



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107949573 B

(45) 授权公告日 2022.05.03

(21) 申请号 201680049891.7

(22) 申请日 2016.09.01

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107949573 A

(43) 申请公布日 2018.04.20

(30) 优先权数据
62/212,851 2015.09.01 US
62/216,043 2015.09.09 US
62/257,195 2015.11.18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.02.27

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/049913 2016.09.01

(87) PCT国际申请的公布数据
W02017/040790 EN 2017.03.09

(73) 专利权人 艾吉纳斯公司
地址 美国马萨诸塞州
专利权人 路德维格癌症研究有限公司
纪念斯隆凯特琳癌症中心

(72) 发明人 M·范迪杰克 C·A·蒙特
G·利特 J·D·沃尔乔克
T·默霍布 R·扎帕索蒂
R·B·霍尔姆加德 D·沙尔
D·A·萨维斯基 N·S·威尔森

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256
代理人 陈文平 徐志明

(51) Int.Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2015203579 A1, 2015.07.23

US 8735553 B1, 2014.05.27

CN 101213297 A, 2008.07.02

CN 102131828 A, 2011.07.20

WO 2014179664 A2, 2014.11.06

US 2014356363 A1, 2014.12.04

US 2015210769 A1, 2015.07.30

徐婧雯等. 抗体药物治疗黑色素瘤的现状
及进展.《中国药科大学学报》.2014,第45卷(第3期),

曹佳彬等. PD-1抗体在肿瘤治疗中的应用.
《中国生物制品学杂志》.2014, (第6期),

R. Moreira Da Silva. Nivolumab Anti-PD-1
monoclonal antibody cancer
immunotherapy..《Drugs of the Future》
.2014,第39卷(第1期),

M. Sznol等. Antagonist antibodies to
PD-1 and B7-H1 (PD-L1) in the treatment of
advanced human cancer..《Clinical cancer
research》.2013,第19卷(第5期), (续)

审查员 黎舒婷

权利要求书3页 说明书68页
序列表98页 附图18页

(54) 发明名称
抗-PD-1抗体及其使用方法

(57) 摘要

本公开提供了特异性地结合人PD-1和拮抗
PD-1功能的抗体。还提供了包含这些抗体的药物

组合物、编码这些抗体的核酸、用于制备这些抗
体的表达载体和宿主细胞及使用这些抗体治疗
受试者的方法。

[转续页]

[接上页]

(56) 对比文件

Benson D M等.The PD-1/PD-L1 axis modulates the natural killer cell versus multiple myeloma effect:a therapeutic target for CT-011,a novel monoclonal anti-PD-1 antibody..《Blood,American

Society of Hematology》.2010,第116卷(第13期),

J.Mcdermott等.Pembrolizumab:PD-1 inhibition as a therapeutic strategy in cancer..《Drug of Today》.2015,第51卷(第1期),

1. 一种特异性地结合人PD-1的分离的抗体,其包含含有互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3的重链可变区及含有互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3的轻链可变区,其中CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:1、2、7、4、5和6中所示的氨基酸序列组成。

2. 权利要求1所述的分离的抗体,其中所述重链可变区的氨基酸序列由SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成。

3. 权利要求2所述的分离的抗体,其中所述抗体包含氨基酸序列由SEQ ID NO:53的氨基酸序列组成的重链。

4. 权利要求1所述的分离的抗体,其中所述轻链可变区的氨基酸序列由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成。

5. 权利要求4所述的分离的抗体,其中所述抗体包含氨基酸序列由SEQ ID NO:19的氨基酸序列组成的轻链。

6. 一种特异性地结合人PD-1的分离的抗体,其包含:

(a) 重链可变区,其中该重链可变区的氨基酸序列由SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成,和

(b) 轻链可变区,其中该轻链可变区的氨基酸序列由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成。

7. 一种特异性地结合人PD-1的分离的抗体,其包含:

(a) 重链,其中该重链的氨基酸序列由SEQ ID NO:53的氨基酸序列组成,和

(b) 轻链,其中该轻链的氨基酸序列由SEQ ID NO:19的氨基酸序列组成。

8. 权利要求7所述的分离的抗体,其中所述重链的氨基酸序列由SEQ ID NO:20的氨基酸序列组成。

9. 权利要求1所述的分离的抗体,其中所述抗体包含含有按照EU编号系统的S228P突变的人IgG₄重链恒定区。

10. 权利要求1-9任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体是人抗体。

11. 权利要求1-9任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体对于人PD-1是拮抗性的。

12. 权利要求11所述的分离的抗体,其中所述抗体灭活、降低或抑制人PD-1的活性。

13. 权利要求11所述的分离的抗体,其中所述抗体抑制人PD-1与人PD-L1或与人PD-L2的结合。

14. 权利要求11所述的分离的抗体,其中所述抗体提高用葡萄球菌肠毒素A (SEA) 刺激的外周血单核细胞 (PBMC) 的IL-2产生。

15. 权利要求11所述的分离的抗体,其中所述抗体提高人T细胞和异体树突状细胞的共培养物的IFN γ 产生。

16. 权利要求11所述的分离的抗体,其中所述抗体提高与卵巢癌腹水共培养的抗-CD3-抗体-刺激的CD4⁺或CD8⁺T细胞的增殖。

17. 权利要求11所述的分离的抗体,其中所述抗体提高与PD-L1-表达的靶细胞共培养的PD-1-表达NFAT-荧光素酶报告细胞中的NFAT信号传导。

18. 权利要求1-9任一项所述的分离的抗体,其与细胞毒性剂、细胞生长抑制剂、毒素、放射性核素或可检测标记偶联。

19. 一种药物组合物,其包含权利要求1-9任一项所述的抗体及药学上可接受的载体或

赋形剂。

20. 一种分离的多核苷酸, 其编码权利要求1-9任一项所述的抗体的重链可变区和轻链可变区, 或者重链和轻链。

21. 一种包含权利要求20所述的多核苷酸的载体。

22. 一种包含权利要求20所述的多核苷酸的重组宿主细胞。

23. 一种产生结合人PD-1的抗体的方法, 该方法包括培养权利要求22所述的宿主细胞以使得所述多核苷酸被表达和所述抗体被产生。

24. 一种重组宿主细胞, 其包含:

(a) 编码权利要求1-9任一项所述的抗体的重链可变区的分离的多核苷酸, 和编码权利要求1-9任一项所述的抗体的轻链可变区的分离的多核苷酸, 或者

(b) 编码权利要求1-9任一项所述的抗体的重链的分离的多核苷酸, 和编码权利要求1-9任一项所述的抗体的轻链的分离的多核苷酸。

25. 一种产生结合人PD-1的抗体的方法, 该方法包括培养权利要求24所述的宿主细胞以使得所述多核苷酸被表达和所述抗体被产生。

26. 权利要求1-9任一项所述的抗体在制备用于提高受试者中响应于抗原的T-细胞激活的药物中的用途。

27. 权利要求1-9任一项所述的抗体在制备用于治疗受试者的癌症的药物中的用途, 其中所述癌症选自表达PD-L1的癌症。

28. 权利要求1-9任一项所述的抗体在制备用于治疗受试者的癌症的药物中的用途, 其中所述癌症选自环境诱导的癌症, 包括由石棉诱导的那些。

29. 权利要求1-9任一项所述的抗体在制备用于治疗受试者的癌症的药物中的用途, 其中所述癌症选自内分泌系统的癌症、肾或子宫的癌症、肛门的癌症、口咽的癌症、阴茎的癌症、直肠的癌症、阴道的癌症、外阴的癌症、HPV相关癌症、白血病、淋巴瘤、转移性癌症、中枢神经系统(CNS)的肿瘤、难治性或复发性恶性肿瘤、肉瘤、皮肤癌、儿童期实体肿瘤和鳞状细胞癌。

30. 权利要求1-9任一项所述的抗体在制备用于治疗受试者的癌症的药物中的用途, 其中所述癌症选自急性白血病、慢性白血病、膀胱癌、骨癌、脑干神经胶质瘤、乳腺癌、肾上腺癌、甲状旁腺的癌症、小肠的癌症、甲状腺的癌症、尿道的癌症、子宫颈的癌症、子宫内膜的癌症、输卵管的癌症、肾盂的癌症、结肠直肠癌、表皮样癌、食管癌、多形性成胶质细胞瘤、神经胶质瘤、头颈癌、肝细胞癌、霍奇金氏病、卡波济氏肉瘤、肝癌、肺癌、淋巴细胞性淋巴瘤、黑素瘤、多发性骨髓瘤、非霍奇金淋巴瘤、卵巢癌、胰腺癌、垂体腺瘤、原发CNS淋巴瘤、前列腺癌、肾细胞癌、软组织肉瘤、脊索瘤、胃癌、T-细胞淋巴瘤、睾丸癌和子宫癌。

31. 权利要求1-9任一项所述的抗体在制备用于治疗受试者的癌症的药物中的用途, 其中所述癌症选自急性成淋巴细胞性白血病、急性髓性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓性白血病、子宫内膜癌和子宫颈癌。

32. 权利要求27-31任一项所述的用途, 其中所述药物适合于皮下或静脉内施用。

33. 权利要求27-31任一项所述的用途, 其中所述药物适合于肿瘤内施用。

34. 权利要求27-31任一项所述的用途, 其中所述药物适合于与另外的治疗剂组合向所述受试者施用。

35. 权利要求34所述的用途, 其中所述另外的治疗剂是化疗剂、放疗剂或检查点靶向剂。

36. 权利要求35所述的用途, 其中所述检查点靶向剂选自拮抗剂抗-PD-1抗体、拮抗剂抗-PD-L1抗体、拮抗剂抗-PD-L2抗体、拮抗剂抗-CTLA-4抗体、拮抗剂抗-TIM-3抗体、拮抗剂抗-LAG-3抗体、拮抗剂抗-CEACAM1抗体、拮抗剂抗-TIGIT抗体、激动剂抗-CD137抗体、激动剂抗-ICOS抗体、激动剂抗-GITR抗体和激动剂抗-OX40抗体。

37. 权利要求34所述的用途, 其中所述另外的治疗剂是吡啶胺-2,3-双加氧酶 (IDO) 的抑制剂。

38. 权利要求37所述的用途, 其中所述抑制剂选自epacadostat、F001287、indoximod和NLG919。

39. 权利要求34所述的用途, 其中所述另外的治疗剂是疫苗。

40. 权利要求39所述的用途, 其中所述疫苗包括包含与抗原肽复合的热休克蛋白的热休克蛋白肽复合物 (HSPPC)。

41. 权利要求40所述的用途, 其中所述热休克蛋白是hsc70并且与肿瘤相关抗原肽复合。

42. 权利要求40所述的用途, 其中所述热休克蛋白是gp96蛋白并且与肿瘤相关抗原肽复合, 其中所述HSPPC源自从受试者获得的肿瘤。

43. 权利要求34所述的用途, 其中所述另外的治疗剂包括TCR。

44. 权利要求43所述的用途, 其中所述另外的治疗剂是可溶性TCR。

45. 权利要求43所述的用途, 其中所述另外的治疗剂是表达TCR的细胞。

46. 权利要求34所述的用途, 其中所述另外的治疗剂是表达嵌合抗原受体的细胞。

47. 权利要求34所述的用途, 其中所述另外的治疗剂是特异性地结合肽-MHC复合体的抗体。

抗-PD-1抗体及其使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2015年9月1日提交的U.S.临时申请No:62/212,851、2015年9月9日提交的U.S.临时申请No:62/216,043和2015年11月18日提交的U.S.临时申请No:62/257,195的利益,其各自通过引用全文合并于此。

1. 技术领域

[0003] 本公开涉及特异性地结合人PD-1的抗体及使用该抗体的方法。

2. 背景技术

[0004] 蛋白质程序化细胞死亡蛋白1 (PD-1) 是受体CD28家族的抑制性成员。PD-1在激活的B细胞、T细胞和骨髓细胞上表达 (Agata等 (1996) Int Immunol 8:765-72; Okazaki等 (2002) Curr Opin Immunol 14:391779-82; Bennett等 (2003) J Immunol 170:711-8)。PD-1是55kDa的I型跨膜蛋白,其是Ig基因超家族的部分且包含膜近侧免疫受体酪氨酸抑制基序 (ITIM) 和膜远侧酪氨酸基转换基序 (ITSM) (Thomas, M.L. (1995) J Exp Med 181:1953-6; Vivier, E和Daeron, M (1997) Immunol Today 18:286-91)。已经鉴定了PD-1的两个配体,PD-L1和PD-L2,其显示为在结合PD-1时下调T细胞激活 (Freeman等 (2000) J Exp Med 192:1027-34; Latchman等 (2001) Nat Immunol 2:261-8; Carter等 (2002) Eur J Immunol 32:634-43)。PD-L1在多种人癌症中是丰富的 (Dong等 (2002) Nat Med 8:787-9)。PD-1和PD-L1之间的相互作用导致肿瘤浸润淋巴细胞的减少、T细胞受体介导的增殖的降低和癌性细胞的免疫逃避 (Dong等 (2003) J Mol Med 81:281-7; Blank等 (2005) Cancer Immunol Immunother 54:307-314; Konishi等 (2004) Clin Cancer Res 10:5094-100)。这种免疫抑制可以通过抑制PD-1与PD-L1的局部相互作用逆转,且该效应在PD-1与PD-L2的相互作用也被阻断时是累加的 (Iwai等 (2002) Proc Natl Acad Sci USA 99:12293-7; Brown等 (2003) J Immunol 170:1257-66)。

[0005] PD-1是免疫细胞抑制分子。PD-1缺陷动物发生各种自身免疫表型,包括自身免疫性心肌病及伴随关节炎和肾炎的狼疮样综合征 (Nishimura等 (1999) Immunity 11:141-51; Nishimura等 (2001) Science 291:319-22)。另外,PD-1已发现在自身免疫性脑脊髓炎、系统性红斑狼疮、移植物抗宿主病 (GVHD)、I型糖尿病和类风湿性关节炎中发挥作用 (Salama等 (2003) J Exp Med 198:71-78; Prokunina和Alarcon-Riquelme (2004) Hum Mol Genet 13:R143; Nielsen等 (2004) Lupus 13:510)。在鼠B细胞肿瘤系中,PD-1的ITSM显示为对于阻断BCR-介导的Ca²⁺流和下游效应分子的酪氨酸磷酸化是必要的 (Okazaki等 (2001) PNAS 98:13866-71)。

[0006] 鉴于人PD-1在调节免疫反应中的作用,设计为拮抗PD-1信号传导的治疗剂对于治疗涉及PD-1介导的免疫抑制的疾病仍然是很有希望的。

3. 发明内容

[0007] 本公开提供了特异性地结合人和拮抗PD-1功能(例如,PD-1-介导的免疫抑制)的抗体。还提供了包含这些抗体的药物组合物、编码这些抗体的核酸、用于产生这些抗体的表达载体和宿主细胞及使用这些抗体治疗受试者的方法。本文公开的抗体特别可用于提高响应于抗原(例如,肿瘤抗原或传染病抗原)的T-细胞激活和/或降低Treg-介导的免疫抑制,且因此用于治疗受试者中的癌症或者治疗或预防受试者的传染病。

[0008] 因此,在一个方面,本公开提供了抗体或分离的抗体,其包含含有互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3的重链可变区和含有互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3的轻链可变区,其中:(a) CDRH1包含SYGMH(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列;(b) CDRH2包含VIWX₁DGSNX₂YYADSVX₃G(SEQ ID NO:32)的氨基酸序列,其中X₁是Y或F;X₂是K或E;和X₃是K或M;(c) CDRH3包含NX₁DX₂(SEQ ID NO:33)的氨基酸序列,其中X₁是G或V;和X₂是H或Y;(d) CDRL1包含RASQSVSSNLA(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列;(e) CDRL2包含GASTRAT(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列;和(f) CDRL3包含QQYNNWPRT(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列。

[0009] 在某些实施方式中,CDRH2包含选自SEQ ID NO:2和34-36的氨基酸序列。

[0010] 在某些实施方式中,CDRH3包含选自SEQ ID NO:3、7和37的氨基酸序列。

[0011] 在某些实施方式中,CDRH1、CDRH2和CDRH3分别包含SEQ ID NO:1、2和3;1、2和7;1、2和37;1、34和7;1、35和7;或1、36和7中所示的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列。

[0012] 在某些实施方式中,抗体包含含有互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3的重链可变区及含有互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3的轻链可变区,其中CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3分别包含SEQ ID NO:1、2、3、4、5和6中所示的氨基酸序列。

[0013] 在某些实施方式中,抗体包含含有互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3的重链可变区及含有互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3的轻链可变区,其中CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3分别包含SEQ ID NO:1、2、7、4、5和6中所示的氨基酸序列。

[0014] 在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的重链可变区。

[0015] 在某些实施方式中,抗体包含含有与选自SEQ ID NO:15、17和26-31的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%或100%同一的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施方式中,重链可变区包含选自SEQ ID NO:15、17和26-31的氨基酸序列。在某些实施方式中,重链可变区包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。在某些实施方式中,重链可变区包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在某些实施方式中,重链可变区包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。在某些实施方式中,重链可变区包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。在某些实施方式中,重链可变区包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列。在某些实施方式中,重链可变区包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列。在某些实施方式中,重链可变区包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列。在某些实施方式中,重链可变区包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:52的氨基酸序列的重链。在某些实施

方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:55的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:56的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的重链。

[0016] 在某些实施方式中,抗体包含具有源自人IGHV3-33种系序列的氨基酸序列(例如,IGHV3-33*01,例如,具有SEQ ID NO:50的氨基酸序列)的重链可变区。

[0017] 在某些实施方式中,抗体包含含有与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%或100%同一的氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施方式中,轻链可变区包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。

[0018] 在某些实施方式中,抗体包含具有源自人IGKV3-15种系序列的氨基酸序列(例如,IGKV3-15*01,例如,具有SEQ ID NO:51的氨基酸序列)的轻链可变区。

[0019] 在某些实施方式中,抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区和轻链可变区分别包含SEQ ID NO:15和16;17和16;26和16;27和16;28和16;29和16;30和16;或31和16中所示的氨基酸序列。

[0020] 在另一个方面,本公开提供了抗体或分离的抗体,其包含:(a)含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的重链可变区,和(b)含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区。

[0021] 在另一个方面,本公开提供了抗体或分离的抗体,其包含:(a)含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的重链可变区,和(b)含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区。

[0022] 在另一个方面,本公开提供了抗体或分离的抗体,其包含:(a)含有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的重链可变区,和(b)含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区。

[0023] 在另一个方面,本公开提供了抗体或分离的抗体,其包含:(a)含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链可变区,和(b)含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区。

[0024] 在另一个方面,本公开提供了抗体或分离的抗体,其包含:(a)含有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的重链可变区,和(b)含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区。

[0025] 在另一个方面,本公开提供了抗体或分离的抗体,其包含:(a)含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的重链可变区,和(b)含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区。

[0026] 在另一个方面,本公开提供了抗体或分离的抗体,其包含:(a)含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的重链可变区,和(b)含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区。

[0027] 在另一个方面,本公开提供了抗体或分离的抗体,其包含:(a)具有源自人IGHV3-33种系序列的氨基酸序列(例如,IGHV3-33*01,例如,具有SEQ ID NO:50的氨基酸序列)的重链可变区,和(b)具有源自人IGKV3-15种系序列的氨基酸序列(例如,IGKV3-15*01,例如,具有SEQ ID NO:51的氨基酸序列)的轻链可变区。

[0028] 在另一个方面,本公开提供了抗体或分离的抗体,其包含:(a)含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的重链可变区,和(b)含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区。

[0029] 在另一个方面,本公开提供了抗体或分离的抗体,其包含含有选自SEQ ID NO:15、17和26-31的氨基酸序列的重链可变区。

[0030] 在另一个方面,本公开提供了抗体或分离的抗体,其包含含有SEQ ID NO:16的氨

氨基酸序列的轻链可变区。

[0031] 在另一个方面,本公开提供了抗体或分离的抗体,其包含:(a)含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的重链,和(b)含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。

[0032] 在另一个方面,本公开提供了抗体或分离的抗体,其包含:(a)含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的重链,和(b)含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。

[0033] 在另一个方面,本公开提供了抗体或分离的抗体,其包含:(a)含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链,和(b)含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。

[0034] 在另一个方面,本公开提供了抗体或分离的抗体,其包含:(a)含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的重链,和(b)含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。

[0035] 在另一个方面,本公开提供了抗体或分离的抗体,其包含:(a)含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链,和(b)含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。

[0036] 在另一个方面,本公开提供了抗体或分离的抗体,其包含:(a)含有SEQ ID NO:52的氨基酸序列的重链,和(b)含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。

[0037] 在另一个方面,本公开提供了抗体或分离的抗体,其包含:(a)含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的重链,和(b)含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。

[0038] 在另一个方面,本公开提供了抗体或分离的抗体,其包含:(a)含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的重链,和(b)含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。

[0039] 在另一个方面,本公开提供了抗体或分离的抗体,其包含:(a)含有SEQ ID NO:55的氨基酸序列的重链,和(b)含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。

[0040] 在另一个方面,本公开提供了抗体或分离的抗体,其包含:(a)含有SEQ ID NO:56的氨基酸序列的重链,和(b)含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。

[0041] 在另一个方面,本公开提供了特异性地结合人PD-1的抗体或分离的抗体,其包含含有互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3的重链可变区及含有互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3的轻链可变区,其中:(a)CDRH1包含SYGMH(SEQ ID NO:1)的氨基酸序列;(b)CDRH2包含VIWX₁DGSNX₂YYADSVX₃G(SEQ ID NO:32)的氨基酸序列,其中X₁是Y或F;X₂是K或E;和X₃是K或M;(c)CDRH3包含NX₁DX₂(SEQ ID NO:33)的氨基酸序列,其中X₁是G或V;和X₂是H或Y;(d)CDRL1包含RASQSVSSNLA(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列;(e)CDRL2包含GASTRAT(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列;和(f)CDRL3包含QQYNNWPRT(SEQ ID NO:6)的氨基酸序列。

[0042] 在某些实施方式中,CDRH2包含选自SEQ ID NO:2和34-36的氨基酸序列。

[0043] 在某些实施方式中,CDRH3包含选自SEQ ID NO:3、7和37的氨基酸序列。

[0044] 在某些实施方式中,CDRH1、CDRH2和CDRH3分别包含SEQ ID NO:1、2和3;1、2和7;1、2和37;1、34和7;1、35和7;或1、36和7中所示的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列。

[0045] 在某些实施方式中,抗体包含含有互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3的重链可变区及含有互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3的轻链可变区,其中CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3分别包含SEQ ID NO:1、2、3、4、5和6中所示的氨基酸序列。

[0046] 在某些实施方式中,抗体包含含有互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3的重链可变区及含有互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3的轻链可变区,其中CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3分别包含SEQ ID NO:1、2、7、4、5和6中所示的氨基酸序列。

[0047] 在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的重链可变区。

[0048] 在某些实施方式中,抗体包含含有与选自SEQ ID NO:15、17和26-31的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%或100%同一的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施方式中,重链可变区包含选自SEQ ID NO:15、17和26-31的氨基酸序列。在某些实施方式中,重链可变区包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列。在某些实施方式中,重链可变区包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。在某些实施方式中,重链可变区包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。在某些实施方式中,重链可变区包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。在某些实施方式中,重链可变区包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列。在某些实施方式中,重链可变区包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列。在某些实施方式中,重链可变区包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列。在某些实施方式中,重链可变区包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:52的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:55的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:56的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的重链。

[0049] 在某些实施方式中,抗体包含具有源自人IGHV3-33种系序列的氨基酸序列(例如,IGHV3-33*01,例如,具有SEQ ID NO:50的氨基酸序列)的重链可变区。

[0050] 在某些实施方式中,抗体包含含有与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%或100%同一的氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施方式中,轻链可变区包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。

[0051] 在某些实施方式中,抗体包含具有源自人IGKV3-15种系序列的氨基酸序列(例如,IGKV3-15*01,例如,具有SEQ ID NO:51的氨基酸序列)的轻链可变区。

[0052] 在某些实施方式中,抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区和轻链可变区分别包含SEQ ID NO:15和16;17和16;26和16;27和16;28和16;29和16;30和16;或31和16中所示的氨基酸序列。

[0053] 在另一个方面,本公开提供了特异性地结合人PD-1的抗体或分离的抗体,其包含:(a)含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的重链可变区,和(b)含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区。

[0054] 在另一个方面,本公开提供了特异性地结合人PD-1的抗体或分离的抗体,其包含:(a)含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的重链可变区,和(b)含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区。

[0055] 在另一个方面,本公开提供了特异性地结合人PD-1的抗体或分离的抗体,其包含:(a)含有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的重链可变区,和(b)含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列

的轻链可变区。

[0056] 在另一个方面,本公开提供了特异性地结合人PD-1的抗体或分离的抗体,其包含:
(a) 含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的重链可变区,和 (b) 含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区。

[0057] 在另一个方面,本公开提供了特异性地结合人PD-1的抗体或分离的抗体,其包含:
(a) 含有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的重链可变区,和 (b) 含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区。

[0058] 在另一个方面,本公开提供了特异性地结合人PD-1的抗体或分离的抗体,其包含:
(a) 含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的重链可变区,和 (b) 含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区。

[0059] 在另一个方面,本公开提供了特异性地结合人PD-1的抗体或分离的抗体,其包含:
(a) 含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的重链可变区,和 (b) 含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区。

[0060] 在另一个方面,本公开提供了特异性地结合人PD-1的抗体或分离的抗体,其包含:
(a) 含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的重链可变区,和 (b) 含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区。

[0061] 在另一个方面,本公开提供了特异性地结合人PD-1的抗体或分离的抗体,其包含:
(a) 具有源自人IGHV3-33种系序列的氨基酸序列(例如,IGHV3-33*01,例如,具有SEQ ID NO:50的氨基酸序列)的重链可变区,和 (b) 具有源自人IGKV3-15种系序列的氨基酸序列(例如,IGKV3-15*01,例如,具有SEQ ID NO:51的氨基酸序列)的轻链可变区。

[0062] 在另一个方面,本公开提供了特异性地结合人PD-1的抗体或分离的抗体,其包含含有选自SEQ ID NO:15、17和26-31的氨基酸序列的重链可变区。

[0063] 在另一个方面,本公开提供了特异性地结合人PD-1的抗体或分离的抗体,其包含含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列的轻链可变区。

[0064] 在另一个方面,本公开提供了特异性地结合人PD-1的抗体或分离的抗体,其包含:
(a) 含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的重链,和 (b) 含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。

[0065] 在另一个方面,本公开提供了特异性地结合人PD-1的抗体或分离的抗体,其包含:
(a) 含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的重链,和 (b) 含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。

[0066] 在另一个方面,本公开提供了特异性地结合人PD-1的抗体或分离的抗体,其包含:
(a) 含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链,和 (b) 含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。

[0067] 在另一个方面,本公开提供了特异性地结合人PD-1的抗体或分离的抗体,其包含:
(a) 含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的重链,和 (b) 含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。

[0068] 在另一个方面,本公开提供了特异性地结合人PD-1的抗体或分离的抗体,其包含:
(a) 含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链,和 (b) 含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。

[0069] 在另一个方面,本公开提供了特异性地结合人PD-1的抗体或分离的抗体,其包含:(a) 含有SEQ ID NO:52的氨基酸序列的重链,和(b) 含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。

[0070] 在另一个方面,本公开提供了特异性地结合人PD-1的抗体或分离的抗体,其包含:(a) 含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的重链,和(b) 含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。

[0071] 在另一个方面,本公开提供了特异性地结合人PD-1的抗体或分离的抗体,其包含:(a) 含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的重链,和(b) 含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。

[0072] 在另一个方面,本公开提供了特异性地结合人PD-1的抗体或分离的抗体,其包含:(a) 含有SEQ ID NO:55的氨基酸序列的重链,和(b) 含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。

[0073] 在另一个方面,本公开提供了特异性地结合人PD-1的抗体或分离的抗体,其包含:(a) 含有SEQ ID NO:56的氨基酸序列的重链,和(b) 含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。

[0074] 在另一个方面,本公开提供了与本文中公开的任何抗体交叉竞争结合人PD-1的抗体或分离的抗体。在另一个方面,本公开提供了与本文中公开的任何抗体结合(例如,特异性地结合)人PD-1的相同表位的抗体或分离的抗体。

[0075] 在另一个方面,本公开提供了结合(例如,特异性地结合)人PD-1的表位的抗体。在某些实施方式中,抗体结合人PD-1的包含SEQ ID NO:74的残基107-122、基本上由其组成或由其组成的表位。在某些实施方式中,抗体结合人PD-1的由SEQ ID NO:74的残基107-122组成的表位。在某些实施方式中,抗体结合人PD-1的包含SEQ ID NO:74的残基5-22、基本上由其组成或由其组成的表位。在某些实施方式中,抗体结合人PD-1的由SEQ ID NO:74的残基5-22组成的表位。在某些实施方式中,抗体结合人PD-1的包含SEQ ID NO:74的残基6-15、基本上由其组成或由其组成的表位。在某些实施方式中,抗体结合人PD-1的由SEQ ID NO:74的残基6-15组成的表位。在某些实施方式中,抗体结合人PD-1的包含SEQ ID NO:74的残基130-138、基本上由其组成或由其组成的表位。在某些实施方式中,抗体结合人PD-1的由SEQ ID NO:74的残基130-138组成的表位。在某些实施方式中,抗体结合人PD-1的包含SEQ ID NO:74的残基106-113、基本上由其组成或由其组成的表位。在某些实施方式中,抗体结合人PD-1的由SEQ ID NO:74的残基106-113组成的表位。

[0076] 在另一个方面,本公开提供了一种抗体,其中在该抗体与人PD-1蛋白结合接着加入氘时,在包含SEQ ID NO:74的残基107-122的区域中人PD-1蛋白中的氢与氘的交换相对于在不存在该抗体的情况下相同区域中人PD-1蛋白中的氢与氘的交换显著减少,如通过氢/氘交换测定的。在另一个方面,本公开提供了一种抗体,其中在该抗体与人PD-1蛋白结合接着加入氘时,在包含SEQ ID NO:74的残基5-22的区域中人PD-1蛋白中的氢与氘的交换相对于在不存在该抗体的情况下相同区域中人PD-1蛋白中的氢与氘的交换显著减少,如通过氢/氘交换测定的。

[0077] 在另一个方面,本公开提供了抗体或分离的抗体,其与本发明的任何抗体结合(例如,特异性地结合)人PD-1的相同表位。在优选的实施方式中,抗体结合人PD-1的包含SEQ

ID NO:74的残基107-122、基本上由其组成或由其组成的表位。在另一优选的实施方式中,抗体结合人PD-1的由SEQ ID NO:74的残基107-122组成的表位。在另一优选的实施方式中,抗体结合人PD-1的包含SEQ ID NO:74的残基5-22、基本上由其组成或由其组成的表位。在另一优选的实施方式中,抗体结合人PD-1的由SEQ ID NO:74的残基5-22组成的表位。在另一优选的实施方式中,抗体结合人PD-1的包含SEQ ID NO:74的残基6-15、基本上由其组成或由其组成的表位。在另一优选的实施方式中,抗体结合人PD-1的由SEQ ID NO:74的残基6-15组成的表位。在另一优选的实施方式中,抗体结合人PD-1的包含SEQ ID NO:74的残基130-138、基本上由其组成或由其组成的表位。在另一优选的实施方式中,抗体结合人PD-1的由SEQ ID NO:74的残基130-138组成的表位。在另一优选的实施方式中,抗体结合人PD-1的包含SEQ ID NO:74的残基106-113、基本上由其组成或由其组成的表位。在另一优选的实施方式中,抗体结合人PD-1的由SEQ ID NO:74的残基106-113组成的表位。在进一步优选的实施方式中,抗体结合人PD-1的包含SEQ ID NO:74的残基6-15、基本上由其组成或由其组成的表位,和/或人PD-1的包含SEQ ID NO:74的残基130-138、基本上由其组成或由其组成的和/或包含SEQ ID NO:74的残基106-113、基本上由其组成或由其组成的表位。与表位的结合优选通过Pepscan分析测定,特别地如实施例中所所述的。例如,与人PD-1的超过一个上述表位序列的结合可以在不连续表位的情况中发生。

[0078] 在另一个方面,本公开提供了与本发明的任何抗体结合(例如,特异性地结合)人PD-1的相同表位的抗体或分离的抗体,其中在该抗体与人PD-1蛋白结合接着加入氘时,在包含SEQ ID NO:74的残基107-122的区域中人PD-1蛋白中的氢与氘的交换相对于在不存在该抗体的情况下相同区域中人PD-1蛋白中的氢与氘的交换显著减少,如通过氢/氘交换测定的。在另一个方面,本公开提供了与本发明的任何抗体结合(例如,特异性地结合)人PD-1的相同表位的抗体或分离的抗体,且其中在该抗体与人PD-1蛋白结合接着加入氘时,在包含SEQ ID NO:74的残基5-22的区域中人PD-1蛋白中的氢与氘的交换相对于在不存在该抗体的情况下相同区域中人PD-1蛋白中的氢与氘的交换显著减少,如通过氢/氘交换测定的。在更优选的实施方式中,在抗体与人PD-1蛋白结合接着加入氘时,在包含SEQ ID NO:74的残基107-122的区域中人PD-1蛋白中的氢与氘的交换相对于在不存在该抗体的情况下相同区域中人PD-1蛋白中的氢与氘的交换显著减少,如通过氢/氘交换测定的,且在该抗体与人PD-1蛋白结合接着加入氘时,在包含SEQ ID NO:74的残基5-22的区域中人PD-1蛋白中的氢与氘的交换相对于在不存在该抗体的情况下相同区域中人PD-1蛋白中的氢与氘的交换显著减少,如通过氢/氘交换测定的。例如,与人PD-1的超过一个上述表位序列的结合可以在不连续表位的情况中发生。

[0079] 在另一个方面,本公开提供了与本发明的任何抗体结合(例如,特异性地结合)人PD-1的相同表位的抗体或分离的抗体,其中该表位通过氢-氘交换(HDX)(特别地如实施例中所所述)或通过Pepscan分析(特别地如实施例中所所述)测定,更优选通过氢-氘交换测定。

[0080] 以下实施方式适应于所有前述方面。

[0081] 在某些实施方式中,抗体包含选自人IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂的重链恒定区。在某些实施方式中,抗体包含人IgG₁重链恒定区。在某些实施方式中,抗体包含缺乏按照EU编号系统的N297位处的聚糖部分的人IgG₁重链恒定区。在某些实施方式中,抗体包含含有按照EU编号系统的N297A突变的人IgG₁重链恒定区。在某些实施方式中,抗体包含含有

按照EU编号系统的N297Q突变的人IgG₁重链恒定区。在某些实施方式中,抗体包含含有按照EU编号系统的D265A突变的人IgG₁重链恒定区。在某些实施方式中,抗体包含含有按照EU编号系统的S228P突变的人IgG₄重链恒定区。

[0082] 在某些实施方式中,抗体包含作为野生型人IgG重链恒定区的变体的人IgG重链恒定区,其中与野生型人IgG重链恒定区结合人Fc受体相比,所述变体人IgG重链恒定区以更低的亲和力结合人Fc受体。在某些实施方式中,人Fc受体是Fc γ R。在某些实施方式中,Fc γ R是Fc γ RIIB。在某些实施方式中,Fc γ R在选自树突状细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、粒细胞、B细胞和自然杀伤细胞的细胞上表达。在某些实施方式中,变体人IgG重链恒定区是变体人IgG₁、变体人IgG₂或变体人IgG₄重链恒定区。在某些实施方式中,抗体包含选自人IgG κ 和IgG λ 的轻链恒定区。

[0083] 在某些实施方式中,抗体是人抗体。在某些实施方式中,抗体对于人PD-1是拮抗性的。在某些实施方式中,抗体灭活、降低或抑制人PD-1的活性。在某些实施方式中,抗体抑制人PD-1与人PD-L1或与人PD-L2的结合。在某些实施方式中,抗体提高用葡萄球菌肠毒素A(SEA)刺激的外周血单核细胞(PBMC)的IL-2产生。在某些实施方式中,抗体提高人T细胞和异体树突状细胞的共培养物的IFN γ 产生。在某些实施方式中,抗体提高与卵巢癌腹水共培养的抗-CD3-抗体-刺激的CD4⁺或CD8⁺T细胞的增殖。在某些实施方式中,抗体提高与表达PD-L1的靶细胞共培养的PD-1-表达NFAT-荧光素酶报告细胞中的NFAT信号传导。

[0084] 在某些实施方式中,本文中公开的抗体与细胞毒性剂、细胞生长抑制剂、毒素、放射性核素或可检测标记偶联。

[0085] 在另一个方面,本公开提供了包含本文公开的抗体及药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物。

[0086] 在另一个方面,本公开提供了编码本文中公开的抗体的重链和/或轻链的多核苷酸或分离的多核苷酸。在另一个方面,本公开提供了包含该多核苷酸的载体。在再一个方面,本公开提供了包含该多核苷酸或载体的重组宿主细胞。在进一步的方面,本公开提供了产生结合人PD-1的抗体的方法,该方法包括培养宿主细胞以使得所述多核苷酸被表达和所述抗体被产生。在优选的实施方式中,所述方法是体外方法。

