



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 105339389 A

(43) 申请公布日 2016. 02. 17

(21) 申请号 201480036088. 0

(22) 申请日 2014. 05. 02

(30) 优先权数据

61/818, 755 2013. 05. 02 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 12. 24

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2014/036525 2014. 05. 02

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/179664 EN 2014. 11. 06

(71) 申请人 安奈普泰斯生物有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 D·J·金 M·凯瑞

(74) 专利代理机构 北京商专永信知识产权代理

事务所(普通合伙) 11400

代理人 郭玥 葛强

(51) Int. Cl.

C07K 16/28(2006. 01)

权利要求书4页 说明书27页

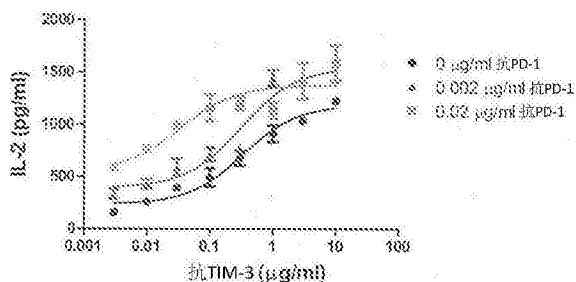
序列表37页 附图3页

(54) 发明名称

针对程序性死亡-1(PD-1)的抗体

(57) 摘要

本发明涉及结合程序性死亡-1(PD-1)蛋白的分离的免疫球蛋白重链多肽和分离的免疫球蛋白轻链多肽。本发明提供了PD-1结合剂,其包括上述免疫球蛋白重链多肽和免疫球蛋白轻链多肽。本发明还提供了相关的载体、组合物以及使用所述PD-1结合剂来治疗癌症或感染性疾病的方法。



1. 一种分离的免疫球蛋白重链多肽,其包括 SEQ ID NO:1 所示的互补决定区 1(CDR) 氨基酸序列,SEQ ID NO:2 所示的 CDR2 氨基酸序列,和 SEQ ID NO:3 所示的 CDR3 氨基酸序列,其中任选地

- (a) SEQ ID NO:1 的第 9 位残基被不同的氨基酸残基替换,
- (b) SEQ ID NO:2 的第 7、8 和 9 位残基中的一个或多个被不同的氨基酸残基替换,
- (c) SEQ ID NO:3 的第 1、2 和 5 位残基中的一个或多个被不同的氨基酸残基替换,或者
- (d) (a) 至 (c) 项的任意组合。

2. 根据权利要求 1 所述的分离的免疫球蛋白重链多肽,其包括 SEQ ID NO:1 所示的 CDR1 氨基酸序列,SEQ ID NO:2 所示的 CDR2 氨基酸序列,和 SEQ ID NO:3 所示的 CDR3 氨基酸序列,但是 SEQ ID NO:1 的第 9 位残基被不同的氨基酸残基替换。

3. 根据权利要求 2 所述的分离的免疫球蛋白重链多肽,其中 SEQ ID NO:1 的第 9 位残基被甲硫氨酸 (M) 残基替换。

4. 根据权利要求 1 至 3 中的任一项所述的分离的免疫球蛋白重链多肽,其包括 SEQ ID NO:1 所示的 CDR1 氨基酸序列,SEQ ID NO:2 所示的 CDR2 氨基酸序列,和 SEQ ID NO:3 所示的 CDR3 氨基酸序列,但是 SEQ ID NO:2 的第 7、8 和 9 位残基中的一个或多个被不同的氨基酸残基替换。

5. 根据权利要求 4 所述的分离的免疫球蛋白重链多肽,其中

- (a) SEQ ID NO:2 的第 7 位残基被天冬酰胺 (N) 残基替换,
- (b) SEQ ID NO:2 的第 8 位残基被丝氨酸 (S) 残基替换,
- (c) SEQ ID NO:3 的第 9 位残基被苏氨酸 (T) 残基替换,或者
- (d) (a) 至 (c) 项的任意组合。

6. 根据权利要求 1 至 5 中的任一项所述的分离的免疫球蛋白重链多肽,其包括 SEQ ID NO:1 所示的 CDR1 氨基酸序列,SEQ ID NO:2 所示的 CDR2 氨基酸序列,和 SEQ ID NO:3 所示的 CDR3 氨基酸序列,但是 SEQ ID NO:3 的第 1、2 和 5 位残基中的一个或多个被不同的氨基酸残基替换。

7. 根据权利要求 6 所述的分离的免疫球蛋白重链多肽,其中

- (a) SEQ ID NO:3 的第 1 位残基被谷氨酸 (E) 残基替换,
- (b) SEQ ID NO:3 的第 2 位残基被酪氨酸 (Y) 残基替换,
- (c) SEQ ID NO:3 的第 5 位残基被丝氨酸 (S) 残基替换,或者
- (d) (a) 至 (c) 项的任意组合。

8. 根据权利要求 1 至 7 中的任一项所述的分离的免疫球蛋白重链多肽,其包括 SEQ ID NO:4 至 11 中任一所示的氨基酸序列。

9. 一种分离的免疫球蛋白重链多肽,其包括 SEQ ID NO:12 所示的互补决定区 1(CDR) 氨基酸序列,SEQ ID NO:13 所示的 CDR2 氨基酸序列,和 SEQ ID NO:14 所示的 CDR3 氨基酸序列,其中任选地

- (a) SEQ ID NO:12 的第 9 位残基被不同的氨基酸残基替换,
- (b) SEQ ID NO:13 的第 8 位残基和 / 或第 9 位残基被不同的氨基酸残基替换,
- (c) SEQ ID NO:14 的第 5 位残基被不同的氨基酸残基替换,或者
- (d) (a) 至 (c) 项的任意组合。

10. 根据权利要求 9 所述的分离的免疫球蛋白重链多肽,其包括 SEQ ID NO:12 所示的 CDR1 氨基酸序列,SEQ ID NO:13 所示的 CDR2 氨基酸序列,和 SEQ ID NO:14 所示的 CDR3 氨基酸序列,但是 SEQ ID NO:12 的第 9 位残基被不同的氨基酸残基替换。

11. 根据权利要求 10 所述的分离的免疫球蛋白重链多肽,其中 SEQ ID NO:12 的第 9 位残基被亮氨酸 (L) 残基替换。

12. 根据权利要求 9 至 11 中的任一项所述的分离的免疫球蛋白重链多肽,其包括 SEQ ID NO:12 所示的 CDR1 氨基酸序列,SEQ ID NO:13 所示的 CDR2 氨基酸序列,和 SEQ ID NO:14 所示的 CDR3 氨基酸序列,但是 SEQ ID NO:13 的第 8 位残基和 / 或第 9 位残基被不同的氨基酸残基替换。

13. 根据权利要求 12 所述的分离的免疫球蛋白重链多肽,其中

(a) SEQ ID NO:13 的第 8 位残基被酪氨酸 (Y) 残基替换,

(b) SEQ ID NO:13 的第 9 位残基被丙氨酸 (A) 残基替换。

14. 根据权利要求 9 至 13 中的任一项所述的分离的免疫球蛋白重链多肽,其包括 SEQ ID NO:12 所示的 CDR1 氨基酸序列,SEQ ID NO:13 所示的 CDR2 氨基酸序列,和 SEQ ID NO:14 所示的 CDR3 氨基酸序列,但是 SEQ ID NO:3 的第 5 位残基被不同的残基替换。

15. 根据权利要求 15 所述的分离的免疫球蛋白重链多肽,其中 SEQ ID NO:14 的第 5 位残基被苏氨酸 (T) 残基替换。

16. 根据权利要求 1 至 7 中的任一项所述的分离的免疫球蛋白重链多肽,其包括 SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17 或者 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列。

17. 一种分离的免疫球蛋白重链多肽,其包括 SEQ ID NO:19 所示的互补决定区 1 (CDR) 氨基酸序列,SEQ ID NO:20 所示的 CDR2 氨基酸序列,和 SEQ ID NO:21 所示的 CDR3 氨基酸序列。

18. 根据权利要求 17 所述的分离的免疫球蛋白重链多肽,其包括 SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24 或者 SEQ ID NO:25 所示的氨基酸序列。

19. 一种分离的免疫球蛋白重链多肽,其包括与 SEQ ID NO:4-11、SEQ ID NO:15-18 和 SEQ ID NO:22-25 中的任一具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。

20. 一种分离的免疫球蛋白轻链多肽,其包括 SEQ ID NO:26 所示的互补决定区 1 (CDR) 氨基酸序列和 SEQ ID NO:27 所示的 CDR2 氨基酸序列。

21. 根据权利要求 20 所述的分离的免疫球蛋白轻链多肽,其包括 SEQ ID NO:28 或者 SEQ ID NO:29 所示的氨基酸序列。

22. 一种分离的免疫球蛋白轻链多肽,其包括 SEQ ID NO:30 所示的互补决定区 1 (CDR) 氨基酸序列和 SEQ ID NO:31 所示的 CDR2 氨基酸序列,其中任选地,SEQ ID NO:30 的第 12 位残基被不同的氨基酸残基替换。

23. 根据权利要求 22 所述的分离的免疫球蛋白轻链多肽,其中 SEQ ID NO:30 的第 12 位残基被不同的氨基酸残基替换。

24. 根据权利要求 23 所述的分离的免疫球蛋白轻链多肽,其中 SEQ ID NO:30 的第 12 位残基被苏氨酸 (T) 残基替换。

25. 根据权利要求 22 至 24 中的任一项所述的分离的免疫球蛋白轻链多肽,其包括 SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33 或者 SEQ ID NO:34 所示的氨基酸序列。

26. 一种分离的免疫球蛋白轻链多肽,其包括 SEQ ID NO:35 所示的互补决定区 1 (CDR) 氨基酸序列,SEQ ID NO:36 所示的 CDR2 氨基酸序列,和 SEQ ID NO:37 所示的 CDR3 氨基酸序列,其中任选地,

(a) SEQ ID NO:36 的第 5 位残基被不同的氨基酸残基替换,和 / 或

(b) SEQ ID NO:37 的第 4 位残基被不同的氨基酸残基替换。

27. 根据权利要求 26 所述的分离的免疫球蛋白轻链多肽,其包括 SEQ ID NO:35 所示的 CDR1 氨基酸序列,SEQ ID NO:36 所示的 CDR2 氨基酸序列,和 SEQ ID NO:37 所示的 CDR3 氨基酸序列,但是 SEQ ID NO:36 的第 5 位残基被不同的氨基酸残基替换。

28. 根据权利要求 27 所述的分离的免疫球蛋白轻链多肽,其中 SEQ ID NO:36 的第 5 位残基被亮氨酸 (L) 残基替换。

29. 根据权利要求 26 至 28 中的任一项所述的分离的免疫球蛋白轻链多肽,其包括 SEQ ID NO:35 所示的 CDR1 氨基酸序列,SEQ ID NO:36 所示的 CDR2 氨基酸序列,和 SEQ ID NO:37 所示的 CDR3 氨基酸序列,但是 SEQ ID NO:37 的第 4 位残基被不同的氨基酸残基替换。

30. 根据权利要求 29 所述的分离的免疫球蛋白轻链多肽,其中 SEQ ID NO:37 的第 4 位残基被天冬酰胺 (N) 残基替换。

31. 根据权利要求 26 至 30 中的任一项所述的分离的免疫球蛋白轻链多肽,其包括 SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40 或者 SEQ ID NO:41 所示的氨基酸序列。

32. 一种分离的免疫球蛋白轻链多肽,其包括与 SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40 或者 SEQ ID NO:41 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。

33. 一种分离的或纯化的核酸序列,所述核酸序列编码权利要求 1 至 19 中任一项所述的分离的免疫球蛋白重链多肽。

34. 一种分离的或纯化的核酸序列,所述核酸序列编码权利要求 20 至 32 中任一项所述的分离的免疫球蛋白轻链多肽。

35. 一种载体,其包含权利要求 33 或者权利要求 34 所述的分离的或纯化的核酸分子。

36. 一种分离的程序性死亡-1 蛋白 (PD-1) 结合剂,其包括 (a) 权利要求 1 至 19 中任一项所述的免疫球蛋白重链多肽和 (b) 权利要求 20 至 32 中任一项所述的免疫球蛋白轻链多肽。

37. 根据权利要求 36 所述的分离的 PD-1 结合剂,其是抗体、抗体缀合物或其抗原结合片段。

38. 根据权利要求 36 或者权利要求 37 所述的分离的 PD-1 结合剂,其是选自 F(ab')₂、Fab'、Fab、Fv、scFv、dsFv、dAb 和单链结合多肽的抗体片段。

39. 一种分离的或纯化的核酸序列,其编码权利要求 36 至 38 中任一项所述的 PD-1 结合剂。

40. 一种载体,其包含权利要求 39 所述的分离的或纯化的核酸序列。

41. 一种分离的细胞,其包含权利要求 40 所述的载体。

42. 一种组合物,其包含权利要求 36 至 38 中任一项所述的分离的 PD-1 结合剂或者权利要求 40 所述的载体以及药学上可接受的载体。

43. 一种在哺乳动物中治疗癌症或感染性疾病的方法,所述方法包括向患有癌症或感

染性疾病的哺乳动物施用有效量的权利要求 42 所述组合物,以此在所述哺乳动物中治疗所述癌症或感染性疾病。

44. 根据权利要求 43 所述的方法,其中将所述组合物施用给患有癌症的哺乳动物。

45. 根据权利要求 44 所述的方法,其中所述癌症是黑色素瘤、肾细胞癌、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、胆囊癌、喉癌、肝癌、甲状腺癌、胃癌、唾液腺癌、前列腺癌、胰腺癌或者 Merkel 细胞瘤。

46. 根据权利要求 43 所述的方法,其中将所述组合物施用给患有感染性疾病的哺乳动物。

47. 根据权利要求 46 所述的方法,其中所述感染性疾病由病毒或细菌引起。

48. 根据权利要求 47 所述的方法,其中所述病毒是人免疫缺陷病毒 (HIV)、呼吸道合胞病毒 (RSV)、流感病毒、登革热病毒或者 B 型肝炎病毒 (HBV)。

49. 根据权利要求 43 至 48 中任一项所述的方法,其中所述 PD-1 结合剂在所述哺乳动物中的半衰期在 30 分钟和 45 天之间。

50. 根据权利要求 43 至 49 中任一项所述的方法,其中所述 PD-1 结合剂以在约 1 皮摩尔 (PM) 和约 100 微摩尔 (μM) 之间的 K_D 结合 PD-1。

51. 根据权利要求 43 至 50 中任一项所述的方法,其还包括向所述哺乳动物施用组合物,所述组合物包括 (i) 结合 TIM-3 蛋白的抗体和 (ii) 药学上可接受的载体。

52. 根据权利要求 43 至 50 中任一项所述的方法,其还包括向所述哺乳动物施用组合物,所述组合物包括 (i) 结合 LAG-3 蛋白的抗体和 (ii) 药学上可接受的载体。

针对程序性死亡-1 (PD-1) 的抗体

[0001] 对以电子形式提交的材料参考并入

[0002] 与本申请同时提交的计算机可读的核苷酸 / 氨基酸序列表通过引用整体并入本申请, 并明确为如下: 一个 45,084 字节的 ASCII (文本) 文件, 命名为“716746_ST25.TXT”, 创建于 2014 年 5 月 1 日。

[0003] 发明背景

[0004] 程序性死亡 1 (PD-1) (也称为程序性细胞死亡 1) 是具有 268 个氨基酸的 I 型跨膜蛋白, 其最初是通过对发生凋亡的小鼠 T 细胞系的消减杂交而被鉴定的 (Ishida et al., *Embo J.*, 11:3887-95(1992))。PD-1 是 T 细胞调节物 CD28/CTLA-4 家族的成员, 并且在活化的 T 细胞、B 细胞和髓系细胞上表达 (Greenwald et al., *Annu. Rev. Immunol.*, 23:515-548(2005); 和 Sharpe et al., *Nat. Immunol.*, 8:239-245(2007))。

[0005] 已经鉴定了 PD-1 的两种配体: PD 配体 1 (PD-L1) 和 PD 配体 2 (PD-L2), 两者都属于 B7 蛋白超家族 (Greenwald et al., 同上)。PD-L1 在多种细胞类型中表达, 包括肺细胞、心脏细胞、胸腺细胞、脾细胞和肾细胞 (参见, 例如, Freeman et al., *J. Exp. Med.*, 192(7):1027-1034(2000); 和 Yamazaki et al., *J. Immunol.*, 169(10):5538-5545(2002))。用脂多糖 (LPS) 和 GM-CSF 处理后巨噬细胞和树突细胞 (DC) 上 PD-L1 的表达上调, 并且经由 T 细胞和 B 细胞受体信号转导, T 细胞和 B 细胞上 PD-L1 的表达得到上调。PD-L1 还在多种鼠肿瘤细胞系中表达 (参见, 例如, Iwai et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 99(19):12293-12297(2002); 和 Blank et al., *Cancer Res.*, 64(3):1140-1145(2004))。与此相反, PD-L2 呈现出更受局限的表达模式并且主要由抗原呈递细胞 (例如, 树突细胞和巨噬细胞) 和某些肿瘤细胞系表达 (参见, 例如, Latchman et al., *Nat. Immunol.*, 2(3):261-238(2001))。无论在肿瘤微环境内的肿瘤细胞、间质或是其他细胞上, 肿瘤中 PD-L1 的高表达都与较差的临床预后相关, 据推测这是由于其在肿瘤中抑制效应 T 细胞并上调调节性 T 细胞 (Treg)。

[0006] PD-1 负调节 T 细胞的活化, 并且这种抑制功能与胞质结构域内的基于免疫受体酪氨酸转换基序 (ITSM) 有联系 (参见, 例如, Greenwald et al., 同上; 和 Parry et al., *Mol. Cell. Biol.*, 25:9543-9553(2005))。PD-1 的缺乏会导致自身免疫。例如, 已经显示 PD-1 敲除的 C57BL/6 小鼠发展出狼疮样综合症 (参见, 例如, Nishimura et al., *Immunity*, 11:141-1151(1999))。在人类中, PD-1 基因上的单核苷酸多态性与以下疾病的高发生率相关: 系统性红斑狼疮、1 型糖尿病、类风湿性关节炎和多发性硬化发展 (参见, 例如, Nielsen et al., *Tissue Antigens*, 62(6):492-497(2003); Bertsias et al., *Arthritis Rheum.*, 60(1):207-218(2009); Ni et al., *Hum. Genet.*, 121(2):223-232(2007); Tahoori et al., *Clin. Exp. Rheumatol.*, 29(5):763-767(2011); 和 Kroner et al., *Ann. Neurol.*, 58(1):50-57(2005))。PD-1 的异常表达也参与一些病理 (例如肿瘤的免疫逃逸和慢性病毒感染) 中的 T 细胞障碍 (参见, 例如, Barber et al., *Nature*, 439:682-687(2006); 和 Sharpe et al., 同上)。

