



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112236454 B

(45) 授权公告日 2022. 09. 13

(21) 申请号 201980020380.6

(22) 申请日 2019.03.18

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112236454 A

(43) 申请公布日 2021.01.15

(66) 本国优先权数据
201810255570.3 2018.03.20 CN
PCT/CN2018/079631 2018.03.20 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.09.18

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/CN2019/078515 2019.03.18

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/179396 EN 2019.09.26

(73) 专利权人 上海药明生物技术有限公司
地址 200131 上海市浦东新区富特中路299号

(72) 发明人 陈蕴颖 李竞

(74) 专利代理机构 中国贸促会专利商标事务所有限公司 11038
专利代理师 李程达

(51) Int.Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

审查员 马岚

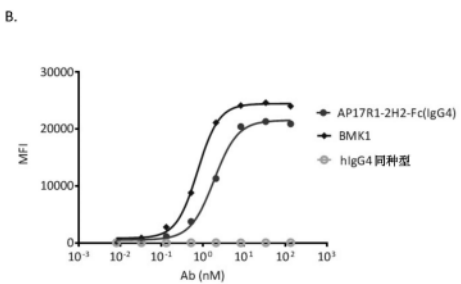
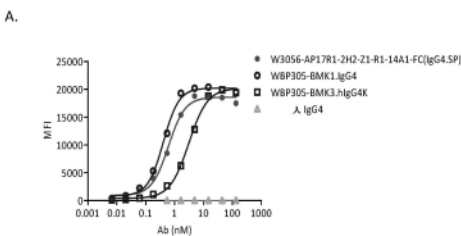
权利要求书2页 说明书45页
序列表21页 附图16页

(54) 发明名称

新型抗PD-1抗体

(57) 摘要

提供了与细胞表面PD-1特异性结合的新型抗PD-1抗体。还提供了编码抗PD-1抗体的核酸分子,用于表达抗PD-1抗体的表达载体和宿主细胞。本发明进一步提供了产生抗PD-1抗体的方法及其用途。



1. VHH抗体,其包含:如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列的CDR1,如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列的CDR3。

2. VHH抗体,其包含:

(a) 如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的CDR1,如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的CDR3;

(b) 如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的CDR1,如SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的CDR3;

(c) 如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的CDR1,如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的CDR3;

(d) 如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的CDR1,如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列的CDR3;

(f) 如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列的CDR1,如SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列的CDR3;

(g) 如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列的CDR1,如SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列的CDR3;

(h) 如SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列的CDR1,如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的CDR3;

(i) 如SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列的CDR1,如SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列的CDR3;

(j) 如SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列的CDR1,如SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列的CDR3;

(k) 如SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列的CDR1,如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列的CDR3;或

(l) 如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列的CDR1,如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列的CDR2和如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列的CDR3。

3. 权利要求1或2的VHH抗体,其中VHH的氨基酸序列如SEQ ID NO:37-49中任一个所示。

4. 权利要求1或2的VHH抗体,其中所述VHH抗体是PD-1拮抗剂。

5. 权利要求1或2的VHH抗体,其中所述VHH抗体是抗PD-1抗体。

6. 权利要求1或2的VHH抗体,其中所述VHH抗体是单结构域抗体;嵌合抗体;或人源化抗体。

7. 权利要求1或2的VHH抗体,其中所述VHH来自骆驼科动物。

8. 权利要求1或2的VHH抗体,其中所述VHH来自羊驼或美洲驼。

9. 权利要求1或2的VHH抗体,其中所述VHH与另一分子融合,所述另一分子是免疫球蛋白的Fc结构域、荧光蛋白或具有不同特异性的VHH。

10. 权利要求9所述的VHH抗体,其中所述免疫球蛋白是IgG。

11. 权利要求1或2的VHH抗体,其中所述VHH抗体是嵌合抗体。

12. 权利要求11的VHH抗体,其中所述VHH抗体是来自骆驼科动物的VHH与人IgG的Fc结构域的嵌合抗体。

13. 权利要求12的VHH抗体,其中所述VHH抗体是来自骆驼动物的VHH与人IgG4的Fc结构

域的嵌合抗体。

14. 权利要求1或2的VHH抗体,其中所述VHH抗体是人源化抗体。

15. 权利要求1或2的VHH抗体,其中所述VHH抗体具有以下性质中的一种或多种:

(a) 以 1×10^{-7} M或更小的 K_D 结合人PD-1;

(b) 抑制PD-L1或PD-L2与PD-1的结合;

(c) 诱导CD4⁺T细胞中IFN- γ 的产生;

(d) 不与人CD28、CTLA-4、ICOS和BTL结合;

(e) 与小鼠PD-1具有交叉反应性;和

(f) 在60°C是稳定的。

16. 分离的核酸分子,其编码如前述权利要求中任一项所定义的VHH。

17. 权利要求16的分离的核酸分子,其由如SEQ ID NO:50-62中任一项所示的核酸序列组成。

18. 一种表达载体,其包含权利要求16或17的分离的核酸分子。

19. 一种宿主细胞,其包含权利要求18的表达载体。

20. 权利要求19的宿主细胞,所述宿主细胞是细菌细胞,真菌细胞或哺乳动物细胞。

21. 权利要求20的宿主细胞,所述宿主细胞是大肠杆菌(E.coli)或酵母。

22. 一种药物组合物,其包含至少一种如权利要求1-15中任一项所定义的VHH抗体和药学上可接受的载体。

23. 制备如权利要求1-15中任一项所定义的VHH抗体的方法,包括以下步骤:

- 在权利要求19或20或21的宿主细胞中表达权利要求1-15中任一项所定义的VHH抗体;

和

- 从宿主细胞分离VHH抗体。

24. 权利要求1-15中任一项所定义的VHH抗体在制备用于抑制或阻断受试者中PD-L1或PD-L2与PD-1结合的药物组合物中的用途。

25. 如权利要求1-15中任一项所定义的VHH抗体在制备用于治疗或预防会受益于免疫应答上调的与PD-1相关的病况的药物中的用途。

26. 权利要求25的用途,其中所述病况是增殖性病症或慢性病毒感染。

27. 权利要求25的用途,其中所述病况是癌症。

28. 权利要求1-15中任一项定义的VHH抗体在制备用于治疗或预防受试者中与PD-1相关的病况的药物中的用途,其中所述受试者具有上调的PD-L1或PD-L2表达。

29. 用于治疗或诊断增殖性病症的试剂盒,其包含容器,所述容器包含权利要求1-15中任一项所定义的VHH抗体。

30. 权利要求29的试剂盒,其中所述增殖性病症是癌症。

新型抗PD-1抗体

[0001] 序列表

[0002] 本申请包含序列表,并且其全部内容通过引用并入本文。

技术领域

[0003] 本申请一般而言涉及抗体。更具体地,本申请涉及与PD-1特异性结合的单结构域抗体,其制备方法及其用途。

背景技术

[0004] 来自临床前和临床结果的越来越多的证据表明,靶向免疫检查点正在成为治疗癌症患者的最有前途的方法。与CD28具有同源性的免疫球蛋白超家族的抑制成员程序性死亡蛋白1 (PD-1) 在T细胞、活化的B细胞和骨髓细胞上表达 (Agata等人,同上;Okazaki等人 (2002) Curr. Opin. Immunol. 14:391779-82;Bennett等人. (2003) J Immunol 170:711-8), 并且在调节免疫系统中的刺激和抑制信号方面具有关键作用 (Okazaki, Taku等人. 2007 International Immunology 19:813-824)。PD-1通过筛选凋亡细胞中的差异表达而被发现 (Ishida等人 (1992) EMBO J 11:3887-95)。

[0005] PD-1是I型跨膜蛋白,其是Ig基因超家族的一部分 (Agata等人. (1996) bit Immunol 8:765-72), 并且PD-1的结构由一个免疫球蛋白可变样胞外结构域和含有免疫受体酪氨酸基抑制基序 (ITIM) 和免疫受体酪氨酸基开关基序 (ITSM) 的胞质结构域组成。虽然在结构上与CTLA-4相似,但PD-1缺乏对B7-1和B7-2结合至关重要的MYPPPY基序。PD-1具有两种已知的配体,即PD-L1 (B7-H1, CD274) 和PD-L2 (B7-DC, CD273), 它们是B7家族的表达在细胞表面的成员 (Freeman等人 (2000) J Exp Med 192:1027-34;Latchman等人 (2001) Nat Immunol 2:261-8;Carter et al (2002) Eur J Immunol 32:634-43)。PD-L1和PD-L2都是与PD-1结合但不与其他CD28家族成员结合的B7同系物。

[0006] 作为免疫检查点蛋白之一的PD-1是在活化的B细胞、T细胞和骨髓细胞上表达的CD28家族的抑制成员 (Agata等人,同上;Okazaki等人. (2002) Curr Opin Immunol 14:391779-82;Bennett等人. (2003) J Immunol 170:711-8), 并且在限制T细胞的活性方面起主要作用,这提供了肿瘤细胞逃脱免疫监视的主要免疫抗性机制。PD-1在T细胞中诱导无效能或无反应状态,导致细胞不能产生最佳水平的效应细胞因子。PD-1也可能通过其抑制存活信号的能力诱导T细胞凋亡。PD-1缺陷动物发展各种自身免疫表型,包括自身免疫性心肌病和具有关节炎和肾炎的狼疮样综合征 (Nishimura等人. (1999) Immunity 11:141-51;Nishimura等人. (2001) Science 291:319-22)。此外,已经发现PD-1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等人. (2003) J Exp Med 198:71-78;Prokunina and Alarcon-Riquelme (2004) Hum Mol Genet 13:R143;Nielsen等人. (2004) Lupus 11:510)。在小鼠B细胞肿瘤系中,PD-1的ITSM显示出对阻断下游效应分子的BCR介导的Ca²⁺流和酪氨酸磷酸化是必需的 (Okazaki等人. (2001) PNAS 98:13866-71)。

[0007] 在活化的T细胞上表达的PD-1和在肿瘤细胞上表达的PD-L1的相互作用负调节免疫应答并抑制抗肿瘤免疫。PD-L1在多种人癌症中大量存在 (Dong等人 (2002) Nat. Med. 8: 787-9)。PD-L1在肿瘤上的表达与食管癌、胰腺癌和其他类型癌症中存活率降低相关,突出显示该途径作为肿瘤免疫治疗的有希望的靶标。几个研究小组已经显示,PD-1-PD-L1相互作用使疾病恶化,导致肿瘤浸润淋巴细胞的减少,T细胞受体介导的增殖的减少和癌细胞的免疫逃避 (Dong等人. (2003) J. Mol. Med. 81:281-7; Blank等人. (2005) Cancer Immunol. Immunother. 54:307-314; Konishi等人. (2004) Clin. Cancer Res. 10:5094-100)。通过抑制PD-1与PD-L1的局部相互作用可以逆转免疫抑制,并且当PD-1与PD-L2的相互作用也被阻断时,效果是可加成的。

[0008] 单结构域抗体(sdAb)是由单个单体可变抗体域组成的抗体。像整个抗体一样,它能够选择性结合特定的抗原。单结构域抗体比由两条蛋白重链和两条轻链组成的常见抗体小得多。第一个单结构域抗体是由骆驼科动物中发现的重链抗体改造而来的 (Hamers-Casterman C, Atarhouch T, Muyldermans S, Robinson G, Hamers C, Songa EB, Bendahman N, Hamers R (1993) Naturally occurring antibodies devoid of light chains. Nature 363 (6428): 446-448.); 这些被称为VHH片段。目前,对单结构域抗体的大多数研究基于重链可变结构域。

[0009] 单结构域抗体具有许多优点。例如,它们通常表现出高溶解度和稳定性,并且还可以容易地在酵母、植物和哺乳动物细胞中产生 (Harmsen MM, De Haard HJ (2007) Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. Appl Microbiol Biotechnol 77 (1): 13-22.)。此外,它们具有良好的热稳定性和良好的组织渗透性。而且它们还在生产中具有成本效益。单结构域抗体的优势使其适用于各种生物技术和治疗应用。例如,它们可用于治疗疾病,包括但不限于癌症、感染性疾病、炎症性疾病和神经退行性疾病。

[0010] 虽然已开发出针对PD-1的抗体,但作为治疗剂仍有改善抗PD-1抗体的需要。此外,值得注意的是,目前针对PD-1的单结构域抗体很少。因此,本领域希望开发新的抗PD-1抗体,特别是针对PD-1的单结构域抗体。

[0011] 发明概述

[0012] 广义而言,本发明涉及提供具有改善功效的抗体的新型化合物、方法、组合物和制品。本发明提供的益处广泛地适用于抗体治疗和诊断领域,并且可以与能够与各种靶标反应的抗体联合使用。本发明提供了抗PD-1抗体,优选单结构域抗体。还提供了制备抗体的方法,编码抗PD-1抗体的核酸分子,用于表达抗PD-1抗体的表达载体和宿主细胞。本发明的抗体提供了治疗或预防与PD-1相关的病症的方法。

[0013] 在一些方面,本发明涉及PD-1结合分子。

[0014] 在一些实施方案中,PD-1结合分子具有一种或多种以下性质:

[0015] (a) 以 1×10^{-7} M或更小的 K_D 结合人PD-1;

[0016] (b) 抑制PD-L1/2与PD-1的结合;

[0017] (c) 诱导CD4⁺T细胞中IFN- γ 的产生;

[0018] (d) 基本上不与人CD28、CTLA-4、ICOS和BTL结合;

[0019] (e) 与人PD-1没有交叉反应性,但与小鼠PD-1具有交叉反应性;和

[0020] (f) 至少在60℃是稳定的,如通过DSF测定检测的。

[0021] 在一些实施方案中,所述PD-1结合分子包含至少一个免疫球蛋白单可变结构域(例如VHH),其中所述VHH包含CDR1、CDR2和CDR3,并且其中CDR1包含与SEQ ID NO:1至少90%相同的氨基酸序列,CDR2包含与SEQ ID NO:2至少90%相同的氨基酸序列,和CDR3包含与SEQ ID NO:3至少80%相同的氨基酸序列。

[0022] 在一些实施方案中,所述PD-1结合分子包含至少一个免疫球蛋白单可变结构域(例如VHH),其中所述VHH包含CDR1、CDR2和CDR3,并且其中CDR1在氨基酸序列上与SEQ ID NO:1存在不超过2个氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差异;CDR2在氨基酸序列上与SEQ ID NO:2存在不超过2个氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差异;和/或CDR3在氨基酸序列上与SEQ ID NO:3存在不超过2个氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差异。

[0023] 在一些实施方案中,PD-1结合分子包含至少一个免疫球蛋白单可变结构域(例如VHH),其中VHH包含CDR1、CDR2和CDR3,并且其中CDR1、CDR2和CDR3选自:

[0024] (a) 由DSIX₁SX₂VNMG表示的CDR1,其中X₁=D或Q,并且X₂=M或L;

[0025] (b) 由LIAX₃YITHYADFVKG表示的CDR2,其中X₃=N、T、Y、R或W;

[0026] (c) 由RX₄IX₅X₆DY表示的CDR3,其中X₄=N或S,X₅=I、R或Y,并且X₆=V或E。

[0027] 在一些实施方案中,PD-1结合分子包含至少一个免疫球蛋白单可变结构域(例如VHH),其中VHH包含CDR1、CDR2和CDR3,并且其中CDR1、CDR2和CDR3选自:

[0028] (a) 具有如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的CDR1,具有如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的CDR2和具有如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的CDR3;

[0029] (b) 具有如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的CDR1,具有如SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的CDR2和具有如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的CDR3;

[0030] (c) 具有如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的CDR1,具有如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的CDR2和具有如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的CDR3;

[0031] (d) 具有如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的CDR1,具有如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的CDR2和具有如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列的CDR3;

[0032] (e) 具有如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列的CDR1,具有如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列的CDR2和具有如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列的CDR3;

[0033] (f) 具有如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列的CDR1,具有如SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列的CDR2和具有如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列的CDR3;

[0034] (g) 具有如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列的CDR1,具有如SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列的CDR2和具有如SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列的CDR3;

[0035] (h) 具有如SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列的CDR1,具有如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的CDR2和具有如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的CDR3;

[0036] (i) 具有如SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列的CDR1,具有如SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列的CDR2和具有如SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列的CDR3;

[0037] (j) 具有如SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列的CDR1,具有如SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列的CDR2和具有如SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列的CDR3;

[0038] (k) 具有如SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列的CDR1,具有如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列的CDR2和具有如SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列的CDR3;和

