸，意思是重组表达载体包括在与所表达的核酸序列可操作地连接、在用于表达的宿主细胞的基础上选择的一种或多种调节序列。在重组表达载体中，“可操作地连接”意指目标核苷酸序列以允许核苷酸序列表达(例如，于体外转录/翻译系统中或载体被引入宿主细胞时在宿主细胞中)的方式连接调节序列(一种或多种)。术语“调节序列”意图包括启动子、增强子及其他表达控制元件(例如，多腺苷酸化信号)。这种调节序列在例如，Goeddel(1990)Methods Enzymol.185:3-7中被述及。调节序列包括在多种宿主细胞中引导核苷酸序列组成型表达的调节序列和仅在某些宿主细胞中引导核苷酸序列表达的调节序列(例如，组织特异性调节序列)。本领域技术人员将理解的是，表达载体的设计可取决于如下因素：所转化的宿主细胞的选择、所需蛋白质的表达水平及类似因素。可将本发明的表达载体引入宿主细胞，从而生成由如本文所述核酸编码的蛋白质或肽，包括融合蛋白质或肽。

[0182] 可设计本发明的重组表达载体以在原核或真核细胞中表达本发明多肽(例如，图2-7)。例如，多肽可在细菌细胞——如大肠杆菌(E.coli)、昆虫细胞(利用杆状病毒表达载体)、酵母细胞或哺乳动物细胞中表达。适当的宿主细胞在上述Goeddel(1990)中被进一步述及。或者，例如利用T7启动子调节序列和T7聚合酶，重组的表达载体可在体外转录和翻译。

[0183] 原核生物中的多肽表达最常在这样的大肠杆菌中进行：具有含有引导融合或非融合蛋白质表达的组成型或诱导型启动子的载体。融合载体向其中被编码的多肽——通常是重组多肽的氨基末端——添加了许多氨基酸。这种融合载体一般用于三个目的：1)增加重组多肽的表达；2)增加重组多肽的溶解性；和3)通过在亲和纯化中作为配体辅助重组多肽的纯化。通常，在融合表达载体中，在融合部分和重组多肽的接合点引入蛋白水解切割位点，以使重组多肽能在融合蛋白质纯化后与融合部分分离。这种酶及其同源识别序列包括Xa因子、凝血酶和肠激酶。一般的融合表达载体包括pGEX(Pharmacia Biotech Inc;Smith，D.B.和Johnson，K.S.(1988)Gene67:31-40)、pMAL(New England Biolabs，Beverly，Mass.)和pRIT5(Pharmacia，Piscataway，NJ)，其分别将谷胱甘肽S转移酶(GST)、麦芽糖E结合蛋白质或蛋白质A融合至目标重组多肽。

[0184] 适当的诱导型非融合大肠杆菌表达载体的实例包括pTrc(Amann等.(1988)Gene 69:301-315)和pET 1 Id(Studier等.(1990)Methods Enzymol.185:60-89)。pTrc载体的目标基因表达取决于杂交trp-lac融合启动子的宿主RNA聚合酶转录。pET 11 d载体的目标基因表达取决于共表达的病毒RNA聚合酶(T7 gn1)介导的T7 gn10-lac融合启动子的转录。该病毒聚合酶由宿主菌株BL21(DE3)或HMS174(DE3)提供,该菌株来自在lacUV 5启动子的转录控制下具有T7 gn1基因的寄居原噬菌体。

[0185] 使大肠杆菌中的重组多肽表达最大化的一种策略是在蛋白水解性切割重组多肽的能力减弱的宿主细菌中表达多肽(Gottesman,S.(1990)Methods Enzymol.185:119-128)。另一种策略是改变插入表达载体中的核酸的核酸序列,以使各氨基酸各自的密码子是大肠杆菌中优先使用的密码子(Wada等.(1992)Nucleic Acids Res.20:2111-2118)。可通过标准DNA合成技术对本发明的核酸序列进行这种改变。

[0186] 在另一个实施方式中,表达载体是酵母表达载体。酵母酿酒酵母(S.cerevisiae)中表达载体的实例包括pYepSec1(Baldari等.(1987)EMBO J.6:229-234)、pMFa(Kurjan和Herskowitz(1982)Cell 30:933-943)、pJRY88(Schultz等.(1987)Gene 54:113-123)、pYES2(Invitrogen Corporation,San Diego,Calif.)和picZ(Invitrogen Corp,San Diego,Calif.)。

[0187] 或者,可利用杆状病毒表达载体在昆虫细胞中表达本发明的多肽(例如,图2-7)。可用于在培养的昆虫细胞(例如,Sf 9细胞)中表达多肽的杆状病毒载体包括pAc系列(Smith等.(1983)Mol.CellBiol.3:2156-2165)和pVL系列(Lucklow和Summers(1989)Virology 170:31-39)。

[0188] 还有另一个实施方式中,利用哺乳动物表达载体在哺乳动物细胞中表达本发明的核酸(例如,图2-7)。哺乳动物表达载体的实例包括pCDM8(Seed,B.(1987)Nature 329:840)和pMT2PC(Kaufman等.(1987)EMBO J.6:187-195)。当用于哺乳动物细胞时,表达载体的控制功能通常由病毒的调节元件提供。例如,常用的启动子得自多瘤病毒(polyma)、腺病毒2、巨细胞病毒和猴病毒(Simian Virus)40。对于其他适合的原核和真核细胞表达系统,参见Sambrook,J.等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual.2nd ed.,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1989的第16和17章。

[0189] 在另一个实施方式中,重组的哺乳动物表达载体能引导核酸优先在特定细胞类型中表达(例如,利用组织特异性调节元件表达核酸)。组织特异性调节元件在本领域中公知。适当的组织特异性启动子的非限制性实例包括白蛋白启动子(肝特异性;Pinkert等.(1987)Genes Dev.1:268-277)、淋巴特异性启动子(Calame and Eaton(1988)Adv.Immunol.43:235-275)、T细胞受体的特定启动子(Winoto and Baltimore(1989)EMBO J.8:729-733)和免疫球蛋白的特定启动子(Banerji等.(1983)Cell 33:729-740;Queen和Baltimore(1983)Cell 33:741-748)、神经元特异性启动子(例如,神经细丝启动子;Byrne和Ruddle(1989)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:5473-5477)、胰腺特异性启动子(Edlund等.(1985)Science 230:912-916)和乳腺特异性启动子(例如,乳清启动子;美国专利号4,873,316和欧洲申请公开号264,166)。例如鼠hox启动子(Kessel和Gruss(1990)Science 249:374-379)和α.-胎蛋白启动子(Campes和Tilghman(1989)Genes Dev.3:537-546)也包括发

育调节启动子。

[0190] 本发明另一方面涉及本发明核酸分子(例如,图2-7)被引入的宿主细胞,该核酸分子是在包含使其同源重组到宿主细胞基因组特异位点中的序列的重组表达载体或核酸分子内被引入到所述宿主细胞的。术语"宿主细胞"和"重组的宿主细胞"在本文中可互换使用。要理解的是,这样的术语不仅指特定的对象细胞,也指该细胞的子代或潜在子代。因为某些改变由于突变或环境影响可在后代中发生,事实上该子代可能与亲代细胞不一致,但仍被包括在本文所用术语的范围内。

[0191] 宿主细胞可以是任意原核或真核细胞。例如,可在细菌细胞——如大肠杆菌、昆虫细胞、酵母或哺乳动物细胞(如中国仓鼠卵巢细胞(CHO)或COS细胞)中表达本发明的多肽(例如,图2-7)。其他适合的宿主细胞是本领域技术人员公知的。

[0192] 通过常规的转化或转染技术可将载体DNA引入原核或真核细胞。如本文所用,术语"转化"和"转染"意指多种本领域公认的将外源核酸(例如,DNA)引入宿主细胞的技术,包括磷酸钙或氯化钙共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂质转染或电穿孔法。在如下中可找到适当的转化或转染宿主细胞的方法:Sambrook等(Molecular Cloning:A Laboratory Manual.2nd,ed.,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1989)及其他实验室手册。

[0193] 对于哺乳动物细胞的稳定转染,已知的是,取决于所使用的表达载体和转染技术,仅小部分细胞可将外源DNA整合到其基因组中。为了识别和选择这些整合体,一般将编码选择性标记(例如,对抗生素的抗性)的基因连同目的基因一起引入宿主细胞。优选的选择性标记包括赋予药物抗性的标记,如G418、潮霉素和甲氨蝶呤。可将编码选择性标记的核酸在与编码PD-L2多肽相同的载体上引入宿主细胞,或者在单独的载体上引入。通过药物选择可鉴定随引入的核酸稳定转染的细胞(例如,当其他细胞死亡时,已整合选择性标记基因的细胞将存活)。

[0194] 本发明的宿主细胞,如培养中的原核或真核宿主细胞可用于生成(即,表达)本发明的多肽(例如,图2-7)。因此,本发明进一步提供利用本发明宿主细胞生成本发明多肽(例如,图2-7)的方法。在一个实施方式中,本方法包括在适当的培养基中培养本发明的宿主细胞(已引入编码本发明多肽(例如,图2-7)的重组表达载体),从而生成本发明的多肽(例如,图2-7)。在另一个实施方式中,本方法进一步包括从培养基或宿主细胞中分离本发明的多肽(例如,图2-7)。

[0195] 如下所述,本发明的宿主细胞也可用于生成非人转基因动物。

[0196] V.生成复合型人PD-1、PD-L1或PD-L2抗体的转基因和转染色体非人动物的制备

[0197] 还有另一方面,本发明提供转基因和转染色体非人动物,如转基因或转染色体小鼠,其能表达与PD-1、PD-L1或PD-L2特异性结合的人单克隆抗体。在特定的实施方式中,本发明提供这样的转基因或转染色体小鼠:其具有包含人重链转基因的基因组,从而在用PD-1、PD-L1或PD-L2抗原和/或表达PD-1、PD-L1或PD-L2的细胞进行免疫时,该小鼠生成人抗PD-1、PD-L1或PD-L2抗体。根据本领域公知的方法,可将人重链转基因整合到小鼠染色体DNA中,作为转基因——例如,HuMAb——小鼠的情况。或者,将人重链转基因保持在染色体外,作为如WO 02/43478所述的转染色体(例如,KM)小鼠的情况。通过进行V-D-J重组和同种型转换,这种转基因和转染色体小鼠能生成PD-1、PD-L1或PD-L2的人单克隆抗体的多种同

种型(例如,IgG、IgA和/或IgE)。同种型转换可通过以下发生:例如,经典或非经典同种型转换。

[0198] 应答用异源抗体组库的外源抗原刺激的转基因或转染色体非人动物的设计要求转基因动物中所包含的异源免疫球蛋白转基因贯穿B细胞的发育途径正确地产生作用。这包括:例如,异源重链转基因的同种型转换。因此,构建转基因,以产生同种型转换和一种或多种如下的抗体:(1)高水平和细胞型特异性的表达、(2)功能基因重排、(3)等位基因排斥的激活和应答、(4)足够的主要组库的表达、(5)信号转导、(6)体细胞超突变和(7)免疫应答过程中转基因抗体基因座的控制。

[0199] 无需符合全部上述标准。例如,在其中转基因动物的内源免疫球蛋白基因座在功能上受阻的那些实施方式中,转基因无需激活等位基因排斥。进一步,在其中转基因包括功能上重排的重链和/或轻链免疫球蛋白基因的那些实施方式中,功能基因重排的第二个标准——至少对于已重排的该转基因——不是必需的。至于分子免疫学的背景,参见,Fundamental Immunology,2nd edition(1989),Paul William E.,ed.Raven Press,N.Y。

[0200] 在某些实施方式中,用于生成本发明人单克隆抗体的转基因或转染色体非人动物在转基因动物的生殖系中包含重排的异源免疫球蛋白重链和轻链转基因、未重排的异源免疫球蛋白重链和轻链转基因或者重排和未重排的异源免疫球蛋白重链和轻链转基因的组合。各重链转基因包括至少一个CH基因。此外,重链转基因可包含功能同种型转换序列,其能支持转基因动物B细胞中编码多种CH基因的异源转基因的同种型转换。这种转换序列可以是天然存在于作为转基因CH基因来源的物种的生殖系免疫球蛋白基因座中的序列,或者这种转换序列可以得自接受转基因构建体的物种(转基因动物)中存在的序列。例如,如果其整合了与小鼠重链基因座中天然存在的序列相似的转换序列,用于制备转基因小鼠的人转基因构建体可产生较高频率的同种型转换事件,大概因为小鼠转换序列被优化,以与小鼠转换重组酶酶系统一起发挥作用,而人转换序列则不这样。转换序列可通过常规的克隆方法分离和克隆,或从如下开始重新合成:在关于免疫球蛋白转换区序列的公开序列信息的基础上设计的重叠合成寡核苷酸(Mills等,Nucl.Acids Res.15:7305 7316(1991);Sideras等,Intl.Immunol.1:631 642(1989))。对于各前述转基因动物,在转基因动物B细胞的相当部分(至少10%)中发现功能上重排的异源重链和轻链免疫球蛋白转基因。

[0201] 用于生成本发明转基因动物的转基因包括重链转基因,该重链转基因包括编码至少一个可变(V)基因片段、一个多样性(D)基因片段、一个连接(J)基因片段和至少一个恒定区基因片段的DNA。免疫球蛋白轻链转基因包括编码至少一个V基因片段、一个J基因片段和至少一个恒定区基因片段的DNA。编码轻链和重链基因片段的基因片段对于转基因非人动物来说是异源的,因为它们来源于或相应于编码不是由转基因非人动物组成的物种的免疫球蛋白重链和轻链基因片段的DNA。在本发明的一方面中,构建转基因,以使各个基因片段未重排,即,没有重排,从而编码功能性免疫球蛋白轻链或重链。这种未重排的转基因支持V、D和J基因片段的重组(功能性重排),优选支持当暴露于PD-1、PD-L1或PD-L2抗原时,在转基因非人动物内产生的重排免疫球蛋白重链中整合全部或部分D区基因片段。

[0202] 在可供选择的选择方式中,转基因包括未重排的“迷你基因座”。这种转基因一般包括C、D和J片段的主要部分和V基因片段的亚型。在这样的转基因构建体中,多种RNA处理、重组信号及类似的调节序列——例如,启动子、增强子、种类转换区、剪接供体和剪接受体

序列——包括得自异源DNA的相应序列。可将这种调节序列整合入本发明所用非人动物相同或相关的物种的转基因中。例如，可将人免疫球蛋白基因片段与转基因小鼠中所用的啮齿动物免疫球蛋白增强子序列组合到转基因中。或者，可将合成调节序列整合入转基因，其中这样的合成调节序列与已知哺乳动物基因组中天然存在的功能DNA序列不是同源的。根据一致规则——如：例如，指定剪接受体位点或启动子/增强子基序的允许序列的规则——设计合成调节序列。例如，迷你基因座包括：基因组免疫球蛋白基因座的一部分，其与天然存在的生殖系Ig基因座相比，具有非必需DNA部分(例如，间插序列；内含子或其部分)的至少一个内部(即，不是在该部分末端)缺失。

[0203] 本发明所用的转基因和转染色体小鼠可呈现具有主要组库的免疫球蛋白生成，理想地与天然小鼠的基本相似。因此，例如，在内源Ig基因失活的实施方式中，总免疫球蛋白水平可在血清的约0.1至10mg/ml或约0.5至5mg/ml或至少约1.0mg/ml的范围内。当能实现IgM转换为IgG的转基因被引入转基因鼠时，成年小鼠的血清IgG与IgM的比可以为约10∶1。IgG与IgM的比将在未成年鼠中大幅下降。一般，大于约10％，优选40至80％的脾和淋巴结B细胞专门表达人IgG蛋白质。

[0204] 组库将理想地接近天然小鼠所显示的组库，通常至少约10％高，或25至50％或以上。一般，主要取决于引入小鼠基因组的不同V、J和D区的数量，将产生至少约上千种不同的免疫球蛋白(理想地是IgG)，例如，优选10^4至10^6或以上。这些免疫球蛋白一般会识别约一半或以上高抗原性蛋白质，例如，葡萄球菌蛋白质A。一般，免疫球蛋白会显示对预选抗原低于10^{-7}M的亲和力(K_D)，如低于10^{-8}M、10^{-9}M或10^{-10}M甚至更低。

[0205] 在一些实施方式中，可优选生成具有预定组库的小鼠，从而限制对预定抗原类型的抗体应答中所显示的V基因的选择。具有预定组库的重链转基因可包括：例如，人对预定抗原类型的抗体应答中优先使用的人V_H基因。或者，一些V_H基因可由于各种理由(例如，编码对预定抗原高亲和力V区的可能性低；进行体细胞突变和亲和力激化(sharpening)的倾向性低；或对特定人具有免疫原性)被排除在限定的组库外。因此，在包含不同重链或轻链基因片段的转基因重排前，例如，通过杂交或DNA测序可容易地鉴定这样的基因片段，因为其来自不是转基因动物的生物物种。

[0206] 可用——例如，PD-1、PD-L1或PD-L2抗原和/或表达PD-1、PD-L1或PD-L2的细胞的纯化或富集制备物——对上述转基因和转染色体小鼠免疫。或者，可用编码人PD-1、PD-L1或PD-L2的DNA使转基因小鼠免疫。然后小鼠将产生B细胞，该B细胞通过转基因内转换重组(顺式转换)进行种类转换，和表达可与PD-1、PD-L1或PD-L2反应的免疫球蛋白。免疫球蛋白可以是人抗体(也被称为“人序列抗体”)，其中人转基因序列编码重链和轻链多肽，所述人转基因序列可包括通过体细胞突变得到的序列和V区重组接合点以及生殖系编码序列；即使其他非生殖系序列可由于体细胞突变和差异的V-J和V-D-J重组接合点而存在，这些人抗体也可被称为与人V_L或V_H基因片段和人J_L或D_H和J_H片段编码的多肽序列基本一致。各抗体链的可变区一般至少80％由人生殖系V、J和——在重链情况下——D基因片段编码；经常至少85％的可变区由存在于转基因上的人生殖系序列编码；通常90％或95％或以上的可变区序列由存在于转基因上的人生殖系序列编码。但是，由于非生殖系序列通过体细胞突变及VJ和VDJ连接被引入，人序列抗体会经常具有一些可变区序列(而恒定区序列较不经常)，该可变区序列不是由小鼠生殖系的人转基因(一种或多种)中所发现的人V、D或J基因片段编码。

一般，这种非生殖系序列(或各自的核苷酸位点)会在CDRs中或附近或已知体细胞突变聚集的区域中聚集。

[0207] 结合预定抗原的人抗体可由同种型转换产生，从而生成包括人序列γ链(如γ1、γ2a、γ2B或γ3)和人序列轻链(如κ)的人抗体。这种同种型转换的人抗体常常包含一种或多种体细胞突变(一种或多种)，其一般位于可变区，并且通常在CDR的约10个残基之中或之内，由特别是二级(或随后的)抗原挑战后的亲和力成熟和抗原的B细胞选择造成。这些高亲和力的人抗体可具有低于10^{-7}M的结合亲和力(K_D)，如低于10^{-8}M、10^{-9}M、10^{-10}M、10^{-10}M甚至更低的结合亲和力(K_D)。

[0208] 本发明的另一方面包括得自本文所述转基因或转染色体小鼠的B细胞。B细胞可用于生成表达人单克隆抗体的杂交瘤，该人单克隆抗体以高亲和力(例如，低于10^{-7}M)结合人PD-1、PD-L1或PD-L2。

[0209] 通过如下方法可促进对PD-1、PD-L1或PD-L2的高亲和力人单克隆抗体的发育：所述方法用于在具有包含整合人免疫球蛋白转基因的基因组的转基因小鼠中扩大人可变区基因片段的组库，所述方法包括将含有V区基因片段的V基因转基因引入基因组，该V区基因片段不存在于所述的整合人免疫球蛋白转基因中。通常，V区转基因是人造酵母染色体，其包括如可天然存在于人基因组中或如可通过重组法分别剪接在一起的人V_H或V_L(V_K)基因片段阵列的一部分，其可包括无序或遗漏的V基因片段。通常YAC上包含至少五个或更多功能V基因片段。在该变异中，可能通过V组库扩张法生成转基因小鼠，其中该小鼠表达这样的免疫球蛋白链：包含存在于V区转基因上的V区基因片段所编码的可变区序列和在人Ig转基因上编码的C区。通过V组库扩张法的手段，可生成具有至少5个不同V基因的转基因小鼠；如包含至少约24个或更多V基因的小鼠可生成的。一些V基因片段可不具功能性(例如，假基因及类似基因)；这些片段可被保留，或如需，可通过技术人员可用的重组法被选择性去除。

[0210] 一旦小鼠生殖系经改造包含具有扩张V片段组库的功能YAC——其基本不存在于含有J和C基因片段的人Ig转基因中，该特性可被传播和繁殖到其他遗传背景中，包括这样的背景：其中具有扩张V片段组库的功能YAC被繁殖到具有不同人Ig转基因的小鼠生殖系中。具有扩张V片段组库的多种功能YAC可被繁殖到生殖系中，与人Ig转基因(一种或多种)共同作用。虽然在本文中也被称为YAC转基因，但这种转基因在被整合到基因组中时可大幅缺乏酵母序列，如酵母自主复制所需的序列；在酵母中的复制不再必要后(即，在引入小鼠ES细胞或小鼠前受精卵前)，通过基因工程(例如，限制酶切消化和脉冲场凝胶电泳或其他适合的方法)可将这种序列任选地去除。传播人序列免疫球蛋白表达特性的方法包括繁殖含有人Ig转基因(一种或多种)并且任选也含有具有扩张V片段组库的功能YAC的转基因小鼠。V_H和V_L基因片段均可存在于YAC上。转基因鼠可被繁殖到从业者所需的任何背景中，包括具有其他人转基因——包括人Ig转基因和/或编码其他人淋巴细胞蛋白质的转基因——的背景。本发明也提供由具有扩张V区组库YAC转基因的转基因小鼠生成的高亲和力人序列免疫球蛋白。虽然前文描述了本发明所述转基因动物的优选实施方式，但考虑已被分为如下四类的其他实施方式：

[0211] (1)包含未重排的重链和重排的轻链免疫球蛋白转基因的转基因动物；

[0212] (2)包含未重排的重链和未重排的轻链免疫球蛋白转基因的转基因动物；

[0213] (3)包含重排的重链和未重排的轻链免疫球蛋白转基因的转基因动物；和

[0214] (4)包含重排的重链和重排的轻链免疫球蛋白转基因的转基因动物。

[0215] VI.抗体结合物/免疫毒素

[0216] 另一方面,本发明描述了结合治疗部分——如细胞毒素、药物(例如,免疫抑制剂)或放射性同位素——的人PD-1、PD-L1或PD-L2抗体。当结合细胞毒素时,这些抗体结合物被称为"免疫毒素"。细胞毒素或细胞毒剂包括对细胞有害(例如,杀伤细胞)的任何药剂。实例包括紫杉醇、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、依托泊苷、tenoposide、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、阿霉素、柔红霉素、二羟基炭疽菌素二酮、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素D、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素及其类似物或同系物。治疗剂包括但不限于抗代谢物(例如,甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶氨烯咪胺)、烷化剂(例如,氮芥、塞替哌(thioepa)苯丁酸氮芥、苯丙氨酸氮芥、亚硝(基)脲氮芥(BSNU)和环己亚硝脲(CCNU)、环磷酰胺(cyclothosphamide)、白消安、二溴甘露醇、链脲霉素、丝裂霉素C和顺式二氯二胺络铂(II)(DDP)顺铂)、蒽环类抗生素(例如,柔红霉素(原道诺霉素)和阿霉素)、抗生素(例如,更生霉素(原放线菌素)、博莱霉素、光神霉素和氨茴霉素(AMC))和抗有丝分裂剂(例如,长春新碱和长春碱)。本发明的抗体可结合放射性同位素——例如,放射性碘,从而生成用于治疗相关疾病——如,癌症——的细胞毒性放射性药物。

[0217] 可在诊断上或预后上使用结合的人PD-1、PD-L1或PD-L2抗体,以监测组织中的多肽水平,作为临床检验程序的一部分,例如,从而——例如,确定给定治疗方案的效力。将抗体与可检测物质偶联(即,物理连接)可有助于检测。可检测物质的实例包括多种酶、辅基、荧光物质、发光物质、生物发光物质和放射性物质。适当酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、P-半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;适当辅基复合物的实例包括链霉抗生物素蛋白/生物素和抗生物素蛋白/生物素;适当荧光物质的实例包括伞形酮、荧光素、荧光素异硫氰酸酯、若丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光物质的实例包括鲁米诺;生物发光物质的实例包括荧光素酶、虫荧光素和水母发光蛋白;以及适当放射性物质的实例包括^{125}I、^{131}I、^{35}S或^{3}H。

[0218] 本发明的抗体结合物可用于调节给定的生物应答。治疗部分并非被解释为限于经典的化学治疗剂。例如,药物部分可以是具有所需生物活性的蛋白质或多肽。这种蛋白质可包括:例如,酶活性毒素或其活性片段,如相思豆毒素、篦麻毒素A、假单胞菌属外毒素或白喉毒素;蛋白质,如肿瘤坏死因子或干扰素γ;或生物应答调节物,如,例如,淋巴因子、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")或其他细胞因子或生长因子。

[0219] 使这样的治疗部分与抗体结合的技术是公知的,参见,例如,Arnon等,"Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy",Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy,Reisfeld等(eds.),pp.243 56(Alan R.Liss,Inc.1985);Hellstrom等,"Antibodies For Drug Delivery",Controlled Drug Delivery(2nd Ed.),Robinson等(eds.),pp.623 53(Marcel Dekker,Inc.1987);Thorpe,"Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review",Monoclonal Antibodies'84:Biological And Clinical Applications,Pinchera等(eds.),pp.475 506(1985);"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(eds.),pp.303 16(Academic Press 1985)和Thorpe等,"The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates",Immunol.Rev.,62:119 58(1982)。

[0220] VII.药物组合物

[0221] 另一方面,本发明提供组合物,例如,药物组合物,其包含与药学上可接受的载体一起配制的本发明的一种单克隆抗体或其抗原结合部分(一种或多种)(如抗原结合片段)或单克隆抗体或其抗原结合部分(一种或多种)(如抗原结合片段)的组合。在一个实施方式中,组合物包括多种(例如,两种或更多种)本发明分离的人抗体的组合。优选地,组合物中各抗体结合PD-1、PD-L1和/或PD-L2的不同预选表位。

[0222] 也可在组合治疗中给予本发明的药物组合物,即,组合其他药剂。例如,组合治疗可包括本发明的组合物和至少一种或多种另外的治疗剂,如抗炎性剂、DMARD(疾病调节抗风湿药物)、免疫抑制剂、化疗剂和银屑病药剂。也可协同放射治疗给予本发明的药物组合物。本发明也包括与其他抗体——如,CD4特异性抗体和IL-2特异性抗体——共同给药。