[0007] 最近的研究证实, PD-1 诱导的 T 细胞抑制还参与抑制抗肿瘤免疫。例如, PD-L1 在多种人和小鼠肿瘤上表达, 并且在肿瘤上 PD-1 与 PD-L1 的结合导致 T 细胞的抑制以及肿瘤的免疫逃避和保护作用 (Dong et al., *Nat. Med.*, 8:793-800 (2002))。肿瘤细胞表达 PD-L1 与其在体外抵抗抗肿瘤 T 细胞的裂解作用直接相关 (Dong et al., 同上; and Blank et al., *Cancer Res.*, 64:1140-1145 (2004))。PD-1 敲除小鼠能抵抗肿瘤侵袭 (Iwai et al., *Int. Immunol.*, 17:133-144 (2005)), 并且当来自 PD-1 敲除小鼠的 T 细胞被过继转移到带有肿瘤的小鼠中时, 能高度有效地产生肿瘤排斥 (Blank et al., 同上)。使用单克隆抗体阻断 PD-1 的抑制性信号能增强小鼠中宿主的抗肿瘤免疫 (Iwai et al., 同上; and Hirano et al., *Cancer Res.*, 65:1089-1096 (2005)), 并且肿瘤中 PD-L1 的高表达水平与许多人癌症类型的预后不良相关 (Hamanishi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104:3360-3365 (2007), Brown et al., *J. Immunol.*, 170:1257-1266 (2003); and Flies et al., *Yale Journal of Biology and Medicine*, 84(4):409-421 (2011))。

[0008] 鉴于上述情况, 已经开发出了用于抑制 PD-1 活性来治疗各种类型癌症以及用于免疫增强 (例如, 来治疗感染性疾病) 的策略 (参见, 例如, Ascierto et al., *Clin. Cancer Res.*, 19(5):1009-1020 (2013))。在这方面, 已经开发了靶向 PD-1 的单克隆抗体用于治疗癌症 (参见, 例如, Weber, *Semin. Oncol.*, 37(5):430-4309 (2010); 和 Tang et al., *Current Oncology Reports*, 15(2):98-104 (2013))。例如, 在 I 期临床试验中, nivolumab (也称为 BMS-936558) 在非小细胞肺癌、黑素瘤和肾细胞癌中产生了完全应答或部分应答 (参见, 例如, Topalian, *New England J. Med.*, 366:2443-2454 (2012)), 且其目前正处于 III 期临床试验。MK-3575 是针对 PD-1 的人源化单克隆抗体, 其已经在 I 期临床试验中显示出抗肿瘤活性的证据 (参见, 例如, Patnaik et al., 2012 American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting, 摘要编号 2512)。另外, 最近的证据表明, 靶向 PD-1 的疗法能增强针对病原体 (例如 HIV) 的免疫应答 (参见, 例如, Porichis et al., *Curr. HIV/AIDS Rep.*, 9(1):81-90 (2012))。尽管有这些进展, 然而, 这些潜在疗法在人体中的效力可能是有限的。

[0009] 因此, 需要以高亲和力结合 PD-1 并且有效地中和 PD-1 活性的 PD-1 结合剂 (例如, 抗体)。本发明提供了这样的 PD-1 结合剂。

[0010] 发明概述

[0011] 本发明提供了一种分离的免疫球蛋白重链多肽, 其包括 SEQ ID NO:1 所示的互补决定区 1 (CDR) 氨基酸序列, SEQ ID NO:2 所示的 CDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO:3 所示的 CDR3 氨基酸序列, 其中任选地, (a) SEQ ID NO:1 的第 9 位残基被不同的氨基酸残基替换, (b) SEQ ID NO:2 的第 7、8 和 9 位残基中的一个或多个被不同的氨基酸残基替换, (c) SEQ ID NO:3 的第 1、2 和 5 位残基中的一个或多个被不同的氨基酸残基替换, 或者 (d) (a) 至 (c) 项的任意组合。

[0012] 本发明提供了一种分离的免疫球蛋白重链多肽, 其包括 SEQ ID NO:12 所示的互补决定区 1 (CDR) 氨基酸序列, SEQ ID NO:13 所示的 CDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO:14 所示的 CDR3 氨基酸序列, 其中任选地, (a) SEQ ID NO:12 的第 9 位残基被不同的氨基酸残基替换, (b) SEQ ID NO:13 的第 8 位残基和 / 或第 9 位残基被不同的氨基酸残基替换, (c) SEQ ID NO:14 的第 5 位残基被不同的氨基酸残基替换, 或者 (d) (a) 至 (c) 项的任意组合。

[0013] 本发明提供了一种分离的免疫球蛋白重链多肽,其包括SEQ ID NO:19所示的互补决定区 1(CDR) 氨基酸序列,SEQ ID NO:20所示的 CDR2 氨基酸序列,和 SEQ ID NO:21 所示的 CDR3 氨基酸序列。

[0014] 本发明还提供了一种分离的免疫球蛋白重链多肽,其包括与 SEQ ID NO:4-11、SEQ ID NO:15-18 和 SEQ ID NO:22-25 中的任一具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。

[0015] 本发明提供了一种分离的免疫球蛋白轻链多肽,其包括 SEQ ID NO:26 所示的互补决定区 1(CDR) 氨基酸序列和 SEQ ID NO:27 所示的 CDR2 氨基酸序列。

[0016] 本发明提供了一种分离的免疫球蛋白轻链多肽,其包括 SEQ ID NO:30 所示的互补决定区 1(CDR) 氨基酸序列和 SEQ ID NO:31 所示的 CDR2 氨基酸序列,其中任选地, SEQ ID NO:30 的第 12 位残基被不同的氨基酸残基替换。

[0017] 本发明提供了一种分离的免疫球蛋白轻链多肽,其包括 SEQ ID NO:35 所示的互补决定区 1(CDR) 氨基酸序列,SEQ ID NO:36 所示的 CDR2 氨基酸序列,和 SEQ ID NO:37 所示的 CDR3 氨基酸序列,其中任选地, (a) SEQ ID NO:36 的第 5 位残基被不同的氨基酸残基替换,和 / 或 (b) SEQ ID NO:37 的第 4 位残基被不同的氨基酸残基替换。

[0018] 本发明提供了一种分离的免疫球蛋白轻链多肽,其包括与 SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40 或者 SEQ ID NO:41 具有至少 90% 同一性的氨基酸序列。

[0019] 此外,本发明提供了编码前述免疫球蛋白多肽的分离的或纯化的核酸序列、包括这种核酸序列的载体、包括前述免疫球蛋白多肽的分离的 PD-1 结合剂、编码这种 PD-1 结合剂的核酸序列、包括这种核酸序列的载体、包括这种载体的分离的细胞、包括这种 PD-1 结合剂或者这种载体的并且具有药学上可接受的运载体的组合物、和通过向哺乳动物施用有效量的这种组合物以在哺乳动物中治疗癌症或者感染性疾病的方法。

[0020] 附图简述

[0021] 图 1 示意性地描绘了用于生成如实施例 1 所述的抗 PD-1 单克隆抗体的不同的 PD-1 抗原构建体。

[0022] 图 2 显示的实验结果证实了在存在低水平的抗 PD-1 抗体 APE2058 的条件下,在人 CD4⁺T 细胞 MLR 测定法中抗 TIM-3 的拮抗剂抗体升高的活性。

[0023] 图 3 显示的实验结果证实了在存在低水平的抗 PD-1 的 APE2058 的条件下,在人 CD4⁺T 细胞 MLR 测定法中抗 LAG-3 的拮抗剂抗体升高的活性。

[0024] 发明详述

[0025] 本发明提供了一种分离的免疫球蛋白重链多肽和 / 或一种分离的免疫球蛋白轻链多肽,或其片段(例如,抗原结合片段)。本文使用的术语“免疫球蛋白”或“抗体”,是指见于脊椎动物血液或者其他体液中的蛋白,其被免疫系统用来识别和中和外来物体,例如细菌和病毒。所述多肽是“分离的”,是指其被移除出其天然环境。在优选的实施方案中,免疫球蛋白或抗体是包括至少一个互补决定区(CDR)的蛋白。所述 CDR 形成抗体的“高变区”,其负责抗原结合(在下文中进一步讨论)。完整的免疫球蛋白通常由四条多肽组成:两条具有相同拷贝数的重(H)链多肽和两条具有相同拷贝数的轻(L)链多肽。所述重链中的每一条含有一个 N-末端可变(V_H)区和三个 C-末端恒定(C_H1、C_H2 和 C_H3)区,并且每条轻链含有一个 N-末端可变(V_L)区和一个 C-末端恒定(C_L)区。基于其恒定结构域的氨基酸

序列,可将抗体的轻链归入两种不同类型中的一种,kappa(κ)或lambda(λ)。在典型的免疫球蛋白中,每条轻链通过二硫键连接重链,并且所述两条重链通过二硫键彼此相互连接。所述轻链可变区与所述重链可变区对齐,并且所述轻链恒定区与所述重链的第一恒定区对齐。所述重链的其余恒定区彼此互相对齐。

[0026] 每对轻链和重链的可变区形成抗体的抗原结合位点。所述 V_H 和 V_L 区具有相同的基本结构,其中每个区域包括四个框架(FW或FR)区。本文所用的术语“框架区”是指在所述可变区内的相对保守的氨基酸序列,其中所述框架区位于高变区或者互补决定区(CDR)之间。每个可变结构域有4个框架区,命名为FR1、FR2、FR3和FR4。所述框架区形成 β 片层,其提供所述可变区的结构框架(参见,例如,C. A. Janeway et al. (eds.), Immunobiology, 5th Ed., Garland Publishing, New York, NY(2001))。

[0027] 所述框架区由三个互补决定区(CDR)相连。如上讨论,所述三个CDR,即CDR1、CDR2和CDR3,形成抗体的“高变区”,其负责抗原结合。所述CDR形成环,所述环连接,并且在某些情况下包括部分的,由框架区形成的 β -片层结构。尽管所述轻链和重链的恒定区不直接参与所述抗体与抗原的结合,但是所述恒定区能影响可变区的方向。所述恒定区还显示出各种效应功能,例如通过与效应分子和细胞的相互作用参与抗体依赖的补体介导的裂解或抗体依赖的细胞毒性。

[0028] 理想地,本发明所述分离的免疫球蛋白重链多肽和分离的免疫球蛋白轻链多肽结合PD-1。如上讨论,程序性死亡-1(PD-1)(也称为程序性细胞死亡1)是具有268个氨基酸的I型跨膜蛋白(Ishida et al., 同上)。PD-1是T细胞调节物CD28/CTLA-4家族的成员,并且在活化的T细胞、B细胞和髓系细胞上表达(Greenwald et al., 同上;and Sharpe et al., 同上)。PD-1包括胞外的IgV结构域,后跟短胞外柄、跨膜区和胞内尾。所述胞内尾包含位于基于免疫受体酪氨酸抑制基序和基于免疫受体酪氨酸转换基序中的两个磷酸化位点,其在PD-1负调节T细胞受体信号的能力方面发挥作用(参见,例如,Ishida et al., 同上;和Blank et al., 同上)。本发明所述分离的免疫球蛋白重链多肽和本发明所述分离的免疫球蛋白轻链多肽能形成这样的试剂:其结合PD-1和另一抗原,产生“双反应性”的结合剂(例如,双反应性抗体)。例如,所述试剂能结合PD-1和免疫系统的另一负调节物如,例如,淋巴细胞激活基因3(LAG-3)和/或T细胞免疫球蛋白结构域和粘蛋白结构域3蛋白(TIM-3)。

[0029] 结合PD-1的抗体及其组分在本领域是已知的(参见,例如,美国专利号8,168,757;Topalian et al., 同上;和Patnaik et al., 同上)。抗PD-1的抗体也可购自如,例如,Abcam(Cambridge, MA)等来源。

[0030] 氨基酸“替换”或“取代”是指位于给定位置上的一个氨基酸或者残基被位于相同位置的另一氨基酸或者位于多肽序列内的残基替换。

[0031] 氨基酸大致分为“芳香族”或“脂肪族”。芳香族氨基酸包括芳香环。“芳香族”氨基酸的实例包括组氨酸(H或His)、苯丙氨酸(F或Phe)、酪氨酸(Y或Tyr)和色氨酸(W或Trp)。非芳香族氨基酸大致归为“脂肪族”。“脂肪族”氨基酸的实例包括甘氨酸(G或Gly)、丙氨酸(A或Ala)、缬氨酸(V或Val)、亮氨酸(L或Leu)、异亮氨酸(I或Ile)、甲硫氨酸(M或Met)、丝氨酸(S或Ser)、苏氨酸(T或Thr)、半胱氨酸(C或Cys)、脯氨酸(P或Pro)、谷氨酸(E或Glu)、天冬氨酸(A或Asp)、天冬酰胺(N或Asn)、谷氨酰胺(Q或Gln)、赖氨酸

(K 或 Lys) 和精氨酸 (R 或 Arg)。

[0032] 脂肪族氨基酸可以再分为四个亚组。“大脂肪族非极性亚组”由缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸组成。“脂肪族微极性亚组”由甲硫氨酸、丝氨酸、苏氨酸和半胱氨酸组成。“脂肪族极性 / 带电亚组”由谷氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、赖氨酸和精氨酸组成。“小残基亚组”由甘氨酸和丙氨酸组成。带电 / 极性氨基酸组可以再分为三个亚组：由赖氨酸和精氨酸组成的“带正电亚组”、由谷氨酸和天冬氨酸组成的“带负电亚组”、以及由天冬酰胺和谷氨酰胺组成的“极性亚组”。

[0033] 芳香族氨基酸可以再分为两个亚组：由组氨酸和色氨酸组成的“氮环亚组”和由苯丙氨酸和酪氨酸组成的“苯基亚组”。

[0034] 氨基酸替换或取代可以是保守的、半保守的、或者不保守的。短语“保守的氨基酸取代”或者“保守的突变”是指一个氨基酸被另一具有共同特性的氨基酸替换。一种明确个体氨基酸之间共同特性的功能性方法是分析同源生物相应蛋白之间氨基酸变化的基准化频率 (Schulz and Schirmer, Principles of Protein Structure, Springer-Verlag, New York (1979))。根据这种分析, 可以定义氨基酸的组别, 其中组内的氨基酸优先与彼此交换, 并且因此在其对蛋白质总体结构的影响上彼此最为相似 (Schulz and Schirmer, 同上)。

[0035] 保守的氨基酸取代的实例包括上述亚组内的氨基酸的取代, 例如, 赖氨酸取代精氨酸, 反之亦然, 使得可以保留正电荷; 谷氨酸取代天冬氨酸, 反之亦然, 使得可以保留负电荷; 丝氨酸取代苏氨酸, 使得可以保留游离的 -OH; 以及谷氨酰胺取代天冬酰胺, 使得可以保留游离的 -NH₂。

[0036] “半保守突变”包括上面列出的相同组、而非相同亚组中氨基酸的氨基酸取代。例如, 天冬氨酸对天冬酰胺的取代, 或者天冬酰胺对赖氨酸的取代, 涉及同组内但在不同亚组内的氨基酸。“不保守突变”涉及不同组间的氨基酸取代, 例如, 赖氨酸取代色氨酸, 或者苯丙氨酸取代丝氨酸等。

[0037] 本发明提供了一种免疫球蛋白重链多肽, 其包括 SEQ ID NO:1 所示的互补决定区 1 (CDR) 氨基酸序列, SEQ ID NO:2 所示的 CDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO:3 所示的 CDR3 氨基酸序列。在本发明的一个实施方案中, 所述分离的免疫球蛋白重链多肽包括、由、或者基本上由 SEQ ID NO:1 所示的互补决定区 1 (CDR) 氨基酸序列, SEQ ID NO:2 所示的 CDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO:3 所示的 CDR3 氨基酸序列组成, 其中任选地, (a) SEQ ID NO:1 的第 9 位残基被不同的氨基酸残基替换, (b) SEQ ID NO:2 的第 7、8 和 9 位残基中的一个或多个被不同的氨基酸残基替换, (c) SEQ ID NO:3 的第 1、2 和 5 位残基中的一个或多个被不同的氨基酸残基替换, 或者 (d) (a) 至 (c) 项的任意组合。当本发明所述免疫球蛋白重链多肽基本上由 SEQ ID NO:1 所示的 CDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO:2 所示的 CDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO:3 所示的 CDR3 氨基酸序列和任选的氨基酸替换组成时, 可以在所述多肽中包括另外的不实质性影响所述多肽的组分 (例如, 蛋白部分, 如促进纯化或分离的生物素)。当本发明所述免疫球蛋白重链多肽由 SEQ ID NO:1 所示的 CDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO:2 所示的 CDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO:3 所示的 CDR3 氨基酸序列和任选的氨基酸替换组成时, 所述多肽不包括任何另外的组分 (即, 对于本发明所述免疫球蛋白重链多肽来说不是内源性的组分)。

[0038] 在本发明的一个实施方案中, 所述分离的免疫球蛋白多肽包括 SEQ ID NO:1 所示

的 CDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO:2 所示的 CDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO:3 所示的 CDR3 氨基酸序列, 但是 (a) SEQ ID NO:1 的第 9 位残基被不同的氨基酸残基替换, (b) SEQ ID NO:2 的第 7、8 和 9 位残基中的一个或多个被不同的氨基酸残基替换, (c) SEQ ID NO:3 的第 1、2 和 5 位残基中的一个或多个被不同的氨基酸残基替换, 或者 (d) (a) 至 (c) 项的任意组合。例如, 所述分离的免疫球蛋白重链多肽可以包括 SEQ ID NO:1 所示的 CDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO:2 所示的 CDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO:3 所示的 CDR3 氨基酸序列, 但是 SEQ ID NO:1 的第 9 位残基被不同的氨基酸残基替换以及 SEQ ID NO:2 的第 7、8 和 9 位残基中的一个或多个被不同的氨基酸残基替换。或者, 所述分离的免疫球蛋白重链多肽可以包括 SEQ ID NO:1 所示的 CDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO:2 所示的 CDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO:3 所示的 CDR3 氨基酸序列, 但是 SEQ ID NO:1 的第 9 位残基被不同的氨基酸残基替换, SEQ ID NO:2 的第 7、8 和 9 位残基中的一个或多个被不同的氨基酸残基替换, 以及 SEQ ID NO:3 的第 1、2 和 5 位残基中的一个或多个被不同的氨基酸残基替换。在另一实施方案中, 所述分离的免疫球蛋白重链多肽可以包括 SEQ ID NO:1 所示的 CDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO:2 所示的 CDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO:3 所示的 CDR3 氨基酸序列, 但是 SEQ ID NO:3 的第 1、2 和 5 位残基中的一个或多个被不同的氨基酸残基替换。SEQ ID NO:1 的第 9 位残基, SEQ ID NO:2 的第 7、8 和 9 位残基, 和 SEQ ID NO:3 的第 1、2 和 5 位残基中每个都能被任意合适的氨基酸残基替换, 在每个位置上, 所述任意合适的氨基酸残基可以是相同或不同的。例如, 在第一位的氨基酸残基能被第一不同的氨基酸残基替换, 以及在第二位的氨基酸残基能被第二不同的氨基酸残基替换, 其中所述第一和第二不同的氨基酸残基是相同的或者不同的。