[0039] (1) 具有如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列的CDR1,具有如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列的CDR2和具有如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列的CDR3。

[0040] 在一些实施方案中,PD-1结合分子包含至少一个免疫球蛋白单可变结构域(例如VHH),其中VHH包含

[0041] (A) SEQ ID NO:37-49中任一所示的氨基酸序列;

[0042] (B) 与SEQ ID NO:37-49中的任何一个至少85%、至少90%或至少95%相同的氨基酸序列;或

[0043] (C) 与SEQ ID NO:37-49中的任何一个相比具有一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列。

[0044] 在一些方面,本发明涉及分离的核酸分子,其包含编码如本文所公开的PD-1结合分子的核酸序列。

[0045] 在一些方面,本发明涉及包含编码如本文所公开的PD-1结合分子的核酸分子的表达载体。

[0046] 在一些方面,本发明涉及包含本文公开的表达载体的宿主细胞。

[0047] 在一些方面,本发明涉及包含至少一种本文公开的PD-1结合分子和药学上可接受的载体的药物组合物。

[0048] 在一些方面,本发明涉及用于制备PD-1结合分子的方法,其包括在宿主细胞中表达PD-1结合分子并从宿主细胞分离PD-1结合分子。

[0049] 在一些方面,本发明涉及抑制或阻断受试者中PD-L1与PD-1结合的方法,其包括:向受试者施用治疗有效量的本文公开的PD-1结合分子。

[0050] 在一些方面,本发明涉及用于抑制或阻断受试者中PD-L2与PD-1结合的方法,其包括:向受试者施用治疗有效量的本文公开的PD-1结合分子。

[0051] 在一些方面,本发明涉及治疗受试者中与PD-1相关的病症的方法,其包括:向受试者施用治疗有效量的本文公开的PD-1结合分子。

[0052] 在一些方面,本发明涉及治疗受试者中会受益于免疫应答上调的病症的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本文公开的PD-1结合分子。

[0053] 在一些方面,本发明涉及本文公开的PD-1结合分子在制备用于治疗或预防增殖性病症例如癌症的药物中的用途。

[0054] 在一些方面,本发明涉及本文公开的PD-1结合分子在制备用于治疗或预防将受益于免疫应答上调的病症的药物中的用途。

[0055] 在一些方面,本发明涉及使用本文公开的PD-1结合分子以及本文公开的药物组合物的试剂盒或装置和相关方法,其可用于治疗增殖性疾病如癌症。为此,本发明优选提供可用于治疗此类病症的制品,其包含含有如本文公开的PD-1结合分子的容器和用于使用本文所公开的PD-1结合分子来治疗、改善或预防增殖性疾病或其进展或复发的说明材料。在选定的实施方案中,装置和相关方法将包括使至少一种循环肿瘤细胞与本文公开的PD-1结合分子接触的步骤。

[0056] 以上内容是一个概述,因此必要时包含细节的简化、概括和省略;因此,本领域技术人员将认识到,该概述仅是举例说明性的,并不意图以任何方式进行限制。本文所述的方法、组合物和/或装置和/或其他主题的其它方面、特征和优势将在本文所示的教导中变得

明显。提供概述以简化地介绍一些选择的观念,这些概念将在下面的详细描述中进一步描述。本概述不旨在确定所要求保护的主题的关键特征或基本特征,也不旨在用作确定所要求保护的主题的范围的辅助手段。此外,贯穿本申请引用的所有参考文献、专利和公开的专利申请的内容通过引用整体并入本文。

[0057] 附图简述

[0058] 图1显示了抗-PD-1抗体与细胞表面人PD-1的结合,由MFI (平均荧光强度)表示并通过FACS测量。

[0059] 图2显示了抗-PD-1抗体与细胞表面小鼠PD-1的结合,由MFI表示并通过FACS测量。

[0060] 图3显示了抗-PD-1抗体与细胞表面食蟹猴PD-1的结合,由MFI表示并通过FACS测量。

[0061] 图4显示了通过FACS测量的人PD1/PD-L1阻断。

[0062] 图5显示了通过FACS测量的小鼠PD1/PD-L1阻断。

[0063] 图6显示了通过ELISA测量的人PD1/PD-L2阻断。

[0064] 图7显示了通过ELISA测量的食蟹猴PD1/PD-L1阻断。

[0065] 图8显示了通过ELISA测量的对人PD-1、CD28、CTLA-4、ICOS和BTLA的交叉反应性。

[0066] 图9显示抗体AP17R1-2H2 (图9A和9B) 和抗体W3056-AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1-FC (IgG4.SP) (图9C和9D) 分别针对参照抗体BMK1和BMK3的表位分仓。

[0067] 图10显示了通过ELISA测量并由IL-2水平 (图10A) 和IFN- γ 水平 (图10B) 反映的抗PD-1抗体对人同种异体混合淋巴细胞反应 (A11o-MLR) 的影响。

[0068] 图11显示了通过IFN- γ 产生水平 (图11A) 和T细胞增殖水平 (图11B) 反映的抗PD-1抗体对人自体同源MLR (Auto-MLR) 的影响。

[0069] 图12显示了通过IFN- γ 产生水平 (图12A) 和T细胞增殖水平 (图12B) 反映的抗PD-1抗体对人Treg MLR影响。

[0070] 图13显示抗PD-1抗体的ADCC测定。

[0071] 图14显示通过DSF (差示扫描荧光测定法) 测定的热稳定性测试的结果。

[0072] 图15显示通过FACS检测血清处理的样品的靶标结合而检测的W3056-AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1-FC (IgG4.SP) 在37°C在人血清中的稳定性。

[0073] 发明详述

[0074] 虽然本发明可以以许多不同的形式来实施,但在此公开的是验证本发明原理的其具体的举例说明性实施方案。应该强调的是,本发明不限于所举例说明的具体实施方案。此外,本文使用的任何章节标题仅用于组织目的,并不被解释为限制所描述的主题。

[0075] 除非在此另外定义,否则与本发明结合使用的科学和技术术语将具有本领域普通技术人员通常理解的含义。此外,除非上下文另有要求,单数形式的术语应包括复数形式,复数形式的术语应包括单数形式。更具体地,如在本说明书和所附权利要求中所使用的,除非上下文另外明确指出,否则单数形式“一”,“一个”和“该”包括复数指示物。因此,例如,提及“一种蛋白质”包括多种蛋白质;提及“一个细胞”包括细胞的混合物等。在本申请中,除非另有说明,否则使用“或”意指“和/或”。此外,术语“包含”以及其他形式 (诸如“包括”和“含有”) 的使用不是限制性的。此外,说明书和所附权利要求中提供的范围包括端点和断点之间的所有值。

[0076] 通常,与本文描述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学和蛋白质以及核酸化学和杂交有关的术语以及其技术是本领域众所周知和常用的术语。除非另有说明,否则本发明的方法和技术通常根据本领域公知的常规方法进行,并如在本说明书全文中引用和讨论的各种通用和更具体的参考文献中所述进行。参见例如Abbas等人, *Cellular and Molecular Immunology*, 6th ed., W.B. Saunders Company (2010); Sambrook J. & Russell D. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 3rd ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (2000); Ausubel等人, *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, Wiley, John & Sons, Inc. (2002); Harlow and Lane *Using Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1998); 和 Coligan等人, *Short Protocols in Protein Science*, Wiley, John & Sons, Inc. (2003)。与本文描述的分析化学,合成有机化学和药物和药物化学有关的术语以及实验室程序和技术是本领域中众所周知和常用的术语。此外,本文使用的任何章节标题仅用于组织目的,并且不被解释为限制所描述的主题。

[0077] 定义

[0078] 为了更好地理解本发明,相关术语的定义和解释提供如下。

[0079] 如本文所用,术语“抗体”或“Ab”通常是指表现出所需生物学或结合活性的任何形式的抗体。它包括但不限于人源化抗体、完全人抗体、嵌合抗体和单结构域抗体。抗体可以包含重链和轻链。重链可分为 μ 、 δ 、 γ 、 α 和 ϵ ,它们分别将抗体的同种型定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。每条重链由重链可变区(VH)和重链恒定区(CH)组成。重链恒定区由3个结构域(CH1, CH2和CH3)组成。每条轻链由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成。VH和VL区可以进一步分为由相对保守的区域(称为框架区(FR))间隔开的高变区(称为互补决定区(CDR))。每个VH和VL由以下顺序的3个CDR和4个FR组成:从N端到C端的FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4。氨基酸在各种区域或结构域中的分布遵循Kabat Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1987 and 1991)) 或 Chothia & Lesk (1987) *J. Mol. Biol.* 196:901-917; Chothia等人, (1989) *Nature* 342:878-883中的定义。抗体可以具有不同的抗体同种型,例如IgG(例如, IgG1, IgG2, IgG3或IgG4亚型), IgA1, IgA2, IgD, IgE或IgM抗体。

[0080] 如本文所用的术语“人源化抗体”是指其中来源于另一种哺乳动物物种如小鼠的种系的CDR序列已被移植到人框架序列上的抗体。可以在人框架序列内进行额外的框架区修饰。

[0081] 如本文所用的术语“嵌合抗体”是指这样的抗体,其中可变区序列来自一个物种并且恒定区序列来自另一物种,例如其中可变区序列源自小鼠抗体和恒定区序列来源于人抗体。

[0082] 如本文所用,术语“PD-1”是指程序性细胞死亡蛋白,其属于免疫球蛋白超家族并且作为共抑制性受体发挥作用以负调节免疫系统。PD-1是CD28/CTLA-4家族的成员,并且具有两种已知的配体,包括PD-L1和PD-L2。PD-1的替代名称或同义词包括PDCD1, PD1, CD279和SLEB2等。在NCBI登录号:NP_005009.2下公开了人PD-1的代表性氨基酸序列,并且在NCBI登录号NM_005018.2下显示了编码人PD-1的代表性核酸序列。

[0083] 如本文所用,术语“PD-L1”是指程序性细胞死亡配体1(PD-L1,参见例如Freeman等人.(2000) J. Exp. Med. 192:1027)。PD-L1的替代名称或同义词包括PDCD1L1, PDL1, B7H1, CD274和B7-H等。人PD-L1的代表性氨基酸序列在NCBI登录号NP_054862.1中公开,编码人PD-L1的代表性核酸序列显示在NCBI登录号:NM_014143.3下。PD-L1在胎盘,脾脏,淋巴结,胸腺,心脏,胎儿肝脏中表达,并且也在许多肿瘤或癌细胞中发现。PD-L1结合其受体PD-1或B7-1,其在活化的T细胞、B细胞和骨髓细胞上表达。PD-L1和其受体的结合诱导信号转导以抑制TCR介导的细胞因子产生和T细胞增殖的激活。因此,PD-L1在特定事件(例如妊娠,自身免疫疾病,组织同种异体移植)期间抑制免疫系统中起主要作用,并且被认为允许肿瘤或癌细胞绕过免疫检查点并逃避免疫应答。

[0084] 如本文所用,术语“PD-L2”是指程序性细胞死亡配体2。PD-L2的替代名称或同义词包括PDCD1L2, PDL2, B7-DC, Btdc和CD273等。人PD-L2的代表性氨基酸序列在NCBI登录号NP_079515.2中公开。

[0085] 如本文所用,术语“抗PD-1抗体”是指能够特异性结合PD-1(例如人,猴或猴PD-1)的抗体。有利的是,抗PD-1抗体以足以提供诊断和/或治疗用途的亲合力与PD-1特异性结合。

[0086] 如本文所用,术语“ K_a ”旨在表示特定抗体-抗原相互作用的缔合速率,而本文所用的术语“ K_d ”旨在表示特定抗体-抗原相互作用的解离速率。抗体的 K_d 值可以使用本领域良好建立的方法来确定。如本文所用,术语“ K_d ”旨在表示特定抗体-抗原相互作用的解离常数,其从 K_d 与 K_a 的比率(即, K_d/K_a)获得并且表示为摩尔浓度(M)。确定抗体 K_d 的优选方法是通过使用表面等离子体共振,优选使用生物传感器系统如**Biacore®**系统。

[0087] 如本文所用的术语“特异性结合”或“特异性结合至”是指两个分子之间例如抗体和抗原之间的非随机结合反应。

[0088] 如本文所用,“抑制结合”、“阻断结合”或“竞争相同表位”的能力是指抗体抑制两个分子(例如人PD-1和抗-PD-1抗体)的结合至任何可检测的程度的能力。在一些实施方案中,阻断两个分子之间结合的抗体将两个分子之间的结合相互作用抑制至少50%。在一些实施方案中,该抑制可以大于60%,大于70%,大于80%或大于90%。

[0089] 如本文所用的术语IgG抗体的“高亲和力”是指针对靶抗原具有 1×10^{-7} M或更低,更优选 5×10^{-8} M或更低,甚至更优选 1×10^{-8} M或更低,甚至更优选 5×10^{-9} M或更低,和甚至更优选 1×10^{-9} M或更低的 K_d 的抗体。

[0090] 如本文所用的术语“ EC_{50} ”,也被称为“半数有效浓度”,是指在特定的暴露时间后诱导在基线和最大值之间的50%的应答的药物、抗体或毒剂的浓度。在本申请的上下文中, EC_{50} 的单位为“nM”。

[0091] 如本文所用,术语“表位”是指免疫球蛋白或抗体特异性结合的抗原部分。“表位”也被称为“抗原决定簇”。表位或抗原决定簇通常由分子例如氨基酸、碳水化合物或糖侧链的化学活性表面基团组成,并且通常具有特定的三维结构和特定的电荷特征。例如,表位通常包含独特立体构象中的至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个连续或不连续的氨基酸,其可以是“线性”或“构象”表位。参见例如Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, G.E. Morris, Ed. (1996)。在线性表位中,蛋白质和相互作用分子(例如抗体)之间的所有相互作用位点沿蛋白质的一级氨基酸序列线性存在。在构象

表位中,相互作用位点跨越蛋白质中彼此分离的氨基酸残基。取决于通过本领域技术人员已知的常规技术检测的结合相同表位的竞争性,可以筛选抗体。例如,可以进行竞争或交叉竞争研究以获得彼此竞争或交叉竞争结合抗原(例如RSV融合蛋白)的抗体。在国际专利申请WO 03/48731中描述了用于获得结合相同表位的抗体的高通量方法,其基于它们的交叉竞争。

[0092] 如本文所用,术语“分离的”是指通过人工方式从天然状态获得的状态。如果某种“分离的”物质或组分天然存在,则可能是由于其天然发生变化,或者物质与天然分离,或者两者兼而有之。例如,某种未分离的多核苷酸或多肽天然存在于某个活动物体体内,从该天然状态分离的相同的高纯度多核苷酸或多肽被称为分离的多核苷酸或多肽。术语“分离的”既不排除混合的人造或合成物质,也不排除不影响分离的物质的活性的其他不纯物质。

[0093] 如本文所用,术语“分离的抗体”旨在指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如,特异性结合PD-1蛋白的分离的抗体基本上不含特异性结合除PD-1蛋白以外的抗原)。但是,特异性结合人PD-1蛋白的分离的抗体可能与其他抗原如来自其他物种的PD-1蛋白具有交叉反应性。此外,分离的抗体可以基本上不含其他细胞材料和/或化学物质。

[0094] 如本文所用,术语“载体”是指可以在其中插入多核苷酸的核酸媒介物。当载体允许插入其中的多核苷酸编码的蛋白质的表达时,该载体称为表达载体。该载体可以通过转化、转导或转染入宿主细胞而使携带的遗传物质元件在宿主细胞中表达。载体是本领域技术人员所熟知的,包括但不限于质粒,噬菌体,粘粒,人工染色体如酵母人工染色体(YAC),细菌人工染色体(BAC)或P1衍生人工染色体(PAC);噬菌体如 λ 噬菌体或M13噬菌体和动物病毒。可用作载体的动物病毒包括但不限于逆转录病毒(包括慢病毒),腺病毒,腺伴随病毒,疱疹病毒(如单纯疱疹病毒),痘病毒,杆状病毒,乳头瘤病毒,乳多空病毒(如SV40)。载体可以包含用于控制表达的多个元件,包括但不限于启动子序列,转录起始序列,增强子序列,选择元件和报道基因。另外,载体可以包含复制起点。