[0087] 在一个实施方式中,本发明涉及本发明的抗体,或本发明的药物组合物,或本发明的多核苷酸,或本发明的载体,或本发明的重组宿主细胞,其用作药物。

[0088] 在一个实施方式中,本发明涉及本发明的抗体,或本发明的药物组合物,或本发明的多核苷酸,或本发明的载体,或本发明的重组宿主细胞,其用作诊断剂。

[0089] 在一个实施方式中,本发明涉及本发明的抗体用于制备免疫治疗的药物组合物或药物的用途。优选地,免疫治疗是用于提高T-细胞的活性,任选地用于治疗癌症或者治疗或预防传染病。

[0090] 在另一个方面,本公开提供了提高受试者中响应于抗原的T-细胞激活的方法,该方法包括向受试者施用有效量的本文公开的抗体或药物组合物。

[0091] 在另一个方面,本公开提供了治疗受试者的癌症的方法,该方法包括向受试者施用有效量的本文公开的抗体或药物组合物。在某些实施方式中,所述癌症选自黑素瘤、头颈癌(例如,头颈鳞状细胞癌)、肺癌(例如,非小细胞肺癌和小细胞肺癌)、乳腺癌(例如,赫塞汀抗性乳腺癌和曲妥珠单抗-DM1(T-DM1)抗性乳腺癌)、前列腺癌、多形性成胶质细胞瘤、结

肠直肠癌、肉瘤、膀胱癌、宫颈癌、HPV相关癌症、阴道的癌症、外阴的癌症、阴茎的癌症、肛门的癌症、直肠的癌症、口咽的癌症、多发性骨髓瘤、肾细胞癌、卵巢癌、肝细胞癌、子宫内膜癌、胰腺癌、淋巴瘤和白血病(例如,老年白血病、急性髓性白血病(AML)和老年AML)。在某些实施方式中,抗体或药物组合物皮下或静脉内施用。在某些实施方式中,抗体或药物组合物肿瘤内施用。在某些实施方式中,抗体或药物组合物递送到肿瘤引流淋巴结。在某些实施方式中,抗体或药物组合物动脉内施用。

[0092] 在一个方面,本发明涉及本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,其用于提高响应于抗原的T-细胞激活的方法中。

[0093] 在一个方面,本发明涉及本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,其用于提高受试者中响应于抗原的T-细胞激活的方法中。

[0094] 在一个方面,本发明涉及本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物用于制备提高受试者中响应于抗原的T-细胞激活的药物组合物的用途。

[0095] 在一个方面,本发明涉及本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,其用于提高受试者中响应于抗原的T-细胞激活的方法中,包括向受试者施用有效量的本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物。

[0096] 在一个方面,本发明涉及本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,其用于治疗癌症的方法中,优选地其中癌症选自黑素瘤、头颈癌(例如,头颈鳞状细胞癌)、肺癌(例如,非小细胞肺癌和小细胞肺癌)、乳腺癌(例如,赫塞汀抗性乳腺癌和曲妥珠单抗-DM1(T-DM1)抗性乳腺癌)、前列腺癌、多形性成胶质细胞瘤、结肠直肠癌、肉瘤、膀胱癌、宫颈癌、HPV相关癌症、阴道的癌症、外阴的癌症、阴茎的癌症、肛门的癌症、直肠的癌症、口咽的癌症、多发性骨髓瘤、肾细胞癌、卵巢癌、肝细胞癌、子宫内膜癌、胰腺癌、淋巴瘤和白血病(例如,老年白血病、急性髓性白血病(AML)和老年AML)。

[0097] 在一个方面,本发明涉及本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,其用于治疗受试者的癌症的方法中,优选地其中癌症选自黑素瘤、头颈癌(例如,头颈鳞状细胞癌)、肺癌(例如,非小细胞肺癌和小细胞肺癌)、乳腺癌(例如,赫塞汀抗性乳腺癌和曲妥珠单抗-DM1(T-DM1)抗性乳腺癌)、前列腺癌、多形性成胶质细胞瘤、结肠直肠癌、肉瘤、膀胱癌、宫颈癌、HPV相关癌症、阴道的癌症、外阴的癌症、阴茎的癌症、肛门的癌症、直肠的癌症、口咽的癌症、多发性骨髓瘤、肾细胞癌、卵巢癌、肝细胞癌、子宫内膜癌、胰腺癌、淋巴瘤和白血病(例如,老年白血病、急性髓性白血病(AML)和老年AML)。

[0098] 在一个方面,本发明涉及本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,其用于治疗受试者的癌症的方法中,包括向受试者施用有效量的本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,优选地其中癌症选自黑素瘤、头颈癌(例如,头颈鳞状细胞癌)、肺癌(例如,非小细胞肺癌和小细胞肺癌)、乳腺癌(例如,赫塞汀抗性乳腺癌和曲妥珠单抗-DM1(T-DM1)抗性乳腺癌)、前列腺癌、多形性成胶质细胞瘤、结肠直肠癌、肉瘤、膀胱癌、宫颈癌、HPV相关癌症、阴道的癌症、外阴的癌症、阴茎的癌症、肛门的癌症、直肠的癌症、口咽的癌症、多发性骨髓瘤、肾细胞癌、卵巢癌、肝细胞癌、子宫内膜癌、胰腺癌、淋巴瘤和白血病(例如,老年白血病、急性髓性白血病(AML)和老年AML)。

[0099] 在本发明用途的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物的优选实施方式中,抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,更优选抗体或药物组合

物,皮下或静脉内施用。在本发明用途的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物的另一优选实施方式中,抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,更优选抗体或药物组合物,肿瘤内或动脉内施用。

[0100] 在某些实施方式中,前述方法进一步包括向受试者施用另外的治疗剂。因此,在用于本发明方法的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物的一个优选实施方式中,该方法进一步包括向受试者施用另外的治疗剂。

[0101] 在一个方面,本发明涉及(a)本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物和(b)另外的治疗剂,其用作药物。

[0102] 在一个方面,本发明涉及(a)本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物和(b)另外的治疗剂,其用于治疗癌症的方法中。

[0103] 在一个方面,本发明涉及药物组合物、试剂盒或药盒(kit-of-parts),其包含(a)本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物及(b)另外的治疗剂。

[0104] 在某些实施方式中,另外的治疗剂是化疗剂或检查点靶向剂。在某些实施方式中,检查点靶向剂选自拮抗剂抗-PD-1抗体、拮抗剂抗-PD-L1抗体、拮抗剂抗-PD-L2抗体、拮抗剂抗-CTLA-4抗体、拮抗剂抗-TIM-3抗体、拮抗剂抗-LAG-3抗体、拮抗剂抗-CEACAM1抗体、拮抗剂抗-TIGIT抗体、激动剂抗-CD137抗体、激动剂抗-ICOS抗体、激动剂抗-GITR抗体和激动剂抗-OX40抗体。在某些实施方式中,另外的治疗剂是吡咯啉-2,3-双加氧酶(IDO)的抑制剂。在某些实施方式中,所述抑制剂选自epacadostat、F001287、indoximod和NLG919。在某些实施方式中,另外的治疗剂是疫苗。在某些实施方式中,疫苗包括包含与抗原肽复合的热休克蛋白的热休克蛋白肽复合物(HSPPC)。在某些实施方式中,热休克蛋白是hsc70并且与肿瘤相关抗原肽复合。在某些实施方式中,热休克蛋白是gp96蛋白并且与肿瘤相关抗原肽复合,其中所述HSPPC源自从受试者获得的肿瘤。在某些实施方式中,另外的治疗剂包括TCR。在某些实施方式中,另外的治疗剂是可溶性TCR。在某些实施方式中,另外的治疗剂是表达TCR的细胞。在某些实施方式中,另外的治疗剂是表达嵌合抗原受体的细胞。在某些实施方式中,另外的治疗剂是特异性地结合肽-MHC复合体的抗体。在某些实施方式中,另外的治疗剂是佐剂。在一个方面,本发明涉及(a)本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,以及其用于制备药物的用途,和(b)用作药物的疫苗,特别地,用于治疗癌症的方法中,优选地其中疫苗包含与抗原肽复合的热休克蛋白的热休克蛋白肽复合物(HSPPC)。在一个方面,本发明涉及药物组合物、试剂盒或药盒,其包含(a)本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,和(b)疫苗,优选地其中疫苗包含与抗原肽复合的热休克蛋白的热休克蛋白肽复合物(HSPPC)。

4. 附图说明

[0105] 图1A、1B、1C和1D是显示抗-PD-1抗体与激活的原代人或食蟹猴T细胞的结合的曲线图,如通过流式细胞术测量的。计算平均荧光强度(MFI)并针对一定范围的抗体浓度作图。在图1A中,AGEN2046w、AGEN2047w和人IgG₁同种型对照测量与葡萄球菌肠毒素A(SEA)刺激的人CD4⁺T细胞的结合。AGEN2034w和人IgG₄同种型对照针对SEA刺激的人CD4⁺T细胞(图1B和1D)和葡萄球菌肠毒素B(SEB)刺激的食蟹猴CD4⁺T细胞(图1C)进行测试。

[0106] 图2是显示AGEN2034w与人PD-1-Fc、人ROBO2-Fc、人B7-H7-Fc或SIRP γ -His的结合

的曲线图。相互作用通过悬浮阵列技术(suspension array technology)测量且平均荧光强度(MFI)针对抗体浓度作图。

[0107] 图3A、3B、3C、3D、3E和3F是显示在剂量滴定的抗-PD-1抗体的存在下重组PD-L1-Fc和/或PD-L2-Fc与PD-1偶联珠结合的百分比的曲线图。在图3A、3B、3C和3D中,测试的抗-PD-1抗体分别是AGEN2033w、AGEN2034w、AGEN2046w和AGEN2047w。在图3E和3F中,对于AGEN2034w和同种型对照抗体显示相似的结果。

[0108] 图4A、4B、4C、4D、4E和4F是描绘在SEA刺激后抗-PD-1抗体对原代人PBMC培养物的功能活性的曲线图。图4A是显示抗-PD-1抗体AGEN2033w、AGEN2034w、AGEN2046w、AGEN2047w和IgG₁同种型对照诱导的IL-2产生的曲线图。显示了分泌的IL-2的平均值(棒)。图4B是显示与同种型对照相比,在剂量滴定的AGEN2034w的存在下IL-2产生的曲线图。误差棒代表一个标准差。AGEN2034w或同种型对照抗体在抗-CTLA-4抗体伊匹单抗(图4C)、抗-TIGIT抗体pab2197或pab2196(图4D)、抗-CD137抗体pab2225(图4E)或抗-OX40抗体pab1928(图4F)存在或不存在的条件下测试。

[0109] 图5A、5B和5C是来自检验Fc γ 受体(Fc γ R)啮合对于在SEA刺激后抗-PD-1抗体对原代人PBMC的拮抗活性的影响的研究的结果。图5A是显示在抗-CD16抗体存在或不存在的条件下抗-PD-1参比抗体或同种型对照诱导的IL-2产生的曲线图。图5B是来自检验在同种型对照、抗-CD16抗体、抗-CD32抗体或抗-CD64抗体存在的条件下AGEN2034w或同种型对照诱导的IL-2分泌的相似研究的结果。图5C是显示具有野生型人IgG₁Fc区的AGEN2047w、三种相应的Fc突变体(N297A、S267E/L328F和S239D/A330L/I332E)及其相应同种型对照诱导的IL-2产生的曲线图。显示了分泌的IL-2的平均值(棒)。

[0110] 图6是显示在不存在任何抗体或存在同种型对照抗体或抗-PD-1抗体AGEN2034w的情况下人T细胞和异体树突状细胞的共培养物的IFN γ 产生的曲线图。显示了IFN γ 的平均值(棒)。

[0111] 图7A、7B和7C是测量在AGEN2034w或同种型对照抗体的存在下与卵巢癌腹水共培养后抗-CD3-抗体-刺激的T细胞的增殖的分析的结果。图7A和7B是显示在10 μ g/ml的AGEN2034w或同种型对照抗体存在下分别来自CD4⁺和CD8⁺T细胞的CFSE荧光的代表性柱状图。图7C是显示来自相似研究的结果的曲线图。在图7C中,CD4⁺T细胞的增殖(如通过CFSE稀释测量的)相对于在不存在卵巢癌腹水的情况下CD4⁺T细胞的增殖标准化并针对抗体浓度作图。

[0112] 图8是显示Jurkat NFAT-荧光素酶报告分析中由抗-PD-1抗体AGEN2034w或IgG₄同种型对照抗体诱导的反应的曲线图。如通过荧光素酶表达测量的反应针对在测试的最低浓度的同种型对照抗体存在下诱导的反应标准化(倍数诱导)并针对抗体浓度作图。

[0113] 图9A、9B、9C、9D、9E和9F是显示在剂量滴定的抗-PD-1抗体AGEN2001w(图9A)、AGEN2002w(图9B)、EP11_p11_B03(图9C)、EP11_p11_B05(图9D)、EP11_p11_C02(图9E)或EP11_p11_C03(图9F)存在下重组PD-L1-Fc和PD-L2-Fc与PD-1偶联珠结合的百分比的曲线图。

[0114] 图10是描绘在SEA刺激后抗-PD-1抗体AGEN2002w或IgG₁同种型对照对原代人PBMC的培养物的功能活性的曲线图,如通过IL-2产生证明的。显示了分泌的IL-2的平均值(棒)。

5. 具体实施方式

[0115] 本公开提供了特异性地结合人PD-1和拮抗PD-1功能(例如,PD-1-介导的免疫抑制)的抗体。还提供了包含这些抗体的药物组合物、编码这些抗体的核酸、用于产生这些抗体的表达载体和宿主细胞及使用这些抗体治疗受试者的方法。本文中公开的抗体特别可用于提高响应于抗原(例如,肿瘤抗原或传染病抗原)的T-细胞激活,且因此用于治疗受试者的癌症或者治疗或预防受试者的传染病。本文所述的“分离的抗体”的所有情况另外设想为可以是,但不必需是,分离的抗体。本文所述的“分离的多核苷酸”的所有情况另外设想为可以是,但不必需是,分离的多核苷酸。本文所述的“抗体”的所有情况另外设想为可以是,但不必需是,分离的抗体。本文所述的“多核苷酸”的所有情况另外设想为可以是,但不必需是,分离的多核苷酸。

[0116] 5.1定义

[0117] 如本文中使用的,术语“约”和“大约”在用于修饰数值或数值范围时表明高于该值或范围5%-10%或低于该值或范围5%-10%的变异保留在所述值或范围的预定含义内。

[0118] 如本文中使用的,术语“PD-1”是指蛋白质程序性细胞死亡蛋白1。PD-1核苷酸和氨基酸序列是本领域中公知的。示例性的人PD-1氨基酸序列显示于GenBank存贮GI号:167857792中。

[0119] 如本文中使用的,术语“抗体”和“(多个)抗体”包括全长抗体、全长抗体的抗原结合片段及包含抗体CDR、VH区或VL区的分子。抗体的实例包括单克隆抗体、重组产生的抗体、单特异性抗体、多特异性抗体(包括双特异性抗体)、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、免疫球蛋白、合成抗体、包含两条重链和两条轻链分子的四聚体抗体、抗体轻链单体、抗体重链单体、抗体轻链二聚体、抗体重链二聚体、抗体轻链-抗体重链对、胞内抗体、异缀合抗体(heteroconjugate antibody)、抗体-药物偶联物、单域抗体、单价抗体、单链抗体或单链Fvs(scFv)、骆驼化抗体(camelize antibody)、亲和体(affibodies)、Fab片段、F(ab')₂片段、二硫键连接的Fvs(sdFv)、抗-独特型(抗-Id)抗体(包括,例如,抗-抗-Id抗体)及上述任一种的抗原结合片段。在某些实施方式中,本文所述的抗体是指多克隆抗体群体。抗体可以是免疫球蛋白分子的任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY),任何类别(例如,IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁或IgA₂)或任何亚类(例如,IgG_{2a}或IgG_{2b})。在某些实施方式中,本文所述的抗体是IgG抗体或者其类别(例如,人IgG₁或IgG₄)或亚类。在具体的实施方式中,抗体是人源化单克隆抗体。在另一具体的实施方式中,抗体是人单克隆抗体。在某些实施方式中,本文所述的抗体是IgG₁或IgG₂抗体。

[0120] 如本文中使用的,术语“VH区”和“VL区”分别是指单一抗体重链和轻链可变区,其包含FR(框架区)1、2、3和4及CDR(互补决定区)1、2和3(参见Kabat等(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest. (NIH Publication No.91-3242, Bethesda),其通过引用全文合并于此)。

[0121] 如本文中使用的,术语“CDR”或“互补决定区”意思是在重链和轻链多肽两者的可变区内发现的非连续的抗原组合位点。这些特定区域已由Kabat等,J.Biol.Chem.252,6609-6616(1977)和Kabat等,Sequences of protein of immunological interest. (1991)、Chothia等,J.Mol.Biol.196:901-917(1987)以及MacCallum等,J.Mol.Biol.262:732-745(1996)描述(其全部通过引用全文合并于此),其中该定义包括了在相互之间进行

比较时氨基酸残基的重叠或亚组。优选地,术语“CDR”是由Kabat在序列比较的基础上所定义的CDR。CDRH1、CDRH2和CDRH3表示重链CDR,且CDRL1、CDRL2和CDRL3表示轻链CDR。

[0122] 如本文中使用的,术语“EU编号系统”是指用于抗体恒定区的EU编号规则,如Edelman, G.M.等, Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969) 和Kabat等, 在“Sequences of Proteins of Immunological Interest”, U.S. Dept. Health and Human Services, 5th edition, 1991中所述的, 其各自通过引用全文合并于此。

[0123] 如本文中使用的,术语“框架(FR)氨基酸残基”是指免疫球蛋白链的框架区中的那些氨基酸。如本文中使用的,术语“框架区”或“FR区”包括作为可变区的部分但非CDR(例如,使用CDR的Kabat定义)的部分的氨基酸残基。

[0124] 如本文中使用的,术语“可变区”和“可变域”可互换使用且是本领域中常用的。可变区通常是指抗体的一部分,一般地,轻链或重链的一部分,通常成熟重链中的大约氨基末端110-125个氨基酸和成熟轻链中的大约90-115个氨基酸,其在抗体之间序列上是广泛不同的且用于特定抗体对于其特定抗原的结合和特异性。序列的变异性集中在称为互补决定区(CDR)的那些区域中,而可变域中更高度保守的区域称为框架区(FR)。在某些实施方式中,可变区是人可变区。在某些实施方式中,可变区包含啮齿动物或鼠CDR和人框架区(FR)。在特定的实施方式中,可变区是灵长类(例如,非人灵长动物类)可变区。在某些实施方式中,可变区包含啮齿动物或鼠CDR和灵长类(例如,非人灵长类)框架区(FR)。

[0125] 术语“VL”和“VL域”可互换使用以指抗体的轻链可变区。

[0126] 术语“VH”和“VH域”可互换使用以指抗体的重链可变区。

[0127] 如本文中使用的,术语“恒定区”和“恒定域”是可互换的且是本领域中常用的。恒定区是抗体部分,例如,轻链和/或重链的羧基末端部分,其不直接参与抗体与抗原的结合但可以表现出各种效应子功能,如与Fc受体(例如,Fc γ 受体)的相互作用。免疫球蛋白分子的恒定区一般具有相对于免疫球蛋白可变域更保守的氨基酸序列。

[0128] 如本文中使用的,术语“重链”当结合抗体使用时可以指基于恒定域的氨基酸序列的任何不同类型,例如,alpha(α)、delta(δ)、epsilon(ϵ)、gamma(γ)和mu(μ),其分别导致抗体的IgA、IgD、IgE、IgG和IgM类别,包括IgG的亚类,例如,IgG₁、IgG₂、IgG₃和IgG₄。

[0129] 如本文中使用的,术语“轻链”当结合抗体使用时可以指基于恒定域的氨基酸序列的任何不同类型,例如,kappa(κ)或lambda(λ)。轻链氨基酸序列是本领域中公知的。在具体的实施方式中,轻链是人轻链。

[0130] “结合亲和力”一般是指分子(例如,抗体)的单一结合位点与其结合伴侣(例如,抗原)之间非共价相互作用的强度和强度。除非另外指明,如本文中使用的,“结合亲和力”是指反映结合对(例如,抗体和抗原)的成员之间的1:1相互作用的固有结合亲和力。分子X对于其伴侣Y的亲和力一般可以通过解离常数(K_D)表示。亲和力可以以本领域中已知的多种方式测量和/或表示,包括但不限于平衡解离常数(K_D)和平衡结合常数(K_A)。 K_D 从 k_{off}/k_{on} 的商计算,而 K_A 从 k_{on}/k_{off} 的商计算。 k_{on} 是指例如,抗体与抗原的结合速率常数,且 k_{off} 指例如,抗体与抗原的解离速率常数。 k_{on} 和 k_{off} 可以通过本领域技术人员已知的技术测定,如BIAcore[®]或KinExA。

[0131] 如本文中使用的,术语“特异性结合”是指抗体以至少约 $1 \times 10^{-6}M$ 、 $1 \times 10^{-7}M$ 、 $1 \times 10^{-8}M$ 、 $1 \times 10^{-9}M$ 、 $1 \times 10^{-10}M$ 、 $1 \times 10^{-11}M$ 、 $1 \times 10^{-12}M$ 或更小的解离常数(K_D)结合抗原和/或以比其

对于非特异性抗原的亲和力高至少两倍的亲和力结合抗原的能力。在一个实施方式中,特异性地结合抗原的分子可以一般以较低的亲和力结合其它肽或多肽,如通过例如,免疫分析、**BIAcore**[®]、KinExA 3000仪(Sapidyne Instruments,Boise,ID)或本领域中已知的其它分析测定。在一个实施方式中,特异性地结合抗原的分子以至少比该分子非特异性地结合另一抗原的结合常数(K_A)大至少 $2\log$ 、 $2.5\log$ 、 $3\log$ 、 $4\log$ 或更大的 K_A 结合抗原。在一个实施方式中,特异性地结合抗原的分子以 $1 \times 10^{-6}\text{M}$ 或更小、 $1 \times 10^{-7}\text{M}$ 或更小、 $1 \times 10^{-8}\text{M}$ 或更小、 $1 \times 10^{-9}\text{M}$ 或更小、 $1 \times 10^{-10}\text{M}$ 或更小、 $1 \times 10^{-11}\text{M}$ 或更小或者 $1 \times 10^{-12}\text{M}$ 或更小的 K_d 结合抗原。

[0132] 在另一具体实施方式中,特异性地结合抗原的分子在相似的结合条件下不与其它蛋白交叉反应。在另一具体实施方式中,特异性地结合PD-1的分子不与其它非PD-1蛋白交叉反应。在具体实施方式中,本文提供了以比对于另一不相关抗原更高的亲和力结合PD-1(例如,人PD-1)的抗体。在某些实施方式中,本文提供了以比对于另一不相关抗原高20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更高的亲和力结合PD-1(例如,人PD-1)的抗体,如通过例如,放射免疫分析、表面等离子体共振或动力学排除分析(kinetic exclusion assay)测量的。在具体实施方式中,本文所述的抗-PD-1抗体与不相关的非PD-1蛋白的结合程度低于抗体与PD-1蛋白的结合的10%、15%或20%,如通过例如,放射免疫分析测量的。

[0133] 如本文中使用的,“表位”是本领域中的术语且是指抗体可以与其特异性结合的抗原的局部区域。表位可以是,例如,多肽的连续氨基酸(线性或连续表位)或者表位可以,例如,从一个或多个多肽的两个或更多个非连续区域集合到一起(构象、非线性、不连续或非连续表位)。在某些实施方式中,抗体与其结合的表位可以通过,例如,NMR谱、X-射线衍射晶体学研究、ELISA分析、与质谱偶联的氢/氘交换(例如,液相色谱电喷雾质谱)、基于阵列的寡肽扫描分析(例如,使用CLIPS(Chemical Linkage of Peptides onto Scaffolds)对非连续或构象表位作图而约束肽)和/或诱变作图(例如,定点诱变作图)确定。对于X-射线晶体学,结晶可以使用本领域中的任何已知方法完成(例如,GiegéR等,(1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50 (Pt 4):339-350;McPherson A(1990) *Eur J Biochem* 189:1-23;Chayen NE(1997) *Structure* 5:1269-1274;McPherson A(1976) *J Biol Chem* 251:6300-6303,其各自通过引用全文合并于此)。抗体:抗原晶体可以使用公知的X-射线衍射技术进行研究且可以使用计算机软件如X-PLOR(Yale University,1992,distributed by Molecular Simulations,Inc.;参见例如Meth Enzymol(1985)114&115卷,eds Wyckoff HW等,;U.S.2004/0014194)和BUSTER(Bricogne G(1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49 (Pt 1):37-60;Bricogne G(1997) *Meth Enzymol* 276A:361-423,ed Carter CW;Roversi P等,(2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56 (Pt 10):1316-1323,其各自通过引用全文合并于此)进行优化。诱变作图研究可以使用本领域技术人员已知的任何方法完成。参见,例如,Champe M等,(1995) *J Biol Chem* 270:1388-1394和Cunningham BC&Wells JA(1989) *Science* 244:1081-1085(其各自通过引用全文合并于此)对于诱变技术的描述,包括丙氨酸扫描诱变技术。CLIPS(Chemical Linkage of Peptides onto Scaffolds)是呈现处于结构约束的构象中的一个或多个肽以如复杂蛋白质结构域的功能模拟物发挥作用的技术。参见,例如,U.S.公开No.US 2008/0139407 A1和US 2007/099240 A1及US专利No.7,972,993,其全部通过引用全

文合并于此。在具体的实施方式中,抗体的表位使用丙氨酸扫描诱变研究确定。在具体实施方式中,抗体的表位使用与质谱偶联的氢/氘交换确定。在具体实施方式中,抗体的表位使用Pepscan Therapeutics的CLIPS表位作图技术确定。

[0134] 如本文中使用的,术语“T细胞受体”和“TCR”可互换使用且是指全长异二聚的 $\alpha\beta$ 或 $\gamma\delta$ TCR、全长TCR的抗原结合片段和包含TCR CDR或可变区的分子。TCR的实例包括,但不限于全长TCR、全长TCR的抗原结合片段、缺乏跨膜和胞质区的可溶性TCR、包含通过柔性接头连接的TCR可变区的单链TCR、通过工程化二硫键连接的TCR链、单特异性TCR、多特异性TCR(包括双特异性TCR)、TCR融合体、人TCR、人源化TCR、嵌合TCR、重组产生的TCR和合成TCR。该术语包括野生型TCR和遗传工程化TCR(例如,包含嵌合TCR链的嵌合TCR,其包括来自第一物种的TCR的第一部分和来自第二物种的TCR的第二部分)。

[0135] 如本文中使用的,术语“主要组织相容性复合体”和“MHC”可互换使用且是指MHC I类分子和/或MHC II类分子。

[0136] 如本文中使用的,术语“肽-MHC复合体”是指具有结合在MHC的本领域公认肽结合袋中的肽的MHC分子(MHC I类或MHC II类)。

[0137] 如本文中使用的,术语“治疗”、“处理”和“疗法”是指本文中所述的治疗性或预防性措施。“治疗”的方法利用抗体至患有疾病或障碍或易患这种疾病或障碍的受试者的施用以预防、治愈、延迟疾病或障碍、减轻疾病或障碍的严重性或改善疾病或障碍的一种或多种症状或疾病或障碍的复发,或者延长受试者的存活期超出在没有这种治疗的情况下预期的存活期。

[0138] 如本文中使用的,术语“有效量”在治疗施用于受试者的情况中是指实现所需的预防或治疗效应的治疗量。

[0139] 如本文中使用的,术语“受试者”包括任何人或非人动物。在优选的实施方式中,受试者是人或非人哺乳动物,更优选是人。

[0140] 两个序列(例如,氨基酸序列或核酸序列)之间的“百分同一性”的确定可以使用数学算法完成。用于两个序列的具体的、非限制性实例是Karlin S&Altschul SF(1990)PNAS 87:2264-2268的算法,如在Karlin S&Altschul SF(1993)PNAS 90:5873-5877中改进的,其各自通过引用全文合并于此。这样的算法整合到Altschul SF等,(1990)J Mol Biol 215:403的NBLAST和XBLAST程序中,其通过引用全文合并于此。BLAST核苷酸检索可以用NBLAST核苷酸程序参数集,例如,评分=100,字长=12,进行以获得与本文所述核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST蛋白质检索可以用XBLAST程序参数集,例如,评分50,字长=3,进行以获得与本文所述蛋白质分子同源的氨基酸序列。为获得用于比较目的的带空位比对,Gapped BLAST可以如Altschul SF等,(1997)Nuc Acids Res 25:3389-3402中所述使用,其通过引用全文合并于此。或者,PSI BLAST可以用于进行迭代的检索,其检测分子之间的亲缘关系(Id.)。当使用BLAST、Gapped BLAST和PSI Blast程序时,可以使用相应程序(例如,XBLAST和NBLAST)的缺省参数(参见,例如,互联网上的National Center for Biotechnology Information(NCBI),ncbi.nlm.nih.gov)。用于序列比较的数学算法的另一具体的、非限制性实例是Myers和Miller,1988,CABIOS 4:11-17的算法,其通过引用全文合并于此。这样的算法整合到ALIGN程序(版本2.0)中,其是GCG序列比对软件包的部分。当使用ALIGN程序用于比较氨基酸序列时,可以使用PAM120权重残差表、12的空位

长度罚分和4的空位罚分。

[0141] 两个序列之间的百分同一性可以使用与如上所述的那些相似的技术(在具有或没有允许的空位的情况下)确定。在计算百分同一性时,通常仅计算精确的匹配。

[0142] 5.2抗-PD-1抗体

[0143] 在一个方面,本公开提供了特异性地结合人PD-1和拮抗PD-1功能的抗体。示例性抗体的氨基酸序列在本文的表1-6中示出。

[0144] 表1. 示例性抗-PD-1抗体的可变区、CDR和FR的序列

[0145]

SEQ ID NO:	描述	氨基酸序列
1	AGEN2033w Kabat CDRH1	SYGMH
2	AGEN2033w Kabat CDRH2	VIWYDGSNKYYADSVKG
3	AGEN2033w Kabat CDRH3	NVDY
4	AGEN2033w Kabat CDRL1	RASQSVSSNLA
5	AGEN2033w Kabat CDRL2	GASTRAT
6	AGEN2033w Kabat CDRL3	QQYNNWPRT
7	AGEN2034w Kabat CDRH3	NGDH
8	AGEN2033w IMGT CDRH1	GFTFSSYG
9	AGEN2033w IMGT CDRH2	IWYDGSNK
10	AGEN2033w IMGT CDRH3	ASNVDY
11	AGEN2033w IMGT CDRL1	QSVSSN
12	AGEN2033w IMGT CDRL2	GAS
13	AGEN2033w IMGT CDRL3	QQYNNWPRT
14	AGEN2034w IMGT CDRH3	ASNGDH
15	AGEN2033w, AGEN2046w VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWIYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNVDYWGQ GTLVTVSS
16	AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w, AGEN2047w VL	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAW YQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTE FTLTISSLQSEDFAVYYCQQYNNWPRTFGQGTKVE IK
17	AGEN2034w, AGEN2047w VH	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWIYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSS
18	AGEN2033w 重链 IgG4 S228P	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWIYDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNVDYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC

[0146]

		LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK
52	AGEN2033w 重链 IgG4 S228P(没有 C-末端赖氨酸)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNVYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLG
19	AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w, AGEN2047w 轻链	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAW YQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTE FTLTISSLQSEDAVYYCQQYNWPRFTFGQGTKE IKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCCLNNFY PREAKVQWVKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSL SSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFN RGEC
20	AGEN2034w 重链 IgG4 S228P	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK
53	AGEN2034w 重链 IgG4 S228P(没有 C-末端赖氨酸)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKR VESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNA KTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK VSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSV

[0147]

		MHEALHNHYTQKSLSLSLG
21	AGEN2046w 重链 IgG1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNVYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
54	AGEN2046w 重链 IgG1(没有 C-末端赖氨酸)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNVYWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
22	AGEN2047w 重链 IgG1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
55	AGEN2047w 重链 IgG1(没有 C-末端赖氨酸)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKYYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
23	AGEN2047w 重链 IgG1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH

[0148]

	N297A	WVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
56	AGEN2047w 重链 IgG1 N297A(没有 C-末端赖氨酸)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
24	AGEN2047w 重链 IgG1 S267E/L328F	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKAFAPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
57	AGEN2047w 重链 IgG1 S267E/L328F(没有 C-末端 赖氨酸)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGC LVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKR VEPKSCDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKAFAPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPS REEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN NYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
25	AGEN2047w 重链 IgG1 S239D/A330L/I332E	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGSKNYADSVKGRFTI SRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQ

[0149]

		GTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
58	AGEN2047w 重链 IgG1 S239D/A330L/I332E(没有 C-末端赖氨酸)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGNSKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
26	AGEN2001w VH (BADD426-2614)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGNSKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATNGDYWGQGTLVTVSS
27	AGEN2002w VH (BADD426-2615)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGNSKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDYWGQGTLVTVSS
28	EP11_pl1_B03 (BADD438-2743)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGNSNEYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQGTLVTVSS
29	EP11_pl1_B05 (BADD438-2745)	QVQLVESGGGMVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWFDSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQGTLVTVSS
30	EP11_pl1_C02 (BADD438-2746)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGNSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGHGTLVTVSS
31	EP11_pl1_C03 (BADD438-2747)	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAVIWDGNSNKYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASNGDHWGQGTLVTVSS
32	CDRH2 共有序列	VIWX ₁ DGSNX ₂ YYADSVX ₃ G X ₁ 是 Y 或 F; X ₂ 是 K 或 E; 和 X ₃ 是 K 或 M
33	CDRH3 共有序列	NX ₁ DX ₂ X ₁ 是 G 或 V; 和

[0150]

		X2 是 H 或 Y
34	CDRH2	VIWYDGSNEYADSVKG
35	CDRH2	VIWFDGSNKYYADSVKG
36	CDRH2	VIWYDGSNKYYADSVMG
37	CDRH3	NGDY
38	VH FR1	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFS
39	VH FR1	QVQLVESGGGMVQPGRSLRLSCAASGFTFS
40	VH FR2	WVRQAPGKGLEWVA
41	VH FR3	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAS
42	VH FR3	RFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAT
43	VH FR4	WGQGTLLVTVSS
44	VH FR4	WGHGTLVTVSS
45	VL FR1	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSC
46	VL FR2	WYQQKPGQAPRLLIY
47	VL FR3	GIPARFSGSGSGTEFTLTISLQSEDAVYYC
48	VL FR4	FGQGTKVEIK
49	VH 共有序列	QVQLVESGGGX ₁ VQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWX ₂ DGSNX ₃ YYADSVX ₄ GRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAX ₅ NX ₆ DX ₇ WX ₈ GTLVTVSS X ₁ 是 V 或 M, X ₂ 是 Y 或 F, X ₃ 是 K 或 E, X ₄ 是 K 或 M, X ₅ 是 S 或 T, X ₆ 是 G 或 V, X ₇ 是 H 或 Y, 和 X ₈ 是 Q 或 H
50	IGHV3-33*01 种系序列	QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSSYGMH WVRQAPGKGLEWVAVIWDGSNKYYADSVKGRFTI SRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
51	IGKV3-15*01 种系序列	EIVMTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSNLAW YQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPARFSGSGSGTE FTLTISLQSEDAVYYCQQYNNWP
59	人 IgG1 G1m3 异型(没有 C- 末端赖氨酸)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPV LDSDGSFFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG
60	人 IgG1 G1m3 异型	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQ

[0151]

		VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPPV LDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV FSCSV MHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
61	IgG1 N297A(没有 C-末端赖氨酸)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
62	IgG1 N297A	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDK THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
63	IgG4 S228P(没有 C-末端赖氨酸)	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKRVE SKYGGP CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
64	IgG4 S228P	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPE PVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYTCNV DHKPSNTKVDKRVE SKYGGP CPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNV FSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK
65	人 κ 轻链恒定区 IGKC*01 Km3 异型	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYP R EAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS SLTTLTKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0152] 表2. 示例性抗-PD-1抗体的重链CDR序列¹

[0153]

抗体	CDRH1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)
----	--------------------	--------------------	--------------------

[0154]

AGEN2033w	SYGMH (1)	VIWYDGSNKYYADSVKG (2)	NVDY (3)
AGEN2034w	SYGMH (1)	VIWYDGSNKYYADSVKG (2)	NGDH (7)
AGEN2001w	SYGMH (1)	VIWYDGSNKYYADSVKG (2)	NGDY (37)
AGEN2002w	SYGMH (1)	VIWYDGSNKYYADSVKG (2)	NGDY (37)
EP11_pl1_B03	SYGMH (1)	VIWYDGSNEYADSVKG (34)	NGDH (7)
EP11_pl1_B05	SYGMH (1)	VIWFDGSNKYYADSVKG (35)	NGDH (7)
EP11_pl1_C02	SYGMH (1)	VIWYDGSNKYYADSVKG (2)	NGDH (7)
EP11_pl1_C03	SYGMH (1)	VIWYDGSNKYYADSVMG (36)	NGDH (7)