[0223] 如本文所用,"药学上可接受的载体"包括生理上相容的任何和全部溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等渗和吸收延缓剂及类似物。优选地,载体适于静脉内、肌肉内、皮下、肠胃外、脊柱或表皮给药(例如,通过注射或输液)。取决于给药的途径,活性化合物——即,抗体、双特异性和多特异性分子——可被包裹在材料中,以保护化合物不受酸和使化合物失活的其他自然条件影响。

[0224] "药学上可接受的盐"指保留所需的母体化合物生物活性并且没有给予任何所不希望的毒理学效应的盐(参见:例如,Berge、S.M.,等.(1977)J.Pharm.Sci.66:119)。这种盐的实例包括酸加成盐和碱加成盐。酸加成盐包括得自无毒无机酸——如盐酸、硝酸、磷酸、硫酸、氢溴酸、氢碘酸、亚磷酸及类似无机酸——的盐和得自无毒有机酸——如,脂肪族单羧酸和二羧酸、苯基取代烷酸、羟基烷酸、芳香酸、脂肪族和芳香族磺酸及类似有机酸——的盐。碱加成盐包括得自碱土金属——如钠、钾、镁、钙及类似碱土金属——的盐和得自无毒有机胺——如N,N'-二苄乙烯二胺、N-甲葡糖胺、氯普鲁卡因、胆碱、二乙醇胺、乙二胺、普鲁卡因及类似有机胺——的盐。

[0225] 可通过本领域已知的多种方法给予本发明所述的组合物。如技术人员将理解,给药的途径和/或方式将取决于所需的结果而变化。可将活性化合物连同将防止化合物迅速释放的载体一起制备,如控释制剂,包括植入物、透皮贴剂和微囊传送系统。可使用生物可降解、生物相容的聚合物,如乙烯醋酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。这种制剂的多种制备方法被授予专利权或被本领域技术人员普遍了解。参见,例如,Sustained and Cotrolled Release Drug Delivery Systems,J.R.Robinson,ed.,Marcel Dekker,Inc.,New York,1978。

[0226] 为了通过某些给药途径给予本发明的化合物,可有必要用防止其失活的材料包被该化合物,或使该化合物与之共同给予。例如,可将化合物在适当的载体——例如,脂质体或稀释剂——中给予个体。药学上可接受的稀释剂包括盐水和缓冲水溶液。脂质体包括水中油中水CGF乳液和常规的脂质体(Strejan等.(1984)J.Neuroimmunol.7:27)。

[0227] 药学上可接受的载体包括无菌水溶液或分散液和用于临时制备无菌可注射溶液

或分散液的无菌粉末。这种药学活性物质的介质和药剂的应用在本领域公知。除任何常规介质或药剂与活性化合物不相容的范围外，考虑其在本发明的药物组合物中的应用。也可将补充活性化合物并入组合物中。

[0228] 治疗组合物一般必须无菌并且在制备和储存条件下稳定。可将组合物配制成溶液、微乳液、脂质体或其他适于高药物浓度的规则结构。载体可以是溶剂或分散介质，其包含，例如，水、乙醇、多元醇(例如，甘油、丙二醇和液态聚乙二醇及类似物)及其适当混合物。例如，通过使用包衣——如，卵磷脂，通过在分散的情况下保持所需的颗粒大小，以及通过使用表面活性剂，可保持适合的流动性。在多种情况下，将优选在组合物中包含等渗剂，例如，糖、多元醇——如甘露醇、山梨醇——或氯化钠。通过在组合物中包含延迟吸收的药剂——例如，单硬脂酸盐和凝胶——可造成可注射组合物的吸收延长。

[0229] 在通过将适当溶剂中所需含量的活性化合物与上述一种成分或成分组合合并，如需，然后进行除菌微滤，可制备无菌的可注射溶液。一般，通过将活性化合物并入包含基本分散介质和上面例举的成分中其他所需成分的无菌载体，制备分散液。对于用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况，优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥(冻干法)，该方法从其之前无菌过滤溶液生成活性成分和任何其他所需成分的粉末。

[0230] 调整用药方案以提供最佳所需反应(例如，治疗反应)。例如，可给予单独的大丸剂(bolus)，可随时间给予若干个分剂量，或者可如治疗情况的紧急度指示按比例减少或增加剂量。例如，可通过每周一次或两次皮下注射或者通过每月一次或两次皮下注射给予本发明的人抗体。以单位剂型配制肠胃外组合物，对于给药的容易性和剂量的均匀性尤其有益。本文所用的单位剂型指适于作为所治疗对象的单一剂量的物理分离单位；各单位包含活性化合物经计算与所需的药学载体一起产生期望疗效的预定量。本发明的单位剂型的规格由以下规定和直接决定：(a)活性化合物的独特特性和所要实现的特定治疗效果；和(b)治疗个体敏感性的这种活性化合物合成领域中的固有限制。

[0231] 在一个实施方式中，本发明所述的药剂是抗体。如本文所限定，治疗有效量的抗体(即，有效剂量)的范围是约0.001至30mg/kg体重；或约0.01至25mg/kg体重；或约0.1至20mg/kg体重；或约1至10mg/kg、2至9mg/kg、3至8mg/kg、4至7mg/kg、或5至6mg/kg体重。技术人员会理解，某些因素可影响有效治疗对象所需的剂量，包括但不限于，疾病或病症的严重程度、在前治疗、一般健康状况和/或对象年龄、以及存在的其他疾病。此外，以治疗有效量的抗体对对象进行的治疗可包括单独的治疗，或者优选包括一系列治疗。也会被理解的是，治疗所用抗体的有效剂量可随特定治疗的过程增加或减少。剂量的变化可源于诊断分析的结果。

[0232] 药学上可接受的抗氧化剂的实例包括：(1)水溶性抗氧化剂，如抗坏血酸、半胱氨酸盐酸盐、硫酸氢钠、偏亚硫酸氢钠、亚硫酸钠及类似物；(2)油溶性抗氧化剂，如抗坏血酸棕榈酸酯、丁基化羟基苯甲醚(BHA)、丁基化羟基甲苯(BHT)、卵磷脂、没食子酸丙酯、α-生育酚及类似物；和(3)金属螯合剂，如柠檬酸、乙二胺四乙酸(EDTA)、山梨醇、酒石酸、磷酸及类似物。

[0233] 对于治疗组合物，本发明的制剂包括适于口服、鼻服、局部(包括口腔含化和舌下含化)、直肠、阴道和/或肠胃外给药的制剂。制剂可以方便地以单位剂型提供，并且可以通过制药领域中任何已知的方法制备。可与载体材料组合生成单独剂型的活性成分的含量将

取决于所治疗的对象和特定的给药方式而变化。可与载体材料组合生成单独剂型的活性成分的含量一般将是产生治疗效果的组合物的含量。一般，超过100％，该含量将在以下范围内：约0.001％至约90％的活性成分，或者约0.005％至约70％，或者约0.01％至约30％。

[0234] 适于阴道给药的本发明制剂也包括阴道栓剂、棉球、膏剂、凝胶剂、糊剂、泡沫或喷雾制剂，其包含本领域已知适合的这种载体。本发明组合物局部或透皮给药的剂型包括粉末、喷雾剂、软膏剂、糊剂、膏剂、洗剂、凝胶剂、溶液、贴剂和吸入剂。活性化合物可在无菌条件下与药学上可接受的载体混合，与可能需要的任何防腐剂、缓冲剂或推进剂混合。

[0235] 本文所用的短语“肠胃外给药”和“肠胃外给予”意为除肠内和局部给药外的通常通过注射的给药方式，无限制地包括静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心脏内、皮内、腹膜内、经气管、皮下、表皮下、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外和胸骨内(intrastemal)注射和灌注。

[0236] 本发明药物组合物中可用的适当的水载体和非水载体的实例包括：水、乙醇、多元醇(如甘油、丙二醇、聚乙二醇及类似物)及其适当的混合物；植物油，如橄榄油；和可注射的有机酯，如油酸乙酯。通过使用包衣材料——如卵磷脂，通过在分散的情况下保持所需的颗粒大小，以及通过使用表面活性剂，可保持适合的流动性。

[0237] 这些组合物也可包含佐剂如防腐剂、润湿剂、乳化剂和分散剂。通过上述除菌程序和通过内含多种抗细菌和抗真菌剂——例如，对羟苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚山梨酸及类似物，可确保防止微生物存在。可能也需要在组合物中包含等渗剂，如糖、氯化钠及类似物。此外，通过内含延迟吸收的试剂——如单硬脂酸铝和凝胶，可造成可注射药物形式的吸收延长。

[0238] 当将本发明的化合物作为药物给予人和动物时，可将其单独给予或作为药物组合物给予，该药物组合物包含：例如，与药学上可接受的载体结合的0.001至90％(例如，0.005至70％，如0.01至30％)的活性成分。

[0239] 无论选择何种给药途径，通过本领域技术人员已知的常规方法，均可将可以以适当的水合形式使用的本发明化合物和/或本发明药物组合物配制成药学上可接受的剂型。

[0240] 本发明药物组合物的活性成分的实际剂量水平可被改变，从而得到有效达到对于特定患者、组合物和给药形式所期望的治疗反应、并对患者无毒的活性成分量。所选的剂量水平将取决于多个药代动力学因素，包括所用的本发明特定组合物或其酯、盐或酰胺的活性、给药途径、给药时间、所用特定化合物的排泄速度、治疗的持续时间、与所用特定组合物联合使用的其他药物、化合物和/或材料、所治疗患者的年龄、性别、体重、情况、一般健康状况和前医疗史、以及医疗领域公知的类似因素。具有本领域普通技能的医师或兽医可容易确定和开处所需药物组合物的有效量。例如，医师或兽医可使药物组合物中所用的本发明化合物以低于达到期望治疗效果所需要的水平的剂量开始，并逐渐增加剂量直到达到期望的效果。一般，本发明组合物的适当日剂量将是这样的化合物量：其是有效产生治疗效果的最低剂量。这种有效剂量一般将取决于上述因素。优选静脉内、肌肉内、腹膜内或皮下给药，优选接近目标位点给药。如需，可任选地以单位剂型在全天以适当的间隔分别给予两次、三次、四次、五次、六次或更多次分计量，给予有效日剂量的治疗组合物。尽管可以单独给予本发明的化合物，优选以药物制剂(组合物)给予该化合物。

[0241] 可以用本领域已知的医疗装置给予治疗组合物。例如，在一个实施方式中，可用无

针皮下注射器——如美国专利号5,399,163、5,383,851、5,312,335、5,064,413、4,941,880、4,790,824或4,596,556所公开的装置——给予本发明所述的治疗组合物。本发明可用的公知的植入体和组件的实例包括:美国专利号4,487,603,其公开了用于以受控的速率配药的可植入微输注泵;美国专利号4,486,194,其公开了用于通过皮肤给药的治疗装置;美国专利号4,447,233,其公开了用于以精确的输注速率输送药物的药疗输注泵;美国专利号4,447,224,其公开了用于连续药物输送的可变流动可植入输注装置;美国专利号4,439,196,其公开了具有多室间隔的渗透药物输送系统;和美国专利号4,475,196,其公开了渗透药物输送系统。本领域技术人员了解多种其他这样的植入体、输送系统和组件。

[0242] 在某些实施方式中,可制备本发明的人单克隆抗体,确保在体内适当的分布。例如,血脑屏障(BBB)排斥多种高亲水性化合物。为了确保本发明的治疗化合物穿过BBB(如需),其可被配制于,例如,脂质体中。至于制备脂质体的方法,参见:例如,美国专利号4,522,811;5,374,548;和5,399,331。脂质体可包括一个或多个部分,其被选择性地输送到特异性细胞或器官中,从而提高靶向药物输送(参见,例如,V.V.Ranade(1989)J.Clin.Pharmacol.29:685)。示例性靶向部分包括叶酸或生物素(参见,例如,Low等,美国专利号5,416,016);甘露糖苷(Umezawa等,(1988)Biochem.Biophys.Res.Commun.153:1038);抗体(P.G.Bloeman等.(1995)FEBS Lett.357:140;M.Owais等.(1995)Antimicrob.Agents Chemother.39:180);表面活性蛋白A受体(Briscoe等.(1995)Am.J.Physiol.1233:134),其不同种类可组成本发明的制剂和发明分子的组分;p120(Schreier等.(1994)J.Biol.Chem.269:9090);同样参见K.Keinanen;M.L.Laukkanen(1994)FEBS Lett.346:123;J.J.Killion;I.J.Fidler(1994)Immunomethods 4:273。在本发明的一个实施方式中,本发明的治疗化合物被制于脂质体中;在另一个实施方式中,脂质体包括靶向部分。还有另一个实施方式中,通过大丸剂注射将脂质体中的治疗化合物递送到接近肿瘤或感染的位点。组合物必须具有达到易注射程度的流动性。其必须在制备和储存条件下稳定,并且必须被保存,防止微生物——如细菌和真菌——的污染行为。

[0243] 组合物必须无菌,并且具有达到可通过注射器输送该组合物的程度的流动性。除水外,载体可以是等渗缓冲盐水溶液、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液态聚乙二醇(polyetheylene glycol)及类似物)及其适当的混合物。例如,通过利用包覆如卵磷脂,通过在分散的情况下保持所需颗粒大小和通过使用表面活性剂,可保持合适的流动性。在多种情况下,优选在组合物中包含等渗剂,例如,糖、多元醇——如甘露醇或山梨醇、和氯化钠。通过在组合物中包含延迟吸收的试剂——例如,单硬脂酸铝或凝胶,可造成可注射的组合物被长期吸收。

[0244] 当活性化合物被适当地保护时,如上所述,可口服给予该化合物,例如,用惰性稀释剂或可同化的食用载体。

[0245] VIII.本发明的应用和方法

[0246] 本文所述的抗体(包括抗体的衍生物和结合物)和包含该抗体的组合物可用于多种体外和体内诊断和治疗应用(例如,通过上调或下调免疫应答)。例如,结合至PD-1或B7-1的PD-1配体传导抑制信号。因此,调节PD-1与PD-1配体之间或PD-1配体与B7多肽之间的相互作用导致免疫应答得到调节。PD-1配体也可共刺激T细胞。因此,在一个实施方式中,阻断PD-1配体与PD-1或B7之间相互作用的抗体可防止抑制性信号传导。在一个实施方式中,阻

断PD-1配体共刺激信号的抗体阻断传向免疫细胞的共刺激信号。此外，PD-L2的连接可诱导细胞因子分泌和树突细胞存活。因此，阻断PD-L2连接的抗体可抑制树突细胞存活和减少树突细胞的细胞因子表达，并通过这些机制抑制免疫应答。特别是，本文所述的抗体可用于有关PD-1、PD-L1和/或PD-L2介导的特定病症的诊断、预后、预防和治疗应用，如述，例如，在Keir等.(2008)Annu.Rev.Immunol.26:677;Sharpe等，(2007)Nat.Immunol.8:239;Freeman等.(2007)J.Exp.Med.10:2223中；在此引入其中每一个其全部作为参考。

[0247] 在一个实施方式中，本发明的抗体和抗原结合片段可用于有关神经变性疾病(老年精神病、阿尔茨海默病、唐氏综合征、帕金森病、克-雅二氏病、糖尿病神经病变、帕金森综合征、亨廷顿病、马查多-约瑟夫病、肌萎缩性侧索硬化、糖尿病神经病变和克-雅二氏病)的诊断、预后、预防和治疗应用。

[0248] 在另一个实施方式中，本发明的抗体和抗原结合片段可用于促进免疫反应的疾病的诊断、预后、预防和治疗应用(如治疗和延迟疾病的发作或进程)，例如，哮喘、自身免疫性疾病(肾小球肾炎、关节炎、扩张型心肌病型疾病、溃疡性结肠炎(ulceous colitis)、斯耶格伦综合征、克罗恩病、全身性红斑(systemic erythematodes)、慢性类风湿关节炎、多发性硬化、银屑病、变应性接触性皮炎、多肌炎(polymyosiis)、皮肤增厚、结节性动脉外膜炎、风湿热、普通白癜风、胰岛素依赖型糖尿病、贝切特病、桥本病、阿狄森病、皮肌炎、重症肌无力、赖特综合征、格雷夫斯病、恶性贫血(anaemia perniciosa)、肺出血一肾炎综合征、不育症、慢性活动性肝炎、天疱疮、自身免疫性血小板减少性紫癜、和自身免疫性溶血性贫血、活动性慢性肝炎、阿狄森病、抗磷脂综合征、特应性变态反应、自身免疫性萎缩性胃炎、自身免疫性胃酸缺乏(achlorhydra autoimmune)、腹部疾病、库兴综合征、皮肌炎、盘状狼疮、红斑狼疮、肺出血一肾炎综合征、桥本甲状腺炎、特发性肾上腺萎缩、特发性血小板减少、胰岛素依赖型糖尿病、郎-伊二氏综合征、狼疮样肝炎、淋巴细胞减少一些病例、混合性结缔组织病、类天疱疮、普通天疱疮、恶性贫血(pernicious anema)、晶状体源性葡萄膜炎(phacogenic uveitis)、结节性多动脉炎、多腺体自身综合征、原发性胆汁性肝硬变、原发性硬化性胆管炎、雷诺综合征、复发性多软骨炎、施密特综合征、局限性硬皮病(或顶脊综合征)、交感性眼炎、全身性红斑狼疮、高安动脉炎、颞动脉炎、甲状腺毒症、B型胰岛素抵抗、溃疡性结肠炎和韦格纳肉芽肿)。

[0249] 还有另一个实施方式中，本发明的抗体和抗原结合片段可用于诊断、预后、预防和治疗应用(如治疗和延迟疾病的发作或进程)，以进行持续性传染病(例如，病毒传染病，包括HPV、HBV、丙型肝炎病毒(HCV)、逆转录病毒如人免疫缺陷病毒(HIV-1和HIV-2)、疱疹病毒如EB病毒(EBV)、巨细胞病毒(CMV)、HSV-1和HSV-2以及流感病毒)的治疗和/或预防。如本文所述可利用的与病原体有关的其他抗原是多种寄生物的抗原，包括疟疾，优选基于NANP重复序列的疟疾肽。此外，细菌、真菌和其他病原性疾病包括：如曲霉(Aspergillus)、布鲁属(Brugia)、假丝酵母(Candida)、衣原体(Chlamydia)、球虫(Coccidia)、隐球菌(Cryptococcus)、恶丝虫(Dirofilaria)、淋球菌(Gonococcus)、组织胞浆菌(Histoplasma)、利什曼原虫(Leishmania)、分枝杆菌(Mycobacterium)、支原体(Mycoplasma)、草履虫(Paramecium)、百日咳菌(Pertussis)、变形体(Plasmodium)、肺炎球菌(Pneumococcus)、肺囊虫(Pneumocystis)、立克次体(Rickettsia)、沙门氏菌(Salmonella)、志贺氏杆菌(Shigella)、葡萄球菌(Staphylococcus)、链球菌

(Streptococcus)、弓形体(Toxoplasma)和霍乱弧菌(Vibriocholerae)。示例性物种包括：淋病奈瑟菌(Neisseria gonorrhea)、结核分枝杆菌(Mycobacterium tuberculosis)、白色假丝酵母(Candida albicans)、热带假丝酵母(Candida tropicalis)、阴道毛滴虫(Trichomonas vaginalis)、阴道嗜血杆菌(Haemophilus vaginalis)、B组链球菌属某种(Group B streptococcus sp.)、Microplasma hominis、杜克雷嗜血杆菌(Hemophilus ducreyi)、腹股沟肉芽肿(Granuloma inguinale)、性病性淋巴肉芽肿(Lymphopathia venereum)、梅毒密螺旋体(Treponema pallidum)、流产布鲁氏杆菌(Brucella abortus)、羊流产布鲁氏杆菌(Brucella melitensis)、猪流产布鲁氏杆菌(Brucella suis)、犬布鲁氏菌(Brucella canis)、胎儿弯曲菌(Campylobacter fetus)、胎儿弯曲菌肠亚种(Campylobacter fetus intestinalis)、波摩那钩端螺旋体(Leptospira pomona)、单核细胞增多性李斯特菌(Listeria monocytognes)、羊布鲁氏菌(Brucella ovis)、鹦鹉热衣原体(Chlamydia psittaci)、牛毛滴虫(Trichomonas foetus)、鼠弓形体(Toxoplasma gondii)、大肠杆菌(Escherichia coli)、马驹放线杆菌(Actinobacillus equuli)、羊流产沙门氏菌(Salmonella abortus ovis)、羊流产沙门氏菌(Salmonella abortus equi)、绿脓杆菌(Pseudomonas aeruginosa)、马棒状杆菌(Corynebacterium equi)、化脓棒状杆菌(Corynebacterium pyogenes)、精子放线杆菌(Actinobaccilus seminis)、牛生殖器支原体(Mycoplasma bovigenitalium)、烟曲霉(Aspergillus fumigatus)、分支犁头霉(Absidia ramosa)、马媾疫锥虫(Trypanosoma equiperdum)、弩巴贝虫(Babesia caballi)、破伤风杆菌(Clostridium tetani)、肉毒杆菌(Clostridium botulinum)；或真菌，如，例如，巴西副球孢子菌(Paracoccidioides brasiliensis)；或其他病原体，例如，镰状疟原虫(Plasmodium falciparum)。也包括国家变应性与传染病研究所(NIAID)优先病原体。其包括A类剂，如重型天花(痘疮)、炭疽杆菌(Bacillus anthracis)(炭疽)、鼠疫耶氏菌(Yersinia pestis)(鼠疫)、肉毒杆菌毒素(肉毒杆菌中毒)、土拉热弗朗西丝氏菌(Francisella tularensis)(土拉菌病)、纤丝病毒(埃博拉出血热、马尔堡出血热)、沙粒病毒(Lassas(拉沙热)、Junin(阿根廷出血热)和相关病毒)；B类剂，如伯纳特立克次体(Coxiella burnetti)(Q热)、布鲁氏菌属的种(布鲁氏菌病)、鼻疽伯克霍尔德菌(Burkholderia mallei)(鼻疽)、α病毒(委内瑞拉脑脊髓炎、东部和西部马脑脊髓炎)、蓖麻(Ricinus communis)(蓖麻子)的篦麻毒素、产气荚膜梭状芽孢杆菌(Clostridium perfringens)的ε毒素；葡萄球菌肠毒素(Staphylococcus enterotoxin)B、沙门氏菌属的种、志贺氏痢疾杆菌(Shigella dysenteriae)、大肠杆菌菌株O157:H7、霍乱弧菌(Vibrio cholerae)、小型隐孢菌(Cryptosporidium parvum)；C类剂，如尼帕病毒(nipah virus)、汉坦病毒、蜱传出血热病毒、蜱传脑炎病毒、黄热病和多元抗药结核病；蠕虫、如血吸虫(Schistosoma)和绦虫(Taenia)；和原生动物，如利什曼原虫(例如，墨西哥利什曼原虫)和变形体。

[0250] 还有另一个实施方式中，本发明所述的抗体或抗原结合片段可用于如下的诊断、预后、预防和治疗应用：器官移植排斥、移植物抗宿主病(GVHD)、变应性疾病和PD-1、PD-L1和/或PD-L2参与的免疫反应衰减引起的疾病——例如，癌症和传染病。

[0251] 根据如下已知的方法，将本文所述的抗体或抗原结合片段给予个体：如静脉内(例如，以大丸剂或通过连续输注一段时间)、皮下、肌肉内、腹膜内、脑脊髓内、关节内、滑膜内、

鞘内或吸入途径给药。

[0252] 如果得到一个或多个有益或预期的结果——包括期望的临床结果，个体就得到治疗。对于本发明的目的，有益或期望的临床结果包括但不限于如下其中一个或多个：减少疾病引起的一种或多种症状、提高遭受疾病的个体的生活质量、减少治疗疾病所需的其他药疗的剂量、延缓疾病进程和/或延长个体的存活。

[0253] 1.筛选方法

[0254] 本发明一方面涉及利用本抗体通过调节共刺激来调节免疫应答的方法(如，调节PD-1、PD-L1或PD-L2功能的抗体)。这种方法应用筛选分析，包括基于细胞和非基于细胞的分析。在一个实施方式中，该分析提供了鉴定调节PD-1配体与PD-1之间相互作用的抗体的方法。在另一个实施方式中，该分析提供了鉴定调节PD-1配体与B7多肽之间相互作用的抗体的方法。

[0255] 在一个实施方式中，本发明涉及筛选这样的候选物或检验这样的抗体的分析：其结合或调节PD-1、PD-L1或PD-L2的活性，例如，调节多肽与其同源结合配偶体相互作用(例如，结合其同源结合配偶体)的能力。在一个实施方式中，鉴定调节免疫应答的抗体的方法涉及确定抗体调节——例如，增强或抑制——PD-1与PD-1配体之间相互作用的能力和进一步确定抗体调节PD-1配体与B7多肽之间相互作用的能力。在一个实施方式中，选择调节PD-1配体与PD-1之间相互作用(例如，不调节PD-1配体与B7多肽之间相互作用)的抗体。在另一个实施方式中，选择调节PD-1配体与B7多肽之间相互作用(例如，不调节PD-1配体与PD-1之间相互作用)的抗体。

[0256] 在另一个实施方式中，鉴定降低免疫应答的抗体的方法涉及：确定候选抗体增强PD-1配体与B7多肽之间相互作用的能力；和选择抑制PD-1配体与B7多肽之间相互作用的抗体。在另一个实施方式中，鉴定降低免疫应答的抗体的方法涉及：确定候选抗体增强PD-1配体与PD-1之间相互作用的能力；和选择增强PD-1配体与PD-1之间相互作用的抗体。

[0257] 在一个实施方式中，分析是基于细胞的分析，包括用检验抗体接触表达PD-1、PD-L1或PD-L2的细胞，和确定检验抗体调节(例如，刺激或抑制)PD-1或PD-1配体目标结合其结合配偶体的能力。例如，通过测量直接结合或通过测量免疫细胞激活的参数，可实现确定PD-1、PD-1配体或B7多肽结合其结合配偶体或与其结合配偶体相互作用的能力。

[0258] 例如，在直接结合分析中，PD-1或PD-1配体蛋白质(或其各自的目标多肽)可与放射性同位素或酶标记结合，从而通过检测复合物中标记的蛋白质，可确定PD-1配体与PD-1或与B7多肽的结合。例如，PD-1或PD-1可用^{125}I、^{35}S、^{14}C或^{3}H直接或间接标记，通过放射(radioemmission)直接计数或通过闪烁计数检测放射性同位素。或者，PD-1或PD-1配体可被如下酶标记：例如，辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或荧光素酶，并且可通过确定适当底物向产物的转化，检测酶标记。

[0259] 同样在本发明范围内的是，不标记其中任何相互作用物，确定化合物调节PD-1与PD-1配体之间或PD-1配体与B7多肽之间相互作用的能力。例如，可利用微生理记录仪(microphysiometer)以其目标多肽，检测PD-1与PD-1配体之间或PD-1配体与B7多肽之间的相互作用，而没有标记PD-1、PD-1配体、B7多肽或目标多肽(McConnell，H.M.等.(1992) Science 257:1906-1912)。如本文所用，“微生理记录仪”(例如，Cytosensor)是利用光寻址电位传感器(LAPS)测量细胞酸化其环境的速率的分析仪器。该酸化速率的改变可用作化合