[0095] 如本文所用,术语“宿主细胞”是指可以导入载体的细胞,包括但不限于原核细胞如大肠杆菌(*E.coli*)或枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*),真菌细胞如酵母细胞或曲霉属(*Aspergillus*),昆虫细胞如S2果蝇细胞或Sf9,以及动物细胞如成纤维细胞,CHO细胞,COS细胞,NS0细胞,HeLa细胞,BHK细胞,HEK293细胞或人细胞。

[0096] 如本文所用的术语“T细胞”包括CD4+T细胞,CD8+T细胞,T辅助1型T细胞,T辅助2型T细胞,T辅助17型T细胞和抑制性T细胞。

[0097] 如本文所用,术语“同一性”是指通过比对和比较序列确定的两个或更多个多肽分子或两个或更多个核酸分子的序列之间的关系。“百分比同一性”是指比较分子中氨基酸或核苷酸之间相同残基的百分比,并基于被比较的最小分子的大小计算。对于这些计算,比对中的间隙(如果有的话)优选通过特定的数学模型或计算机程序(即“算法”)来寻址。可以用于计算比对的核酸或多肽的同一性的方法包括在Computational Molecular Biology, (Lesk, A.M., ed.), 1988, New York: Oxford University Press; Biocomputing Informatics and Genome Projects, (Smith, D.W., ed.), 1993, New York: Academic Press; Computer Analysis of Sequence Data, Part I, (Griffin, A.M., and Griffin, H.G., eds.), 1994, New Jersey: Humana Press; von Heinje, G., 1987, Sequence Analysis

in Molecular Biology, New York: Academic Press; Sequence Analysis Primer, (Gribskov, M. and Devereux, J., eds.), 1991, New York: M. Stockton Press; 和 Carillo 等人, 1988, SIAM J. Applied Math. 48:1073 中描述的那些。

[0098] 如本文所用, 术语“免疫原性”是指刺激生物体中特异性抗体或致敏淋巴细胞形成的能力。它不仅指抗原刺激特定免疫细胞活化、增殖和分化以最终产生免疫效应物质如抗体和致敏淋巴细胞的性质, 还指抗体或致敏 T 淋巴细胞的特异性免疫应答可以在用抗原刺激生物体后在生物体的免疫系统中形成。免疫原性是抗原最重要的特性。抗原是否能够成功诱导宿主中免疫应答的产生取决于三个因素: 抗原的性质, 宿主的反应性和免疫手段。

[0099] 如本文所用, 术语“转染”是指将核酸引入真核细胞特别是哺乳动物细胞的过程。用于转染的方案和技术包括但不限于脂质转染和化学和物理方法如电穿孔。许多转染技术在本领域是公知的并且在本文中公开。参见例如 Graham 等人, 1973, Virology 52:456; Sambrook 等人, 2001, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 同上; Davis 等人, 1986, Basic Methods in Molecular Biology, Elsevier; Chu et al, 1981, Gene 13:197。

[0100] 如本文所用, 术语“SPR”或“表面等离子体共振”是指并且包括允许通过检测生物传感器基质内的蛋白质浓度的改变来分析实时生物特异性相互作用的光学现象, 例如使用 BIAcore 系统 (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden 和 Piscataway, NJ)。关于详细描述, 参见实施例 5 和 Jönsson, U., 等人 (1993) Ann. Biol. Clin. 51:19-26; Jönsson, U., 等人 (1991) Biotechniques 11:620-627; Johnson, B., 等人 (1995) J. Mol. Recognit. 8:125-131; 和 Johnson, B., 等人 (1991) Anal. Biochem. 198:268-277。

[0101] 如本文所用, 术语“荧光激活细胞分选”或“FACS”是指专门类型的流式细胞术。它提供了根据每个细胞的特定光散射和荧光特征, 将生物细胞的异质混合物以每次一个细胞分拣到两个或更多个容器中的方法 (FlowMetric, “Sorting Out Fluorescence Activated Cell Sorting”. 2017-11-09)。用于进行 FACS 的仪器是本领域技术人员已知的并且可以对于公众是可商购获得的。这种仪器的实例包括 Becton Dickinson (Foster City, Calif.) 的 FACS Star Plus、FACScan 和 FACSort 仪器、来自 Coulter Epics Division (Hialeah, Fla.) 的 Epics C 和来自 Cytomation (Colorado Springs, Colo.) 的 MoFlo。

[0102] 术语“受试者”包括任何人或非人动物, 优选人。

[0103] 如本文所用, 术语“与 PD-1 关联的病症”或“与 PD-1 相关的病症”是指由 PD-1 (如人 PD-1) 的增加或减少的表达或活性引起、加重或以其它方式与其相关的任何病症。

[0104] 如本文所用, 术语“癌症”是指引发医学病症的任何肿瘤或恶性细胞生长、增殖或转移介导的实体瘤和非实体瘤如白血病。

[0105] 本文在治疗病情的情况中使用的术语“治疗”和“医治”一般涉及人或动物的治疗和疗法, 其中实现了一些期望的治疗效果, 例如, 抑制病情进展, 包括进展速度下降, 进展速度停滞, 病情消退, 病情改善和病情治愈。还包括了作为预防措施 (即预防) 的治疗。对于癌症, “治疗”可能是指抑制或减缓肿瘤或恶性细胞生长、增殖或转移或其某种组合。对于肿瘤, “治疗”包括去除全部或部分肿瘤、抑制或减缓肿瘤生长和转移、预防或延迟肿瘤的发展或其某种组合。

[0106] 如本文所用, 术语“治疗有效量”涉及活性化合物或包含活性化合物的材料、组合物或剂型的量, 其在按照所需的治疗方案施用时有效用于产生与合理的益处/风险比相称

的某些所需的治疗效果。具体而言,“治疗有效量”意指抗体或其抗原结合部分有效治疗人PD-1相关疾病或病症的量或浓度。

[0107] 如本文所用,本发明的“宿主细胞”是指引入外源多核苷酸的细胞。

[0108] 如本文所用,术语“治疗有效量”或“有效量”是指有效治疗人PD-1相关的疾病或病况的药物的量或浓度。

[0109] 如本文所用,术语“药学上可接受”是指载体、稀释剂、赋形剂和/或其盐在化学和/或物理上与制剂中的其他成分相容,并且与接受者在生理学上相容。

[0110] 如本文所用,术语“药学上可接受的载体和/或赋形剂”是指在药理学和/或生理学上与受试者和活性剂相容的载体和/或赋形剂,其在本领域中是公知的(参见,例如, Remington's Pharmaceutical Sciences. Edited by Gennaro AR, 19th ed. Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1995),并且包括但不限于pH调节剂,表面活性剂,佐剂和离子强度增强剂。例如,pH调节剂包括但不限于磷酸盐缓冲液;表面活性剂包括但不限于阳离子、阴离子或非离子表面活性剂,例如Tween-80;离子强度增强剂包括但不限于氯化钠。

[0111] 如本文所用,术语“佐剂”是指非特异性免疫增强剂,其在与抗原一起递送至生物体或被提前递送至有机体时可以增强生物体中的对抗原的免疫应答或改变免疫应答的类型。存在多种佐剂,包括但不限于铝佐剂(例如氢氧化铝),弗氏佐剂(例如弗氏完全佐剂和弗氏不完全佐剂),短小棒状杆菌,脂多糖,细胞因子等。弗氏佐剂是目前动物实验中最常用的佐剂。氢氧化铝佐剂更常用于临床试验。

[0112] PD-1结合分子

[0113] 在一些方面,本发明包含PD-1结合分子。

[0114] 一般来说,PD-1结合分子可以包括任何特异性结合PD-1的分子。在一些情况下,“PD-1结合分子”可以包括“PD-1拮抗剂”。“PD-1拮抗剂”是指阻断PD-L1与免疫细胞(T细胞,B细胞或NKT细胞)上表达的PD-1结合的任何化合物或生物分子,并且优选还阻断PD-L2与免疫细胞表达的PD-1结合。PD-1结合分子或PD-1拮抗剂可以是多肽或蛋白质,例如抗体,更具体地说是抗PD-1抗体。

[0115] 抗体包括但不限于嵌合抗体、人源化抗体或单结构域抗体。在具体的实施方案中,PD-1结合分子是单结构域抗体,其通常是指由单个单体可变抗体结构域组成的抗体。像整个抗体一样,单结构域抗体能够选择性结合特定抗原。

[0116] 更具体而言,PD-1结合分子是单结构域重链抗体,其可与术语“VHH”、“VHH抗体”、“VHH结构域”、“VHH抗体片段”、“V_{HH}”或“纳米抗体”等互换使用。来自骆驼科抗体的V_{HH}分子是已知的最小完整抗原结合结构域之一(约15KDa,或是常规IgG的1/10),因此非常适合递送至致密组织和进入大分子之间的有限空间。

[0117] 本文公开的本发明的单结构域抗体可由本领域技术人员根据本领域已知的方法或任何未来的方法制备。例如,可以使用本领域已知的方法获得VHH,例如通过免疫骆驼并从中获得杂交瘤,或者通过使用本领域已知的分子生物学技术克隆本发明的VHH的文库,然后通过使用噬菌体展示进行选择。

[0118] 例如,可通过用所需抗原免疫美洲驼或羊驼并随后分离编码重链抗体的mRNA来获得单结构域抗体。通过逆转录和聚合酶链反应,产生含有数百万克隆的单结构域抗体的基

因文库。筛选技术如噬菌体展示和核糖体展示有助于鉴定结合抗原的克隆。一种技术是噬菌体展示,其中在噬菌体上合成(优选人)抗体文库,用感兴趣的抗原或其抗体结合部分筛选文库,并分离结合抗原的噬菌体,从其中可以获得免疫反应性片段。用于制备和筛选这种文库的方法是本领域众所周知的,并且用于产生噬菌体展示文库的试剂盒可商购获得(例如,Pharmacia重组噬菌体抗体系统,目录号27-9400-01;以及Stratagene SurfZAP™噬菌体展示试剂盒,目录号240612)。还有其他方法和试剂可用于产生和筛选抗体展示文库(参见例如Barbas等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:7978-7982(1991))。

[0119] 当最有效的克隆被鉴定时,例如通过亲和力成熟或人源化优化其DNA序列。人源化可以防止人体对抗抗体的免疫反应。

[0120] 因此,可通过以下方式获得单结构域抗体:(1)分离天然存在的重链抗体的VHH结构域;(2)通过表达编码天然存在的VHH结构域的核苷酸序列;(3)通过天然存在的VHH结构域的“人源化”(如下所述)或通过表达编码这种人源化VHH结构域的核酸;(4)通过来自任何动物物种,特别是哺乳动物物种,例如来自人的天然存在VH结构域的“骆驼化”,或通过表达编码这种骆驼化VH结构域的核酸;(5)通过如Ward等人(上文)描述的“结构域抗体”或“Dab”的“骆驼化”,或通过表达编码这种骆驼化VH结构域的核酸;(6)使用合成或半合成技术制备蛋白质、多肽或其他氨基酸序列;(7)通过使用用于核酸合成的技术制备编码VHH的核酸,然后表达由此获得的核酸;和/或(8)通过前述的任何组合。基于本文的公开内容,用于执行前述内容的合适方法和技术对于本领域技术人员将是清楚的,并且例如包括下文更详细描述的方法和技术。

[0121] 单结构域抗体通常通过从免疫动物获得的血液、淋巴结或脾cDNA PCR克隆可变结构域库至噬菌体展示载体中而产生。通常通过在固定化抗原(例如涂布在试管塑料表面的抗原,固定在链霉抗生物素蛋白珠上的生物素化抗原或细胞表面上表达的膜蛋白)上淘选相文库来选择抗原特异性单结构域抗体。通过体外模拟该策略可以提高adAb的亲和力,例如通过CDR区的定点诱变和在增加的严格条件(更高温度,高或低盐浓度,高或低pH和低抗原浓度)下对固定化抗原进行进一步的淘选(Wesolowski等人.,Single domain antibodies:promising experimental and therapeutic tools in infection and immunity.Med Microbiol Immunol(2009)198:157-174)。

[0122] 用于制备特异性结合抗原或表位的VHH的方法描述于参考文献中,参见例如:R.van der Linden等人.,Journal of Immunological Methods,240(2000)185-195;Li等人.,J Biol Chem.,287(2012)13713-13721;Deffar等人.,African Journal of Biotechnology Vol.8(12),pp.2645,17June,2009和W094/04678。

[0123] 在一些实施方案中,PD-1结合分子中的VHH与抗体的Fc结构域(例如IgG的Fc结构域(例如IgG4或IgG1))融合。在具体实施方案中,Fc-结构域是IgG4的Fc-结构域。通过将VHH融合至Fc结构域,可以更有效地募集效应功能,例如ADCC和CDC。而且,VHH与Fc结构域的融合可以帮助PD-1结合分子形成二聚体,并且还可以帮助延长PD-1结合分子的体内半衰期。

[0124] 如本文所用,术语“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”是指其中与某些细胞毒性细胞(例如天然杀伤(NK)细胞,嗜中性粒细胞和巨噬细胞)上存在的Fc受体(FcR)结合的分泌的Ig使这些细胞毒性效应细胞能够特异性结合携带抗原的靶细胞并随后用细胞毒素杀死靶细胞的细胞毒性形式。抗体“武装”细胞毒性细胞,并且对于这种杀伤是绝对需

要的。介导ADCC的主要细胞NK细胞仅表达Fc γ RIII,而单核细胞表达Fc γ RI,Fc γ RII和Fc γ RIII。造血细胞上的FcR表达总结在Ravetch and Kinet,Annu.Rev.Immunol 9:457-92 (1991)的464页的表3中。为了评估感兴趣分子的ADCC活性,可以进行体外ADCC测定,例如美国专利号5,500,362或5,821,337中所述的测定。可用于此类测定的效应细胞包括外周血单核细胞(PBMC)和自然杀伤(NK)细胞。可选或另外地,感兴趣分子的ADCC活性可以在体内评估,例如在如Clynes等人PNAS (USA) 95:652-656 (1998) 公开的动物模型中评估。

[0125] 术语“补体依赖性细胞毒性”或“CDC”是指在补体存在下靶细胞的裂解。经典补体途径的激活由补体系统的第一组分(C1q)与结合其同源抗原的抗体(适当的亚类)结合而启动。为了评估补体活化,可以执行CDC测定,例如Gazzano-Santoro等人,J.Immunol.Methods 202:163 (1996)中所述的。

[0126] 为了便于描述,在下面的章节中将PD-1结合分子描述为抗PD-1抗体。

[0127] 具有某些性质的抗PD-1抗体

[0128] 本发明的抗体的特征在于抗体的特定功能特征或性质。在一些实施方案中,抗体具有以下性质中的一种或多种:

[0129] (a) 以 1×10^{-7} M或更小的 K_D 结合人PD-1;

[0130] (b) 抑制或阻断PD-L1或PD-L2与PD-1的结合;

[0131] (c) 诱导CD4⁺T细胞中IFN- γ 的产生;

[0132] (d) 基本上不与人CD28、CTLA-4、ICOS和/或BTL结合;

[0133] (e) 与人PD-1没有交叉反应性,但与小鼠PD-1具有交叉反应性;和

[0134] (f) 至少在60°C是稳定的。

[0135] 本发明的抗体以高亲和力与细胞表面PD-1结合。本发明的抗体与PD-1的结合可以使用本领域良好建立的一种或多种技术,例如ELISA来评估。本发明抗体的结合特异性也可以通过监测抗体与表达PD-1蛋白的细胞的结合(例如流式细胞术)来确定。例如,抗体可以通过流式细胞术测定来测试,其中抗体与表达人PD-1的细胞系例如已转染以在其细胞表面表达PD-1的CHO细胞反应。另外或可选地,可以在BIAcore结合测定中测试抗体的结合,包括结合动力学(例如 K_d 值)。其他合适的结合测定包括ELISA测定,例如使用重组PD-1蛋白。例如,本发明的抗体以 1×10^{-7} M或更低, 5×10^{-8} M或更低, 2×10^{-8} M或更低, 5×10^{-9} M或更低, 4×10^{-9} M或更低, 3×10^{-9} M或更低, 2×10^{-9} M或更低, 1×10^{-9} M或更低, 5×10^{-10} M或更低, 1×10^{-10} M或更低的 K_D 结合细胞表面(例如人PD-1)蛋白。

[0136] 在一些实施方案中,本发明的抗体以不超过或约10nM、9nM、8nM、7nM、6nM、5nM、4nM、3nM、2nM、1nM、0.9nM、0.8nM、0.7nM、0.6nM、0.5nM、0.4nM、0.3nM、0.2nM、0.1nM、0.09nM、0.08nM、0.07nM、0.06nM、0.05nM、0.04nM、0.03nM、0.02nM、或0.01nM的 EC_{50} 结合食蟹猴或猴PD-1,如通过FACS测量的。