[0039] 在一个实施方案中, 所述分离的免疫球蛋白重链多肽包括 SEQ ID NO:1 所示的 CDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO:2 所示的 CDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO:3 所示的 CDR3 氨基酸序列, 但是 SEQ ID NO:1 的第 9 位残基被甲硫氨酸 (M) 残基替换。在另一实施方案中, 所述分离的免疫球蛋白重链多肽包括 SEQ ID NO:1 所示的 CDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO:2 所示的 CDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO:3 所示的 CDR3 氨基酸序列, 但是 (a) SEQ ID NO:2 的第 7 位残基被天冬酰胺 (N) 残基替换, (b) SEQ ID NO:2 的第 8 位残基被丝氨酸 (S) 残基替换, (c) SEQ ID NO:2 的第 9 位残基被苏氨酸 (T) 残基替换, 或者 (d) (a) 至 (c) 项的任意组合。在另一实施方案中, 所述分离的免疫球蛋白重链多肽包括 SEQ ID NO:1 所示的 CDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO:2 所示的 CDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO:3 所示的 CDR3 氨基酸序列, 但是 (a) SEQ ID NO:3 的第 1 位残基被谷氨酸 (E) 残基替换, (b) SEQ ID NO:3 的第 2 位残基被酪氨酸 (Y) 残基替换, (c) SEQ ID NO:3 的第 5 位残基被丝氨酸 (S) 残基替换, 或者 (d) (a) 至 (c) 项的任意组合。

[0040] 上述示例性免疫球蛋白重链多肽可以包括以下任一氨基酸序列: SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10 或 SEQ ID NO:11。

[0041] 本发明提供了一种分离的免疫球蛋白重链多肽, 其包括、基本上由、或者由 SEQ ID NO:12 所示的互补决定区 1 (CDR) 氨基酸序列, SEQ ID NO:13 所示的 CDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO:14 所示的 CDR3 氨基酸序列组成, 其中任选地, (a) SEQ ID NO:12 的第 9 位残基被不同的氨基酸残基替换, (b) SEQ ID NO:13 的第 8 位残基和 / 或第 9 位残基被不同的氨基

酸残基替换, (c) SEQ ID NO:14 的第 5 位残基被不同的氨基酸残基替换, 或者 (d) (a) 至 (c) 项的任意组合。当本发明所述免疫球蛋白重链多肽基本上由 SEQ ID NO:12 所示的 CDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO:13 所示的 CDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO:14 所示的 CDR3 氨基酸序列和任选的氨基酸替换组成时, 可以在所述多肽中包括另外的不实质性影响所述多肽的组分 (例如, 蛋白部分如促进纯化或分离的生物素)。当本发明所述免疫球蛋白重链多肽由 SEQ ID NO:12 所示的 CDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO:13 所示的 CDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO:14 所示的 CDR3 氨基酸序列和任选的氨基酸替换组成时, 所述多肽不包括任何另外的组分 (即, 对于本发明所述免疫球蛋白重链多肽来说不是内源性的组分)。

[0042] 在一个实施方案中, 所述分离的免疫球蛋白重链多肽可以包括 SEQ ID NO:12 所示的 CDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO:13 所示的 CDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO:14 所示的 CDR3 氨基酸序列, 但是 (a) SEQ ID NO:12 的第 9 位残基被不同的氨基酸残基替换, (b) SEQ ID NO:13 的第 8 位残基和 / 或第 9 位残基被不同的氨基酸残基替换, (c) SEQ ID NO:14 的第 5 位残基被不同的氨基酸残基替换, 或者 (d) (a) 至 (c) 项的任意组合。例如, 所述分离的免疫球蛋白重链多肽可以包括 SEQ ID NO:12 所示的 CDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO:13 所示的 CDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO:14 所示的 CDR3 氨基酸序列, 但是 SEQ ID NO:12 的第 9 位残基被不同的氨基酸残基替换, SEQ ID NO:13 的第 8 位残基, 和 SEQ ID NO:13 的第 9 位残基被不同的氨基酸残基替换。或者, 所述分离的免疫球蛋白重链多肽可以包括 SEQ ID NO:12 所示的 CDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO:13 所示的 CDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO:14 所示的 CDR3 氨基酸序列, 但是 SEQ ID NO:12 的第 9 位残基被不同的氨基酸残基替换以及 SEQ ID NO:14 的第 5 位残基被不同的氨基酸残基替换。在另一实施方案中, 所述分离的免疫球蛋白重链多肽可以包括 SEQ ID NO:12 所示的 CDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO:13 所示的 CDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO:14 所示的 CDR3 氨基酸序列, 但是 SEQ ID NO:12 的第 9 位残基被不同的氨基酸残基替换, SEQ ID NO:13 的第 8 位残基被不同的氨基酸残基替换, SEQ ID NO:13 的第 9 位残基被不同的氨基酸残基替换, 以及 SEQ ID NO:14 的第 5 位残基被不同的氨基酸残基替换。SEQ ID NO:12 的第 9 位残基, SEQ ID NO:13 的第 8 和 9 位残基, 和 SEQ ID NO:14 的第 5 位残基中每个都能被任意合适的氨基酸残基替换, 在每个位置上, 所述任意合适的氨基酸残基可以是相同或不同的。例如, 在第一位的氨基酸残基能被第一不同的氨基酸残基替换, 以及在第二位的氨基酸残基能被第二不同的氨基酸残基替换, 其中所述第一第二不同的氨基酸残基是相同的或者不同的。在一个实施方案中, 所述分离的免疫球蛋白重链多肽包括 SEQ ID NO:12 所示的 CDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO:13 所示的 CDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO:14 所示的 CDR3 氨基酸序列, 但是 SEQ ID NO:12 的第 9 位残基被亮氨酸 (L) 残基替换。在另一实施方案中, 所述分离的免疫球蛋白重链多肽包括 SEQ ID NO:12 所示的 CDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO:13 所示的 CDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO:14 所示的 CDR3 氨基酸序列, 但是 (a) SEQ ID NO:13 的第 8 位残基被酪氨酸 (Y) 残基替换, 和 / 或 (b) SEQ ID NO:13 的第 9 位残基被丙氨酸 (A) 残基替换。在另一实施方案中, 所述分离的免疫球蛋白重链多肽包括 SEQ ID NO:12 所示的 CDR1 氨基酸序列, SEQ ID NO:13 所示的 CDR2 氨基酸序列, 和 SEQ ID NO:14 所示的 CDR3 氨基酸序列, 但是 SEQ ID NO:14 的第 5 位残基被苏氨酸 (T) 残基替换。

[0043] 上述示范性免疫球蛋白重链多肽可以包括以下任一氨基酸序列: SEQ ID NO:15、

SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17 或 SEQ ID NO:18。

[0044] 本发明提供了一种分离的免疫球蛋白重链多肽,其包括、基本上由、或者由 SEQ ID NO:19 所示的互补决定区 1(CDR) 氨基酸序列,SEQ ID NO:20 所示的 CDR2 氨基酸序列,和 SEQ ID NO:21 所示的 CDR3 氨基酸序列组成。当本发明所述免疫球蛋白重链多肽基本上由 SEQ ID NO:19 所示的 CDR1 氨基酸序列,SEQ ID NO:20 所示的 CDR2 氨基酸序列,和 SEQ ID NO:21 所示的 CDR3 氨基酸序列组成时,可以在所述多肽中包括另外的不实质性影响所述多肽的组分(例如,蛋白部分,如促进纯化或分离的生物素)。当本发明所述免疫球蛋白重链多肽由 SEQ ID NO:19 所示的 CDR1 氨基酸序列,SEQ ID NO:20 所示的 CDR2 氨基酸序列,和 SEQ ID NO:21 所示的 CDR3 氨基酸序列组成时,所述多肽不包括任何另外的组分(即,对于本发明所述免疫球蛋白重链多肽来说不是内源性的组分)。上述示例性免疫球蛋白重链多肽可以包括以下任一氨基酸序列:SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24 或 SEQ ID NO:25。

[0045] 此外,可以在上述免疫球蛋白重链多肽中插入一个或多个氨基酸。可以在所述免疫球蛋白重链多肽的氨基酸序列中插入任意数量的任意合适的氨基酸。在这方面,可以在所述免疫球蛋白重链多肽的氨基酸序列中插入至少一个氨基酸(例如,2 个或多个,5 个或多个,或者 10 个或多个氨基酸),但不超过 20 个氨基酸(例如,18 个或更少,15 个或更少,或者 12 个或更少的氨基酸)。优选地,在所述免疫球蛋白重链多肽的氨基酸序列中插入 1-10 个氨基酸(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸)。在这方面,可以在任意上述免疫球蛋白重链多肽的任意合适的位置插入氨基酸。优选地,在所述免疫球蛋白重链多肽的 CDR(例如,CDR1、CDR2 或 CDR3) 中插入氨基酸。

[0046] 本发明提供了一种分离的免疫球蛋白重链多肽,其包括具有与 SEQ ID NO:4-11、SEQ ID NO:15-18 和 SEQ ID NO:22-25 中的任一项至少 90% 同一性(例如,至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或者 100% 同一性)的氨基酸序列。可以通过将目的核酸或者目的氨基酸的序列与参考的核酸或氨基酸序列进行比较来确定本文所述的核酸或氨基酸序列的“同一性”。同一性百分数是用目的序列和参考序列间相同的(即,同一的)核苷酸或者氨基酸残基的数量除以最长序列的长度(即,目的序列或者参考序列的长度,以较长者为准)。用于获得最佳比对以及计算两个或多个序列间同一性的一些数学算法是已知的并且结合进一些可用的软件程序中。这些程序的实例包括 CLUSTAL-W、T-Coffee 和 ALIGN(用于比对核酸和氨基酸序列)、BLAST 程序(例如,BLAST2.1、BL2SEQ 及其更高版本)和 FASTA 程序(例如,FASTA3x、FASTM 和 SSEARCH)(用于序列比对和序列相似性检索)。序列比对的算法也在文献中有所公开,例如,Altschul et al., *J. Molecular Biol.*, 215(3):403-410(1990), Beigert et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106(10):3770-3775(2009), Durbin et al., eds., *Biological Sequence Analysis: Probabilistic Models of Proteins and Nucleic Acids*, Cambridge University Press, Cambridge, UK(2009), Soding, *Bioinformatics*, 21(7):951-960(2005), Altschul et al., *Nucleic Acids Res.*, 25(17):3389-3402(1997), 和 Gusfield, *Algorithms on Strings, Trees and Sequences*, Cambridge University Press, Cambridge UK(1997)。

[0047] 本发明提供了一种免疫球蛋白轻链多肽,其包括 SEQ ID NO:26 所示的互补决定区

1(CDR) 氨基酸序列和 SEQ ID NO:27 所示的 CDR2 氨基酸序列。在本发明的一个实施方案中,所述分离的免疫球蛋白轻链多肽包括、基本上由、或者由 SEQ ID NO:26 所示的 CDR1 氨基酸序列和 SEQ ID NO:27 所示的 CDR2 氨基酸序列组成。当本发明所述免疫球蛋白轻链多肽基本上由 SEQ ID NO:26 所示的 CDR1 氨基酸序列和 SEQ ID NO:27 所示的 CDR2 氨基酸序列组成时,可以在所述多肽中包括另外的不实质性影响所述多肽的组分(例如,蛋白部分,如促进纯化或分离的生物素)。当本发明所述免疫球蛋白轻链多肽由 SEQ ID NO:26 所示的 CDR1 氨基酸序列和 SEQ ID NO:27 所示的 CDR2 氨基酸序列组成时,所述多肽不包括任何另外的组分(即,对于本发明所述免疫球蛋白轻链多肽来说不是内源性的组分)。上述示例性免疫球蛋白轻链多肽可以包括 SEQ ID NO:28 或 SEQ ID NO:29。

[0048] 本发明提供了一种分离的免疫球蛋白轻链多肽,其包括 SEQ ID NO:30 所示的互补决定区 1(CDR) 氨基酸序列和 SEQ ID NO:31 所示的 CDR2 氨基酸序列。在本发明的一个实施方案中,所述分离的免疫球蛋白轻链多肽包括、由、基本上由 SEQ ID NO:30 所示的 CDR1 氨基酸序列和 SEQ ID NO:31 所示的 CDR2 氨基酸序列组成,其中任选地,SEQ ID NO:30 的第 12 位残基被不同的氨基酸残基替换。当本发明所述免疫球蛋白轻链多肽基本上由 SEQ ID NO:30 所示的 CDR1 氨基酸序列和 SEQ ID NO:31 所示的 CDR2 氨基酸序列和任选的氨基酸替换组成时,可以在所述多肽中包括另外的不实质影响所述多肽的组分(例如,蛋白部分如促进纯化或分离的生物素)。当本发明所述免疫球蛋白轻链多肽由 SEQ ID NO:30 所示的 CDR1 氨基酸序列和 SEQ ID NO:31 所示的 CDR2 氨基酸序列和任选的氨基酸替换组成时,所述多肽不包括任何另外的组分(即,对于本发明所述免疫球蛋白轻链多肽来说不是内源性的组分)。

[0049] 在这方面,例如,所述分离的免疫球蛋白轻链多肽可以包括 SEQ ID NO:30 所示的 CDR1 氨基酸序列和 SEQ ID NO:31 所示的 CDR2 氨基酸序列,但是 SEQ ID NO:30 的第 12 位残基被不同的氨基酸残基替换。SEQ ID NO:30 的第 12 位残基可以被任意合适的氨基酸残基替换。在一个实施方案中,所述分离的免疫球蛋白轻链多肽可以包括 SEQ ID NO:30 所示的 CDR1 氨基酸序列和 SEQ ID NO:31 所示的 CDR2 氨基酸序列,但是 SEQ ID NO:30 的第 12 位残基被苏氨酸(T) 残基替换。上述示例性免疫球蛋白轻链多肽可以包括以下氨基酸序列中的任一项:SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33 或 SEQ ID NO:34。

[0050] 本发明提供了一种分离的免疫球蛋白轻链多肽,其包括 SEQ ID NO:35 所示的互补决定区 1(CDR) 氨基酸序列,SEQ ID NO:36 所示的 CDR2 氨基酸序列,和 SEQ ID NO:37 所示的 CDR3 氨基酸序列。在一个实施方案中,所述免疫球蛋白轻链多肽包括、基本上由、或者由 SEQ ID NO:35 所示的 CDR1 氨基酸序列,SEQ ID NO:36 所示的 CDR2 氨基酸序列,和 SEQ ID NO:37 所示的 CDR3 氨基酸序列组成,其中任选地,(a)SEQ ID NO:36 的第 5 位残基被不同的氨基酸残基替换,和/或(b)SEQ ID NO:37 的第 4 位残基被不同的氨基酸残基替换。当本发明所述免疫球蛋白轻链多肽基本上由 SEQ ID NO:35 所示的 CDR1 氨基酸序列,SEQ ID NO:36 所示的 CDR2 氨基酸序列,和 SEQ ID NO:37 所示的 CDR3 氨基酸序列和任选的氨基酸替换组成时,可以在所述多肽中包括另外的其不实质性影响所述多肽的组分(例如,蛋白部分如促进纯化或分离的生物素)。当本发明所述免疫球蛋白轻链多肽由 SEQ ID NO:35 所示的 CDR1 氨基酸序列,SEQ ID NO:, 36 所示的 CDR2 氨基酸序列,和 SEQ ID NO:37 所示的 CDR3 氨基酸序列和任选的氨基酸替换组成时,所述多肽不包括任何另外的组分(即,对于

本发明所述免疫球蛋白轻链多肽来说不是内源性的组分)。在这方面,例如,所述分离的免疫球蛋白轻链多肽可以包括 SEQ ID NO:35 所示的 CDR1 氨基酸序列,SEQ ID NO:36 所示的 CDR2 氨基酸序列,和 SEQ ID NO:37 所示的 CDR3 氨基酸序列。或者,所述分离的免疫球蛋白轻链多肽可以包括 SEQ ID NO:35 所示的 CDR1 氨基酸序列,SEQ ID NO:36 所示的 CDR2 氨基酸序列,和 SEQ ID NO:37 所示的 CDR3 氨基酸序列,但是 (a)SEQ ID NO:36 的第 5 位残基被不同的氨基酸残基替换,和 / 或 (b)SEQ ID NO:37 的第 4 位残基被不同的氨基酸残基替换。SEQ ID NO:36 的第 5 位残基和 SEQ ID NO:37 的第 4 位残基每个都能被任意合适的氨基酸残基替换,在每个位置上,所述任意合适的氨基酸残基可以是相同或不同的。例如,在第一位的氨基酸残基能被第一位的不同的氨基酸残基替换,以及在第二位的氨基酸残基能被第二位的不同的氨基酸残基替换,其中所述第一位和第二位的不同的氨基酸残基是相同的或者不同的。

[0051] 在一个实施方案中,所述分离的免疫球蛋白轻链多肽包括 SEQ ID NO:35 所示的 CDR1 氨基酸序列,SEQ ID NO:36 所示的 CDR2 氨基酸序列,和 SEQ ID NO:37 所示的 CDR3 氨基酸序列,但是 (a)SEQ ID NO:36 的第 5 位残基被亮氨酸 (L) 残基替换,和 / 或 (b)SEQ ID NO:37 的第 4 位残基被天冬酰胺 (N) 残基替换。上述示例性免疫球蛋白轻链多肽可以包括以下任一氨基酸序列:SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40 或者 SEQ ID NO:41。

[0052] 此外,可以在上述免疫球蛋白轻链多肽中插入一个或多个氨基酸。可以在所述免疫球蛋白轻链多肽的氨基酸序列中插入任意数量的任意合适的氨基酸。在这方面,可以在所述免疫球蛋白轻链多肽的氨基酸序列中插入至少一个氨基酸(例如,2 个或更多个,5 个或更多个,或者 10 个或更多个氨基酸),但不超过 20 个氨基酸(例如,18 个或更少,15 个或更少,或者 12 个或更少的氨基酸)。优选地,在所述免疫球蛋白轻链多肽的氨基酸序列中插入 1-10 个氨基酸(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个氨基酸)。在这方面,可以在上述免疫球蛋白轻链多肽的任意合适的位置插入氨基酸。优选地,在所述免疫球蛋白轻链多肽的 CDR(例如,CDR1、CDR2 或 CDR3) 中插入氨基酸。