物与受体间相互作用的指示。

[0260] 在另一个实施方式中，通过确定多肽组一个或多个成员的活性，可实现确定抗体对抗给定组多肽间相互作用的能力。例如，通过如下可确定PD-1或PD-1配体的活性：检测细胞第二信使(例如，酪氨酸激酶活性)的诱导，检测适当底物的催化/酶活性，检测报道基因(包括与编码可检测标记物——氯霉素乙酰转移酶——的核酸可操作地连接的目标应答调节元件)的诱导，或检测PD-1或PD-1配体调控的细胞应答。例如，通过测量增殖分析中化合物调节免疫细胞共刺激或抑制的能力，或通过干扰所述多肽结合识别其部分的抗体的能力，可实现确定抗体结合所述多肽或与所述多肽相互作用的能力。

[0261] 当被添加到体外分析中时，阻断或抑制PD-1配体与共刺激的受体相互作用的抗体以及促进PD-1配体介导的抑制信号的抗体可通过其抑制免疫细胞增殖和/或效应子功能或诱导无反应性的能力被鉴定。例如，可在通过激活受体在刺激信号转导的试剂存在的情况下培养细胞。多种公认的细胞激活读数器可用于测量激活剂存在下的细胞增殖或效应子功能(例如，抗体生成、细胞因子生成、吞噬作用)。通过利用本领域已知的技术测量抗体实现所测增殖或效应子功能降低的能力，可容易地确定检验抗体阻断此激活的能力。

[0262] 例如，可在T细胞分析中检验本发明的抗体抑制或增强共刺激的能力，如Freeman等.(2000)J.Exp.Med.192:1027和Latchman等.(2001)Nat.Immunol.2:261所述。CD4+T细胞可从人PBMC中分离，并用激活的抗CD3抗体刺激。通过^{3}H胸苷结合可测定T细胞的增殖。分析中有无CD28共刺激，均可进行分析。可用来自PBMC的Jurkat T细胞和PHA胚细胞进行类似的分析。

[0263] 还有另一个实施方式中，本发明的分析是无细胞分析，其中用检验抗体接触PD-1或PD-1配体或其生物活性部分，并确定检验抗体结合多肽或其生物活性部分的能力。检验抗体与PD-1或PD-1配体多肽的结合可如上所述被直接或间接确定。还有另一个实施方式中，分析包括：用其结合配偶体接触多肽或其生物活性部分以形成分析混合物，用检验抗体接触该分析混合物，以及确定检验抗体与分析混合物中的多肽相互作用的能力，其中确定检验抗体与多肽相互作用的能力包括：确定检验抗体相对于结合配偶体优先结合多肽或其生物活性部分的能力。

[0264] 例如，可利用PD-1配体和PD-1多肽形成分析混合物，并且通过上述确定结合的其中一个方法确定PD-1结合PD-1配体的能力和确定PD-1配体结合PD-1多肽的能力，可检验检验抗体阻断此相互作用的能力。利用技术如实时生物分子相互作用分析(BIA)(Sjolander，S.and Urbaniczky，C.(1991)Anal.Chem.63:2338-2345和Szabo等.(1995)Curr.Opin.Struct.Biol.5:699-705)，也可实现确定PD-1多肽结合PD-1配体的能力和确定PD-1配体结合B7多肽的能力。如本文所用，“BIA”是不标记任何相互作用物(例如，BIA核)的情况下实时研究生物特异性相互作用的技术。表面等离子体共振(SPR)的光学现象的改变可用作生物多肽间的实时反应的指示。可将PD-1、PD-1配体和B7多肽固定在BIA核芯片上，并且可检验抗体与PD-1、PD-1配体和B7多肽的结合。利用BIA技术的实例由Fitz等.(1997)Oncogene 15:613述及。

[0265] 本发明的无细胞分析适用于可溶蛋白质和/或膜结合形式蛋白质(例如，PD-1配体或PD-1蛋白质或其生物活性部分、或PD-1配体或PD-1结合的结合配偶体)。在使用膜结合形式蛋白质(例如，细胞表面PD-1配体或PD-1受体)的无细胞分析情况下，使用增溶剂以使膜

结合形式蛋白质保持溶解可能是理想的。这种增溶剂的实例包括:非离子型洗涤剂,如正辛基葡糖苷、正十二烷基葡糖苷、正十二烷基麦芽糖苷、辛酰基-N-甲基葡糖酰胺、癸酰基-N-甲基葡糖酰胺、Triton®X-100、Triton®X-114、Thesit®、异三癸基聚(乙二醇醚)$_n$、3-[(3-胆酰氨基丙基(cholamidopropyl))二甲基氨基(amminio)]-1-丙烷磺酸酯(CHAPS)、3-[(3-胆氨基丙基)二甲基氨基]-2-羟基-1-丙烷磺酸酯(CHAPSO)或N-十二烷基=N,N-二甲基-3-氨基-1-丙烷磺酸酯。

[0266] 在上述分析方法的一个或多个实施方式中,可能需要将PD-1、PD-1配体和B7多肽或适当的目标多肽固定,从而有助于使蛋白质其中之一或两蛋白质的复合形式从未复合形式分离,并且从而适应分析自动化。检验抗体与PD-1或PD-1配体的结合可在任何适于容纳反应物的容器中实现。该容器的实例包括:微型滴定板、试管和微型离心管。在一个实施方式中,可提供这样的融合蛋白质:其增加了使蛋白质其中之一或两蛋白质与基质结合的结构域。例如,可将谷胱甘肽-S-转移酶/PD-1、PD-1配体或B7多肽融合蛋白质或者谷胱甘肽-S-转移酶/目标融合蛋白质吸附在谷胱甘肽琼脂糖小珠(Sigma Chemical,St.Louis,MO)或谷胱甘肽衍生的微型滴定板上,然后将其与检验化合物结合,在利于复合物形成的条件(例如,盐和pH的生理条件)下温育该混合物。温育后,洗涤小珠或微型滴定板孔,从而去除任何未结合的组分,小珠情况下将基质固定,直接或间接地确定复合物,例如,如上所述。或者,可将复合物从基质解离,利用标准技术确定PD-1、PD-1配体或B7多肽的结合水平或活性水平。

[0267] 在可供选择的实施方式中,通过如下可实现确定检验化合物调节PD-1或PD-1配体活性的能力:确定检验抗体调节作用于PD-1下游或PD-1配体的多肽——例如,与PD-1配体相互作用的多肽或例如通过与PD-1的细胞质结构域相互作用而作用于PD-1下游的多肽——的活性的能力。例如,可确定第二信使的水平,可确定反应物多肽对于适当目标的活性,或可如上所述确定反应物与适当目标的结合。

[0268] 本发明进一步涉及通过上述筛选分析鉴定到的新型抗体。因此,在适当的动物模型中进一步应用如本文所述所鉴定的抗体是在本发明的范围内的。例如,可在动物模型中应用如本文所述所鉴定的抗体以确定用该抗体治疗的效力、毒性或副作用。或者,可在动物模型中应用如本文所述所鉴定的抗体以确定该抗体的作用机制。此外,本发明涉及上述筛选分析所鉴定的新型抗体对于本文所述治疗的应用。

[0269] 2.预防性方法

[0270] 一方面,本发明涉及用于预防个体内与有害或低于理想免疫应答相关的疾病或病症的方法。例如,通过任何本领域已知的诊断或预后分析或本领域已知的诊断或预后分析的组合,可鉴定处于疾病危险的个体,其将从用所要求保护的抗体或方法的治疗受益。可在与有害或低于理想的免疫应答相关的病症表现前进行预防性抗体的给予。基于临床迹象可确定用于治疗的适当抗体,以及,例如利用本文所述的筛选分析可鉴定用于治疗的适当抗体。

[0271] 3.治疗方法

[0272] 本发明另一方面涉及——例如,通过调节PD-1与PD-1配体之间和/或PD-1配体和B7多肽之间相互作用——调节免疫应答的治疗方法。例如,PD-1与PD-1配体之间或PD-1配体与B7多肽之间相互作用的调节导致免疫应答得到调节。因此,在一个实施方式中,阻断

PD-1与PD-1配体之间相互作用的抗体可防止抑制性信号传导。PD-1配体也可增强T细胞的共刺激信号。因此，在另一个实施方式中，防止PD-1配体提供共刺激信号的抗体可抑制T细胞共刺激。

[0273] 这些调节抗体可在体外(例如，通过用抗体接触细胞)，或可选地在体内(例如，通过向对象给予该剂)被给予。因此，本发明涉及如下方法：例如，通过调节PD-1配体与PD-1或B7多肽之间相互作用，治疗患有疾病或病症的个体，其将从免疫应答的调节受益。

[0274] 4.免疫应答的下降调节

[0275] 本发明多个实施方式关于上调PD-1配体的抑制功能或下调PD-1配体的共刺激功能从而下调免疫应答。下降调节可以是抑制或阻断已进行中的免疫应答的形式，或可包括防止免疫应答的诱导。通过下调免疫细胞应答或通过诱导免疫细胞的特异性无反应性或二者，可抑制激活的免疫细胞的功能。

[0276] 例如，可利用如下下调免疫应答：通过PD-1配体阻断共刺激(例如，同时不导致或增大PD-L1与PD-1之间的相互作用)的抗PD-1配体抗体，或促进PD-1配体与PD-1结合(例如，同时不导致或同时通过PD-1配体抑制共刺激)的抗PD-1配体抗体。

[0277] 本发明的一个实施方式中，通过共同给予抗原和阻断PD-1配体共刺激的抗体，针对特定的抗原诱导耐受性。例如，可针对特定的蛋白质诱导耐受性。在一个实施方式中，可抑制对不需要免疫应答的变应原或外源蛋白质的免疫应答。例如，频繁接收VIII因子的患者产生抗该凝血因子的抗体。阻断PD-1配体介导的共刺激信号的抗体或刺激PD-1介导的抑制信号的抗体结合重组的VIII因子(或通过与VIII因子物理连接，例如，通过交联)的共同给予可导致下降调节。

[0278] 在一个实施方式中，可将下调免疫应答的两个单独药剂组合成单个组合物，或分别给予(同时或相继)，从而更有效地下调个体内免疫细胞介导的免疫应答。此外，治疗活性量的其中一种或多种主题抗体可与其他下调剂协同使用，从而影响免疫应答。其他免疫调节剂的实例包括而不限于：阻断共刺激信号(例如，抗CD28或ICOS)的抗体、作为CTLA4激动剂的抗体和/或抗其他免疫细胞标记物(例如，抗CD40、抗CD40配体或抗细胞因子)的抗体、融合蛋白质(例如，CTLA4-Fc)以及免疫抑制药物(例如，雷帕霉素、环孢霉素A或FK506)。

[0279] 下调或防止PD-1配体共刺激，或促进PD-1配体与PD-1之间的相互作用可用于下调如下的免疫应答：例如，在组织、皮肤和器官的移植情况中、在移植物抗宿主病(GVHD)中或在炎性疾病——如全身性红斑狼疮和多发性硬化中。例如，免疫细胞功能的阻断导致组织移植中的组织破坏减少。一般，在组织移植中，移植物的排斥通过免疫细胞将其识别为外源而开始，然后发生破坏移植物的免疫反应。在移植前或与移植同时单独或协同另一种下调剂给予抑制PD-1配体共刺激的抗体，可促进抑制信号生成。此外，PD-1配体共刺激信号的抑制或者PD-1配体或PD-1抑制信号的促进也可足以使免疫细胞无变应性(anergize)，从而诱导个体的耐受性。通过阻断PD-1配体介导的共刺激信号来诱导长期耐受性可避免这些阻断剂重复给药的必要性。

[0280] 为了实现个体内足够的免疫抑制或耐受，可能也需要阻断其他多肽的共刺激功能。例如，可能需要在移植前或与移植同时，通过(分别或在单个的组合物中一起)给予可溶形式的如下组合而阻断B7-1、B7-2或B7-1和B7-2的功能：具有这些抗原其中每一种的活性的肽、抗这些抗原的阻断抗体或阻断小分子。或者，可能需要促进PD-1配体或PD-1的抑制活

性和抑制B7-1和/或B7-2的共刺激活性。可连同本发明的下调方法使用的其他下调剂包括：例如，通过CTLA4传导抑制信号的下调剂、可溶形式的CTLA4、通过CTLA4激活抑制信号的抗体、抗其他免疫细胞标记物或可溶形式的其他受体配体对的阻断抗体(例如，破坏CD40与CD40配体之间相互作用的剂(例如，抗CD40配体抗体))、抗细胞因子的抗体或免疫抑制药物。

[0281] 免疫应答下降调节也可用于治疗自身免疫性疾病。多种自身免疫性疾病源于不恰当的免疫细胞激活，其具有抗自身组织的反应性，并且其促进疾病病理所涉及的细胞因子和自身抗体生成。防止自身反应性免疫细胞激活可减少或消除疾病症状。给予如下反应剂可用于抑制免疫细胞激活和防止在疾病过程中可能涉及的自身抗体或细胞因子生成：其通过破坏PD-1配体与B7多肽之间的相互作用，或通过促进PD-1配体与PD-1之间的相互作用，并没有调节PD-1配体与B7多肽之间的相互作用或同时下调PD-1配体与B7多肽之间的相互作用，阻断免疫细胞的共刺激。此外，促进PD-1配体或PD-1的抑制功能的药剂可诱导自身反应性免疫细胞的抗原特异性耐受性，其可导致长期减缓疾病。利用多个经良好表征的人类自身免疫性疾病动物模型，可确定药剂防止或减轻自身免疫性疾病的效力。实例包括鼠实验性自身免疫性脑炎、MRL/lpr/lpr小鼠或NZB杂交小鼠的全身性红斑狼疮、鼠自身免疫性胶原性关节炎、NOD小鼠和BB大鼠糖尿病和鼠实验性重症肌无力(参见，例如，Paul ed.，Fundamental Immunology，Raven Press，New York，Third Edition 1993，第30章)。

[0282] 免疫细胞激活的抑制——例如，通过抑制IgE生成——可治疗性应用于变态反应和变应性反应的治疗。可将促进PD-1配体或PD-1抑制功能的抗体给予变应性对象，以抑制个体内免疫细胞介导的变应性反应。通过联合适当的MHC多肽暴露于变应原，可伴随免疫细胞PD-1配体共刺激的抑制或PD-1配体或PD-1抑制途径的刺激。取决于变应原的进入途径和IgE在肥大细胞或嗜碱性细胞上的沉积模式，变应性反应本身可以是全身性的或局部性的。因此，免疫细胞介导的变应性反应的抑制可通过局部或系统地给予抑制PD-1配体与共刺激受体相互作用的抑制形式的药剂或促进PD-1配体或PD-1抑制功能的抗体而实现。

[0283] 通过阻断PD-1配体共刺激或通过促进PD-1配体与PD-1之间的相互作用抑制免疫细胞激活也可以在免疫细胞病毒感染的治疗中至关重要。例如，在获得性免疫缺陷综合征(AIDS)中，免疫细胞激活刺激病毒复制。这些相互作用的调节可导致病毒复制被抑制，从而改善AIDS过程。这些相互作用的调节也可用于促进妊娠的保持。PD-1配体通常在胎盘滋养层——即形成母体与胎儿间分界面并且可对防止胎儿的母体排斥发挥作用的细胞层——中高度表达。可用调节这些相互作用的药剂治疗由于胚胎或胎儿的免疫学排斥而处于自然流产危险的女性(例如，曾有过自然流产的女性或受孕困难的女性)。

[0284] 通过调节PD-1配体共刺激或通过调节PD-1配体/PD-1结合进行的免疫应答下降调节也可用于治疗自身组织的自身免疫攻击。例如，PD-1配体通常在心脏中高度表达，并且可保护心脏不受自身免疫攻击。其通过这样的事实得到证明：Balb/c PD-1敲除的鼠以血栓形成呈现对心脏的巨大自身免疫攻击。因此，通过调节这些相互作用，可改善或改良由自身免疫攻击引起或加剧的病症(例如，此实例中的心脏病、心肌梗死或动脉粥样硬化)。因此，调节由自身免疫攻击加剧的病症——如自身免疫性疾病(以及如下病症：心脏病、心肌梗死和动脉粥样硬化)在本发明的范围内。

[0285] 5.免疫应答的上升调节

[0286] 同样在治疗上可用的是阻断PD-1配体与PD-1或B7-1的相互作用，作为上调免疫应答的手段。免疫应答的上升调节可以是如下形式：增强已存在的免疫应答或引起初始免疫应答。例如，利用主题组合物和方法增强免疫应答可用于微生物(例如，细菌、病毒或寄生虫)感染的情况。在一个实施方式中，利用阻断PD-1配体与PD-1相互作用的抗体来增强免疫应答。这种抗体(例如，阻断PD-L1结合PD-1的非激活抗体)在治疗上可用于抗体和细胞介导的应答的上升调节将有益的情形。示例性病症包括病毒性皮肤病，如疱疹或带状疱疹，在该情况下，可向皮肤局部提供这种药剂。此外，通过全身给予这种药剂缓解全身性病毒疾病，如流行性感冒、普通感冒和脑炎。

[0287] 或者，通过离体的方法可增强受感染患者的免疫应答，例如，通过从患者体内去除免疫细胞，体外用阻断PD-1配体与PD-1相互作用的抗体接触免疫细胞，以及将体外刺激的免疫细胞再次引入患者。

[0288] 在某些实例中，可能需要进一步给予上调免疫应答的其他药剂，例如，通过共刺激受体转导信号的其他B7族成员形式，从而进一步增强免疫应答。

[0289] 阻断PD-1配体与PD-1或B7-1相互作用的抗体可在预防上用于针对多种多肽(例如，得自病原体的多肽)的疫苗。通过接种适当佐剂中的病毒蛋白质和阻断PD-1配体与PD-1或B7-1相互作用的抗体，可诱导对病原体(例如，病毒)的免疫性。

[0290] 在另一个实施方式中，如本文所述，上升调节或增强免疫应答功能可用于诱导肿瘤免疫性。

[0291] 在另一个实施方式中，通过本文所述的方法可刺激免疫应答，从而克服在前存在的耐受性。例如，通过给予阻断PD-1配体与PD-1相互作用的抗体，可诱导针对对象所不能给予显著免疫应答的抗原——例如，对于自身抗原，如肿瘤特异性抗原——的免疫应答。在一个实施方式中，可共同给予自身抗原，如肿瘤特异性抗原。在另一个实施方式中，可针对抗原(例如，自身抗原)刺激免疫应答，从而治疗神经系统疾病。在另一个实施方式中，主题药剂可用作佐剂，以促进自动免疫过程中对外源抗原的应答。

[0292] 在一个实施方式中，免疫细胞得自对象，并且在本文所述抗体的存在下进行离体培养，从而扩大免疫细胞群和/或促进免疫细胞激活。在进一步的实施方式中，然后将免疫细胞给予对象。如本领域已知，例如，通过向免疫细胞提供初始激活信号和共刺激信号，可在体外刺激免疫细胞。也可利用多种药剂共刺激免疫细胞增殖。在一个实施方式中，根据PCT申请号WO 94/29436所述的方法离体培养免疫细胞。共刺激的多肽可以是可溶的，连接于细胞膜或连接于固体表面——如小珠。

[0293] 本发明的其他实施方式在以下实施例中被述及。通过以下实施例进一步说明本发明，这些实施例不应被解释为进一步限制。在此明确地将序列表、附图和本申请全文引用的全部参考文献、专利和公布的专利申请的内容引入作为参考。

实施例

[0294] 以下实施例述及适于以人PD-1、PD-L1和PD-L2为目标的治疗目的的单克隆抗体的生成。复合型人抗人PD-1、PD-L1和PD-L2抗体分别从鼠抗人EH12.2H7、29E.2A3和24F.10C12抗体生成。人V区序列的片段来源于不相关的人抗体(生殖系和非生殖系)序列数据库。利用结合预测算法，检验各选定序列片段(以及片段间的连接点)结合MHC II类的潜力。设计全

部最终的复合型人抗体序列变体，以回避T细胞表位。利用编码人序列片段组合的合成寡核苷酸生成复合型人抗体V区基因。然后将其克隆到包含人恒定区的载体中，并且生成抗体和通过竞争ELISA检验抗体与目标抗原的结合。

[0295] 实施例1：复合型人抗体可变区序列的设计

[0296] 利用Swiss Pdb生成小鼠EH12.2H7、29E.2A3和24F.10C12 V区的结构模型，并且分析该结构模型从而鉴定小鼠V区中重要的“限制性”氨基酸，其可能对于抗体的结合特性是必需的。仅CDR中包含的残基被认为是重要的，包括Kabat和Chothia定义下限定的CDR残基。

[0297] 由上述分析，认为可用CDR外宽范围的序列但用CDR序列内窄范围的可能可选残基生成复合型人形式的EH12.2H7、29E.2A3和24F.10C12。初步分析显示，来自几种人抗体的相应序列片段可被组合以生成与小鼠序列相似或相同的CDR。对于CDR外和侧翼的区域，人序列片段的广泛选择被鉴定为新型复合型人抗体可变区的可能的组分。

[0298] 基于以上分析，可用于生成EH12.2H7、29E.2A3和24F.10C12复合型人抗体变体的初步序列片段大组被选定，并通过MHC II类结合预测算法和BLAST进行分析，该BLAST在已知抗体序列相关的T细胞表位的专有数据库中进行搜索。舍弃这样的序列片段：其中潜在的MHC II类结合肽被鉴定或针对已知T细胞表位的数据库评价为显著命中(hit)。这导致片段组减少，再次如上对这些片段组的组合进行分析，从而确保片段间的连接点不含潜在的T细胞表位。然后将选定的片段组合，生成重链和轻链可变区序列，用于合成。对于全部三种抗体，用如下详述的序列构建五个重链和四个轻链；

[0299]

抗原	复合型VH序列	复合型VK序列
[0300] PD-1	图2(A-E)	图3(A-D)
[0301] PD-L1	图4(A-E)	图5(A-D)
[0302] PD-L2	图6(A-E)	图7(A-D)

[0303] 用于生成分别抗PD-1、PD-L1和PD-L2的抗体的这些复合型人抗体序列的序列片段在表1、2和3中得到详细描述。

[0304] 表1.构成抗PD-1复合型人抗体的人序列片段的来源(衍生)

(a)

Genbank 登录号	VH3 序列
BAA75018	QVQLVQSGHEVKQPGASVK (SEQ ID NO:82)
AAG00910	MSCKASGYSFTS (SEQ ID NO:83)
AAY18543	SGYSFTSSWI (SEQ ID NO:84)
AAY57105	WIHWV (SEQ ID NO:85)
AAG00910	KQ
AAD16517	QAPGQGLEWIG (SEQ ID NO:86)
AAD53797	GLEWIGYIYPS (SEQ ID NO:87)
CAA08742	STGF (SEQ ID NO:88)
CAC87219	TEYN (SEQ ID NO:89)
AAT96419	QKF
AAA17939	KDR
AAR02530	DRAT (SEQ ID NO:90)
AAA17939	TLT
AAM87977	TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:91)
CAA78534	STAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRD (SEQ ID NO:92)
AAV40096	DSSGY (SEQ ID NO:93)
AAR38557	YHA
AAW29142	AMD
IGHJ4	DYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:94)

[0305]

(b)

Genbank 登录号.	VH4 序列
BAA75018	QVQLVQSGHEVKQPGASVK (SEQ ID NO:82)
AAG00910	MSCKASGYSFTS (SEQ ID NO:83)
AAY18543	SGYSFTSSWI (SEQ ID NO:84)
AAA02616	HWVRQAPGQGLEWIG (SEQ ID NO:95)
AAD53797	GLEWIGYIYPS (SEQ ID NO:87)
CAA08742	STGF (SEQ ID NO:88)
CAC87219	TEYN (SEQ ID NO:89)
AAT96419	QKF
AAA17939	KDR
AAR02530	DRAT (SEQ ID NO:90)
AAA17939	TLT
AAM87977	TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:91)
CAA78534	STAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRD (SEQ ID NO:92)
AAV40096	DSSGY (SEQ ID NO:93)
AAR38557	YHA
AAW29142	AMD
IGHJ4	DYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:94)

[0306] 表1续：

(c)

Genbank 登录号	Vκ3 序列
AAY16615	EIVLTQSPATLSLSPGQR (SEQ ID NO:96)
AAD09377	RLTISCRASQ (SEQ ID NO:97)
AAA99362	TISCRASQSVST (SEQ ID NO:98)
AAL04518	SVSTSGYSYMHW (SEQ ID NO:99)
AAA58912	WYQQKPDQSPKLLIK (SEQ ID NO:100)
AAD16648	FGS
AAD19478	SNLESG (SEQ ID NO:101)
AAL10884	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA (SEQ ID NO:102)
AAD16559	PEDFATYYCQHS (SEQ ID NO:103)
AAA99326	SW
AAC16811	EIP
人 J2	YTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:104)

[0307]

(d)

Genbank 登录号	Vκ4 序列
AAB53267	DIVLTQSP (SEQ ID NO:105)
AAY16615	IVLTQSPATLSLSPGQR (SEQ ID NO:106)
AAD09377	RLTISCRASQ (SEQ ID NO:97)
AAA99362	TISCRASQSVST (SEQ ID NO:98)
AAL04518	SVSTSGYSYMHW (SEQ ID NO:99)
AAA58912	WYQQKPDQSPKLLIK (SEQ ID NO:100)
AAD16648	FGS
AAD19478	SNLESG (SEQ ID NO:101)
AAL10884	GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA (SEQ ID NO:102)
AAD16559	PEDFATYYCQHS (SEQ ID NO:103)
AAA99326	SW
AAC16811	EIP
人 J2	YTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:104)

[0308] 表2.构成抗PD-L1复合型人抗体的人序列片段的来源

(a)

Genbank 登录号	VH2 序列
ABI50688	EVQLVQSGAEVKKPGASVK (SEQ ID NO:107)
AAG00910	MSCKASGY (SEQ ID NO:108)
ABI50688	SCKASGYTFTSY (SEQ ID NO:109)
AAC50839	SYVMHWV (SEQ ID NO:110)
CAC43594	WVKQ (SEQ ID NO:111)
AAA18267	QAPGQRLEWIG (SEQ ID NO:112)
ABF20472	GY
AAD30737	VNPF (SEQ ID NO:113)
CAL06274	NDGT (SEQ ID NO:114)
CAC43212	KYN
CAC87219	YNE
CAD31770	EM
AAR32413	FKGR (SEQ ID NO:115)
AAG30515	GRAT (SEQ ID NO:116)
ABA62048	TLT
ABI50549	TSD
AAR32572	DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA (SEQ ID NO:117)
AAC18225	AVYYCARQA (SEQ ID NO:118)
AAV39747	AWGY (SEQ ID NO:119)
IGHJ5*02	PWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:120)

[0309]

(b)