[0137] 在一些实施方案中,本发明的抗体以0.2nM-100nM(例如0.2nM-50nM,0.2nM-30nM,0.2nM-20nM,0.2nM-10nM或1nM-10nM)的 IC_{50} 抑制人PD-1与其配体的结合,如在竞争测定中例如通过ELISA所测量的。

[0138] 本发明的抗PD-1抗体对PD-1是特异性的。在一些实施方案中,抗体及其抗原结合片段不结合CD28、CTLA-4、ICOS和/或BTL。例如,与CD28、CTLA-4、ICOS和/或BTL的结合亲和力小于与PD-1的结合亲和力的15%,10%,9%,8%,7%,6%,5%,4%,3%,2%,或1%。

[0139] 在一些实施方案中,本发明的抗体阻断人PD-1与其配体的结合,从而提供生物学活性,包括例如从活化的T细胞(例如CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞)诱导细胞因子产生,诱导活化的T细胞(例如CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞)的增殖,以及逆转T_{reg}的抑制功能。示例性的细胞因子包括IL-2和IFN γ 。术语“IL-2”是指白细胞介素2,其是免疫系统中调节白血球(例如白细胞)活性的一类细胞因子信号传导分子。术语“干扰素 γ (IFN γ)”是由天然杀伤细胞(NK),NKT细胞,CD4⁺和CD8⁺T细胞产生的细胞因子,其是巨噬细胞的关键激活剂和主要组织相容性复合体(MHC)分子表达的诱导剂。细胞因子产生可以使用本领域已知的方法确定,例如通过ELISA。方法也可用于检测T细胞的增殖,包括[3H]胸苷掺入测定。

[0140] 在一些实施方案中,本发明的抗体与人PD-1没有交叉反应性,但与小鼠PD-1具有交叉反应性。目前在临床试验中测试的大多数针对PD-1的单克隆抗体仅针对人PD-1,这限制了临床前体内测定和由于小鼠来源的蛋白质序列的免疫原性而降低的功效。与小鼠PD-1具有交叉反应性的人源化抗体克服了这些缺陷,并显示出更高的体内耐受性和更高的效率。

[0141] 包含与特定序列具有序列同一性的CDR的抗PD-1抗体

[0142] 在一些实施方案中,本发明的抗PD-1抗体包含至少一个免疫球蛋白单可变结构域(例如VHH),其中所述VHH包含CDR1、CDR2和CDR3,并且其中CDR1包含与SEQ ID NO:1至少90%相同的氨基酸序列,CDR2包含与SEQ ID NO:2至少90%相同的氨基酸序列,和CDR3包含与SEQ ID NO:3至少80%相同的氨基酸序列。

[0143] 除非另有说明,否则将氨基酸分配给每个CDR可以根据以下提供的编号方案之一: Kabat等人(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest (5th Ed.), US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication no. 91-3242; Chothia等人, 1987, PMID: 3681981; Chothia等人, 1989, PMID: 2687698; MacCallum等人, 1996, PMID: 8876650; 或 Dubel, Ed. (2007) Handbook of Therapeutic Antibodies, 3rd Ed., Wiley-VCH Verlag GmbH and Co.。

[0144] 抗体序列中的可变区和CDR可以根据本领域已经开发的一般规则(如上所述,例如Kabat编号系统)或通过将序列与已知可变区的数据库比对来鉴定。在Kontermann and Dubel, eds., Antibody Engineering, Springer, New York, NY, 2001和Dinarello等人, Current Protocols in Immunology, John Wiley and Sons Inc., Hoboken, NJ, 2000中描述了鉴定这些区域的方法。抗体序列的示例性数据库描述于并可获自www.bioinf.org.uk/abs上的“Abysis”网站(由Department of Biochemistry&Molecular Biology University College London, London, England的A.C.Martin维护)和VBASE2网站www.vbase2.org, 如Retter等人, Nucl. Acids Res., 33 (Database issue): D671-D674 (2005)中所述。优选使用Abysis数据库分析序列,其整合了来自Kabat、IMGT和蛋白质数据库(PDB)的序列数据与来自PDB的结构数据,参见Dr. Andrew C.R. Martin所著的书中的Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains. In: Antibody Engineering Lab Manual (Ed.: Duebel, S. and Kontermann, R., Springer-Verlag, Heidelberg, ISBN-13: 978-3540413547, 也可在网站bioinforg.uk/abs上获得)。Abysis数据库网站还包括已经开发用于识别可以根据本文的教导使用的CDR的一般规则。除非另有说明,否则本文所述的所有CDR均根据Kabat的Abysis数据库网站获得。

[0145] 两个氨基酸序列之间的百分比同一性可以使用E.Meyers和W.Miller的算法(Comput.Appl.Biosci.,4:11-17(1988))确定,该算法已被并入ALIGN程序(版本2.0),使用PAM120权重残基表,空位长度罚分为12,空位罚分为4。另外,两个氨基酸序列之间的百分比同一性可以通过Needleman和Wunsch的算法(J.Mol.Biol.48:444-453(1970))确定,其已并入GCG软件包(可从<http://www.gcg.com>获得)中的GAP程序中,使用Blossum 62矩阵或PAM250矩阵,空隙权重为16、14、12、10、8、6或4,长度权重为1、2、3、4、5或6。

[0146] 另外地或可选地,本发明的蛋白质序列可以进一步用作“查询序列”来执行针对公共数据库的搜索以例如识别相关序列。这种搜索可以使用Altschul,等人(1990)J.Mol.Biol.215:403-10的XBLAST程序(版本2.0)来执行。可用XBLAST程序进行BLAST蛋白质搜索,得分=50,字长=3,以获得与本发明的抗体分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的空位比对,可使用空位BLAST,如Altschul等人,(1997)Nucleic Acids Res.25(17):3389-3402中所述的。当使用BLAST和空位BLAST程序时,可以使用各个程序(例如,XBLAST和NBLAST)的默认参数。参见www.ncbi.nlm.nih.gov。

[0147] 在另一些实施方案中,CDR氨基酸序列可以与上文出的各个序列至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%相同。

[0148] 包含具有氨基酸添加、缺失或取代的CDR的抗PD-1抗体

[0149] 在一些实施方案中,本发明的抗PD-1抗体包含至少一个免疫球蛋白单可变结构域(例如VHH),其中所述VHH包含CDR1、CDR2和CDR3,并且其中CDR1在氨基酸序列上与SEQ ID NO:1存在不超过2个氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差异;CDR2在氨基酸序列上与SEQ ID NO:2存在不超过2个氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差异;和/或CDR3在氨基酸序列上与SEQ ID NO:3存在不超过2个氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差异。例如,CDR1、CDR2和CDR3分别与SEQ ID NO:1-3所示的氨基酸序列存在仅一个氨基酸的氨基酸添加、缺失或取代的差异。

[0150] 在一些实施方案中,本发明的抗PD-1抗体包含至少一个免疫球蛋白单可变结构域(例如VHH),其中所述VHH包含CDR1、CDR2和CDR3,并且其中CDR1、CDR2和CDR3选自:

[0151] (a) 由DSIX₁SX₂VNMG表示的CDR1,其中X₁=D或Q,并且X₂=M或L;

[0152] (b) 由LIAX₃YITHYADFVKG表示的CDR2,其中X₃=N、T、Y、R或W;

[0153] (c) 由RX₄IX₅X₆DY表示的CDR3,其中X₄=N或S,X₅=I、R或Y,并且X₆=V或E。

[0154] 优选地,分离的抗体或其抗原结合部分的CDR含有不多于2个氨基酸或不多于1个氨基酸的保守取代。如本文所用,术语“保守取代”是指不会不利地影响或改变包含氨基酸序列的蛋白质/多肽的基本性质的氨基酸取代。例如,保守取代可以通过本领域已知的标准技术(例如定点诱变和PCR介导的诱变)引入。保守氨基酸取代包括其中氨基酸残基被具有相似侧链的另一氨基酸残基取代的取代,例如物理或功能相似的残基(例如具有相似的大小,形状,电荷,化学性质包括形成共价键或氢键的能力等)至相应的氨基酸残基的取代。本领域已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸,精氨酸和组氨酸),具有酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸和谷氨酸),具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(例如甘氨酸,天冬酰胺,谷氨酰胺,丝氨酸,苏氨酸,酪氨酸,半胱氨酸,色氨酸),具有非极性侧链的氨基酸(例如丙氨酸,缬氨酸,亮氨酸,异亮氨酸,脯氨酸,苯丙氨酸,甲硫氨酸),具有β-分支侧链的氨基酸(例如苏氨酸,缬氨酸,异亮氨酸)和具

有芳香族侧链的氨基酸(例如酪氨酸,苯丙氨酸,色氨酸,组氨酸)。因此,相应的氨基酸残基优选被来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基取代。用于鉴定氨基酸保守取代的方法在本领域中是公知的(参见例如Brummell等人,Biochem.32:1180-1187(1993);Kobayashi等人,Protein Eng.12(10):879-884(1999);和Burks等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 94:412-417(1997),其通过引用并入本文)。

[0155] 包含CDR的抗PD-1抗体

[0156] 在一些实施方案中,至少一个免疫球蛋白单可变结构域(例如VHH),其中所述VHH包含CDR1、CDR2和CDR3,并且其中CDR1、CDR2和CDR3选自:

[0157] (a) 包含SEQ ID NO:1中所示的氨基酸序列或由其组成的CDR1,包含SEQ ID NO:2中所示的氨基酸序列或由其组成的CDR2,和包含SEQ ID NO:3中所示氨基酸序列或由其组成的CDR3;

[0158] (b) 包含SEQ ID NO:4中所示的氨基酸序列或由其组成的CDR1,包含SEQ ID NO:5中所示的氨基酸序列或由其组成的CDR2,和包含SEQ ID NO:6中所示氨基酸序列或由其组成的CDR3;

[0159] (c) 包含SEQ ID NO:7中所示氨基酸序列或由其组成的CDR1,包含SEQ ID NO:8中所示氨基酸序列或由其组成的CDR2,和包含SEQ ID NO:9中所示氨基酸序列或由其组成的CDR3;

[0160] (d) 包含SEQ ID NO:10中所示氨基酸序列或由其组成的CDR1,包含SEQ ID NO:11中所示氨基酸序列或由其组成的CDR2,和包含SEQ ID NO:12中所示氨基酸序列或由其组成的CDR3;

[0161] (e) 包含SEQ ID NO:13中所示氨基酸序列或由其组成的CDR1,包含SEQ ID NO:14中所示氨基酸序列或由其组成的CDR2,和包含SEQ ID NO:15中所示氨基酸序列或由其组成的CDR3;

[0162] (f) 包含SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列或由其组成的CDR1,包含SEQ ID NO:17中所示氨基酸序列或由其组成的CDR2,和包含SEQ ID NO:18中所示氨基酸序列或由其组成的CDR3;

[0163] (g) 包含SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列或由其组成的CDR1,包含SEQ ID NO:20中所示氨基酸序列或由其组成的CDR2,和包含SEQ ID NO:21中所示氨基酸序列或由其组成的CDR3;

[0164] (h) 包含SEQ ID NO:22中所示氨基酸序列或由其组成的CDR1,包含SEQ ID NO:23中所示氨基酸序列或由其组成的CDR2,和包含包含SEQ ID NO:24中所示氨基酸序列或由其组成的CDR3;

[0165] (i) 包含SEQ ID NO:25中所示氨基酸序列或由其组成的CDR1,包含SEQ ID NO:26中所示氨基酸序列或由其组成的CDR2,和包含SEQ ID NO:27中所示氨基酸序列或由其组成的CDR3;

[0166] (j) 包含SEQ ID NO:28中所示氨基酸序列或由其组成的CDR1,包含SEQ ID NO:29中所示氨基酸序列或由其组成的CDR2,和包含SEQ ID NO:30中所示氨基酸序列或由其组成的CDR3;

[0167] (k) 包含SEQ ID NO:31中所示氨基酸序列或由其组成的CDR1,包含SEQ ID NO:32

中所所示氨基酸序列或由其组成的CDR2,和包含SEQ ID NO:33中所所示氨基酸序列或由其组成的CDR3;和

[0168] (1) 包含SEQ ID NO:34中所所示氨基酸序列或由其组成的CDR1,包含SEQ ID NO:35中所所示氨基酸序列或由其组成的CDR2,和包含SEQ ID NO:36中所所示氨基酸序列或由其组成的CDR3。

[0169] 在一些实施方案中,至少一个免疫球蛋白单可变结构域(例如VHH),其中所述VHH包含CDR1、CDR2和CDR3,并且其中CDR1、CDR2和CDR3选自:

[0170] (a) 具有如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列的CDR1,具有如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列的CDR2和具有如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列的CDR3;

[0171] (b) 具有如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列的CDR1,具有如SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的CDR2和具有如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列的CDR3;

[0172] (c) 具有如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的CDR1,具有如SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列的CDR2和具有如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列的CDR3;

[0173] (d) 具有如SEQ ID NO:10所示的氨基酸序列的CDR1,具有如SEQ ID NO:11所示的氨基酸序列的CDR2和具有如SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列的CDR3;

[0174] (e) 具有如SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列的CDR1,具有如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列的CDR2和具有如SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列的CDR3;

[0175] (f) 具有如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列的CDR1,具有如SEQ ID NO:17所示的氨基酸序列的CDR2和具有如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列的CDR3;

[0176] (g) 具有如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列的CDR1,具有如SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列的CDR2和具有如SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列的CDR3;

[0177] (h) 具有如SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列的CDR1,具有如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列的CDR2和具有如SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列的CDR3;

[0178] (i) 具有如SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列的CDR1,具有如SEQ ID NO:26所示的氨基酸序列的CDR2和具有如SEQ ID NO:27所示的氨基酸序列的CDR3;

[0179] (j) 具有如SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列的CDR1,具有如SEQ ID NO:29所示的氨基酸序列的CDR2和具有如SEQ ID NO:30所示的氨基酸序列的CDR3;

[0180] (k) 具有如SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列的CDR1,具有如SEQ ID NO:32所示的氨基酸序列的CDR2和具有如SEQ ID NO:33所示的氨基酸序列的CDR3;和

[0181] (1) 具有如SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列的CDR1,具有如SEQ ID NO:35所示的氨基酸序列的CDR2和具有如SEQ ID NO:36所示的氨基酸序列的CDR3。

[0182] 通过VHH序列定义的抗PD-1抗体

[0183] 在一些实施方案中,抗PD-1抗体包含至少一个免疫球蛋白单可变结构域(例如VHH),其中所述VHH包含或由以下组成:

[0184] (A) SEQ ID NO:37-49中任一个所示的氨基酸序列;

[0185] (B) 与SEQ ID NO:37-49中的任何一个至少85%、至少90%或至少95%相同的氨基酸序列;或

[0186] (C) 与SEQ ID NO:37-49中的任何一个相比具有一个或多个(例如,1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)氨基酸的添加、缺失和/或取代的氨基酸序列。

[0187] 在其他实施方案中,VHH的氨基酸序列可以与上述各个序列至少85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%相同。作为说明性实例,抗体可以包含与SEQ ID NO:37具有至少85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%序列同一性的VHH。

[0188] 在一些进一步的实施方案中,抗PD-1抗体可以包含重链和/或轻链的可变区中的氨基酸的保守取代或修饰。本领域理解的是,可以进行某些不消除抗原结合的保守序列修饰。参见例如Brummell等人(1993) *Biochem* 32:1180-8;de Wildt等人(1997) *Prot.Eng.*10:835-41;Komissarov等人(1997) *J. Biol. Chem.*272:26864-26870;Hall等人(1992) *J. Immunol.*149:1605-12;Kelley and O'Connell(1993) *Biochem.*32:6862-35;Adib-Conquy等人(1998) *Int. Immunol.*10:341-6和Beers等人(2000) *Clin. Can. Res.*6:2835-43。