[0155] ¹表2中的VH CDR按照Kabat确定。[0156] 表3. 示例性抗-PD-1抗体的轻链CDR序列²

[0157]

抗体	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
AGEN2033w	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
AGEN2034w	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
AGEN2001w	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
AGEN2002w	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
EP11_pl1_B03	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
EP11_pl1_B05	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
EP11_pl1_C02	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)
EP11_pl1_C03	RASQSVSSNLA (4)	GASTRAT (5)	QQYNNWPRT (6)

[0158] ²表3中的VL CDR按照Kabat确定。[0159] 表4. 示例性抗-PD-1抗体的VH框架 (FR) 序列³

[0160]

抗体	VH FR1 (SEQ ID NO:)	VH FR2 (SEQ ID NO:)	VH FR3 (SEQ ID NO:)	VH FR4 (SEQ ID NO:)
AGEN2033w	QVQLVESGGGVV QPGRSLRLSCAAS GFTFS (38)	WVRQAPGK GLEWVA (40)	RFTISRDN SKNTL YLQMNSLRAEDT AVYYCAS (41)	WGQGTLVT VSS (43)
AGEN2034w	QVQLVESGGGVV QPGRSLRLSCAAS GFTFS (38)	WVRQAPGK GLEWVA (40)	RFTISRDN SKNTL YLQMNSLRAEDT AVYYCAS (41)	WGQGTLVT VSS (43)

[0161]

AGEN2001w	QVQLVESGGGVV QPGRSLRLSCAAS GFTFS (38)	WVRQAPGK GLEWVA (40)	RFTISRDN SKNTL YLQMNSLRAEDT AVYYCAT (42)	WGQGTLVT VSS (43)
AGEN2002w	QVQLVESGGGVV QPGRSLRLSCAAS GFTFS (38)	WVRQAPGK GLEWVA (40)	RFTISRDN SKNTL YLQMNSLRAEDT AVYYCAS (41)	WGQGTLVT VSS (43)
EP11_p11_B 03	QVQLVESGGGVV QPGRSLRLSCAAS GFTFS (38)	WVRQAPGK GLEWVA (40)	RFTISRDN SKNTL YLQMNSLRAEDT AVYYCAS (41)	WGQGTLVT VSS (43)
EP11_p11_B 05	QVQLVESGGGMV QPGRSLRLSCAAS GFTFS (39)	WVRQAPGK GLEWVA (40)	RFTISRDN SKNTL YLQMNSLRAEDT AVYYCAS (41)	WGQGTLVT VSS (43)
EP11_p11_C 02	QVQLVESGGGVV QPGRSLRLSCAAS GFTFS (38)	WVRQAPGK GLEWVA (40)	RFTISRDN SKNTL YLQMNSLRAEDT AVYYCAS (41)	WGHGTLVT VSS (44)
EP11_p11_C 03	QVQLVESGGGVV QPGRSLRLSCAAS GFTFS (38)	WVRQAPGK GLEWVA (40)	RFTISRDN SKNTL YLQMNSLRAEDT AVYYCAS (41)	WGQGTLVT VSS (43)

[0162] ³表4中所述的VH框架区基于Kabat编号系统对于CDR的边界确定。换句话说，VH CDR通过Kabat确定且框架区是以FR1、CDRH1、FR2、CDRH2、FR3、CDRH3和FR4的形式在可变区中围绕CDR的氨基酸残基。

[0163] 表5. 示例性抗-PD-1抗体的VL框架 (FR) 序列⁴

[0164]

抗体	VL FR1 (SEQ ID NO:)	VL FR2 (SEQ ID NO:)	VL FR3 (SEQ ID NO:)	VL FR4 (SEQ ID NO:)
AGEN2033w	EIVMTQSPATLSVS PGERATLSC (45)	WYQQKPGQA PRLIIY (46)	GIPARFSGSGSGTEFTLT ISLQSEDAVYYC (47)	FGQGTKVEIK (48)
AGEN2034w	EIVMTQSPATLSVS PGERATLSC (45)	WYQQKPGQA PRLIIY (46)	GIPARFSGSGSGTEFTLT ISLQSEDAVYYC (47)	FGQGTKVEIK (48)
AGEN2001w	EIVMTQSPATLSVS PGERATLSC (45)	WYQQKPGQA PRLIIY (46)	GIPARFSGSGSGTEFTLT ISLQSEDAVYYC (47)	FGQGTKVEIK (48)
AGEN2002w	EIVMTQSPATLSVS PGERATLSC (45)	WYQQKPGQA PRLIIY (46)	GIPARFSGSGSGTEFTLT ISLQSEDAVYYC (47)	FGQGTKVEIK (48)

[0165]

EP11_p11_B03	EIVMTQSPATLSVS PGERATLSC (45)	WYQQKPGQA PRLIY (46)	GIPARFSGSGSGTEFTLT ISSLQSEDAVYYC (47)	FGQGTKVEIK (48)
EP11_p11_B05	EIVMTQSPATLSVS PGERATLSC (45)	WYQQKPGQA PRLIY (46)	GIPARFSGSGSGTEFTLT ISSLQSEDAVYYC (47)	FGQGTKVEIK (48)
EP11_p11_C02	EIVMTQSPATLSVS PGERATLSC (45)	WYQQKPGQA PRLIY (46)	GIPARFSGSGSGTEFTLT ISSLQSEDAVYYC (47)	FGQGTKVEIK (48)
EP11_p11_C03	EIVMTQSPATLSVS PGERATLSC (45)	WYQQKPGQA PRLIY (46)	GIPARFSGSGSGTEFTLT ISSLQSEDAVYYC (47)	FGQGTKVEIK (48)

[0166] ⁴表5中所述的VL框架区基于Kabat编号系统对于CDR的边界确定。换句话说,VL CDR通过Kabat确定且框架区是以FR1、CDRL1、FR2、CDRL2、FR3、CDRL3和FR4的形式在可变区中围绕CDR的氨基酸残基。

[0167] 表6. 示例性抗-PD-1抗体的VH和VL序列

[0168]

抗体	重链可变区	SEQ ID NO:	轻链可变区	SEQ ID NO:
AGEN2033w	BADD438-2742	15	3738	16
AGEN2034w	BADD438-2744	17	3738	16
AGEN2001w	BADD426-2614	26	3738	16
AGEN2002w	BADD426-2615	27	3738	16
EP11_p11_B03	BADD438-2743	28	3738	16
EP11_p11_B05	BADD438-2745	29	3738	16
EP11_p11_C02	BADD438-2746	30	3738	16
EP11_p11_C03	BADD438-2747	31	3738	16

[0169] 表7. PD-1的示例性序列

[0170]

SEQ ID NO:	描述	氨基酸序列
74	示例性成熟 PD-1 序列	PGWFLDSPDRPWNPPTFSPALLVVTEGDNATFTCSFSNTS ESFVLNWYRMSPSNQTDKLAAFPEDRSQPGQDCRFRVTQ LPNGRDFHMSVVRARRNDSGTLYCGAISLAPKAQIKESLR AELRVTERRAEVPTAHPSPSPRPAGQFQTLVVG VVGGLLG SLVLLVWVLAVICSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVF SVDYGELDFQWREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGT SSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL
75	PD-1 表位(残基 107-122)	SLAPKAQIKESLRAEL

[0171]

76	PD-1 表位(残基 5-22)	LDSPDRPWNPPTFSPALL
77	PD-1 表位(残基 6-15)	DSPDRPWNPP
78	PD-1 表位(残基 130-138)	EVPTAHPSP
79	PD-1 表位(残基 106-113)	ISLAPKAQ

[0172] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1的分离的抗体,其包含:

[0173] (a) CDRH1包含SYGMH (SEQ ID NO:1) 的氨基酸序列;和/或

[0174] (b) CDRH2包含VIWX₁DGSNX₂YYADSVX₃G (SEQ ID NO:32) 的氨基酸序列,其中

- [0175] X_1 是Y或F;
- [0176] X_2 是K或E;和
- [0177] X_3 是K或M;和/或
- [0178] (c) CDRH3包含 NX_1DX_2 (SEQ ID NO:33)的氨基酸序列,其中
- [0179] X_1 是G或V;和
- [0180] X_2 是H或Y;和/或
- [0181] (d) CDRL1包含RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:4)的氨基酸序列;和/或
- [0182] (e) CDRL2包含GASTRAT (SEQ ID NO:5)的氨基酸序列;和/或
- [0183] (f) CDRL3包含QQYNNWPRT (SEQ ID NO:6)的氨基酸序列。
- [0184] 在某些实施方式中,所述抗体包含上述VH CDR中的一个、两个或全部三个。在某些实施方式中,所述抗体包含表2中抗体之一的CDRH1。在某些实施方式中,所述抗体包含表2中抗体之一的CDRH2。在某些实施方式中,所述抗体包含表2中抗体之一的CDRH3。在某些实施方式中,所述抗体包含表2中抗体之一的VH CDR中的一个、两个或全部三个(例如,表2的一行中的VH CDR,例如,来自AGEN2033w或AGEN2034w的所有VH CDR)。在某些实施方式中,所述抗体包含本文所述的VH框架。在某些实施方式中,所述抗体包含表4中所示抗体的VH框架区(例如,表4的一行中的一个、两个、三个或四个框架区)。
- [0185] 在某些实施方式中,所述抗体包含上述VL CDR中的一个、两个或全部三个。在某些实施方式中,所述抗体包含表3中抗体之一的CDRL1。在某些实施方式中,所述抗体包含表3中抗体之一的CDRL2。在某些实施方式中,所述抗体包含表3中抗体之一的CDRL3。在某些实施方式中,所述抗体包含表3中抗体之一的一个、两个或全部三个VL CDR(例如,表3的一行中的VL CDR,例如,来自AGEN2033w或AGEN2034w的所有VL CDR)。在某些实施方式中,所述抗体包含本文所述的VL框架区。在某些实施方式中,所述抗体包含表5中所示抗体的VL框架区(FR)(例如,表5的一行中的一个、两个、三个或四个框架区)。
- [0186] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1的分离的抗体,包含含有互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3的重链可变区及含有互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3的轻链可变区,其中:
- [0187] (a) CDRH1包含SYGMH (SEQ ID NO:1)的氨基酸序列;
- [0188] (b) CDRH2包含 $VIWX_1DGSNX_2YYADSVX_3G$ (SEQ ID NO:32)的氨基酸序列,其中
- [0189] X_1 是Y或F;
- [0190] X_2 是K或E;和
- [0191] X_3 是K或M;
- [0192] (c) CDRH3包含 NX_1DX_2 (SEQ ID NO:33)的氨基酸序列,其中 X_1 是G或V;和
- [0193] X_2 是H或Y;
- [0194] (d) CDRL1包含RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:4)的氨基酸序列;
- [0195] (e) CDRL2包含GASTRAT (SEQ ID NO:5)的氨基酸序列;和
- [0196] (f) CDRL3包含QQYNNWPRT (SEQ ID NO:6)的氨基酸序列。
- [0197] 在某些实施方式中,CDRH2包含选自SEQ ID NO:2和34-36的氨基酸序列。在某些实施方式中,CDRH3包含选自SEQ ID NO:3、7和37的氨基酸序列。
- [0198] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1的分离的抗体,包含含有

互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3的重链可变区,其中CDRH1、CDRH2和CDRH3分别包含SEQ ID NO:1、2和3;1、2和7;1、2和37;1、34和7;1、35和7;或1、36和7中所示的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列。

[0199] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1的分离的抗体,包含含有互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3的重链可变区及含有互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3的轻链可变区,其中CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3分别包含SEQ ID NO:1、2、3、4、5和6;1、2、7、4、5和6;1、2、37、4、5和6;1、34、7、4、5和6;1、35、7、4、5和6;或1、36、7、4、5和6中所示的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

[0200] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1的分离的抗体,其包含:

[0201] (a) 包含SYGMH (SEQ ID NO:1) 的氨基酸序列的CDRH1;和/或

[0202] (b) 包含VIWYDGSNKYYADSVKG (SEQ ID NO:2) 的氨基酸序列的CDRH2;和/或

[0203] (c) 包含NVDY (SEQ ID NO:3) 或NGDH (SEQ ID NO:7) 的氨基酸序列的CDRH3;和/或

[0204] (d) 包含RASQSVSSNLA (SEQ ID NO:4) 的氨基酸序列的CDRL1;和/或

[0205] (e) 包含GASTRAT (SEQ ID NO:5) 的氨基酸序列的CDRL2;和/或

[0206] (f) 包含QQYNNWPRT (SEQ ID NO:6) 的氨基酸序列的CDRL3。

[0207] 在某些实施方式中,抗体包含SEQ ID NO:1、2和3中所示的一个、两个或全部三个VH CDR。在某些实施方式中,抗体包含SEQ ID NO:1、2和7中所示的一个、两个或全部三个VH CDR。在某些实施方式中,抗体包含SEQ ID NO:4、5和6中所示的一个、两个或全部三个VL CDR。

[0208] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1的分离的抗体,包含含有互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3的重链可变区,其中CDRH1、CDRH2和CDRH3分别包含SEQ ID NO:1、2和3中所示的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列。

[0209] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1的分离的抗体,包含含有互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3的重链可变区,其中CDRH1、CDRH2和CDRH3分别包含SEQ ID NO:1、2和7中所示的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列。

[0210] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1的分离的抗体,包含含有互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3的轻链可变区,其中CDRL1、CDRL2和CDRL3分别包含SEQ ID NO:4、5和6中所示的CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

[0211] 在某些实施方式中,抗体包含含有CDRH1、CDRH2和CDRH3区的重链可变区及含有CDRL1、CDRL2和CDRL3区的轻链可变区,其中CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3区分别包含SEQ ID NO:1、2、3、4、5和6中所示的氨基酸序列。

[0212] 在某些实施方式中,抗体包含含有CDRH1、CDRH2和CDRH3区的重链可变区及含有CDRL1、CDRL2和CDRL3区的轻链可变区,其中CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3区分别包含SEQ ID NO:1、2、7、4、5和6中所示的氨基酸序列。

[0213] 在某些实施方式中,抗体的CDR可以按照Chothia编号方案确定,该Chothia编号方案涉及免疫球蛋白结构环的位置(参见,例如,Chothia C&Lesk AM, (1987), J Mol Biol 196:901-917;Al-Lazikani B等, (1997) J Mol Biol 273:927-948;Chothia C等, (1992) J Mol Biol 227:799-817;Tramontano A等, (1990) J Mol Biol 215(1):175-82;和U.S.专利 No.7,709,226,其全部通过引用全文合并于此)。通常,当使用Kabat编号规则时,Chothia

CDRH1环存在于重链氨基酸26-32、33或34处,Chothia CDRH2环存在于重链氨基酸52-56处,且Chothia CDRH3环存在于重链氨基酸95-102处,而Chothia CDRL1环存在于轻链氨基酸24-34处,Chothia CDRL2环存在于轻链氨基酸50-56处,和Chothia CDRL3环存在于轻链氨基酸89-97处。当使用Kabat编号规则编号时,Chothia CDRH1环的末尾在H32和H34之间变化,这取决于该环的长度(这是因为Kabat编号方案设置H35A和H35B处的插入。如果35A和35B都不存在,则环结束于32处;如果仅35A存在,则环结束于33处;如果35A和35B都存在,则环结束于34处)。

[0214] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1的分离的抗体,该抗体包含本文表6中公开的抗体(例如,AGEN2033w或AGEN2034w)的VL的Chothia VL CDR。在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1的分离的抗体,该抗体包含本文表6中公开的抗体(例如,AGEN2033w或AGEN2034w)的Chothia VH CDR。在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1的分离的抗体,该抗体包含本文表6中公开的抗体(例如,AGEN2033w或AGEN2034w)的Chothia VH CDR和Chothia VL CDR。在某些实施方式中,特异性地结合人PD-1的抗体包含一个或多个CDR,其中Chothia和Kabat CDR具有相同的氨基酸序列。在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1且包含Kabat CDR和Chothia CDR的组分的分离的抗体。

[0215] 在某些实施方式中,抗体的CDR可以按照IMGT编号系统确定,如Lefranc M-P, (1999) *The Immunologist* 7:132-136和Lefranc M-P等, (1999) *Nucleic Acid Res* 27:209-212中所述的,其各自通过引用全文合并于此。按照IMGT编号方案,CDRH1在位置26-35处,CDRH2在位置51-57处,CDRH3在位置93-102处,CDRL1在位置27-32处,CDRL2在位置50-52处,和CDRL3在位置89-97处。在特定的实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1且包含本文表6中公开的抗体(例如,AGEN2033w或AGEN2034w)的CDR的抗体,如通过IMGT编号系统确定的,例如,如Lefranc M-P (1999),同上和Lefranc M-P等, (1999),同上中所述的。

[0216] 在某些实施方式中,抗体的CDR可以按照MacCallum RM等, (1996) *J Mol Biol* 262:732-745确定,在此处通过引用全文并入。也参见,例如,Martin A. "Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains," in *Antibody Engineering*, Kontermann和Dübel, eds., Chapter 31, pp.422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001), 在此处通过引用全文并入。在特定的实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1且包含本文表6中公开的抗体(例如,AGEN2033w或AGEN2034w)的CDR的抗体,如通过MacCallum RM等, (1996), 同上的方法确定的。

[0217] 在某些实施方式中,抗体的CDR可以按照AbM编号方案确定,该方案涉及AbM高变区,其代表Kabat CDR和Chothia结构环之间的折衷,且由Oxford Molecular's AbM抗体建模软件(Oxford Molecular Group, Inc.)使用,在此处通过引用全文并入。在特定的实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1且包含本文表6中公开的抗体(例如,AGEN2033w或AGEN2034w)的CDR的抗体,如通过AbM编号方案确定的。

[0218] 因此,在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1的分离的抗体,其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:15中所示的CDRH1、CDRH2和CDRH3区氨基酸序列的重链可变区及SEQ ID NO:16中所示的CDRL1、CDRL2和CDRL3区氨基酸序列,其中各CDR按照Kabat定义、Chothia定义、Kabat定义和Chothia定义的组合、IMGT编号系统、AbM定义或CDR的接触定

义限定。

[0219] 因此,在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1的分离的抗体,其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:17中所示的CDRH1、CDRH2和CDRH3区氨基酸序列的重链可变区及SEQ ID NO:16中所示的CDRL1、CDRL2和CDRL3区氨基酸序列,其中各CDR按照Kabat定义、Chothia定义、Kabat定义和Chothia定义的组合、IMGT编号系统、AbM定义或CDR的接触定义限定。

[0220] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1的分离的抗体,该抗体包含含有CDRH1、CDRH2和CDRH3区的重链可变区及含有CDRL1、CDRL2和CDRL3区的轻链可变区,其中CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3区分别包含SEQ ID NO:8、9、10、11、12和13中所示的氨基酸序列。

[0221] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1的分离的抗体,该抗体包含含有CDRH1、CDRH2和CDRH3区的重链可变区及含有CDRL1、CDRL2和CDRL3区的轻链可变区,其中CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3区分别包含SEQ ID NO:8、9、14、11、12和13中所示的氨基酸序列。

[0222] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1的分离的抗体,包含含有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的重链可变区。

[0223] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1的分离的抗体,其包含具有源自人IGHV3-33种系序列的氨基酸序列的重链可变区。选自框架1、框架2、框架3、CDRH1和CDRH2的一个或多个区(例如,这些区中的两个、三个、四个或五个)可以源自人IGHV3-33种系序列。在一个实施方式中,框架1、框架2、框架3、CDRH1和CDRH2全部源自人IGHV3-33种系序列。在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1的分离的抗体,包含含有与选自SEQ ID NO:15、17和26-31的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%或100%(例如,至少86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%)同一的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含具有选自SEQ ID NO:15、17和26-31的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含具有SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含具有SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含具有SEQ ID NO:26中所示的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含具有SEQ ID NO:27中所示的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含具有SEQ ID NO:28中所示的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含具有SEQ ID NO:29中所示的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含具有SEQ ID NO:30中所示的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含具有SEQ ID NO:31中所示的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含具有SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,所述抗体包含具有SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,所述抗体包含具有SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,所述抗体包含具有SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,所述抗体包含具有SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,所述抗体包含具有SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,所述抗体包含具有SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,所述抗体包含具有SEQ ID NO:52

所示的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,所述抗体包含具有SEQ ID NO:53所示的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,所述抗体包含具有SEQ ID NO:54所示的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,所述抗体包含具有SEQ ID NO:55所示的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,所述抗体包含具有SEQ ID NO:56所示的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,所述抗体包含具有SEQ ID NO:57所示的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,所述抗体包含具有SEQ ID NO:58所示的氨基酸序列的重链。

[0224] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1的分离的抗体,包含具有源自人IGKV3-15种系序列的氨基酸序列的轻链可变区。选自框架1、框架2、框架3、CDRL1和CDRL2的一个或多个区(例如,这些区中的两个、三个、四个或五个)可以源自人IGKV3-15种系序列。在一个实施方式中,框架1、框架2、框架3、CDRL1和CDRL2全部源自人IGKV3-15种系序列。在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1的分离的抗体,包含含有与SEQ ID NO:16的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%或100%(例如,至少86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%)同一的氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施方式中,抗体包含具有SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施方式中,抗体包含具有SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列的轻链。

[0225] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1的分离的抗体,包含含有与SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%或100%(例如,至少86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%)同一的氨基酸序列的重链可变区,及含有与SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%或100%(例如,至少86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%)同一的氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施方式中,抗体包含具有选自SEQ ID NO:15、17和26-31的氨基酸序列的重链可变区及具有SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列的轻链可变区。

[0226] 在某些实施方式中,抗体分别包含SEQ ID NO:15和16;17和16;26和16;27和16;28和16;29和16;30和16;或31和16中所示的重链可变区和轻链可变区氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体包含具有SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列的重链可变区,及具有SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施方式中,抗体包含具有SEQ ID NO:17中所示的氨基酸序列的重链可变区,及具有SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施方式中,抗体包含具有SEQ ID NO:26中所示的氨基酸序列的重链可变区,及具有SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施方式中,抗体包含具有SEQ ID NO:27中所示的氨基酸序列的重链可变区,及具有SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施方式中,抗体包含具有SEQ ID NO:28中所示的氨基酸序列的重链可变区,及具有SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施方式中,抗体包含具有SEQ ID NO:29中所示的氨基酸序列的重链可变区,及具有SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施方式中,抗体包含具有SEQ ID NO:30中所示的氨基酸序列的重链可变区,及具有SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施方式中,抗体包含具有SEQ ID NO:31中所示的氨基酸序列的重链可变区,及具有SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的重链,及含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的重链,及含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列

的轻链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的重链,及含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的重链,及含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的重链,及含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的重链,及含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的重链,及含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:52的氨基酸序列的重链,及含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的重链,及含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的重链,及含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:55的氨基酸序列的重链,及含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:56的氨基酸序列的重链,及含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的重链,及含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的重链,及含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的轻链。

[0227] 在某些实施方式中,本公开提供了与包含分别SEQ ID NO:15和16中所示的重链和轻链可变区氨基酸序列的抗体交叉竞争与人PD-1结合的分离的抗体。

[0228] 在某些实施方式中,本公开提供了与分别包含SEQ ID NO:15和16中所示的重链和轻链可变区氨基酸序列的抗体结合人PD-1蛋白上的相同表位的分离的抗体。

[0229] 在某些实施方式中,本公开提供了与分别包含SEQ ID NO:17和16中所示的重链和轻链可变区氨基酸序列的抗体竞争与人PD-1结合的分离的抗体。

[0230] 在某些实施方式中,本公开提供了与分别包含SEQ ID NO:17和16中所示的重链和轻链可变区氨基酸序列的抗体结合人PD-1蛋白上的相同表位的分离的抗体。

[0231] 在某些实施方式中,本公开提供了与分别包含SEQ ID NO:26和16中所示的重链和轻链可变区氨基酸序列的抗体竞争与人PD-1结合的分离的抗体。

[0232] 在某些实施方式中,本公开提供了与分别包含SEQ ID NO:26和16中所示的重链和轻链可变区氨基酸序列的抗体结合人PD-1蛋白上的相同表位的分离的抗体。

[0233] 在某些实施方式中,本公开提供了与分别包含SEQ ID NO:27和16中所示的重链和轻链可变区氨基酸序列的抗体竞争与人PD-1结合的分离的抗体。

[0234] 在某些实施方式中,本公开提供了与分别包含SEQ ID NO:27和16中所示的重链和轻链可变区氨基酸序列的抗体结合人PD-1蛋白上的相同表位的分离的抗体。

[0235] 在某些实施方式中,本公开提供了与分别包含SEQ ID NO:28和16中所示的重链和轻链可变区氨基酸序列的抗体竞争与人PD-1结合的分离的抗体。

[0236] 在某些实施方式中,本公开提供了与分别包含SEQ ID NO:28和16中所示的重链和轻链可变区氨基酸序列的抗体结合人PD-1蛋白上的相同表位的分离的抗体。

[0237] 在某些实施方式中,本公开提供了与分别包含SEQ ID NO:29和16中所示的重链和轻链可变区氨基酸序列的抗体竞争与人PD-1结合的分离的抗体。

[0238] 在某些实施方式中,本公开提供了与分别包含SEQ ID NO:29和16中所示的重链和

轻链可变区氨基酸序列的抗体结合人PD-1蛋白上的相同表位的分离的抗体。

[0239] 在某些实施方式中,本公开提供了与分别包含SEQ ID NO:30和16中所示的重链和轻链可变区氨基酸序列的抗体竞争与人PD-1结合的分离的抗体。

[0240] 在某些实施方式中,本公开提供了与分别包含SEQ ID NO:30和16中所示的重链和轻链可变区氨基酸序列的抗体结合人PD-1蛋白上的相同表位的分离的抗体。

[0241] 在某些实施方式中,本公开提供了与分别包含SEQ ID NO:31和16中所示的重链和轻链可变区氨基酸序列的抗体竞争与人PD-1结合的分离的抗体。

[0242] 在某些实施方式中,本公开提供了与分别包含SEQ ID NO:31和16中所示的重链和轻链可变区氨基酸序列的抗体结合人PD-1蛋白上的相同表位的分离的抗体。

[0243] 任何Ig恒定区可以用于本文中公开的抗体中。在某些实施方式中,Ig区是人IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂重链恒定区。在某些实施方式中,Ig区是人IgG₁。在某些实施方式中,Ig区是人IgG₄。在某些实施方式中,Ig(例如,IgG₁)缺乏在体内成熟野生型IgG₁抗体中正常地存在于位置N297处(按照EU编号系统)的N-连接的聚糖部分。N297聚糖的缺乏导致效应子功能的显著丧失。N297聚糖的消除可以使用本领域中已知的任何方法实现。例如,在某些实施方式中,N297聚糖的消除通过N297残基的突变以除去糖基化位点而实现。因此,在某些实施方式中,本文中公开的抗体包含含有按照EU编号系统的N297A突变的重链恒定区(例如,人IgG₁重链恒定区)。在某些实施方式中,本文中公开的抗体包含含有按照EU编号系统的N297Q突变的重链恒定区(例如,IgG₁重链恒定区)。在某些实施方式中,本文中公开的抗体包含含有按照EU编号系统的D265A突变的IgG₁重链恒定区(例如,人IgG₁重链恒定区)。在某些实施方式中,本文中公开的抗体包含含有按照EU编号系统的S228P突变的IgG₄重链恒定区(例如,人IgG₄重链恒定区)。

[0244] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1的分离的抗体,该抗体包含含有SEQ ID NO:59、60、61、62、63或64的氨基酸序列的重链恒定区。在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1的分离的抗体,该抗体包含含有SEQ ID NO:59的氨基酸序列的重链恒定区。在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1的分离的抗体,该抗体包含含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的重链恒定区。在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1的分离的抗体,该抗体包含含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的重链恒定区。在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1的分离的抗体,该抗体包含含有SEQ ID NO:62的氨基酸序列的重链恒定区。在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1的分离的抗体,该抗体包含含有SEQ ID NO:63的氨基酸序列的重链恒定区。在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1的分离的抗体,该抗体包含含有SEQ ID NO:64的氨基酸序列的重链恒定区。在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1的分离的抗体,该抗体包含含有SEQ ID NO:65的氨基酸序列的轻链恒定区。

[0245] 在某些实施方式中,本文所述的抗体的IgG区具有提高的对CD32B(也称为Fc γ RIIB或FCGR2B)的亲和力,例如,如与具有野生型Fc区,例如,IgG₁Fc的抗体相比的。在某些实施方式中,本文所述的抗体具有相对于CD32A(Fc γ RIIA)和CD16(Fc γ RIIIA)两者而言对于CD32B(Fc γ RIIB)选择性提高的亲和力。导致对CD32B的提高了的亲和力的序列改变是本领域中已知的,例如,在Mimoto等,Protein Engineering,Design&Selection 10:589-598(2013),Chu等,Molecular Immunology 45:3926-3933(2008)和Strohl,Current Opinion

in Biology20:685-691 (2009) 中,其各自通过引用全文并入本文中。在某些实施方式中,抗体包含含有按照EU编号系统编号的选自以下的突变的重链恒定区,例如,IgG₁恒定区,或其片段:G236D、P238D、S239D、S267E、L328F和L328E及其组合。在某些实施方式中,抗体包含含有按照EU编号系统编号的S267E和L328F置换的重链恒定区,例如,IgG₁恒定区,或其片段。在某些实施方式中,抗体包含含有按照EU编号系统编号的P238D和L328E置换的重链恒定区,例如,IgG₁恒定区,或其片段。在某些实施方式中,抗体包含含有按照EU编号系统编号的P238D置换和选自E233D、G237D、H268D、P271G、A330R及其组合的置换的重链恒定区,例如,IgG₁恒定区,或其片段。在某些实施方式中,抗体包含含有按照EU编号系统编号的P238D、E233D、G237D、H268D、P271G和A330R置换的重链恒定区,例如,IgG₁恒定区,或其片段。在某些实施方式中,抗体包含含有按照EU编号系统编号的G236D和S267E的重链恒定区,例如,IgG₁恒定区,或其片段。在某些实施方式中,抗体包含含有按照EU编号系统编号的S239D和S267E的重链恒定区,例如,IgG₁恒定区,或其片段。在某些实施方式中,抗体包含含有按照EU编号系统编号的V262E、S267E和L328F的重链恒定区,例如,IgG₁恒定区,或其片段。在某些实施方式中,抗体包含含有按照EU编号系统编号的V264E、S267E和L328F的重链恒定区,例如,IgG₁恒定区,或其片段。

[0246] 在某些实施方式中,一个、两个或更多个突变(例如,氨基酸置换)引入按照EU编号系统编号的本文所述抗体的Fc区(例如,CH2域(人IgG₁的残基231-340)和/或CH3域(人IgG₁的残基341-447)和/或铰链区)中以改变抗体的一种或多种功能特性,如血清半衰期、补体结合(complement fixation)、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞毒性。

[0247] 在某些实施方式中,一个、两个或更多个突变(例如,氨基酸置换)引入Fc区(CH1域)的铰链区中以使得铰链区中的半胱氨酸残基数量改变(例如,提高或降低),如例如,U.S.专利No.5,677,425中所述的,在此处通过引用全文并入。CH1域的铰链区中的半胱氨酸残基数量可以被改变以,例如,促进轻链和重链的组装或者改变(例如,提高或降低)抗体的稳定性。

[0248] 在具体实施方式中,一个、两个或更多个氨基酸突变(例如,置换、插入或删除)引入IgG恒定域或其FcRn-结合片段(优选Fc或铰链-Fc域片段)中以改变(例如,增大或减小)抗体的体内半衰期。参见,例如,国际公开No.WO 02/060919;WO 98/23289;和WO 97/34631;及U.S.专利No.5,869,046,6,121,022,6,277,375和6,165,745(其全部通过引用全文合并于此)关于将改变(例如,减小或增大)抗体的体内半衰期的突变的实例。在一些实施方式中,一个、两个或更多个氨基酸突变(例如,置换、插入或删除)引入IgG恒定域或其FcRn-结合片段(优选Fc或铰链-Fc域片段)中以减小抗体的体内半衰期。在其它实施方式中,一个、两个或更多个氨基酸突变(例如,置换、插入或删除)引入IgG恒定域或其FcRn-结合片段(优选Fc或铰链-Fc域片段)中以增大抗体的体内半衰期。在具体实施方式中,抗体可以在按照EU编号系统编号的第二恒定(CH2)域(人IgG₁的残基231-340)和/或第三恒定(CH3)域(人IgG₁的残基341-447)中具有一个或多个氨基酸突变(例如,置换)。在具体实施方式中,本文所述的抗体的IgG₁恒定区包含按照EU编号系统编号的252位的甲硫氨酸(M)至酪氨酸(Y)置换、254位的丝氨酸(S)至苏氨酸(T)置换和256位的苏氨酸(T)至谷氨酸(E)置换。参见U.S.专利No.7,658,921,其通过引用全文合并于此。这种类型的突变IgG,称为“YTE突变体”已经证明与相同抗体的野生型形式相比显示出四倍提高的半衰期(参见Dall’Acqua WF等,

(2006) J Biol Chem 281:23514-24,其通过引用全文合并于此)。在某些实施方式中,抗体包含含有按照EU编号系统编号的251-257、285-290、308-314、385-389和428-436位置处氨基酸残基的一个、两个、三个或更多个氨基酸置换的IgG恒定域。

[0249] 在一些实施方式中,一个、两个或更多个突变(例如,氨基酸置换)引入按照EU编号系统编号的本文所述的抗体Fc区(例如,CH2域(人IgG₁的残基231-340)和/或CH3域(人IgG₁的残基341-447)和/或铰链区)中以提高或降低抗体对效应细胞表面上的Fc受体(例如,激活的Fc受体)的亲和力。降低或提高抗体对Fc受体的亲和力的抗体Fc区中的突变及用于将这样的突变引入Fc受体或其片段中的技术是本领域技术人员已知的。抗体Fc受体中可以使改变抗体对Fc受体的亲和力的突变的实例描述于例如,Smith P等,(2012) PNAS 109:6181-6186,U.S.专利No.6,737,056及国际公开No.WO 02/060919;WO 98/23289;和WO 97/34631中,其全部通过引用全文合并于此。

[0250] 在进一步的实施方式中,一个、两个或更多个氨基酸置换引入IgG恒定域Fc区中以改变抗体的效应子功能。例如,选自按照EU编号系统编号的氨基酸残基234、235、236、237、297、318、320和322的一个或多个氨基酸可以用不同的氨基酸残基替换以使得抗体具有对于效应配体(effector ligand)的改变的亲和力但保留亲本抗体的抗原结合能力。对于其的亲和力被改变的效应配体可以是,例如,Fc受体或补体的C1组分。这一途径更详细地描述于U.S.专利No.5,624,821和5,648,260中,其各自通过引用全文合并于此。在一些实施方式中,恒定区结构域的删除或灭活(通过点突变或其它方式)可以降低循环抗体的Fc受体结合,由此提高肿瘤定位。参见,例如,U.S.专利No.5,585,097和8,591,886(其各自通过引用全文合并于此)关于删除或灭活恒定域和由此提高肿瘤定位的突变的描述。在某些实施方式中,一个或多个氨基酸置换可以引入本文所述的抗体的Fc区中以除去Fc区上的潜在糖基化位点,这可以减少Fc受体结合(参见,例如,Shields RL等,(2001) J Biol Chem 276:6591-604,其通过引用全文合并于此)。在各种实施方式中,可以在本文所述抗体的恒定区中进行一个或多个以下突变:按照EU编号系统编号的N297A置换;N297Q置换;L235A置换和L237A置换;L234A置换和L235A置换;E233P置换;L234V置换;L235A置换;C236删除;P238A置换;D265A置换;A327Q置换;或P329A置换。在某些实施方式中,选自按照EU编号系统编号的D265A、P329A及其组合的突变可以在本文所述的抗体的恒定区中进行。

[0251] 在具体实施方式中,本文所述的抗体包含具有按照EU编号系统编号的N297Q或N297A氨基酸置换的IgG₁恒定域。在一个实施方式中,本文所述的抗体包含具有选自按照EU编号系统编号的D265A、P329A及其组合的突变的IgG₁恒定域。在另一实施方式中,本文所述的抗体包含具有选自按照EU编号系统编号的L234A、L235A及其组合的突变的IgG₁恒定域。在某些实施方式中,本文所述抗体的恒定区中对应于按照EU编号系统编号的人IgG₁重链的位置L234、L235和D265的位置中的氨基酸残基分别地不是L、L和D。这一途径详细描述于国际公开No.WO 14/108483中,其通过引用全文合并于此。在特定的实施方式中,对应于按照EU编号系统编号的人IgG₁重链中的位置L234、L235和D265的氨基酸分别是F、E和A;或A、A和A。