Genbank 登录号	VH4 序列
ABI50688	EVQLVQSGAEVKKPGASVK (SEQ ID NO:107)
AAG00910	MSCKASGY (SEQ ID NO:108)
ABI50688	SCKASGYTFTSY (SEQ ID NO:109)
AAC50839	SYVMHWV (SEQ ID NO:110)
AAA18267	WVRQAPGQRLEWIG (SEQ ID NO:121)
ABF20472	GY
AAD30737	VNPF (SEQ ID NO:113)
CAL06274	NDGT (SEQ ID NO:114)
CAC43212	KYN
CAC87219	YNE
CAD31770	EM
AAR32413	FKGR (SEQ ID NO:115)
AAG30515	GRAT (SEQ ID NO:116)
ABA62048	TLT
ABI50549	TSD
AAR32572	DKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA (SEQ ID NO:117)
AAC18225	AVYYCARQA (SEQ ID NO:118)
AAV39747	AWGY (SEQ ID NO:119)
IGHJ5*02	PWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:120)

[0310] 表2续：

(c)

Genbank 登录号	Vκ1 序列
CAA31193	DIVLTQSPASLALS (SEQ ID NO:122)
ABA26115	LSPGERAT (SEQ ID NO:123)
AAQ21828	ESV
CAA51101	VE
AAA58691	YYGTSL (SEQ ID NO:124)
AAY33369	VQWYQQKPGQ (SEQ ID NO:125)
ABI74051	WYQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO:126)
CAC39383	PKLLIYAASS (SEQ ID NO:127)
CAA38592	SVDS (SEQ ID NO:128)
AAK26833	DSGVPSRFSGSGSGT (SEQ ID NO:129)
AAM46660	RFSGSGSGTDFTLTINSLE (SEQ ID NO:130)
AAL04518	EEEDAA (SEQ ID NO:131)
AAK68016	AMYFCQQ (SEQ ID NO:132)
CAK50767	SR
AAP23227	RVPYTFG (SEQ ID NO:133)
人 J2	YTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:104)

[0311]

(d)

Genbank 登录号	Vκ2 序列
CAA31193	DIVLTQSPASLALS (SEQ ID NO:122)
CAE54363	IVLTQSPATLSLSPGE (SEQ ID NO:134)
ABA26115	LSPGERAT (SEQ ID NO:123)
AAQ21828	ESV
CAA51101	VE
AAA58691	YYGTSL (SEQ ID NO:124)
AAY33369	VQWYQQKPGQ (SEQ ID NO:125)
ABI74051	WYQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO:126)
CAC39383	PKLLIYAASS (SEQ ID NO:127)
CAA38592	SVDS (SEQ ID NO:128)
AAK26833	DSGVPSRFSGSGSGT (SEQ ID NO:129)
AAM46660	RFSGSGSGTDFTLTINSLE (SEQ ID NO:130)
AAA58912	TINSLEAEDAA (SEQ ID NO:135)
AAK68016	AMYFCQQ (SEQ ID NO:132)
CAK50767	SR
AAP23227	RVPYTFG (SEQ ID NO:133)
人 J2	YTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:104)

[0312] 表2续：

Genbank 登录号	Vκ4 序列
CAA31193	DIVLTQSPASLALS (SEQ ID NO:122)
CAE54363	IVLTQSPATLSLSPGE (SEQ ID NO:134)
ABA26115	LSPGERAT (SEQ ID NO:123)
AAQ21828	ESV
CAA51101	VE
AAA58691	YYGTSL (SEQ ID NO:124)
AAY33369	VQWYQQKPGQ (SEQ ID NO:125)
ABI74051	WYQQKPGQPPKLLIY (SEQ ID NO:126)
CAC39383	PKLLIYAASS (SEQ ID NO:127)
CAA38592	SVDS (SEQ ID NO:128)
AAK26833	DSGVPSRFSGSGSGT (SEQ ID NO:129)
AAM46660	RFSGSGSGTDFTLTINSLE (SEQ ID NO:130)
AAA58912	TINSLEAEDAATYFC (SEQ ID NO:136)
AAK68016	AMYFCQQ (SEQ ID NO:132)
CAK50767	SR
AAP23227	RVPYTFG (SEQ ID NO:133)
人 J2	YTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:104)

(e)

[0313]

[0314] 表3.构成抗PD-L2复合型人抗体的人序列片段的来源

(a)

Genbank 登录号	VH2 序列
ABF83419	QVQLVQSGAEVKKPGASVK (SEQ ID NO:137)
AAG00910	MSCKASGY (SEQ ID NO:108)
ABF83419	SCKASGYTFTGY (SEQ ID NO:138)
AAL17955	TMHWV (SEQ ID NO:139)
CAC43594	WVKQ (SEQ ID NO:111)
AAL17955	QAPG (SEQ ID NO:140)
AAF40162	GQGLEWIG (SEQ ID NO:141)
AAR02558	GYINP (SEQ ID NO:142)
AAR32283	INPRSG (SEQ ID NO:143)
AAR02553	GYT
CAC87219	TEYN (SEQ ID NO:89)
AAT96419	QKF
AAA17939	KDR
AAB06403	RTT
AAA17939	TLT
AAG30529	TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:91)
ABE66740	DTAVYYCARPW (SEQ ID NO:144)
ABK81281	WFAYWGQGT (SEQ ID NO:145)
IGHJ4	YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:146)

[0315]

(b)

Genbank 登录号	VH4 序列
ABF83419	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGY (SEQ ID NO:147)
AAL17955	TMHWVRQAPG (SEQ ID NO:148)
AAF40162	GQGLEWIG (SEQ ID NO:141)
AAR02558	GYINP (SEQ ID NO:142)
AAR32283	INPRSG (SEQ ID NO:143)
AAR02553	GYT
CAC87219	TEYN (SEQ ID NO:89)
AAT96419	QKF
AAA17939	KDR
AAB06403	RTT
AAA17939	TLT
AAG30529	TADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR (SEQ ID NO:91)
ABE66740	DTAVYYCARPW (SEQ ID NO:144)
ABK81281	WFAYWGQGT (SEQ ID NO:145)
IGHJ4	YWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO:146)

[0316] 表3续：

(c)

Genbank 登录号	Vκ2 序列
AAD16249	DIVMTQSP (SEQ ID NO:149)
CAA31193	PASL (SEQ ID NO:150)
AAA58913	LSVTPGEKVTITC (SEQ ID NO:151)
AAQ99244	CKSSQSLL (SEQ ID NO:152)
ABA71421	LNS
AAD19451	GN
AAS86065	QK
AAD14073	KNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF (SEQ ID NO:153)
AAZ09126	RFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ (SEQ ID NO:154)
CAA31484	NDY
CAC87582	YSYPL (SEQ ID NO:155)
人 J1	TFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:156)

(d)

Genbank 登录号	Vκ3 序列
AAD16249	DIVMTQSP (SEQ ID NO:149)
AAA58913	VMTQSPAFLSVTPGEKVTITC (SEQ ID NO:157)
AAQ99244	CKSSQSLL (SEQ ID NO:152)
ABA71421	LNS
AAD19451	GN
AAS86065	QK
AAD14073	KNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF (SEQ ID NO:153)
AAZ09126	RFTGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ (SEQ ID NO:154)
CAA31484	NDY
CAC87582	YSYPL (SEQ ID NO:155)
人 J1	TFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:156)

[0317]

(e)

Genbank 登录号	Vκ4 序列
AAD16249	DIVMTQSP (SEQ ID NO:149)
AAA58913	VMTQSPAFLSVTPGEKVTITC (SEQ ID NO:157)
AAQ99244	CKSSQSLL (SEQ ID NO:152)
ABA71421	LNS
AAD19451	GN
AAS86065	QK
AAD14073	KNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF (SEQ ID NO:153)
CAD44754	RFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ (SEQ ID NO:158)
CAA31484	NDY
CAC87582	YSYPL (SEQ ID NO:155)
人 J1	TFGQGTKLEIK (SEQ ID NO:156)

[0318] 实施例2:复合型人抗体的生成和检验

[0319] 利用经退火、连接和PCR扩增给出全长合成V区(图2A、图3A、图4A、图5A、图6A和图7A)的一系列重叠寡核苷酸,合成EH12.2H7、29E.2A3和24F.10C12初始变体1的复合型人抗体VH和VK区基因。对于各复合型人抗体,将初始变体1用作模板,利用长重叠寡核苷酸和PCR构建随后的序列变体。然后将组装的变体直接克隆到表达载体(图1)中,并验证其序列。

[0320] 通过电穿孔法将嵌合和复合重链和轻链(即,各抗体共20对)的全部组合稳定转染

到NS0细胞中，并在包含200nM甲氨蝶呤的培养基(高葡萄糖DMEM，具有L-谷氨酰胺和丙酮酸钠、5％超低IgG FCS、pen/strep，全部来自Invitrogen)中进行选择。检验各构建体的几个抗药物菌落的表达水平，并选择最佳表达系，在液氮下进行冷冻。

[0321] 利用Fc捕获型K轻链检测ELISA将各组合最佳表达系的上清液相对于IgG1/κ标准进行定量。然后在竞争ELISA中检验定量的上清液与其目标抗原的结合。在4℃下以50μl/孔1μg/ml pH 9.6碳酸盐缓冲液中的人Fc-PD-1、Fc-PD-L1或Fc-PD-L2(R&D系统)涂布96孔Maxisorb™板(Nunc)过夜。小鼠参考抗体和复合型人抗体样本的重复滴定(在0.0078μg/ml至8μg/ml的范围内)生成，并且与PBS pH 7.4/2％BSA中恒定浓度(40ng/ml)的生物素化的小鼠参考抗体混合。加入100μl/孔的滴定以洗涤(4×以PBS pH 7.4/0.05％Tween 20)分析板，并且在室温下温育1小时。如上洗涤板，并且以100μl/孔加入PBS pH 7.4/2％BSA中1/1000稀释的链霉抗生物素蛋白HRP(Sigma)，在室温下再温育1小时。再次洗涤后，用100μl/孔OPD底物检测所结合的生物素化的参考抗体。在490nm下测定吸光度，并将检验抗体的结合曲线与鼠参考标准进行比较。将吸光度相对于样本浓度作图，通过各数据组拟合直线。利用该线的方程式计算抑制生物素-EH12.2H7结合PD-1、生物素-29E.2A3结合PD-L1和生物素-24F.10C12结合人PD-L2的50％所需的浓度(IC_{50})。

[0322] 选择具有最佳IC_{50}的抗体，使EH12.2H7、29E.2A3和24F.10C12抗体的全部这些变体细胞系增加至100ml，并生长至饱和。通过蛋白质A亲和层析将抗体从各培养物纯化。简要而言，用0.1体积的10×PBS pH 7.4调整上清液pH，并经过1ml Mab Select Sure蛋白质A柱(GE Healthcare)。在用50mM柠檬酸盐缓冲液pH 3.0洗脱前，用10体积的PBS pH 7.4洗柱。收集1ml馏分，并立即用0.1ml的1m Tris-HCl pH 9.0中和。收集包含蛋白质的馏分(由280nm下的吸光度确定)，在PBS pH 7.4中进行缓冲交换，纯化的抗体在+4℃下储存。图8A-C显示经考马斯蓝染色的1μg各抗体的SDS-PAGE凝胶。通过UV吸收计算抗体浓度，其基于经计算的摩尔消光系数，如280nm下EH12.2H7的$E_{0.1\%}$＝1.61，280nm下29E.2A3的$E_{0.1\%}$＝1.46，以及280nm下24F.10C12的$E_{0.1\%}$＝1.57。

[0323] 如上所述，通过竞争ELISA检验纯化抗体与人Fc-PD-1、Fc-PD-L1或Fc-PD-L2的结合。从0.0625μg/ml至8.0μg/ml对检验抗体进行重复滴定。测定490nm下的吸光度，并将其相对于检验抗体的浓度作图(图9A-C、10A-C)。

[0324] 表4概括了抗PD-1、PD-L1和PD-L2抗体的复合型VH和VK变体序列的组合的结果。对于EH12.2H7，全部人源化抗体具有相对于小鼠参考提高的IC50，尤其VH4/VK3的结合具有两倍增加。在29E.2A3的情况下，变体VH2/VK1和VH2/VK4与小鼠参考具有同等结合，而变体VH2/VK2和VH4/VK2的结合分别减少1.75和1.36倍。对于24F.10C12，全部所选变体具有相对于小鼠参考相似但略微减少的结合(1.13倍)。

[0325] 表4：PD-1、PD-L1和PD-L2复合型人抗体序列变种的IC50值

[0326]

EH12.2H7		29E.2A3		24F.10C12	
抗体	IC50 μg/ml	抗体	IC50 μg/ml	抗体	IC50 μg/ml
小鼠	1.23	小鼠	0.28	小鼠	0.52
VH3/VK3	0.93	VH2/VK1	0.27	VH2/VK2	0.58
VH3/VK4	0.74	VH2/VK2	0.49	VH2/VK3	0.59
VH4/VK3	0.57	VH4/VK2	0.38	VH4/VK2	0.60
VH4/VK4	0.91	VH2/VK4	0.29	VH4/VK4	0.58

[0327] 由于这些实验，从完全得自不相关的人抗体可变区的氨基酸序列片段构建了对人PD-1、PD-L1和PD-L2具有特异性的复合型人抗体。复合型人抗体变体中的全部CDR和框架区均包括一个以上不相关的人序列片段(源自人类序列数据库)，并且全部复合型人抗体被特异性设计以回避T细胞表位。最初选择四个主要候选抗体(Candidate)与人PD-1、PD-L1或PD-L2结合，基于随后的分析，证明以小鼠抗体两倍之内进行结合。

[0328] 实施例5：通过抑制PD-1:PD配体相互作用增强的T细胞激活刺激

[0329] PD-1信号传导途径抑制了中度TCR/CD28共刺激信号，细胞因子的生成第一次减少而没有伴随T细胞的增殖减少。由于TCR/CD28共刺激信号减弱，PD-1途径占主导，细胞因子生成的显著减少，伴随着增殖减少。因此，为了确定利用本发明的复合型人抗体通过抑制与PD-L1或PD-L2的相互作用进行的PD-1途径抑制增强T细胞激活，进行混合淋巴细胞反应(MLR)。

[0330] 通过在IL-4和GM-CSF中培养人外周血单核细胞，分离未成熟的骨髓树突细胞。未成熟的树突细胞暴露于IL-1β、TNF-α、IL-6和PGE_2的炎性混合物，引起具有APC功能的成熟树突细胞发育。但是，在成熟阶段期间向炎性细胞因子添加IL-10产生功能也仅有1/6至1/3的APC。

[0331] 在PD-1、PD-L1和/或PD-L2的复合型人抗体或对照抗体存在的情况下，将IL-10处理的树突细胞用作APC，进行T细胞激活分析(MLR)。预期将抗PD-1、抗PD-L1和/或PD-L2 mAb加入IL-10处理的树突细胞和同种T细胞的培养物会造成T细胞增殖和细胞因子表达相对于IgG处理的培养物对照增加。抗PD-1抗体与抗PD-L1抗体、抗PD-L2抗体的组合，也可造成刺激的增加比任一种单独的抗体见到的增加都大。

[0332] 实施例6：慢性感染小鼠(Chronically-Infected Mice)中PD-1途径的抑制

[0333] 利用被多种淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)菌株感染的小鼠研究慢性病毒感染对CD8 T细胞功能的影响。LCMV Armstrong菌株引起这样急性感染：在8天内清除，留下长期存活的高功能性、静止记忆CD8 T细胞群。相反，LCMV Cl-13菌株在宿主中建立持续感染，表现为持续长达3个月的病毒血症。

[0334] 为确定阻断PD-1信号传导使T细胞的功能恢复，并增强慢性LCMV感染过程中的病毒控制，利用本发明所述的复合型人抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体和/或抗PD-L2抗体，破坏慢性LCMV感染过程中的PD-1信号传导。从感染后第23天至第37天，每3天向被LCMV Cl-13感染的小鼠给予抗体。预期在第37天经治疗的小鼠中相对于未经治疗的对照会有若干倍增多的LCMV特异性CD8 T细胞。同样预期以后增殖的诱导会对CD8 T细胞具有特异性，并且经治疗的小鼠和未经治疗的小鼠的脾中的CD4 T细胞数将可能近似相同。

[0335] 除CD8 T细胞增殖增加外，预期PD-1信号传导的抑制也会造成病毒特异性CD8 T细胞中抗病毒细胞因子的生成增加。经治疗的小鼠的CD8 T细胞的IFN-γ和TNF-α生成相比起未经治疗的小鼠将可能高几倍。也应加速病毒清除，并且感染后第37天应在经治疗的小鼠的肺和肾中观察到病毒滴定度降低，而未经治疗的小鼠可能将显示在全部这些组织中显著水平的病毒。

[0336] CD4 T细胞在CD8 T细胞应答的生成和保持中发挥关键的作用。在这方面，顶替CD4 T细胞的CD8 T细胞不能给予正常的免疫应答，由此通常被称为“无用的T细胞”。此外，慢性LCMV感染在CD4 T细胞缺失下更加严重。因此，在LCMV-Cl-13感染过程中生成的无用T细胞比在CD4 T细胞存在下生成的T细胞显示出甚至更严重的功能性损伤。

[0337] CD4 T细胞在LCMV-Cl-13感染时耗竭，在感染后第46天至第60天用本发明所述的复合型人抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体和/或抗PD-L1抗体治疗小鼠。预期治疗后经治疗的小鼠的脾中可能将具有比未经治疗的对照小鼠多几倍的LCMV特异性CD8T细胞。经治疗小鼠的此病毒特异性CD8 T细胞的增长可能导致增殖增加，如BrdU掺入法所测。通过在治疗过程中在饮用水中加入1mg/ml BrdU，进行BrdU分析，并根据制造商方案(BD Biosciences，San Diego，Calif.)进行染色。

[0338] 为确定PD-1信号的抑制使无用、耗竭的、病毒特异性CD8 T细胞的溶解活性增加，在治疗后利用^{51}Cr释放分析(Wherry等，2003.J.Virol.77:4911-27)检测病毒特异性CD8 T细胞的离体溶解活性。预期治疗2周后脾、肝、肺和血清中的病毒滴定度相对于未经治疗的小鼠会降低几倍。

[0339] 实施例7:PD-1信号传导抑制剂疫苗的给予

[0340] 在持续感染期间促进T细胞应答的一种方法是治疗性疫苗接种。此方法的原理是：在慢性病毒感染期间，内源抗原可以不以最佳方式或免疫原性方式存在；以及以疫苗的形式提供抗原可对病毒特异性T细胞和B细胞提供更有效的刺激。利用慢性LCMV模型，给予小鼠表达LCMV GP33表位的重组牛痘病毒作为治疗疫苗(VVGP33)，其导致一些慢性感染小鼠的CD8 T细胞应答适度提高。将此治疗疫苗接种结合本发明所述的复合型人抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体和/或抗PD-L2抗体。预期将促进LCMV特异性T细胞应答达到比任一种单独治疗更高的水平，并且组合治疗的效果将可能比加成更好。

[0341] 实施例8:黑猩猩作为持续性HCV感染免疫治疗的模型

[0342] 黑猩猩提供人类HCV持久性的模型。导致终生病毒持续的T细胞免疫性缺陷包括HCV特异性CD4辅助T细胞不足和CD8效应T细胞的活性减弱或改变。用本发明的复合型人抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体和/或抗PD-L2抗体治疗持续感染的黑猩猩。结合利用重组结构和非结构HCV蛋白质的疫苗接种，确定阻断抑制途径的效力，以及确定这种策略是否可以提高病毒特异性记忆T细胞的频率和寿命。T细胞免疫性缺陷在持续感染的人和黑猩猩中具有独特的HCV特异性。然后通过向黑猩猩给予人源化的单克隆抗体，可使抗病毒活性恢复，该人源化的单克隆抗体通过这些分子阻断信号传导。

[0343] 用本发明的复合型人抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体和/或抗PD-L2抗体治疗持续感染的黑猩猩。用抗体治疗后，确定体液和细胞的免疫应答以及HCV RNA载量。在第1、2、3、5和8周，然后以每月一次的间隔收集样本。样本包括：1)用于转氨酶、自身抗体、HCV中和抗体及细胞因子应答分析的血清、2)用于病毒负载和基因组进化的血浆、3)用于免疫性、共刺激/

抑制受体表达和功能体外测定的PBMC、4)用于肝内淋巴细胞和RNA分离的新鲜(不固定)肝脏,以及5)用于组织学和免疫组织化学分析的固定(福尔马林/石蜡包埋的)肝脏。同样在2或3个时间点收集局部淋巴结,通过免疫组织化学和分子技术评价共抑制分子和剪接变体的表达。

[0344] 为确定HCV抗原疫苗接种是否加强了抗体治疗效果,如下处理黑猩猩:1)在第0、4和24周进行重组包膜糖蛋白E1和E2(在MF59佐剂中)和其他蛋白质(核和用ISCOMS制成的NS3、4和5)的肌肉内免疫接种;2)进行用于本发明抗体,但与本发明抗体的复合型人抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体和/或抗PD-L2抗体共同给予的疫苗的肌肉内免疫接种。免疫接种后,以每月一次的间隔监测HCV特异性T细胞和B细胞的应答1年时间。

[0345] 此分析中在HCV四聚体阳性T细胞和总T细胞上检测的标记物包括分化标记物(例如,CD45RA/RO、CD62L、CCR7和CD27)、激活标记物(例如,CD25、CD69、CD38和HLA-DR)、存活/增殖标记物(例如,bcl-2和Ki67)、细胞毒性潜力标记物(例如,颗粒酶(granzyme)和穿孔素)和细胞因子受体标记物(CD122和CD127)。感兴趣的相关性存在于趋化因子IP-10的治疗前水平与对PEG IFN-γ/利巴韦林的应答之间。测量IP-10水平,从而研究负调控途径或HCV特异性T细胞应答与IP-10水平之间的潜在相关性。通过流式细胞计量术进行PBMC抑制受体和配体的表达。

[0346] 实施例9:通过PD-1阻断增强体内SIV特异性的免疫性

[0347] 在猕猴中检验慢性猿猴免疫缺陷病毒(SIV)感染期间PD-1阻断的免疫恢复潜力。对14只感染SIV的印度恒河猕猴(Indian rhesus macaque)(猕猴)进行研究。8只猕猴用于慢性早期,用200 50%SIV251组织培养感染剂量($TCID_{50}$)进行静脉内感染。6只猕猴用于慢性晚期,3只用SIV251进行直肠内感染,3只用SIV239进行静脉内感染。除RDb11外,全部猕猴均对Mamu B08和Mamu B17等位基因呈阴性。RDb11对Mamu B17等位基因呈阳性。

[0348] 体内抗体治疗:将部分人源化的鼠抗人PD-1抗体(克隆EH12-1540)(Dorfman等,Am.J.Surg.Pathol.30:802-810,2006)或对照抗体(SYNAGIS)输入猕猴。抗PD-1抗体具有与人IgG1连接的小鼠可变重链结构域(经突变减少FcR,互补结合),与人κ连接的小鼠可变轻链结构域。在体外,将克隆EH12与猕猴PD-1结合,并阻断PD-1与其配体之间的相互作用。SYNAGIS是对呼吸道合胞体病毒的F蛋白质具有特异性的人源化小鼠单克隆抗体(IgG1κ)。在第0、3、7和10天,以每kg体重3mg静脉内给予抗体。

[0349] 免疫应答:如前述分离来自血液的外周血单核细胞和来自直肠捏合(pinch)活组织检查的淋巴细胞(Velu等,J.Virol.81:5819-5828,2007)。如前述进行四聚体染色、细胞内细胞因子生成和抗SIV Env结合抗体的测定(Amara等,Science 292:69-74,2001;Kannanganat等,J.Virol.81:8468-8476,2007;Lai等,Virology 369:153-167,2007)。

[0350] 在慢性SIV感染早期(10周)和晚期(约90周)进行PD-1阻断。9只猕猴(5只在早期,4只在晚期)接受抗PD-1抗体,5只猕猴(3只在早期,2只在晚期)接受同种型对照抗体(Synagis,具有抗呼吸道合胞体病毒(RSV)特异性)。

[0351] 慢性SIV感染期间的PD-1阻断造成SIV特异性CD8 T细胞在全部猕猴的血液中迅速扩张。在表达Mamu A*01组织相容性分子的7只抗PD-1抗体治疗的猕猴和3只对照抗体治疗的猕猴中利用主要组织相容性复合型(MHC)I四聚复合物,研究CD8 T细胞对两个免疫主要表位——Gag CM9(Allen等,J.免疫1.160:6062-6071,1998)和Tat SL8/TL8(Allen等,

Nature 407:386-390,2000)——的应答。在阻断前多数(>98%)Gag-CM9四聚体特异性CD8 T细胞表达PD-1。在PD-1阻断后,Gag-CM9四聚体特异性CD8 T细胞迅速扩张,并在第7-21天达到顶峰。在峰值应答时,这些水平比第0天其各自水平高约2.5至11倍(P=0.007),并保持升高直到第28-45天。类似的结果在慢性SIV感染早期和晚期的阻断中观察到。阻断后14天,在两个Mamu A*01阴性动物(RTd11和RDb11)中也观察到Gag特异性干扰素(IFN)-y阳性CD8 T细胞频率增长3-4倍,证明PD-1阻断可提高受非Mamu A*01等位基因限制的病毒特异性CD8 T细胞的频率。在对照抗体治疗的猕猴中没有观察到SIV特异性CD8 T细胞扩张。

[0352] PD-1阻断也与体内正在进行活跃的细胞分裂并伴随功能性质量提高的病毒特异性CD8 T细胞频率的显著提高有关。与SIV特异性CD8 T细胞的迅速扩张一致,共表达Ki67(增殖细胞的标记物)的Gag-CM9四聚体特异性CD8细胞的频率也早在阻断后7天得到提高(P=0.01)。同样,我们观察到共表达穿孔素和颗粒酶B(细胞溶解潜力;分别为P=0.001和P=0.03)、CD28(共刺激潜力;P=0.001)、CD127(增殖潜力;P=0.0003)和CCR7(淋巴结归位潜力;0.001)的Gag-CM9四聚体特异性CD8 T细胞的频率提高。观察到阻断后四聚体阴性且Ki67阳性CD8 T细胞的频率瞬时提高1.5至2倍。这可能由于对Gag的其他表位和SIV的其他蛋白质具有特异性的CD8 T细胞的扩张和这些动物的其他慢性病毒感染。在3只对照抗体治疗的猕猴中没有观察到这些标记物显著增加。

[0353] 阻断后没有观察到Tat-TL8特异性CD8 T细胞扩张。这可能由于病毒没有被Tat-TL8特异性CD8 T细胞识别,因为已知PD-1阻断仅在其同时通过T细胞受体收到信号时才会造成T细胞扩张。为检验该可能性,将以下病毒基因组测序:阻断开始前就在血浆中存在,来自全部3只感染SIV251并在感染早期接受阻断抗体的Mamu A*01阳性猕猴的病毒基因组。事实上,发现了病毒基因组相应于Tat TL8表位区的突变。所有这些突变已显示或被预测会降低Tat SL8/TL8肽与Mamu A*01 MHC分子的结合,并造成不被Tat-SL8/TL8特异性CD8 T细胞识别。这些结果说明,体内的PD-1阻断可能不造成特异性脱离病毒表位突变体的T细胞扩张。