[0189] 本文使用的术语“保守取代”是指氨基酸取代,其不会不利地影响或改变包含氨基酸序列的蛋白质/多肽的基本性质。例如,保守取代可以通过本领域已知的标准技术(例如定点诱变和PCR介导的诱变)引入。保守氨基酸取代包括其中氨基酸残基被具有相似侧链的另一氨基酸残基取代的取代,例如物理或功能相似的残基(例如具有相似的大小,形状,电荷,化学性质包括形成共价键或氢键的能力等)至相应的氨基酸残基的取代。本领域已经定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸,精氨酸和组氨酸),具有酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸和谷氨酸),具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(例如甘氨酸,天冬酰胺,谷氨酰胺,丝氨酸,苏氨酸,酪氨酸,半胱氨酸,色氨酸),具有非极性侧链的氨基酸(例如丙氨酸,缬氨酸,亮氨酸,异亮氨酸,脯氨酸,苯丙氨酸,甲硫氨酸),具有 β -分支侧链的氨基酸(例如苏氨酸,缬氨酸,异亮氨酸)和具有芳香族侧链的氨基酸(例如酪氨酸,苯丙氨酸,色氨酸,组氨酸)。因此,相应的氨基酸残基优选被来自相同侧链家族的另一个氨基酸残基取代。用于鉴定氨基酸保守取代的方法在本领域中是公知的(参见例如Brummell等人, *Biochem.*32:1180-1187(1993);Kobayashi等人, *Protein Eng.*12(10):879-884(1999);和Burks等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:412-417(1997),其通过引用并入本文)。

[0190] 分仓和表位作图

[0191] 将进一步理解的是,所公开的抗体将与由所选择的靶或其片段呈递的离散表位或免疫原性决定簇缔合或结合。在一些实施方案中,表位或免疫原性决定簇包括分子的化学活性表面分组,例如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基。在一些实施方案中,表位可以具有特定的三维结构特征和/或特异性电荷特性。因此,如本文所用,术语“表位”包括能够与免疫球蛋白或T细胞受体特异性结合或以其他方式与分子相互作用的任何蛋白质决定簇。在一些实施方案中,当抗体优先识别蛋白质和/或大分子的复杂混合物中的其靶抗原时,抗体被认为特异性结合(或免疫特异性结合或反应)抗原。在一些实施方案中,当平衡解离常数(K_D)小于或等于 10^{-6} M或小于或等于 10^{-7} M时,更优选当 K_D 小于或等于 10^{-7} M时,称抗体与抗原特异性结合等于 10^{-8} M,甚至更优选当 K_D 小于或等于 10^{-9} M时,抗体被认为特异性结合抗原。

[0192] 由连续氨基酸形成的表位(有时称为“线性”或“连续”表位)通常在蛋白质变性时保留,而通过三级折叠形成的表位通常在蛋白质变性后丢失。在任何情况下,抗体表位通常在独特的空间构象中包含至少3个,更通常地至少5或8-10个氨基酸。

[0193] 在这方面,应该理解的是,在一些实施方案中,表位可以与例如PD-1蛋白的一个或

多个区域、结构域或基序结合或位于其中。类似地,本领域公认的术语“基序”将根据其通用含义使用,并且通常应该是指通常十至二十个连续氨基酸残基的蛋白质的短保守区域。

[0194] 无论如何,一旦确定了抗原上的所需表位,就有可能产生针对该表位的抗体,例如通过使用本发明中描述的技术用包含表位的肽免疫。或者,在发现过程中,抗体的产生和表征可以阐明关于位于特定结构域或基序中的期望表位的信息。从这些信息中,可以竞争性筛选与相同表位结合的抗体。实现这一点的方法是进行竞争研究以发现彼此竞争性结合的抗体,即抗体竞争结合抗原。在WO 03/48731中描述了基于其交叉竞争对抗体进行分仓的高通量方法。分仓或结构域水平或表位作图包括抗体竞争或在酵母上的抗原片段表达的其他方法在本领域中是公知的。

[0195] 如本文所用,术语“分仓”是指用于基于抗原结合特征和竞争对抗体进行分组或分类的方法。尽管这些技术对于定义和分类本发明的抗体是有用的,但是这些仓(bin)并不总是直接与表位结合,并且表位结合的这种初始测定可以通过本领域中和如本文所述的其他公认的方法进一步改进和确认。然而,可以理解的是,将抗体凭验性地分配至各个仓提供了可以指示所公开的抗体的治疗潜力的信息。

[0196] 更具体地,可以通过使用本领域已知和本文实施例中所示的方法确定选定的参考抗体(或其片段)是否结合相同的表位或与第二测试抗体交叉竞争结合(即,在相同的仓内)。

[0197] 其他相容的表位作图技术包括丙氨酸扫描突变体,肽印迹(Reineke (2004) *Methods Mol Biol* 248:443-63)(特别地通过引用整体并入本文)或肽切割分析。另外,可以使用抗原的表位切除,表位提取和化学修饰等方法(Tomer (2000) *Protein Science* 9:487-496)(特别地通过引用整体并入本文)。

[0198] 编码本发明抗体的核酸分子

[0199] 在一些方面,本发明涉及分离的核酸分子,其包含编码如本文所公开的VHH的核酸序列。

[0200] 本发明的核酸可以使用标准分子生物学技术获得。对于从免疫球蛋白基因文库获得的抗体(例如,使用噬菌体展示技术),编码这种抗体的核酸可以从基因文库中回收。

[0201] 本发明的示例性核酸分子分别是SEQ ID Nos:50-62所列的那些。在一些实施方案中,所述核酸分别与SEQ ID NO:17-20具有至少80%(例如至少85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%或99%)的序列同一性。在一些实施方案中,同一性的百分比源自遗传密码的简并性,并且编码的蛋白质序列保持不变。

[0202] 可以使用本领域已知的重组技术将编码抗PD-1抗体的核酸分子插入载体以进一步克隆(扩增DNA)或用于表达。在另一个实施方案中,抗体可以通过本领域已知的同源重组产生。编码单克隆抗体的DNA易于使用常规方法分离和测序(例如,通过使用能够与编码抗体重链的基因特异性结合的寡核苷酸探针)。许多载体是可用的。载体组分通常包括但不限于以下一种或多种:信号序列,复制起点,一个或多个标记基因,增强子元件,启动子(例如SV40,CMV,EF-1 α),和转录终止序列。选择标记基因有助于选择导入了载体的宿主细胞(参见例如美国专利号4,399,216;4,634,665和5,179,017)。例如,通常选择标记基因赋予载体已经导入其中的宿主细胞对药物(例如G418,潮霉素或甲氨蝶呤)的抗性。选择标记基因可以包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(用于具有甲氨蝶呤选择/扩增的dhfr-宿主细胞)和neo

基因(用于G418选择)。

[0203] 在一些实施方案中,载体系统包括哺乳动物、细菌、酵母系统等,并包括质粒,例如,但不限于,pALTER,pBAD,pcDNA,pCa1,pL,pET,pGEMEX,pGEX,pCI,pCMV,pEGFP,pEGFT,pSV2,pFUSE,pVITRO,pVIVO,pMAL,pMONO,pSELECT,pUNO,pDUO,Psg5L,pBABE,pWPIX,pBI,p15TV-L,pPro18,pTD,pRS420,pLexA,pACT2.2等等,以及其他实验室和商业可用的载体。合适的载体可以包括质粒或病毒载体(例如复制缺陷型逆转录病毒,腺病毒和腺伴随病毒)。在本发明的一个实施方案中,载体可以是pET,例如含有六组氨酸标签和c-Myc-标签基因的pETbac。

[0204] 包含编码PD-1结合分子的核酸序列的载体可以被引入宿主细胞用于克隆或基因表达。用于在本文的载体中克隆或表达DNA的合适宿主细胞是原核生物、酵母或高等真核生物细胞。用于该目的的合适原核生物包括真细菌,例如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物体,例如肠杆菌科如埃希氏菌属,例如大肠杆菌,肠杆菌属,欧文氏菌属,克雷伯氏菌属,变形杆菌属,沙门氏菌属,例如鼠伤寒沙门氏菌,沙雷氏菌属,例如粘质沙雷氏菌和志贺氏菌,以及芽孢杆菌属如枯草芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌,假单胞菌属如铜绿假单胞菌和链霉菌。

[0205] 除了原核生物以外,真核微生物如丝状真菌或酵母是合适的用于抗PD-1抗体编码载体的克隆或表达宿主。酿酒酵母或普通面包酵母是低等真核宿主微生物中最常用的。然而,许多其它属、种和菌株通常是可获得的并且可用于本发明,例如粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*);克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)宿主,例如乳克鲁维酵母(*K.lactis*)、脆壁克鲁维酵母(*K.fragilis*) (ATCC 12,424)、保加利亚克鲁维酵母(*K.bulgaricus*) (ATCC 16,045)、威克曼氏克鲁维酵母(*K.wickerhamii*) (ATCC 24,178)、*K.waltii* (ATCC 56,500)、果蝇克鲁维酵母(*K.drosophilae*) (ATCC 36,906)、耐热克鲁维酵母(*K.thermotolerans*)和马克斯克鲁维氏酵母(*K.marxianus*);西洋蓍霉(*Yarrowia*) (EP 402,226);巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*) (EP 183,070);念珠菌属(*Candida*);*Trichoderma reesia* (EP 244,234);粗糙链孢霉(*Neurospora crassa*);许旺氏酵母属(*Schwanniomyces*)如西方许旺氏酵母(*Schwanniomyces occidentalis*);和丝状真菌,例如链孢霉属(*Neurospora*)、青霉属(*Penicillium*)、*Tolypocladium*以及曲霉属宿主如构巢曲霉(*A.nidulans*)和黑曲霉(*A.niger*)。

[0206] 用于表达本文提供的抗PD-1抗体的其他合适的宿主细胞来源于多细胞生物体。无脊椎动物细胞的实例包括植物和昆虫细胞。目前已经从下述宿主中鉴定了大量的杆状病毒株和变体以及相应的容许型昆虫宿主细胞:草地夜蛾(*Spodoptera Frugiperda*,毛虫)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*,蚊子)、白纹伊蚊(*Aedes albopictus*,蚊子)、*Drosophila melanogaster*(果蝇)和家蚕蛾(*Bombyx mori*)。用于转染的各种病毒株是公众可获得的,例如苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*) NPV的L-1变体和家蚕NPV的Bm-5株,并且根据本发明,这些病毒可以用作本文的病毒,特别是用于转染草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞。棉花、玉米、马铃薯、大豆、矮牵牛花、番茄和烟草的植物细胞培养物也可用作宿主。

[0207] 用上述用于抗PD-1抗体产生的表达或克隆载体转化宿主细胞,并在用于诱导启动子、选择转化体或扩增编码所需序列的基因的根据需要修改的常规营养培养基中培养。

[0208] 用于产生本文提供的抗PD-1抗体的宿主细胞可以在各种培养基中培养。诸如Ham'

s F10 (Sigma), Minimal Essential Medium (MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma) 和 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Sigma) 的商业上可获得的培养基适于培养宿主细胞。此外, Ham等人., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes等人., Anal. Biochem. 102:255 (1980), U.S. Pat. No. 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; 或 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; 或 U.S. Pat. Re. 30,985 中描述的任何培养基可用作宿主细胞的培养基。必要时可以用激素和/或其他生长因子(如胰岛素, 转铁蛋白或表皮生长因子), 盐(如氯化钠, 钙, 镁和磷酸盐), 缓冲液(如HEPES), 核苷酸(如腺苷和胸腺嘧啶), 抗生素(如 GENTAMYCIN™ 药物), 微量元素(定义为无机化合物, 通常以微摩尔范围内的终浓度存在) 和葡萄糖或等同能量来源添加至任何这些培养基。任何其他必需的补充剂也可以以本领域技术人员已知的适当浓度包含在内。诸如温度、pH 等的培养条件是与之前选择用于表达的宿主细胞一起使用的那些, 并且对普通技术人员而言将是明显的。

[0209] 当使用重组技术时, 抗体可以在细胞内, 在周质空间中产生, 或者直接分泌到培养基中。如果抗体在细胞内产生, 作为第一步, 例如通过离心或超滤除去微粒碎片(宿主细胞或裂解片段)。Carter等人, Bio/Technology 10:163-167 (1992) 描述了分离分泌到大肠杆菌周质空间的抗体的方法。简而言之, 在约30分钟内, 在乙酸钠(pH 3.5), EDTA和苯甲基磺酰氟(PMSF)的存在下融化细胞糊。细胞碎片可以通过离心去除。在抗体分泌到培养基中的情况下, 通常首先使用市售的蛋白质浓缩过滤器, 例如Amicon或Millipore Pellicon超滤单元浓缩来自这种表达系统的上清液。蛋白酶抑制剂例如PMSF可包括在任何前述步骤中以抑制蛋白水解, 并可包含抗生素以防止外来污染物的生长。

[0210] 可以使用例如羟基磷灰石层析, 凝胶电泳, 透析, DEAE-纤维素离子交换层析, 硫酸铵沉淀, 盐析和亲和层析来纯化从细胞制备的抗体, 其中亲和层析是优选的纯化技术。

[0211] 在任何初步纯化步骤之后, 包含目标抗体和污染物的混合物可以使用pH介于约2.5-4.5之间的洗脱缓冲液进行低pH疏水相互作用色谱, 优选在低盐浓度(例如约0-0.25M盐)下进行。

[0212] 药物组合物

[0213] 在一些方面, 本发明涉及药物组合物, 其包含至少一种如本文所公开的PD-1结合分子和药学上可接受的载体。

[0214] 组合物的组分

[0215] 药物组合物可以任选地含有一种或多种另外的药物活性成分, 例如另一种抗体或药物。本发明的药物组合物还可以与例如另一种免疫刺激剂、抗癌剂、抗病毒剂或疫苗组合施用, 使得抗PD-1抗体增强对疫苗的免疫反应。药学上可接受的载体可以包括例如药学上可接受的液体, 凝胶或固体载体, 水性介质, 非水性介质, 抗微生物剂, 等渗剂, 缓冲剂, 抗氧化剂, 麻醉剂, 悬浮/分散剂, 螯合剂, 稀释剂, 佐剂, 赋形剂或无毒的辅助物质, 本领域已知的各种组分的组合或更多。

[0216] 合适的组分可以包括例如抗氧化剂, 填充剂, 粘合剂, 崩解剂, 缓冲剂, 防腐剂, 润滑剂, 调味剂, 增稠剂, 着色剂, 乳化剂或稳定剂如糖和环糊精。合适的抗氧化剂可包括例如甲硫氨酸, 抗坏血酸, EDTA, 硫代硫酸钠, 铂, 过氧化氢酶, 柠檬酸, 半胱氨酸, 巯基甘油, 巯基乙酸, 巯基山梨糖醇, 丁基甲基苯甲醚, 丁基化羟基甲苯和/或丙基砷酸盐。如本发明所公开的, 在包含还原抗体或其抗原结合片段的一种或多种抗氧化剂如甲硫氨酸的含有本发明公

开的组合物的抗体或抗原结合片段的溶剂中,其可被氧化。氧化还原可防止或减少结合亲和力的降低,从而增强抗体稳定性并延长保质期。因此,在一些实施方案中,本发明提供了包含一种或多种抗体或其抗原结合片段和一种或多种抗氧化剂如甲硫氨酸的组合物。本发明进一步提供了多种方法,其中将抗体或其抗原结合片段与一种或多种抗氧化剂如甲硫氨酸混合。从而,抗体或其抗原结合片段可以被防止氧化,以延长其保质期和/或增加活性。

[0217] 为了进一步说明,药学上可接受的载体可以包括例如水性载体,例如氯化钠注射液,林格氏注射液,等渗右旋糖注射液,无菌水注射液或右旋糖和乳酸林格氏注射液,非水性载体如植物来源的固定油,棉籽油,玉米油,芝麻油或花生油,抑菌剂或抑真菌浓度的抗微生物剂,等渗剂如氯化钠或葡萄糖,缓冲剂如磷酸盐或柠檬酸盐缓冲剂,抗氧化剂如硫酸氢钠,局部麻醉剂如盐酸普鲁卡因,悬浮剂和分散剂如羧甲基纤维素钠,羟丙基甲基纤维素或聚乙烯吡咯烷酮,乳化剂如聚山梨酯80 (TWEEN-80),螯合剂或螯合剂如EDTA(乙二胺四乙酸)或EGTA(乙二醇四乙酸),乙醇,聚乙二醇,丙二醇,氢氧化钠,盐酸,柠檬酸或乳酸。用作载体的抗微生物剂可以添加到包含酚或甲酚、汞制剂、苯甲醇、氯丁醇、对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯、硫柳汞、苯扎氯铵和苄索氯铵的多剂量容器中的药物组合物中。合适的赋形剂可以包括例如水,盐水,右旋糖,甘油或乙醇。合适的无毒辅助物质可以包括例如润湿剂或乳化剂,pH缓冲剂,稳定剂,溶解度增强剂或诸如乙酸钠,脱水山梨糖醇单月桂酸酯,三乙醇胺油酸酯或环糊精的试剂。