[0053] 本发明提供了一种分离的免疫球蛋白轻链多肽,其包括氨基酸序列,所述氨基酸序列具有与 SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:40 和 SEQ ID NO:41 中的任一项至少 90% 的同一性(例如,至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99%、或者 100% 的同一性)。可以通过使用本文所述的方法来确定本文所述的核酸或氨基酸序列的“同一性”。

[0054] 本发明提供了一种分离的程序性死亡-1 (PD-1) 结合剂,其包括,基本上由,或者由本文所述的新的分离的氨基酸序列组成。“程序性死亡-1 (PD-1) - 结合剂”是指特异性结合所述程序性死亡蛋白 1 (PD-1) 的分子,优选蛋白质分子。优选地,所述 PD-1 结合剂是抗体或其片段(例如,免疫原性片段)。本发明所述分离的 PD-1 结合剂包括、基本上由、或者由本发明所述分离的免疫球蛋白重链多肽和 / 或本发明所述分离的免疫球蛋白轻链多肽组成。在一个实施方案中,所述分离的 PD-1 结合剂包括、基本上由、或者由本发明所述免疫球蛋白重链多肽或本发明所述免疫球蛋白轻链多肽组成。在另一实施方案中,所述分离的 PD-1 结合剂包括、基本上由、或者由本发明所述免疫球蛋白重链多肽和本发明所述免疫球蛋白轻链多肽组成。

[0055] 本发明不限于这样的分离的 PD-1 结合剂：其包括、基本上由、或者由免疫球蛋白重链多肽和 / 或免疫球蛋白轻链多肽组成，所述多肽具有本文公开的特定氨基酸残基的取代、插入、和 / 或缺失。事实上，只要氨基酸的取代、插入和 / 或删除导致增强或改善所述 PD-1 结合剂的生物活性，本发明所述免疫球蛋白重链多肽和 / 或本发明所述免疫球蛋白轻链多肽的任意氨基酸残基，可以被不同的氨基酸残基，以任意组合进行取代，或者可以被删除或插入。PD-1 结合剂的“生物活性”是指，例如，对 PD-1 或者特定的 PD-1 表位的结合亲和力和、对 PD-1 蛋白结合其配体 PD-L1 和 PD-L2 的中和或抑制、对 PD-1 蛋白体内活性（例如， IC_{50} ）的中和或抑制、药代动力学和交叉反应性（例如，与 PD-1 蛋白的非人同源物或直系同源体，或者与其他蛋白或组织的交叉反应性）。本领域中认可的抗原结合剂的其他生物特性或特征包括，例如，亲合性、选择性、可溶性、折叠性、免疫毒性、表达和制剂。可以使用以下标准技术观察、测量、和 / 或评估上述特性或特征，所述标准技术包括，但不限于，ELISA、竞争性 ELISA、表面等离子共振分析法 (BIACORE™)，或者 KINEXA™、体外或体内中和测定法、受体-配体结合测定法、细胞因子或生长因子产生和 / 或分泌测定法、和信号转导和免疫组织化学测定法。

[0056] 本文针对 PD-1 结合剂的活性使用的术语“抑制”或“中和”，是指基本上拮抗、阻止、防止、限制、减慢、破坏、改变、消除、停止或逆转例如，PD-1 蛋白的生物活性，或者与 PD-1 蛋白相关的疾病或病症的进程或严重程度。优选地，本发明所述分离的 PD-1 结合剂将 PD-1 蛋白活性抑制或中和了至少约 20%、约 30%、约 40%、约 50%、约 60%、约 70%、约 80%、约 90%、约 95%、约 100%，或者由任意两个前述值界定的范围。

[0057] 本发明所述分离的 PD-1 结合剂可以如本文所述是完整的抗体，或者抗体片段。本文中互换使用术语“抗体的片段”、“抗体片段”和“抗体的功能片段”来表示抗体的一个或多个保留特异性结合抗原的能力的片段（一般地，参见，Holliger et al., Nat. Biotech., 23(9):1126-1129(2005)）。所述分离的 PD-1 结合剂可以含有 PD-1 结合抗体的任意片段。理想地，所述抗体片段包括，例如，一个或多个 CDR、可变区（或其部分）、恒定区（或其部分）、或其组合。抗体片段的实例包括，但不限于，(i) Fab 片段，其是由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_H1 结构域组成的单价片段，(ii) $F(ab')_2$ 片段，其是双价片段，包括两个由铰链区的二硫键相连的 Fab 片段，(iii) 由抗体单臂的 V_L 和 V_H 结构域组成的 Fv 片段，(iv) 通过使用温和的还原条件打破 $F(ab')_2$ 片段的二硫键而产生的 Fab' 片段，(v) 由二硫键稳定的 Fv 片段 (dsFv)，和 (vi) 域抗体 (dAb)，其是特异性结合抗原的抗体单可变区结构域 (VH 或 VL) 多肽。

[0058] 在所述分离的 PD-1 结合剂包括所述免疫球蛋白重链或轻链多肽的片段的实施方案中，只要所述片段结合、并且优选地抑制 PD-1 蛋白的活性，则所述片段可以是任意大小的。在这方面，理想地，所述免疫球蛋白重链多肽的片段包括介于约 5 个和 18 个之间（例如，约 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18 个，或者由任意两个前述值界定的范围）的氨基酸。同样地，理想地，所述免疫球蛋白轻链多肽的片段包括介于约 5 个和 18 个之间（例如，约 5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18 个，或者由任意两个前述值界定的范围）的氨基酸。

[0059] 当所述 PD-1 结合剂是抗体或抗体片段时，理想地，所述抗体或抗体片段包括任意合适的类的重链恒定区 (Fc)。优选地，所述抗体或抗体片段包括基于野生型 IgG1、IgG2 或

IgG4 抗体的重链恒定区,或其变体。

[0060] 所述 PD-1 结合剂还可以是单链抗体片段。单链抗体片段的实例包括,但不限于,(i) 单链 Fv(scFv),其是由所述 Fv 片段(即, V_L 和 V_H) 的两个结构域组成的单价分子,所述两个结构域由合成的接头连接,其使得能够将所述两个结构域合成为单多肽链(参见,例如, Bird et al., Science, 242:423-426(1988);Huston et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883(1988);和 Osbourn et al., Nat. Biotechnol., 16:778(1998)) 和 (ii) 双抗体,其是多肽链的二聚体,其中每条多肽链包括通过肽接头连接至 V_L 的 V_H ,所述肽接头短至不能允许同一多肽链上的 V_H 和 V_L 之间发生配对,从而驱使不同的 V_H - V_L 多肽链上的互补结构域之间发生配对,以产生具有两个功能性抗原结合位点的二聚体分子。抗体片段是本领域已知的,详细描述请见例如,美国专利公开号 2009/0093024A1。

[0061] 所述分离的 PD-1 结合剂还可以是胞内抗体或其片段。胞内抗体是在胞内表达并在胞内发挥作用的抗体。胞内抗体通常缺乏二硫键并且能够通过其特异性结合活性调节靶基因的表达或活性。胞内抗体包括单结构域片段,如分离的 V_H 和 V_L 结构域以及 scFv。胞内抗体可以包括连接该胞内抗体的 N 或 C 末端的亚细胞运输信号,以允许在定位有靶蛋白的亚细胞室中以高浓度表达。在与靶基因相互作用时,胞内抗体调节靶蛋白的功能和/或通过例如加速靶蛋白的降解以及将所述靶蛋白隔离进非生理性亚细胞室等机制,达到表型/功能的敲除。胞内抗体介导的基因失活的其他机制会取决于所述胞内抗体所针对的表位,例如结合靶蛋白上的催化位点或者结合参与蛋白-蛋白、蛋白-DNA、或者蛋白-RNA 相互作用的表位。

[0062] 所述分离的 PD-1 结合剂还可以是抗体缀合物。在这方面,所述分离的 PD-1 结合剂可以是 (1) 抗体、替换的支架、或其片段,和 (2) 蛋白或者包括所述 PD-1 结合剂的非蛋白质部分的缀合物。例如,所述 PD-1 结合剂可以是完全的或部分的缀合肽、荧光分子或化学治疗剂的抗体。

[0063] 所述分离的 PD-1 结合剂可以是,或者可以获自,人抗体、非人抗体、或者嵌合抗体。“嵌合的”是指包括人和非人区域的抗体或其片段。优选地,所述分离的 PD-1 结合剂是人源化抗体。“人源化”抗体是包括人抗体支架和至少一个获自或者来源于非人抗体的 CDR 的单克隆抗体。非人抗体包括从任意非人的动物如,例如,啮齿类动物(例如,小鼠或大鼠)分离的抗体。人源化抗体可以包括一个、两个、或者三个获自或者来源于非人抗体的 CDR。在本发明优选的实施方案中,本发明所述 PD-1 结合剂的 CDRH3 获自或者来源于小鼠单克隆抗体,而本发明所述 PD-1 结合剂的其余可变区和恒定区获自或者来源于人单克隆抗体。

[0064] 可以以任意方式,包括经由体外来源(例如,杂交瘤或者以重组的方式生成抗体的细胞系)和体内来源(例如,啮齿动物),获得人抗体、非人抗体、嵌合抗体、或者人源化抗体。用于产生抗体的方法是本领域已知的并且描述于,例如, Köhler and Milstein, Eur. J. Immunol., 5:511-519(1976);Harlow and Lane(eds.), Antibodies:A Laboratory Manual, CSH Press(1988);和 Janeway et al. (eds.), Immunobiology, 第 5 版, Garland Publishing, New York, NY(2001)。在某些实施方案中,可以通过使用转基因动物(例如,小鼠)来产生人抗体或者嵌合抗体,其中一个或多个内源性免疫球蛋白基因被一个或多个免疫球蛋白基因替换。内源性抗体基因被人抗体基因有效地替换的转基因小鼠的实例包括,但不限于, Medarex 的 HUMAB-MOUSE™、Kirin 的 TC MOUSE™和 Kyowa

Kirin 的 KM-MOUSE™(参见,例如, Lonberg, Nat. Biotechnol., 23(9):1117-25(2005), 和 Lonberg, Handb. Exp. Pharmacol., 181:69-97(2008))。可以使用本领域已知的任意合适的方法(参见,例如, An, Z. (ed.), Therapeutic Monoclonal Antibodies: From Bench to Clinic, John Wiley&Sons, Inc., Hoboken, New Jersey(2009))产生人源化抗体,包括,例如,将非人的 CDR 移植到人抗体支架上(参见,例如, Kashmiri et al., Methods, 36(1):25-34(2005);和 Hou et al., J. Biochem., 144(1):115-120(2008))。在一个实施方案中,可以通过使用,例如,美国专利申请公开号 2011/0287485A1 中描述的方法,制备人源化抗体。

[0065] 在优选的实施方案中,所述 PD-1 结合剂结合 PD-1 蛋白表位,其阻断 PD-1 结合 PD-L1。本发明还提供了分离的或纯化的 PD-1 蛋白表位,其以间接的或变构的方式阻断 PD-1 结合 PD-L1。

[0066] 本发明还提供一个或多个分离的或纯化的核酸序列,其编码本发明所述免疫球蛋白重链多肽、本发明所述免疫球蛋白轻链多肽、和本发明所述 PD-1 结合剂。

[0067] 术语“核酸序列”意在包括 DNA 或 RNA 的聚合物,即,多核苷酸,其可以是单链或者双链并且其可以含有非天然的或者改变的核苷酸。本文所用的术语“核酸”和“多核苷酸”是指任意长度的聚合形式的核苷酸、核糖核苷酸(RNA)或者脱氧核糖核苷酸(DNA)。这些术语是指分子的一级结构,并且因此包括双链和单链 DNA,以及双链和单链 RNA。作为等同物,所述术语包括从核苷酸类似物制成的 RNA 或 DNA 类似物和修饰的多核苷酸,例如,但不限于,甲基化的和/或封端的多核苷酸。尽管本领域已知许多其他的连接(例如,硫代磷酸酯、硼烷磷酸酯(boranophosphates)等),但核酸通常由磷酸键连接以形成核酸序列或多核苷酸。编码本发明所述免疫球蛋白重链多肽的核酸序列包括,例如,SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:44、SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:48、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53、SEQ ID NO:54 和 SEQ ID NO:55。编码本发明所述免疫球蛋白轻链多肽的核酸序列包括,例如,SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60、SEQ ID NO:61、SEQ ID NO:62、SEQ ID NO:63 和 SEQ ID NO:64。

[0068] 本发明另外提供了包括一个或多个编码本发明所述免疫球蛋白重链多肽、本发明所述免疫球蛋白轻链多肽、和/或本发明所述 PD-1 结合剂的核酸序列的载体。所述载体可以是,例如,质粒、附加体、粘粒、病毒载体(例如,逆转录病毒或腺病毒载体)、或噬菌体。合适的载体和制备载体的方法是本领域公知的(参见,例如, Sambrook et al., Molecular Cloning, a Laboratory Manual, 第3版, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N. Y. (2001), 和 Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley&Sons, New York, N. Y. (1994))。

[0069] 除了编码本发明所述免疫球蛋白重多肽、本发明所述免疫球蛋白轻链多肽,和/或本发明所述 PD-1 结合剂的核酸序列,优选地,所述载体包括表达控制序列,例如启动子、增强子、聚腺苷酸化信号、转录终止子、内部核糖体进入位点(IRES)等,以为所述编码序列在宿主细胞中的表达做准备。示例性的表达控制序列在本领域是已知的并且描述于,例如, Goeddel, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Vol. 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990)。

[0070] 来自各种不同来源的许多启动子,包括组成型、诱导型、和可阻遏的启动子在本领域是公知的。启动子的代表性来源包括例如,病毒、哺乳动物、昆虫、植物、酵母和细菌,并且来自这些来源的合适的启动子都是易获得的,或者可以基于从例如,保藏机构(如 ATCC) 以及其他商业的或者个体的来源获得的公开的序列合成制得。启动子可以是单向的(即,以一个方向起始转录)或者双向的(即,以 3' 或 5' 方向起始转录)。启动子的非限制性实例包括,例如, T7 细菌表达系统、pBAD(araA) 细菌表达系统、巨细胞病毒(CMV) 启动子、SV40 启动子、RSV 启动子。诱导型启动子包括,例如,四环素(Tet) 系统(美国专利号 5,464,758 和 5,814,618)、蜕皮激素诱导系统(No et al., Proc. Natl. Acad. Sci., 93:3346-3351(1996))、T-REX™系统(Invitrogen, Carlsbad, CA)、LACSWITCH™系统(Stratagene, San Diego, CA) 和 Cre-ERT 他莫昔芬诱导的重组酶系统(Indra et al., Nuc. Acid. Res., 27:4324-4327(1999); Nuc. Acid. Res., 28:e99(2000); 美国专利号 7,112,715; 和 Kramer&Fussenegger, Methods Mol. Biol., 308:123-144(2005))。

[0071] 本文所用的术语“增强子”是指 DNA 序列,所述 DNA 序列提升例如,以可操作的形式与其连接的核酸序列的转录。增强子可以位于离所述核酸序列的编码区许多千碱基的位置并且能介导与调控因子的结合、DNA 甲基化模式、或者 DNA 结构的变化。来自各种不同来源的许多增强子是本领域公知的,并且可以克隆的多核苷酸形式得到或者在克隆的多核苷酸内(来自,例如,保藏机构如 ATCC 以及其他商业的或个人的来源)。一些包括启动子(例如常用的 CMV 启动子)的多核苷酸还包括增强子序列。增强子可以位于编码序列的上游、之内、或者下游。

[0072] 所述载体还可以包括“选择标记基因”。本文所用的术语“选择标记基因”是指在存在相应的选择剂的条件下,允许细胞表达特异性选择的核酸序列或排除该核酸序列表达的核酸序列。合适的选择标记基因是本领域已知的并且描述于,例如,国际专利申请公开号 WO 1992/008796 和 WO 1994/028143; Wigler et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:3567-3570(1980); O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:1527-1531(1981); Mulligan&Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78:2072-2076(1981); Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol., 150:1-14(1981); Santerre et al., Gene, 30:147-156(1984); Kent et al., Science, 237:901-903(1987); Wigler et al., Cell, 11:223-232(1977); Szybalska&Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 48:2026-2034(1962); Lowy et al., Cell, 22:817-823(1980); 和美国专利号 5,122,464 和 5,770,359。

[0073] 在一些实施方案中,所述载体是“附加型表达载体”或“附加体”,其能够在宿主细胞中复制,并且在存在适当选择压力的条件下,作为染色体外的 DNA 片段持续存在于宿主细胞内(参见,例如, Conese et al., Gene Therapy, 11:1735-1742(2004))。代表性的市售的附加型表达载体包括,但不限于,利用艾伯斯坦巴尔(Epstein Barr)核抗原 1(EBNA1) 和艾伯斯坦巴尔(Epstein Barr)病毒(EBV)的复制起点(oriP)的附加型质粒。来自 Invitrogen(Carlsbad, CA)的载体 pREP4、pCEP4、pREP7 和 pcDNA3.1 以及来自 Stratagene(La Jolla, CA)的 pBK-CMV 载体代表了使用 T 抗原和 SV40 复制起点来代替 EBNA1 和 oriP 的附加型载体的非限制性实例。

[0074] 其他合适的载体包括整合的表达载体,其可以随机整合进宿主细胞的 DNA,或者可

以包括重组位点以使在所述表达载体和所述宿主细胞的染色体之间发生特异性重组。这种整合型表达载体可以利用宿主细胞染色体的内源性表达控制序列来实现目的蛋白的表达。以位点特异性的方式进行整合的载体实例包括,例如,来自 Invitrogen (Carlsbad, CA) 的 flp-in 系统组分(例如, pcDNATM5/FRT), 或者 cre-lox 系统, 例如见于 Stratagene (La Jolla, CA) 的 pExchange-6 核心载体。随机整合进宿主细胞染色体的载体实例包括, 例如, 来自 Invitrogen (Carlsbad, CA) 的 pcDNA3.1 (在不存在 T 抗原的条件下进行整合)、来自 Millipore (Billerica, MA) 的 UCOE、和来自 Promega (Madison, WI) 的 pCI 或 pFN10A (ACT) FLEXITM。