[0252] 在某些实施方式中,按照EU编号系统编号的本文所述抗体的恒定区中选自氨基酸残基329、331和322的一个或多个氨基酸可以用不同的氨基酸残基替换以使得抗体具有改变的C1q结合和/或降低或消除的补体依赖性细胞毒性(CDC)。这一途径更详细地描述于

U.S. 专利No.6,194,551 (Idusogie等)中,其通过引用全文合并于此。在一些实施方式中,按照EU编号系统编号的,本文所述抗体的CH2域的N-末端区域中氨基酸位置231-238内的一个或多个氨基酸残基被改变以由此改变抗体固定补体的能力。这一途径更详细地描述于国际公开No.WO 94/29351中,其通过引用全文合并于此。在某些实施方式中,本文所述的抗体的Fc区通过对按照EU编号系统编号的以下位置处的一个或多个氨基酸进行突变(例如,引入氨基酸置换)被修饰以提高抗体介导抗体依赖性T细胞细胞毒性(ADCC)的能力和/或提高抗体对Fc γ 受体的亲和力:238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、328、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438或439。这一途径进一步描述于国际公开No.WO 00/42072中,其通过引用全文合并于此。

[0253] 在某些实施方式中,本文所述的抗体包含IgG₄抗体的恒定区且按照EU编号系统编号的重链氨基酸残基228处的丝氨酸置换脯氨酸。在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1的分离的抗体,该抗体包含含有SEQ ID NO:63的氨基酸序列的重链恒定区。在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1的分离的抗体,该抗体包含含有SEQ ID NO:64的氨基酸序列的重链恒定区。

[0254] 在某些实施方式中,本文所述的任何恒定区突变或修饰可以引入具有两个重链恒定区的本文所述抗体的一个或两个重链恒定区中。

[0255] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1的分离的抗体及作为拮抗剂的功能。

[0256] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1并相对于没有任何抗体或具有不相关的抗体(例如,不特异性地结合人PD-1的抗体)的情况下的PD-1活性降低PD-1活性至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%的分离的抗体,如通过本文所述的和/或本领域技术人员已知的方法评估的。在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1且相对于没有任何抗体或具有不相关的抗体(例如,不特异性地结合人PD-1的抗体)的情况下的PD-1活性降低PD-1活性至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍的分离的抗体,如通过本文所述的和/或本领域技术人员已知的方法评估的。PD-1活性的非限制性实例包括PD-1信号传导、PD-1与PD-1配体(例如,PD-L1或PD-L2)的结合、细胞因子产生(例如,IL-2或IFN γ)的抑制和T细胞增殖的抑制。在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1且灭活、降低或抑制PD-1活性的分离的抗体。在具体的实施方式中,PD-1活性的降低如以下实施例中所述。

[0257] 在具体的实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1且相对于在没有任何抗体或具有不相关的抗体(例如,不特异性地结合人PD-1的抗体)的情况下PD-1与其配体(例如,PD-L1或PD-L2)的结合降低PD-1与其配体(例如,PD-L1或PD-L2)的结合至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%的分离的抗体,如通过本文所述的(参见以下实施例)和/或本领域技术人员已知的方法评估的。在具体的实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-

1且相对于在没有任何抗体或具有不相关的抗体(例如,不特异性地结合人PD-1的抗体)的情况下PD-1与其配体(例如,PD-L1或PD-L2)的结合降低PD-1与其配体(例如,PD-L1或PD-L2)的结合至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍的分离的抗体,如通过本文所述的(参见以下实施例)和/或本领域技术人员已知的方法评估的。

[0258] 在具体的实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1且相对于在没有任何抗体或具有不相关的抗体(例如,不特异性地结合人PD-1的抗体)的情况下的细胞因子产生(例如,IL-2或IFN γ)增加细胞因子产生至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%的分离的抗体,如通过本文所述的(参见以下实施例)和/或本领域技术人员已知的方法评估的。在具体的实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1且相对于在没有任何抗体或具有不相关的抗体(例如,不特异性地结合人PD-1的抗体)的情况下的细胞因子产生(例如,IL-2或IFN γ)增加细胞因子产生至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍的分离的抗体,如通过本文所述的(参见以下实施例)和/或本领域技术人员已知的方法评估的。

[0259] 在具体的实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1且单独地或与抗-CTLA-4抗体(例如,伊匹单抗或tremelimumab)、抗-TIGIT抗体、抗-CD137抗体(例如,urelumab或utomilumab)或抗-0X40抗体(例如,pogalizumab或tavolixizumab)组合,相对于在没有任何抗体或具有不相关的抗体(例如,不特异性地结合人PD-1的抗体)的情况下的IL-2产生提高人外周血单核细胞(PBMC)中响应于葡萄球菌肠毒素A(SEA)刺激的IL-2产生至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍的分离的抗体,如通过本文所述的(参见以下实施例)和/或本领域技术人员已知的方法评估的。

[0260] 在某些实施方式中,在本文所述的抗体(其特异性地结合人PD-1)单独地或与抗-CTLA-4抗体(例如,伊匹单抗或tremelimumab)、抗-TIGIT抗体、抗-CD137抗体(例如,urelumab或utomilumab)或抗-0X40抗体(例如,pogalizumab或tavolixizumab)组合的存在下葡萄球菌肠毒素A(SEA)刺激的人外周血单核细胞(PBMC)相对于在没有任何抗体或具有不相关的抗体(例如,不特异性地结合人PD-1的抗体)的情况下仅用SEA刺激的PBMC提高IL-2产生至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍,如通过本文所述的(参见以下实施例)和/或本领域技术人员已知的方法评估的。

[0261] 在具体的实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1且相对于在没有任何抗体或具有不相关的抗体(例如,不特异性地结合人PD-1的抗体)的情况下人T细胞和异体树突状细胞的共培养物的IFN γ 产生提高人T细胞和异体树突状细胞的共培养物的IFN γ 产生至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍的分离的抗体,如通过本文所述的(参见以下实施例)和/或本领域技术人员已知的方法评估的。

[0262] 在某些实施方式中,在本文所述的抗体(其特异性地结合人PD-1)的存在下人T细

胞和异体树突状细胞的共培养物相对于在没有任何抗体或具有不相关的抗体(例如,不特异性地结合人PD-1的抗体)的情况下人T细胞和异体树突状细胞的共培养物的IFN γ 产生提高IFN γ 产生至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍,如通过本文所述的(参见以下实施例)和/或本领域技术人员已知的方法评估的。

[0263] 在具体的实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1且相对于在没有任何抗体或具有不相关的抗体(例如,不特异性地结合人PD-1的抗体)的情况下的T细胞增殖提高T细胞增殖至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%的分离的抗体,如通过本文所述的(参见以下实施例)和/或本领域技术人员已知的方法评估的。在具体的实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1且相对于在没有任何抗体或具有不相关的抗体(例如,不特异性地结合人PD-1的抗体)的情况下的T细胞增殖提高T细胞增殖至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍的分离的抗体,如通过本文所述的(参见以下实施例)和/或本领域技术人员已知的方法评估的。

[0264] 在具体的实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1且相对于在没有任何抗体或具有不相关的抗体(例如,不特异性地结合人PD-1的抗体)的情况下与卵巢癌腹水共培养的抗-CD3-抗体刺激的CD4+或CD8+T细胞的增殖提高与卵巢癌腹水共培养的抗-CD3-抗体刺激的CD4+或CD8+T细胞的增殖至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍的分离的抗体,如通过本文所述的(参见以下实施例)和/或本领域技术人员已知的方法评估的。

[0265] 在具体的实施方式中,本公开提供了特异性地结合人PD-1且相对于在没有任何抗体或具有不相关的抗体(例如,不特异性地结合人PD-1的抗体)的情况下与表达PD-L1的靶细胞共培养的PD-1表达NFAT-荧光素酶报告细胞中的NFAT信号传导,提高与表达PD-L1的靶细胞共培养的PD-1表达NFAT-荧光素酶报告细胞中的NFAT信号传导至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍的分离的抗体,如通过本文所述的(参见以下实施例)和/或本领域技术人员已知的方法评估的。

[0266] 5.3药物组合物

[0267] 本文提供了包含在生理上可接受的载体、赋形剂或稳定剂中的具有所需纯度水平的本文所述的抗-PD-1抗体的组合物(Remington's Pharmaceutical Sciences(1990) Mack Publishing Co., Easton, PA)。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所使用的剂量和浓度下对于接受者是无毒的,并包括缓冲剂如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双胺;苯扎氯铵、苯索氯铵;酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;

螯合剂,如EDTA;糖类,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐反离子,如钠;金属复合物(例如,Zn-蛋白复合物);和/或非离子表面活性剂,如TWEENTM、PLURONICSTM或聚乙二醇(PEG)。

[0268] 在具体的实施方式中,药物组合物包含在药学上可接受的载体中的本文所述的抗-PD-1抗体和任选地一种或多种另外的预防或治疗剂。在具体的实施方式中,药物组合物包含在药学上可接受的载体中的有效量的本文所述的抗体和任选地一种或多种另外的预防或治疗剂。在一些实施方式中,抗体是包括在药物组合物中的唯一活性成分。本文所述的药物组合物可用于抑制PD-1活性和治疗病症如癌症或传染病。在优选的实施方式中,本发明涉及包含本发明的抗-PD-1抗体的本发明药物组合物,其用作药物。在另一优选的实施方式中,本发明涉及用于治疗癌症或传染病的方法中的本发明药物组合物。在另一优选的实施方式中,本发明涉及本发明的抗-PD-1抗体用于制备治疗癌症或传染病的药物组合物的用途。

[0269] 用于肠胃外制剂中的药学上可接受的载体包括水性媒介物、非水性媒介物、抗微生物剂、等渗剂、缓冲剂、抗氧化剂、局部麻醉剂、助悬剂和分散剂、乳化剂、掩蔽剂或螯合剂和其它药学上可接受的物质。水性媒介物的实例包括氯化钠注射液、林格氏注射液、等渗葡萄糖注射液、无菌水注射液、葡萄糖和乳酸林格氏注射液。非水性肠胃外媒介物包括植物来源的不挥发性油、棉籽油、玉米油、芝麻油和花生油。可以向包装在多剂量容器中的肠胃外制剂中添加抑菌或抑真菌浓度的抗微生物剂,其包括苯酚类或甲酚类、汞剂、苯甲醇、氯丁醇、对羟基苯甲酸甲酯和丙酯、硫柳汞、苯扎氯铵和苄索氯铵。等渗剂包括氯化钠和葡萄糖。缓冲剂包括磷酸盐和柠檬酸盐。抗氧化剂包括硫酸氢钠。局部麻醉剂包括盐酸普鲁卡因。助悬剂和分散剂包括羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素和聚乙烯吡咯烷酮。乳化剂包括聚山梨醇酯80(TWEEN[®]80)。金属离子的掩蔽剂或螯合剂包括EDTA。药物载体还包括用于水混溶性媒介物的乙醇、聚乙二醇和丙二醇及用于pH调节的氢氧化钠、盐酸、柠檬酸或乳酸。

[0270] 药物组合物可以配制用于对受试者的任何施用途径。施用途径的具体实例包括鼻内、口服、肺、透皮、皮内和肠胃外。本文中设想肠胃外施用,特征为皮下、肌肉内或静脉内。注射剂可以以常规形式制备,或者作为液体溶液或悬浮液,适合于注射前在液体中制备溶液或悬浮液的固体形式,或作为乳液。注射剂、溶液和乳液还包含一种或多种赋形剂。合适的赋形剂是,例如,水、盐水、右旋糖、甘油或乙醇。另外,如果需要,待施用的药物组合物还可以包含少量的非毒性辅助物质如湿润剂或乳化剂、pH缓冲剂、稳定剂、溶解性增强剂和其它这类试剂,如,例如,乙酸钠、单月桂酸山梨醇酐酯、油酸三乙醇胺和环糊精。

[0271] 用于抗体的肠胃外施用的制剂包括准备用于注射的无菌溶液、准备用于恰在使用前与溶剂组合的无菌干燥可溶产物如冻干粉末,包括皮下注射片、准备用于注射的无菌悬浮液、准备用于恰在使用前与媒介物组合的无菌干燥不溶性产物和无菌乳液。溶液可以是水性的或非水性的。

[0272] 如果静脉内施用,合适的载体包括生理盐水或磷酸盐缓冲盐水(PBS),及包含增稠剂和增溶剂如葡萄糖、聚乙二醇和聚丙二醇及其混合物的溶液。

[0273] 包含抗体的局部混合物如对于局部和全身性施用所述制备。所得混合物可以是溶液、悬浮液、乳液等且可以配制为霜剂、凝胶、油膏、乳液、溶液、酞剂、洗剂、悬浮液、酞剂、贴片、泡沫剂、气雾剂、灌洗剂、喷雾剂、栓剂、创可贴、皮肤贴片或适合局部施用的任何其它制

剂。

[0274] 本文所述的抗-PD-1抗体可以配置为用于局部应用的气雾剂,如通过吸入(参见,例如,U.S.专利No.4,044,126、4,414,209和4,364,923,其描述了用于递送可用于治疗炎症性疾病,特别是哮喘的类固醇的气雾剂,且其通过引用全文并入)。用于施用于呼吸道的这些制剂可以是气雾剂或用于喷雾器的溶液的形式,或者为用于吹入的微细粉,其单独或与惰性载体如乳糖组合。在这种情况下,在一个实施方式中,制剂的颗粒具有小于50微米的直径,在一个实施方式中小于10微米。

[0275] 本文所述的抗-PD-1抗体可以配置以凝胶、霜剂和洗剂的形式用于区域或局部应用,如用于局部应用于皮肤或粘膜(如在眼睛中),和用于应用于眼睛或者用于脑池内或脊柱内应用。局部施用设想用于透皮递送且也用于施用于眼睛或粘膜,或用于吸入疗法。抗体单独地或与其它药学上可接受的赋形剂组合的鼻用溶液也可施用。

[0276] 透皮贴片,包括离子电渗和电泳装置,是本领域技术人员公知的,且可以用于施用抗体。例如,这类贴片公开于U.S.专利No.6,267,983、6,261,595、6,256,533、6,167,301、6,024,975、6,010,715、5,985,317、5,983,134、5,948,433和5,860,957中,其全部通过引用全文合并于此。

[0277] 在某些实施方式中,包含本文所述的抗体的药物组合物是冻干粉末,其可以重构用于作为溶液、乳液和其它混合物施用。它也可以重构并配制为固体或凝胶。冻干粉末通过溶解本文所述的抗体或其药学上可接受的衍生物在适合的溶剂中来制备。在一些实施方式中,冻干粉末是无菌的。溶剂可以包含提高稳定性的赋形剂或者粉末或从粉末制备的重构溶液的其它药理组分。可以使用的赋形剂包括,但不限于右旋糖、山梨醇、果糖、玉米糖浆、木糖醇、甘油、葡萄糖、蔗糖或其它合适的试剂。溶剂还可以包含缓冲剂,如柠檬酸盐、磷酸钠或磷酸钾或者本领域技术人员已知(在一个实施方式中)在大约中性pH下的其它这类缓冲剂。溶液的后续无菌过滤接着在本领域技术人员已知的标准条件下冻干提供了所需的制剂。在一个实施方式中,所得溶液分配到用于冻干的小瓶中。各小瓶包含化合物的单一剂量或多个剂量。冻干粉末可以在适宜条件下储存,如在约4℃至室温下。这一冻干粉末用注射水重构提供用于肠胃外施用的制剂。对于重构,冻干粉末添加到无菌水或其它合适的载体中。精确量取决于所选择的化合物。这种量可以经验地确定。

[0278] 本文所述的抗-PD-1抗体和本文提供的其它组合物也可以配制为靶向于待治疗受试者的特定组织、受体或其它身体区域。许多这类靶向方法是本领域技术人员公知的。所有这类靶向方法在本文中设想用于本组合物中。对于靶向方法的非限制性实例,参见,例如,U.S.专利No.6,316,652、6,274,552、6,271,359、6,253,872、6,139,865、6,131,570、6,120,751、6,071,495、6,060,082、6,048,736、6,039,975、6,004,534、5,985,307、5,972,366、5,900,252、5,840,674、5,759,542和5,709,874,其全部通过引用全文合并于此。在具体的实施方式中,本文所述的抗体靶向于肿瘤。

[0279] 待用于体内施用的组合物可以是无菌的。这容易地通过例如,无菌过滤膜的过滤完成。

[0280] 5.4使用方法及用途

[0281] 在另一个方面,本公开提供了使用本文公开的抗-PD-1抗体治疗受试者的方法。受试者中受益于PD-1功能的抑制的任何疾病或障碍可以使用本文公开的抗-PD-1抗体治疗。

本文中公开的抗-PD-1抗体特别可用于抑制对肿瘤的免疫系统耐受,且因此可用作癌症患者的免疫治疗。例如,在某些实施方式中,本公开提供了提高受试者中响应于抗原的T-细胞激活的方法,该方法包括向受试者施用有效量的如本文公开的抗-PD-1抗体或其药物组合物。在某些实施方式中,本公开提供了治疗受试者的癌症的方法,该方法包括向受试者施用有效量的如本文公开的抗体或药物组合物。可以用本文公开的抗-PD-1抗体或药物组合物治疗的癌症包括,但不限于黑素瘤、头颈癌(例如,头颈鳞状细胞癌)、肺癌(例如,非小细胞肺癌和小细胞肺癌)、乳腺癌(例如,赫塞汀抗性乳腺癌和曲妥珠单抗-DM1 (T-DM1) 抗性乳腺癌)、前列腺癌、多形性成胶质细胞瘤、结肠直肠癌、肉瘤、膀胱癌、宫颈癌、HPV相关癌症、阴道的癌症、外阴的癌症、阴茎的癌症、肛门的癌症、直肠的癌症、口咽的癌症、多发性骨髓瘤、肾细胞癌、卵巢癌、肝细胞癌、子宫内膜癌、胰腺癌、淋巴瘤和白血病(例如,老年白血病、急性髓性白血病(AML) 和老年AML)。因此,在一个实施方式中,本发明涉及本发明的抗体和/或药物组合物,其用作药物。在优选的实施方式中,本发明涉及本发明的抗体和/或药物组合物在制备用于治疗受试者的癌症的方法中的药物中的用途,和/或用于抑制对肿瘤的免疫系统耐受的用途和/或用于患有癌症的受试者的免疫疗法的用途,和/或用于提高受试者中响应于抗原的T-细胞激活的方法中的用途。在优选的实施方式中,癌症选自黑素瘤、头颈癌(例如,头颈鳞状细胞癌)、肺癌(例如,非小细胞肺癌和小细胞肺癌)、乳腺癌(例如,赫塞汀抗性乳腺癌和曲妥珠单抗-DM1 (T-DM1) 抗性乳腺癌)、前列腺癌、多形性成胶质细胞瘤、结肠直肠癌、肉瘤、膀胱癌、宫颈癌、HPV相关癌症、阴道的癌症、外阴的癌症、阴茎的癌症、肛门的癌症、直肠的癌症、口咽的癌症、多发性骨髓瘤、肾细胞癌、卵巢癌、肝细胞癌、子宫内膜癌、胰腺癌、淋巴瘤和白血病(例如,老年白血病、急性髓性白血病(AML) 和老年AML)。

[0282] 可以用本文公开的抗-PD-1抗体或药物组合物治疗的另外的癌症包括,但不限于黑素瘤(例如,转移性恶性黑素瘤和皮肤或眼内恶性黑素瘤)、肾癌(例如,透明细胞癌)、前列腺癌(例如,激素难治性前列腺腺癌)、乳腺癌、结肠癌、肺癌(例如,非小细胞肺癌)、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头或颈的癌症、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛区的癌症、胃癌、睾丸癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、霍奇金氏病,非霍奇金淋巴瘤、食管癌、小肠癌、内分泌系统的癌症、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、慢性或急性白血病(包括急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病)、儿童期实体肿瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管的癌症、肾盂癌、中枢神经系统(CNS) 的肿瘤、原发CNS淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊索瘤、脑干神经胶质瘤、神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波济氏肉瘤、表皮样癌、鳞状细胞癌、T-细胞淋巴瘤、环境诱导的癌症(包括由石棉诱导的那些)、食管癌、肝癌、难治性或复发性恶性肿瘤、转移性癌症、表达PD-L1的癌症及所述癌症的组合。

[0283] 在某些实施方式中,本公开提供了预防或治疗受试者的传染病的方法,该方法包括向受试者施用有效量的如本文公开的抗-PD-1抗体或其药物组合物。在一个实施方式中,本文提供了用于预防和/或治疗感染(例如,病毒感染、细菌感染、真菌感染、原生动物感染或寄生虫感染)的方法。根据该方法预防和/或治疗的感染可以由本文确定的传染剂引起。在具体的实施方式中,本文所述的抗-PD-1抗体或其组合是施用于受试者的唯一活性剂。在一些实施方式中,本文所述的抗-PD-1抗体或其组合物与用于治疗传染病的抗-感染干预(例如,抗病毒剂、抗菌剂、抗真菌剂或抗蠕虫剂) 结合使用。因此,在优选的实施方式中,

本发明涉及抗体、这样的抗体用于制备药物组合物的用途和/或用于预防和/或治疗传染病的方法中的本发明的药物组合物,更优选其中抗体或药物组合物是施用于受试者的唯一活性剂,或其中抗体或药物组合物与抗-感染干预结合使用。

[0284] 可以通过本文公开的抗-PD-1抗体或药物组合物治疗和/或预防的传染病通过传染剂引起,包括但不限于细菌、寄生虫、真菌、原生动物和病毒。在具体的实施方式中,通过本文公开的抗-PD-1抗体或药物组合物治疗和/或预防的传染病通过病毒引起。可以按照本文所述的方法预防和/或治疗的病毒疾病或病毒感染包括,但不限于通过甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、流感(例如,甲型流感或乙型流感)病毒、水痘病毒、腺病毒、I型单纯疱疹病毒(HSV-I)、II型单纯疱疹病毒(HSV-II)、牛瘟病毒、鼻病毒、艾柯病毒、轮状病毒、呼吸道合胞体病毒、乳头状瘤病毒、乳多空病毒、巨细胞病毒、棘病毒(echinovirus)、虫媒病毒、汉坦病毒(hantavirus)、柯萨奇病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、风疹病毒、脊髓灰质炎病毒、天花病毒、EB病毒、I型人类免疫缺陷病毒(HIV-I)和II型人类免疫缺陷病毒(HIV-II),及病毒疾病如病毒性脑膜炎、脑炎、登革热或天花的病毒剂引起的那些。

[0285] 可以预防和/或治疗的细菌感染包括由大肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、普通变形杆菌、Staphylococcus viridans和铜绿假单胞菌。可以按照本文所述的方法预防和/或治疗的由细菌(例如,大肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、普通变形杆菌、Staphylococcus viridans和铜绿假单胞菌)引起的细菌疾病包括,但不限于Mycobacteria rickettsia、支原体、奈瑟氏菌属、肺炎链球菌、伯氏疏螺旋体(莱姆病)、炭疽芽孢杆菌(Bacillus anthracis)(炭疽)、破伤风、链球菌属、葡萄球菌属、分枝杆菌属、百日咳(pertussis)、霍乱、瘟疫、白喉、衣原体、金黄色葡萄球菌和军团菌属。

[0286] 可以按照本文所述的方法预防和/或治疗的由原生动物引起的原生动物疾病或原生动物感染包括,但不限于利什曼原虫、球虫病、锥虫血吸虫或疟疾。可以按照本文所述的方法预防和/或治疗的由寄生虫引起的寄生虫病或寄生虫感染包括,但不限于衣原体和立克次氏体。

[0287] 可以按照本文所述的方法预防和/或治疗的真菌疾病或真菌感染包括,但不限于由念珠菌感染引起的那些、接合菌病、念珠菌乳腺炎、具有潜伏trichosporonemia的进行性播散性毛孢子菌病、播散性念珠菌病、肺副球孢子菌病、肺曲霉病、卡氏肺孢子虫肺炎、隐球菌脑膜炎、球孢子菌性脑膜脑炎(coccidioidal meningoencephalitis)和脑脊髓血管炎(cerebrospinal vasculitis)、黑曲霉感染、镰刀菌角膜炎(Fusarium keratitis)、副鼻窦真菌病(paranasal sinus mycoses)、烟曲霉心内膜炎、胫骨软骨发育不良、光滑念珠菌阴道炎、口咽部念珠菌病、X-连锁慢性肉芽肿病、脚癣、皮肤念珠菌病、霉菌性胎盘炎、播散性毛孢子菌病、变应性支气管肺曲霉病、真菌性角膜炎、新型隐球菌感染、真菌性腹膜炎、膝弯孢霉(Curvularia geniculata)感染、葡萄球菌眼内炎、孢子丝菌病和皮真菌病。

[0288] 在某些实施方式中,这些方法还包括向受试者施用另外的治疗剂。在某些实施方式中,另外的治疗剂是化疗剂、放疗剂或检查点靶向剂。在某些实施方式中,检查点靶向剂选自拮抗剂抗-CTLA-4抗体、拮抗剂抗-PD-L1抗体、拮抗剂抗-PD-L2抗体、拮抗剂抗-PD-1抗体、拮抗剂抗-TIM-3抗体、拮抗剂抗-LAG-3抗体、拮抗剂抗-CEACAM1抗体、拮抗剂抗-TIGIT抗体、激动剂抗-CD137抗体、激动剂抗-ICOS抗体、激动剂抗-GITR抗体和激动剂抗-OX40抗体。在某些实施方式中,本文中公开的抗-PD-1抗体与拮抗剂抗-CTLA-4抗体和激动剂抗-

ICOS抗体结合施用于受试者。在某些实施方式中,本文中公开的抗-PD-1抗体与拮抗剂抗-CTLA-4抗体结合施用于受试者。在某些实施方式中,本公开提供了治疗受试者的癌症的方法,该方法包括与拮抗剂抗-CTLA-4抗体或其药物组合物结合向受试者施用本文公开的抗-PD-1抗体或其药物组合物,其中癌症选自肺癌(例如,非小细胞肺癌(NSCLC),例如,一线NSCLC)、黑素瘤(例如,一线黑素瘤)和头颈癌(例如,头颈鳞状细胞癌(SCCHN),例如,一线SCCHN)。

[0289] 在优选的实施方式中,本发明涉及抗体、这样的抗体用于制备药物组合物的用途和/或用于本发明的方法中的本发明的药物组合物,其中该方法还包括向受试者施用另外的治疗剂。在另一优选的实施方式中,本发明涉及(a)本发明的抗体和/或药物组合物及(b)另外的治疗剂,其用作药物。在另一优选的实施方式中,本发明涉及(a)本发明的抗体和/或药物组合物,及(b)另外的治疗剂,其用于治疗癌症的方法中。在进一步的实施方式中,本发明涉及药物组合物、试剂盒或药盒,其包含(a)本发明的抗体和/或药物组合物及(b)另外的治疗剂。在一个更优选的实施方式中,另外的治疗剂是化疗剂、放疗剂或检查点靶向剂。

[0290] 在某些实施方式中,抗-CTLA-4抗体用于本文公开的方法中。在某些实施方式中,抗-CTLA-4抗体是由Bristol-Myers Squibb开发的伊匹单抗。在某些实施方式中,抗-CTLA-4抗体是由Pfizer和Medimmune开发的Tremelimumab。在某些实施方式中,抗-CTLA-4抗体是由CytomX和Bristol-Myers Squibb开发的靶向CTLA-4的Probody。

[0291] 可以用于本文公开的治疗方法中的抗-CTLA-4抗体的非限制性实例公开于以下专利和专利申请中,其全部通过引用全文合并于此:US专利No.6,984,720;US专利No.7,411,057;US专利No.7,034,121;US专利No.8,697,845;US专利No.8,518,404;U.S.公开No.US2009/0123477A1;U.S.公开No.US 2014/0105914A1;U.S.公开No.US2013/0267688A1;U.S.公开No.US 2016/0145355A1;PCT公开No.WO 2014/207064A1和PCT公开No.WO 2016/015675A1。

[0292] 在某些实施方式中,本文公开的抗-PD-1抗体与靶向免疫调节酶如IDO(吡啶胺-(2,3)-双加氧酶)和/或TDO(色氨酸2,3-双加氧酶)的化合物结合施用于受试者。因此,在另一更优选的实施方式中,另外的治疗剂是靶向免疫调节酶的化合物,甚至更优选吡啶胺-(2,3)-双加氧酶(IDO)的抑制剂。在某些实施方式中,这样的化合物选自epacadostat (Incyte Corp;参见,例如,WO 2010/005958,其通过引用全文并入本文中)、F001287 (Flexus Biosciences/Bristol-Myers Squibb)、indoximod (NewLink Genetics)和NLG919 (NewLink Genetics)。在一个实施方式中,化合物是epacadostat。在另一实施方式中,化合物是F001287。在另一实施方式中,化合物是indoximod。在另一实施方式中,化合物是NLG919。

[0293] 在某些实施方式中,本文公开的抗-PD-1抗体与疫苗结合施用于受试者。疫苗可以是,例如,肽疫苗、DNA疫苗或RNA疫苗。在某些实施方式中,疫苗是基于热休克蛋白的肿瘤疫苗或基于热休克蛋白的病原体疫苗。在具体的实施方式中,本文公开的抗-PD-1抗体与基于热休克蛋白的肿瘤疫苗结合施用于受试者。热休克蛋白(HSP)是在所有物种中普遍存在的高度保守蛋白质的家族。它们的表达可以由于热休克或其它形式的应激(包括暴露于毒素、氧化应激或葡萄糖饥饿)而有力地诱导到高得多的水平。根据分子量归类为五个家族:HSP-110、-90、-70、-60和-28。HSP通过抗原呈递细胞(APC)如巨噬细胞和树突状细胞(DC)中的交

又呈递途径递送免疫原性肽,从而导致T细胞激活。HSP作为肿瘤相关抗原肽的伴侣蛋白载体发挥作用,从而形成能够诱导肿瘤特异性免疫的复合体。在从死亡肿瘤细胞释放时,HSP-抗原复合体由抗原呈递细胞(APC)摄取,在其中抗原被加工成结合MHC I类和II类分子的肽,从而导致抗-肿瘤CD8⁺和CD4⁺T细胞的激活。由源自肿瘤制备物的HSP复合体诱发的免疫特异性地针对由各受试者的癌症表达的独特抗原肽库。因此,在进一步优选的实施方式中,本发明涉及(a)本发明的抗体和/或药物组合物及(b)疫苗,其用作药物,特别地用于治疗癌症的方法中。在另一优选的实施方式中,本发明涉及药物组合物、试剂盒或药盒,其包含(a)本发明的抗体和/或药物组合物及(b)疫苗。在进一步优选的实施方式中,疫苗是基于热休克蛋白的肿瘤疫苗或基于热休克蛋白的病原体疫苗,更优选基于热休克蛋白的肿瘤疫苗。

[0294] 热休克蛋白肽复合物(HSPPC)是由与抗原肽非共价复合的热休克蛋白组成的蛋白质肽复合体。HSPPC诱发先天性和适应性免疫反应两者。在具体的实施方式中,抗原肽显示出对于所治疗的癌症的抗原性。HSPPC通过膜受体(主要CD91)或通过结合Toll-样受体被APC有效地捕获。HSPPC内化导致具有趋化因子和细胞因子产生的APC的功能性成熟,从而导致天然杀伤细胞(NK)、单核细胞的激活及Th1和Th-2-介导的免疫反应。在某些实施方式中,本文公开的方法中使用的HSPPC包含与抗原肽复合的来自应激蛋白的hsp60、hsp70或hsp90家族的一种或多种热休克蛋白。在某些实施方式中,HSPPC包含hsc70、hsp70、hsp90、hsp110、grp170、gp96、钙网蛋白或其两者或更多者的组合。

[0295] 在具体实施方式中,热休克蛋白肽复合物(HSPPC)包含与重组抗原肽复合的重组热休克蛋白(例如,hsp70或hsc70)或其肽结合结构域。重组热休克蛋白可以通过重组DNA技术产生,例如,使用人hsc70序列,如Dworniczak和Mirault,Nucleic Acid Res.15:5181-5197(1987)及GenBank登录no.P11142和/或Y00371中所述的,其各自通过引用全文合并于此。在某些实施方式中,Hsp70序列描述于Hunt和Morimoto Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.82(19),6455-6459(1985)及GenBank登录no.P0DMV8和/或M11717中,其各自通过引用全文合并于此。抗原肽也可以通过本领域中已知的重组DNA方法制备。

[0296] 在某些实施方式中,抗原肽包含修饰的氨基酸。在某些实施方式中,修饰的氨基酸包含翻译后修饰。在某些实施方式中,修饰的氨基酸包含翻译后修饰的模拟物。在某些实施方式中,修饰的氨基酸是已经在侧链羟基或胺上磷酸化的Tyr、Ser、Thr、Arg、Lys或His。在某些实施方式中,修饰的氨基酸是已经在侧链羟基或胺上磷酸化的Tyr、Ser、Thr、Arg、Lys或His氨基酸的模拟物。

[0297] 在具体的实施方式中,本文公开的抗-PD-1抗体与热休克蛋白肽复合物(HSPPC),例如,热休克蛋白肽复合物-96(HSPPC-96)组合施用于受试者以治疗癌症。HSPPC-96包含与抗原肽复合的96kDa热休克蛋白(Hsp),gp96。HSPPC-96是从受试者的肿瘤制得的癌症免疫疗法且包含癌症的抗原性“指纹”。在某些实施方式中,这一指纹包含仅在该特定受试者的特定癌细胞中存在的独特抗原,且疫苗的注射意图刺激受试者的免疫系统以识别和攻击具有特定癌症指纹的任何细胞。因此,在另一优选的实施方式中,本发明涉及与热休克蛋白肽复合物(HSPPC)组合的本发明的抗体和/或药物组合物,其用作药物和/或用于治疗癌症的方法中。

[0298] 在某些实施方式中,HSPPC,例如,HSPPC-96,由受试者的肿瘤组织产生。在具体的实施方式中,HSPPC(例如,HSPPC-96)由所治疗的癌症或其转移的类型的肿瘤产生。在另一

具体的实施方式中,HSPPC(例如,HSPPC-96)是所治疗的受试者自体的。在某些实施方式中,肿瘤组织是非坏死肿瘤组织。在某些实施方式中,至少1克(例如,至少1、至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9或至少10克)的非坏死肿瘤组织用于产生疫苗方案。在某些实施方式中,在手术切除后,非坏死肿瘤组织在用于疫苗制备之前冷冻。在一些实施方式中,HSPPC,例如,HSPPC-96,通过纯化技术从肿瘤组织分离,过滤并制备用于可注射疫苗。在某些实施方式中,受试者施用6-12剂的HSPPC,例如,HSPPC-96。在这样的实施方式中,HSPPC,例如,HSPPC-96,剂量可以每周施用前4个剂量和随后每两周施用2-8个另外的剂量。

[0299] 可以根据本文所述的方法使用的HSPPC的进一步实例公开于以下专利和专利申请中:U.S.专利No.6,391,306,6,383,492,6,403,095,6,410,026,6,436,404,6,447,780,6,447,781和6,610,659,其全部通过引用全文合并于此。

[0300] 在某些实施方式中,本文中公开的抗-PD-1抗体与佐剂结合施用于受试者。各种佐剂可以根据治疗情况使用。合适佐剂的非限制性实例包括,但不限于完全弗氏佐剂(CFA)、不完全弗氏佐剂(IFA)、montanide ISA(不完全Seppic佐剂)、Ribi佐剂系统(RAS)、Titer Max、胞壁酰肽、Syntex佐剂制剂(SAF)、明矾(氢氧化铝和/或磷酸铝)、铝盐佐剂、Gerbu[®]佐剂、硝基纤维素吸附的抗原、包封或捕集的抗原、3De-0-酰化单磷酰脂质A(3D-MPL)、免疫刺激寡核苷酸、toll-样受体(TLR)配体、甘露聚糖结合凝集素(MBL)配体、STING激动剂、免疫刺激复合物如皂素、Quil A、QS-21、QS-7、ISCOMATRIX及其它。其它佐剂包括CpG寡核苷酸和双链RNA分子,如聚(A)和聚(U)。以上佐剂的组合也可以使用。参见,例如,U.S.专利No.6,645,495;7,029,678和7,858,589,其全部通过引用全文合并于此。在一个实施方式中,本文中使用的佐剂是QS-21STIMULON。

[0301] 在某些实施方式中,本文中公开的抗-PD-1抗体与包含TCR的另外的治疗剂组合施用于受试者。在某些实施方式中,另外的治疗剂是可溶性TCR。在某些实施方式中,另外的治疗剂是表达TCR的细胞。因此,在另一优选的实施方式中,本发明涉及与包含TCR的另外的治疗剂组合的本发明的抗体和/或药物组合物,其用作药物和/或用于治疗癌症的方法中。