[0354] PD-1阻断也造成结肠直肠粘膜组织(消化道)——SIV/HIV复制的优先位点——处Gag-CM9特异性CD8 T细胞的扩张。虽然其中1只的血液中扩张显著,但7只猕猴中的2只没有观察到扩张。与血液相反,消化道中的扩张更晚到第42天达到峰值,并且相对于其各自第0天的水平在2至3倍的范围内(P=0.003)。与血液相似,共表达Ki67(P=0.01)、穿孔素(P=0.03)、颗粒酶B(P=0.01)和CD28(P=0.01)的Gag-CM9四聚体特异性细胞也在阻断后于消化道内增加。

[0355] 更重要地,PD-1阻断也提高抗病毒CD8 T细胞的功能质量,并造成能共同生成细胞因子IFN-y、肿瘤坏死因子(TNF)-α和白细胞介素(IL)-2的多功能细胞生成。在感染慢性期晚期中PD-1阻断开始那天,Gag特异性IFN-γ阳性细胞的频率低,其不能共表达TNF-α和IL-2。但是,在阻断后,4只PD-1抗体治疗的猕猴中IFN-γ阳性细胞的频率全部提高(P=0.03),并且其获得了共表达TNF-α和IL-2的能力。IFN-γ阳性细胞的扩张在第14-21天达到峰值,峰值水平比其各自第0天的水平高2-10倍。在第21天,总Gag特异性细胞中约16%共表达全部三种细胞因子,约30%共表达IFN-γ和TNF-α。其与第0天总Gag特异性细胞中<1%共表达全部三种细胞因子(P=0.01),约14%共表达IFN-γ和TNF-α(P=0.04)形成对比。在感染慢性期早期的阻断后也观察到类似的结果。

[0356] 为检验慢性免疫缺陷病毒感染期间PD-1对调节B细胞功能的作用，表征PD-1阻断后SIV感染猕猴的B细胞应答。PD-1阻断前不同B细胞亚组的PD-1表达的分析显示记忆B细胞($CD20^+CD27^+CD21^-$)相对于天然B细胞($CD20^+CD27^-CD21^+$；$P<0.001$)优先表达PD-1。体内的PD-1阻断导致阻断后到第28天SIV特异性结合抗体的滴定度2至8倍增长($P<0.001$)。为对其进一步理解，对同时用抗PD-1抗体和抗逆转录病毒疗法进行治疗的SIV感染猕猴的记忆B细胞增殖进行实验，观察到早在第3天Ki67+(增殖)记忆B细胞显著增加，而天然B细胞则没有。这些结果证明，慢性SIV感染期间PD-1-PDL途径可对调节B细胞机能障碍有影响。

[0357] 中和分析显示抗易中和、适于实验室的SIV251的滴定度两倍增长，抗难中和、野生型SIV251或SIV239的滴定度无增长。用抗PD-1抗体治疗的9只动物中的2只中，阻断后仅有最少量(<2倍)的SIV特异性抗体扩张。显著地，阻断前这2只动物的总记忆B细胞频率(总B细胞的-40％)相比起其余7只动物(总B细胞的60-90％)，表明阻断前SIV特异性记忆B细胞的水平可决定阻断后SIV特异性抗体的扩张水平。

[0358] PD-1阻断造成血浆病毒血症显著减少($P=0.03$)，并且也延长了SW感染猕猴的存活($P=0.001$)。在慢性期早期用抗PD-1抗体治疗的5只猕猴中的2只中，病毒载量到第10天下降，并维持或低于该水平直到第90天。在1只猕猴中，病毒载量瞬时下降，而其余2只猕猴中瞬时提高，并回到阻断前水平。与慢性期早期相反，在慢性期晚期用抗PD-1抗体治疗的全部4只猕猴到第7天显示病毒血症瞬时增加，但到第21天病毒载量迅速减少到比其各自第0天水平更低的水平。但是，病毒RNA水平到第43天回到阻断前水平。如预期，在用对照抗体治疗的5只猕猴的任一只中没有观察到血浆病毒载量显著降低。到阻断后第21-28天，抗PD-1-抗体治疗的动物的病毒RNA水平比其各自第0天水平低第2-10倍($P=0.03$)。到阻断后第150天，对照组中5只猕猴其中4只由于AIDS有关的症状(例如，食欲不振、腹泻、体重下降)死亡，而抗PD-1-抗体治疗组中的9只动物全部存活($P=0.001$)。

[0359] 所观察到的全部晚期治疗的动物和一些早期治疗的动物的血浆病毒血症水平最初上升可能是由于激活的CD4 T细胞的频率提高。为将其确定，测定阻断后Ki67阳性总CD4 T细胞的百分率和生成SIV Gag特异性IFN-y的CD4 T细胞(病毒复制的优先目标)的频率。这些分析显示，到阻断后第7-14天Ki67阳性CD4 T细胞的百分率瞬时增长($P=0.002$)，并且在感染晚期进行治疗的动物中的增长比在感染早期进行治疗的动物更高($P=0.015$)。同样，也观察到Gag特异性CD4 T细胞的频率提高，但仅在感染晚期进行治疗的动物中。没有观察到对照抗体治疗的猕猴的这些激活CD4 T细胞显著增加。这些结果表明，激活的CD4 T细胞可能有助于所观察到的阻断后血浆病毒血症水平最初上升。

[0360] 在PD-1阻断开始前，抗PD-1-抗体治疗组和对照抗体治疗组之间的血浆中的病毒载量设定点及血液和消化道中的总CD4 T细胞相似。但是，在体内阻断前两治疗组之间的共表达穿孔素、颗粒酶B或CD28的Gag CM9+细胞和Gag CM9+细胞的频率不相似。这提高了如下可能性：这些不同可有助于PD-1阻断后Gag CM9+细胞扩张。为研究阻断前Gag CM9+细胞的频率对其阻断后扩张的影响，在阻断开始前基于Gag CM9+细胞的频率将抗PD-1-抗体治疗组分成两个亚组，以使一组具有与对照抗体治疗组相似的Gag CM9+细胞水平，另一组具有相对于对照抗体治疗组更高的Gag CM9+细胞水平。然后分析这些亚组的阻断后Gag CM9+细胞扩张。不考虑其在阻断前是处于低水平或高水平，PD-1阻断后两动物亚组的Gag CM9+细胞扩张均很明显。基于Gag CM9+细胞的频率进行的亚组分析也观察到类似的结果，该Gag

CM9+细胞共表达与更好的T细胞功能相关的分子，如穿孔素、颗粒酶B、CCR7、CD 127或CD28。但是，观察到这样的趋势：阻断前具有更高水平Gag CM9+CD28+细胞的动物的Gag CM9+CD28+细胞扩张更好，表明CD28的表达可作为预测体内PD-1阻断结果的生物标记。

[0361] 上述实验证明，用PD-1的抗体进行的PD-1阻断导致具有改善的功能质量的病毒特异性CD8 T细胞迅速扩张。在血液中，也在消化道中——主要的SIV感染库——可见这种增强的T细胞免疫性。PD-1阻断也造成记忆B细胞增殖和SIV包膜特异性抗体增多。这种改善的免疫应答关联于血浆病毒载量显著减少，并且也延长了SIV感染猕猴的存活。在慢性感染早期(第10周)和晚期(～第90周)，甚至在严重淋巴细胞减少的情况下，阻断均有效。这些结果证明了通过阻断单一抑制途径细胞免疫应答和体液免疫应答在病原体免疫缺陷病毒感染期间被提高，并且确定了控制人免疫缺陷病毒感染的新型治疗方法。

[0362] 实施例10：通过人源化PD-1抗体和人源化PD-L1抗体进行体外PD-1:PDL途径阻断后SIV特异性CD8 T细胞的增殖提高

[0363] 在体外检验得自EH-12.2H7的人源化抗PD-1抗体和得自29E.2A3的人源化抗PD-L1抗体对SIV Gag特异性CD8 T细胞增殖能力的影响。人源化抗PD-1抗体具有SEQ ID NO:28的重链可变区序列和SEQ ID NO:32的轻链可变区序列。人源化抗PD-L1抗体具有SEQ ID NO:35的重链可变区序列和SEQ ID NO:42的轻链可变区序列。人源化抗体的重链恒定区来自具有Ser 228至Pro突变(从CPSCP至CPPCP)的人IgG4——以使抗体形成二聚体，轻链恒定区是人κ轻链恒定区。Ser 228的氨基酸编号是根据EU编号系统。参见Aalberse等，Immunology 105:9-19，2002。得自SIV感染猕猴(感染后3个月至1.5年之间)的PBMC用羧基荧光素二醋酸琥珀酰亚胺酯(CFSE)染色，并在阻断抗体存在或不存在下用SIV Gag肽集合体(pool)或培养基刺激6天。在刺激结束时，对细胞表面CD3和CD8和细胞内Ki-67染色。然后在FACS Calibur上得到细胞，并利用Flowjo软件进行分析。基于分散确定淋巴细胞，然后分析CD8 T细胞(CD3+、CD8+)的Ki-67和CFSE共染色。Ki-67+、CFSE低的细胞被鉴定为增殖细胞。

[0364] 如图14A所示，利用抗PD-1 Ab进行的体外PD-1:PD-1配体途径阻断导致SIV特异性CD8 T细胞应答的增殖显著提高。利用抗PD-L1 Ab进行的体外阻断造成SIV特异性CD8 T细胞应答的增殖适度提高(图14B)。

[0365] 实施例11：通过持续感染的黑猩猩的肝内单核细胞进行HCV特异性T细胞增殖恢复

[0366] 从超过10年长期感染HCV基因型1a H77菌株的黑猩猩1564分离出CFSE标记的肝内淋巴细胞(2×10^6)。肝内淋巴细胞与如下4×10^6辐射的自身CD8衰竭的PBMC——该PBMC未处理或与包含整个HCV多蛋白(基因型1aH77菌株)的重叠肽脉冲——共培养6天。在用L-谷氨酰胺和10％FCS补充、具有和不具有抗PD-L1阻断抗体(10μg/ml，在第0天和第2天添加)的RPMI培养基中培养细胞。人源化抗PD-L1抗体具有SEQ ID NO:35的重链可变区序列和SEQ ID NO:42的轻链可变区序列。人源化抗体的重链恒定区来自具有Ser 228至Pro突变(CPSCP至CPPCP)的人IgG4——以使抗体形成二聚体，轻链恒定区是人κ轻链恒定区。Ser 228的氨基酸编号是根据EU编号系统。参见Aalberse等，Immunology 105:9-19，2002。在第6天，将细胞用CD8-PerCP、A0701/P7(758)-PE四聚体、PD-1-Alexa 647、CD4-Alexa 700、CD14-Alexa 700、CD16-Alexa 700、CD19-Alexa 700和Live/Dead Blue染色。在BD LSR II流式细胞计数器上获得样本，利用FlowJo软件分析数据。

[0367] 如图15所示，抗PD-L1抗体治疗使HCV特异性T细胞增殖通过持续感染的黑猩猩的

肝内单核细胞得到恢复。

[0368] 通过参考并入

[0369] 在此将本文所提及的全部出版物、专利和专利申请引入其全部作为参考，如同已具体并分别指明将各个出版物、专利或专利申请引入作为参考。在冲突的情况下，本申请——包括本文的任何定义——将占主导。

[0370] 同样将涉及关于进入公开数据库的登录号——如万维网上美国遗传学研究院(TIGR)和/或万维网上美国国立生物技术信息中心(NCBI)维护的登录号——的任何多核苷酸和多肽序列引入其全部作为参考。

[0371] 等同物

[0372] 本领域技术人员会理解或能确定，应用不超过常规的实验，有多种与本文所述的本发明具体实施方式等同的实施方式。意图将这种等同实施方式被所附权利要求囊括。

序列表

<110> 达纳-法伯癌症研究公司
埃默里大学
G.J.弗里曼
R.艾哈迈德
T.D.琼斯
F.J.卡尔
J.P.格雷格森

<120> 人抗PD-1、PD-L1和PD-L2的抗体及其应用

<130> 677192000140

<140> PCT/US2009/058475
<141> 2009-09-25

<150> US 61/100,534
<151> 2008-09-26

<160> 158

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 363
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 1
[0001]
```
caggtccagc ttgtgcagtc tggggctgaa ctgaaacagc ctggggcctc agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggcta cagttttact agctcctgga tacactgggt gaaacaggct 120
cctggacagg gtctggaatg gattggatac atttatccta gcactggttt tactgagtac 180
aatcagaagt tcaaggacag ggccacattg actgcagaca aatccaccag cacagcctac 240
atggaactga gcagcctgag atctgaggac tctgcagtct attactgtgc aagatggagg 300
gacagctcgg gctaccatgc tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc 360
tca                                                               363
```

<210> 2
<211> 288
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2

Met	Gln	Ile	Pro	Gln	Ala	Pro	Trp	Pro	Val	Val	Trp	Ala	Val	Leu	Gln
1				5					10					15	
Leu	Gly	Trp	Arg	Pro	Gly	Trp	Phe	Leu	Asp	Ser	Pro	Asp	Arg	Pro	Trp
			20					25					30		
Asn	Pro	Pro	Thr	Phe	Ser	Pro	Ala	Leu	Leu	Val	Val	Thr	Glu	Gly	Asp
		35					40					45			
Asn	Ala	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Phe	Ser	Asn	Thr	Ser	Glu	Ser	Phe	Val
	50					55					60				
Leu	Asn	Trp	Tyr	Arg	Met	Ser	Pro	Ser	Asn	Gln	Thr	Asp	Lys	Leu	Ala
65					70					75					80
Ala	Phe	Pro	Glu	Asp	Arg	Ser	Gln	Pro	Gly	Gln	Asp	Cys	Arg	Phe	Arg
				85					90					95	
Val	Thr	Gln	Leu	Pro	Asn	Gly	Arg	Asp	Phe	His	Met	Ser	Val	Val	Arg
			100					105					110		
Ala	Arg	Arg	Asn	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Leu	Cys	Gly	Ala	Ile	Ser	Leu
		115					120					125			
Ala	Pro	Lys	Ala	Gln	Ile	Lys	Glu	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Leu	Arg	Val
	130					135					140				
Thr	Glu	Arg	Arg	Ala	Glu	Val	Pro	Thr	Ala	His	Pro	Ser	Pro	Ser	Pro
145					150					155					160
Arg	Pro	Ala	Gly	Gln	Phe	Gln	Thr	Leu	Val	Val	Gly	Val	Val	Gly	Gly
				165					170					175	
Leu	Leu	Gly	Ser	Leu	Val	Leu	Leu	Val	Trp	Val	Leu	Ala	Val	Ile	Cys
			180					185					190		
Ser	Arg	Ala	Ala	Arg	Gly	Thr	Ile	Gly	Ala	Arg	Arg	Thr	Gly	Gln	Pro
		195					200					205			

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

<210> 3
<211> 363
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 3
caggtccagc ttgtgcagtc tggggctgaa gtgaaacagc ctggggcctc agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggcta cagttttact agctcctgga tacactgggt gaaacaggct 120
cctggacagg gtctggaatg gattggatac atttatccta gcactggttt tactgagtac 180
aatcagaagt tcaaggacag ggccacattg actgcagaca aatccaccag cacagcctac 240
atggaactga gcagcctgag atctgaggac actgcagtct attactgtgc aagatggagg 300
gacagctcgg gctaccatgc tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 4
<211> 290
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4
Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
1 5 10 15
[0002] Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
20 25 30
Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
35 40 45
Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
50 55 60
Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
65 70 75 80
Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
85 90 95
Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
100 105 110
Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
115 120 125
Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
130 135 140
Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
145 150 155 160
Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
165 170 175
Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
180 185 190
Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
195 200 205
Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
210 215 220
Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
225 230 235 240
Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
245 250 255
Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
260 265 270
Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
275 280 285
Glu Thr
290

<210> 5

<211> 363
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 5
caggtccagc ttgtgcagtc tggggctgaa gtgaaacagc ctggggcctc agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggcta cagtttact agctcctgga tacactgggt gaaacaggct 120
cctggacagg gtctggaatg gattggatac atttatccta gcactggttt tactgagtac 180
aatcagaagt tcaaggacag ggccacattg actgcagaca aatccaccag cacagcctac 240
atggaactga gcagcctgag atctgaggac actgcagtct attactgtgc aagatggagg 300
gacagctcgg gctaccatgc tatggactac tggggtcaag gaaccctggt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 6
<211> 273
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6
Met Ile Phe Leu Leu Leu Met Leu Ser Leu Glu Leu Gln Leu His Gln
1 5 10 15
Ile Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile
20 25 30
Glu His Gly Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser
35 40 45
His Val Asn Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn
50 55 60
Asp Thr Ser Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu
65 70 75 80
Pro Leu Gly Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp
85 90 95
Glu Gly Gln Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr
100 105 110
Lys Tyr Leu Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr
115 120 125
[0003] His Ile Leu Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln
130 135 140
Ala Thr Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val
145 150 155 160
Pro Ala Asn Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val
165 170 175
Thr Ser Val Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys
180 185 190
Val Phe Trp Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp
195 200 205
Leu Gln Ser Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp Leu Leu His
210 215 220
Ile Phe Ile Pro Phe Cys Ile Ile Ala Phe Ile Phe Ile Ala Thr Val
225 230 235 240
Ile Ala Leu Arg Lys Gln Leu Cys Gln Lys Leu Tyr Ser Ser Lys Asp
245 250 255
Thr Thr Lys Arg Pro Val Thr Thr Thr Lys Arg Glu Val Asn Ser Ala
260 265 270
Ile

<210> 7
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠 (Mus musculus)

<400> 7
Ser Ser Trp Ile His
1 5

<210> 8
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 8

Tyr Ile Tyr Pro Ser Thr Gly Phe Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
Asp

<210> 9
<211> 12
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 9
Trp Arg Asp Ser Ser Gly Tyr His Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 10
<211> 15
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 10
Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His
1 5 10 15

<210> 11
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 11
Phe Gly Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

[0004]

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 12
Gln His Ser Trp Glu Ile Pro Tyr Thr
1 5

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 13
Ser Tyr Val Met His
1 5

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 14
Tyr Val Asn Pro Phe Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Met Phe Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 15
<211> 6
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 15
Gln Ala Trp Gly Tyr Pro
1 5

<210> 16
<211> 15
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 16
Arg Ala Thr Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Gly Thr Ser Leu Val Gln
1 5 10 15

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 17
Ala Ala Ser Ser Val Asp Ser
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 18
Gln Gln Ser Arg Arg Val Pro Tyr Thr
1 5

<210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠

[0005] <400> 19
Gly Tyr Thr Met His
1 5

<210> 20
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 20
Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15
Asp

<210> 21
<211> 5
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 21
Pro Trp Phe Ala Tyr
1 5

<210> 22
<211> 17
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 22
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15
Thr

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 23
Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 24
Gln Asn Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 25
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 25
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Gln Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Ser
20 25 30
Trp Ile His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Tyr Pro Ser Thr Gly Phe Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
[0006] Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Trp Arg Asp Ser Ser Gly Tyr His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 26
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 26
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Gln Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Ser
20 25 30
Trp Ile His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Tyr Pro Ser Thr Gly Phe Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Trp Arg Asp Ser Ser Gly Tyr His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 27
<211> 121

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 27
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly His Glu Val Lys Gln Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Ser
20 25 30
Trp Ile His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Tyr Pro Ser Thr Gly Phe Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Trp Arg Asp Ser Ser Gly Tyr His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 28
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 28
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly His Glu Val Lys Gln Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Ser
20 25 30
[0007] Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Tyr Pro Ser Thr Gly Phe Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Trp Arg Asp Ser Ser Gly Tyr His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 29
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 29
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly His Glu Val Lys Gln Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Ser
20 25 30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Tyr Pro Ser Thr Gly Phe Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Trp Arg Asp Ser Ser Gly Tyr His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 30
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 30
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Thr Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Gln Arg Leu Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30
Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Lys Phe Gly Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Ser Leu Glu Glu Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
85 90 95
Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 31
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 31
[0008] Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Gln Arg Leu Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30
Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Lys Phe Gly Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
85 90 95
Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 32
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 32
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Gln Arg Leu Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30
Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Lys Phe Gly Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
85 90 95
Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 33
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 33
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Gln Arg Leu Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30
Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Lys Phe Gly Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
85 90 95
Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 34
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 34
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
[0009] Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Val Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Val Asn Pro Phe Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Met Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gln Ala Trp Gly Tyr Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 35
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 35
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Val Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Val Asn Pro Phe Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Met Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gln Ala Trp Gly Tyr Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 36
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 36
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Val Asn Pro Phe Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Met Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gln Ala Trp Gly Tyr Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 37
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

[0010] <220>
<223> 合成构建物

<400> 37
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Val Asn Pro Phe Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Met Phe
50 55 60
Lys Gly Arg Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gln Ala Trp Gly Tyr Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 38
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 38
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Val Asn Pro Phe Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Met Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ser Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gln Ala Trp Gly Tyr Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ser
115

<210> 39
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 39
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Thr Glu Ser Val Glu Tyr Tyr
20 25 30
Gly Thr Ser Leu Val Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Val Asp Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
65 70 75 80
Ser Leu Glu Glu Glu Asp Ala Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95
Arg Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

[0011]

<210> 40
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 40
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Thr Glu Ser Val Glu Tyr Tyr
20 25 30
Gly Thr Ser Leu Val Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Val Asp Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
65 70 75 80
Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95
Arg Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 41
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 41
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Thr Glu Ser Val Glu Tyr Tyr
20 25 30
Gly Thr Ser Leu Val Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Val Asp Ser Gly Val Pro Ser

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

<210> 42
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 42
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Thr Glu Ser Val Glu Tyr Tyr
20 25 30
Gly Thr Ser Leu Val Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Val Asp Ser Gly Val Pro Ser
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
65 70 75 80
Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95
Arg Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 43
<211> 114
<212> PRT
[0012] <213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 43
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
Thr Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Arg Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser

<210> 44
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 44
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
Thr Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

<210> 45
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 45
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Arg Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser

[0013]

<210> 46
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 46
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Arg Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser

<210> 47
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 47
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

```
 1               5                  10                  15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
            20                  25                  30
Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
        35                  40                  45
Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
    50                  55                  60
Lys Asp Arg Thr Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65                  70                  75                  80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Arg Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
            100                 105                 110
Ser Ser
```

<210> 48
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 48

[0014]

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Thr Val Thr Pro Gly
 1               5                  10                  15
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
            20                  25                  30
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
        35                  40                  45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
    50                  55                  60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65                  70                  75                  80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
                85                  90                  95
Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
            100                 105                 110
Lys
```

<210> 49
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 49