[0075] 还可以使用病毒载体。代表性的市售的病毒表达载体包括, 但不限于, 购自 Crucell 公司(莱顿, 荷兰)的基于腺病毒的 Per. C6 系统、来自 Invitrogen (Carlsbad, CA) 的基于慢病毒的 pLP1、以及来自 Stratagene (La Jolla, CA) 的逆转录病毒载体 pFB-ERV 加 pCFB-EGSH。

[0076] 可在相同的载体上(即, 以顺式方向)将编码本发明所述氨基酸序列的核酸序列提供给细胞。单向启动子可用于控制每个核酸序列的表达。在另一实施方案中, 双向和单向启动子的组合可用于控制多个核酸序列的表达。或者, 可以在单独的载体上(即, 以反式方向)将编码本发明所述氨基酸序列的核酸序列提供给细胞群。在每个单独载体中的每个核酸序列可以包括相同的或不同的表达控制序列。可以将所述单独的载体同时或者先后提供给细胞。

[0077] 可以将包括编码本发明所述氨基酸序列的核酸序列的载体导入能够表达其编码的多肽的宿主细胞, 包括任意合适的原核细胞或真核细胞。这样, 本发明提供了分离的包括本发明所述载体的细胞。优选的宿主细胞能够易于且稳定地生长, 具有相当快的生长速率, 具有良好表征的表达系统, 并且能够进行简单并有效地转化或转染的细胞。

[0078] 合适的原核细胞的实例包括, 但不限于, 来自芽孢杆菌属(例如枯草芽孢杆菌和短芽孢杆菌)、大肠杆菌属(例如大肠杆菌)、假单胞菌属、链霉菌属、沙门氏菌属和欧文氏菌的细胞。特别有用的原核细胞包括大肠杆菌的各类菌株(例如, K12、HB101 (ATCC 号 33694)、DH5 α 、DH10、MC1061 (ATCC 号 53338) 和 CC102)。

[0079] 优选地, 将所述载体引入真核细胞。合适的真核细胞是本领域已知的并且包括, 例如, 酵母细胞、昆虫细胞和哺乳动物细胞。合适的酵母细胞的实例包括来自克鲁维酵母属、毕赤酵母属、鼻孢子菌属、酵母属和裂殖酵母属的细胞。优选的酵母细胞包括, 例如, 酿酒酵母和毕赤酵母。

[0080] 合适的昆虫细胞描述于, 例如, Kitts et al., *Biotechniques*, 14:810-817 (1993); Lucklow, *Curr. Opin. Biotechnol.*, 4:564-572 (1993); 和 Lucklow et al., *J. Virol.*, 67:4566-4579 (1993)。优选的昆虫细胞包括 Sf-9 和 HI5 (Invitrogen, Carlsbad, CA)。

[0081] 优选地, 本发明利用哺乳动物细胞。众多合适的哺乳动物宿主细胞是本领域已知的, 并且许多可从美国标准生物保藏中心 (ATCC, Manassas, VA) 获得。合适的哺乳动物细胞的实例包括, 但不限于, 中国仓鼠卵巢细胞 (CHO) (ATCC 号 CCL61)、CHO DHFR 细胞 (Urlaub et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97:4216-4220 (1980))、人胚肾 (HEK) 293 或 293T 细胞 (ATCC 号 CRL1573) 和 3T3 细胞 (ATCC 号 CCL92)。其他合适的哺乳动物细胞系是

猴 COS-1 (ATCC 号 CRL1650) 和 COS-7 细胞系 (ATCC 号 CRL1651), 以及 CV-1 细胞系 (ATCC 号 CCL70)。另外的示例性哺乳动物宿主细胞包括灵长类细胞系和啮齿类细胞系, 包括转化的细胞系。正常的二倍体细胞、来源于原代组织体外培养的细胞系、以及原代的外植体, 也是合适的。其他合适的哺乳动物细胞系包括, 但不限于, 小鼠神经母细胞瘤 N2A 细胞、HeLa、小鼠 L-929 细胞和 BHK 或 HaK 仓鼠细胞系, 所有这些均从 ATCC 获得。用于选择合适的哺乳动物宿主细胞的方法和用于细胞的转化、培养、扩增、筛选和纯化的方法是本领域已知的。

[0082] 最优选地, 所述哺乳动物细胞是人细胞。例如, 所述哺乳动物细胞可以是人淋巴细胞系或者来源于人淋巴的细胞系, 例如前 B 淋巴细胞来源的细胞系。人淋巴细胞系的实例包括, 但不限于, RAMOS (CRL-1596)、Daudi (CCL-213)、EB-3 (CCL-85)、DT40 (CRL-2111)、18-81 (Jack et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85:1581-1585 (1988))、Raji 细胞 (CCL-86) 及其衍生物。

[0083] 可以通过“转染”、“转化”或“转导”将编码本发明所述氨基酸序列的核酸序列导入细胞。本文所用的“转染”、“转化”或“转导”, 是指通过使用物理或化学方法将一个或多个外源多核苷酸引入宿主细胞。许多转染技术是本领域已知的并且包括, 例如, 磷酸钙-DNA 共沉淀法 (参见, 例如, Murray E. J. (ed.), Methods in Molecular Biology, Vol. 7, Gene Transfer and Expression Protocols, Humana Press (1991)); DEAE-葡聚糖法; 电穿孔法; 阳离子脂质体介导的转染; 钨颗粒微粒子轰击法 (Johnston, Nature, 346:776-777 (1990)); 和磷酸铯-DNA 共沉淀法 (Brash et al., Mol. Cell Biol., 7:2031-2034 (1987))。可以在感染性颗粒在合适的包装细胞中生长之后, 将噬菌体或病毒载体导入宿主细胞, 其中所述包装细胞有很多是可商购的。

[0084] 本发明提供了包括有效量的本发明所述免疫球蛋白重链多肽、本发明所述免疫球蛋白轻链多肽、本发明所述 PD-1 结合剂、本发明所述编码前述任意一种的核酸序列、或者本发明所述包括本发明所述核酸序列的载体的组合物。优选地, 所述组合物是药学上可接受的 (例如, 生理学上可接受的) 组合物, 其包括运载体, 优选药学上可接受的 (例如, 生理学上可接受的) 运载体, 和本发明所述氨基酸序列、抗原结合剂或载体。在本发明上下文中可以使用任意合适的运载体, 并且这样的运载体是本领域公知的。运载体的选择将部分由所述组合物所施用的特定位点以及用于施用所述组合物的特定的方法确定。任选地, 所述组合物可以是无菌的。可以将所述组合物冷冻或冻干用于储存并且临使用前在合适的无菌运载体中复原。按照描述于, 例如, Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (2001) 中的常规技术可以产生所述组合物。

[0085] 本发明还提供了用于治疗任意这样疾病或病症的方法: 在所述疾病或病症中, PD-1 蛋白的不当表达 (例如, 过表达) 或者升高的活性导致或者促成所述疾病的病理效应, 或者 PD-1 蛋白水平或活性的降低在哺乳动物 (优选人) 中具有治疗益处。本发明还提供了在哺乳动物中治疗癌症或者感染性疾病的方法。所述方法包括将上述组合物施用给患有癌症或感染性疾病的哺乳动物, 以此在所述哺乳动物中治疗所述癌症或感染性疾病。如本文中讨论的, PD-1 在多种癌症中异常表达 (参见, 例如, Brown et al., J. Immunol., 170:1257-1266 (2003); 和 Flies et al., Yale Journal of Biology and Medicine, 84:409-421 (2011)), 并且在一些肾细胞癌患者中 PD-L1 的表达与肿瘤侵袭性

相关。本发明所述方法能用于治疗本领域已知的任意类型的癌症,如,例如,黑色素瘤、肾细胞癌、肺癌、膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、胆囊癌、喉癌、肝癌、甲状腺癌、胃癌、唾液腺癌、前列腺癌、胰腺癌、或者 Merkel 细胞癌(参见,例如, Bhatia et al., Curr. Oncol. Rep., 13(6):488-497(2011))。本发明所述方法能用于治疗任意类型的感染性疾病(即,由细菌、病毒、真菌、或寄生虫引起的疾病或病症)。能被本发明所述方法治疗的感染性疾病的实例包括,但不限于,由人类免疫缺陷病毒(HIV)、呼吸道合胞病毒(RSV)、流感病毒、登革热病毒、乙肝病毒(HBV,或者丙肝病毒(HCV))引起的疾病。对包括本发明所述免疫球蛋白重链多肽、本发明所述免疫球蛋白轻链多肽、本发明所述 PD-1 结合剂、本发明所述编码前述任意一种的核酸序列、或者本发明所述包括本发明所述核酸序列的载体的组合物的施用,在哺乳动物中诱导针对癌症或感染性疾病的免疫应答。“免疫应答”会需要,例如,抗体的产生和/或免疫效应细胞(例如, T 细胞)的活化。

[0086] 本文所用的术语“治疗(treatment)”、“治疗(treating)”等是指获得所希望的药理学和/或生理学效应。优选地,所述效应是治疗性的,即,所述效应部分地或者完全地治愈疾病和/或可归因于所述疾病的不利症状。为此,本发明所述方法包括施用“治疗有效量”的所述 PD-1 结合剂。“治疗有效量”是指在必要的剂量和时间段内,有效地实现所希望的治疗结果的量。所述治疗有效量可根据以下因素而变化,例如,个体的疾病状态、年龄、性别和体重,以及所述 PD-1 结合剂在所述个体中引发所希望的应答的能力。例如,本发明所述 PD-1 结合剂的治疗有效量是降低 PD-1 蛋白在人中的生物活性和/或增强针对癌症或感染性疾病的免疫应答的量。

[0087] 或者,所述药理学和/或生理学效应可以是预防性的,即,所述效应完全地或部分地预防疾病或其症状。在这方面,本发明所述方法包括施用“预防有效量”的 PD-1 结合剂。“预防有效量”是指在必要的剂量和时间段上,有效地实现所希望的预防效果(例如,预防疾病发作)的量。

[0088] 典型的剂量可以是,例如,在动物或人体重的 1pg/kg 至 20pg/kg 范围内;然而,低于或高于该示例性范围的剂量也在本发明范围之内。每日的肠胃外剂量可以是约 0.00001 μ g/kg 到约 20mg/kg 总体重(例如,约 0.001 μ g/kg、约 0.1 μ g/kg、约 1 μ g/kg、约 5 μ g/kg、约 10 μ g/kg、约 100 μ g/kg、约 500 μ g/kg、约 1mg/kg、约 5mg/kg、约 10mg/kg、或者由任意两个上述值限定的范围),优选从约 0.1 μ g/kg 至约 10mg/kg 总体重(例如,约 0.5 μ g/kg、约 1 μ g/kg、约 50 μ g/kg、约 150 μ g/kg、约 300 μ g/kg、约 750 μ g/kg、约 1.5mg/kg、约 5mg/kg、或者由任意两个上述值限定的范围),更优选从约 1 μ g/kg 至 5mg/kg 总体重(例如,约 3 μ g/kg、约 15 μ g/kg、约 75 μ g/kg、约 300 μ g/kg、约 900 μ g/kg、约 2mg/kg、约 4mg/kg、或者由任意两个上述值限定的范围),甚至更优选从每日约 0.5 至 15mg/kg 体重(例如,约 1mg/kg、约 2.5mg/kg、约 3mg/kg、约 6mg/kg、约 9mg/kg、约 11mg/kg、约 13mg/kg、或者由任意两个上述值限定的范围)。可以通过定期评估所治疗的患者来监测治疗或预防效力。对于根据具体状况进行持续数天或更长时间的重复施用,可以重复治疗直至发生所希望的对疾病症状的遏制。然而,其他剂量方案也可能是有用的并且在本发明范围之内。可以通过单次推注施用所述组合物,通过多次推注施用所述组合物,或者通过连续输注施用所述组合物来递送所希望的剂量。

[0089] 可以通过使用标准的施用技术,包括口服、静脉内施用、腹膜内施用、皮下施用、经

肺施用、经皮施用、肌肉内施用、鼻内施用、经颊施用、舌下施用、或者栓剂施用，施用这样的组合物；其包括有效量的本发明所述免疫球蛋白重链多肽、本发明所述免疫球蛋白轻链多肽、本发明所述 PD-1 结合剂、本发明所述编码前述任一的核酸序列、或者本发明所述包括本发明所述核酸序列的载体。优选地，所述组合物适于肠胃外施用。本文所用的术语“肠胃外”包括静脉内施用、肌肉施用、皮下施用、直肠施用、阴道施用、和腹膜内施用。更优选地，通过使用静脉内、腹膜内或皮下注射的外周全身递送方式，向哺乳动物施用所述组合物。

[0090] 一旦施用给了哺乳动物（例如，人），可通过本领域已知的任意合适的方法测定本发明所述 PD-1 结合剂的生物活性。例如，可以通过确定特定的 PD-1 结合剂的稳定性来评估生物活性。在本发明的一个实施方案中，所述 PD-1 结合剂（例如，抗体）具有介于约 30 分钟和 45 天之间的体内半衰期（例如，约 30 分钟、约 45 分钟、约 1 小时、约 2 小时、约 4 小时、约 6 小时、约 10 小时、约 12 小时、约 1 天、约 5 天、约 10 天、约 15 天、约 25 天、约 35 天、约 40 天、约 45 天、或者由任意两个上述值限定的范围）。在另一实施方案中，所述 PD-1 结合剂具有介于约 2 小时和 20 天之间的体内半衰期（例如，约 5 小时、约 10 小时、约 15 小时、约 20 小时、约 2 天、约 3 天、约 7 天、约 12 天、约 14 天、约 17 天、约 19 天、或者由任意两个上述值限定的范围）。在另一实施方案中，所述 PD-1 结合剂具有介于约 10 天和约 40 天之间的体内半衰期（例如，约 10 天、约 13 天、约 16 天、约 18 天、约 20 天、约 23 天、约 26 天、约 29 天、约 30 天、约 33 天、约 37 天、约 38 天、约 39 天、约 40 天、或者由任意两个上述值限定的范围）。

[0091] 还可以通过确定与 PD-1 蛋白或者其表位的结合亲和力来评估特定的 PD-1 结合剂的生物活性。术语“亲和力”是指两个试剂可逆结合的平衡常数，并且表示为解离常数 (K_D)。结合剂与配体的亲和力，例如抗体对表位的亲和力，可以是，例如，从约 1 皮摩尔 (pM) 到约 100 微摩尔 (μ M)（例如，从约 1 皮摩尔 (pM) 到约 1 纳摩尔 (nM)，从约 1nM 到约 1 微摩尔 (μ M)，或者从约 1 μ M 到约 100 μ M)。在一个实施方案中，所述 PD-1 结合剂能够以小于或等于 1 纳摩尔的 K_D （例如，0.9nM、0.8nM、0.7nM、0.6nM、0.5nM、0.4nM、0.3nM、0.2nM、0.1nM、0.05nM、0.025nM、0.01nM、0.001nM、或者由上述任意两个数值限定的范围）结合 PD-1 蛋白。在另一实施方案中，所述 PD-1 结合剂能够以小于或等于 200pM 的 K_D （例如，190pM、175pM、150pM、125pM、110pM、100pM、90pM、80pM、75pM、60pM、50pM、40pM、30pM、25pM、20pM、15pM、10pM、5pM、1pM、或者由上述任意两个数值明确的范围）结合 PD-1。可以使用任何本领域公认的测定法来测量对目的抗原或目的表位的免疫球蛋白亲和力。这样的方法包括，例如，荧光激活细胞分选法 (FACS)、可分离珠法（例如，磁珠）、表面等离子体共振法 (SPR)、液相竞争法 (KINEXA™)、抗原筛选法和 / 或 ELISA（参见，例如，Janeway et al. (eds.), Immunobiology, 第 5 版, Garland Publishing, New York, NY, 2001）。

[0092] 可以单独地或者与其他药物（例如，作为佐剂）组合施用本发明所述 PD-1 结合剂。例如，可以与其他试剂组合施用所述 PD-1 结合剂来治疗或预防本文所公开的疾病。在这方面，所述 PD-1 结合剂可以与至少一种其他抗癌剂组合使用，包括，例如，本领域已知的任意化疗剂，电离辐射，小分子抗癌剂，癌疫苗，生物疗法（例如，其他单克隆抗体，杀癌病毒，基因疗法，和过继 T 细胞转移）和 / 或手术。当本发明所述方法治疗感染性疾病时，所述 PD-1 结合剂可以与至少一种抗菌剂或者至少一种抗病毒剂组合施用。在这方面，所述抗菌剂可以是本领域已知的任意合适的抗生素。所述抗病毒试剂可以是特异性靶向特定病毒

的任意合适类型的任一种疫苗（例如，减毒活疫苗、亚单位疫苗、重组载体疫苗、和小分子抗病毒疗法（例如，病毒复制抑制剂和核苷类似物））。

[0093] 在另一实施方案中，本发明所述 PD-1 结合剂可以与抑制免疫检查点通路的其他试剂组合施用。例如，本发明所述 PD-1 结合剂可以与抑制或拮抗 CTLA-4、TIM-3 或 LAG-3 通路的试剂组合施用。同时靶向这些免疫检查点通路中两条或多条通路的组合治疗具有证实的增强的和潜在地协同抗肿瘤活性（参见，例如，Sakuishi et al., *J. Exp. Med.*, 207:2187-2194(2010); Ngiow et al., *Cancer Res.*, 71:3540-3551(2011); and Woo et al., *Cancer Res.*, 72:917-927(2012)）。在一个实施方案中，本发明所述 PD-1 结合剂与结合 TIM-3 的抗体和 / 或结合 LAG-3 的抗体进行组合施用。在这方面，本发明所述在哺乳动物中治疗癌症或感染性疾病的方法可以进一步包括向所述哺乳动物施用包括 (i) 结合 TIM-3 蛋白的抗体和 (ii) 药学上可接受的运载体的组合物，或者包括 (i) 结合 LAG-3 蛋白的抗体和 (ii) 药学上可接受的运载体的组合物。

[0094] 除治疗用途外，本文所述的 PD-1 结合剂可用于诊断或研究应用。在这方面，所述 PD-1 结合剂可用于诊断癌症或感染性疾病的方法中。所述 PD-1 结合剂可以类似的方式用于在进行与 PD-1 的异常表达相关的疾病或病症测试的受试者中监测 PD-1 蛋白水平的测定法中。研究的应用包括，例如，利用所述 PD-1 结合剂和标记物检测样品中（例如，在人的体液中或者在细胞或组织提取物中）的 PD-1 蛋白的方法。所述 PD-1 结合剂可以加以修饰或者不加修饰地使用，例如与可检测部分共价或非共价标记。例如，所述可检测部分可以是放射性同位素（例如， ^3H 、 ^{14}C 、 ^{32}P 、 ^{35}S 、或 ^{125}I ），荧光化合物或化学发光化合物（例如，异硫氰酸荧光素、若丹明、或萤光素），酶（例如，碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶、或辣根过氧化物酶），或辅基。在本发明上下文中可以使用任何本领域中已知的方法分别将抗原结合剂（例如，抗体）缀合上可检测部分（参见，例如，Hunter et al., *Nature*, 194:495-496(1962); David et al., *Biochemistry*, 13:1014-1021(1974); Pain et al., *J. Immunol. Meth.*, 40:219-230(1981); 和 Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.*, 30:407-412(1982)）。