[0302] 在某些实施方式中,本文中公开的抗-PD-1抗体与表达嵌合抗原受体(CAR)的细胞组合施用于受试者。在某些实施方式中,所述细胞是T细胞。

[0303] 在某些实施方式中,本文中公开的抗-PD-1抗体与TCR模拟抗体组合施用于受试者。在某些实施方式中,TCR模拟抗体是特异性地结合肽-MHC复合体的抗体。对于TCR模拟抗体的非限制性实例,参见,例如,U.S.专利No.9,074,000及U.S.公开No.US 2009/0304679A1和US 2014/0134191A1,其全部通过引用全文合并于此。

[0304] 抗-PD-1抗体和另外的治疗剂(例如,化疗剂、放疗剂、检查点靶向剂、IDO抑制剂、疫苗、佐剂、可溶性TCR、表达TCR的细胞、表达嵌合抗原受体的细胞和/或TCR模拟抗体)可以作为独立的剂型单独地、顺序地或同时地施用。在一个实施方式中,抗-PD-1抗体肠胃外施用,且IDO抑制剂口服施用。

[0305] 本文所述的抗体或药物组合物可以通过多种途径递送到受试者。这些包括,但不限于肠胃外、鼻内、气管内、口服、皮内、局部、肌肉内、腹膜内、透皮、静脉内、肿瘤内、结膜、动脉内和皮下途径。也可以使用肺部施用,例如,通过使用吸入器或喷雾器,及用作喷雾的具有雾化剂的制剂。在某些实施方式中,本文所述的抗体或药物组合物皮下或静脉内递送。在某些实施方式中,本文所述的抗体或药物组合物动脉内递送。在某些实施方式中,本文所

述的抗体或药物组合物肿瘤内递送。在某些实施方式中,本文所述的抗体或药物组合物递送至肿瘤引流淋巴结。

[0306] 有效地治疗和/或预防病症的抗体或组合物的量取决于疾病的性质,且可以通过标准临床技术确定。

[0307] 待用于组合物中的精确剂量也取决于施用途径及感染或由其引起的疾病的严重性,且应当根据实施者的判断和各受试者的情况决定。例如,有效剂量也可以根据施用的方式、目标位点、患者的生理状态(包括年龄、体重和健康)(无论患者是人或动物)、施用的其它药物治疗或治疗是预防性或治疗性的而变化。通常,患者是人,但非人哺乳动物包括转基因动物也可以被治疗。治疗剂量最佳地滴定以优化安全性和效力。

[0308] 本文所述的抗-PD-1抗体也可以用于利用本领域技术人员已知的经典免疫组织学方法(包括免疫测定,如酶联免疫吸附分析(ELISA)、免疫沉淀或蛋白质印迹)测定生物样品中的PD-1蛋白水平。合适的抗体分析标记是本领域中已知的且包括酶标记如葡萄糖氧化酶;放射性同位素如碘(^{125}I , ^{121}I)、碳(^{14}C)、硫(^{35}S)、氚(^3H)、铟(^{121}In)和锝(^{99}Tc);发光标记如鲁米诺;和荧光标记如荧光素和罗丹明,及生物素。这样的标记可以用于标记本文所述的抗体。或者,识别本文所述的抗-PD-1抗体的第二抗体可以被标记并与抗-PD-1抗体结合使用以检测PD-1蛋白水平。因此,在一个实施方式中,本发明涉及本发明的抗体用于体外检测生物样品中的人PD-1蛋白的用途。在进一步的实施方式中,本发明涉及本发明的抗-PD-1抗体用于体外测定和/或检测生物样品中的人PD-1蛋白水平的用途,优选地其中抗-PD-1抗体与放射性核素或可检测标记偶联和/或携带本文中所述的标记,和/或其中使用免疫组织学方法。

[0309] 测定PD-1蛋白的表达水平意图包括直接地(例如,通过测定或估算绝对蛋白质水平)或相对地(例如,通过与第二生物样品中的疾病相关蛋白质水平比较)定性或定量地测量或估算第一生物样品中的PD-1蛋白水平。第一生物样品中的PD-1多肽表达水平可以测量或估算并与标准PD-1蛋白水平相比较,该标准获自从不具有障碍的个体获得的第二生物样品或通过平均来自不具有障碍的个体群体的水平来确定。如本领域中理解的,一旦“标准”PD-1多肽水平已知,其可以重复地用作进行比较的标准。因此,在进一步的实施方式中,本发明涉及用于测定和/或检测生物样品中的PD-1蛋白水平,特别地人PD-1蛋白水平,的体外方法,包括通过免疫组织学方法定性或定量地测量或估算生物样品中的PD-1蛋白,特别地人PD-1蛋白的水平。

[0310] 如本文中使用的,术语“生物样品”是指从受试者获得的任何生物样品,潜在地表达PD-1的细胞系、组织或其它细胞来源。用于从动物(例如,人)获得组织活检样品和体液的方法是本领域中公知的。生物样品包括外周血单核细胞。

[0311] 本文所述的抗-PD-1抗体可以用于预后、诊断、监测和筛选应用,包括技术人员公知和标准的和基于本说明书的体外和体内应用。用于体外评估和评价免疫系统状态和/或免疫反应的预后、诊断、监测和筛选分析和试剂盒可以用于预测、诊断和监测以评价患者样品,包括已知具有或怀疑具有免疫系统功能障碍的那些,或针于预期的或所需的免疫系统反应、抗原反应或疫苗反应来预测、诊断和监测。免疫系统状态和/或免疫反应的评估和评价也可用于相对于不同药剂或抗体确定患者对于药物的临床试验或对于特定化疗剂、放疗剂或抗体(包括其组合)的施用的适合性。这一类型的预后和诊断监测和评估实际上早已利

用针对乳腺癌中的HER2蛋白的抗体 (HercepTest™, Dako), 其中该分析也用于针对使用 Herceptin® 的抗体治疗评价患者。体内应用包括定向细胞治疗和免疫系统调节和免疫反应的放射成像。因此, 在一个实施方式中, 本发明涉及抗-PD-1抗体、这样的抗体用于制备药物组合物的用途和/或用作诊断剂的本发明的药物组合物。在优选的实施方式中, 本发明涉及抗-PD-1抗体、这样的抗体用于制备药物组合物的用途和/或用于预测、诊断和监测以评价具有或怀疑具有免疫系统功能障碍的患者, 或相对于预期的或所需的免疫系统反应、抗原反应或疫苗反应进行预测、诊断和监测的方法中的本发明的药物组合物。在另一实施方式中, 本发明涉及本发明的抗-PD-1抗体用于通过体外测定和/或检测受试者的生物样品中的人PD-1蛋白水平来预测、诊断和监测以评价具有或怀疑具有免疫系统功能障碍的患者, 或相对于预期的或所需的免疫系统反应、抗原反应或疫苗反应来预测、诊断和监测的用途。

[0312] 在一个实施方式中, 抗-PD-1抗体可以用于活检样品的免疫组织化学中。优选地, 该方法是体外方法。在另一实施方式中, 抗-PD-1抗体可以用于检测PD-1的水平或在其膜表面上包含PD-1的细胞的水平, 该水平然后可以与某些疾病症状相关联。本文所述的抗-PD-1抗体可以携带可检测的或功能性的标记和/或可以与放射性核素或可检测标记偶联。当使用荧光标记时, 当前可用的显微术和荧光激活细胞分选分析 (FACS) 或本领域中已知的两种方法过程的组合可以用于鉴定和定量特定结合成员。本文所述的抗-PD-1抗体可以携带荧光标记或与荧光标记偶联。示例性的荧光标记包括, 例如, 反应性的和偶联的探针, 例如氨基香豆素、荧光素和德克萨斯红、Alexa Fluor染料、Cy染料和DyLight染料。抗-PD-1抗体可以携带放射性标记或放射性核素或者与其偶联, 如同位素³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、³⁶Cl、⁵¹Cr、⁵⁷Co、⁵⁸Co、⁵⁹Fe、⁶⁷Cu、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹¹⁷Lu、¹²¹I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁹⁸Au、²¹¹At、²¹³Bi、²²⁵Ac和¹⁸⁶Re。当使用放射性标记时, 当前可用的本领域已知的计数过程可以用于鉴定和定量抗-PD-1抗体与PD-1 (例如, 人PD-1) 的特异性结合。在其中标记是酶的情况下, 检测可以通过如本领域中已知的任何当前采用的比色的、光谱光度测量的、荧光光度的、电泳检测的或气体定量的技术完成。这可以通过在允许形成抗体和PD-1之间的复合物的条件下使样品或对照样品与抗-PD-1抗体接触来实现。检测抗体和PD-1之间形成的任何复合物并在样品或对照样品中进行比较。鉴于本文所述的抗体与PD-1的特异性结合, 抗体可以用于特异性地检测细胞表面上的PD-1表达。本文所述的抗体也可以用于通过免疫亲和纯化来纯化PD-1。本文还包括用于定量分析例如PD-1或PD-1/PD-1配体复合物的存在水平的可制备成测试试剂盒、试剂盒或药盒的形式的分析系统。该系统、测试试剂盒、试剂盒或药盒可以包含标记的组分, 例如, 标记的抗体, 和一种或多种另外的免疫化学试剂。

[0313] 5.5多核苷酸、载体和产生抗-PD-1抗体的方法

[0314] 在另一个方面, 本文提供了包含编码特异性地结合PD-1 (例如, 人PD-1) 抗原的本文所述的抗体或其片段 (例如, 轻链可变区和/或重链可变区) 的核苷酸序列的多核苷酸, 及载体, 例如, 用于在宿主细胞 (例如, 大肠杆菌和哺乳动物细胞) 中重组表达的包含这类多核苷酸的载体。本文提供了包含编码任何本文中提供的抗体的重链和/或轻链的核苷酸序列的多核苷酸, 以及包含这样的多核苷酸序列的载体, 例如, 用于在宿主细胞, 例如, 哺乳动物细胞中高效表达的表达载体。

[0315] 如本文中使用的, “分离的”多核苷酸或核酸分子是与其在核酸分子的天然来源 (例如, 小鼠或人) 中存在的其它核酸分子分离的多核苷酸或核酸分子。此外, “分离的”核酸

分子如cDNA分子可以基本上不含其它细胞物质,或在通过重组技术产生时,基本上不含培养基,或在化学合成时,基本上不含化学前体或其它化学品。例如,表述“基本上不含”包括具有少于约15%、10%、5%、2%、1%、0.5%或0.1% (特别地少于约10%) 的其它物质(例如,细胞物质、培养基、其它核酸分子、化学前体和/或其它化学品)的多核苷酸或核酸分子制备物。在具体的实施方式中,编码本文所述的抗体的核酸分子是分离或纯化的。

[0316] 在特定方面中,本文提供了包含编码特异性地结合PD-1多肽(例如,人PD-1)且包含如本文所述的氨基酸序列的抗体以及与这样的抗体竞争结合PD-1多肽(例如,以剂量依赖性的方式)或与这样的抗体结合相同的表位的抗体的核苷酸序列的多核苷酸。

[0317] 在某些方面中,本文提供了包含编码本文所述抗体的轻链或重链的核苷酸序列的多核苷酸。多核苷酸可以包含编码含有本文所述的抗体的VL FR和CDR(参见,例如,表3和5)的轻链的核苷酸序列或编码含有本文所述的抗体的VH FR和CDR(参见,例如,表2和4)的重链的核苷酸序列。

[0318] 本文还提供了编码抗-PD-1抗体的多核苷酸,其例如通过密码子/RNA优化、异源信号序列的替换和mRNA不稳定性元件的消除进行优化。通过引入密码子变化和/或消除mRNA中的抑制性区域产生用于重组表达的编码抗-PD-1抗体或其片段(例如,轻链、重链、VH域或VL域)的优化核酸的方法可以通过相应地采用例如,U.S. 专利No. 5,965,726;6,174,666;6,291,664;6,414,132和6,794,498中描述的优化方法进行,其全部通过引用全文合并于此。例如,RNA内的潜在剪接位点和不稳定性元件(例如,富A/T或A/U元件)可以被突变而不改变该核酸序列编码的氨基酸以提高用于重组表达的RNA的稳定性。该改变利用了遗传密码的简并性,例如,使用对于相同氨基酸的替代密码子。在一些实施方式中,可能希望改变一个或多个密码子以编码保守性突变,例如,具有与原始氨基酸相似的化学结构和/或性质的相似氨基酸。这样的方法可以相对于通过未优化的多核苷酸编码的抗-PD-1抗体的表达提高抗-PD-1抗体或其片段的表达至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍或更高。

[0319] 在某些实施方式中,编码本文所述的抗-PD-1抗体或其片段(例如,VL域和/或VH域)的优化多核苷酸序列可以与编码本文所述的抗-PD-1抗体或其片段(例如,VL域和/或VH域)的未优化多核苷酸序列的反义(例如,互补)多核苷酸杂交。在特定的实施方式中,编码本文所述的抗-PD-1抗体或其片段的优化核苷酸序列在高严格性条件下与编码本文所述的抗-PD-1抗体或其片段的未优化多核苷酸序列的反义多核苷酸杂交。在具体的实施方式中,编码本文所述的抗-PD-1抗体或其片段的优化核苷酸序列在高严格性、中等或低严格性杂交条件下与编码本文所述的抗-PD-1抗体或其片段的未优化多核苷酸序列的反义多核苷酸杂交。关于杂交条件的信息已经被描述,参见,例如,U.S. 专利申请公开No. US 2005/0048549(例如,72-73段),其通过引用全文并入本文中。

[0320] 多核苷酸可以通过本领域中已知的任何方法获得,并测定多核苷酸的核苷酸序列。编码本文所述的抗体(例如,表1-6中所描述的抗体)及这些抗体的修饰形式的核苷酸序列可以使用本领域中公知的方法确定,即,已知编码特定氨基酸的核苷酸密码子以产生编码该抗体的核酸的方式组装。编码抗体的这种多核苷酸可以从化学合成的寡核苷酸组装(例如,如Kutmeier G等,(1994),BioTechniques 17:242-6中所述,其通过引用全文合并于此),简言之,其涉及包含抗体编码序列的部分的重叠寡核苷酸的合成,那些寡核苷酸的退

火和连接,和然后连接的寡核苷酸通过PCR的扩增。

[0321] 或者,编码本文所述的抗体的多核苷酸可以使用本领域中公知的方法(例如,PCR和其它分子克隆方法)从来自合适来源(例如,杂交瘤)的核酸产生。例如,使用可与已知序列的3'和5'末端杂交的合成引物的PCR扩增可以使用从产生目标抗体的杂交瘤细胞获得的基因组DNA进行。这样的PCR扩增方法可以用于获得包含编码抗体轻链和/或重链的序列的核酸。这样的PCR扩增方法可以用于获得包含编码抗体的可变轻链区和/或可变重链区的序列的核酸。扩增的核酸可以克隆到用于在宿主细胞中表达和用于进一步克隆的载体中,例如,以产生嵌合和人源化抗体。

[0322] 如果包含编码特定抗体的核酸的克隆不可得,但抗体分子的序列是已知的,则编码免疫球蛋白的核酸可以化学合成或通过使用可与序列的3'和5'末端杂交的合成引物的PCR扩增或通过使用对于特定基因序列特异性的寡核苷酸探针进行克隆以鉴定例如来自编码抗体的cDNA文库的cDNA克隆而从合适的来源(例如,抗体cDNA文库或从自表达抗体的任何组织或细胞(如选择为表达本文所述的抗体的杂交瘤细胞)分离的核酸(优选聚A+RNA)产生的cDNA文库)获得。通过PCR产生的扩增的核酸然后可以使用本领域中公知的任何方法克隆到可复制克隆载体中。

[0323] 编码本文所述的抗-PD-1抗体的DNA可以使用常规程序(例如,通过使用能够特异性地结合编码抗-PD-1抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)容易地分离和测序。杂交瘤细胞可以用作这类DNA的来源。一旦分离,DNA可以置于表达载体中,其然后转染到宿主细胞如大肠杆菌细胞、猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞(例如,来自CHO GS System™(Lonza)的CHO细胞)或骨髓瘤细胞(其否则不产生免疫球蛋白)中以在重组宿主细胞中获得抗-PD-1抗体的合成。

[0324] 为产生全抗体,包括VH或VL核苷酸序列、限制性位点和保护限制性位点的侧翼序列的PCR引物可以用于扩增scFv克隆中的VH或VL序列。利用本领域技术人员已知的克隆技术,PCR扩增的VH域可以克隆到表达重链恒定区(例如,人 γ 4恒定区)的载体中,且PCR扩增的VL域可以克隆到表达轻链恒定区(例如,人 κ 或 λ 恒定区)的载体中。在某些实施方式中,用于表达VH或VL的载体包含EF-1 α 启动子、分泌信号、用于可变区、恒定域和选择标记如新霉素的克隆位点。VH和VL域也可以克隆到表达必要的恒定区的一个载体中。重链转换载体和轻链转换载体然后使用本领域技术人员已知的技术共转染到细胞系中以产生表达全长抗体(例如,IgG)的稳定或瞬时细胞系。

[0325] DNA也可以例如通过用人重链和轻链恒定域的编码序列替代鼠序列或者通过共价接合全部或部分非免疫球蛋白多肽的编码序列与免疫球蛋白编码序列进行修饰。

[0326] 还提供了在高严格性、中等或低严格性杂交条件下与编码本文所述的抗体的多核苷酸杂交的多核苷酸。在特定的实施方式中,本文所述的多核苷酸在高严格性、中等或低严格性杂交条件下与编码本文提供的VH域和/或VL域的多核苷酸杂交。

[0327] 杂交条件已经在本领域中描述且是本领域技术人员已知的。例如,在严格条件下的杂交可以包括在约45℃下6x氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中与滤器结合的DNA杂交,接着在约50-65℃下0.2xSSC/0.1%SDS中的一个或多个洗涤;在高度严格条件下的杂交可以包括在约45℃下6xSSC中与滤器结合的核酸杂交,接着在约68℃下0.1xSSC/0.2%SDS中的一个或多个洗涤。在其它严格杂交条件下的杂交是本领域技术人员已知的且已经被描述,参见,例

如,Ausubel FM等,eds.,(1989)Current Protocols in Molecular Biology,Vol.I,Green Publishing Associates,Inc.and John Wiley&Sons,Inc.,New York,6.3.1-6.3.6和2.10.3页,其通过引用全文合并于此。

[0328] 在某些方面中,本文提供了表达(例如,重组表达)特异性地结合PD-1(例如,人PD-1)的本文所述的抗体的细胞(例如,宿主细胞),及相关多核苷酸和表达载体。本文提供了用于在宿主细胞中,优选在哺乳动物细胞中重组表达的包含含有编码抗-PD-1抗体或片段的核苷酸序列的多核苷酸的载体(例如,表达载体)。本文还提供了包含用于重组表达本文所述的抗-PD-1抗体(例如,人或人源化抗体)的这类载体的宿主细胞。在特定的方面中,本文提供了用于产生本文所述的抗体的方法,包括从宿主细胞表达这样的抗体。

[0329] 特异性结合PD-1(例如,人PD-1)的本文所述的抗体(例如,全长抗体、抗体的重链和/或轻链或者本文所述的单链抗体)的重组表达包括构建包含编码抗体的多核苷酸的表达载体。一旦编码本文所述的抗体分子、抗体的重链和/或轻链或其片段(例如,重链和/或轻链可变区)的多核苷酸已经获得,用于产生抗体分子的载体可以使用本领域中公知的技术通过重组DNA技术产生。因此,用于通过表达包含抗体或抗体片段(例如,轻链或重链)编码核苷酸序列的多核苷酸制备蛋白质的方法在本文中描述。本领域技术人员公知的方法可以用于构建包含抗体或抗体片段(例如,轻链或重链)编码序列及适宜的转录和翻译控制信号的表达载体。这些方法包括,例如,体外重组DNA技术、合成技术和体内遗传重组。还提供了包含任选地与启动子连接的编码本文所述的抗体分子、抗体的重链或轻链、抗体或其片段的重链或轻链可变区或者重链或轻链CDR的核苷酸序列的可复制载体。这样的载体可以,例如,包括编码抗体分子的恒定区的核苷酸序列(参见,例如,国际公开No.WO 86/05807和WO 89/01036;和U.S.专利No.5,122,464,其通过引用全文合并于此),和抗体的可变区可以克隆到这样的载体中用于表达整个重链、整个轻链或整个重链和轻链两者。

[0330] 表达载体可以通过常规技术转移到细胞(例如,宿主细胞)且所得细胞然后通过常规技术培养以产生本文所述的抗体或其片段。因此,本文提供了包含编码本文所述的抗体或其片段,或者其重链或轻链或其片段,或者本文所述的单链抗体的多核苷酸的宿主细胞,该多核苷酸与用于在宿主细胞中表达这样的序列的启动子可操作地连接。在某些实施方式中,为了表达双链抗体,单独地编码重链和轻链两者的载体可以在宿主细胞中共表达以表达整个免疫球蛋白分子,如以下详述的。在某些实施方式中,宿主细胞包含本文所述的抗体或其片段的重链和轻链两者的多核苷酸。在特定的实施方式中,宿主细胞包含两个不同的载体,第一载体包含编码本文所述的抗体或其片段的重链或重链可变区的多核苷酸,和第二载体包含编码本文所述的抗体或其片段的轻链或轻链可变区的多核苷酸。在其它实施方式中,第一宿主细胞包含含有编码本文所述的抗体或其片段的重链或重链可变区的多核苷酸的第一载体和第二宿主细胞包含含有编码本文所述的抗体或其片段的轻链或轻链可变区的多核苷酸的第二载体。在特定的实施方式中,由第一细胞表达的重链/重链可变区与第二细胞的轻链/轻链可变区结合以形成本文所述的抗-PD-1抗体。在某些实施方式中,本文提供了包含这样的第一宿主细胞和这样的第二宿主细胞的宿主细胞群体。

[0331] 在特定的实施方式中,本文提供包含含有编码本文所述的抗-PD-1抗体的轻链/轻链可变区的多核苷酸的第一载体和含有编码本文所述的抗-PD-1抗体的重链/重链可变区的多核苷酸的第二载体的载体群体。

[0332] 多种宿主-表达载体系统可以用于表达本文所述的抗体分子(参见,例如,U.S.专利No.5,807,715,其通过引用全文合并于此)。这样的宿主-表达系统代表目标编码序列可以通过其产生并随后纯化的媒介,但也代表在用适宜的核苷酸编码序列转化或转染时可以原位表达本文所述的抗体分子的细胞。这些包括但不限于微生物,如用包含抗体编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的细菌(例如,大肠杆菌和枯草芽孢杆菌);用包含抗体编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如,毕赤酵母);用包含抗体编码序列的重组病毒表达载体(例如,杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用重组病毒表达载体(例如,花椰菜花叶病毒,CaMV;烟草花叶病毒,TMV)感染的或用包含抗体编码序列的重组质粒表达载体(例如,Ti质粒)转化的植物细胞系统(例如,绿藻如莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*));或携带包含源自哺乳动物细胞基因组的启动子(例如,金属硫蛋白启动子)或源自哺乳动物病毒的启动子(例如,腺病毒晚期启动子;牛痘病毒7.5K启动子)的重组表达构建体的哺乳动物细胞系统(例如,COS(例如,COS1或COS)、CHO、BHK、MDCK、HEK 293、NS0、PER.C6、VERO、CRL7030、HsS78Bst、HeLa和NIH 3T3、HEK-293T、HepG2、SP210、R1.1、B-W、L-M、BSC1、BSC40、YB/20和BMT10细胞)。在具体的实施方式中,用于表达本文所述的抗体的细胞是CHO细胞,例如来自CHO GS System™(Lonza)的CHO细胞。在特定的实施方式中,用于表达本文所述的抗体的细胞是人细胞,例如,人细胞系。在具体的实施方式中,哺乳动物表达载体是pOptiVEC™或pcDNA3.3。在特定的实施方式中,尤其用于表达完整重组抗体分子的细菌细胞如大肠杆菌或真核细胞(例如,哺乳动物细胞)用于重组抗体分子的表达。例如,与载体如来自人巨细胞病毒的主要中早期基因启动子元件结合的哺乳动物细胞如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞是抗体的有效表达系统(Foecking MK&Hofstetter H(1986) Gene 45:101-5;和Cockett MI等,(1990) Biotechnology 8(7):662-7,其各自通过引用全文合并于此)。在某些实施方式中,本文所述的抗体通过CHO细胞或NS0细胞产生。在具体的实施方式中,编码本文所述的抗体(其特异性地结合PD-1(例如,人PD-1))的核苷酸序列的表达通过组成型启动子、诱导型启动子或组织特异性启动子调节。

[0333] 在细菌系统中,多种表达载体可以有利地根据所表达抗体分子预期的用途来选择。例如,当待产生大量的这种抗体用于生成抗体分子的药物组合物时,指导容易纯化的融合蛋白产物的高水平表达的载体可能是希望的。这样的载体包括,但不限于大肠杆菌表达载体pUR278(Ruether U&Mueller-Hill B(1983) EMBO J 2:1791-1794),其中抗体编码序列可以单独地与lac Z编码区同框连接到载体中,使得产生融合蛋白;pIN载体(Inouye S&Inouye M(1985) Nuc Acids Res 13:3101-3109;Van Heeke G&Schuster SM(1989) J Biol Chem 24:5503-5509);等等,其全部通过引用全文合并于此。例如,pGEX载体也可以用于表达作为与谷胱甘肽5-转移酶(GST)的融合蛋白的外源多肽。一般地,这样的融合蛋白是可溶性的且可以容易地通过吸附和结合于基质谷胱甘肽琼脂糖珠从裂解的细胞纯化,接着在游离谷胱甘肽的存在下稀释。pGEX载体设计为包括凝血酶或因子Xa蛋白酶切割位点以使得克隆的靶基因产物可以从GST部分释放。

[0334] 在昆虫系统中,例如,苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*)核多角体病毒(AcNPV)可以用作表达外源基因的载体。病毒在草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞中生长。抗体编码序列可以单独地克隆到病毒的非必需区(例如多角体基因)中并置于AcNPV启动子(例如多角体启动子)的控制下。

[0335] 在哺乳动物宿主细胞中,可以使用多种基于病毒的表达系统。在其中腺病毒用作表达载体的情况中,目标抗体编码序列可以连接到腺病毒转录/翻译控制复合体,例如,晚期启动子和三联体前导序列。这一嵌合基因然后可以通过体外或体内重组插入到腺病毒基因组中。病毒基因组的非必需区(例如,E1或E3区)中的插入将产生有活力的且能够在感染的宿主中表达抗体分子的重组病毒(例如,参见Logan J&Shenk T(1984)PNAS 81(12):3655-9,其通过引用全文合并于此)。特定的启动信号也可以是插入的抗体编码序列的高效翻译所需的。这些信号包括ATG启动密码子和相邻序列。此外,启动密码子必须与所需编码序列的阅读框同相以确保整个插入片段的翻译。这些外源翻译控制信号和启动密码子可以具有多种来源,天然的和合成的。表达的效率可以通过包括适宜的转录增强子元件、转录终止子等增强(参见,例如,Bitter G等,(1987)Methods Enzymol.153:516-544,其通过引用全文合并于此)。

[0336] 另外,可以选择调节插入序列的表达或者以所需的特定方式修饰和加工基因产物的宿主细胞株。蛋白质产物的这样的修饰(例如,糖基化)和加工(例如,切割)对于蛋白质的功能可能是重要的。不同的宿主细胞具有用于蛋白质和基因产物的翻译后加工和修饰的特征性的和特定的机制。适宜的细胞系或宿主系统可以选择为确保所表达的外源蛋白的正确修饰和加工。为此目的,可以使用具有用于初级转录物的适当加工、糖基化和基因产物的磷酸化的细胞机制的真核宿主细胞。这样的哺乳动物宿主细胞包括,但不限于CHO、VERO、BHK、Hela、MDCK、HEK 293、NIH 3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20和T47D、NS0(不内源地产生任何免疫球蛋白链的鼠骨髓瘤细胞系)、CRL7030、COS(例如,COS1或COS)、PER.C6、VERO、HsS78Bst、HEK-293T、HepG2、SP210、R1.1、B-W、L-M、BSC1、BSC40、YB/20、BMT10和HsS78Bst细胞。在某些实施方式中,本文所述的抗-PD-1抗体在哺乳动物细胞,如CHO细胞中产生。

[0337] 在具体的实施方式中,本文所述的抗体具有降低的岩藻糖含量或没有岩藻糖含量。这样的抗体可以使用本领域技术人员已知的技术产生。例如,抗体可以在岩藻糖化能力缺陷或缺乏的细胞中表达。在具体的实例中,敲除 α 1,6-岩藻糖基转移酶的两个等位基因的细胞系可以用于产生具有降低的岩藻糖含量的抗体。**Potelligent[®]**系统(Lonza)是可以用于产生具有降低的岩藻糖含量的抗体的这种系统的实例。

[0338] 对于重组蛋白的长期、高产率的生产,可以生成稳定的表达细胞。例如,可以生成稳定地表达本文所述的抗-PD-1抗体的细胞系。在特定的实施方式中,本文提供的细胞稳定地表达轻链/轻链可变区和重链/重链可变区,其结合以形成本文所述的抗体。

[0339] 在某些方面中,替代使用包含病毒复制起点的表达载体,宿主细胞可以用通过适宜的表达控制元件(例如,启动子、增强子、序列、转录终止子、多腺苷酸化位点等)和选择标记控制的DNA转化。在引入外源DNA/多核苷酸后,工程化细胞可以允许在富集培养基中生长1-2天,和然后切换到选择培养基。重组质粒中的选择标记赋予对选择的抗性且允许细胞稳定地整合质粒到其染色体中和生长以形成基因座,其随后可以克隆和扩增到细胞系中。这一方法可以有利地用于使表达本文所述的抗-PD-1抗体或其片段的细胞系工程化。这样的工程化细胞系可以特别地用于筛选和评价直接或间接地与抗体分子相互作用的组合物。

[0340] 可以使用多种选择系统,包括但不限于分别地tk-、hgprt-或aprt-细胞中的单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler M等,(1977)Cell 11(1):223-32)、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(Szybalska EH&Szybalski W(1962)PNAS 48(12):2026-2034)和腺嘌呤磷酸核糖基

转移酶 (Lowy I 等, (1980) Cell 22 (3):817-23), 其全部通过引用全文合并于此。而且, 抗代谢物抗性可以用作对于以下基因的选择基础: dhfr, 其赋予对甲氨喋呤的抗性 (Wigler M 等, (1980) PNAS 77 (6):3567-70; O'Hare K 等, (1981) PNAS 78:1527-31); gpt, 其赋予对霉酚酸的抗性 (Mulligan RC & Berg P (1981) PNAS 78 (4):2072-6); neo, 其赋予对氨基糖苷 G-418 的抗性 (Wu GY & Wu CH (1991) Biotherapy 3:87-95; Tolstoshev P (1993) Ann Rev Pharmacol Toxicol 32:573-596; Mulligan RC (1993) Science 260:926-932; 和 Morgan RA & Anderson WF (1993) Ann Rev Biochem 62:191-217; Nabel GJ & Felgner PL (1993) Trends Biotechnol 11 (5):211-5); 和 hygromycin, 其赋予对潮霉素的抗性 (Santerre RF 等, (1984) Gene 30 (1-3):147-56), 其全部通过引用全文合并于此。重组 DNA 技术领域通常已知的方法可以常规地应用于选择所需的重组克隆且这样的方法描述于, 例如, Ausubel FM 等, (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler M, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); 和第 12 和 13 章, Dracopoli NC 等, (eds.), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colbère-Garapin F 等, (1981) J Mol Biol 150:1-14 中, 其通过引用全文合并于此。

[0341] 抗体分子的表达水平可以通过载体扩增提高 (综述参见 Bebbington CR & Hentschel CCG, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Vol.3 (Academic Press, New York, 1987), 其通过引用全文合并于此)。当表达抗体的载体系统中的标记是可扩增的时, 宿主细胞培养物中存在的抑制剂水平的提高将增加标记基因的拷贝数。由于扩增的区域与抗体基因相关, 抗体的产生也增加 (Crouse GF 等, (1983) Mol Cell Biol 3:257-66, 其通过引用全文合并于此)。

[0342] 宿主细胞可以用本文所述的两种或更多种表达载体共转染, 第一载体编码重链衍生的多肽和第二载体编码轻链衍生的多肽。两个载体可以包含相同的选择标记, 这使得能够等同地表达重链和轻链多肽。宿主细胞可以用不同量的两种或更多种表达载体共转染。例如, 宿主细胞可以用以下比率中任一种的第一表达载体和第二表达载体转染: 1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:12、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45 或 1:50。

[0343] 或者, 可以使用编码且能够表达重链和轻链多肽两者的单一载体。在这样的情况中, 轻链应当置于重链之前以避免过量的毒性游离重链 (Proudfoot NJ (1986) Nature 322:562-565; 和 Köhler G (1980) PNAS 77:2197-2199, 其各自通过引用全文合并于此)。重链和轻链的编码序列可以包含 cDNA 或基因组 DNA。表达载体可以是单顺反子的或多顺反子的。多顺反子的核酸构建体可以编码 2、3、4、5、6、7、8、9、10 或更多个或者 2-5、5-10 或 10-20 的范围中的基因/核苷酸序列。例如, 双顺反子的核酸构建体可以按以下顺序包含启动子、第一基因 (例如, 本文所述的抗体的重链) 和第二基因 (例如, 本文所述的抗体的轻链)。在这样的表达载体中, 两个基因的转录可以通过该启动子驱动, 而来自第一基因的 mRNA 的翻译可以通过帽依赖性的扫描机制和来自第二基因的 mRNA 的翻译可以通过非帽依赖性的机制, 例如, 通过 IRES。

[0344] 一旦本文所述的抗体分子已经通过重组表达产生, 它可以通过本领域已知用于免

疫球蛋白分子纯化的任何方法进行纯化,例如,通过色谱(例如,离子交换色谱、亲和色谱,特别是通过对于蛋白A后的特定抗原的亲和力、和胶柱(sizing column)色谱)、离心、差异溶解性或通过任何其它用于蛋白质纯化的标准技术。此外,本文所述的抗体可以与本文所述的或本领域中另外已知的异源多肽序列融合以促进纯化。

[0345] 在特定的实施方式中,本文所述的抗体是分离或纯化的。通常,分离的抗体是基本上不含具有与分离的抗体不同的抗原特异性的其它抗体的抗体。例如,在特定的实施方式中,本文所述的抗体的制备物基本上不含细胞物质和/或化学前体。表述“基本上不含细胞物质”包括其中抗体与它从其中分离或重组产生的细胞的细胞组分分离的抗体制备物。因此,基本上不含细胞物质的抗体包括具有少于约30%、20%、10%、5%、2%、1%、0.5%或0.1%(以干重计)的异源蛋白质(本文中也称为“污染蛋白质”)的抗体和/或抗体的变体,例如,抗体的不同翻译后修饰的形式或抗体的其它不同形式(例如,抗体片段),的制备物。当抗体重组产生时,它一般也基本上不含培养基,即,培养基占蛋白质制备物体积的少于约20%、10%、2%、1%、0.5%或0.1%。当抗体通过化学合成产生时,它一般基本上不含化学前体或其它化学品,即,它与参与蛋白质合成的化学前体或其它化学品分离。因此,这样的抗体制备物具有少于约30%、20%、10%或5%(以干重计)的化学前体或目标抗体以外的化合物。在具体的实施方式中,本文所述的抗体是分离或纯化的。

[0346] 特异性地结合PD-1(例如,人PD-1)的抗体或其片段可以通过本领域中已知用于抗体的合成的任何方法产生,例如,通过化学合成或通过重组表达技术。除非另外指明,本文所述的方法采用分子生物学、微生物学、遗传分析、重组DNA、有机化学、生物化学、PCR、寡核苷酸合成和修饰、核酸杂交及现有技术的相关领域中的常规技术。这些技术描述于,例如,本文中引用的参考文献中且在文献中完全说明。参见,例如,Maniatis T等,(1982) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J等,(1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J等,(2001) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM等, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons (1987 and annual updates); *Current Protocols in Immunology*, John Wiley & Sons (1987 and annual updates) Gait (ed.) (1984) *Oligonucleotide Synthesis: A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein (ed.) (1991) *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach*, IRL Press; Birren B等, (eds.) (1999) *Genome Analysis: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press,其全部通过引用全文合并于此。

[0347] 在具体的实施方式中,本文所述的抗体是通过涉及DNA序列的生成(例如,经由合成)、遗传工程的任何方式制备、表达、生成或分离的抗体(例如,重组抗体)。在某些实施方式中,这样的抗体包含不天然存在于动物或哺乳动物(例如,人)体内的抗体种系库内的序列(例如,DNA序列或氨基酸序列)。

[0348] 在一个方面,本文提供了制备特异性地结合PD-1(例如,人PD-1)的抗体的方法,包括培养本文所述的细胞或宿主细胞。优选地,该方法体外进行。在特定的方面中,本文提供了产生特异性结合PD-1(例如,人PD-1)的抗体的方法,包括使用本文所述的细胞或宿主细胞(例如,包含编码本文所述的抗体的多核苷酸的细胞或宿主细胞)表达(例如,重组表达)