```
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Thr Pro Gly
 1               5                  10                  15
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
            20                  25                  30
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
        35                  40                  45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
    50                  55                  60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65                  70                  75                  80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
                85                  90                  95
Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
            100                 105                 110
Lys
```

<210> 50
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 50
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95
Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110
Lys

<210> 51
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 51
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
[0015] Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95
Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
100 105 110
Lys

<210> 52
<211> 363
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 52
caggtccagc ttgtgcagtc tgggcatgaa gtgaaacagc ctggggcctc agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggcta cagttttact agctcctgga tacactgggt gagacaggct 120
cctggacagg gtctggaatg gattggatac atttatccta gcactggttt tactgagtac 180
aatcagaagt tcaaggacag ggccacattg actgcagaca aatccaccag cacagcctac 240
atggaactga gcagcctgag atctgaggac actgcagtct attactgtgc aagatggagg 300
gacagctcgg gctaccatgc tatggactac tggggtcaag gaaccctggt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 53
<211> 363
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 53
caggtccagc ttgtgcagtc tgggcatgaa gtgaaacagc ctggggcctc agtgaaggtg 60

tcctgcaagg cttctggcta cagttttact agctcctgga tacactgggt gagacaggct 120
cctggacagg gtctggaatg gattggatac atttatccta gcactggttt tactgagtac 180
aatcagaagt tcaaggacag ggccacaatc actgcagaca aatccaccag cacagcctac 240
atggaactga gcagcctgag atctgaggac actgcagtct attactgtgc aagatggagg 300
gacagctcgg gctaccatgc tatggactac tggggtcaag gaaccctggt caccgtctcc 360
tca 363

<210> 54
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 54
gacattgtgc tgacacagtc tcctgcttcc ttaactctgt ctccagggca gaggctcacc 60
atctcatgca gggccagcca aagtgtcagt acatctggct atagttatat gcactggtac 120
caacagaaac cagaccagtc ccccaaactc ctcatcaagt ttggctccaa cctagaatct 180
ggcatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatctct 240
tctctggagg aggaggattt tgcaacatat tactgtcagc acagttggga gattccgtac 300
acgttcggac aggggaccaa gctggaaata aaa 333

<210> 55
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 55
gacattgtgc tgacacagtc tcctgctacc ttatctctgt ctccagggca gaggctcacc 60
atctcatgca gggccagcca aagtgtcagt acatctggct atagttatat gcactggtac 120
caacagaaac cagaccagtc ccccaaactc ctcatcaagt ttggctccaa cctagaatct 180
ggcatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatctct 240
tctctggagc ctgaggattt tgcaacatat tactgtcagc acagttggga gattccgtac 300
[0016] acgttcggac aggggaccaa gctggaaata aaa 333

<210> 56
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 56
gagattgtgc tgacacagtc tcctgctacc ttatctctgt ctccagggca gaggctcacc 60
atctcatgca gggccagcca aagtgtcagt acatctggct atagttatat gcactggtac 120
caacagaaac cagaccagtc ccccaaactc ctcatcaagt ttggctccaa cctagaatct 180
ggcatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatctct 240
tctctggagc ctgaggattt tgcaacatat tactgtcagc acagttggga gattccgtac 300
acgttcggac aggggaccaa gctggaaata aaa 333

<210> 57
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 57
gacattgtgc tgacacagtc tcctgctacc ttatctctgt ctccagggca gaggctcacc 60
atctcatgca gggccagcca aagtgtcagt acatctggct gaggctcacc atctcatgca 120
gggccagcca aagtgtcagt acatctggct ctcatcaagt ttggctccaa cctagaatct 180
ggcatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatctct 240
tctctggagc ctgaggattt tgcagtgtat tactgtcagc acagttggga gattccgtac 300
acgttcggac aggggaccaa gctggaaata aaa 333

<210> 58
<211> 345
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 58
gaggtccagc tggtgcagtc tggacctgag ctgaaaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggata cacattcact agctatgtta tgcactgggt gaagcaggcc 120
cctgggcagc gccttgagtg gattggatat gttaatcctt tcaatgatgg tactaagtac 180
aatgagatgt tcaaaggcag ggccacactg acttcagaca aatccaccag cacagcctac 240
atggagctca gcagcctgag gtctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagacaggct 300
tggggttacc cctggggcca agggactctg gtcactgtct cttct 345

<210> 59
<211> 345
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 59
gaggtccagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaaaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggata cacattcact agctatgtta tgcactgggt gaagcaggcc 120
cctgggcagc gccttgagtg gattggatat gttaatcctt tcaatgatgg tactaagtac 180
aatgagatgt tcaaaggcag ggccacactg acttcagaca aatccaccag cacagcctac 240
atggagctca gcagcctgag gtctgaggac actgcggtct attactgtgc aagacaggct 300
tggggttacc cctggggcca agggactctg gtcactgtct cttct 345

<210> 60
<211> 344
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 60
gaggtccagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaaaaagc ctggggcttc agtgaagatg 60
[0017] tcctgcaagg cttctggata cacattcact agctatgtta tgcactgggt gaggcaggcc 120
cctgggcagc gccttgagtg gattggatat gttaatcctt tcaatgatgg tactaagtac 180
aatgagatgt tcaaaggcag ggccacactg acttcagaca aatccaccag cacagcctac 240
atggagctca gcagcctgag gtctgaggac actgcggtct attactgtgc aagacaggct 300
ggggttaccc ctggggccaa gggactctgg tcactgtctc ttct 344

<210> 61
<211> 345
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 61
gaggtccagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaaaaagc ctggggcttc agtgaaggtg 60
tcctgcaagg cttctggata cacattcact agctatgtta tgcactgggt gaggcaggcc 120
cctgggcagc gccttgagtg gattggatat gttaatcctt tcaatgatgg tactaagtac 180
aatgagatgt tcaaaggcag ggccacactg acttcagaca aatccaccag cacagcctac 240
atggagctca gcagcctgag gtctgaggac actgcggtct attactgtgc aagacaggct 300
tggggttacc cctggggcca agggactctg gtcactgtct cttct 345

<210> 62
<211> 345
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 62
gaggtccagc tggtgcagtc tggagctgag gtgaaaaagc ctggggcttc agtgaaggtg 60
tcctgcaagg cttctggata cacattcact agctatgtta tgcactgggt gaggcaggcc 120
cctgggcagc gccttgagtg gattggatat gttaatcctt tcaatgatgg tactaagtac 180
aatgagatgt tcaaaggcag ggccacaatc acttcagaca aatccaccag cacagcctac 240
atggagctca gcagcctgag gtctgaggac actgcggtct attactgtgc aagacaggct 300
tggggttacc cctggggcca agggactctg gtcactgtct cttct 345

<210> 63

<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 63
gacattgtgc tcacccaatc tccagcttct ttggctctgt ctcccgggga gagagccacc 60
ctctcctgca gagccactga aagtgttgaa tactatggca caagtttagt gcagtggtac 120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccag cgtagattct 180
ggggtccctt ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcaat 240
tctctggagg aggaggatgc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaggag ggttccgtac 300
acgttcggac aggggaccaa gctggagata aaa 333

<210> 64
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 64
gacattgtgc tcacccaatc tccagctact ttgtctctgt ctcccgggga gagagccacc 60
ctctcctgca gagccactga aagtgttgaa tactatggca caagtttagt gcagtggtac 120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccag cgtagattct 180
ggggtccctt ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcaat 240
tctctggagg ccgaggatgc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaggag ggttccgtac 300
acgttcggac aggggaccaa gctggagata aaa 333

<210> 65
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
[0018] <223> 合成构建物

<400> 65
gagattgtgc tcacccaatc tccagctact ttgtctctgt ctcccgggga gagagccacc 60
ctctcctgca gagccactga aagtgttgaa tactatggca caagtttagt gcagtggtac 120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccag cgtagattct 180
ggggtccctt ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcaat 240
tctctggagg ccgaggatgc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaggag ggttccgtac 300
acgttcggac aggggaccaa gctggagata aaa 333

<210> 66
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 66
gacattgtgc tcacccaatc tccagctact ttgtctctgt ctcccgggga gagagccacc 60
ctctcctgca gagccactga aagtgttgaa tactatggca caagtttagt gcagtggtac 120
caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatg ctgcatccag cgtagattct 180
ggggtccctt ccaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcaat 240
tctctggagg ccgaggatgc tgcaacctat ttctgtcagc aaagtaggag ggttccgtac 300
acgttcggac aggggaccaa gctggagata aaa 333

<210> 67
<211> 342
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 67
caggtccagc tggtgcagtc tggagctgaa ctgaagaaac ctggggcctc agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggcta caccttcact ggctacacga tgcactgggt aaaacaggcc 120
cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gaagtggata tactgagtat 180
aatcagaagt tcaaggacag gaccacattg actgcagaca aatctaccag cacagcctac 240

atggaactga gcagcctgag atctgaggac tctgcggtct attattgtgc aagaccctgg 300
tttgcttact ggggccaagg gactctggtc actgtctctt ca 342

<210> 68
<211> 342
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 68
caggtccagc tggtgcagtc tggagctgaa gtgaagaaac ctggggcctc agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggcta caccttttact ggctacacga tgcactgggt aaaacaggcc 120
cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gaagtggata tactgagtat 180
aatcagaagt tcaaggacag gaccacattg actgcagaca aatctaccag cacagcctac 240
atggaactga gcagcctgag atctgaggac actgcggtct attattgtgc aagaccctgg 300
tttgcttact ggggccaagg gactctggtc actgtctctt ca 342

<210> 69
<211> 342
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 69
caggtccagc tggtgcagtc tggagctgaa gtgaagaaac ctggggcctc agtgaagatg 60
tcctgcaagg cttctggcta caccttttact ggctacacga tgcactgggt aagacaggcc 120
cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gaagtggata tactgagtat 180
aatcagaagt tcaaggacag gaccacattg actgcagaca aatctaccag cacagcctac 240
atggaactga gcagcctgag atctgaggac actgcggtct attattgtgc aagaccctgg 300
tttgcttact ggggccaagg gactctggtc actgtctctt ca 342

<210> 70
<211> 342
[0019] <212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 70
caggtccagc tggtgcagtc tggagctgaa gtgaagaaac ctggggcctc agtgaaggtg 60
tcctgcaagg cttctggcta caccttttact ggctacacga tgcactgggt aagacaggcc 120
cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gaagtggata tactgagtat 180
aatcagaagt tcaaggacag gaccacattg actgcagaca aatctaccag cacagcctac 240
atggaactga gcagcctgag atctgaggac actgcggtct attattgtgc aagaccctgg 300
tttgcttact ggggccaagg gactctggtc actgtctctt ca 342

<210> 71
<211> 342
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 71
caggtccagc tggtgcagtc tggagctgaa gtgaagaaac ctggggcctc agtgaaggtg 60
tcctgcaagg cttctggcta caccttttact ggctacacga tgcactgggt aagacaggcc 120
cctggacagg gtctggaatg gattggatac attaatccta gaagtggata tactgagtat 180
aatcagaagt tcaaggacag gaccacaatc actgcagaca aatctaccag cacagcctac 240
atggaactga gcagcctgag atctgaggac actgcggtct attattgtgc aagaccctgg 300
tttgcttact ggggccaagg gactctggtc actgtctctt ca 342

<210> 72
<211> 339
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 72

gacattgtga tgacacagtc tccagcctcc ctgactgtga caccaggaga gaaggtcact 60
atcacctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctacttgacc 120
tggtaccagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctactgggc atccactagg 180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc 240
atcagcagtc tgcaggctga agacgtggca gtttattact gtcagaatga ttatagttat 300
cctctcacgt tcggtcaggg gaccaagctg gagatcaaa 339

<210> 73
<211> 339
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 73
gacattgtga tgacacagtc tccagcctcc ctgtctgtga caccaggaga gaaggtcact 60
atcacctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctacttgacc 120
tggtaccagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctactgggc atccactagg 180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc 240
atcagcagtc tgcaggctga agacgtggca gtttattact gtcagaatga ttatagttat 300
cctctcacgt tcggtcaggg gaccaagctg gagatcaaa 339

<210> 74
<211> 339
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 74
gacattgtga tgacacagtc tccagccttc ctgtctgtga caccaggaga gaaggtcact 60
atcacctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctacttgacc 120
tggtaccagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctactgggc atccactagg 180
gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc 240
atcagcagtc tgcaggctga agacgtggca gtttattact gtcagaatga ttatagttat 300
[0020] cctctcacgt tcggtcaggg gaccaagctg gagatcaaa 339

<210> 75
<211> 339
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成构建物

<400> 75
gacattgtga tgacacagtc tccagccttc ctgtctgtga caccaggaga gaaggtcact 60
atcacctgca agtccagtca gagtctgtta aacagtggaa atcaaaagaa ctacttgacc 120
tggtaccagc agaaaccagg gcagcctcct aaactgttga tctactgggc atccactagg 180
gaatctgggg tccctgatcg cttctccggc agtggatctg gaacagattt cactctcacc 240
atcagcagtc tgcaggctga agacgtggca gtttattact gtcagaatga ttatagttat 300
cctctcacgt tcggtcaggg gaccaagctg gagatcaaa 339

<210> 76
<211> 121
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 76
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Gln Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Ser
20 25 30
Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Tyr Pro Ser Thr Gly Phe Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Trp Arg Asp Ser Ser Gly Tyr His Ala Met Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 77
<211> 111
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 77
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Thr Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr Ser
20 25 30
Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Lys Phe Gly Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His
65 70 75 80
Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser Trp
85 90 95
Glu Ile Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 78
<211> 115
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 78
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30
Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
[0021] Gly Tyr Val Asn Pro Phe Asn Asp Gly Thr Lys Tyr Asn Glu Met Phe
50 55 60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gln Ala Trp Gly Tyr Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110
Val Ser Ala
115

<210> 79
<211> 111
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 79
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Thr Glu Ser Val Glu Tyr Tyr
20 25 30
Gly Thr Ser Leu Val Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Val Asp Ser Gly Val Pro Ala
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Thr Ile His
65 70 75 80
Pro Val Glu Glu Asp Asp Ile Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg
85 90 95
Arg Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 80
<211> 114
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 80
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Ala Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30
Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Ile Asn Pro Arg Ser Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Pro Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110
Ser Ala

<210> 81
<211> 113
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 81
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Thr Val Thr Ala Gly
1 5 10 15
Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
20 25 30
Gly Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45
Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60
Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
65 70 75 80
Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Asn
85 90 95
[0022] Asp Tyr Ser Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
100 105 110
Lys

<210> 82
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 82
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly His Glu Val Lys Gln Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys

<210> 83
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 83
Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser
1 5 10

<210> 84
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 84
Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Ser Trp Ile
1 5 10

<210> 85

<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 85
Trp Ile His Trp Val
1 5

<210> 86
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 86
Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 87
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 87
Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Ser
1 5 10

<210> 88
<211> 4
<212> PRT
<213> 智人

<400> 88
Ser Thr Gly Phe
1

[0023]

<210> 89
<211> 4
<212> PRT
<213> 智人

<400> 89
Thr Glu Tyr Asn
1

<210> 90
<211> 4
<212> PRT
<213> 智人

<400> 90
Asp Arg Ala Thr
1

<210> 91
<211> 28
<212> PRT
<213> 智人

<400> 91
Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu
1 5 10 15
Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25

<210> 92
<211> 25
<212> PRT
<213> 智人

<400> 92
Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala
1 5 10 15
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Arg Asp
20 25

<210> 93
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 93
Asp Ser Ser Gly Tyr
1 5

<210> 94
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 94
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 95
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 95
His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10 15

[0024] <210> 96
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人

<400> 96
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Gln Arg

<210> 97
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 97
Arg Leu Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln
1 5 10

<210> 98
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 98
Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Thr
1 5 10

<210> 99
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 99

Ser Val Ser Thr Ser Gly Tyr Ser Tyr Met His Trp
1 5 10

<210> 100
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 100
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Lys
1 5 10 15

<210> 101
<211> 6
<212> PRT
<213> 智人

<400> 101
Ser Asn Leu Glu Ser Gly
1 5

<210> 102
<211> 28
<212> PRT
<213> 智人

<400> 102
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15
Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala
20 25

[0025]

<210> 103
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 103
Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Ser
1 5 10

<210> 104
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 104
Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 105
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 105
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro
1 5

<210> 106
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 106
Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gln
1 5 10 15
Arg

<210> 107
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 107
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys

<210> 108
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 108
Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr
1 5

<210> 109
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 109
Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
1 5 10

<210> 110
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

[0026]

<400> 110
Ser Tyr Val Met His Trp Val
1 5

<210> 111
<211> 4
<212> PRT
<213> 智人

<400> 111
Trp Val Lys Gln
1

<210> 112
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 112
Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 113
<211> 4
<212> PRT
<213> 智人

<400> 113
Val Asn Pro Phe
1

<210> 114
<211> 4

<212> PRT
<213> 智人

<400> 114
Asn Asp Gly Thr
1

<210> 115
<211> 4
<212> PRT
<213> 智人

<400> 115
Phe Lys Gly Arg
1

<210> 116
<211> 4
<212> PRT
<213> 智人

<400> 116
Gly Arg Ala Thr
1

<210> 117
<211> 25
<212> PRT
<213> 智人

<400> 117
Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
1 5 10 15
Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
[0027] 20 25

<210> 118
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 118
Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gln Ala
1 5

<210> 119
<211> 4
<212> PRT
<213> 智人

<400> 119
Ala Trp Gly Tyr
1

<210> 120
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 120
Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 121
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 121
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 122
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 122
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Leu Ser
1 5 10

<210> 123
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 123
Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr
1 5

<210> 124
<211> 6
<212> PRT
<213> 智人

<400> 124
Tyr Tyr Gly Thr Ser Leu
1 5

<210> 125
<211> 10
<212> PRT
[0028] <213> 智人

<400> 125
Val Gln Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
1 5 10

<210> 126
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 126
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 127
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 127
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser
1 5 10

<210> 128
<211> 4
<212> PRT
<213> 智人

<400> 128
Ser Val Asp Ser
1

<210> 129

<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 129
Asp Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr
1 5 10 15

<210> 130
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 130
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
1 5 10 15
Ser Leu Glu

<210> 131
<211> 6
<212> PRT
<213> 智人

<400> 131
Glu Glu Glu Asp Ala Ala
1 5

<210> 132
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 132
[0029] Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln
1 5

<210> 133
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 133
Arg Val Pro Tyr Thr Phe Gly
1 5

<210> 134
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人

<400> 134
Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu
1 5 10 15

<210> 135
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 135
Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala
1 5 10

<210> 136
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 136
Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Phe Cys
1 5 10 15

<210> 137
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 137
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys

<210> 138
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 138
Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
1 5 10

<210> 139
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 139
Thr Met His Trp Val
1 5

[0030] <210> 140
<211> 4
<212> PRT
<213> 智人

<400> 140
Gln Ala Pro Gly
1

<210> 141
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 141
Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5

<210> 142
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 142
Gly Tyr Ile Asn Pro
1 5

<210> 143
<211> 6
<212> PRT
<213> 智人

<400> 143
Ile Asn Pro Arg Ser Gly
1 5

<210> 144
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 144
Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Pro Trp
1 5 10

<210> 145
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 145
Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
1 5

<210> 146
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 146
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 147
<211> 32
<212> PRT
<213> 智人

[0031]

<400> 147
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

<210> 148
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 148
Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
1 5 10

<210> 149
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 149
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro
1 5

<210> 150
<211> 4
<212> PRT
<213> 智人

<400> 150
Pro Ala Ser Leu
1

<210> 151
<211> 13
<212> PRT

<213> 智人

<400> 151
Leu Ser Val Thr Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys
1 5 10

<210> 152
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 152
Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu
1 5

<210> 153
<211> 33
<212> PRT
<213> 智人

<400> 153
Lys Asn Tyr Leu Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys
1 5 10 15
Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val Pro Asp Arg
20 25 30
Phe

<210> 154
<211> 29
<212> PRT
<213> 智人

[0032]

<400> 154
Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
1 5 10 15
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
20 25

<210> 155
<211> 5
<212> PRT
<213> 智人

<400> 155
Tyr Ser Tyr Pro Leu
1 5

<210> 156
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 156
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

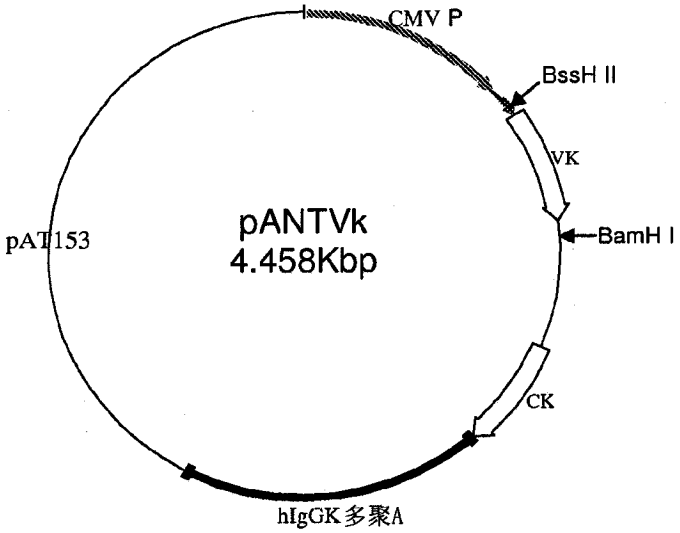
<210> 157
<211> 21
<212> PRT
<213> 智人

<400> 157
Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Phe Leu Ser Val Thr Pro Gly Glu Lys
1 5 10 15
Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 158

<211> 29
<212> PRT
<213> 智人

[0033] <400> 158
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
1 5 10 15
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln
20 25


CMV P
BssH II
VK
BamH I
CK
hIgGK多聚A
pAT153
pANTVk
4.458Kbp

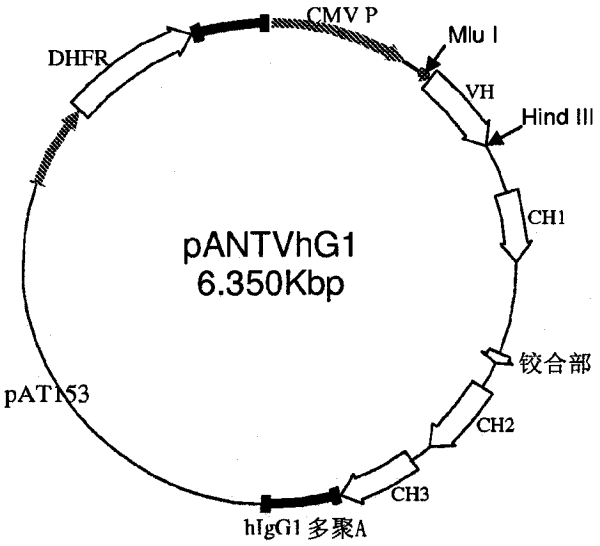

CMV P
Mlu I
VH
Hind III
CH1
铰合部
CH2
CH3
hIgG1多聚A
pAT153
DHFR
pANTVhG1
6.350Kbp

图1表达载体图

（图2A）重链VH1

```
        10         20         30         40         50
CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAACTGAAACAGCCTGGGGCCTC
 Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  L  K  Q  P  G  A  S

        60         70         80         90        100
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGTTTTACTAGCTCCTGGA
  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  S  F  T  S  S  W
                                                CDR1

       110        120        130        140        150
TACACTGGGTGAAACAGGCTCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
I  H  W  V  K  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y

      160        170        180        190        200
ATTTATCCTAGCACTGGTTTTACTGAGTACAATCAGAAGTTCAAGGACAG
 I  Y  P  S  T  G  F  T  E  Y  N  Q  K  F  K  D  R
                  CDR2

       210        220        230        240        250
GGCCACATTGACTGCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAACTGA
  A  T  L  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

       260        270        280        290        300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATGGAGG
S  S  L  R  S  E  D  S  A  V  Y  Y  C  A  R  W  R

       310        320        330        340        350
GACAGCTCGGGCTACCATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGT
 D  S  S  G  Y  H  A  M  D  Y  W  G  Q  G  T  S  V
       CDR3

       360
CACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:1)
  T  V  S  S  (SEQ ID NO:25)
```

图2.抗PD-1重链的复合型人抗体序列变体

（图2B）重链VH2

```
        10         20         30         40         50
CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAAGTGAAACAGCCTGGGGCCTC
 Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  Q  P  G  A  S

        60         70         80         90        100
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGTTTTACTAGCTCCTGGA
  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  S  F  T  S  S  W
                                                CDR1

       110        120        130        140        150
TACACTGGGTGAAACAGGCTCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
I  H  W  V  K  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y

       160        170        180        190        200
ATTTATCCTAGCACTGGTTTTACTGAGTACAATCAGAAGTTCAAGGACAG
 I  Y  P  S  T  G  F  T  E  Y  N  Q  K  F  K  D  R
                  CDR2

       210        220        230        240        250
GGCCACATTGACTGCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAACTGA
  A  T  L  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

       260        270        280        290        300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATGGAGG
S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  W  R

       310        320        330        340        350
GACAGCTCGGGCTACCATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGT
 D  S  S  G  Y  H  A  M  D  Y  W  G  Q  G  T  S  V
            CDR3

       360
CACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:3)
  T  V  S  S  (SEQ ID NO:26)
```

（图2C）重链VH3

```
        10         20         30         40         50
CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGGCTGAAGTGAAACAGCCTGGGGCCTC
 Q  V  Q  L  V  Q  S  G  H  E  V  K  Q  P  G  A  S

        60         70         80         90        100
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGTTTTACTAGCTCCTGGA
  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  S  F  T  S  S  W
                                                CDR1

       110        120        130        140        150
TACACTGGGTGAAACAGGCTCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
I  H  W  V  K  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y

       160        170        180        190        200
ATTTATCCTAGCACTGGTTTTACTGAGTACAATCAGAAGTTCAAGGACAG
 I  Y  P  S  T  G  F  T  E  Y  N  Q  K  F  K  D  R
                CDR2

       210        220        230        240        250
GGCCACATTGACTGCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAACTGA
  A  T  L  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

       260        270        280        290        300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATGGAGG
S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  W  R

       310        320        330        340        350
GACAGCTCGGGCTACCATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCCTGGT
 D  S  S  G  Y  H  A  M  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V
          CDR3

       360
CACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:5)
  T  V  S  S  (SEQ ID NO:27)
```

（图2D）重链VH4

```
        10         20         30         40         50
CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGCATGAAGTGAAACAGCCTGGGGCCTC
 Q  V  Q  L  V  Q  S  G  H  E  V  K  Q  P  G  A  S

        60         70         80         90        100
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGTTTTACTAGCTCCTGGA
  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  S  F  T  S  S  W
                                                CDR1

       110        120        130        140        150
TACACTGGGTGAGACAGGCTCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
I  H  W  V  R  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y

       160        170        180        190        200
ATTTATCCTAGCACTGGTTTTACTGAGTACAATCAGAAGTTCAAGGACAG
 I  Y  P  S  T  G  F  T  E  Y  N  Q  K  F  K  D  R
                         CDR2

       210        220        230        240        250
GGCCACATTGACTGCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAACTGA
  A  T  L  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

       260        270        280        290        300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATGGAGG
S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  W  R

       310        320        330        340        350
GACAGCTCGGGCTACCATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCCTGGT
 D  S  S  G  Y  H  A  M  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V
          CDR3

       360
CACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:52)
  T  V  S  S  (SEQ ID NO:28)
```

（图2E）重链VH5

```
        10         20         30         40         50
CAGGTCCAGCTTGTGCAGTCTGGGCATGAAGTGAAACAGCCTGGGGCCTC
 Q  V  Q  L  V  Q  S  G  H  E  V  K  Q  P  G  A  S

        60         70         80         90        100
AGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACAGTTTTACTAGCTCCTGGA
  V  K  V  S  C  K  A  S  G  Y  S  F  T  S  S  W
                                                CDR1

       110        120        130        140        150
TACACTGGGTGAGACAGGCTCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
I  H  W  V  R  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y

       160        170        180        190        200
ATTTATCCTAGCACTGGTTTTACTGAGTACAATCAGAAGTTCAAGGACAG
 I  Y  P  S  T  G  F  T  E  Y  N  Q  K  F  K  D  R
                CDR2

       210        220        230        240        250
GGCCACAATCACTGCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAACTGA
  A  T  I  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

       260        270        280        290        300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCAGTCTATTACTGTGCAAGATGGAGG
S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  W  R

       310        320        330        340        350
GACAGCTCGGGCTACCATGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCCTGGT
 D  S  S  G  Y  H  A  M  D  Y  W  G  Q  G  T  L  V
           CDR3

       360
CACCGTCTCCTCA (SEQ ID NO:53)
  T  V  S  S  (SEQ ID NO:29)
```

（图3A）轻链VK1

```
        10         20         30         40         50
GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTTCCTTAACTCTGTCTCCAGGGCA
 D  I  V  L  T  Q  S  P  A  S  L  T  L  S  P  G  Q

        60         70         80         90        100
GAGGCTCACCATCTCATGCAGGGCCAGCCAAAGTGTCAGTACATCTGGCT
  R  L  T  I  S  C  R  A  S  Q  S  V  S  T  S  G
                                 CDR1

       110        120        130        140        150
ATAGTTATATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGACCAGTCCCCCAAACTC
Y  S  Y  M  H  W  Y  Q  Q  K  P  D  Q  S  P  K  L

       160        170        180        190        200
CTCATCAAGTTTGGCTCCAACCTAGAATCTGGCATCCCTGCCAGGTTCAG
 L  I  K  F  G  S  N  L  E  S  G  I  P  A  R  F  S
             CDR2

       210        220        230        240        250
TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCTCTTCTCTGGAGG
  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  E

       260        270        280        290        300
AGGAGGATTTTGCAACATATTACTGTCAGCACAGTTGGGAGATTCCGTAC
E  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  H  S  W  E  I  P  Y
                                 CDR3

       310        320        330
ACGTTCGGACAGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO:54)
 T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K  (SEQ ID NO:30)
```

图3抗PD-1轻链的复合型人抗体序列变体

（图3B）轻链VK2

```
        10         20         30         40         50
GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTACCTTATCTCTGTCTCCAGGGCA
 D  I  V  L  T  Q  S  P  A  T  L  S  L  S  P  G  Q

        60         70         80         90        100
GAGGCTCACCATCTCATGCAGGGCCAGCCAAAGTGTCAGTACATCTGGCT
  R  L  T  I  S  C  R  A  S  Q  S  V  S  T  S  G
                                          CDR1

       110        120        130        140        150
ATAGTTATATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGACCAGTCCCCCAAACTC
Y  S  Y  M  H  W  Y  Q  Q  K  P  D  Q  S  P  K  L

       160        170        180        190        200
CTCATCAAGTTTGGCTCCAACCTAGAATCTGGCATCCCTGCCAGGTTCAG
 L  I  K  F  G  S  N  L  E  S  G  I  P  A  R  F  S
             CDR2

       210        220        230        240        250
TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCTCTTCTCTGGAGC
  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  E

       260        270        280        290        300
CTGAGGATTTTGCAACATATTACTGTCAGCACAGTTGGGAGATTCCGTAC
P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  H  S  W  E  I  P  Y
                                          CDR3

       310        320        330
ACGTTCGGACAGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO:55)
T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K  (SEQ ID NO:31)
```

（图3C）轻链VK3

```
        10         20         30         40         50
GAGATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTACCTTATCTCTGTCTCCAGGGCA
 E  I  V  L  T  Q  S  P  A  T  L  S  L  S  P  G  Q

        60         70         80         90        100
GAGGCTCACCATCTCATGCAGGGCCAGCCAAAGTGTCAGTACATCTGGCT
  R  L  T  I  S  C  R  A  S  Q  S  V  S  T  S  G
                                          CDR1

       110        120        130        140        150
ATAGTTATATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGACCAGTCCCCCAAACTC
Y  S  Y  M  H  W  Y  Q  Q  K  P  D  Q  S  P  K  L