[0095] 可以通过本领域已知的任意合适的方法，使用本发明所述 PD-1 结合剂来测量 PD-1 蛋白的水平。这样的方法包括，例如，放射免疫测定法 (RIA) 和 FACS。可以使用任意合适的技术，例如，通过在适于形成抗原 - 抗体复合物的条件下将包括，或者疑似包括 PD-1 多肽的样品和 PD-1 特异性抗体组合在一起，来确立 PD-1 蛋白的正常或标准表达值。用可检测物质直接或间接地标记所述抗体，以便于检测结合的或者未被结合的抗体。合适的可检测物质包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料和放射性材料（参见，例如，*Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques*, CRC Press, Inc. (1987)）。然后将样品中表达的 PD-1 多肽的量与标准值进行比较。

[0096] 可以在试剂盒（即，预定量的反应物和用于进行诊断测定法的说明书的封装组合）中提供所述 PD-1 结合剂。如果所述 PD-1 结合剂被酶标记，那么该试剂盒需要包括底物和所述酶所需要的辅因子（例如，提供可检测发色团或荧光团的底物前体）。此外，在试剂盒中可以包括其他添加剂，例如稳定剂、缓冲液（例如，封闭缓冲液或裂解缓冲液）等。各种反应物的相对量可以是变化的，以提供基本上优化测定法的灵敏度的反应物溶液浓度。可以以干粉形式（通常是冻干的）提供所述反应物，包括赋形剂，其在溶解时会提供具有适当浓度的反应液。

[0097] 以下实施例进一步说明本发明,但是,当然不应该被理解成以任何方式限制其范围。

[0098] 实施例 1

[0099] 本实施例展示了产生针对人 PD-1 的单克隆抗体的方法。

[0100] 生成了一些形式的编码人 PD-1 及其配体 PD-L1 和 PD-L2 的基因,作为抗原用于小鼠免疫、杂交瘤筛选和移植有 CDR 的抗体的亲和力成熟,并且示意性地描绘于图 1。使用带有潮霉素选择 (Millipore, Billerica, MA) 的泛染色质开放元件 (UCOE) 单表达载体,表达全长的人和食蟹猴 PD-1 基因及其天然前导序列并且不添加标签。按照制造商的说明,用 Lipofectamine LTX (Life Technologies, Carlsbad, CA) 稳定转染 CHO-K1 细胞。在用潮霉素进行选择后,使用 PE-缀合的小鼠抗人 PD-1 的抗体 (BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ), 通过流式细胞术鉴定在细胞表面上表达 PD-1 的细胞并对其进行亚克隆。然后选择亚克隆子用于 PD-1 的高水平和均匀表达。

[0101] 如图 1 所示,将编码人和食蟹猴 PD-1 的可溶性单体形式胞外域 (ECD) 的核酸序列构建成带有附于所述 ECD 的 C 末端的 His 标签形式或者与小鼠 IgG2a Fc 构建成可溶性二聚体融合蛋白。如图 1 所示,将编码人 PD-L1 和 PD-L2 的可溶性二聚体形式的 ECD 的核酸序列与小鼠 IgG1Fc 构建成融合蛋白。使用标准技术在 HEK 293 细胞或者稳定的 CHO 细胞系中瞬时表达可溶性蛋白。通过镍亲和和柱层析和随后的尺寸排阻层析从细胞培养上清液中纯化 His- 标记的蛋白。使用蛋白 A/G 亲和层析纯化 IgG-Fc 融合蛋白。通过 SDS-PAGE 和尺寸排阻层析分析纯化的蛋白,以确保同质性。此外,通过质谱法确认特征和尺寸。

[0102] 对于 FACS 分选实验,使用标准技术,通过用 NHS 酯交联剂 (Thermo-Fisher Scientific 公司, Waltham, MA) 或荧光染料 DyLight 650 (Thermo-Fisher Scientific 公司, Waltham, MA) 用生物素标记纯化的蛋白。

[0103] 用在细胞表面表达全长 PD-1 的 CHO 细胞或者 PD-1ECD His 蛋白免疫小鼠。具体地,从 Harlan Laboratories 公司 (Indianapolis, IN) 购得雌性 BALB/c 小鼠 (7 周龄) 并分成两组。适应六天后,用纯化的人 PD-1ECD-His 以每只小鼠 50 μ g, 与 TITERMAX GOLD™ (Sigma Aldrich, St. Louis, MO) 以 1:1 的乳液形式,对一组动物进行四个周次的剂量免疫。在腋窝和腹股沟区域周围以皮下的形式进行免疫。对第二组动物,在腹股沟区域周围皮下注射四个周次剂量的稳定表达全长人 PD-1 (每只小鼠 5×10^6 个细胞) 的 CHO-K1 细胞。十天后,将动物放血用于测量对 PD-1 的血清滴度,并且在休息 3 周后在用可溶性的人 PD-1 免疫增强各组中的一只小鼠。三天后,从每只动物收集脾脏、腋窝 / 肱淋巴结和腹股沟淋巴结。将从两只动物中收集的所有组织的细胞的单细胞悬浮液合并,并且使用标准技术通过细胞融合,将其用于产生杂交瘤。使用了两种不同的骨髓瘤细胞系用于融合, F0 (描述于 de St. Groth and Scheidegger, J. Immunol. Methods, 35:1-21 (1980)) 和 P3X63Ag8.653 (描述于 Kearney et al., J. Immunol., 123:1548-1550 (1979))。

[0104] 从 10 块 96 孔平板中筛选杂交瘤上清液,用于结合稳定转染有表达编码全长人 PD-1 的核酸序列的 CHO-K1 细胞克隆,并与未转染的 CHO-K1 细胞的结合作比较。具体地,用 PBS/2% FBS 1:1 稀释杂交瘤上清液,并将所述上清液与等体积的 PD-1CHO-K1 细胞 (PBS 中的 2.5×10^5 个细胞, 2% FBS 中) 在 4°C 孵育 30 分钟。离心细胞,用 PBS/1% FBS 漂洗细胞一次,并与 APC 缀合的山羊抗小鼠 IgG (H+L) (Southern Biotechnology, Birmingham, AL) 在

4°C 孵育 30 分钟。用 PBS/2% FBS 漂洗细胞两次,将所述细胞重悬于 PBS、2% FBS、1% 多聚甲醛,并且在 BD FACARRAY™ 生物分析仪上分析荧光 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ)。通过 ELISA 定量小鼠 IgG 水平。

[0105] 在强力结合 PD-1CHO 细胞的基础上,扩增 46 个亲代孔,并且测试上清液阻断 DyL650 标记的 PD-L1-mIgG1Fc 融合蛋白结合 PD-1CHO 细胞的能力。具体地,以剂量效应的方式将纯化的小鼠单克隆抗体与 $E_{C_{30}}$ 浓度的 PD-L1-DyL650 (10nM) 孵育,并且通过流式细胞术对抑制作用进行定量。将孔中显示最佳 PD-L1 阻断活性和最高水平的小鼠 IgG 的细胞进行亚克隆用于进一步分析,包括纯化以及重链和轻链 (V_H 和 V_L) 的测序。选择 11 个最强的 PD-1/PD-L1 相互作用的阻断剂用于亚克隆。再次确认 PD-1 的结合和 PD-L1 的阻断后,扩大培养选定的亚克隆,并且收集上清液用于抗体纯化。对于纯化的抗体,验证其与人和食蟹猴 PD-1 的结合及其 PD-L1 的阻断活性。通过在 BIACORE™ T200 仪器 (GE Healthcare, Waukesha, WI) 上进行表面等离子体共振确定 K_D 值,并且使用 BIACORE T200™ 评价软件 (GE Healthcare, Waukesha, WI) 确定动力学常数。在这方面,在 GE 抗小鼠 IgG 所偶联的 BIACORE™ CM5 芯片上捕获抗体。从最高浓度 500nM 开始,使用两倍或三倍系列稀释液,使 PD-1-His 单体流过所捕获的抗体。使用 1:1 的结合模型将得到的传感图进行全局拟合 (fit),以计算结合和解离速率以及随后的亲和力 (K_D)。

[0106] 本实施例的结果展示了生成结合人和食蟹猴 PD-1 并且阻断 PD-1 配体结合的单克隆抗体的方法。

[0107] 实施例 2

[0108] 本实施例描述移植有 CDR 的、嵌合的抗 PD-1 单克隆抗体的设计和产生。

[0109] 实施例 1 中所述的生产具有 PD-L1 阻断活性的 PD-1 结合抗体的杂交瘤亚克隆是同型的,对其进行了 RT-PCR 用于克隆抗体重链可变区 (V_H) 和轻链可变区 (V_L),并且进行了测序。具体地,使用 RNEASY™ 试剂盒 (Qiagen, Venlo, 荷兰) 从杂交瘤克隆的细胞团块 (5×10^5 个细胞 / 团块) 中分离了 RNA, 并且使用寡 -dT 作为引物的 SUPERSCRIP™ III 第一链合成系统 (Life Technologies, Carlsbad, CA) 制备 cDNA。 V_L 的 PCR 扩增利用了 9 条或 11 条变性的小鼠 V_L 正向引物池 (参见 Kontermann and Dubel, eds., Antibody Engineering, Springer-Verlag, Berlin (2001)) 和小鼠 κ 恒定区反向引物。按照 SUPERSCRIP™ III 第一链合成系统 (Life Technologies, Carlsbad, CA) 建议的方案, V_H 的 PCR 扩增利用了 12 条变性的小鼠 V_H 正向引物池 (Kontermann and Dubel, 同上) 和小鼠 $\gamma 1$ 或 $\gamma 2a$ 恒定区反向引物 (基于从每个克隆中对纯化的抗体进行的分型)。纯化 PCR 产物并将其克隆进 pcDNA3.3-TOPO (Life Technologies, Carlsbad, CA)。从每个细胞团块中选择单个集落 (24 条重链和 48 条轻链) 并且使用标准的 Sanger 测序法 (Genewiz 公司, South Plainfield, NJ) 测序。检查了可变区序列,并将其与最接近的人重链或轻链 V 区的种序列进行比对。选择了 3 种抗体用于移植 CDR: (1) 包括 SEQ ID NO:4 的 V_H 和 SEQ ID NO:28 的 V_L 的 9A2, (2) 包括 SEQ ID NO:15 的 V_H 和 SEQ ID NO:32 的 V_L 的 10B11, 和 (3) 包括 SEQ ID NO:22 的 V_H 和 SEQ ID NO:38 的 V_L 的 6E9。

[0110] 通过将来自每个上述小鼠抗体的 CDR 残基移植进最接近的人种系同源物,设计移植有 CDR 的抗体序列。合成了移植有 CDR 的抗体可变区并与人 IgG1/ κ 恒定区一起表达用于分析。此外,使用连接人 IgG1/ κ 恒定区的上述小鼠抗体可变区构建了小鼠:人嵌合

抗体。如上所述,对嵌合的并且移植有 CDR 的抗体与人和食蟹猴 PD-1 抗原的结合以及其在 PD-1/PD-L1 的阻断测定法中的活性进行表征。

[0111] 还在人 CD4⁺T 细胞混合淋巴细胞反应 (MLR) 测定法中测试了嵌合的并且移植有 CDR 的抗体的功能性拮抗剂活性,其中通过测量 IL-2 的分泌评估 CD4⁺T 细胞在存在抗 PD-1 抗体的条件下的活化。由于 PD-1 是 T 细胞功能的负调节物,因此对 PD-1 的拮抗预计会导致 T 细胞活化的升高,所述 T 细胞活化的升高通过 IL-2 产量的升高而测得。移植有 9A2、10B11 和 6E9CDR 的抗体表现出拮抗活性并且被选择用于亲和力成熟。

[0112] 本实施例的结果展示了产生特异性结合并抑制 PD-1 的嵌合的并且移植有 CDR 的单克隆抗体的方法。

[0113] 实施例 3

[0114] 本实施例展示了针对 PD-1 的单克隆抗体的亲和力成熟。

[0115] 来源于原始鼠科单克隆抗体 (9A2、10B11 和 6E9) 的移植有 CDR 的抗体经体外体细胞超突变进行了亲和力成熟。使用 SHM-XEL 落叶系统在 HEK 293c18 细胞表面展示每种抗体 (参见 Bowers et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 108:20455-20460 (2011); 和美国专利申请公开号 2013/0035472)。如 Bowers et al., 同上中所述,在建立了稳定的附加体细胞系 (episomal lines) 后,将用于表达活化诱导的胞嘧啶脱氨酶 (AID) 的载体转染进所述细胞以引发体细胞超突变。在提升抗原结合严格性的条件下进行了多轮 FACS 分选之后,在每个抗体可变区中鉴定了一些突变,并将所述突变进行重组以生成成熟的具有改进特性的人源化抗体。

[0116] 将一组六个亲和力成熟的人源化重链和轻链可变区序列进行了配对 (示为 APE1922、APE1923、APE1924、APE1950、APE1963 和 APE2058) 并选其进行表征,示于表 1 中。使用表面等离子共振 (SPR) 和基于溶液的亲和力分析法测定这些抗体序列中每个的 PD-1 结合特性。从 HEK293 细胞将抗体表达成人 IgG1 抗体并与参考抗体 (BMS-936558 的人 IgG1 版本,命名为 BMS) 作比较。

[0117] 使用 Biacore T200[™] 仪器进行 SPR 分析,并使用 BIACORE[™] T200 评价软件确定动力学常数。选择实验参数以确保会在最高抗原浓度处达到饱和并且 R_{max} 值将保持低于 30RU。使用 EDC 激活的胺偶联化学将 GE 抗人 IgG (Fc-特异性的,约 7,000RU) 固定在 BIACORE[™]CM5 芯片上。然后使用该表面捕获抗体 (0.5 μ g/mL,捕获时间为 60 秒)。接着,使用从 500nM 到 2nM 的三倍系列稀释液将单体的可溶性人 PD1-Avi-His 流过被捕获的抗体 (结合 300 秒,解离 300 秒)。使用 3M MgCl₂ (接触时间为 60 秒) 在每个循环之间去除捕获的抗体和抗原,以确保每种浓度的抗原具有新鲜的结合表面。使用 1:1 的结合模型将得到的传感图进行全局拟合 (fit),以计算结合和解离速率 (分别为 k_a 和 k_d),以及亲和力 (K_D)。

[0118] 使用 KINEXA[™]3000 测定法 (Sapidyne Instruments, Boise, Idaho) 进行基于溶液的亲和力分析,并且使用 KINEXA[™] 专业软件 3.2.6 分析结果。选择实验参数以在抗体单独存在时达到在 0.8 和 1.2V 之间的最大信号,同时将缓冲液单独存在时的非特异性结合信号限制在最大信号的 10% 以内。通过在 50mM Na₂CO₃ 的溶液中稀释 PD-1-Avi-His (1mL 中 50 μ g/mL),用抗原包被吡内酯珠 (50mg)。将所述溶液室温搅拌 2 小时,并且在 picofuge 中沉淀珠粒并用封闭液漂洗两次 (10mg/mL BSA, 1M Tris-HCl, pH 8.0)。将珠粒重新悬浮于封闭液 (1mL),在室温下搅拌 1 小时,并且在 25 倍体积的 PBS/0.02% NaN₃ 中稀释。对于亲

和力的测量,二抗是 ALEXFLUOR™647 染料-抗-人 IgG (500ng/mL)。将样品抗体的浓度保持恒定 (50pM 或 75pM),同时使用从 1 μM 到 17pM 的三倍稀释液系列滴定 PD1-Avi-His 抗原。将所有样品在 PBS、0.2% NaN₃、1mg/mL BSA 中稀释,并允许其在室温平衡 30 小时。此外,测试仅含有抗体和仅含有缓冲液的样品以分别确定最强的信号和非特异性结合信号。亲和力和分析的结果示于表 1 中。所有选定的抗体都显示出比所述 BMS 参考抗体更高的 PD-1 亲和力,具有最高亲和力的抗体是 APE2058。

[0119] 表 1

[0120]

抗体	V _H SEQ ID NO:	V _L SEQ ID NO:	BIACORE™ k _a (M ^s) ⁻¹	BIACORE™ k _d (s ⁻¹)	BIACORE™ K _D (nM)	KINEXA™ K _D (nM)
BMS	n/a	n/a	8.8 x 10 ⁴	2.1 x 10 ⁻³	23	2
APE192 2	6	29	1.3 x 10 ⁵	1.8 x 10 ⁻³	15	-
APE192 3	7	29	1.9 x 10 ⁵	1.7 x 10 ⁻³	9	1

[0121]

抗体	V _H SEQ ID NO:	V _L SEQ ID NO:	BIACORE™ k _a (M ^s) ⁻¹	BIACORE™ k _d (s ⁻¹)	BIACORE™ K _D (nM)	KINEXA™ K _D (nM)
APE192 4	8	29	1.8 x 10 ⁵	1.8 x 10 ⁻³	10	-1
APE195 0	9	29	1.5 x 10 ⁵	2.5 x 10 ⁻³	17	-
APE196 3	10	29	5.8 x 10 ⁴	1.0 x 10 ⁻³	17	-
APE205 8	23	40	3.0 x 10 ⁵	6.4 x 10 ⁻⁴	2	0.2

[0122] 为了评估所述抗体与细胞表面 PD-1 的结合,通过上述的流式细胞术确定与表达人或食蟹猴 PD-1 的 CHO 细胞的结合。此外,通过使用上述的 DyL650 标记的 PD-L1 (小鼠 IgG1Fc 融合蛋白) 和表达 PD-1 的 CHO 细胞评估对 PD-1/PD-L1 相互作用的阻断作用。观察所有测试的亲和力成熟抗体序列对细胞表面 PD-1 的高结合亲和力,其对食蟹猴 PD-1 的反应性在对人反应性的 3-4 倍之内。所有被测试的亲和力成熟抗体序列对 PD-1/PD-L1 的相互作用的阻断也是有效的,其 IC₅₀ 值在低 nM 范围内。这些结果与通过 BIACORE™ 和 KINEXA™ 系统测定的结合亲和力以及细胞表面的 EC₅₀ 值一致。