[0218] 施用、制剂和剂量

[0219] 本发明的药物组合物可以通过各种途径体内施用至有需要的受试者,所述途径包括但不限于口服,静脉内,动脉内,皮下,肠胃外,鼻内,肌内,颅内,心内,心室内,气管内,口腔,直肠,腹膜内,皮内,局部,经皮和鞘内,或者通过植入或吸入。本发明组合物可以配制成固体、半固体、液体或气体形式的制剂;包括但不限于片剂,胶囊剂,粉剂,颗粒剂,软膏剂,溶液剂,栓剂,灌肠剂,注射剂,吸入剂和气雾剂。根据预期的应用和治疗方案可以选择合适的制剂和施用途径。

[0220] 用于肠内施用的合适制剂包括硬或软的明胶胶囊,丸剂,片剂,包括包衣片剂,酏剂,混悬剂,糖浆剂或吸入剂及其控释剂型。

[0221] 适用于肠胃外施用(例如通过注射)的制剂包括活性成分溶解、悬浮于其中或以其他方式提供的(例如,在脂质体或其他微粒中)的水性或非水性、等渗、无热原、无菌液体(例如溶液,混悬液)。这些液体可以另外含有其它药学上可接受的成分,例如抗氧化剂,缓冲剂,防腐剂,稳定剂,抑菌剂,悬浮剂,增稠剂和使制剂与预期接受者的血液(或其他相关体液)等渗的溶质。赋形剂的实例包括例如水,醇,多元醇,甘油,植物油等。适用于此类制剂的等渗载体的实例包括氯化钠注射液,林格溶液或乳酸林格氏注射液。类似地,特定剂量方案(即剂量,时间和重复)将取决于具体个体和个体的病史以及诸如药代动力学(例如半衰期,清除率等)的经验考虑。

[0222] 施用频率可以在治疗过程中确定和调整,并且基于减少增殖或致瘤细胞的数量,维持这种肿瘤细胞的减少,减少肿瘤细胞的增殖或延迟转移的发展。在一些实施方案中,施用的剂量可以被调节或减少以控制潜在的副作用和/或毒性。或者,本发明治疗组合物的持续连续释放制剂可能是合适的。

[0223] 本领域技术人员将会理解,合适的剂量可因患者而异。确定最佳剂量通常涉及治

疗益处水平与任何风险或有害副作用的平衡。所选择的剂量水平将取决于多种因素,包括但不限于特定化合物的活性,施用,施用时间,化合物清除速率,治疗持续时间,其他联合使用的药物、化合物和/或材料,病症的严重程度,以及物种,患者的性别、年龄、体重、病情、一般健康状况和以前的病史。化合物的量和施用途径最终由医生、兽医或临床医师决定,但通常选择剂量以达到实现所需效果的作用部位处的局部浓度,而不会导致实质性的有害或不利副作用。

[0224] 通常,PD-1结合分子可以以各种范围施用。在一些实施方案中,本文提供的PD-1结合分子可以以约0.01mg/kg至约100mg/kg(例如约0.01mg/kg,约0.5mg/kg,约1mg/kg,约2mg/kg,约5mg/kg,约10mg/kg,约15mg/kg,约20mg/kg,约25mg/kg,约30mg/kg,约35mg/kg,约40mg/kg,约45mg/kg,约50mg/kg,约55mg/kg,约60mg/kg,约65mg/kg,约70mg/kg,约75mg/kg,约80mg/kg,约85mg/kg,约90mg/kg,约95mg/kg,或约100mg/kg)的治疗有效剂量施用。在这些实施方案的某些中,抗体以约50mg/kg或更低的剂量施用,并且在这些实施方案中的某些中,剂量为10mg/kg或更低,5mg/kg或更低,1mg/kg或更低,0.5mg/kg或更低,或者0.1mg/kg或更低。在某些实施方案中,施用剂量可以在治疗过程中改变。例如,在某些实施方案中,初始施用剂量可以高于后续施用剂量。在某些实施方案中,取决于受试者的反应,施用剂量可以在治疗过程中变化。

[0225] 无论如何,本发明的抗体或其抗原结合部分优选根据需要施用于有需要的受试者。本领域技术人员可以确定施用频率,例如主治医生基于所治疗病症、所治疗受试者的年龄、所治疗病症的严重程度、所治疗受试者的一般健康状况等的考虑。

[0226] 在某些优选的实施方案中,涉及本发明的抗体或其抗原结合部分的治疗过程将包含在数周或数月的时间内施用的多剂量的所选药物产品。更具体地说,本发明的抗体或其抗原结合部分可以每天,每两天,每四天,每周,每十天,每两周,每三周,每月,每六周,每两个月,每十周或每三个月施用。就此而言,可以理解的是,可以基于患者响应和临床实践来改变剂量或者调整间隔。

[0227] 在给予一次或多次施用的个体中也可凭经验确定所公开的治疗组合物的剂量和方案。例如,可给予个体增量剂量的如本文所述产生的治疗组合物。在选定的实施方案中,剂量可分别根据经验确定或观察到的副作用或毒性逐渐增加或减少或减轻。为了评估所选择的组合物的功效,可以如前所述跟踪特定疾病、病症或病情的标志物。对于癌症,这些包括通过触诊或视觉观察直接测量肿瘤大小,通过X射线或其他成像技术间接测量肿瘤大小;通过直接肿瘤活组织检查和肿瘤样本的显微镜检查评估的改善;测量根据本文所述方法鉴定的间接肿瘤标志物(例如用于前列腺癌的PSA)或致瘤性抗原,疼痛或麻痹的减轻;与肿瘤相关的言语、视力、呼吸或其他失能的改善;食欲增加;或通过接受的测试测量的生活质量的提高或生存期的延长。本领域技术人员将明白,剂量将根据个体、肿瘤病情的类型、肿瘤病情的阶段、肿瘤病情是否已开始转移至个体中的其他位置以及过去使用的治疗和并行使用的治疗而变化。

[0228] 用于肠胃外施用(例如静脉内注射)的相容制剂可包含浓度为约10 μ g/ml至约100mg/ml的如本文提供的PD-1结合分子。在一些实施方案中,PD-1结合分子的浓度可包括20 μ g/ml,40 μ g/ml,60 μ g/ml,80 μ g/ml,100 μ g/ml,200 μ g/ml,300 μ g/ml,400 μ g/ml,500 μ g/ml,600 μ g/ml,700 μ g/ml,800 μ g/ml,900 μ g/ml或1mg/ml。在其他优选的实施方案中,PD-1结

合分子的浓度将包括2mg/ml, 3mg/ml, 4mg/ml, 5mg/ml, 6mg/ml, 8mg/ml, 10mg/ml, 12mg/ml, 14mg/ml, 16mg/ml, 18mg/ml, 20mg/ml, 25mg/ml, 30mg/ml, 35mg/ml, 40mg/ml, 45mg/ml, 50mg/ml, 60mg/ml, 70mg/ml, 80mg/ml, 90mg/ml或100mg/ml。

[0229] 本发明的应用

[0230] 本发明的PD-1结合分子具有许多体外和体内用途。例如,可以将这些分子体外或离体施用于培养细胞,或例如体内施用于人受试者,以增强各种情况下的免疫力。免疫应答可以被增强、刺激或上调。

[0231] 优选的受试者包括需要增强免疫应答的人患者。所述方法特别适用于治疗具有可通过增强免疫应答(例如T细胞介导的免疫应答)治疗的病症的人患者。在一个具体的实施方案中,所述方法特别适合于体内治疗癌症。为了实现免疫的抗原特异性增强,可以将抗PD-1抗体与感兴趣的抗原一起施用,或者抗原可能已经存在于待治疗的受试者中(例如携带肿瘤或病毒的受试者)。当抗PD-1抗体与另一种药剂一起施用,两者可以以任何顺序施用或同时施用。

[0232] 本发明进一步提供了用于检测样品中PD-1抗原的存在或测量人PD-1抗原的量的方法,包括在允许PD-1结合分子与PD-1之间形成复合物的条件下使样品和对照样品与PD-1结合分子接触。然后检测复合物的形成,其中与对照样品相比,样品之间的差异复合物形成表明样品中存在PD-1抗原。此外,本发明的PD-1结合分子可用于通过免疫亲和纯化来纯化人PD-1。

[0233] 治疗癌症

[0234] 与PD-1相关的病症和障碍可以是与免疫相关的疾病或病症。在一些实施方案中,PD-1相关的病症和病症包括肿瘤和癌症,例如非小细胞肺癌,小细胞肺癌,肾细胞癌,结肠癌,卵巢癌,乳腺癌,胰腺癌,胃癌,膀胱癌,食道癌,间皮瘤,黑素瘤,头颈癌,甲状腺癌,肉瘤,前列腺癌,成胶质细胞瘤,宫颈癌,胸腺癌,白血病,淋巴瘤,骨髓瘤,真菌病毒,梅克尔细胞癌和其他血液恶性肿瘤,如经典霍奇金淋巴瘤(CHL),原发性纵隔大B细胞淋巴瘤,富含T细胞/组织细胞的B细胞淋巴瘤,EBV阳性和阴性PTLD以及EBV相关弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL),浆细胞淋巴瘤,结外NK/T细胞淋巴瘤,鼻咽癌和HHV8相关原发性渗出性淋巴瘤,霍奇金淋巴瘤,中枢神经系统(CNS)肿瘤如原发性CNS淋巴瘤,脊髓轴肿瘤或脑干胶质瘤。在某些实施方案中,肿瘤和癌症是转移性的,特别是表达PD-L1的转移性肿瘤。在某些实施方案中,PD-1相关的病症和障碍包括自身免疫性疾病,例如系统性红斑狼疮(SLE),牛皮癣,系统性硬皮病,自身免疫性糖尿病等。在某些实施方案中,所述PD-1相关的病症和病症包括感染性疾病,例如慢性病毒感染,例如乙型肝炎,丙型肝炎,疱疹病毒,爱泼斯坦-巴尔病毒,HIV,巨细胞病毒,I型单纯疱疹病毒的病毒感染,单纯疱疹病毒2型,人乳头瘤病毒,腺病毒,卡波西肉瘤相关疱疹病毒流行病,细环病毒(Torquetenovirus),JC病毒或BK病毒。

[0235] 抗体或其抗原结合部分可以与化学疗法或放射疗法组合使用。

[0236] 与化疗组合使用

[0237] 抗体或其抗原结合部分可以与抗癌剂、细胞毒性剂或化学治疗剂组合使用。

[0238] 术语“抗癌剂”或“抗增殖剂”意指可用于治疗细胞增殖性病症例如癌症的任何药剂,并且包括但不限于细胞毒性剂,细胞抑制剂,抗血管生成剂,放射疗法和放射治疗剂,靶向抗癌剂,BRM,治疗性抗体,癌症疫苗,细胞因子,激素疗法,放射疗法和抗转移剂和免疫治

疗剂。应该理解的是,在如上所述的选定实施方案中,此类抗癌剂可以包含缀合物并且可以在施用之前与公开的位点特异性抗体结合。更具体而言,在一些实施方案中,将选择的抗癌剂连接至工程化抗体的不配对半胱氨酸以提供如本文所述的工程化偶联物。因此,这样的工程化缀合物被明确地考虑在本发明的范围内。在其他实施方案中,所公开的抗癌剂将与包含如上所述的不同治疗剂的位点特异性缀合物组合施用。

[0239] 如本文所用,术语“细胞毒性剂”是指对细胞有毒并降低或抑制细胞功能和/或引起细胞破坏的物质。在一些实施方案中,该物质是源自活生物体的天然存在的分子。细胞毒性剂的实例包括但不限于细菌(例如,白喉毒素,假单胞菌内毒素和外毒素,葡萄球菌肠毒素A),真菌(例如 α -八叠球菌素,局限曲霉素),植物(相思豆毒蛋白,蓖麻毒素,蒴莲根毒素,槲寄生素,美洲商陆抗病毒蛋白,皂草素,白树毒素,momoridin,天花粉蛋白,大麦毒素,油桐(*Aleurites fordii*)蛋白,石竹素蛋白,*Phytolacca mericana*蛋白(PAPI,PAPII和PAP-S),苦瓜抑制剂,麻风树毒蛋白,巴豆毒素,石碱草抑制剂,白树毒素,mitegellin,局限曲霉素,酚霉素,新霉素和单端孢霉烯族化合物)或动物(例如细胞毒性RNA酶,如胞外胰腺RNA酶;DNA酶I,包括其片段和/或变体)的小分子毒素或酶促活性毒素。

[0240] 为了本发明的目的,“化学治疗剂”包括非特异性降低或抑制癌细胞的生长、增殖和/或存活的化学化合物(例如细胞毒性剂或细胞抑制剂)。这些化学试剂通常针对细胞生长或分裂所需的细胞内过程,因此对于通常快速生长和分裂的癌细胞特别有效。例如,长春新碱使微管解聚,从而抑制细胞进入有丝分裂。通常,化学治疗剂可以包括抑制或被设计用于抑制癌细胞或可能变成性或产生致瘤后代(例如TIC)的细胞的任何化学药剂。这些药剂通常是组合使用的,并且通常是最有效的,例如,在诸如CHOP或FOLFIRI的方案中。

[0241] 可以与本发明的位点特异性构建体组合使用的抗癌剂(作为位点特异性缀合物的组分或未缀合状态)的实例包括但不限于烷化剂、烷基磺酸盐、氮丙啶、乙烯亚胺和甲基三聚氰胺、多聚乙酰(acetogenins)、喜树碱、苔藓抑素、卡利士他汀(callystatin)、CC-1065、克瑞托欣(cryptophycins)、多拉司他汀、多卡米星、艾榴素(eleutherobin)、水鬼蕉碱、沙克迪因(sarcodictyin)、海绵素(spongistatin)、氮芥、抗生素、烯二炔类抗生素、dynemicin、双膦酸盐、埃斯波霉素、色素蛋白烯二炔抗生素发色团、阿克拉霉素类(aclacinomysins)、放线菌素、安曲霉素、偶氮丝氨酸、博莱霉素、放线菌素C、卡拉宾辛(carabycin)、洋红霉素、嗜癌霉素、色霉素类(chromomycinis)、更生霉素、柔红霉素、地托比星、6-重氮基-5-氧代-L-正亮氨酸、**ADRIAMYCIN[®]**多柔比星、表柔比星、依索比星、伊达比星、麻西罗霉素、丝裂霉素、霉酚酸、诺加霉素、橄榄霉素、培洛霉素、博地霉素(potfiromycin)、嘌呤霉素、三铁阿霉素、罗多比星、链黑菌素、链脲菌素、杀结核菌素、乌苯美司、净司他丁、佐柔比星;抗-代谢物、埃罗替尼、威罗菲尼、克唑替尼、索拉非尼、依鲁替尼、恩杂鲁胺、叶酸类似物、嘌呤类似物、雄激素、抗-肾上腺素、叶酸补充剂如弗林酸(frolic acid)、醋葡醛内酯、醛磷酸胺糖苷、氨基乙酰丙酸、恩尿嘧啶、安吡啶、贝斯布希(bestrabucil)、比生群、依达曲沙、迪夫法明(defofamine)、秋水仙胺、地吡醌、艾夫尼辛(elfornithine)、依利醋铵、爱波喜龙、依托格鲁、硝酸镓、羟基脲、香菇多糖、氯尼达明、美坦生类化合物(maytansinoids)、米托胍脲、米托蒽醌、莫丹摩尔(mopidanmol)、尼特林(nitraerine)、喷司他丁、蛋氨酸芥、吡柔比星、洛索蒽醌、鬼臼酸、2-乙基胍、丙卡巴肼、**PSK[®]**多糖复合物(JHS Natural Products,Eugene,OR)、雷佐生;根霉素;西佐喃;锗螺