       160        170        180        190        200
CTCATCAAGTTTGGCTCCAACCTAGAATCTGGCATCCCTGCCAGGTTCAG
 L  I  K  F  G  S  N  L  E  S  G  I  P  A  R  F  S
             CDR2

       210        220        230        240        250
TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCTCTTCTCTGGAGC
  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  E

       260        270        280        290        300
CTGAGGATTTTGCAACATATTACTGTCAGCACAGTTGGGAGATTCCGTAC
P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  H  S  W  E  I  P  Y
                                          CDR3

       310        320        330
ACGTTCGGACAGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO:56)
T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K  (SEQ ID NO:32)
```

（图3D）轻链VK4

```
        10         20         30         40         50
GACATTGTGCTGACACAGTCTCCTGCTACCTTATCTCTGTCTCCAGGGCA
 D  I  V  L  T  Q  S  P  A  T  L  S  L  S  P  G  Q

        60         70         80         90        100
GAGGCTCACCATCTCATGCAGGGCCAGCCAAAGTGTCAGTACATCTGGCT
  R  L  T  I  S  C  R  A  S  Q  S  V  S  T  S  G
                                          CDR1

       110        120        130        140        150
ATAGTTATATGCACTGGTACCAACAGAAACCAGACCAGTCCCCCAAACTC
Y  S  Y  M  H  W  Y  Q  Q  K  P  D  Q  S  P  K  L

       160        170        180        190        200
CTCATCAAGTTTGGCTCCAACCTAGAATCTGGCATCCCTGCCAGGTTCAG
 L  I  K  F  G  S  N  L  E  S  G  I  P  A  R  F  S
             CDR2

       210        220        230        240        250
TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCTCTTCTCTGGAGC
  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  E

       260        270        280        290        300
CTGAGGATTTTGCAGTGTATTACTGTCAGCACAGTTGGGAGATTCCGTAC
P  E  D  F  A  V  Y  Y  C  Q  H  S  W  E  I  P  Y
                                          CDR3

       310        320        330
ACGTTCGGACAGGGGACCAAGCTGGAAATAAAA (SEQ ID NO:57)
 T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K  (SEQ ID NO:33)
```

（图4A）重链VH1

```
        10         20         30         40         50
GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGACCTGAGCTGAAAAAGCCTGGGGCTTC
 E  V  Q  L  V  Q  S  G  P  E  L  K  K  P  G  A  S

        60         70         80         90        100
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTAGCTATGTTA
  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  S  Y  V
                                          CDR1

       110        120        130        140        150
TGCACTGGGTGAAGCAGGCCCCTGGGCAGCGCCTTGAGTGGATTGGATAT
M  H  W  V  K  Q  A  P  G  Q  R  L  E  W  I  G  Y

       160        170        180        190        200
GTTAATCCTTTCAATGATGGTACTAAGTACAATGAGATGTTCAAAGGCAG
 V  N  P  F  N  D  G  T  K  Y  N  E  M  F  K  G  R
                CDR2

       210        220        230        240        250
GGCCACACTGACTTCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCA
  A  T  L  T  S  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

       260        270        280        290        300
GCAGCCTGAGGTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACAGGCT
S  S  L  R  S  E  D  S  A  V  Y  Y  C  A  R  Q  A

       310        320        330        340
TGGGGTTACCCCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCT (SEQ ID NO:58)
 W  G  Y  P  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S  (SEQ ID NO:34)
  CDR3
```

图4抗PD-L1重链的复合型人抗体序列变体

（图4B）重链VH2

```
        10         20         30         40         50
GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAAAAGCCTGGGGCTTC
 E  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S

        60         70         80         90        100
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTAGCTATGTTA
  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  S  Y  V
                                          CDR1

       110        120        130        140        150
TGCACTGGGTGAAGCAGGCCCCTGGGCAGCGCCTTGAGTGGATTGGATAT
M  H  W  V  K  Q  A  P  G  Q  R  L  E  W  I  G  Y

       160        170        180        190        200
GTTAATCCTTTCAATGATGGTACTAAGTACAATGAGATGTTCAAAGGCAG
 V  N  P  F  N  D  G  T  K  Y  N  E  M  F  K  G  R
                CDR2

       210        220        230        240        250
GGCCACACTGACTTCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCA
  A  T  L  T  S  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

       260        270        280        290        300
GCAGCCTGAGGTCTGAGGACACTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACAGGCT
S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  Q  A

       310        320        330        340
TGGGGTTACCCCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCT (SEQ ID NO:59)
 W  G  Y  P  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S  (SEQ ID NO:35)
CDR3
```

（图4C）重链VH3

```
        10         20         30         40         50
GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAAAAGCCTGGGGCTTC
 E  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S

        60         70         80         90        100
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTAGCTATGTTA
  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  S  Y  V
                                          CDR1

       110        120        130        140        150
TGCACTGGGTGAGGCAGGCCCCTGGGCAGCGCCTTGAGTGGATTGGATAT
M  H  W  V  R  Q  A  P  G  Q  R  L  E  W  I  G  Y

       160        170        180        190        200
GTTAATCCTTTCAATGATGGTACTAAGTACAATGAGATGTTCAAAGGCAG
 V  N  P  F  N  D  G  T  K  Y  N  E  M  F  K  G  R
                CDR2

       210        220        230        240        250
GGCCACACTGACTTCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCA
  A  T  L  T  S  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

       260        270        280        290        300
GCAGCCTGAGGTCTGAGGACACTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACAGGCT
S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  Q  A

       310        320        330        340
TGGGGTTACCCCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCT (SEQ ID NO:60)
 W  G  Y  P  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S  (SEQ ID NO:36)
 CDR3
```

（图4D）重链VH4

```
        10         20         30         40         50
GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAAAAGCCTGGGGCTTC
 E  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S

        60         70         80         90        100
AGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTAGCTATGTTA
  V  K  V  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  S  Y  V
                                          CDR1

       110        120        130        140        150
TGCACTGGGTGAGGCAGGCCCCTGGGCAGCGCCTTGAGTGGATTGGATAT
M  H  W  V  R  Q  A  P  G  Q  R  L  E  W  I  G  Y

       160        170        180        190        200
GTTAATCCTTTCAATGATGGTACTAAGTACAATGAGATGTTCAAAGGCAG
 V  N  P  F  N  D  G  T  K  Y  N  E  M  F  K  G  R
                CDR2

       210        220        230        240        250
GGCCACACTGACTTCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCA
  A  T  L  T  S  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

       260        270        280        290        300
GCAGCCTGAGGTCTGAGGACACTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACAGGCT
S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  Q  A

       310        320        330        340
TGGGGTTACCCCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCT (SEQ ID NO:61)
 W  G  Y  P  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S  (SEQ ID NO:37)
CDR3
```

（图4E）重链VH5

```
        10         20         30         40         50
GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAGGTGAAAAAGCCTGGGGCTTC
 E  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S

        60         70         80         90        100
AGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGATACACATTCACTAGCTATGTTA
  V  K  V  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  S  Y  V
                                          CDR1

       110        120        130        140        150
TGCACTGGGTGAGGCAGGCCCCTGGGCAGCGCCTTGAGTGGATTGGATAT
M  H  W  V  R  Q  A  P  G  Q  R  L  E  W  I  G  Y

       160        170        180        190        200
GTTAATCCTTTCAATGATGGTACTAAGTACAATGAGATGTTCAAAGGCAG
 V  N  P  F  N  D  G  T  K  Y  N  E  M  F  K  G  R
                CDR2

       210        220        230        240        250
GGCCACAATCACTTCAGACAAATCCACCAGCACAGCCTACATGGAGCTCA
  A  T  I  T  S  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

       260        270        280        290        300
GCAGCCTGAGGTCTGAGGACACTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACAGGCT
S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  Q  A

       310        320        330        340
TGGGGTTACCCCTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCT (SEQ ID NO:62)
 W  G  Y  P  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S  (SEQ ID NO:38)
CDR3
```

（图5A）轻链VK1

```
        10         20         30         40         50
GACATTGTGCTCACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTCTGTCTCCCGGGGA
 D  I  V  L  T  Q  S  P  A  S  L  A  L  S  P  G  E

        60         70         80         90        100
GAGAGCCACCCTCTCCTGCAGAGCCACTGAAAGTGTTGAATACTATGGCA
  R  A  T  L  S  C  R  A  T  E  S  V  E  Y  Y  G
                                          CDR1

       110        120        130        140        150
CAAGTTTAGTGCAGTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTC
T  S  L  V  Q  W  Y  Q  Q  K  P  G  Q  P  P  K  L

       160        170        180        190        200
CTCATCTATGCTGCATCCAGCGTAGATTCTGGGGTCCCTTCCAGGTTTAG
 L  I  Y  A  A  S  S  V  D  S  G  V  P  S  R  F  S
             CDR2

       210        220        230        240        250
TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCAATTCTCTGGAGG
  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  N  S  L  E

       260        270        280        290        300
AGGAGGATGCTGCAATGTATTTCTGTCAGCAAAGTAGGAGGGTTCCGTAC
E  E  D  A  A  M  Y  F  C  Q  Q  S  R  R  V  P  Y
                                    CDR3

       310        320        330
ACGTTCGGACAGGGGACCAAGCTGGAGATAAAA (SEQ ID NO:63)
T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K  (SEQ ID NO:39)
```

图5抗PD-L1轻链的复合型人抗体序列变体

（图5B）轻链VK2

```
        10         20         30         40         50
GACATTGTGCTCACCCAATCTCCAGCTACTTTGTCTCTGTCTCCCGGGGA
 D  I  V  L  T  Q  S  P  A  T  L  S  L  S  P  G  E

        60         70         80         90        100
GAGAGCCACCCTCTCCTGCAGAGCCACTGAAAGTGTTGAATACTATGGCA
  R  A  T  L  S  C  R  A  T  E  S  V  E  Y  Y  G
                                 CDR1

       110        120        130        140        150
CAAGTTTAGTGCAGTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTC
T  S  L  V  Q  W  Y  Q  Q  K  P  G  Q  P  P  K  L

       160        170        180        190        200
CTCATCTATGCTGCATCCAGCGTAGATTCTGGGGTCCCTTCCAGGTTTAG
 L  I  Y  A  A  S  S  V  D  S  G  V  P  S  R  F  S
             CDR2

       210        220        230        240        250
TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCAATTCTCTGGAGG
  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  N  S  L  E

       260        270        280        290        300
CCGAGGATGCTGCAATGTATTTCTGTCAGCAAAGTAGGAGGGTTCCGTAC
A  E  D  A  A  M  Y  F  C  Q  Q  S  R  R  V  P  Y
                                 CDR3

       310        320        330
ACGTTCGGACAGGGGACCAAGCTGGAGATAAAA (SEQ ID NO:64)
T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K  (SEQ ID NO:40)
```

（图5C）轻链VK3

```
        10         20         30         40         50
GAGATTGTGCTCACCCAATCTCCAGCTACTTTGTCTCTGTCTCCCGGGGA
 E  I  V  L  T  Q  S  P  A  T  L  S  L  S  P  G  E

        60         70         80         90        100
GAGAGCCACCCTCTCCTGCAGAGCCACTGAAAGTGTTGAATACTATGGCA
  R  A  T  L  S  C  R  A  T  E  S  V  E  Y  Y  G
                                          CDR1

       110        120        130        140        150
CAAGTTTAGTGCAGTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTC
T  S  L  V  Q  W  Y  Q  Q  K  P  G  Q  P  P  K  L

       160        170        180        190        200
CTCATCTATGCTGCATCCAGCGTAGATTCTGGGGTCCCTTCCAGGTTTAG
 L  I  Y  A  A  S  S  V  D  S  G  V  P  S  R  F  S
             CDR2

       210        220        230        240        250
TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCAATTCTCTGGAGG
  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  N  S  L  E

       260        270        280        290        300
CCGAGGATGCTGCAATGTATTTCTGTCAGCAAAGTAGGAGGGTTCCGTAC
A  E  D  A  A  M  Y  F  C  Q  Q  S  R  R  V  P  Y
                                          CDR3

       310        320        330
ACGTTCGGACAGGGGACCAAGCTGGAGATAAAA (SEQ ID NO:65)
 T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K  (SEQ ID NO:41)
```

（图5D）轻链VK4

```
        10         20         30         40         50
GACATTGTGCTCACCCAATCTCCAGCTACTTTGTCTCTGTCTCCCGGGGA
 D  I  V  L  T  Q  S  P  A  T  L  S  L  S  P  G  E

        60         70         80         90        100
GAGAGCCACCCTCTCCTGCAGAGCCACTGAAAGTGTTGAATACTATGGCA
  R  A  T  L  S  C  R  A  T  E  S  V  E  Y  Y  G
                                      CDR1

       110        120        130        140        150
CAAGTTTAGTGCAGTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAAACTC
T  S  L  V  Q  W  Y  Q  Q  K  P  G  Q  P  P  K  L

       160        170        180        190        200
CTCATCTATGCTGCATCCAGCGTAGATTCTGGGGTCCCTTCCAGGTTTAG
 L  I  Y  A  A  S  S  V  D  S  G  V  P  S  R  F  S
             CDR2

       210        220        230        240        250
TGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCACCATCAATTCTCTGGAGG
  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  N  S  L  E

       260        270        280        290        300
CCGAGGATGCTGCAACCTATTTCTGTCAGCAAAGTAGGAGGGTTCCGTAC
A  E  D  A  A  T  Y  F  C  Q  Q  S  R  R  V  P  Y
                                      CDR3

       310        320        330
ACGTTCGGACAGGGGACCAAGCTGGAGATAAAA (SEQ ID NO:66)
 T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K  (SEQ ID NO:42)
```

（图6A）重链VH1

```
        10         20         30         40         50
CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAACTGAAGAAACCTGGGGCCTC
 Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  L  K  K  P  G  A  S

        60         70         80         90        100
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTGGCTACACGA
  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  G  Y  T
                                                CDR1

       110        120        130        140        150
TGCACTGGGTAAAACAGGCCCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
M  H  W  V  K  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y

       160        170        180        190        200
ATTAATCCTAGAAGTGGATATACTGAGTATAATCAGAAGTTCAAGGACAG
 I  N  P  R  S  G  Y  T  E  Y  N  Q  K  F  K  D  R
                CDR2

       210        220        230        240        250
GACCACATTGACTGCAGACAAATCTACCAGCACAGCCTACATGGAACTGA
  T  T  L  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

       260        270        280        290        300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGTGCAAGACCCTGG
S  S  L  R  S  E  D  S  A  V  Y  Y  C  A  R  P  W

       310        320        330        340
TTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA (SEQ ID NO:67)
 F  A  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S  (SEQ ID NO:43)
CDR3
```

图6抗PD-L2重链的复合型人抗体序列变体

（图6B）重链VH2

```
        10         20         30         40         50
CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAAGTGAAGAAACCTGGGGCCTC
 Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S

        60         70         80         90        100
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTGGCTACACGA
  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  G  Y  T
                                          CDR1

       110        120        130        140        150
TGCACTGGGTAAAACAGGCCCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
M  H  W  V  K  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y

       160        170        180        190        200
ATTAATCCTAGAAGTGGATATACTGAGTATAATCAGAAGTTCAAGGACAG
 I  N  P  R  S  G  Y  T  E  Y  N  Q  K  F  K  D  R
                      CDR2

       210        220        230        240        250
GACCACATTGACTGCAGACAAATCTACCAGCACAGCCTACATGGAACTGA
  T  T  L  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

       260        270        280        290        300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCGGTCTATTATTGTGCAAGACCCTGG
S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  P  W

       310        320        330        340
TTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA (SEQ ID NO:68)
 F  A  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S  (SEQ ID NO:44)
CDR3
```

（图6C）重链VH3

```
        10         20         30         40         50
CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAAGTGAAGAAACCTGGGGCCTC
 Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S

        60         70         80         90        100
AGTGAAGATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTGGCTACACGA
  V  K  M  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  G  Y  T
                                                CDR1

       110        120        130        140        150
TGCACTGGGTAAGACAGGCCCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
M  H  W  V  R  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y

       160        170        180        190        200
ATTAATCCTAGAAGTGGATATACTGAGTATAATCAGAAGTTCAAGGACAG
 I  N  P  R  S  G  Y  T  E  Y  N  Q  K  F  K  D  R
                        CDR2

       210        220        230        240        250
GACCACATTGACTGCAGACAAATCTACCAGCACAGCCTACATGGAACTGA
  T  T  L  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

       260        270        280        290        300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCGGTCTATTATTGTGCAAGACCCTGG
S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  P  W

       310        320        330        340
TTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA (SEQ ID NO:69)
 F  A  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S  (SEQ ID NO:45)
CDR3
```

（图6D）重链VH4

```
        10         20         30         40         50
CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAAGTGAAGAAACCTGGGGCCTC
 Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S

        60         70         80         90        100
AGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTGGCTACACGA
  V  K  V  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  G  Y  T
                                          CDR1

       110        120        130        140        150
TGCACTGGGTAAGACAGGCCCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
M  H  W  V  R  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y

       160        170        180        190        200
ATTAATCCTAGAAGTGGATATACTGAGTATAATCAGAAGTTCAAGGACAG
 I  N  P  R  S  G  Y  T  E  Y  N  Q  K  F  K  D  R
                CDR2

       210        220        230        240        250
GACCACATTGACTGCAGACAAATCTACCAGCACAGCCTACATGGAACTGA
  T  T  L  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

       260        270        280        290        300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCGGTCTATTATTGTGCAAGACCCTGG
S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  P  W

       310        320        330        340
TTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA (SEQ ID NO:70)
F  A  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S  (SEQ ID NO:46)
CDR3
```

（图6E）重链VH5

```
        10         20         30         40         50
CAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGAGCTGAAGTGAAGAAACCTGGGGCCTC
 Q  V  Q  L  V  Q  S  G  A  E  V  K  K  P  G  A  S

        60         70         80         90        100
AGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTGGCTACACGA
  V  K  V  S  C  K  A  S  G  Y  T  F  T  G  Y  T
                                          CDR1

       110        120        130        140        150
TGCACTGGGTAAGACAGGCCCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATAC
M  H  W  V  R  Q  A  P  G  Q  G  L  E  W  I  G  Y

       160        170        180        190        200
ATTAATCCTAGAAGTGGATATACTGAGTATAATCAGAAGTTCAAGGACAG
 I  N  P  R  S  G  Y  T  E  Y  N  Q  K  F  K  D  R
              CDR2

       210        220        230        240        250
GACCACAATCACTGCAGACAAATCTACCAGCACAGCCTACATGGAACTGA
  T  T  I  T  A  D  K  S  T  S  T  A  Y  M  E  L

       260        270        280        290        300
GCAGCCTGAGATCTGAGGACACTGCGGTCTATTATTGTGCAAGACCCTGG
S  S  L  R  S  E  D  T  A  V  Y  Y  C  A  R  P  W

       310        320        330        340
TTTGCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTTCA (SEQ ID NO:71)
 F  A  Y  W  G  Q  G  T  L  V  T  V  S  S  (SEQ ID NO:47)
CDR3
```

（图7A）轻链VK1

```
        10         20         30         40         50
GACATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCTCCCTGACTGTGACACCAGGAGA
 D  I  V  M  T  Q  S  P  A  S  L  T  V  T  P  G  E

        60         70         80         90        100
GAAGGTCACTATCACCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAAACAGTGGAA
  K  V  T  I  T  C  K  S  S  Q  S  L  L  N  S  G
                                          CDR1

       110        120        130        140        150
ATCAAAAGAACTACTTGACCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCT
N  Q  K  N  Y  L  T  W  Y  Q  Q  K  P  G  Q  P  P

       160        170        180        190        200
AAACTGTTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCG
 K  L  L  I  Y  W  A  S  T  R  E  S  G  V  P  D  R
                CDR2

       210        220        230        240        250
CTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC
  F  T  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S

       260        270        280        290        300
TGCAGGCTGAAGACGTGGCAGTTTATTACTGTCAGAATGATTATAGTTAT
L  Q  A  E  D  V  A  V  Y  Y  C  Q  N  D  Y  S  Y
                                          CDR3

       310        320        330
CCTCTCACGTTCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (SEQ ID NO:72)
 P  L  T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K  (SEQ ID NO:48)
```

图7抗PD-L2轻链的复合型人抗体序列变体

（图7B）轻链VK2

```
        10         20         30         40         50
GACATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCTCCCTGTCTGTGACACCAGGAGA
 D  I  V  M  T  Q  S  P  A  S  L  S  V  T  P  G  E

        60         70         80         90        100
GAAGGTCACTATCACCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAAACAGTGGAA
  K  V  T  I  T  C  K  S  S  Q  S  L  L  N  S  G
                                          CDR1

       110        120        130        140        150
ATCAAAAGAACTACTTGACCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCT
N  Q  K  N  Y  L  T  W  Y  Q  Q  K  P  G  Q  P  P

       160        170        180        190        200
AAACTGTTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCG
 K  L  L  I  Y  W  A  S  T  R  E  S  G  V  P  D  R
                CDR2

       210        220        230        240        250
CTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC
  F  T  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S

       260        270        280        290        300
TGCAGGCTGAAGACGTGGCAGTTTATTACTGTCAGAATGATTATAGTTAT
L  Q  A  E  D  V  A  V  Y  Y  C  Q  N  D  Y  S  Y
                                          CDR3

       310        320        330
CCTCTCACGTTCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (SEQ ID NO:73)
 P  L  T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K  (SEQ ID NO:49)
```

（图7C）轻链VK3

```
        10         20         30         40         50
GACATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCTTCCTGTCTGTGACACCAGGAGA
 D  I  V  M  T  Q  S  P  A  F  L  S  V  T  P  G  E

        60         70         80         90        100
GAAGGTCACTATCACCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAAACAGTGGAA
  K  V  T  I  T  C  K  S  S  Q  S  L  L  N  S  G
                                                CDR1

       110        120        130        140        150
ATCAAAAGAACTACTTGACCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCT
N  Q  K  N  Y  L  T  W  Y  Q  Q  K  P  G  Q  P  P

       160        170        180        190        200
AAACTGTTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCG
 K  L  L  I  Y  W  A  S  T  R  E  S  G  V  P  D  R
                CDR2

       210        220        230        240        250
CTTCACAGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC
  F  T  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S

       260        270        280        290        300
TGCAGGCTGAAGACGTGGCAGTTTATTACTGTCAGAATGATTATAGTTAT
L  Q  A  E  D  V  A  V  Y  Y  C  Q  N  D  Y  S  Y
                                                CDR3

       310        320        330
CCTCTCACGTTCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (SEQ ID NO:74)
 P  L  T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K  (SEQ ID NO:50)
```

(图7D) 轻链VK4

```
        10         20         30         40         50
GACATTGTGATGACACAGTCTCCAGCCTTCCTGTCTGTGACACCAGGAGA
 D  I  V  M  T  Q  S  P  A  F  L  S  V  T  P  G  E

        60         70         80         90        100
GAAGGTCACTATCACCTGCAAGTCCAGTCAGAGTCTGTTAAACAGTGGAA
  K  V  T  I  T  C  K  S  S  Q  S  L  L  N  S  G
                                          CDR1

       110        120        130        140        150
ATCAAAAGAACTACTTGACCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGCCTCCT
N  Q  K  N  Y  L  T  W  Y  Q  Q  K  P  G  Q  P  P

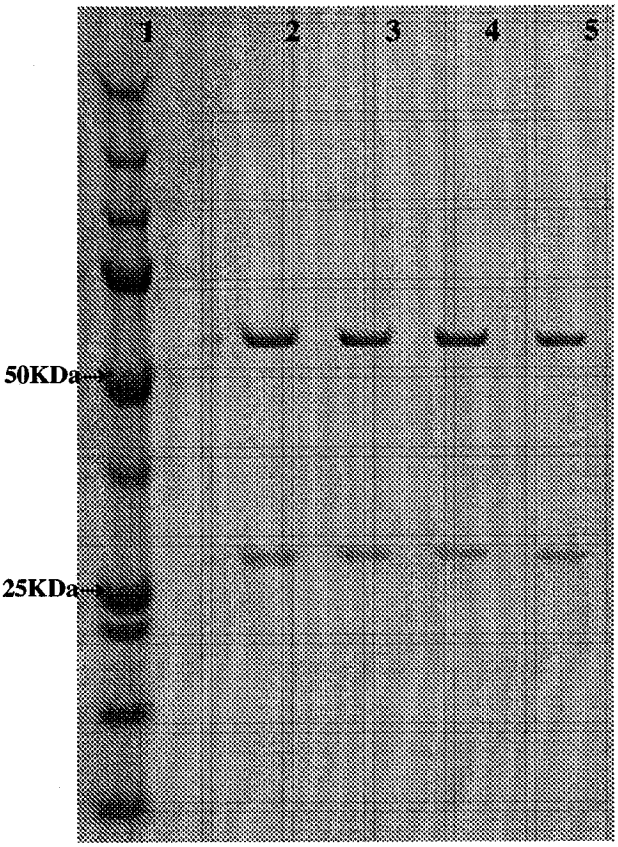
       160        170        180        190        200
AAACTGTTGATCTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCG
 K  L  L  I  Y  W  A  S  T  R  E  S  G  V  P  D  R
                CDR2

       210        220        230        240        250
CTTCTCCGGCAGTGGATCTGGAACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTC
  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S

       260        270        280        290        300
TGCAGGCTGAAGACGTGGCAGTTTATTACTGTCAGAATGATTATAGTTAT
L  Q  A  E  D  V  A  V  Y  Y  C  Q  N  D  Y  S  Y
                                          CDR3