[0123] 如 McConnell et al., Protein Eng. Des. Sel., 26:151 (2013) 中所述,使用 Thermofluor 测定法评估选定的抗体的热稳定性。该测定法通过疏水性荧光染料结合当蛋白展开时蛋白表面上暴露的疏水性斑块的能力来评估稳定性。确定 50% 所述蛋白展开时的温度 (T_m) 以测量热稳定性。该测定法证实,所有被测的亲和力成熟抗体序列都具有高热稳定性,并且都比参考抗体更稳定。APE2058 是最稳定的抗体,显示出的 T_m 比 IgG1 版 BMS-936558 的 T_m 高出不止 10°C。

[0124] 通过 (a) 评估与靶阴性细胞的非特异性结合 (参见,例如,Hotzel et al., mAbs, 4:753-760 (2012)) 和 (b) 测量差异性的新生 Fc 受体 (FcRn) 解离特性 (参见,例

如, Wang et al., Drug Metab. Disp., 39:1469-1477 (2011)), 消除与受试抗体的体内药代动力学相关的潜在问题的风险。为了评估非特异性结合, 使用以流式细胞术为基础的抗体测定法测试抗体与 HEK 293f 细胞的结合。将所述受试抗体与 FDA 批准的两种抗体 (英夫利昔单抗 (infliximab) 和狄诺塞麦 (denosumab)) 作比较。结果表明, 对于所有所述抗体, 非特异性结合较低。为了评估 FcRn 结合和解离, 在基于 BIACORE™ 的测定法中测试了人 FcRn 和食蟹猴 FcRn。抗体在 pH 6.0 时结合 FcRn, 并且在将 pH 调整到 7.4 后, 确定了残留的结合的抗体。该测定法的结果示于表 2 中。

[0125] 表 2

[0126]

抗体	pH 7.4 时残留结合的百分比	
	人 FcRn	食蟹猴 FcRn
BMS	2.0	1.7
APE1922	2.7	2.9
APE1923	4.0	5.0
APE1924	3.6	4.0
APE1950	34.0	36.5
APE1963	9.0	11.9
APE2058	2.1	2.0

[0127] 本实施例的结果证实了产生本发明所述的表现出热稳定性和对 PD-1 具有高亲和力的免疫球蛋白重链和轻链多肽的方法。

[0128] 实施例 4

[0129] 本实施例展示了本发明所述免疫球蛋白重链和轻链多肽的体外活性。

[0130] 如上所述, 在人 CD4⁺T 细胞 MLR 测定法中测试了实施例 3 中所述的 V_H 和 V_L 序列的功能性拮抗活性。对于确定功能效力, 使用不同的人供体在五个分别的实验中确定了每种抗体的 EC₅₀。结果示于表 3 中并且证实每种选定的抗体的有效活性与参考抗体的活性很难区分。

[0131] 表 3

[0132]

EC ₅₀ 值 (μg/mL)						
BMS 参考	APE2058	APE1922	APE1923	APE1924	APE1950	APE1963
0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01
0.03	0.10	0.10	0.2	0.03	0.20	0.10
0.02	0.04	0.03	0.01	0.04	0.02	0.02
0.01	0.01	0.01	0.02	0.01	0.01	0.07
0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01

每行代表使用不同的提供应答性 CD4⁺ T 细胞的人供体的独立实验。阴影行使用一种应答细胞，在存在亲和力成熟的 mAb 的条件下，生成了比其他实验中更高水平的 IL-2，人为地提高了 EC₅₀ 值。

[0133] 本实施例的结果证实，本发明所述免疫球蛋白重链和轻链多肽能拮抗 PD-1 信号，导致 T 细胞活化的升高。

[0134] 实施例 5

[0135] 本实施例证实，将本发明所述 PD-1 结合剂与抗 LAG-3 抗体或者抗 TIM-3 抗体组合，增强了 T 细胞的体外活化。

[0136] 为了建立用于组合研究的参数，在上述人 CD4⁺ T 细胞 MLR 测定法中以剂量效应的方式滴定了抗 PD-1 的抗体 APE2058。对 PD-1 信号的拮抗导致产生升高的 T 细胞活化以及相应的 IL-2 产量升高 4 到 5 倍。

[0137] 基于在多个 MLR 测定法中滴定 APE2058 抗体得到的结果，选择 20ng/mL 的 EC₅₀ 值和代表近似 EC₁₀ 值的低 10 倍的浓度 (2ng/mL) 用于与抗 TIM-3 或 LAG-3 检查点分子的拮抗剂抗体进行组合研究。

[0138] 在 CD4⁺ T 细胞体外测定法中，将完全人源的抗 TIM-3 抗体表征为具有拮抗活性，所述拮抗活性是通过在存在低水平的抗 CD3 和抗 CD28 抗体的条件下升高的 IL-2 产量测定的。如图 2 和表 4 中所示，所述抗 TIM-3 抗体证实具有活性，具有近似 0.3 μg/mL 的 EC₅₀ 值，其活性比单独的所述抗 PD-1 的 APE2058 抗体 (EC₅₀ 近似 0.02 μg/mL) 低近似 15 倍。如图 2 和表 4 中所示，相较于单独的 APE2058 或者抗 TIM-3，当与 0.02 μg/mL 的 APE2058 组合时，所述抗 TIM-3 的拮抗剂抗体刺激了 IL-2 产量的升高，导致了 EC₅₀ 值降低 10 倍。这些结果证实，增强的 T 细胞活化在 PD-1 和 TIM-3 检查点通路的组合抑制的条件下发生。

[0139] 完全人源的抗 LAG-3 拮抗剂抗体 (描述于美国专利申请公开号 2011/0150892) 已经证实在阻断重组型可溶性 LAG-3 结合 MHC II 类阳性细胞方面具有有效的活性。这种抗体在本文中命名为 APE03109，并且在人 CD4⁺ T 细胞 MLR 测定法中评价了其功能性活性。如图 3 和表 4 中所示，证实了 APE03109 在 MLR 中具有活性，具有近似 0.05 μg/mL 的 EC₅₀ 值，其类似于单独的抗 PD-1 抗体的活性。相较于单独的 APE2058 或者 APE03109，当与 0.02 μg/mL 的抗 PD-1 的 APE2058 抗体组合时，所述 APE03109 抗体刺激了 IL-2 产量的升高，导致了 EC₅₀ 值有 5 倍的降低。

[0140] 还在人 CD4⁺T 细胞 MLR 测定法中表征了单独用抗 LAG-3 的 APE03109 抗体以及用 APE2058 和 APE03109 组合的条件下, IL-2 产生的时间过程。如图 3 中所示, 在培养 72 小时后, 对于组合用 0.02 μ g/mL APE2058 和 APE03109, 观察到 EC₅₀ 值有类似的降低。在培养 96 小时后, EC₅₀ 值的差异不那么明显; 然而, 相较于经 APE03109 单独处理的培养物, 经 0.02 μ g/mL 抗 PD-1 的 APE2058 抗体和抗 LAG-3 的 APE03109 抗体处理的培养物中生成的 IL-2 的水平几乎翻倍 (2, 200pg/mL 对 1, 200pg/mL)。与 LAG-3 表达的时间过程一致的是, 虽然单独的 APE2058 在相同的时间上产生了 IL-2 产量的剂量效应性升高, 但是在向 APE2058 加入 APE03109 的 24 小时后, 没有观察到升高的 IL-2 产量。在单独的 MLR 实验中还证实, 48 小时后, APE2058 和 APE03109 的组合将 T 细胞的细胞因子 IFN- γ 的产量水平提高了 50% 以上。

[0141] 为了证实抗 TIM-3 抗体或者抗 LAG-3 抗体在 CD4⁺T 细胞 MLR 中的组合效应归因于靶特异性, 将不相关的人 IgG1 抗体 APE0422 与 0.02 μ g/mL 的抗 PD-1 抗体 APE2058 组合, 进行测试。在被测的最高浓度下 (30 μ g/mL), 相较于单独的抗 PD-1 抗体, APE0422 抗体显示对 IL-2 的生成没有作用。

[0142] 表 4

[0143]

抗体	单剂条件下得到的 MLR 测定法的 EC ₅₀	用 2 ng/mL 的抗 PD-1 抗体得到的 MLR 测定法的 EC ₅₀	用 20 ng/mL 的抗 PD-1 抗体得到的 MLR 测定法的 EC ₅₀	提升倍数
抗-TIM-3	330 ng/mL	310 ng/mL	33 ng/mL	10
抗-LAG-3	53 ng/mL	44 ng/mL	11 ng/mL	4.8

[0144] 本实施例的结果证实, 本发明的 PD-1 结合剂与针对 TIM-3 或 LAG-3 的拮抗性抗体的组合增强 CD4⁺T 细胞的体外活化。

[0145] 本文引用的所有参考文献, 包括出版物、专利申请和专利, 在此通过引用并入, 其程度如同单独并具体地说明每个参考文献通过引用并入并整体示于本文中。

[0146] 在描述本发明的上下文中 (特别是在权利要求书的上下文中), 除非本文另有说明或者与上下文明显矛盾, 否则使用的术语“一个 (a)”和“一个 (an)”和“所述”和“至少一个”等类似的所指对象, 将被理解成包括单数和复数。除非本文另有说明或者与上下文明显矛盾, 否则使用的术语“至少一种”后面紧跟着一项或多项的列表 (例如, “A 和 B 中的至少一种”) 应被理解为表示从列出的项目 (A 或 B) 中选择一项或者所列项目的两项或多项的任意组合 (A 和 B)。除非另有说明, 否则术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”应理解为开放式术语 (即, 表示“包括, 但不限于,”)。除非本文另有说明, 否则本文中数值范围的列举仅旨在用作单独指代落在该范围内的每个单独值的便捷方法, 并且每个单独值并入说明书中, 正如其在本文中单独列举一样。除非本文另有说明或者与上下文明显矛盾, 本文中所描述的所有方法可以以任何合适的顺序进行。任何和所有实例的使用, 或者本文提供的示例性语言 (例如, “例如”), 仅仅是为了更好地说明本发明并且除非另有声明, 并不构成对本发明范围的限制。在说明书中的任何语言都不应该被理解成表明任何未声明的技术特征是实施本发明所必需的。

[0147] 本文描述了本发明优选的实施方案, 包括本发明人已知实施本发明的最佳模

式。在阅读以上描述时,那些优选的实施方案的变动对于本领域的普通技术人员来说可能是显而易见。本申请发明人期望技术人员适当地采用这些变动,并且本申请发明人希望本发明也可以以不同于本文具体描述的方式进行。因此,在适用法律允许的情况下,本发明包括对其所附的权利要求中列举的主题的所有改进和等同物。此外,除非本文另外指出或另外与上下文明显矛盾,否则本发明包括以其所有可能的变化形式存在的上述技术特征的任意组合。

[0001]

序列表

- <110> 安耐普泰斯生物有限公司
 <120> 针对程序性死亡-1 (PD-1) 的抗体
 <130> 716746
 <150> US 61/818,755
 <151> 2013-05-02
 <160> 64
 <170> PatentIn 3.5版
 <210> 1
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成序列
 <400> 1
 Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr Leu Ser
 1 5 10
 <210> 2
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成序列
 <400> 2
 Val Ile Ser Ser Gly Gly Asp Tyr Ala Tyr
 1 5 10
 <210> 3
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0002]

<220>

<223> 合成序列

<400> 3

Asp His Tyr Gly Thr Ser His Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 4

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 4

Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

Thr Leu Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Ser Gly Gly Asp Tyr Ala Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

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

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

Ser Arg Asp His Tyr Gly Thr Ser His Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala

[0003]

115

120

<210> 5
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 5

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

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

Thr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Val Ile Ser Ser Gly Gly Asp Tyr Ala Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Gln 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 Lys Asp His Tyr Gly Thr Ser His Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120

<210> 6
 <211> 120
 <212> PRT

[0004]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 6

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

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

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

Ser Val Ile Ser Ser Gly Gly Asp Ser Ala Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Gln 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 Lys Glu His Tyr Gly Thr Ser His Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 7

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 7

[0005]

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

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

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

Ser Val Ile Ser Ser Gly Gly Asn Ser Ala Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Gln 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 Lys Glu His Tyr Gly Thr Ser His Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120

<210> 8
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 8

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

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

[0006]

	20		25		30														
Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val				
		35					40					45							
Ser	Val	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Asn	Tyr	Ala	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val				
	50					55					60								
Gln	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	Lys	Glu	His	Tyr	Gly	Thr	Ser	His	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly				
			100					105					110						
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala												
		115					120												
<210>	9																		
<211>	120																		
<212>	PRT																		
<213>	人工序列																		
<220>																			
<223>	合成序列																		
<400>	9																		
Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly				
1				5					10					15					
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr				
			20					25					30						
Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val				
		35					40					45							

[0007]

Ser Val Ile Ser Ser Gly Gly Asp Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Gln 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 Lys Glu His Tyr Gly Thr Ser His Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120

<210> 10
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 10

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

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

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

Ser Val Ile Ser Ser Gly Gly Asn Ser Ala Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Gln Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 [0008]

65					70						75					80
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90						95	
Ala	Lys	Glu	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ser	His	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	
			100					105					110			
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala									
		115					120									
<210>	11															
<211>	120															
<212>	PRT															
<213>	人工序列															
<220>																
<223>	合成序列															
<400>	11															
Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1				5					10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
			20					25					30			
Thr	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				
Ser	Val	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Asn	Ser	Ala	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	
	50					55					60					
Gln	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	

[0009]

Ala Lys Glu His Tyr Gly Ser Ser His Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
 115 120

<210> 12
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 12

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr Met Ser
 1 5 10

<210> 13
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 13

Val Ile Ser Ser Gly Gly Asn Ser Thr Tyr
 1 5 10

<210> 14
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 14

Glu His Tyr Gly Ser Ser His Phe Ala Tyr

[0010]

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

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

Thr Leu Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Ser Ser Gly Gly Asn Tyr Ala Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

Gln 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 Lys Glu His Tyr Gly Thr Ser His Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala
115 120

<210> 18
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 18

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

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

[0013]

	20		25		30														
Thr	Leu	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val				
		35					40					45							
Ser	Val	Ile	Ser	Ser	Gly	Gly	Asn	Tyr	Ala	Tyr	Tyr	Pro	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	Lys	Glu	His	Tyr	Gly	Thr	Ser	His	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly				
			100					105					110						
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala												
		115					120												

<210> 19
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 19

Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Asp	Met	Ser
1				5					10

<210> 20
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

[0014]

<400> 20

Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr
1 5 10

<210> 21

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 21

Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 22

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 22

Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Gln Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

[0015]

65					70						75					80
Leu	Gln	Met	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys	
				85					90					95		
Ala	Ser	Pro	Tyr	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser	Val	
			100					105					110			
Thr	Val	Ser	Ser	Ala												
			115													
<210>	23															
<211>	117															
<212>	PRT															
<213>	人工序列															
<220>																
<223>	合成序列															
<400>	23															
Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1				5					10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	
			20					25					30			
Asp	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
		35					40					45				
Ser	Thr	Ile	Ser	Gly	Gly	Gly	Ser	Tyr	Thr	Tyr	Tyr	Gln	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		

[0016]

Ala Ser Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala
 115

<210> 24
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 24

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

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

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

Ser Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Gln Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Ile 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 Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala

[0017]

115

<210> 25
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 25

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

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

Asp Met Ser Trp Val Arg Arg Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Thr Ile Ser Gly Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Gln 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 Pro Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser Ala
 115

<210> 26
 <211> 15
 <212> PRT

[0018]

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 26

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Phe Gly Ile Ser Phe Met Ser
1 5 10 15

<210> 27

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 27

Ala Ala Ser Asn Pro Gly Ser
1 5

<210> 28

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 28

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

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Phe
20 25 30

Gly Ile Ser Phe Met Ser Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Pro Gly Ser Gly Val Pro Ala

[0019]

50		55		60															
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Val	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Ser	Leu	Asn	Ile	His				
65					70					75					80				
Pro	Met	Glu	Glu	Asp	Asp	Ala	Ala	Met	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ser	Lys				
				85					90					95					
Glu	Val	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg				
			100					105					110						
<210>	29																		
<211>	112																		
<212>	PRT																		
<213>	人工序列																		
<220>																			
<223>	合成序列																		
<400>	29																		
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	Glu	Ser	Val	Asp	Asn	Phe				
			20					25					30						
Gly	Ile	Ser	Phe	Met	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro				
		35					40					45							
Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Asn	Pro	Gly	Ser	Gly	Ile	Pro	Ala				
	50					55						60							
Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser				
65					70					75					80				
Ser	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Lys				
				85					90					95					

[0020]

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 30
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 30

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Lys Tyr Gly Ile Ser Phe Met Ser
 1 5 10 15

<210> 31
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 31

Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser
 1 5

<210> 32
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 32

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

Leu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Lys Tyr

[0021]

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

<210> 33
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 33

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

[0022]

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

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 34

<211> 129

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 34

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Lys Tyr
20 25 30

Gly Ile Thr Phe Met Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60

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

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Lys
85 90 95

Glu Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

[0023]

100

105

110

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
 115 120 125

Leu

<210> 35
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 35

Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 36
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 36

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
 1 5

<210> 37
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 37

[0024]

Gln His Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 38
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 38

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
20 25 30

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

Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln His Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 39
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

[0025]

<220>

<223> 合成序列

<400> 39

Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly 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 Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Ser Ser Tyr Pro Trp
 85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 40

<211> 108

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 40

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala

[0026]

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

<210> 41
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 41

Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Phe	Leu	Ser	Ala	Tyr	Val	Gly				
1				5					10					15					
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Gly	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	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	His	Thr	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly				
	50					55					60								

[0027]

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Asn Ser Tyr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 42
<211> 362
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 42
gacgtgaagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc 60
tctctgtcag cctctggatt cactttcagt agttataccc tgtcttgggt tcgccagact 120
ccggggaaga ggctggagtg ggtcgcagtc attagtagtg gtggtgatta cgcctactat 180
ccagacagtg tgcagggccg attcaccate tccagagaca atgccaagaa caccctgtac 240
ctgcaaatga acagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgttc aagagatcac 300
tacggtacta gtcactttgc ttaetggggc caagggactc tggteactgt ctctgcagcc 360
tc 362

<210> 43
<211> 362
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成序列

<400> 43
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60

[0028]

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agttataccc tgtcttgggt cgcgccaggt	120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagtc attagtagtg gtggtgatta cgcctactat	180
ccagacagtg tgcagggccg gttcaccate tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagatcac	300
tacggtaacta gtcactttgc ttactggggc caaggaacco tggtcaccgt ctctcagea	360
tc	362

<210> 44
 <211> 362
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 44	
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagge ttggtacagc ctggggggtc cctgagacte	60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agttatacca tgtcttgggt cgcgccaggt	120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagtc attagtagtg gtggtgatte cgcctactat	180
ccagacagtg tgcagggccg gttcaccate tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagagcac	300
tacggtaacta gtcactttgc ttactggggc caaggaacco tggtcaccgt ctctcagea	360
tc	362