抗体。在特定的实施方式中,细胞是分离的细胞。在特定的实施方式中,外源多核苷酸已经被引入细胞中。在特定的实施方式中,该方法进一步包括纯化从细胞或宿主细胞获得的抗体的步骤。

[0349] 用于产生多克隆抗体的方法中是本领域中已知的(参见,例如,Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5th Ed.,第11章,Ausubel FM等,eds.,John Wiley and Sons,New York,其通过引用全文合并于此)。

[0350] 单克隆抗体可以使用本领域中已知的多种多样的技术制备,包括使用杂交瘤、重组体和噬菌体展示技术,或其组合。例如,单克隆抗体可以使用杂交瘤技术产生,包括本领域中已知的和,例如,在Harlow E&Lane D,Antibodies:A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press,2nd ed.1988);Hammerling GJ等,in:Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563 681 (Elsevier,N.Y.,1981) (其各自通过引用全文合并于此)中教导的那些。如本文中使用的术语“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。例如,单克隆抗体可以从外源表达本文所述的抗体或其片段,例如,这种抗体的轻链和/或重链,的宿主细胞重组产生。

[0351] 在具体的实施方式中,如本文中使用的“单克隆抗体”是通过单一细胞(例如,产生重组抗体的杂交瘤或宿主细胞)产生的抗体,其中抗体特异性地结合PD-1(例如,人PD-1),例如,通过ELISA或本领域中已知的或本文提供的实施例中的其它抗原结合或竞争结合分析测定的。在特定的实施方式中,单克隆抗体可以是嵌合抗体或人源化抗体。在某些实施方式中,单克隆抗体是单价抗体或多价(例如,二价)抗体。在特定的实施方式中,单克隆抗体是单特异性的或多特异性的抗体(例如,双特异性抗体)。例如,本文所述的单克隆抗体可以,例如,通过如Kohler G&Milstein C (1975) Nature 256:495 (其通过引用全文合并于此)中所述的杂交瘤方法产生,或可以例如,使用本文所述的技术从噬菌体文库分离。用于制备克隆细胞系和由此表达的单克隆抗体的其它方法是本领域中公知的(参见,例如,Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5th Ed.,第11章,Ausubel FM等,同上)。

[0352] 使用杂交瘤技术产生和筛选特异性抗体的方法是常规的和本领域中公知的。例如,在杂交瘤方法中,小鼠或其它适宜的宿主动物如绵羊、山羊、兔、大鼠、仓鼠或猕猴被免疫以诱导产生或能够产生特异性地结合用于免疫的蛋白质(例如,PD-1(例如,人PD-1))的抗体的淋巴细胞。或者,淋巴细胞可以在体外进行免疫。淋巴细胞然后使用合适的融合剂如聚乙二醇与骨髓瘤细胞融合以形成杂交瘤细胞(Goding JW (Ed), Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press,1986),在此处通过引用全文并入)。另外,RIMMS(多位点重复免疫)技术可以用于免疫动物(Kilpatrick KE等,(1997) Hybridoma 16:381-9,在此处通过引用全文并入)。

[0353] 在一些实施方式中,小鼠(或其它动物,如大鼠、猴、驴、猪、绵羊、仓鼠或狗)可以用抗原(例如,PD-1(例如,人PD-1))免疫且一旦检测到免疫反应,例如,对于该抗原特异性的抗体在小鼠血清中检测到,则收获小鼠脾脏并分离脾细胞。脾细胞然后通过公知的技术与任何合适的骨髓瘤细胞融合,例如可从American Type Culture Collection(ATCC®) (Manassas,VA)获得的细胞系SP20的细胞,以形成杂交瘤。选择杂交瘤并通过有限的稀释进行克隆。在某些实施方式中,收获免疫小鼠的淋巴结并与NS0骨髓瘤细胞融合。

[0354] 如此制备的杂交瘤细胞在优选包含抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞的生长或存活

的一种或多种物质的合适培养基中接种和生长。例如,如果亲本骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT或HPRT),用于杂交瘤的培养基通常包括次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸苷(HAT培养基),这些物质阻止HGPRT-缺陷细胞的生长。

[0355] 特定的实施方式采用高效地融合,支持所选择的抗体-产生细胞的稳定高水平抗体产生和对如HAT培养基的培养基敏感的骨髓瘤细胞。在这些骨髓瘤细胞系中有鼠骨髓瘤系,如NS0细胞系或可从Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CA, USA获得的源自MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤的那些,及可从American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA获得的SP-2或X63-Ag8.653细胞。人骨髓瘤和小鼠-人杂交骨髓瘤细胞系也已经描述用于产生人单克隆抗体(Kozbor D(1984) J Immunol 133:3001-5; Brodeur等, Monoclonal Antibodies Production Techniques and Applications, pp.51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987), 其各自通过引用全文合并于此)。

[0356] 杂交瘤细胞在其中生长的培养基测定针对PD-1(例如,人PD-1)的单克隆抗体的产生。通过杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性通过本领域中已知的方法(例如,免疫沉淀)或通过体外结合分析如放射免疫分析(RIA)或酶联免疫吸附分析(ELISA)测定。

[0357] 在鉴定产生具有所需特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后,克隆可以通过有限稀释过程亚克隆并通过标准方法生长(Goding JW (Ed), Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 同上)。用于这一目的的合适的培养基包括,例如,D-MEM或RPMI 1640培养基。另外,杂交瘤细胞可以在动物中作为腹水瘤在体内生长。

[0358] 通过亚克隆分泌的单克隆抗体通过常规免疫球蛋白纯化过程如,例如,蛋白A琼脂糖、羟基磷灰石色谱、凝胶电泳、透析或亲和色谱从培养基、腹水或血清适当地分离。

[0359] 本文所述的抗体包括识别特定PD-1(例如,人PD-1)的抗体片段且可以通过本领域技术人员已知的任何技术产生。例如,本文所述的Fab和F(ab')₂片段可以使用如木瓜蛋白酶(以产生Fab片段)或胰蛋白酶(以产生F(ab')₂片段)的酶通过免疫球蛋白分子的蛋白水解切割产生。Fab片段对应于抗体分子的两个相同臂之一且包含与重链的VH和CH1域配对的完整轻链。F(ab')₂片段包含通过铰链区中的二硫键连接的抗体分子的两个抗原结合臂。

[0360] 此外,本文所述的抗体还可以使用本领域中已知的各种噬菌体展示方法产生。在噬菌体展示方法中,功能性抗体结构域展示在携带编码它们的多核苷酸序列的噬菌体颗粒的表面上。特别地,编码VH和VL域的DNA序列从动物cDNA文库(例如,受影响的组织的人或鼠cDNA文库)扩增。编码VH和VL域的DNA通过PCR与scFv接头重组在一起并克隆到噬粒载体中。载体电穿孔到大肠杆菌中且大肠杆菌用辅助噬菌体感染。用于这些方法中的噬菌体通常是丝状噬菌体,包括fd和M13,且VH和VL域通常与噬菌体基因III或基因VIII重组融合。可以用抗原选择或鉴定表达与特定抗原结合的抗原结合结构域的噬菌体,例如,使用标记的抗原或者结合或捕获到固体表面或珠的抗原。可以用于制备本文所述的抗体的噬菌体展示方法的实例包括Brinkman U等,(1995) J Immunol Methods 182:41-50; Ames RS等,(1995) J Immunol Methods 184:177-186; Kettleborough CA等,(1994) Eur J Immunol 24:952-958; Persic L等,(1997) Gene 187:9-18; Burton DR&Barbas CF(1994) Advan Immunol 57:191-280; PCT申请No. PCT/GB91/001134; 国际公开No. WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/1 1236, WO 95/15982, WO 95/20401和WO 97/13844; 及U.S. 专利No. 5,698,426, 5,223,409, 5,403,484, 5,580,717, 5,427,908, 5,750,753, 5,821,047, 5,

571,698,5,427,908,5,516,637,5,780,225,5,658,727,5,733,743和5,969,108中公开的那些,其全部通过引用全文合并于此。

[0361] 如上述文献中描述的,在噬菌体选择后,来自噬菌体的抗体编码区可以分离并用于产生全抗体,包括人抗体,或任何其它所需的抗原结合片段,且在任何所需的宿主中表达,包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母和细菌,例如,如以下所述的。重组产生抗体片段如Fab、Fab' 和F(ab')₂片段的技术也可以使用本领域中已知的方法来利用,如PCT公开No.WO 92/22324;Mullinax RL等,(1992) BioTechniques 12(6):864-9;Sawai H等,(1995) Am J Reprod Immunol 34:26-34;和Better M等,(1988) Science 240:1041-1043中公开的那些方法,其全部通过引用全文合并于此。

[0362] 在某些实施方式中,为生成全抗体,包括VH或VL核苷酸序列、限制性位点和保护限制性位点的侧翼序列的PCR引物可以用于从模板(例如,scFv克隆)扩增VH或VL序列。利用本领域技术人员已知的克隆技术,PCR扩增的VH域可以克隆到表达VH恒定区的载体中,且PCR扩增的VL域可以克隆到表达VL恒定区(例如,人κ或λ恒定区)的载体中。VH和VL域也可以克隆到表达必要恒定区的一个载体中。重链转化载体和轻链转化载体然后使用本领域技术人员已知的技术共转染到细胞系中以产生表达全长抗体(例如,IgG)的稳定或瞬时细胞系。

[0363] 嵌合抗体是其中抗体的不同部分源自不同免疫球蛋白分子的分子。例如,嵌合抗体可以包含与人抗体的恒定区融合的小鼠或大鼠单克隆抗体的可变区。用于产生嵌合抗体的方法是本领域中已知的。参见,例如,Morrison SL(1985) Science 229:1202-7;Oi VT& Morrison SL(1986) BioTechniques 4:214-221;Gillies SD等,(1989) J Immunol Methods 125:191-202;及U.S.专利No.5,807,715,4,816,567,4,816,397和6,331,415,其全部通过引用全文合并于此。

[0364] 人源化抗体能够结合预定的抗原且其包含具有基本上人免疫球蛋白的氨基酸序列的框架区和具有基本上非-人免疫球蛋白(例如,鼠免疫球蛋白)的氨基酸序列的CDR。在特定的实施方式中,人源化抗体也包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常人免疫球蛋白的恒定区。抗体也可以包括重链的CH1、铰链、CH2、CH3和CH4区。人源化抗体可以选自任何类别的免疫球蛋白,包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE,和任何同种型,包括IgG₁、IgG₂、IgG₃和IgG₄。人源化抗体可以使用本领域中已知的多种技术产生,包括但不限于,CDR-移植(欧洲专利No.EP 239400;国际公开No.WO 91/09967;和U.S.专利No.5,225,539,5,530,101和5,585,089)、镶嵌(veneering)或表面重塑(resurfacing)(欧洲专利No.EP 592106和EP 519596;Padlan EA(1991) Mol Immunol 28(4/5):489-498;Studnicka GM等,(1994) Prot Engineering 7(6):805-814;和Roguska MA等,(1994) PNAS 91:969-973)、链改组(U.S.专利No.5,565,332),及例如,U.S.专利No.6,407,213,U.S.专利No.5,766,886,国际公开No.WO 93/17105;Tan P等,(2002) J Immunol 169:1119-25;Caldas C等,(2000) Protein Eng.13(5):353-60;Morea V等,(2000) Methods 20(3):267-79;Baca M等,(1997) J Biol Chem 272(16):10678-84;Roguska MA等,(1996) Protein Eng 9(10):895-904;Couto JR等,(1995) Cancer Res.55(23Supp):5973s-5977s;Couto JR等,(1995) Cancer Res 55(8):1717-22;Sandhu JS(1994) Gene 150(2):409-10和Pedersen JT等,(1994) J Mol Biol 235(3):959-73(其全部通过引用全文合并于此)中公开的技术。也参见U.S.申请公开No.US 2005/0042664A1 (Feb.24,2005),其通过引用全文并入本文中。

[0365] 用于制备多特异性(例如,双特异性)抗体的方法已经被描述,参见,例如,U.S.专利No.7,951,917;7,183,076;8,227,577;5,837,242;5,989,830;5,869,620;6,132,992和8,586,713,其全部通过引用全文合并于此。

[0366] 单域抗体,例如,缺乏轻链的抗体,可以通过本领域中公知的方法产生。参见Riechmann L&Muyldermans S(1999) J Immunol 231:25-38;Nuttall SD等,(2000) Curr Pharm Biotechnol 1(3):253-263;Muyldermans S,(2001) J Biotechnol 74(4):277-302;U.S.专利No.6,005,079;和国际公开No.WO 94/04678,WO 94/25591和W001/44301,其全部通过引用全文合并于此。

[0367] 此外,特异性地结合PD-1抗原的抗体随之可以用于使用本领域技术人员公知的技术生成“模拟”抗原的抗-独特型抗体(参见,例如,Greenspan NS&Bona CA(1989) FASEB J 7(5):437-444;和Nissinoff A(1991) J Immunol 147(8):2429-2438,其各自通过引用全文合并于此)。

[0368] 在特定的实施方式中,与本文所述的抗-PD-1抗体结合相同的PD-1(例如,人PD-1)的表位的本文所述的抗体是人抗体。在特定的实施方式中,竞争地阻断(例如,以剂量依赖性的方式)任何一种本文所述的抗体与PD-1(例如,人PD-1)的结合的本文所述的抗体是人抗体。人抗体可以使用本领域中已知的任何方法产生。例如,可以使用不能够表达功能性内源免疫球蛋白但可以表达人免疫球蛋白基因的转基因小鼠。特别地,人重链和轻链免疫球蛋白基因复合体可以随机地或通过同源重组引入到小鼠胚胎干细胞中。或者,除人重链和轻链基因外,人可变区、恒定区和多变区可以引入小鼠胚胎干细胞中。与通过同源重组的人免疫球蛋白基因座的引入独立地或同时地,小鼠重链和轻链免疫球蛋白基因可以赋予非功能性。特别地, J_H 区的纯合删除防止内源抗体的产生。修饰的胚胎干细胞被扩增并微量注射到囊胚中以产生嵌合小鼠。嵌合小鼠然后可以繁殖以产生表达人抗体的纯合后代。转基因小鼠用选择的抗原,例如,抗原(例如,PD-1)的全部或一部分以正常方式进行免疫。针对抗原的单克隆抗体可以使用常规杂交瘤技术从免疫的转基因小鼠获得。转基因小鼠携带的人免疫球蛋白转基因在B细胞分化过程中重排,并随后发生类别转换和体细胞突变。因此,使用这样的技术,有可能产生治疗上有用的IgG、IgA、IgM和IgE抗体。对于用于产生人抗体的这一技术的综述,参见Lonberg N&Huszar D(1995) Int Rev Immunol 13:65-93,在此处通过引用全文并入。对于用于产生人抗体和人单克隆抗体的这一技术和用于产生这样的抗体的方案的详细讨论,参见,例如,国际公开No.WO 98/24893,WO 96/34096和WO 96/33735;和U.S.专利No.5,413,923,5,625,126,5,633,425,5,569,825,5,661,016,5,545,806,5,814,318和5,939,598,其全部通过引用全文合并于此。能够产生人抗体的小鼠的实例包括XenomouseTM(Abgenix, Inc.; U.S.专利No.6,075,181和6,150,184)、HuAb-MouseTM(Mederex, Inc./Gen Pharm; U.S.专利No.5,545,806和5,569,825)、Trans Chromo MouseTM(Kirin)和KM MouseTM(Medarex/Kirin),其全部通过引用全文合并于此。

[0369] 特异性地结合PD-1(例如,人PD-1)的人抗体可以通过本领域中已知的多种方法制备,包括使用源自人免疫球蛋白序列的抗体文库的上述噬菌体展示方法。也参见U.S.专利No.4,444,887,4,716,111和5,885,793;及国际公开No.WO 98/46645,WO 98/50433,WO 98/24893,WO 98/16654,WO 96/34096,WO 96/33735和WO 91/10741,其全部通过引用全文合并于此。

[0370] 在一些实施方式中,人抗体可以使用小鼠-人杂交瘤产生。例如,用Epstein-Barr病毒(EBV)转化的人外周血淋巴细胞可以与小鼠骨髓瘤细胞融合以产生分泌人单克隆抗体的小鼠-人杂交瘤,且这些小鼠-人杂交瘤可以进行筛选以确定分泌特异性地结合靶抗原(例如,PD-1(例如,人PD-1))的人单克隆抗体的小鼠-人杂交瘤。这样的方法是已知的且描述于本领域中,参见,例如,Shinmoto H等,(2004) Cytotechnology 46:19-23;Naganawa Y等,(2005) Human Antibodies 14:27-31,其各自通过引用全文合并于此。

[0371] 5.6试剂盒

[0372] 还提供了包含一种或多种本文所述的抗体,或者其药物组合物或偶联物的试剂盒。在具体的实施方式中,本文提供了包含填充本文所述的药物组合物的一种或多种成分,如本文提供的一种或多种抗体的一个或多个容器的药物包装或试剂盒。在一些实施方式中,试剂盒包含本文所述的药物组合物和任何预防或治疗剂,如本文所描述的那些。在某些实施方式中,试剂盒可以包含T-细胞丝裂原,如例如,植物血凝素(PHA)和/或乙酸肉豆蔻酸佛波醇酯(PMA),或者TCR复合物刺激的抗体,如抗-CD3抗体和抗-CD28抗体。任选地与这样的容器结合的可以是管理药物或生物学产品的制造、使用和销售由政府机构规定的形式的通告,该通告反映了政府机构对于制造、使用和销售用于人施用的批准。

[0373] 还提供了可以用于上述方法的试剂盒。在一个实施方式中,试剂盒包含一个或多个容器中的本文所述的抗体,优选纯化的抗体。在具体的实施方式中,本文所述的试剂盒包含作为对照的基本上分离的PD-1抗原(例如,人PD-1)。在另一具体的实施方式中,本文所述的试剂盒还包含不与PD-1抗原反应的对照抗体。在另一具体的实施方式中,本文所述的试剂盒包含用于检测抗体与PD-1抗原的结合的一个或多个元素(例如,抗体可以与可检测的基质如荧光化合物、酶底物、放射性化合物或发光化合物偶联,或者识别第一抗体的第二抗体可以与可检测的基质偶联)。在特定的实施方式中,本文提供的试剂盒可以包括重组产生的或化学合成的PD-1抗原。试剂盒中提供的PD-1抗原也可以附接于固体支持物。在更具体的实施方式中,上述试剂盒的检测手段包括PD-1抗原附接于其上的固体支持物。这样的试剂盒还可以包括非附接的报告体标记的抗-人抗体或抗-小鼠/大鼠抗体。在这一实施方式中,抗体与PD-1抗原的结合可以通过所述报告体标记的抗体的结合来检测。在一个实施方式中,本发明涉及本发明的试剂盒用于体外测定和/或检测生物样品中的PD-1抗原(人PD-1)的用途。

[0374] 6. 实施例

[0375] 本章节(即,第6节)中的实施例通过举例说明来提供,而不是通过限制的方式。

[0376] 6.1实施例1:抗-PD-1抗体的表征

[0377] 本实施例描述了特异性地结合人PD-1的抗体,特别地命名为AGEN2033w、AGEN2034w、AGEN2046w和AGEN2047w的抗体的表征。AGEN2033w和AGEN2046w共有相同的重链可变区氨基酸序列(SEQ ID NO:15)和相同的轻链可变区氨基酸序列(SEQ ID NO:16)。AGEN2034w和AGEN2047w共有相同的重链可变区氨基酸序列(SEQ ID NO:17)和相同的轻链可变区氨基酸序列(SEQ ID NO:16)。AGEN2033w和AGEN2034w是包含按照EU编号系统的S228P突变(即相对于野生型IgG₄恒定区在位置228处丝氨酸被脯氨酸置换)的人IgG₄抗体,而AGEN2046w和AGEN2047w是人IgG₁抗体。另外,也表征了AGEN2047w的三个Fc突变体:按照EU编号系统编号的N297A突变体、S267E/L328F双重突变体和S239D/A330L/I332E三重突变

体。

[0378] 6.1.1抗体与激活的T细胞表达的PD-1的结合

[0379] 通过流式细胞术检验抗-PD-1抗体AGEN2046w、AGEN2047w和AGEN2034w与激活的外周血单核细胞(PBMC)的结合。从未纯化的血沉棕黄层制备的冷冻保存的人PBMC(Research Blood Components,Catalog number (Cat#) 002)或冷冻保存的食蟹猴PBMC(Worldwide Primates Inc.,定制的)在96-孔NUNC LON delta表面平板(NUNC™)中以 10^5 细胞/孔在补充有Normocin™(InvivoGen,Cat#ant-nr-1)和10%热灭活FBS(Gibco,Cat#16140063)的RPMI1640培养基中接种。细胞在37℃、5%CO₂和97%湿度下在100ng/ml的葡萄球菌肠毒素A(SEA;对于人PBMC)(Toxin Technologies,Cat#at101red)或葡萄球菌肠毒素B(SEB;对于食蟹猴PBMC)(Toxin Technology,Cat#bt202red)存在下培养5天。细胞然后用样品缓冲液(PBS+2%FBS+0.09%叠氮化钠)洗涤一次并在黑暗中的冰上与100μl系列稀释的抗体或同种型对照(10、1、0.1、0.01、0.001和0.0001μg/ml的AGEN2046w、AGEN2047w或人IgG₁同种型对照(LifeTein LLC,Cat#LT12031);或者25、5、1、0.2、0.04、0.008、0.0016、0.00032和0.000064μg/ml的AGEN2034w或人IgG₄同种型对照(LifeTein LLC,Cat#LT12034))一起孵育。在45分钟后,细胞用样品缓冲液洗涤两次并与LIVE/DEAD® Fixable Near-IR Dead Cell Stain(Life Technologies,Cat#L10119)、CD4-BV421(Biolegend,Cat#317434)和山羊F(ab')₂抗-人IgG+A+M,R-PE(Life Technologies,Cat#AHI1707)孵育30分钟。细胞用样品缓冲液洗涤两次并然后重悬于样品缓冲液中和用FACS Fortessa cytometer(Becton Dickinson)进行分析。选通CD4+T细胞并记录平均荧光强度(MFI)。

[0380] 抗-PD-1抗体AGEN2046w和AGEN2047w结合于激活的人CD4+T细胞(图1A)。AGEN2034w结合于激活的人和食蟹猴CD4+T细胞(图1B和1C)。

[0381] AGEN2034w与激活的原代人T细胞的结合再次在相同的分析法中测量。简言之,人PBMC在100ng/ml的SEA肽存在下培养5天和然后用系列稀释(50、10、2、0.4、0.080、0.016、0.0032、0.00064、0.000128、0.0000256、0.00000512和0.000001024μg/ml)的AGEN2034w或人IgG₄同种型对照染色。细胞用FACS Fortessa细胞计(Becton Dickinson)进行分析。选通CD4+T细胞并测定AGEN2034w-阳性细胞的平均荧光强度(MFI)。

[0382] 如图1D中所示,AGEN2034w结合激活的原代人CD4+T细胞。

[0383] 6.1.2PD-1抗体选择性分析

[0384] AGEN2034w对于PD-1的选择性使用悬浮阵列技术针对同源蛋白进行评估。

[0385] 基于其与PD-1的氨基酸序列同源性,Ig超家族蛋白roundabout同源物2(ROBO2)、B7同源物7(B7-H7)和信号调节蛋白γ(SIRP γ)选择用于使用悬浮阵列分析评价AGEN2034w的结合。ROBO2、B7-H7和SIRP γ通过应用Basic Local Alignment Search Tool(BLAST;NCBI)的蛋白质比对鉴定为PD-1的同源物。人PD-1与其同源物的序列同源性如下:人PD-1vs人ROBO2:27.9%;人PD-1vs人SIRP γ(SIRPG_HUMAN):24.8%;和人PD-1vs人B7-H7:22.6%。

[0386] 重组蛋白,人ROBO2-Fc嵌合体(R&D systems,Cat#3147-RB-050)、人B7-H7-Fc嵌合体(R&D systems,Cat#8084-B7-050)、人SIRP γ-His嵌合体(Sino Biologicals,Cat#11828-H08H)和人PD-1-Fc嵌合体(R&D systems,Cat#1086-PD)使用N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)酯化学作用与Luminex®微球(Luminex Corp,Cat#LC10005-01、LC10022-01、

LC10046-01、LC10048-01和LC10059-01) 偶联并与剂量滴定 (7.5、2.5、0.833、0.277、0.0926、0.0309、0.0103、0.0034、0.0011、0.0004、0.0001和0.00004 $\mu\text{g/ml}$) 的AGEN2034w孵育。然后添加用藻红蛋白 (PE) 标记的抗-人IgG抗体以检测AGEN2034w。结合通过 **Luminex[®]** 200检测系统评估。

[0387] 抗体AGEN2034w显示与人PD-1的特异性结合,且在测试的浓度下没有观察到与ROB02、B7-H7或SIRP γ 的显著结合 (图2)。

[0388] 6.1.3通过悬浮阵列技术测定的配体阻断活性

[0389] 为确定是否抗-PD-1抗体阻断配体PD-L1和PD-L2的结合,使用悬浮阵列技术进行分级分析设置 (ranking assay setup)。5 μl 分析缓冲液中的1200 **Luminex[®]** 珠 (Luminex Corp, Cat#48LC10014-48) 添加到96-孔半区域平板 (Corning, Inc., Cat#3884) 的各孔。珠通过与COOH珠表面的胺偶联与PD-1-Fc嵌合体 (R&D systems, Cat#1086-PD) 偶联。偶联反应使用50 $\mu\text{g/ml}$ 的PD-1抗原和 1×10^7 Luminex珠/ml进行。标准NHS酯化学作用用于形成抗原的伯胺基与珠表面上的羧基之间的碳二亚胺键 (Luminex Xmap指南第3章)。

[0390] 用于蛋白质的抗原偶联是简单的两步碳二亚胺过程,其中微球羧基首先在Sulfo-NHS (N-羟基琥珀酰亚胺) 存在下用EDC (1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基] 碳二亚胺盐酸盐) 试剂激活以形成sulfo-NHS-酯中间体。反应性中间体然后通过靶分子 (抗体, 蛋白质或肽) 的伯胺的反应取代以形成共价酰胺键。偶联的珠一式三份地用不同浓度的抗-PD-1抗体 (每孔7.5 $\mu\text{g/ml}$ -0.01 $\mu\text{g/ml}$ 的最终浓度) 在20 $^{\circ}\text{C}$ 和650rpm下孵育1小时。测试的抗体是AGEN2033w、AGEN2034w、AGEN2046w和AGEN2047w、IgG₁同种型对照和IgG₄同种型对照。之后, 30 μl 的R-PE标记的PD-L1-Fc (R&D Systems, Cat#156-B7) 或PD-L2-Fc (R&D Systems, Cat#1224-PL) 以1nM的浓度添加到各孔, 给出60 μl 的总孔体积 (1200珠/孔和0.5nM的标记PD-L1或PD-L2的终浓度)。配体的标记使用R-PE标记试剂盒 (AbDSerotec, LYNX Rapid RPE Antibody Conjugation Kit, Cat#LNK023RPE) 按照制造商的方案进行。平板使用 **Luminex[®]** 200系统 (Millipore) 进行分析。100个珠在50 μl 样品体积中每孔计数。配体阻断潜能使用仅配体对照的非竞争信号 (100%结合) 的MFI值计算。PE可检测信号表明与抗原的配体结合。

[0391] 所有测试的抗-PD-1抗体抑制PD-L1和PD-L2与PD-1的结合 (图3A-3D)。

[0392] AGEN2034w的配体阻断活性的测量在相似的分析法中重复。简言之, 重组PD-1-Fc嵌合体 (R&D systems, Cat#1086-PD) 使用N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS) 酯化学与 **Luminex[®]** 微球 (Luminex Corp, Cat#LC10048-01) 偶联。PD-1偶联的珠与剂量滴定 (4.0×10^{-5} -7.5 $\mu\text{g/ml}$) 的AGEN2034w或同种型对照抗体孵育, 接着荧光标记的PD-L1-Fc (R&D Systems, Cat#156-B7) 或PD-L2-Fc (R&D Systems, Cat#1224-PL) 的孵育。随后PD-L1或PD-L2与PD-1偶联的珠的结合使用 **Luminex[®]** 200检测系统评估并记录平均荧光强度 (MFI)。

[0393] 抗体AGEN2034w有效地阻断PD-1与其配体PD-L1 (图3E) 和PD-L2 (图3F) 的啮合。

[0394] 6.1.4抗-PD-1抗体对葡萄球菌肠毒素A (SEA) 刺激后的人PBMC的作用

[0395] 抗-PD-1抗体对原代人T细胞的功能活性在SEA刺激后评估。在补充有Normocin[™] (InvivoGen, Cat#ant-nr-1) 和10%热灭活FBS (Gibco, Cat#16140063) 的RPMI1640培养基中

以10⁵细胞/孔接种从未纯化的血沉棕黄层制备的冷冻保存的人PBMC (Research Blood Components, Catalog number (Cat#) 002) 在96-孔NUNC LON delta表面板 (NUNC™) 中。细胞在37℃、5%CO₂和97%湿度下在固定浓度 (10μg/ml) 或剂量范围量的抗体 (50、10、2、0.4、0.08、0.016和0.0032μg/ml) 和固定量的SEA (100ng/ml, Toxin Technology, Cat#at101red) 存在下培养5天。测试的抗体是AGEN2033w、AGEN2034w、AGEN2046w、AGEN2047w和IgG₁同种型对照。收集上清液并在-80℃下储存直到分析。IL-2的滴度通过电化学发光 (MSD) 测量。

[0396] 如图4A和4B中所示, 抗-PD-1抗体AGEN2033w、AGEN2034w、AGEN2046w和AGEN2047w相对于同种型对照在SEA刺激的存在下增加PBMC的IL-2产生。

[0397] 此外, AGEN2034w的拮抗活性单独地或与抗-CTLA-4、抗-TIGIT、抗-CD137或抗-0X40抗体组合在如上所述的原代PBMC分析中检验。简言之, 从未纯化的血沉棕黄层制备的冷冻保存的人PBMC (Research Blood Components, Cat#002) 在5μg/ml的抗-CTLA-4抗体伊匹单抗 (Myoderm) (图4C)、10μg/ml的抗-TIGIT抗体pab2197或pab2196 (图4D)、5μg/ml的抗-CD137抗体pab2225 (图4E) 或剂量范围 (12、6、3、0.3、0.03、0.003、0.0003和0.0001μg/ml) 的抗-0X40抗体pab1928存在或不存在的条件下用SEA超抗原 (Toxin Technology, Cat#at101red) (100ng/ml, 在图4C、4D和4F中; 200ng/ml, 在图4E中) 和AGEN2034w (10μg/ml, 在图4C和4E中; 5μg/ml, 在图4D中; 12、6、3、0.3、0.03、0.003、0.0003和0.0001μg/ml的剂量范围, 在图4F中) 或同种型对照抗体培养5天。收集上清液并使用AlphaLISA (Perkin Elmer, Cat#AL221C) 测量IL-2的滴度。抗-TIGIT抗体pab2197和pab2196分别基于抗体10A7和1F4的可变区序列产生, 其提供在U.S. 申请公开No. US2013/0251720中 (在此处通过引用全文并入)。抗-CD137抗体pab2225基于U.S. 专利No. 8, 137, 667 (在此处通过引用全文并入) 中提供的抗体20H4的可变区序列产生。抗-0X40抗体pab1928基于U.S. 专利公开No. US 2013/0280275 (在此处通过引用全文并入) 中提供的抗体Hu106-122的可变区序列产生。抗-TIGIT、抗-CD137和抗-0X40抗体的序列列于表8中。

[0398] 表8. 抗-TIGIT、抗-CD137和抗-0X40抗体的序列

[0399]

SEQ ID NO:	描述	氨基酸序列
66	pab2197 重链	EVQLVESGGGLTQPGKSLKLSCEASGFTFSSFTMHWVRQSPGKGLEW VAFIRSGSGIVFYADAVRGRFTISRDNAKNLLFLQMNDLKSEDTAMY

[0400]

		YCARRPLGHNTFDSWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
67	pab2197 轻链	DIVMTQSPSSSLAVSPGEKVTMTCKSSQSLYYSGVKENLLAWYQQKPG QSPKLLIYYASIRFTGVPDRFTGSGSGTDYTLTITISVQAEDMGQYFC QQGINNPLTFTGDGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCL LNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLS KADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
68	pab2196 重链	EVQLQQSGPELVKPGTSMKISCKASGYSFTGHLMNWVKQSHGKNLEW IGLIIPYNGGTSYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSDDSAVY FCRGLRGRFYAMDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVD GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
69	pab2196 轻链	DVVLVTQTPLSLSVSFGDQVSIQRSSQSLVNSYGNTFLSWYLHKPGQ SPQLLIFGISNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISTIKPEDLGMYYCL QGTHTQPTFGPGTKLEVKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYSTLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
70	pab2225 重链	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSGYYWSWIRQSPEKGLEW IGEINHGGYVTYNPSLESRTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYY CARDYGPNGYDWYFDLWGRGTLTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSS VTVPSLSSLTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPA PELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGF

[0401]

		YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQ GNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
71	pab2225 轻链	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLL IYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNW PPALTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADY EKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
72	pab1928 重链	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSCASGYTFTDYSMHVWRQAPGQGLKW MGWINTETGEPTYADDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVY YCANPYYDYVSYAMDYWGQGTITVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLS SVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVKPKCDKTHCTPCP APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVS NKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKG FYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
73	pab1928 轻链	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQDVSTAVAWYQQKPGKAPKLL IYSASYLYTGVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLPEDIAITYYCQQHYST PRTFGQGTKLEIKRSVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFY REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSTYLSSTLTLSKADYEK HKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0402] 抗-PD-1抗体AGEN2034w,单独或与抗-CTLA-4抗体伊匹单抗(图4C)、抗-TIGIT抗体pab2197或pab2196(图4D)、抗-CD137抗体pab2225(图4E)或抗-OX40抗体pab1928(图4F)组合,在SEA超抗原的存在下增强人PBMC的IL-2产生。

[0403] 6.1.5Fc γ 受体结合对于抗-PD-1抗体的拮抗活性的影响

[0404] 在这一实施例中,检验了Fc γ R对于抗-PD-1抗体的拮抗活性的作用。

[0405] 首先,在Fc γ R阻断剂存在或不存在的条件下检验抗-PD-1参比抗体的拮抗活性。从未纯化的血沉棕黄层制备的冷冻保存的人PBMC(Research Blood Components,Cat#002)在补充有NormocinTM(InvivoGen,Cat#ant-nr-1)和10%热灭活的FBS(Gibco,Cat#16140063)的RPMI1640培养基中以10⁵细胞/孔接种在96-孔NUNCLON delta表面板(NUNCTM)中。细胞在37℃、5%CO₂和97%湿度下在固定浓度的Fc受体阻断混合物(包含抗-CD16抗体(1 μ g/ml,R&D systems,Cat#AF1330)和不相关的IgG₁(25 μ g/ml,LifeTein,Cat#LT12031))存在或不存在的条件下用100ng/ml的SEA肽(Toxin Technology,Cat#at101red)和10 μ g/ml的抗-PD-1参比抗体或同种型对照培养5天。收集上清液并在-80℃下储存直到分析。通过电化学发光(MSD)测量IL-2的滴度。

[0406] 使用抗-CD16抗体阻断Fc γ R在这一原代人PBMC分析中增强了抗-PD-1参比抗体诱导IL-2分泌的能力(图5A)。

[0407] 进行相似的研究以检验Fc γ R阻断对AGEN2034w的拮抗活性的影响。简言之,人PBMC在37℃、5%CO₂和97%湿度下用100ng/ml的SEA肽(Toxin Technology,Cat#

at101red)、10 μ g/ml的AGEN2034w或同种型对照抗体(HEL IgG₁,LifeTein,Cat#LT12031)及20 μ g/ml的抗-CD16抗体(Biolegend,Cat#302013)、抗-CD32抗体(eBioscience,Cat#16-0329-81)(其结合CD32A和CD32B两者)、抗-CD64抗体(Biolegend,Cat#305016)或同种型对照(Biolegend,Cat#400543)培养5天。收集上清液并在-80℃下储存直到分析。通过电化学发光(MSD)测量IL-2的滴度。

[0408] 与图5A中的结果一致,使用抗-CD16抗体、抗-CD32抗体或抗-CD64抗体的Fc γ R阻断在这一人PBMC分析中增加由AGEN2034w诱导的IL-2分泌(图5B)。

[0409] 接着,产生AGEN2047w的三种IgG₁Fc突变体(N297A突变体、S267E/L328F双重突变体和S239D/A330L/I332E三重突变体,按照EU编号系统编号的)并在如上所述的人PBMC SEA分析中针对包含野生型IgG₁恒定区的AGEN2047w进行比较。简言之,冷冻保存的人PBMC与100ng/ml的SEA和10 μ g/ml的抗-PD-1抗体AGEN2047w、AGEN2047w-N297A、AGEN2047w-S267E/L328F、AGEN2047w-S239D/A330L/I332E或具有相应野生型或突变体Fc区的同种型对照抗体孵育。