       310        320        330
CCTCTCACGTTCGGTCAGGGGACCAAGCTGGAGATCAAA (SEQ ID NO:75)
P  L  T  F  G  Q  G  T  K  L  E  I  K  (SEQ ID NO:51)
```

（图8A）纯化的EH12.2H7抗体经考马斯蓝染色的SDS-PAGE：

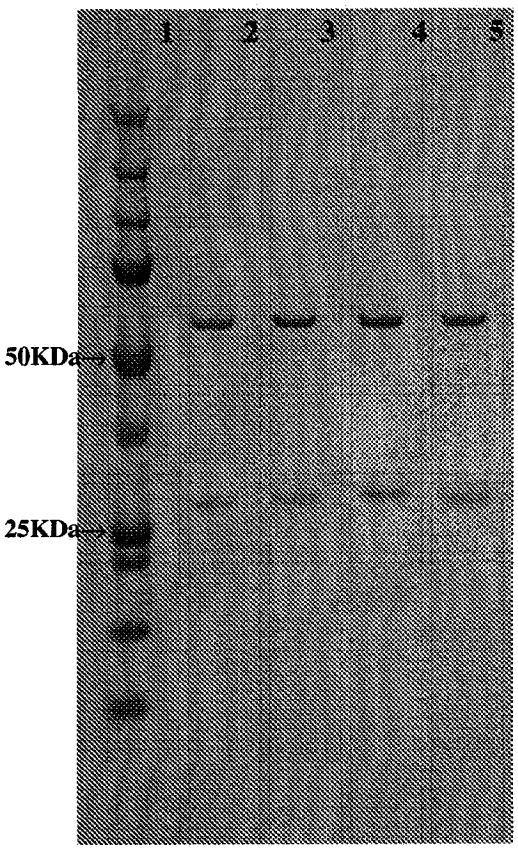


第1道：Bio-Rad精确标记物
第2道：VH4/Vκ4
第3道：VH4/Vκ3
第4道：VH3/Vκ4
第5道：VH3/Vκ3

加载1μg各抗体

图8.EH12.2H7复合型人抗体的纯化

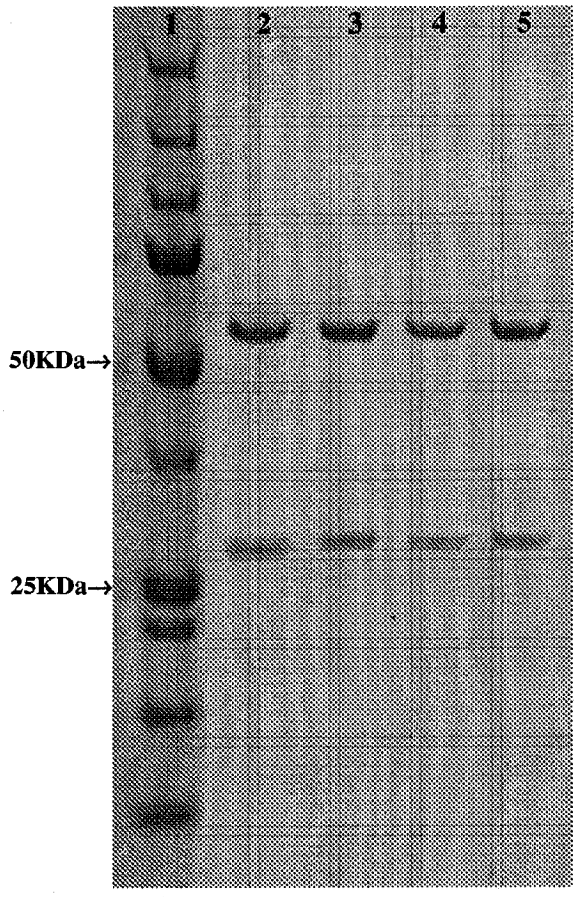
（图8B）纯化的29E.2A3抗体经考马斯蓝染色的SDS-PAGE：



第1道：Bio-Rad精确标记物
第2道：VH4/Vκ2
第3道：VH2/Vκ4
第4道：VH2/Vκ1
第5道：VH2/Vκ2

加载1μg各抗体

（图8C）纯化的24F.10C12抗体经考马斯蓝染色的SDS-PAGE：



第1道：Bio-Rad精确标记物
第2道：VH4/Vκ4
第3道：VH4/Vκ2
第4道：VH2/Vκ3
第5道：VH2/Vκ2

加载1μg各抗体

（图9A）人PD-1的竞争ELISA：

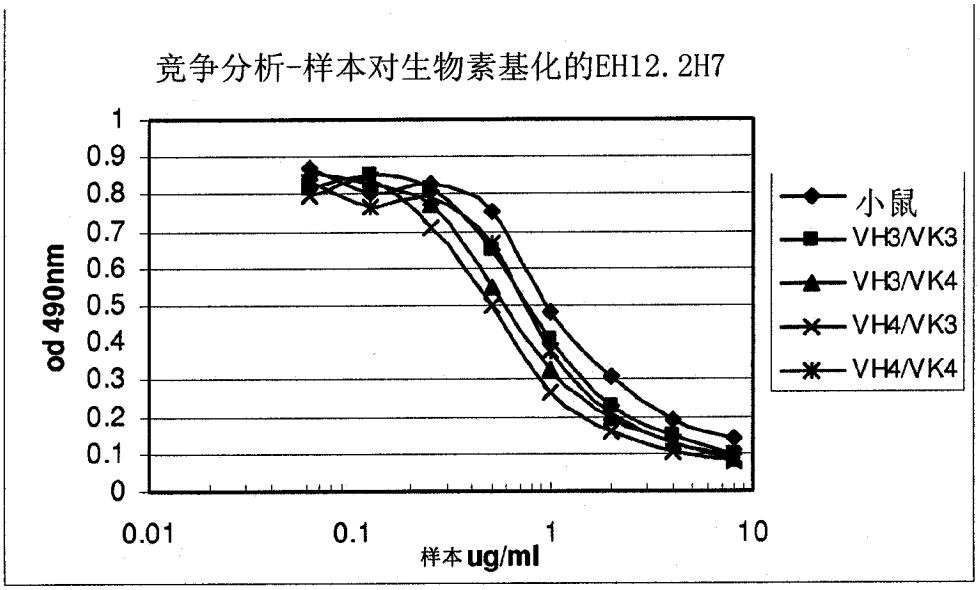
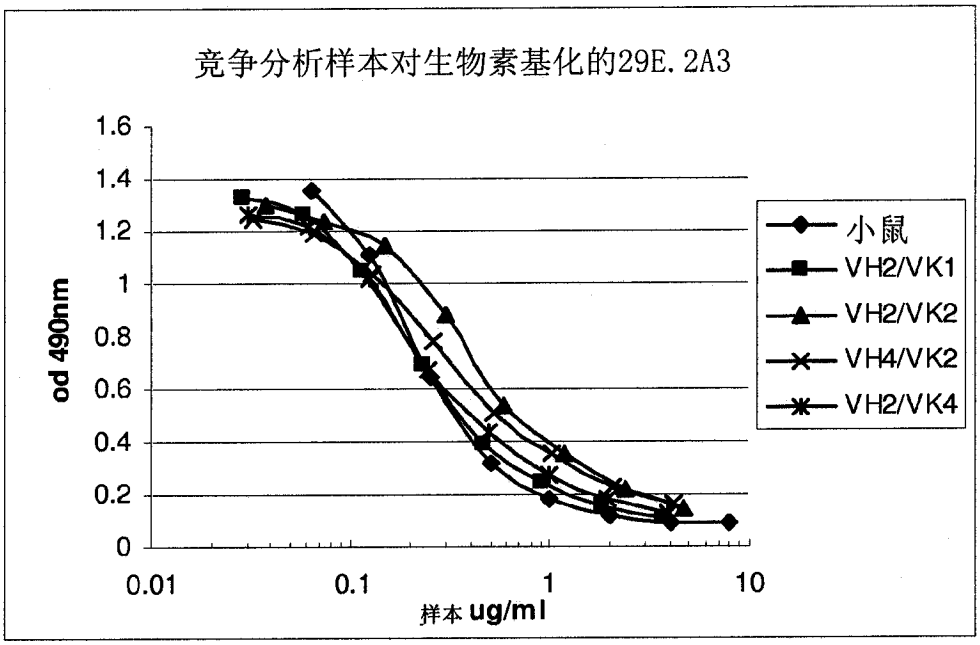
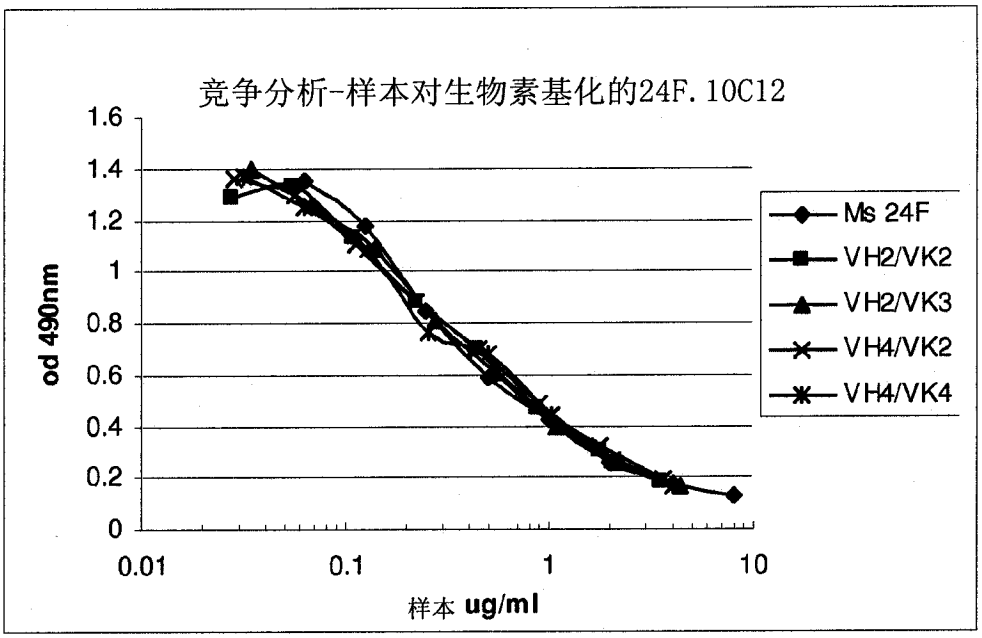


图9复合型人抗体活性与小鼠参考抗体的比较

（图9B）人PD-L1的竞争ELISA：



（图9C）人PD-L2的竞争ELISA：



（图10A）与EH12.2H7竞争结合PD-1

	VH1	VH2	VH3	VH4	VH5
VK1	0.82	0.78	0.82	0.77	ND
VK2	0.66	0.98	0.82	0.98	ND
VK3	0.82	0.98	0.76	0.46	ND
VK4	ND	0.90	0.60	0.74	ND

（图10B）与20E.283竞争结合PD-L1

	VH1	VH2	VH3	VH4	VH5
VK1	3.61	0.96	3.21	2.10	5.96
VK2	3.34	1.75	1.68	3.00	7.8
VK3	2.26	2.26	1.92	3.16	9.16
VK4	5.10	1.04	1.64	2.96	7.04

（图10C）与24F.10C12竞争结合PD-L2

	VH1	VH2	VH3	VH4	VH5
VK1	0.82	0.78	0.82	0.77	ND
VK2	0.66	0.98	0.82	0.98	ND
VK3	0.82	0.98	0.76	0.46	ND
VK4	ND	0.90	0.60	0.74	ND

图10比较小鼠抗人抗体与复合型人抗体的IC20结合

PD-1氨基酸序列（SEQ ID NO:2）

```
MQIPQAPWPV VWAVLQLGWR PGWFLDSPDR PWNPPTFSPA LLVVTEGDNA  50
TFTCSFSNTS ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRVTQL 100
PNGRDFHMSV VRARRNDSGT YLCGAISLAP KAQIKESLRA ELRVTERRAE 150
VPTAHPSPSP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS LVLLVWVLAV ICSRAARGTI 200
GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP CVPEQTEYAT 250
IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL              288
```

PD-L1氨基酸序列（SEQ ID NO:4）

```
MRIFAVFIFM TYWHLLNAFT VTVPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL  50
AALIVYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAALQ 100
ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPVTSE 150
HELTCQAEGY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVTSTLRIN 200
TTINEIFYCT FRRLDPEENH TAELVIPELP LAHPPNERTH LVILGAILLC 250
LGVALIFIFR LRKGRMMDVK KCGIQDTNSK KQSDTHLEET            290
```

PD-L2氨基酸序列（SEQ ID NO:6）

```
MIFLLLMLSL ELQLHQIAAL FTVTVPKELY IIEHGSNVTL ECNFDTGSHV  50
NLGAITASLQ KVENDTSPHR ERATLLEEQL PLGKASFHIP QVQVRDEGQY 100
QCIIIYGVAW DYKYLTLKVK ASYRKINTHI LKVPETDEVE LTCQATGYPL 150
AEVSWPNVSV PANTSHSRTP EGLYQVTSVL RLKPPPGRNF SCVFWNTHVR 200
ELTLASIDLQ SQMEPRTHPT WLLHIFIPFC IIAFIFIATV IALRKQLCQK 250
LYSSKDTTKR PVTTTKREVN SAI                              273
```

图11.PD-1、PD-L1和PD-L2的氨基酸序列

抗体	链	CDR	序列	SEQ ID NO.
抗PD-1	重	CDR1	SSWIH	7
		CDR2	YIYPSTGFTEYNQKFKD	8
		CDR3	WRDSSGYHAMDY	9
	轻	CDR1	RASQSVSTSGYSYMH	10
		CDR2	FGSNLES	11
		CDR3	QHSWEIPYT	12
抗PD-L1	重	CDR1	SYVMH	13
		CDR2	YVNPFNDGTKYNEMFKG	14
		CDR3	QAWGYP	15
	轻	CDR1	RATESVEYYGTSLVQ	16
		CDR2	AASSVDS	17
		CDR3	QQSRRVPYT	18
抗PD-L2	重	CDR1	GYTMH	19
		CDR2	YINPRSGYTEYNQKFKD	20
		CDR3	PWFAY	21
	轻	CDR1	KSSQSLLNSGNQKNYLT	22
		CDR2	WASTRES	23
		CDR3	QNDYSYPLT	24

图12复合型人抗体的CDR氨基酸序列

抗PD-1重链VH1（SEQ ID NO:25）

QVQLVQSGAELKQPGASVKMSCKASGYSFTSSWIHWVKQAPGQGLEWIGYIYPSTGFTEYNQKFKDRA
TLTADKSTSTAYMELSSLRSEDSAVYYCARWRDSSGYHAMDYWGQGTSVTVSS

抗PD-1重链VH2（SEQ ID NO:26）

QVQLVQSGAEVKQPGASVKMSCKASGYSFTSSWIHWVKQAPGQGLEWIGYIYPSTGFTEYNQKFKDRA
TLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRDSSGYHAMDYWGQGTSVTVSS

抗PD-1重链VH3（SEQ ID NO:27）

QVQLVQSGHEVKQPGASVKMSCKASGYSFTSSWIHWVKQAPGQGLEWIGYIYPSTGFTEYNQKFKDRA
TLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRDSSGYHAMDYWGQGTLVTVSS

抗PD-1重链VH4（SEQ ID NO:28）

QVQLVQSGHEVKQPGASVKMSCKASGYSFTSSWIHWVRQAPGQGLEWIGYIYPSTGFTEYNQKFKDRA
TLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRDSSGYHAMDYWGQGTLVTVSS

抗PD-1重链VH5（SEQ ID NO:29）

QVQLVQSGHEVKQPGASVKVSCKASGYSFTSSWIHWVRQAPGQGLEWIGYIYPSTGFTEYNQKFKDRA
TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARWRDSSGYHAMDYWGQGTLVTVSS

抗PD-1轻链VK1（SEQ ID NO:30）

DIVLTQSPASLTLSPGQRLTISCRASQSVSTSGYSYMHWYQQKPDQSPKLLIKFGSNLESGIPARFSG
SGSGTDFTLTISSLEEEDFATYYCQHSWEIPYTFGQGTKLEIK

抗PD-1轻链VK2（SEQ ID NO:31）

DIVLTQSPATLSLSPGQRLTISCRASQSVSTSGYSYMHWYQQKPDQSPKLLIKFGSNLESGIPARFSG
SGSGTDFTLTISSLEPEDFATYYCQHSWEIPYTFGQGTKLEIK

抗PD-1轻链VK3（SEQ ID NO:32）

EIVLTQSPATLSLSPGQRLTISCRASQSVSTSGYSYMHWYQQKPDQSPKLLIKFGSNLESGIPARFSG
SGSGTDFTLTISSLEPEDFATYYCQHSWEIPYTFGQGTKLEIK

抗PD-1轻链VK4（SEQ ID NO:33）

DIVLTQSPATLSLSPGQRLTISCRASQSVSTSGYSYMHWYQQKPDQSPKLLIKFGSNLESGIPARFSG
SGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQHSWEIPYTFGQGTKLEIK

抗PD-L1重链VH1（SEQ ID NO:34）

EVQLVQSGPELKKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQAPGQRLEWIGYVNPFNDGTKYNEMFKGRA
TLTSDKSTSTAYMELSSLRSEDSAVYYCARQAWGYPWGQGTLVTVSS

抗PD-L1重链VH2（SEQ ID NO:35）

EVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVKQAPGQRLEWIGYVNPFNDGTKYNEMFKGRA
TLTSDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQAWGYPWGQGTLVTVSS

图13复合型人抗体可变区重链和轻链的氨基酸序列

图13（续）

抗PD-L1重链VH3（SEQ ID NO:36）

EVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWIGYVNPFNDGTKYNEMFKGRA
TLTSDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQAWGYPWGQGTLVTVSS

抗PD-L1重链VH4（SEQ ID NO:37）

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWIGYVNPFNDGTKYNEMFKGRA
TLTSDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQAWGYPWGQGTLVTVSS

抗PD-L1重链VH5（SEQ ID NO:38）

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYVMHWVRQAPGQRLEWIGYVNPFNDGTKYNEMFKGRA
TITSDKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARQAWGYPWGQGTLVTVSS

抗PD-L1轻链VK1（SEQ ID NO:39）

DIVLTQSPASLALSPGERATLSCRATESVEYYGTSLVQWYQQKPGQPPKLLIYAASSVDSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTINSLEEEDAAMYFCQQSRRVPYTFGQGTKLEIK

抗PD-L1轻链VK2（SEQ ID NO:40）

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRATESVEYYGTSLVQWYQQKPGQPPKLLIYAASSVDSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTINSLEAEDAAMYFCQQSRRVPYTFGQGTKLEIK

抗PD-L1轻链VK3（SEQ ID NO:41）

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRATESVEYYGTSLVQWYQQKPGQPPKLLIYAASSVDSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTINSLEAEDAAMYFCQQSRRVPYTFGQGTKLEIK

抗PD-L1轻链VK4（SEQ ID NO:42）

DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRATESVEYYGTSLVQWYQQKPGQPPKLLIYAASSVDSGVPSRFSG
SGSGTDFTLTINSLEAEDAATYFCQQSRRVPYTFGQGTKLEIK

抗PD-L2重链VH1（SEQ ID NO:43）

QVQLVQSGAELKKPGASVKMSCKASGYTFTGYTMHWVKQAPGQGLEWIGYINPRSGYTEYNQKFKDRT
TLTADKSTSTAYMELSSLRSEDSAVYYCARPWFAYWGQGTLVTVSS

抗PD-L2重链VH2（SEQ ID NO:44）

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTGYTMHWVKQAPGQGLEWIGYINPRSGYTEYNQKFKDRT
TLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPWFAYWGQGTLVTVSS

抗PD-L2重链VH3（SEQ ID NO:45）

QVQLVQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTGYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPRSGYTEYNQKFKDRT
TLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPWFAYWGQGTLVTVSS

抗PD-L2重链VH4（SEQ ID NO:46）

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPRSGYTEYNQKFKDRT
TLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPWFAYWGQGTLVTVSS

图13（续）

抗PD-L2重链VH5（SEQ ID NO:47）

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTGYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPRSGYTEYNQKFKDRT
TITADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARPWFAYWGQGTLVTVSS

抗PD-L2轻链VK1（SEQ ID NO:48）

DIVMTQSPASLTVTPGEKVTITCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF
TGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPLTFGQGTKLEIK

抗PD-L2轻链VK2（SEQ ID NO:49）

DIVMTQSPASLSVTPGEKVTITCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF
TGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPLTFGQGTKLEIK

抗PD-L2轻链VK3（SEQ ID NO:50）

DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF
TGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPLTFGQGTKLEIK

抗PD-L2轻链VK4（SEQ ID NO:51）

DIVMTQSPAFLSVTPGEKVTITCKSSQSLLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRF
SGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQNDYSYPLTFGQGTKLEIK

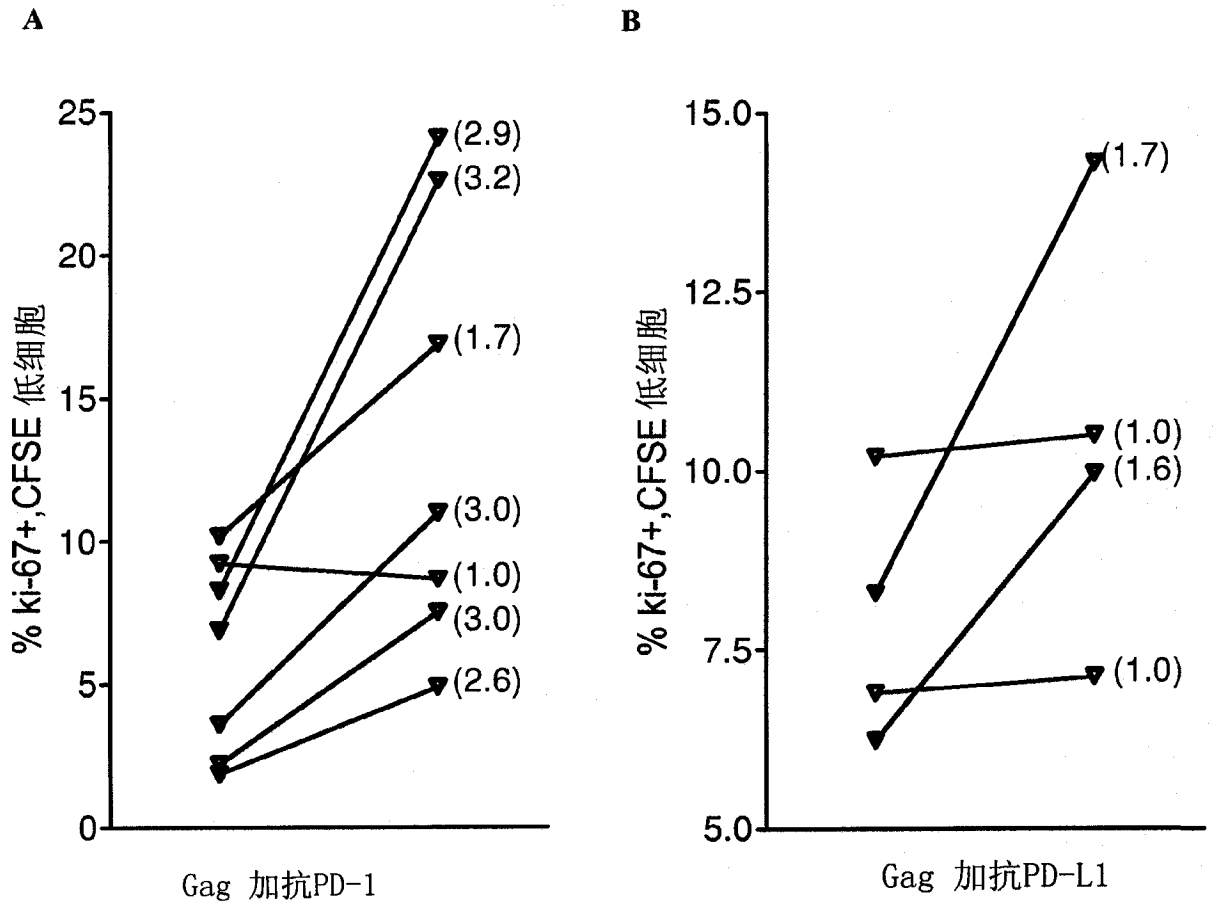

A
B
25
20
15
10
5
0
% ki-67+,CFSE 低细胞
(2.9)
(3.2)
(1.7)
(3.0)
(1.0)
(3.0)
(2.6)
Gag 加抗PD-1
15.0
12.5
10.0
7.5
5.0
% ki-67+,CFSE 低细胞
(1.7)
(1.0)
(1.6)
(1.0)
Gag 加抗PD-L1

图14

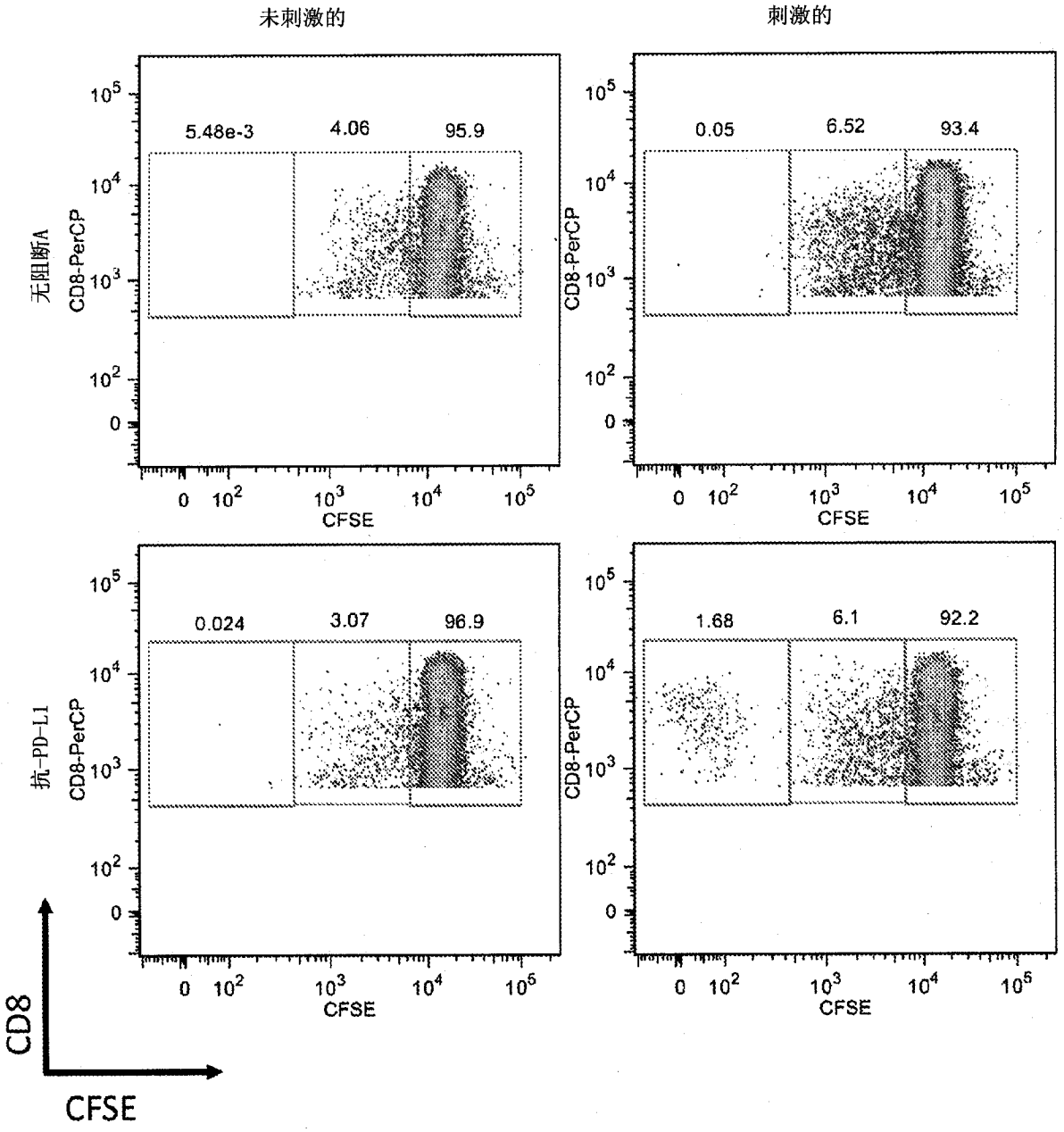

未刺激的
刺激的
无阻断A
抗-PD-L1
CD8-PerCP
CFSE
5.48e-3
4.06
95.9
0.05
6.52
93.4
0.024
3.07
96.9
1.68
6.1
92.2
CD8
CFSE

图15