<210> 45
 <211> 362
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 45	
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagge ttggtacagc ctggggggtc cctgagacte	60

[0029]

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agttatacca tgtcttgggt ccgccaggct	120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagtc attagtagtg gtggtaattc cgcctactat	180
ccagacagtg tgcagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagagcac	300
tacggtaacta gtcactttgc ttactggggc caaggaacco tggtcaccgt ctctcagea	360
tc	362

<210> 46
 <211> 362
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 46	
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagge ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agttatacca tgtcttgggt ccgccaggct	120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagtc attagtagtg gtggtaatta cgcctactat	180
ccagacagtg tgcagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagagcac	300
tacggtaacta gtcactttgc ttactggggc caaggaacco tggtcaccgt ctctcagea	360
tc	362

<210> 47
 <211> 362
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 47	
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagge ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc	60

[0030]

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agttatacca tgtcttgggt cgcagcagct	120
ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagtc attagtagtg gtggtgatte cacctactat	180
ccagacagtg tgcagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagagcac	300
tacggtacta gtcactttgc ttactggggc caaggaacc tggtcacctg ctctcagca	360
tc	362

<210> 48
 <211> 362
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 48	
gaggtgcagc tggtggagtg tgggggagge ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agttatacca tgtcttgggt cgcagcagct	120
ccaggaagg ggctggagtg ggtctcagtc attagtagtg gtggtgatte cgcctactat	180
ccagacagtg tgcagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cagctgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagagtac	300
tacggttcta gtcactttgc ttactggggc caaggaacc tggtcacctg ctctcagca	360
tc	362

<210> 49
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 49	
gacgtgaagc tggtggagtg tgggggagge ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaagtc	60

[0031]

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatacca tgtcttgggt tcgccagact	120
ccggagaaga ggctggagtg ggtctcagtc attagtagtg gtggtaattc cacctactat	180
ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac	240
ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtac aagagagcac	300
tacggtagta gtcactttgc ttactggggc caagggactc tggtaactgt ctctgcagcc	360

<210> 50
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 50	
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagge ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatacca tgtcttgggt ccgccagget	120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagtc attagtagtg gtggtaattc cacctactat	180
ccagacagtg tgaagggccg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagagcac	300
tacggtagta gtcactttgc ttactggggc caaggaacce tggtaaccgt ctctctagca	360

<210> 51
 <211> 360
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 51	
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggagge ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctataccc tgtcttgggt ccgccagget	120
ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcagtc attagtagtg gtggtaatta cgcctactat	180

[0032]

ccagacagtg tgcagggcgc gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gaaagagcac	300
tacggtaacta gtcactttgc ttactggggc caaggaacce tggtcaccgt ctccctcagea	360

<210> 52
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 52	
gaagtgatgc tggtaggagtc tgggggagge ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc	60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatgaca tgtcttgggt tcgccagact	120
ccggagaaga ggctggagtg ggtcgaacc attagtgggt gtggtagtta cacctactat	180
caagacagtg tgaaggggcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac	240
ctgcaaatga gcagtctgag gtctgaggac acggccatgt attactgtgc ctccccttac	300
tatgctatgg actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg tctccctcage a	351

<210> 53
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 53	
gaggtgcage tgtaggagtc tgggggagge ttggtacagc ctggggggte cctgagactc	60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatgaca tgtcttgggt ccgccagget	120
ccaggaagg ggctggagtg ggtctcaacc attagtgggt gtggtagtta cacctactat	180
caagacagtg tgaaggggcg gttcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgtat	240
ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gtccccttac	300

[0033]

tatgctatgg actactgggg gcaagggacc acggtcaccg tctcctcage a 351

<210> 54
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 54
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatgaca tgtcttgggt ccgccagget 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcaacc attagtgggt gtggtagtta caectactat 180
 caagacagtg tgaaggggcg gttcaccate tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gtccccttac 300
 tatgctatgg actactgggg gcaagggacc acggtcaccg tctcctcage a 351

<210> 55
 <211> 351
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 55
 gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc 60
 tectgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatgaca tgtcttgggt ccgccggget 120
 ccaggggaagg ggctggagtg ggtctcaacc attagtgggt gtggtagtta caectactat 180
 caagacagtg tgaaggggcg gttcaccate tccagagaca attccaagaa cacgctgtat 240
 ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggccgtat attactgtgc gtccccttac 300
 tatgctatgg actactgggg gcaagggacc acggtcaccg tctcctcage a 351

<210> 56
 [0034]

<211> 336
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 56
 gacattgtgc tgacceaatc tccagettct ttggctgtgt ctctagggca gagggccacc 60
 atctcctgca gagccagcga aagtgttgat aattttggca ttagttttat gagctggttc 120
 caacagaaac caggacagcc acccaaaactc ctcatctatg ctgcatccaa cccaggatcc 180
 ggggtccctg ccaggttttag tggcagtgta tctgggacag acttcagcct caacatccat 240
 cctatggagg aggatgatgc tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtac 300
 acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaacgg 336

<210> 57
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 57
 gaaatttgtt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gagccagcga aagtgttgat aattttggca ttagttttat gagctggtac 120
 caacagaaac ctggccagge tcccaggetc ctcatctatg ctgcatccaa cccaggatcc 180
 ggcattccag ccaggttcag tggcagtggg tctgggacag acttcaetct caccatcagc 240
 agcctagage ctgaagattt tgcagtttat tactgtcagc aaagtaagga ggttccgtac 300
 acgtttggcc aggggaccaa gctggagatc aaacgg 336

<210> 58
 <211> 336
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0035]

<220>

<223> 合成序列

<400> 58

gacattgtgc tgacceate tccagattct ttggctgtgt ctctagggt gagggccacc 60

atctcctgca gagccagcga aagtgttgat aaatatggca ttagttttat gagctggttc 120

caacagaaac caggacagcc acccaaaactc ctcatctatg ctgcatccaa ccaaggatcc 180

ggggtcctg ccaggttttag tggcagtggg tctgggacag acttcagcct caacatccat 240

cctatggagg aggatgatac tgcaatgtat ttctgtcagc aaagtaagga ggttccgtac 300

acgttcggag gggggaccaa gctggaaata aaacgg 336

<210> 59

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 59

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggga gagggccacc 60

atcaactgca gagccagcga aagtgttgat aaatatggca ttagttttat gagctgggtac 120

cagcagaaac caggacagcc tcctaagctg ctcatctacg ctgcatccaa ccaaggatcc 180

ggggtcctg accgattcag tggcagcggg tctgggacag atttcaactc caccatcagc 240

agcctgcagg ctgaagatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaagga ggttccgtac 300

acgtttggcc aggggaccaa gctggagatc aaacgg 336

<210> 60

<211> 336

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列

<400> 60

[0036]

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctctgggcga gagggccacc	60
atcaactgca gagccagcga aagtgttgat aaatatgcea ttacttttat gagctggtac	120
cagcagaaac caggacagcc tcctaagctg ctcatctacg ctgcatccaa ccaaggatcc	180
ggggtcctg accgattcag tggcageggg tctgggacag atttcaetct caccatcage	240
agcctgcagg ctgaagatgt ggcagtttat tactgtcage aaagtaagga ggttccgtac	300
acgtttggcc aggggaccaa gctggagatc aaacgg	336

<210> 61
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 61 gacattgtga tgaccagtc tcacaaatc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc	60
atcacctgca aggccagtc g gatgtgggt actgctgtag cctggtatca acagaaacca	120
gggcaatctc ctaaactact gatttactgg geatccacce ggcacactgg agtccctgat	180
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccattagcaa tgtgcagtct	240
gaagacttgg cagattatct ctgtcagcat tatagcagct atccgtggac gttcgggtga	300
ggcaccaaac tggaatcaa acgg	324

<210> 62
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 62 gacatccagt tgaccagtc tccatecttc ctgtctgcat ctgtaggaga cagagtcacc	60
atcaactgca aggccagtc g gatgtgggt actgctgtag cctggtatca gcaaaaacca	120

[0037]

gggaaagccc ctaagctcct gatctattgg gcatccaccc ggcacactgg ggtcccataca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatTTTg caacttatta ctgtcagcat tatagcagct atccgtggac gtttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa acgg 324

<210> 63
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> 人工序列

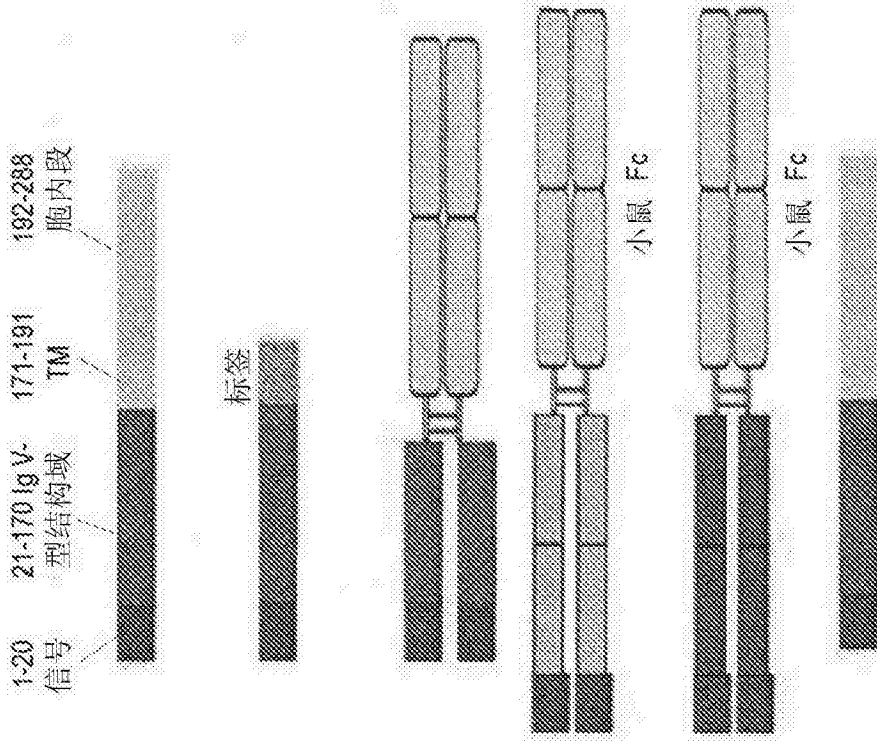
<220>
 <223> 合成序列

<400> 63
 gacatccagt tgacceagtc tccatcette ctgtctgcat atgtaggaga cagagtcacc 60
 atcaacttgea aggccagtca ggatgtgggt actgctgtag cctggatatca gcaaaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctattgg gcatccaccc tgcacactgg ggtcccataca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 gaagatTTTg caacttatta ctgtcagcat tatagcagct atccgtggac gtttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa acgg 324

<210> 64
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成序列

<400> 64
 gacatccagt tgacceagtc tccatcette ctgtctgcat atgtaggaga cagagtcacc 60
 atcaacttgea aggccagtca ggatgtgggt actgctgtag cctggatatca gcaaaaacca 120
 gggaaagccc ctaagctcct gatctattgg gcatccaccc ggcacactgg ggtcccataca 180
 aggttcagcg gcagtggatc tgggacagaa ttcactctca caatcagcag cctgcagcct 240
 [0038]
 gaagatTTTg caacttatta ctgtcagcat tataacagct atccgtggac gtttggccag 300
 gggaccaagc tggagatcaa acgg 324



1. 表达在CHO细胞表面的全长的人PD-1

2. 带有C末端标签G/S-avi-(His)₆的人PD-1胞外结构域

3. 人PD-1胞外结构域 - 小鼠IgG2a Fc

4. 人PD-L1胞外结构域 - 小鼠IgG1 Fc

5. 人PD-L2胞外结构域 - 小鼠IgG1 Fc

6. 表达在CHO细胞表面的全长的食蟹猴PD-1

图 1

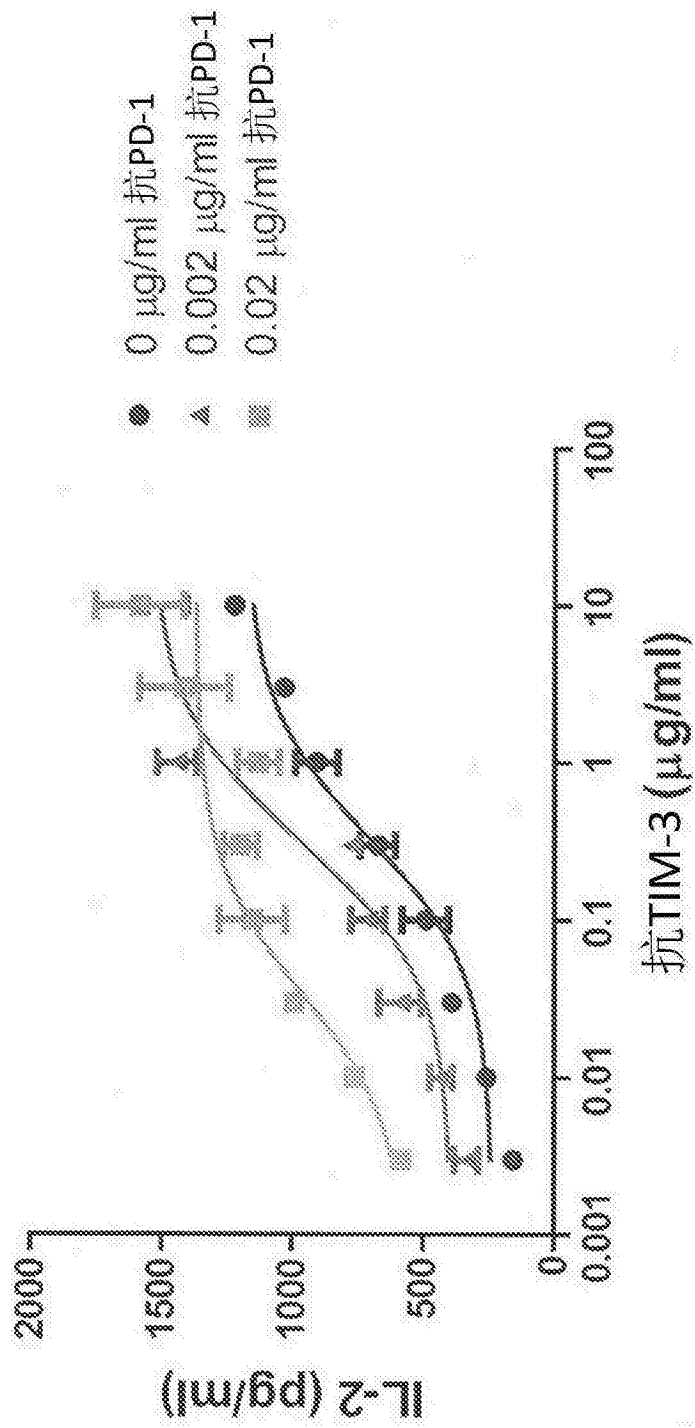


图 2

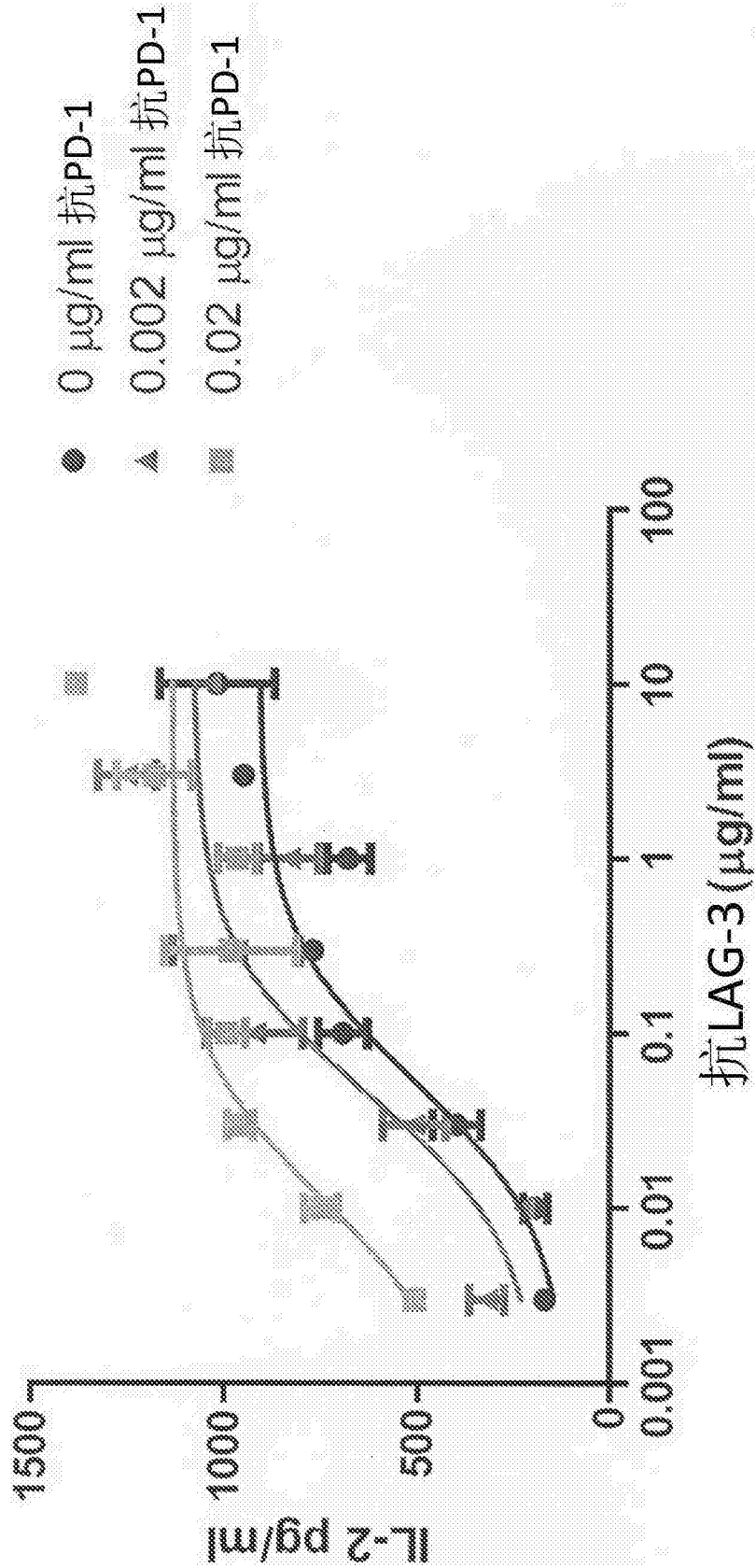


图 3