[0410] 如图5C中所示,具有减弱的Fc γ R结合的N297A突变体进一步增强IL-2分泌。与此相反,S267E/L328F双重突变体和S239D/A330L/I332E三重突变体(这两者均具有增强的Fc γ R结合)诱导比野生型AGEN2047w更少的IL-2产生。

[0411] 6.1.6抗-PD-1抗体在混合淋巴细胞反应中的作用

[0412] 接着,抗-PD-1抗体AGEN2034w在混合淋巴细胞反应中检查。树突状细胞源自从冷冻保存的HLA-A2+人PBMC获得并首先在500U/ml IL-4(Peprotech,Cat#200-04-20UG)和1000U/ml GM-CSF(Peprotech,Cat#300-03-20UG)的存在下分化24小时和然后在1000U/ml TNF α (Peprotech,Cat#300-01A-50UG)、10ng/ml IL-1 β (Peprotech,Cat#200-01B-10UG)、10ng/ml IL-6(Peprotech,Cat#200-06-20UG)和1 μ M PGE2(Sigma,Cat#P0409-5MG)存在下分化另外24小时的分离的CD14+细胞(Stemcell Technologies,Cat#18058)。通过MACS柱纯化(Miltenyi Biotec,Cat#130-096-535)从同种HLA-A2-人PBMC供体纯化的50,000个全T细胞在不存在任何抗体或存在10 μ g/ml人IgG₄同种型对照抗体(Biolegend,Cat#403402)或10 μ g/ml AGEN2034w的情况下在包含5%人AB血清(Corning,Cat#35-060-CI)和青霉素/链霉素(Gibco,Cat#15140-122)的RPMI(Corning,Cat#10-040-CM)中与10,000个树突状细胞共培养。培养物在37℃和5%CO₂下孵育5天。上清液使用AlphaLISA(Perkin Elmer,Cat#AL217C)针对稳态浓度的IFN γ 进行评估。

[0413] 如图6中所示,AGEN2034w诱导纯化的人T细胞和体外衍生的同种树突状细胞的共培养物中的IFN γ 产生。

[0414] 6.1.7抗-PD-1抗体在腹水抑制分析中的作用

[0415] 在本实施例中,检验抗-PD-1抗体AGEN2034w缓解卵巢癌腹水诱导的T细胞增殖抑制的能力。简言之,原代人PBMC用CFSE(Biolegend,Cat#423801)标记和然后用1 μ g/ml抗-CD3抗体(eBioscience,Cat#16-0037-85)和50%体积/体积的卵巢癌腹水在提高浓度(0.00000102-50 μ g/ml)的AGEN2034w或IgG₄同种型对照抗体(Biolegend,Cat#317434)存在下刺激4-5天。细胞用抗-人CD4抗体(Biolegend,Cat#317434)或抗-人CD8抗体(Biolegend,Cat#344710)和LIVE-DEAD生活力染料(viability stain)(Life Technologies,Cat#L10119)进行免疫染色。CD4+或CD8+T细胞的增殖,如通过CFSE稀释证明的,使用BD

Fortessa (Becton Dickinson) 通过流式细胞术测量。

[0416] 如图7A-7C中所示,与卵巢癌腹水的共培养降低抗-CD3-抗体-刺激的T细胞的增殖,且这种降低可以部分地通过抗-PD-1抗体AGEN2034w缓解。

[0417] 6.1.8抗-PD-1抗体在Jurkat NFAT-荧光素酶报告分析中的作用

[0418] 此外,报告分析用于探测AGEN2034w的拮抗活性。具体地,在这一报告分析中,表达PD-L1的靶细胞和PD-1-表达报告细胞的共培养抑制报告细胞中NFAT-荧光素酶报告基因的表达。通过抗-PD-1抗体阻断PD-1/PD-L1相互作用可以缓解抑制性信号,导致荧光素酶表达。

[0419] 简言之,PD-L1+CHOK1靶细胞(Promega,Cat#CS187108)在提高浓度(0-50 μ g/ml)的AGEN2034w或同种型对照抗体存在下在补充有2%热灭活FBS(Gemini,Cat#100-106)的RPMI-1640培养基(Corning,Cat#21-040-CV)中与GloResponse™ NFAT-luc2/PD-1Jurkat报告细胞(Promega,Cat#CS187102)共培养。在6小时的孵育后,AGEN2034w缓解由PD-L1与PD-1的结合诱导的报告基因的抑制的效率通过使用Bio-Glo™荧光素酶分析系统(Promega,Cat#G7941)测量荧光素酶来测定。

[0420] 如图8中所示,抗-PD-1抗体AGEN2034w在这一Jurkat NFAT-荧光素酶报告分析中以剂量依赖性的方式增强TCR信号传导。

[0421] 6.2实施例2:另外的抗-PD-1抗体的表征

[0422] 在本实施例中,表征了以下六种另外的抗-PD-1抗体:AGEN2001w、AGEN2002w、EP11_p11_B03、EP11_p11_B05、EP11_p11_C02和EP11_p11_C03。这些抗体的可变重链和可变轻链序列公开于表6中。

[0423] 6.2.1抗-PD-1抗体的结合和配体阻断分析

[0424] 上述六种抗-PD-1抗体的亲和力通过表面等离子体共振进行分析。所有六种抗体结合重组人PD-1(数据未显示)。

[0425] 六种抗-PD-1抗体的配体阻断活性在与6.1.3节中描述的分析相似的分析中使用悬浮阵列技术检验。偶联的珠在20℃和650rpm下重复地用不同浓度的抗-PD-1抗体(最终浓度每孔7.5 μ g/ml-0.01 μ g/ml)孵育1小时。然后添加R-PE标记的PD-L1-Fc(R&D Systems,Cat#156-B7)或PD-L2-Fc(R&D Systems,Cat#1224-PL)。测试的抗-PD-1抗体是AGEN2001w、AGEN2002w、EP11_p11_B03、EP11_p11_B05、EP11_p11_C02和EP11_p11_C03。如图9A-9F中所示,所有测试的抗-PD-1抗体以剂量依赖性的方式阻断PD-1与PD-L1和PD-L2的结合。

[0426] 6.2.2抗-PD-1抗体对葡萄球菌肠毒素A(SEA)刺激后的人PBMC的作用

[0427] 抗-PD-1抗体AGEN2002w对人PBMC的功能活性在与6.1.4节中描述的分析相似的分析中测试。简言之,从未纯化的血沉棕黄层制备的冷冻保存的人PBMC(Research Blood Components,Cat#002)在37℃、5%CO₂和97%湿度下在10 μ g/ml的抗-PD-1抗体AGEN2002w或同种型对照抗体(HEL IgG₁,LifeTein,Cat#LT12031)和100ng/ml的SEA肽(Toxin Technologies,Cat#at101red)存在下培养4天。收集上清液并在-80℃下储存直到分析。IL-2的滴度通过电化学发光(MSD)测量。

[0428] 如图10中所示,抗-PD-1抗体AGEN2002w在SEA刺激的存在下提高原代人PBMC的IL-2产生。

[0429] 6.3实施例3:抗-PD-1抗体的表位作图

[0430] 抗-PD-1抗体AGEN2034w的表位使用氢-氘交换 (HDX) 质谱和Pepscan分析进行表征。

[0431] 6.3.1使用氢-氘交换 (HDX) 质谱的抗-PD-1Fab的表位作图

[0432] AGEN2034w的Fab片段 (AGEN2034w-Fab) 与人PD-1的细胞外结构域的相互作用通过氢-氘交换 (HDX) 质谱研究。

[0433] 重组His-标记人PD-1从Sino Biological Inc (Cat#10377-H08H) 获得。当使用时, 去糖基化的PD-1从在37℃下与6μl的PNGase F孵育4小时的300μg重组His-标记人PD-1蛋白制备。抗-PD-1抗体的Fab片段通过蛋白酶处理从AGEN2034w制备。

[0434] 对于胃蛋白酶/蛋白酶XVIII消化, 125μl对照缓冲液 (50mM磷酸盐, 100mM氯化钠, pH 7.4) 中的4.0μg的原始或去糖基化的人PD-1通过添加135μl的4M盐酸胍, 0.85M TCEP缓冲液 (最终pH是2.5) 并在11℃下孵育混合物3分钟变性。然后, 混合物使用自行装填的胃蛋白酶/蛋白酶XVIII柱进行柱上胃蛋白酶/蛋白酶XVIII消化且所得的肽使用由与Q Exactive™ Hybrid Quadrupole-Orbitrap Mass Spectrometer (Thermo) 偶联的Waters Acquity UPLC组成的UPLC-MS系统进行分析。肽在50mm×1mm C8柱上用2-27%溶剂B (乙腈中的0.2%甲酸) 的19min梯度分离。肽鉴定通过用Mascot针对人PD-1序列检索MS/MS数据来进行。前体和产物离子的质量容差分别为10ppm和0.05Da。

[0435] 10μl人PD-1 (4.0μg) 或10μl人PD-1和Fab混合物 (4.0μg:4.0μg) 在11℃下用125μl氧化氘标记缓冲液 (50mM磷酸钠, 100mM氯化钠, pH 7.4) 孵育0秒、60秒、600秒和3600秒。氢/氘交换通过添加135μl的4M盐酸胍, 0.85M TCEP缓冲液 (最终pH是2.5) 淬灭。随后, 淬灭的样品如上所述进行柱上胃蛋白酶/蛋白酶XVIII消化和LC-MS分析。质谱在仅MS模式中记录。

[0436] 原始MS数据使用HDX WorkBench, 用于分析H/D交换MS数据的软件 (J. Am. Soc. Mass Spectrom. 2012, 23 (9), 1512-1521, 通过引用全文合并于此) 进行处理。氘水平使用氘化肽及其原始形式 (t_0) 之间的平均质量差异计算。

[0437] 对于无His-标签的去糖基化人PD-1获得85.4%的序列覆盖率。大多数PD-1肽在有或没有抗-人PD-1Fab存在的情况下表现出相同或相似的氘水平。但是, 几个肽片段发现在Fab结合时具有显著降低的氘掺入。该段落中的所有残基按照SEQ ID NO:74编号。去糖基化的人PD-1在残基107-122 (SLAPKAQIKESLRAEL) (SEQ ID NO:75) 处与抗-人PD-1Fab结合时显示出氘摄取的显著降低。另外, 氘摄取的降低在与抗-人PD-1Fab结合时在残基5-22 (LDSPDRPWNPTTFSPALL) (SEQ ID NO:76) 处观察到。

[0438] 6.3.2使用Pepscan分析的抗-PD-1抗体的表位作图

[0439] 抗-PD-1抗体AGEN2034w的结合针对制备为芯片结合的肽阵列的合成PD-1肽片段进行测量。分析通过Pepscan Presto BV, Lelystad, the Netherlands进行。简言之, 为重建人PD-1的表位, 合成了肽的文库。氨基功能化的聚丙烯支持物通过用专有亲水性聚合物制剂接枝, 接着使用二环己基碳二亚胺 (DCC) 和N-羟基苯并三唑 (HOBt) 的与叔丁氧羰基-己二胺 (BocHMDA) 的反应和随后使用三氟乙酸 (TFA) 的Boc-基的切割获得。标准Fmoc-肽合成为通过合成专门改进的JANUS液体操作台 (Perkin Elmer) 在氨基功能化的固体支持物上合成肽。结构模拟物的合成使用Pepscan's 专有Chemically Linked Peptides on Scaffolds (CLIPS) 技术进行。CLIPS技术允许肽构建成单环、双环、三环、片样折叠、螺旋样折叠及其组合。抗体与各合成的肽的结合在PEPSCAN-基ELISA中测试。肽阵列在4℃下与初

级抗体溶液孵育过夜。在洗涤后,肽阵列在25℃下与山羊抗-人HRP偶联物(Southern Biotech,Cat#2010-05)孵育一小时。在洗涤后,添加过氧化物酶底物2,2'-联氮-二-3-乙基苯并噻唑磺酸酯(ABTS)和20μl/ml的3% H_2O_2 。在一小时后,测定显色并用电荷耦合器件(CCD)-相机和图像处理系统量化。

[0440] Pepscan研究证明抗-PD-1抗体AGEN2034w识别人PD-1的延伸,包括按照SEQ ID NO:74编号的残基6-15(DSPDRPWNPP)(SEQ ID NO:77)、残基130-138(EVPTAHPSP)(SEQ ID NO:78)和残基106-113(ISLAPKAQ)(SEQ ID NO:79)。

[0441] ***

[0442] 本发明在范围上不限于本文所述的具体实施方式。事实上,除所描述的那些改变之外的本发明的各种改变从前述说明和附图将对于本领域技术人员变得明显。这样的改变意图落入所附权利要求的范围内。

[0443] 本文中使用的所有参考文献(例如,公开出版物或专利或专利申请)通过引用全文和为所有目的并入以达到如同各单个参考文献(例如,公开出版物或专利或专利申请)特别地和个别地表示通过引用全文和为所有目的并入的程度。其它实施方式在以下权利要求内。

序列表

<110> Agenus Inc.
Ludwig Institute for Cancer Research Ltd
Memorial Sloan Kettering Cancer Center

<120> 抗-PD-1 抗体及其使用方法

<130> 584180:AGBW-003PC

<150> US 62/212,851
<151> 2015-09-01

<150> US 62/216,043
<151> 2015-09-09

<150> US 62/257,195
<151> 2015-11-18

<160> 79

[0001] <170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AGEN2033w Kabat CDRH1

<400> 1

Ser Tyr Gly Met His
1 5

<210> 2
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> AGEN2033w Kabat CDRH2

<400> 2

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 3

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AGEN2033w Kabat CDRH3

<400> 3

[0002] Asn Val Asp Tyr
1

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AGEN2033w Kabat CDRL1

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn Leu Ala
1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AGEN2033w Kabat CDRL2

<400> 5

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AGEN2033w Kabat CDRL3

<400> 6

Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Arg Thr

1 5

[0003]

<210> 7

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AGEN2034w Kabat CDRH3

<400> 7

Asn Gly Asp His

1

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AGEN2033w IMGT CDRH1

<400> 8

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Gly
1 5

<210> 9

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AGEN2033w IMGT CDRH2

<400> 9

Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys
1 5

[0004]

<210> 10

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AGEN2033w IMGT CDRH3

<400> 10

Ala Ser Asn Val Asp Tyr
1 5

<210> 11

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AGEN2033w IMGT CDRL1

<400> 11

	Gln Ser Val Ser Ser Asn
	1 5
	<210> 12
	<211> 3
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> AGEN2033w IMGT CDRL2
	<400> 12
	Gly Ala Ser
	1
	<210> 13
	<211> 9
	<212> PRT
[0005]	<213> 人工序列
	<220>
	<223> AGEN2033w IMGT CDRL3
	<400> 13
	Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Arg Thr
	1 5
	<210> 14
	<211> 6
	<212> PRT
	<213> 人工序列
	<220>
	<223> AGEN2034w IMGT CDRH3
	<400> 14
	Ala Ser Asn Gly Asp His

1 5

<210> 15

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AGEN2033w, AGEN2046w VH

<400> 15

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

[0006]

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Asn Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 16

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w, AGEN2047w VL

<400> 16

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

[0007]

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 17

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AGEN2034w, AGEN2047w VH

<400> 17

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

[0008]

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Asn Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 18

<211> 440

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AGEN2033w 重链 IgG4 S228P

<400> 18

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

[0009]

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Asn Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
115 120 125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr

[illegible]

340

345

350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
355 360 365

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
370 375 380

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
385 390 395 400

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
405 410 415

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430

[0011]

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 19

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AGEN2033w, AGEN2034w, AGEN2046w, AGEN2047w 轻链

<400> 19

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 20

<211> 440

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AGEN2034w 重链 IgG4 S228P

<400> 20

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

[0013]

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Asn Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser

115

120

125

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205

[0014]

Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
210 215 220

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
225 230 235 240

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
245 250 255

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
260 265 270

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
275 280 285

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln

290

295

300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
305 310 315 320

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
325 330 335

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
340 345 350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
355 360 365

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
370 375 380

[0015]

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
385 390 395 400

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
405 410 415

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430

Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
435 440

<210> 21

<211> 443

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AGEN2046w 重链 IgG1

<400> 21

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

[0016] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Asn Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
115 120 125

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

	Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr	
	165	170 175
	Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln	
	180	185 190
	Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp	
	195	200 205
	Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro	
	210	215 220
	Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro	
	225	230 235 240
[0017]	Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr	
	245	250 255
	Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn	
	260	265 270
	Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg	
	275	280 285
	Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val	
	290	295 300
	Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser	
	305	310 315 320
	Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys	
	325	330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
405 410 415

[0018] Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 22

<211> 443

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AGEN2047w 重链 IgG1

<400> 22

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20	25	30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Ser Asn Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser		
100	105	110
[0019]		
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser		
115	120	125
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp		
130	135	140
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr		
145	150	155 160
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr		
165	170	175
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln		
180	185	190
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp		

195	200	205
Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro		
210	215	220
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro		
225	230	235 240
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr		
245	250	255
Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn		
260	265	270
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg		
275	280	285
[0020]		
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val		
290	295	300
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser		
305	310	315 320
Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys		
325	330	335
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu		
340	345	350
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe		
355	360	365
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu		

370

375

380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
 385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
 405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 23

<211> 443

[0021]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AGEN2047w 重链 IgG1 N297A

<400> 23

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
	65						70				75					80
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85						90					95	
	Ala	Ser	Asn	Gly	Asp	His	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser
				100					105						110	
	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser
			115					120						125		
	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp
		130					135					140				
[0022]	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr
	145					150					155					160
	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr
				165						170					175	
	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln
				180					185						190	
	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp
		195						200					205			
	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro
		210					215					220				
	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro
	225					230					235					240

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
 420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440

<210> 24

<211> 443

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AGEN2047w 重链 IgG1 S267E/L328F

<400> 24

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

[0024]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ser Asn Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser

	100		105		110
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser					
115		120		125	
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp					
130		135		140	
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr					
145		150		155	160
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr					
	165		170		175
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln					
	180		185		190
[0025]					
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp					
195		200		205	
Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro					
210		215		220	
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro					
225		230		235	240
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr					
	245		250		255
Cys Val Val Val Asp Val Glu His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn					
	260		265		270
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg					

275	280	285
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val		
290	295	300
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser		
305	310	315 320
Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys		
325	330	335
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu		
340	345	350
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe		
355	360	365
[0026]		
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu		
370	375	380
Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe		
385	390	395 400
Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly		
405	410	415
Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr		
420	425	430
Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
435	440	
<210>	25	

<211> 443

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AGEN2047w 重链 IgG1 S239D/A330L/I332E

<400> 25

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

[0027] Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Asn Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
115 120 125

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140

	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	
	145					150					155					160	
	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	
				165						170					175		
	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	
			180						185					190			
	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	
		195						200						205			
	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	
	210						215					220					
[0028]	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Asp	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	
	225					230					235					240	
	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	
				245						250					255		
	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	
			260						265					270			
	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	
		275					280						285				
	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	
		290					295					300					
	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	
	305					310					315					320	

Asn Lys Ala Leu Pro Leu Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

[0029] Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 26

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AGEN2001w VH (BADD426-2614)

<400> 26

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg

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

[0030]

Ser

<210> 27

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AGEN2002w VH (BADD426-2615)

<400> 27

Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
1				5					10					15	

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

[0031] Ala Ser Asn Gly Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 28

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EP11_p11_B03 (BADD438-2743)

<400> 28

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20

25

30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Asn Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

[0032]

Ser

<210> 29

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EP11_p11_B05 (BADD438-2745)

<400> 29

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Met Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ser Asn Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

[0033]

<210> 30

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EP11_p11_C02 (BADD438-2746)

<400> 30

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ser Asn Gly Asp His Trp Gly His Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

[0034]

<210> 31

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> EP11_p11_C03 (BADD438-2747)

<400> 31

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Met Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ser Asn Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
 100 105 110

Ser

- [0035] <210> 32
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列
- <220>
 <223> CDRH2 共有序列
- <220>
 <221> 变体
 <222> (4)..(4)
 <223> Tyr 或 Phe
- <220>
 <221> 变体
 <222> (9)..(9)
 <223> Lys 或 Glu
- <220>
 <221> 变体
 <222> (16)..(16)
 <223> Lys 或 Met

<400> 32

Val Ile Trp Xaa Asp Gly Ser Asn Xaa Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Xaa
1 5 10 15

Gly

<210> 33

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDRH3 共有序列

<220>

[0036]

<221> 变体

<222> (2)..(2)

<223> Gly 或 Val

<220>

<221> 变体

<222> (4)..(4)

<223> His 或 Tyr

<400> 33

Asn Xaa Asp Xaa
1

<210> 34

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDRH2

<400> 34

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 35

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDRH2

<400> 35

[0037] Val Ile Trp Phe Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 36

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> CDRH2

<400> 36

Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Met
1 5 10 15

Gly

<210> 37
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CDRH3

<400> 37

Asn Gly Asp Tyr
1

<210> 38
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
[0038] <223> VH FR1

<400> 38

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 39
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VH FR1

<400> 39

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Met Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
20 25 30

<210> 40

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VH FR2

<400> 40

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

[0039]

<210> 41

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VH FR3

<400> 41

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ser
20 25 30

<210> 42

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VH FR3

<400> 42

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr
20 25 30

<210> 43

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VH FR4

[0040] <400> 43

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 44

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VH FR4

<400> 44

Trp Gly His Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 45

<211> 23

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL FR1

<400> 45

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 46
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

[0041]

<220>
<223> VL FR2

<400> 46

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 47
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL FR3

<400> 47

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> VL FR4

<400> 48

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

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

[0042]

<220>
<223> VH 共有序列

<220>
<221> 变体
<222> (11).. (11)
<223> Val 或 Met

<220>
<221> 变体
<222> (53).. (53)
<223> Tyr 或 Phe

<220>
<221> 变体
<222> (58).. (58)
<223> Lys 或 Glu

<220>
<221> 变体

<222> (65).. (65)

<223> Lys 或 Met

<220>

<221> 变体

<222> (98).. (98)

<223> Ser 或 Thr

<220>

<221> 变体

<222> (100).. (100)

<223> Gly 或 Val

<220>

<221> 变体

<222> (102).. (102)

<223> His 或 Tyr

<220>

<221> 变体

<222> (105).. (105)

[0043] <223> Gln 或 His

<400> 49

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Xaa Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Xaa Asp Gly Ser Asn Xaa Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Xaa Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Xaa Asn Xaa Asp Xaa Trp Gly Xaa Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser

<210> 50

<211> 98

<212> PRT

<213> 智人

<400> 50

[0044] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg

<210> 51

<211> 95

<212> PRT

<213> 智人

<400> 51

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Asn
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

[0045]

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asn Asn Trp Pro
85 90 95

<210> 52

<211> 439

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AGEN2033w 重链 IgG4 S228P(无 C-末端赖氨酸)

<400> 52

	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Arg
	1			5					10					15		
	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
			20					25					30			
	Gly	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45				
	Ala	Val	Ile	Trp	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
	50					55				60						
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
	65				70				75					80		
[0046]	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85				90					95			
	Ala	Ser	Asn	Val	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser
			100					105				110				
	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser
		115				120					125					
	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp
	130					135				140						
	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr
	145				150				155					160		
	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr
				165				170						175		

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
 180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
 195 200 205

Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala
 210 215 220

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
 225 230 235 240

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
 245 250 255

[0047] Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
 260 265 270

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
 275 280 285

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
 290 295 300

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
 305 310 315 320

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
 325 330 335

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
 340 345 350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
355 360 365

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
370 375 380

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
385 390 395 400

Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe
405 410 415

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
420 425 430

[0048] Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly
435

<210> 53

<211> 439

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AGEN2034w 重链 IgG4 S228P(无 C-末端赖氨酸)

<400> 53

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35

40

45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Asn Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser
115 120 125

[0049]

Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys
180 185 190

Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205

Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala

210

215

220

Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro
225 230 235 240

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val
245 250 255

Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val
260 265 270

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln
275 280 285

Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln
290 295 300

[0050]

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly
305 310 315 320

Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro
325 330 335

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr
340 345 350

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
355 360 365

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr
370 375 380

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr

385	390	395	400
Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe			
405	410	415	
Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys			
420	425	430	
Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly			
435			
<210>	54		
<211>	442		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
[0051] <223>	AGEN2046w 重链 IgG1(无 C-末端赖氨酸)		
<400>	54		
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr			
20	25	30	
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
50	55	60	
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr			
65	70	75	80

	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
					85					90					95	
	Ala	Ser	Asn	Val	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser
				100					105					110		
	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser
			115				120						125			
	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp
		130					135					140				
	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr
	145					150					155					160
[0052]	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr
				165						170					175	
	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln
			180						185					190		
	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp
		195						200					205			
	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro
		210					215					220				
	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro
	225					230					235					240
	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr
				245						250					255	

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 55

<211> 442

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AGEN2047w 重链 IgG1(无 C-末端赖氨酸)

<400> 55

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

[0054]

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Asn Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser

115	120	125
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp		
130	135	140
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr		
145	150	155
		160
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr		
	165	170
		175
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln		
	180	185
		190
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp		
195	200	205

[0055]

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

290

295

300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

[0056]

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 56

<211> 442

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AGEN2047w 重链 IgG1 N297A(无 C-末端赖氨酸)

<400> 56

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

[0057] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Asn Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
100 105 110

Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
115 120 125

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp
130 135 140

Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr
145 150 155 160

Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
165 170 175

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln
180 185 190

Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp
195 200 205

Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro
210 215 220

Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro
225 230 235 240

[0058] Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn
260 265 270

Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg
275 280 285

Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val
290 295 300

Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser
305 310 315 320

Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys
325 330 335

Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu
340 345 350

Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe
355 360 365

Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu
370 375 380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
405 410 415

[0059] Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 57

<211> 442

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AGEN2047w 重链 IgG1 S267E/L328F(无 C-末端赖氨酸)

<400> 57

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20	25	30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
35	40	45
Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
50	55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
65	70	75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
Ala Ser Asn Gly Asp His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser		
100	105	110
[0060]		
Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser		
115	120	125
Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp		
130	135	140
Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr		
145	150	155 160
Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr		
165	170	175
Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln		
180	185	190
Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp		

195	200	205
Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro		
210	215	220
Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro		
225	230	235 240
Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr		
245	250	255
Cys Val Val Val Asp Val Glu His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn		
260	265	270
Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg		
275	280	285
[0061]		
Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val		
290	295	300
Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser		
305	310	315 320
Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys		
325	330	335
Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu		
340	345	350
Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe		
355	360	365
Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu		

370

375

380

Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe
385 390 395 400

Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
405 410 415

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 58

<211> 442

[0062]

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> AGEN2047w 重链 IgG1 S239D/A330L/I332E(无 C-末端赖氨酸)

<400> 58

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr
	65						70				75					80
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85						90					95	
	Ala	Ser	Asn	Gly	Asp	His	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser
				100					105						110	
	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser
			115					120						125		
	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp
		130						135				140				
[0063]	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr
	145					150					155					160
	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr
				165						170					175	
	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln
			180						185					190		
	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp
		195						200					205			
	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro
		210					215					220				
	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Asp	Val	Phe	Leu	Phe	Pro
	225					230					235				240	

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr
420 425 430

Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440

<210> 59
<211> 329
<212> PRT
<213> 智人

<400> 59

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

[0065] Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

[0066]

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 60
<211> 330
<212> PRT
<213> 智人

<400> 60

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

[0067]

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100	105	110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro		
115	120	125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys		
130	135	140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp		
145	150	155
160		
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu		
165	170	175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu		
180	185	190
[0068]		
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn		
195	200	205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly		
210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu		
225	230	235
240		
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
245	250	255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
260	265	270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		

	275	280	285
	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
	290	295	300
	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
	305	310	315 320
	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	325	330	
<210>	61		
<211>	329		
<212>	PRT		
<213>	人工序列		
<220>			
[0069] <223>	IgG1 N297A (无 C-末端赖氨酸)		
<400>	61		
	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys		
	1 5 10 15		
	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr		
	20 25 30		
	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser		
	35 40 45		
	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
	50 55 60		
	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr		
	65 70 75 80		

	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
					85					90					95		
	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	
				100					105					110			
	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	
				115				120					125				
	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	
		130					135				140						
	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	
	145					150				155					160		
[0070]	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
				165					170					175			
	Glu	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
				180				185					190				
	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
		195					200					205					
	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
		210				215					220						
	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	
	225				230					235					240		
	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	
				245					250				255				

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 325

[0071] <210> 62
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> IgG1 N297A

<400> 62

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50

55

60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

[0072]

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225	230	235	240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr			
245	250	255	
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn			
260	265	270	
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe			
275	280	285	
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn			
290	295	300	
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr			
305	310	315	320

[0073]

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 63

<211> 326

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IgG4 S228P (无 C-末端赖氨酸)

<400> 63

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1 5 10 15

Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	
		35						40					45				
	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	
	50						55					60					
	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	
	65					70				75					80		
	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
				85					90						95		
	Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	
			100					105					110				
[0074]	Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	
		115					120					125					
	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	
	130					135						140					
	Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	
	145				150					155					160		
	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	
				165					170					175			
	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	
		180						185					190				
	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	
		195				200					205						

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

[0075] Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly
325

<210> 64

<211> 327

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> IgG4 S228P

<400> 64

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg

1	5	10	15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr	20	25	30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser	35	40	45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser	50	55	60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr	65	70	75
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys	85	90	95
[0076]			
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro	100	105	110
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys	115	120	125
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val	130	135	140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp	145	150	155
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe	165	170	175
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp			

180

185

190

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
195 200 205

Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
210 215 220

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
225 230 235 240

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
245 250 255

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
260 265 270

[0077]

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
275 280 285

Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
290 295 300

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
305 310 315 320

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
325

<210> 65

<211> 107

<212> PRT

<213> 智人

<400> 65

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80

[0078]

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 66

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab2197 重链

<400> 66

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Thr Gln Pro Gly Lys
1 5 10 15

152

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro
225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

[0080]

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

[0081]

<210> 67
<211> 220
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> pab2197 轻链

<400> 67

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Tyr Tyr Ser
20 25 30

Gly Val Lys Glu Asn Leu Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Ile Arg Phe Thr Gly Val
50 55 60

	Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr	
	65	70 75 80
	Ile Thr Ser Val Gln Ala Glu Asp Met Gly Gln Tyr Phe Cys Gln Gln	
		85 90 95
	Gly Ile Asn Asn Pro Leu Thr Phe Gly Asp Gly Thr Lys Leu Glu Ile	
		100 105 110
	Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp	
		115 120 125
	Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn	
		130 135 140
[0082]	Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu	
	145	150 155 160
	Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp	
		165 170 175
	Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr	
		180 185 190
	Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser	
		195 200 205
	Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
		210 215 220
	<210>	68
	<211>	448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab2196 重链

<400> 68

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr
1 5 10 15

Ser Met Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly His
20 25 30

Leu Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Asn Leu Glu Trp Ile
35 40 45

[0083]

Gly Leu Ile Ile Pro Tyr Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Leu Ser Leu Thr Ser Asp Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ser Arg Gly Leu Arg Gly Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
	145					150					155					160
	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
					165					170					175	
	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
				180					185						190	
	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
			195					200						205		
	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
		210					215					220				
[0084]	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro
	225					230					235					240
	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
				245						250					255	
	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
			260						265						270	
	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
		275					280						285			
	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
		290					295					300				
	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
	305					310					315					320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
355 360 365

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

[0085]

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 69

<211> 219

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab2196 轻链

<400> 69

Asp Val Val Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Ser Val Ser Phe Gly
1 5 10 15

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 70
<211> 450
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> pab2225 重链

<400> 70

[0087] Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ala Val Tyr Gly Gly Ser Phe Ser Gly Tyr
20 25 30

Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Gly Gly Tyr Val Thr Tyr Asn Pro Ser Leu Glu
50 55 60

Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

	Arg Asp Tyr Gly Pro Gly Asn Tyr Asp Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly	
	100	105 110
	Arg Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser	
	115	120 125
	Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala	
	130	135 140
	Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val	
	145	150 155 160
	Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala	
	165	170 175
[0088]	Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val	
	180	185 190
	Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His	
	195	200 205
	Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys	
	210	215 220
	Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly	
	225	230 235 240
	Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met	
	245	250 255
	Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His	
	260	265 270

	Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val	
	275	280 285
	His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr	
	290	295 300
	Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly	
	305	310 315 320
	Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile	
		325 330 335
	Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val	
		340 345 350
[0089]	Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser	
	355	360 365
	Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu	
	370	375 380
	Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro	
	385	390 395 400
	Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val	
		405 410 415
	Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met	
	420	425 430
	His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser	
	435	440 445

Pro Gly
450

<210> 71
<211> 216
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> pab2225 轻链

<400> 71

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 Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

[0090]

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

Ala Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
100 105 110

Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys
115 120 125

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
130 135 140

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
145 150 155 160

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
165 170 175

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
180 185 190

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
195 200 205

[0091]

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 72

<211> 451

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> pab1928 重链

<400> 72

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

	Ser	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Lys	Trp	Met	
		35						40					45				
	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Glu	Thr	Gly	Glu	Pro	Thr	Tyr	Ala	Asp	Asp	Phe	
	50						55					60					
	Lys	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Val	Ser	Thr	Ala	Tyr	
	65					70					75				80		
	Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85						90					95		
	Ala	Asn	Pro	Tyr	Tyr	Asp	Tyr	Val	Ser	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	
			100						105					110			
[0092]	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	
		115						120					125				
	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	
		130					135					140					
	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	
	145					150					155				160		
	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	
				165						170					175		
	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	
			180							185				190			
	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	
		195						200					205				

	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	
	210						215					220					
	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	
	225					230					235					240	
	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	
					245					250						255	
	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	
				260						265					270		
	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	
			275						280					285			
[0093]	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	
	290						295					300					
	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	
	305					310					315					320	
	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	
					325					330					335		
	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	
				340						345					350		
	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	
				355				360					365				
	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	
	370						375						380				

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
385 390 395 400

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
405 410 415

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
420 425 430

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
435 440 445

Ser Pro Gly
450

[0094]

<210> 73
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> pab1928 轻链

<400> 73

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Leu Tyr Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

[0095]

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 74

<211> 268

<212> PRT

<213> 智人

<400> 74

Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr
1 5 10 15

Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe
20 25 30

Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr
35 40 45

Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu
50 55 60

[0096] Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu
65 70 75 80

Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn
85 90 95

Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala
100 105 110

Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg
115 120 125

Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro Arg Pro Ala Gly
130 135 140

Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly Leu Leu Gly Ser
145 150 155 160

Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys Ser Arg Ala Ala
165 170 175

Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro Leu Lys Glu Asp
180 185 190

Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly Glu Leu Asp Phe
195 200 205

Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro Cys Val Pro Glu
210 215 220

Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly Met Gly Thr Ser
225 230 235 240

[0097] Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg Ser Ala Gln Pro
245 250 255

Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
260 265

<210> 75
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人

<400> 75

Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu
1 5 10 15

<210> 76
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人

<400> 76

Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala
1 5 10 15

Leu Leu

<210> 77

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 77

Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp Asn Pro Pro
1 5 10

[0098]