胺;替奴佐酸;三亚胺醌;2,2',2"-三氯三乙胺;单端孢霉烯类(尤其是T-2毒素、维拉库林A(verracurin A)、杆孢菌素A和蛇形菌素);乌拉坦;长春地辛;达卡巴嗪;甘露莫司汀;二溴甘露醇;二溴卫矛醇;哌泊溴烷;卡西托欣(gacytosine);阿拉伯糖苷("Ara-C");环磷酰胺;噻替派;紫杉烷类;苯丁酸氮芥(chloranbucil);**GEMZAR®**吉西他滨;6-硫代鸟嘌呤;硫嘌呤;氨甲喋呤;铂类似物;长春碱;铂;依托泊苷(VP-16);异环磷酰胺;米托蒽醌;长春新碱,**NAVELBINE®**长春瑞滨;诺消灵;替尼泊苷;依达曲沙;柔红霉素;氨基蝶呤;希罗达;伊班膦酸盐;伊立替康(Camptosar,CPT-11);拓扑异构酶抑制剂RFS 2000;二氟甲基鸟氨酸;类视色素;卡培他滨;考布他汀;甲酰四氢叶酸;奥沙利铂;PKC- α 、Raf、H-Ras、EGFR和VEGF-A的抑制剂(其减少细胞增殖),以及上述任一项的药学上可接受的盐、酸或衍生物。这一定义中还包括的是用于调节或抑制对肿瘤的激素作用的抗激素剂,诸如抗雌激素和选择性雌激素受体调节剂,抑制调节肾上腺中的雌激素产生的芳香酶的芳香酶抑制剂,和抗-雄激素;以及曲沙他滨(1,3-二氧杂环戊烷核苷胞嘧啶类似物);反义寡核苷酸、核酶诸如VEGF表达抑制剂和HER2表达抑制剂;疫苗,**PROLEUKIN®**rIL-2;**LURTOTECAN®**拓扑异构酶1抑制剂;**ABARELIX®**rmRH;长春瑞滨和埃斯波霉素,以及上述任一项的药学上可接受的盐、酸或衍生物。

[0242] 与放射疗法组合使用

[0243] 本发明还提供了抗体或其抗原结合部分与放射疗法(即,用于在肿瘤细胞内局部诱导DNA损伤的任何机制,例如 γ -照射,X-射线,UV-照射,微波,电子发射等)的组合。还考虑了使用放射性同位素至肿瘤细胞的定向递送的联合疗法,并且所公开的缀合物可以与靶向的抗癌剂或其他靶向手段结合使用。通常,放射疗法在约1周至约2周的时间段内以脉冲方式施用。放射疗法可以对患有头颈癌的受试者施用约6至7周。任选地,放射疗法可以作为单剂量或作为多个顺序剂量施用。

[0244] 诊断

[0245] 本发明提供了用于检测、诊断或监测增殖性病征的体外和体内方法以及筛选来自患者的细胞以鉴定肿瘤细胞包括致瘤细胞的方法。这样的方法包括鉴定用于治疗的患有癌症的个体或监测癌症的进展,包括将患者或从患者获得的样品(体内或体外)与本文所述的抗体接触,并检测样品中与结合的或游离的靶分子的结合的抗体的存在或不存在或结合水平。在一些实施方案中,抗体将包含如本文所述的可检测标记或报道分子。

[0246] 在一些实施方案中,抗体与样品中特定细胞的结合可表示样品可能含有致瘤细胞,从而表明具有癌症的个体可用本文所述的抗体有效治疗。

[0247] 可以通过多种测定法分析样品,例如放射免疫测定法,酶免疫测定法(例如ELISA),竞争结合测定法,荧光免疫测定法,免疫印迹测定法,Western印迹分析和流式细胞术测定法。兼容的体内诊断或诊断测定可以包括本领域公知的成像或监测技术,例如本领域技术人员已知的磁共振成像,计算机化断层摄影(例如CAT扫描),正电子断层扫描(例如PET扫描),放射线照相术,超声波等。

[0248] 药物包装和试剂盒

[0249] 还提供了包含一个或多个剂量的抗体或其抗原结合部分的一个或多个容器的药物包装和试剂盒。在一些实施方案中,提供单位剂量,其中单位剂量含有预定量的组合物,

所述组合物包含例如抗体或其抗原结合部分,具有或不具有一种或多种其他试剂。对于其他实施方案,这种单位剂量以一次性使用的预充式注射用注射器供应。在其他实施方案中,单位剂量中包含的组合物可以包含盐水、蔗糖或类似物;缓冲液,如磷酸盐等;和/或配制在稳定和有效的pH范围内。或者,在一些实施方案中,缀合物组合物可以作为冻干粉末提供,其可以在加入合适的液体(例如无菌水或盐溶液)后重建。在一些优选的实施方案中,组合物包含一种或多种抑制蛋白质聚集的物质,包括但不限于蔗糖和精氨酸。容器上或与容器相关联的任何标签指示封装的缀合物组合物用于治疗选择的肿瘤疾病状况。

[0250] 本发明还提供了用于产生位点特异性缀合物以及任选地一种或多种抗癌剂的单剂量或多剂量施用单元的试剂盒。该试剂盒包括容器以及在容器上或与容器相关联的标签或包装插页。合适的容器包括例如瓶,小瓶,注射器等。容器可以由多种材料形成,例如玻璃或塑料,并且包含药学有效量的所公开的缀合或非缀合形式的缀合物。在其他优选实施例中,容器包括无菌存取口(例如容器可以是静脉内溶液袋或具有可被皮下注射针头刺穿的塞子的小瓶)。这样的试剂盒通常在合适的容器中包含工程化偶联物的药学上可接受的制剂,并且任选地在相同或不同的容器中包含一种或多种抗癌剂。试剂盒还可以含有其他药学上可接受的制剂,用于诊断或组合治疗。例如,除了本发明的抗体或其抗原结合部分之外,这样的试剂盒可以含有任何一种或多种抗癌剂,例如化学治疗剂或放射治疗剂;抗血管生成剂;抗转移剂;靶向抗癌剂;细胞毒性剂;和/或其他抗癌剂。

[0251] 更具体地说,试剂盒可以具有含有所公开的抗体或其抗原结合部分的单个容器,其含有或不含另外的组分,或者它们可以具有用于每种所需试剂的不同容器。在提供用于缀合的组合治疗剂的情况下,可以按摩尔当量组合或一种组分多于另一种的方式预混合单一溶液。或者,试剂盒的缀合物和任何任选的抗癌剂可以在施用于患者之前分开保存在不同的容器中。试剂盒还可以包含用于容纳无菌药学上可接受的缓冲液或其他稀释剂例如抑菌注射用水(BWFI)、磷酸盐缓冲盐水(PBS)、林格氏溶液和葡萄糖溶液的第二/第三容器装置。

[0252] 当试剂盒的组分以一种或多种液体溶液提供时,液体溶液优选为水溶液,特别优选无菌水溶液或盐水溶液。然而,试剂盒的组分可以作为干粉提供。当试剂或组分以干粉形式提供时,可以通过添加合适的溶剂来重构粉末。可以设想溶剂也可以提供于另一个容器中。

[0253] 如上简要所述,所述试剂盒还可含有向患者施用抗体或其抗原结合部分和任何任选组分的工具,例如一种或多种针,I.V.袋或注射器,或者甚至滴眼器、移液管或其他类似装置,通过其可以将制剂注射或引入动物体内或将其施用于身体的患病区域。本发明的试剂盒通常还包括用于容纳小瓶或类似物的装置以及用于商业销售的其他紧密封闭的部件,例如注射或吹塑塑料容器,其中放置并且保持所需的小瓶和其他装置。

[0254] 序列列表概述

[0255] 本申请附带有包含许多核酸和氨基酸序列的序列列表。下表A提供了所包含的序列的概述。

[0256] 表A

[0257]

SEQ ID NO.	描述
1	AP17R1-2H2 或 AP17R1-2H2-Z1 的 CDR1
2	AP17R1-2H2 或 AP17R1-2H2-Z1 的 CDR2
3	AP17R1-2H2 或 AP17R1-2H2-Z1 的 CDR3
4	AP17R1-2H2-Z1-R1-4B2 的 CDR1
5	AP17R1-2H2-Z1-R1-4B2 的 CDR2
6	AP17R1-2H2-Z1-R1-4B2 的 CDR3
7	AP17R1-2H2-Z1-R1-4D8 的 CDR1
8	AP17R1-2H2-Z1-R1-4D8 的 CDR2
9	AP17R1-2H2-Z1-R1-4D8 的 CDR3
10	AP17R1-2H2-Z1-R1-6E1 的 CDR1
11	AP17R1-2H2-Z1-R1-6E1 的 CDR2
12	AP17R1-2H2-Z1-R1-6E1 的 CDR3
13	AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1 的 CDR1
14	AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1 的 CDR2
15	AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1 的 CDR3
16	AP17R1-2H2-Z1-R1-14F1 的 CDR1
17	AP17R1-2H2-Z1-R1-14F1 的 CDR2
18	AP17R1-2H2-Z1-R1-14F1 的 CDR3

[0258]

19	AP17R1-2H2-Z1-R1-14B3 的 CDR1
20	AP17R1-2H2-Z1-R1-14B3 的 CDR2
21	AP17R1-2H2-Z1-R1-14B3 的 CDR3
22	AP17R1-2H2-Z1-R1-14F3 的 CDR1
23	AP17R1-2H2-Z1-R1-14F3 的 CDR2
24	AP17R1-2H2-Z1-R1-14F3 的 CDR3
25	AP17R1-2H2-Z1-R1-27A2 的 CDR1
26	AP17R1-2H2-Z1-R1-27A2 的 CDR2
27	AP17R1-2H2-Z1-R1-27A2 的 CDR3
28	AP17R1-2H2-Z1-R1-29B2 的 CDR1
29	AP17R1-2H2-Z1-R1-29B2 的 CDR2
30	AP17R1-2H2-Z1-R1-29B2 的 CDR3
31	AP17R1-2H2-Z1-R1-29B6 的 CDR1
32	AP17R1-2H2-Z1-R1-29B6 的 CDR2
33	AP17R1-2H2-Z1-R1-29B6 的 CDR3
34	AP17R1-2H2-Z1-R1-30D3 的 CDR1
35	AP17R1-2H2-Z1-R1-30D3 的 CDR2
36	AP17R1-2H2-Z1-R1-30D3 的 CDR3
37	AP17R1-2H2 的全长序列
38	AP17R1-2H2-Z1 的全长序列
39	AP17R1-2H2-Z1-R1-4B2 的全长序列
40	AP17R1-2H2-Z1-R1-4D8 的全长序列
41	AP17R1-2H2-Z1-R1-6E1 的全长序列
42	AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1 的全长序列
43	AP17R1-2H2-Z1-R1-14F1 的全长序列
44	AP17R1-2H2-Z1-R1-14B3 的全长序列
45	AP17R1-2H2-Z1-R1-14F3 的全长序列
46	AP17R1-2H2-Z1-R1-27A2 的全长序列
47	AP17R1-2H2-Z1-R1-29B2 的全长序列

[0259]

48	AP17R1-2H2-Z1-R1-29B6 的全长序列
49	AP17R1-2H2-Z1-R1-30D3 的全长序列
50	编码 AP17R1-2H2 的核苷酸序列
51	编码 AP17R1-2H2-Z1 的核苷酸序列
52	编码 AP17R1-2H2-Z1-R1-4B2 的核苷酸序列
53	编码 AP17R1-2H2-Z1-R1-4D8 的核苷酸序列
54	编码 AP17R1-2H2-Z1-R1-6E1 的核苷酸序列
55	编码 AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1 的核苷酸序列
56	编码 AP17R1-2H2-Z1-R1-14F1 的核苷酸序列
57	编码 AP17R1-2H2-Z1-R1-14B3 的核苷酸序列
58	编码 AP17R1-2H2-Z1-R1-14F3 的核苷酸序列
59	编码 AP17R1-2H2-Z1-R1-27A2 的核苷酸序列
60	编码 AP17R1-2H2-Z1-R1-29B2 的核苷酸序列
61	编码 AP17R1-2H2-Z1-R1-29B6 的核苷酸序列
62	编码 AP17R1-2H2-Z1-R1-30D3 的核苷酸序列

实施例

[0260] 通过参考以下实施例将更容易地理解本文一般地描述的本发明,这些实施例是以举例说明的方式提供的,并且不旨在限制本发明。这些实施例并不旨在表示下面的实验是全部或仅进行的实验。

[0261] 实施例1

[0262] 材料的制备

[0263] 1.材料的准备

[0264] 1.1商业材料

[0265] 表1中提供了实施例中使用的市售材料的信息。

[0266] 表1.商业材料

[0267]

材料	供应商	目录号
-----------	------------	------------

[0268]

FITC 小鼠抗-人 CD279 Ab	eBioscience	Cat.#11-9969-42
FITC 山羊抗-人 IgG Fc	Bethlyl	Cat.#A80-204F
PE 山羊抗-小鼠 IgG Fc	Abcam	Cat.#ab98742
R-PE 山羊抗-人 IgG Fc	Jackson Immuno Research	Cat.#109-115-098
PE 山羊抗-小鼠 IgG Fc	Abcam	Cat.#Ab98742
SA-PE	eBioscience	Cat.#12-4317
HRP 山羊抗-人 IgG Fc	Bethyl	Cat.#A80-304P
链霉亲和素-HRP	Invitrogen	Cat.#SNN1004
Ficoll-Paque™ PLUS	GE Healthcare	Cat.#17-1440-02
人单核细胞富集试剂盒	STEMCELL	Cat.#19059
人 CD4⁺ T 细胞富集试剂盒	STEMCELL	Cat.#19052
重组人 GM-CSF	Amoytop Biotech	Cat.#S10980039
重组人 IL-4	R&D	Cat.#204-IL-010
标准重组人 IFN-γ	PeproTech	Cat.#300-02
人 IFN-γ 捕获抗体	Pierce	Cat.#M700A
人 IFN-γ 检测抗体	Pierce	Cat.#M701B
SA-HRP	Invitrogen	Cat.#SNN1004
人 PD-1, His 标签	Sino Biological	Cat.#10377-H08H

[0269]

食蟹猴 PD-1, His 标签	AcrobioSystem	Cat.#PD1-C5223
食蟹猴 PD-1, hFc 标签	Sino Biological	Cat.#90311-C02H
小鼠 PD-1, His 标签	Sino Biological	Cat.#50124-M08H
人 PD-L2, His 标签	Sino Biological	Cat.#10292-H08H
人 BTLA, His 标签	AcrobioSystems	Cat.#BTA-H52E0
食蟹猴 PD-1, His 标签	R&D Systems	Cat.#85509-PD

[0270] 1.2材料代码

[0271] 表2总结了包括参照抗体、胞外结构域和细胞的材料代码或缩写。

[0272] 表2.材料代码

[0273]

材料名称	代码或缩写
参照抗体 1 (Opdivo [®] , Nivolumab)	BMK1 , BMK1.IgG4 , W305-BMK1.IgG4 或 W305-BMK1.hIgG4
参照抗体 3	BMK3 或 BMK3.IgG4 , W305-BMK3.hIgG4 , 或 W305-BMK3.hIgG4K
人 IgG4 同种型对照	hIgG4 同种型, 同种型, 人 IgG4
人 PD-1 胞外结构域, mFc 标签	hPro1.ECD.mFc
小鼠 PD-1 胞外结构域, mFc 标签	mPro1.ECD.mFc

[0274]

人 PD-L1 胞外结构域, mFc 标签	hProL1.ECD.mFc
小鼠 PD-L1 胞外结构域, mFc 标签	mProL1.ECD.mFc
人 CD28 胞外结构域, mFc 标签	hCD28.ECD.mFc
人 CTLA-4 胞外结构域, His 标签	hCTLA-4.ECD.His
人 ICOS 胞外结构域, mFc 标签	hICOS.ECD.mFc
人 PD-1 胞外结构域, His 标签	hPro1.ECD.His
小鼠 PD-1 胞外结构域, His 标签	mPro1.ECD.His
人 PD-L2 胞外结构域, His 标签	hPro1L2.ECD.His
食蟹猴 PD-1 胞外结构域, hFc 标签	cynoPro1.ECD.hFc
食蟹猴 PD-L1 胞外结构域, hFc 标签	cynoProL1.ECD.hFc
食蟹猴 PD-1 胞外结构域, His 标签	cynoPro1.ECD.His
人 BTLA 胞外结构域, His	hBTLA.ECD.His
表达人 PD-1-的 CHO-S 细胞	CHO-S.hPro1.C6
表达小鼠 PD-1-的 293F 细胞	293F.mPro1.B4
W3056 先导抗体(VHH-Fc(hIgG4) 融合体)	W3056-AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1-FC(IgG4.SP)