<210> 78

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 78

Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro
1 5

<210> 79

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 79

Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln
1 5

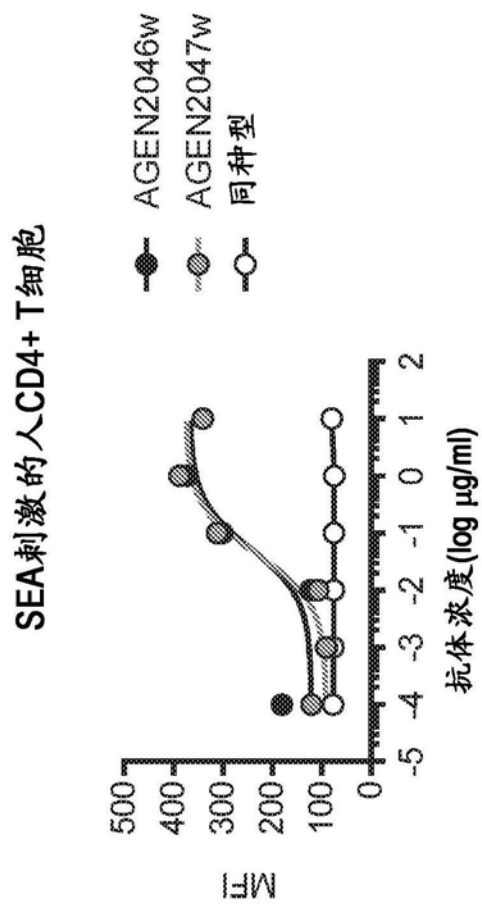


图1A

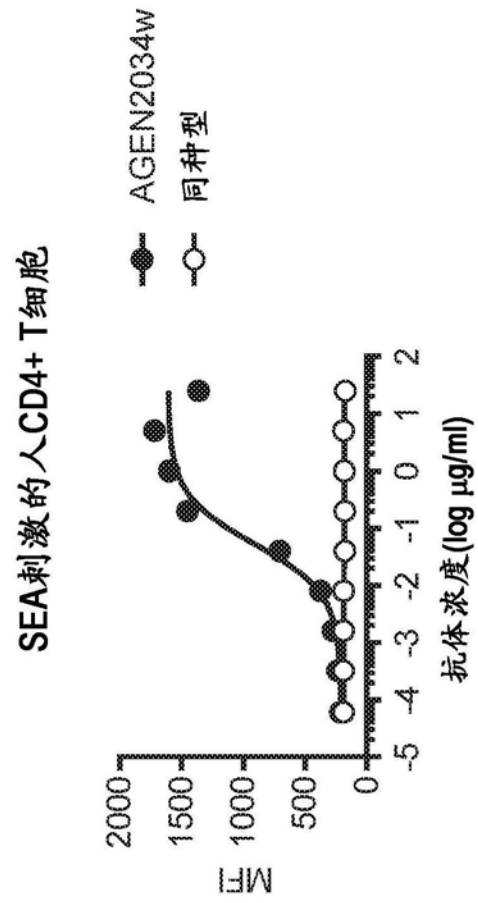


图1B

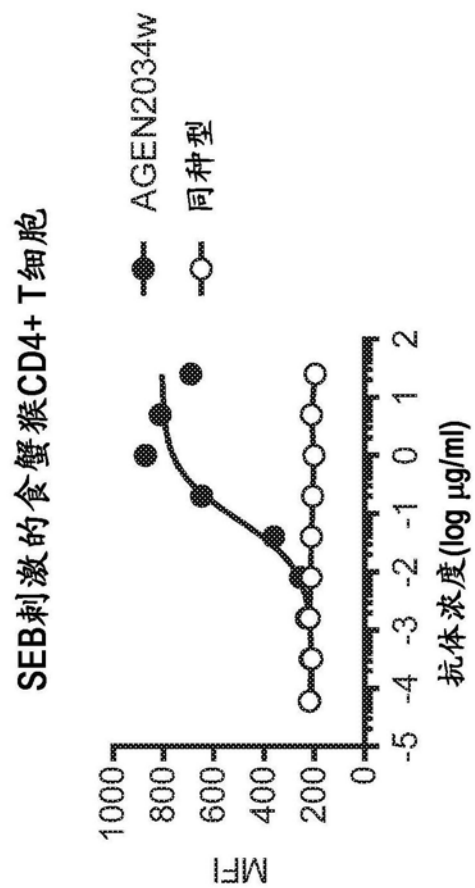


图1C

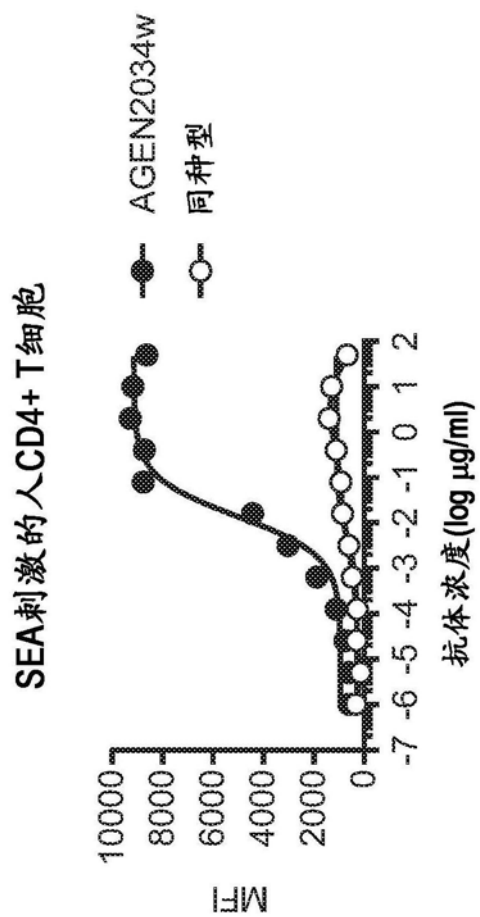


图1D

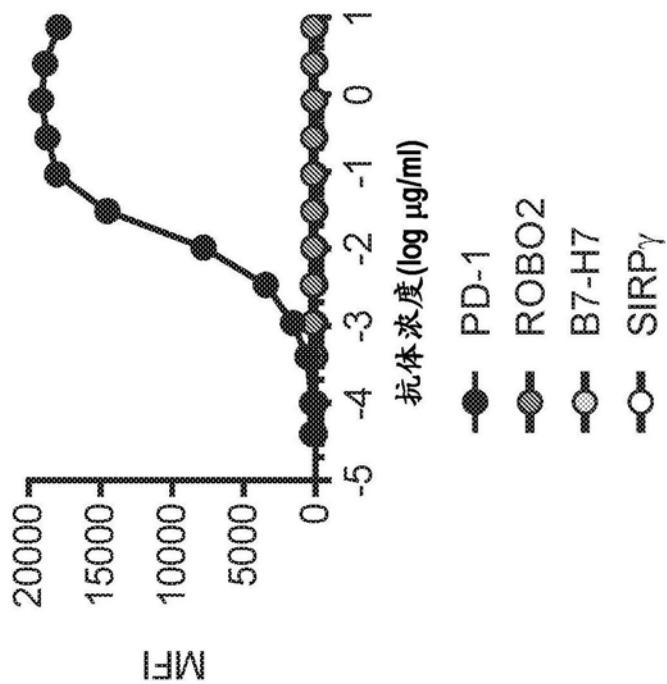


图2

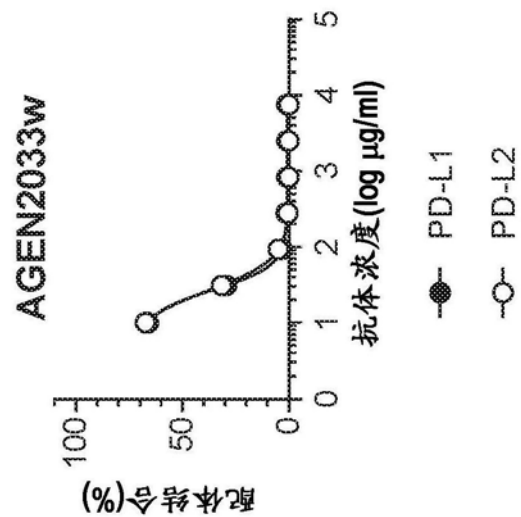


图3A

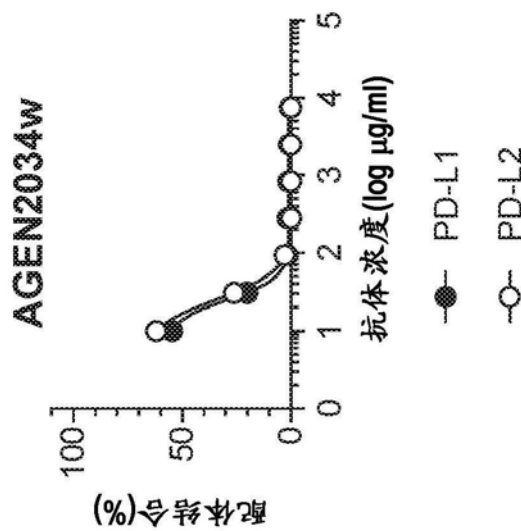


图3B

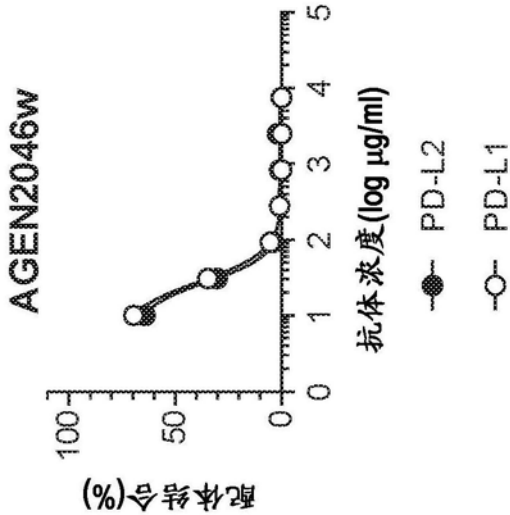


图3C

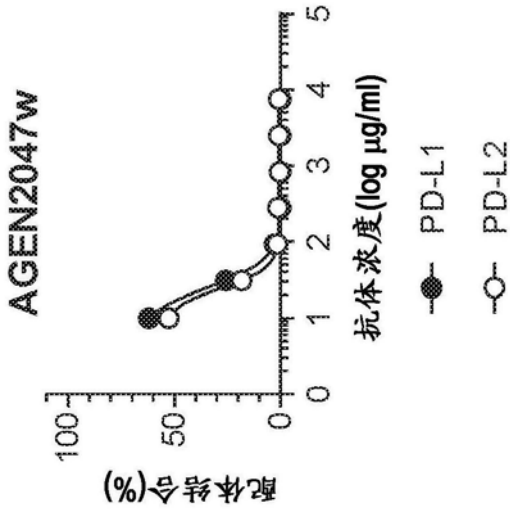


图3D

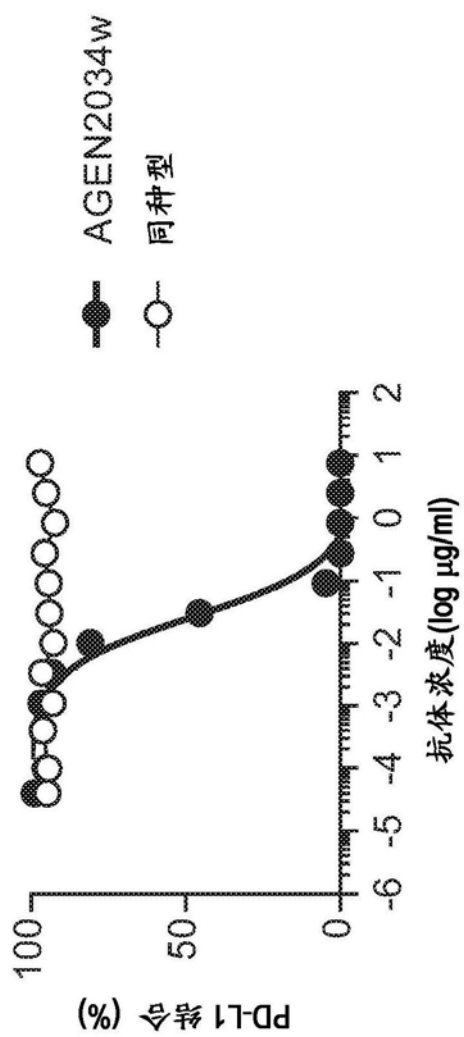


图3E

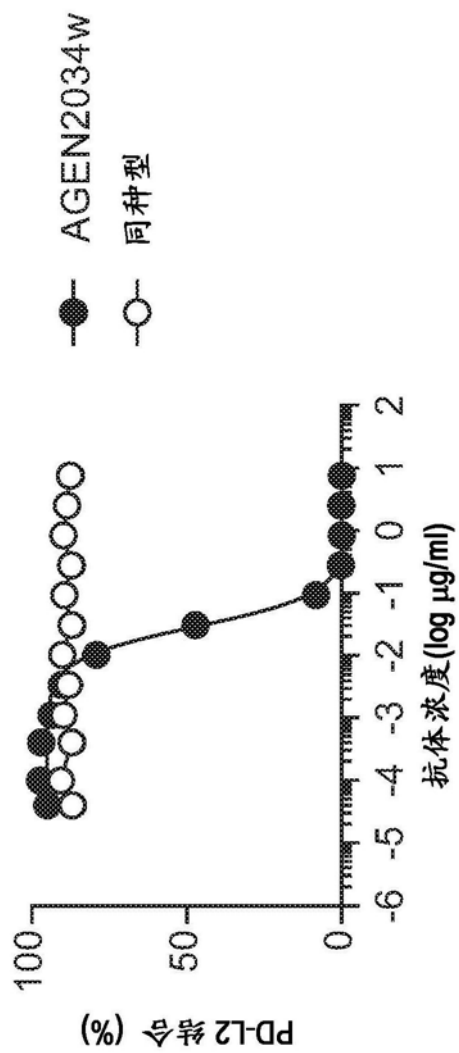


图3F

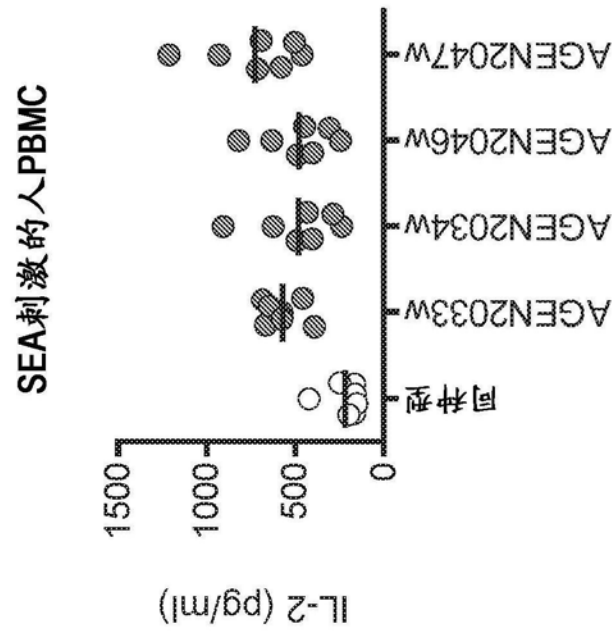


图4A

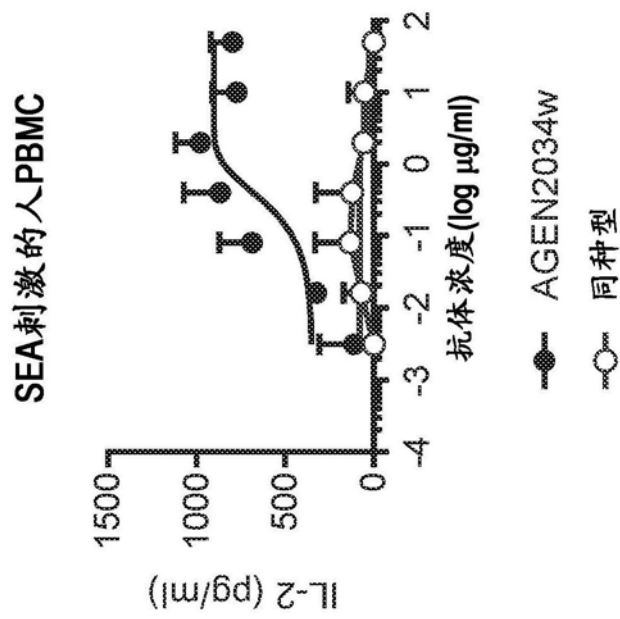


图4B

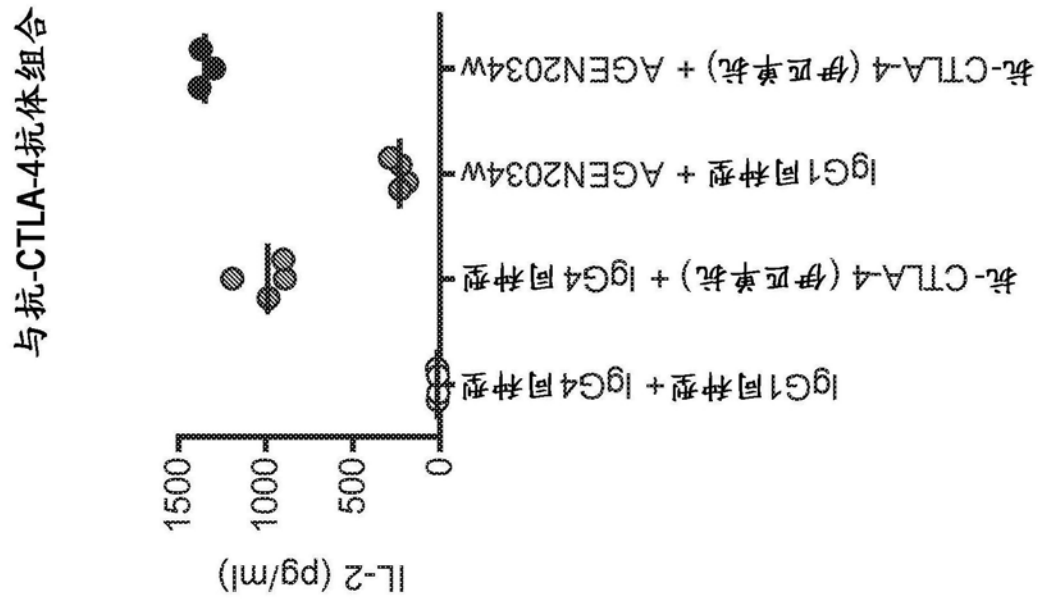


图4C

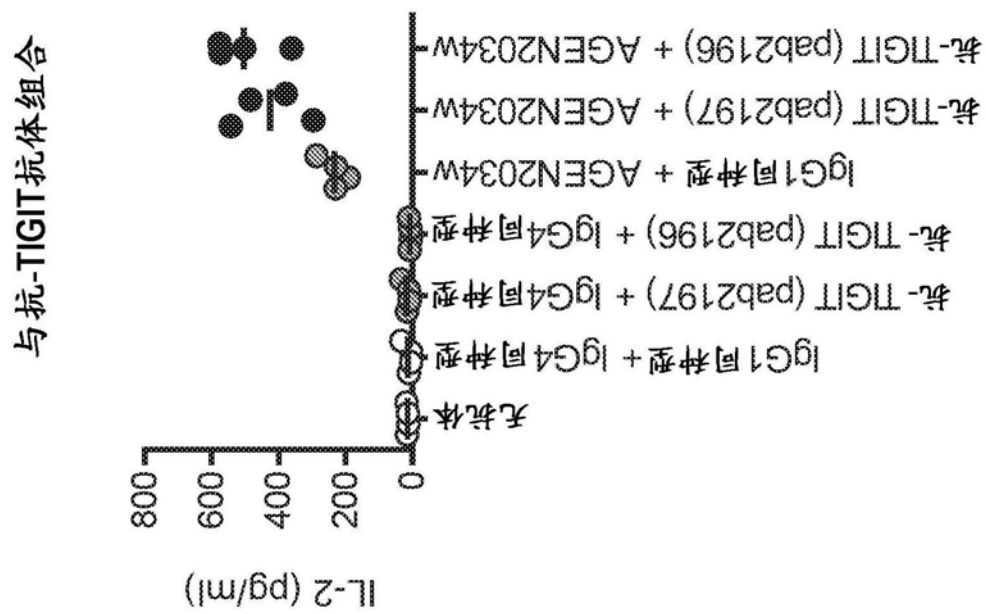


图4D

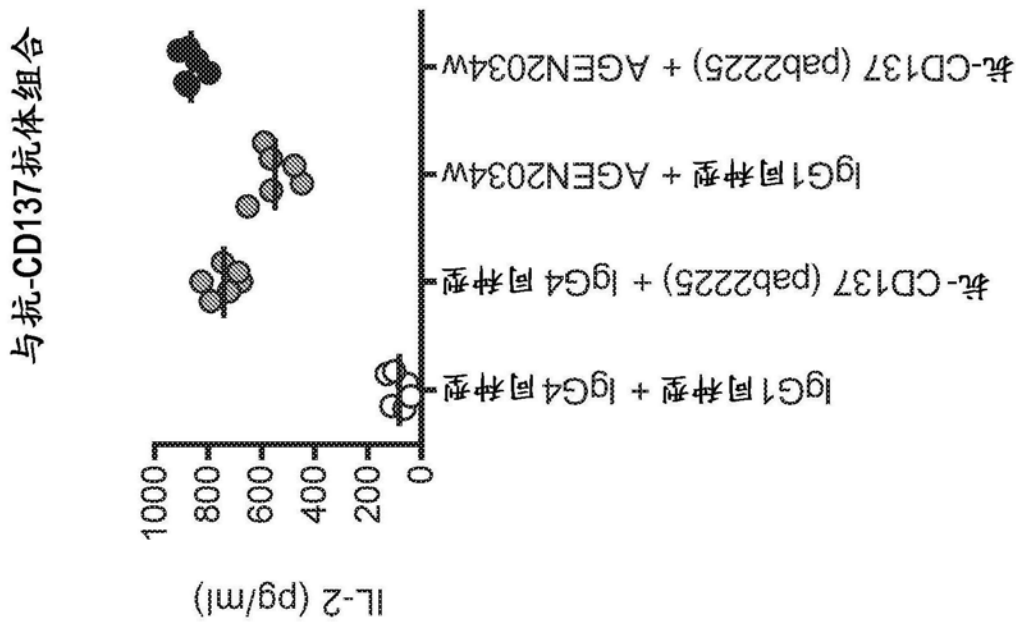


图4E

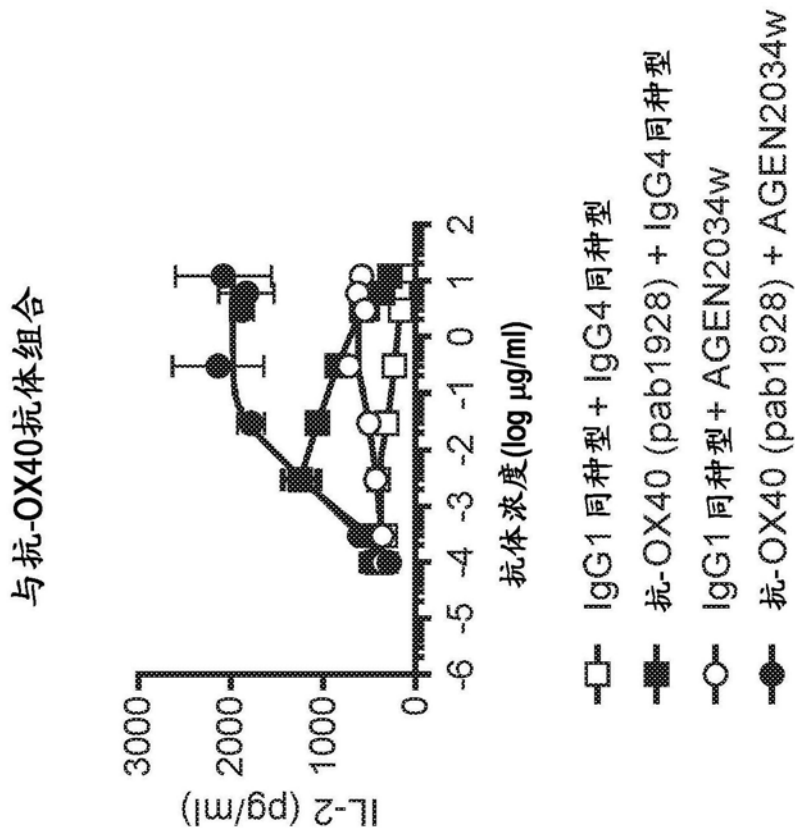


图4F

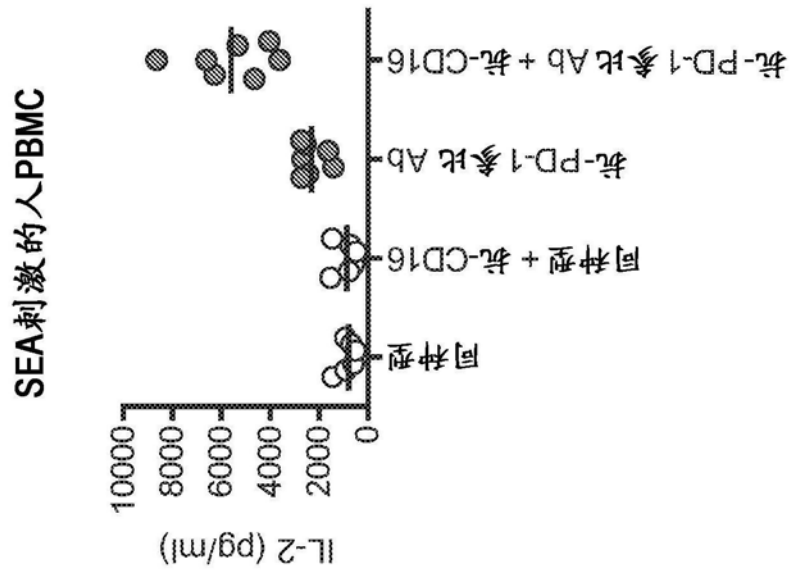


图5A

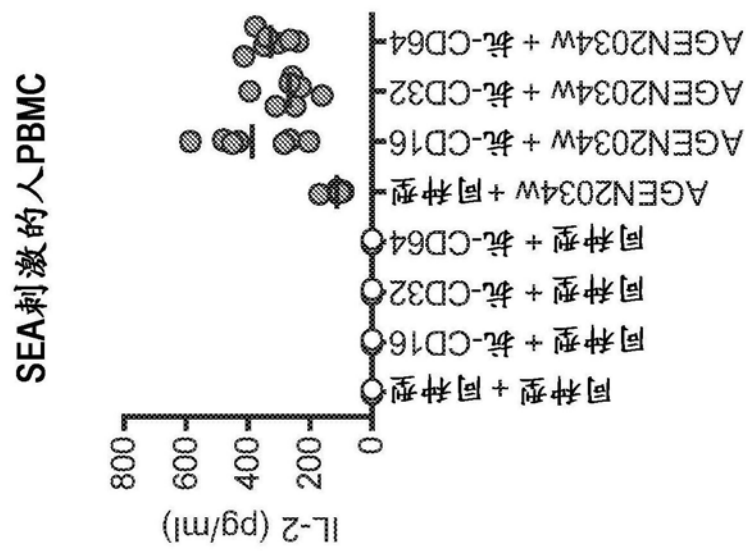


图5B

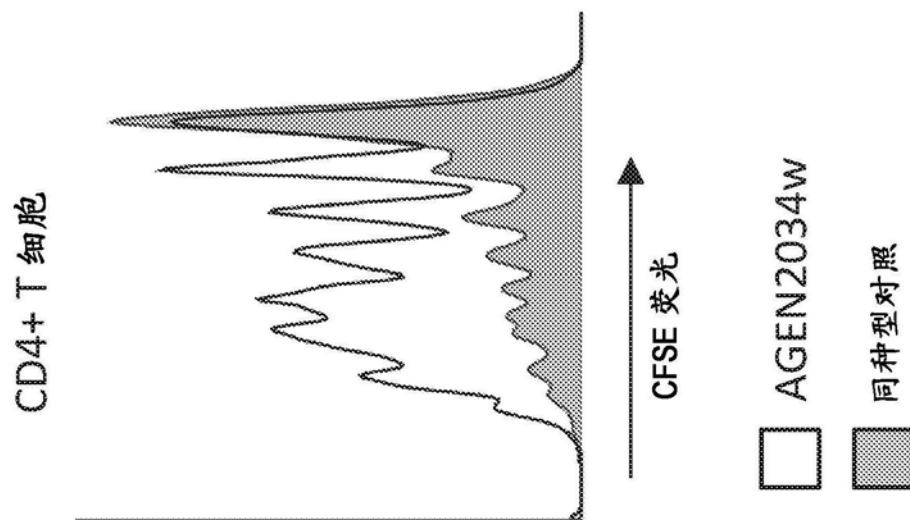


图7A

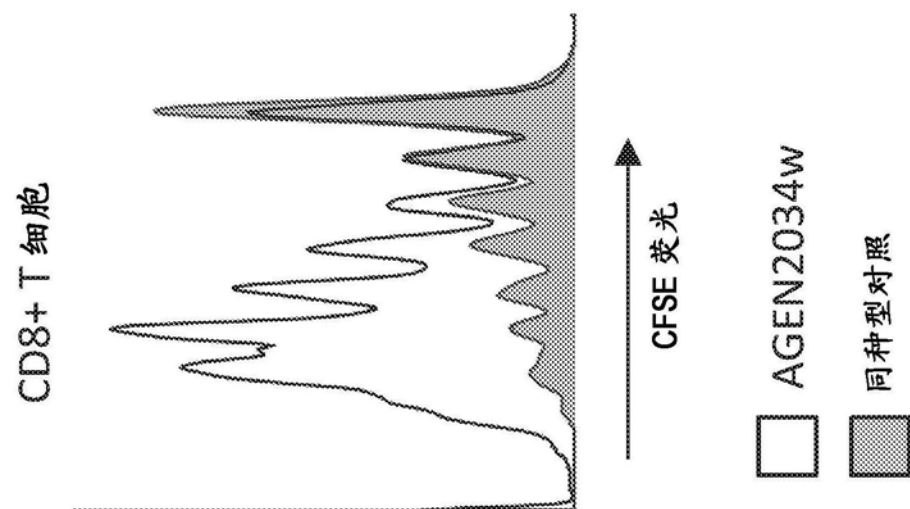


图7B

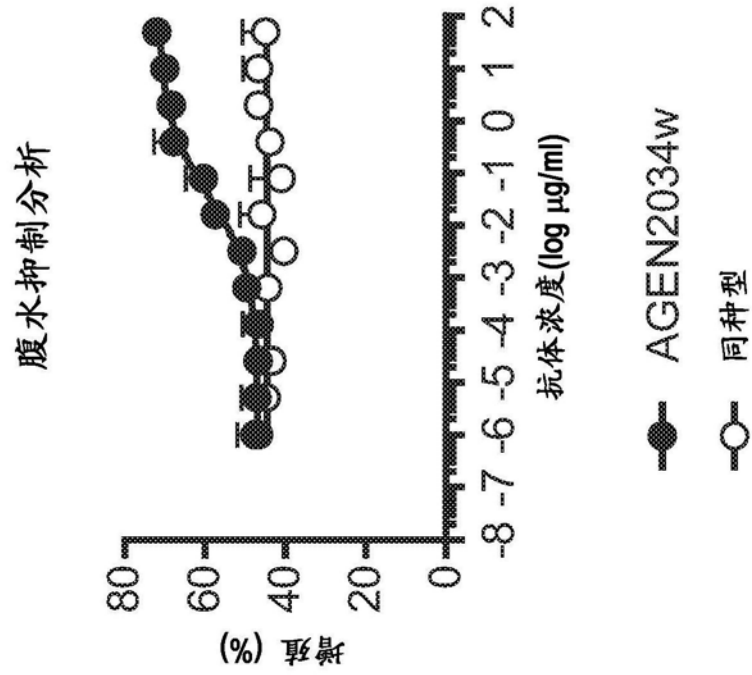


图7C

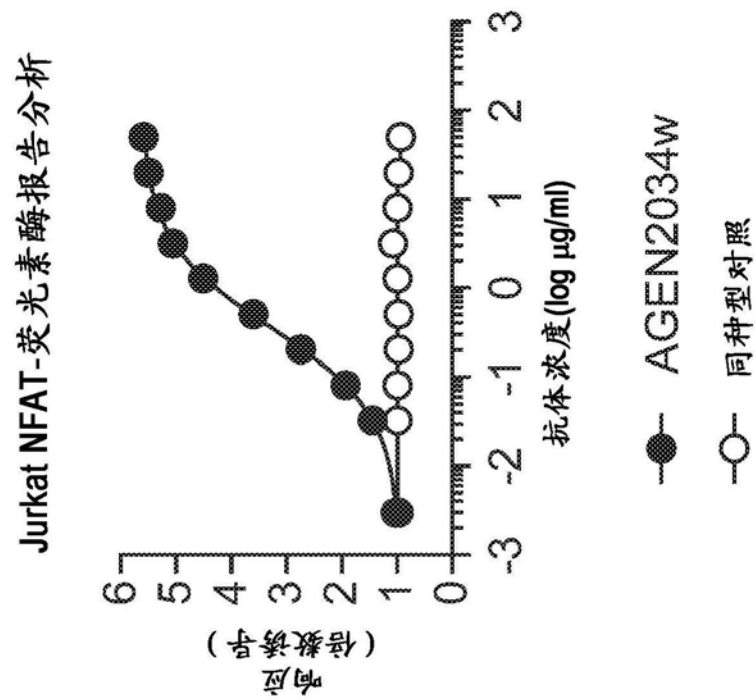


图8

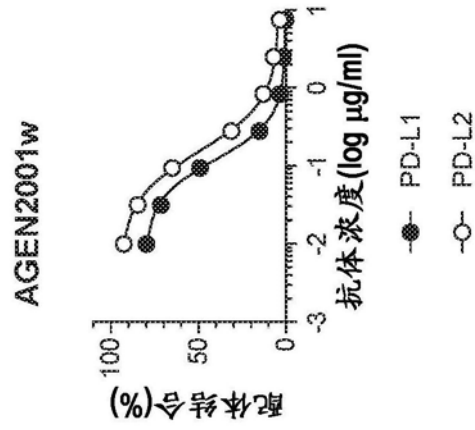


图9A

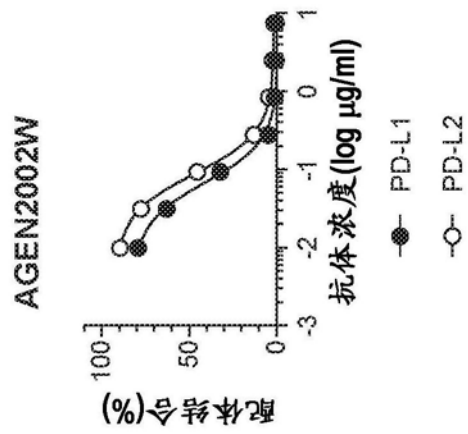


图9B

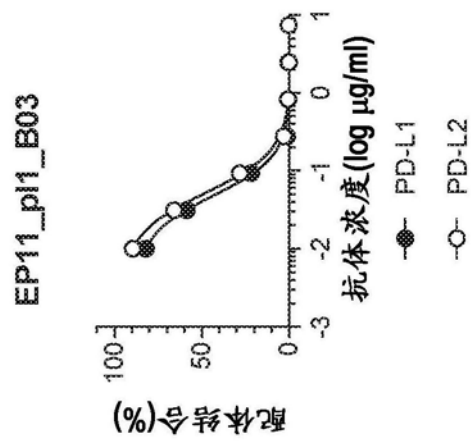


图9C

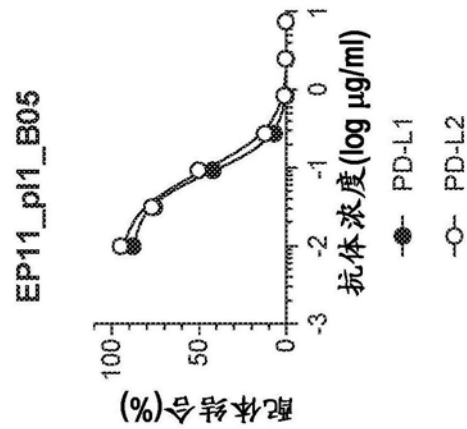


图9D

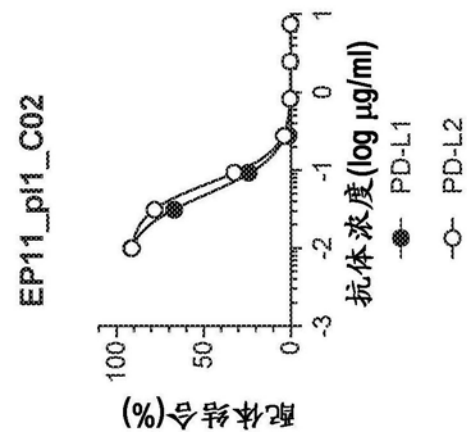


图9E

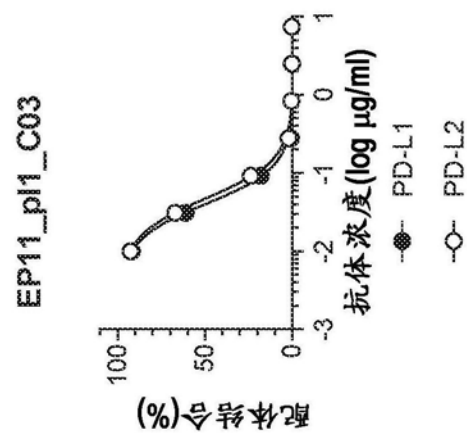


图9F

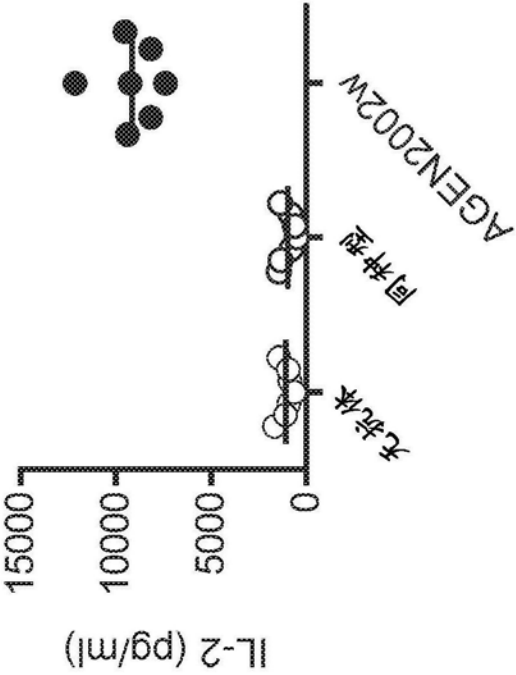


图10