	W3056 先导亲本抗体(VHH)	AP17R1-2H2
[0275]	W3056 先导亲本抗体(VHH-Fc(hIgG4)融合体)	AP17R1-2H2-Fc(IgG4), AP17R1-2H2-FC(IgG4.SP), 或 W3056-AP17R1-2H2-FC(IgG4.SP)

[0276] 2. 抗原的产生

[0277] 在Sangon Biothech (Shanghai, China) 合成编码下述抗原的DNA序列: hPro1.ECD (Genbank登录号NP_005009.2), hProL1.ECD (Genbank登录号NP_054862.1), hCTLA-4.ECD (Genbank登录号NP_005205.2), hCD28.ECD (Genbank登录号NP_006130.1), hICOS.ECD (Genbank登录号NP_036224.1) 和mPro1.ECD (Genbank登录号NP_032824.1), mProL1.ECD (Genbank登录号NP_068693.1), 然后将所述DNA序列亚克隆到修饰的pcDNA3.3表达载体(在C末端具有不同的标签(如6xhis、人Fc或小鼠Fc))中。将得到的表达载体进一步纯化。用纯化的表达载体转染Expi293细胞(Invitrogen-A14527)。将转染的细胞培养5天, 收集上清, 使用Ni-NTA柱(GE Healthcare, 175248)或蛋白质A柱(GE Healthcare, 175438)或蛋白质G柱(GE Healthcare, 170618)进行蛋白纯化。得到的抗原通过SDS-PAGE和SEC大小排阻层析进行质量控制, 然后保存在-80℃。

[0278] 3. 参照抗体的产生

[0279] 在Sangon Biothech (Shanghai, China) 合成编码抗PD-1抗体可变区的DNA序列, 然后将所述DNA序列亚克隆到具有人IgG4 (S228P) 恒定区的修饰的pcDNA3.3表达载体中。BMK1的重链和轻链可变区序列与批准的抗PD-1抗体Opdivo (PCT申请W02006/121168A1中的克隆5C4的序列) 相同。BMK3抗体的重链和轻链可变区序列与美国专利US8168757B2中的克隆1B8的序列相同。

[0280] 将包含编码各种抗PD-1抗体的重链和轻链区域的DNA序列的质粒共同转染Expi293细胞。将转染的细胞培养5天, 并且收集上清, 使用蛋白质A柱(GE Healthcare, 175438)或蛋白质G柱(GE Healthcare, 170618)进行蛋白纯化。得到的抗体通过SDS-PAGE和SEC进行分析, 然后保存在-80℃。

[0281] 3. 建立稳定的细胞系

[0282] 使用Lipofectamine 2000, 用包含编码全长人PD-1或小鼠PD-1的基因的表达载体转染CHO-S或293F细胞。在含有适当的选择压力的培养基中培养细胞。通过有限稀释得到高表达人PD-1的稳定细胞系(WBP305.CHO-S.hPro1.C6)和高表达小鼠PD-1的稳定细胞系(WBP305.293F.mPro1.B4)。

[0283] 实施例2

[0284] VHH和嵌合VHH-Fc (hIgG4) 蛋白质的产生

[0285] 1. 免疫接种

[0286] 为了在骆驼科动物中诱导针对PD-1的体液免疫应答, 对动物以1至3周间隔皮下注射7至9个剂量的人和/或小鼠PD-1 ECD蛋白。剂量范围是每次注射50ug到200ug。

[0287] 2. 血清效价检测

[0288] 免疫后,通过ELISA测定抗PD-1特异性抗体血清效价。对于ELISA试验,用1 μ g/ml重组带his标签的人PD-1 ECD蛋白和小鼠PD-1 ECD蛋白分别包被ELISA板(Nunc,Rochester,MN,USA),并在4 $^{\circ}$ C下孵育过夜。封闭和洗涤后,加入系列稀释的免疫前和免疫血清并在室温下孵育2小时,然后在室温下用山羊抗Llama IgG-HRP(Novas Biologicals,Littleton,CO,USA)孵育1小时。洗涤后,加入TMB底物(Invitrogen,Carlsbad,CA,USA),并通过2M HCl终止反应。使用酶标仪(Molecular Device,Sunnyvale,CA,USA)读取450nm处的吸光度。

[0289] 3. 噬菌体文库构建

[0290] 分别在最后两次注射后6-7天收集50ml血液样品。使用Ficoll-Paque PLUS(GE Healthcare,Little Chalfont,UK)通过密度梯度离心纯化外周血单核细胞(PBMC),收集到约 8×10^7 个PBMC。然后从PBMC中提取总RNA并使用寡聚dT引物和SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix System(Invitrogen,Carlsbad,CA,USA)按照供应商的推荐转录成cDNA。

[0291] cDNA纯化后用作模板以使用信号肽结构域特异性引物和CH2结构域特异性引物扩增Ig重链编码基因片段库。该扩增产生约900bp(代表常规IgG)和700bp(代表缺少CH1结构域的重链IgG)的PCR片段。然后将两类重链编码基因在琼脂糖凝胶上根据大小分离,并且通过QIAquick凝胶提取试剂盒(Qiagen,Hilden,德国)纯化仅编码重链IgG的基因。使用纯化的片段作为模板以使用框架1(FR1)和框4(FR4)特异性引物对扩增VHH库。该扩增程序在FR1的5'末端引入Sfi I限制性位点并在FR4的3'末端引入Not I限制性位点。将约300-400bp的PCR扩增的VHH基因库加载到琼脂糖凝胶上并通过QIAquick凝胶提取试剂盒纯化。然后将纯化的片段用Sfi I和Not I切割并通过QIAquick PCR纯化试剂盒(Qiagen,Hilden,德国)纯化。将VHH基因片段最终连接到噬菌粒载体pFL249中并电转化到大肠杆菌TG1中。转化后,将TG1细胞在SOC培养基中以200rpm振荡培养1h,然后将大肠杆菌TG1铺板于含有补充有100 μ g/mL Cab和1% (w/v) 葡萄糖的固体2YT培养基的平板上,并且在37 $^{\circ}$ C培养过夜。第二天,将菌落刮入补充有1/3 (v/v) 80%甘油的液体2YT培养基中并储存在-80 $^{\circ}$ C。

[0292] 4. 抗PD-1特异性VHH片段的噬菌体展示选择

[0293] 为了选到能有效结合PD-1的VHH片段,采用了蛋白质淘选和细胞淘选的方法。

[0294] 对于蛋白质淘选,首先在4 $^{\circ}$ C下以400rpm振荡过夜将20 μ g重组his标记的人和小鼠PD-1 ECD蛋白分别包被在5ml免疫管(Nunc,Rochester,MN,USA)中。第二天,在洗去未结合的蛋白质后,将管用10%脱脂牛奶在25 $^{\circ}$ C封闭1小时。将来自免疫噬菌体文库的大约 10^{12} cfu噬菌体添加到用10%脱脂乳封闭的未包被免疫管中以消耗非特异性结合的噬菌体,然后将处理的噬菌体加入管中,并在25 $^{\circ}$ C下孵育2小时。用PBST充分洗涤后,丢弃非特异性吸附的噬菌体,用甘氨酸-HCl (pH2.2)洗脱特异性结合的目标噬菌体,然后用1M Tris-HCl (pH8.0)中和用于感染指数生长的TG1细胞。

[0295] 将感染的TG1细胞铺在含有2% (w/v) 葡萄糖和100 μ g/ml氨苄青霉素的2YT琼脂平板上并在37 $^{\circ}$ C培养过夜。第二天,将菌落用3ml 2YT从平板上刮下并通过加入1/3 (v/v) 80%甘油在-80 $^{\circ}$ C下冷冻。将刮下的细菌文库接种到含有100 μ g/ml氨苄青霉素的2YT-Carb中,并用辅助噬菌体M13Ko7在含有50 μ g/ml卡那霉素和1mM IPTG的2YT培养基中感染以用于噬菌体救援,用作下一轮淘选。

[0296] 对于细胞淘选,将 10^{12} cfu噬菌体与 2×10^6 - 1×10^7 个CHO-S或293F细胞预孵育以消

耗非特异性结合的噬菌体颗粒。然后将处理的噬菌体与 2×10^6 - 1×10^7 个PD-1转染的CHO-S或293F细胞一起在4℃下孵育1小时,同时以12rpm转动。用冷的5%FBS-PBS洗涤细胞,并如上所述洗脱细胞结合的噬菌体颗粒。对于Dynabeads的淘选,首先将约 10^{12} cfu噬菌体与200μl Dynabeads M-280链霉抗生物素蛋白 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 一起孵育以消耗非特异性结合的噬菌体颗粒,然后将处理的噬菌体与另外200μl用20μg生物素化的PD-1 ECD蛋白质饱和的Dynabeads在室温下轻轻搅拌孵育1小时。强化洗涤后,如上所述洗脱结合在dynabeads上的噬菌体。

[0297] 5. VHH蛋白质表达和筛选

[0298] 在所需的淘选步骤后,刮下平板上生长的噬菌体感染的TG1细胞集落,并提取含有VHH片段的pFL249噬菌粒。通过用Sfi I和Not I消化pFL249质粒来克隆VHH片段,然后将其连接到含有6个组氨酸标签和c-Myc-标签基因的表达载体pETbac中。将连接产物转化到大肠杆菌BL21 (DE3) 感受态细胞中,然后在25℃在ZYM-5052培养基中以230rpm振荡培养48小时。然后收集细菌培养上清液用于ELISA或FACS测试。

[0299] 使用ELISA作为首个筛选方法来测试VHH与人PD-1 ECD蛋白的结合。简言之,将96孔板(Nunc, Rochester, MN, USA)用重组his标记的人和小鼠PD-1 ECD蛋白在4℃包被过夜。封闭和洗涤后,将BL21大肠杆菌上清液转移至包被的平板并在室温下孵育1小时。然后洗涤板,随后用二抗山羊抗c-Myc-HRP (Bethyl, Montgomery, TX, USA) 孵育1小时。洗涤后,加入TMB底物,用2M HCl终止反应。使用酶标仪 (Molecular Device, Sunnyvale, CA, USA) 读取450nm处的吸光度。

[0300] 为了证实抗PD-1VHH对细胞膜上表达的构象性PD-1分子的天然结合,用人PD-1转染的CHO-S细胞和小鼠PD-1转染的293F细胞进行流式细胞术分析。亲本CHO-S或293F细胞系用作阴性对照。首先将细胞与大肠杆菌培养物上清样品在96孔U形底平板 (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) 中以 1×10^5 个细胞/孔的密度在4℃孵育1小时,然后与二抗山羊抗-c-Myc-PE (Bethyl, Montgomery, TX, USA) 在4℃下孵育30分钟。在每个步骤之间应用2次洗涤,并将细胞重悬于1X PBS/1%BSA中进行流式细胞分析 (IntelliCyt, Albuquerque, NM, USA)。

[0301] 6. 测序

[0302] 通过ELISA和FACS筛选得到的阳性大肠杆菌克隆被送到Biosune (中国上海),用于VHH基因的核苷酸测序。使用CLC Main Workbench (Qiagen, Hilden, Germany) 分析测序结果。

[0303] 一种先导抗体为命名为“AP17R1-2H2”的VHH。其序列信息提供在序列信息表A和序列表中。该抗体也作用于优化(包括人源化和亲和力成熟)的“亲本”。人源化和亲和力成熟将在下面的实施例3中更详细地描述。

[0304] 7. VHH产生

[0305] 携带VHH基因的BL21大肠杆菌克隆在25℃, 40ml ZYM-5052培养基中以230rpm振荡培养48小时。通过SDS-PAGE确认BL21上清中his和c-Myc标签融合的VHH蛋白的表达,然后使用Ni-NTA柱纯化。VHH的纯度通过SEC-HPLC确定。对于低上清表达克隆,使用超声 (Scientz, Ningbo, China) 破碎的大肠杆菌细胞释放可溶性VHH蛋白。

[0306] 8. 嵌合VHH-Fc (hIgG4) 蛋白质产生

[0307] 将目的克隆转化为VHH-Fc (hIgG4) 融合抗体。简言之,使用含有适当限制性位点的

VHH特异性克隆引物从pET-bac载体PCR扩增VHH基因,然后通过融合克隆到含有人hIgG4.S228P的Fc的修饰的pcDNA3.3表达载体中以产生相应的VHH-Fc (hIgG4.SP) 嵌合抗体克隆。用载体瞬时转染293F或Expi293细胞进行抗体表达。收集含有抗体的细胞培养物上清液并使用蛋白质A层析纯化。

[0308] 实施例3

[0309] 抗体优化

[0310] 1. 人源化

[0311] 选择对PD-1具有高亲和力和特异性的VHH用于人源化。使用“最适合”方法将VHH链人源化。

[0312] VHH构架区的氨基酸序列针对人种系V基因数据库进行比对,并且通过使用Kabat CDR定义用VHH CDR序列置换最高命中的人CDR序列来产生人源化VHH序列。框架区中的某些残基被回复突变至VHH原有残基以维持亲和力。将人源化基因回译,针对哺乳动物表达密码子优化,并由GENEWIZ合成。将这些基因用含有适当限制性位点的克隆引物再扩增,并克隆到修饰的pcDNA3.3载体中以表达人源化VHH-Fc (hIgG4.SP)。在使用SPR对PD-1结合进行测试后,选择具有适当亲和力的突变体作为人源化抗体先导。关于亲本抗体“AP17R1-2H2”的VHH-Fc (hIgG4) 形式命名为“AP17R1-2H2-Fc (IgG4)”或“W3056-AP17R1-2H2-FC (IgG4.SP)”。

[0313] 2. 亲和力成熟

[0314] 使用定点诱变方法将亲本克隆的三个互补决定区(CDR1、CDR2和CDR3)中的每个氨基酸分别突变为其他20个氨基酸。使用含有编码20个氨基酸的NNS密码子的DNA引物将突变引入每个靶向CDR位置。磷酸化的单个简并引物用于定点诱变反应。将200ng反应产物电穿孔入BL21并表达。

[0315] 通过使用竞争性ELISA试验筛选突变克隆。简而言之,将96孔Maxisorp Immunoplate在4℃下用pH 9.2的包被缓冲液(200mM Na₂CO₃/NaHCO₃)中的0.5ug/ml抗c-Myc抗体包被过夜。第二天,在室温下用酪蛋白封闭板1小时。封闭后,将上述突变克隆和亲本VHH(即AP17R1-2H2)克隆的大肠杆菌上清液加入平板并在室温下孵育1小时。洗涤平板后,将hPro1.hFc-生物素(0.25μg/ml)和AP17R1-2H2-FC (IgG4.sp)(0.25μg/ml)的预混合物加入到孔中并在室温下孵育1小时。随后在室温下与链霉抗生物素蛋白-HRP缀合物孵育1小时。用TMB底物检测HRP活性并用2M HCl终止反应。在450nm读板。挑出显示在450nm处的光密度(OD)信号大于亲本VHH(即,AP17R1-2H2)克隆的1.5倍的克隆并对其进行测序。这些突变克隆在BL21中重新表达并纯化。表面等离子体共振(SPR)用于检测突变体的亲和力。在人源化和亲和力成熟之后,得到一系列变体。

[0316] 3. SPR的K_d排序

[0317] 为了从亲和力成熟的突变体中筛选到WBP3056 VHH抗体,使用Biacore 8K通过SPR测定法检测针对hPro1.ECD.hFc、mPro1.ECD.hFc和cynoPro1.ECD.hFc (AcrobioSystems)的k_{off}。在固定抗人IgG Fc抗体的CM5传感器芯片上捕获hPro1.ECD.hFc、mPro1.ECD.hFc或cynoPro1.ECD.hFc (AcrobioSystems)。将每种VHH抗体以30μL/分钟的流速注射到传感器芯片上,缔合相为120s,接着150s的解离。使用Langmuir分析将缔合和解离曲线拟合至1:1模型。

[0318] 结果如表3所示。

[0319]

表 3

分析物 (VHH 蛋白)	hPro1.ECD.hFc				mPro1.ECD.hFc				cynoPro1.ECD.hFc			
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)		ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)		ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	
AP17R1-2H2-Z1-R1-4B2	4.50×10 ⁵	4.13×10 ⁻³	9.19×10 ⁻⁹		2.92×10 ⁵	1.01×10 ⁻²	3.46×10 ⁻⁸		3.45×10 ⁵	8.79×10 ⁻³	2.55×10 ⁻⁸	
AP17R1-2H2-Z1-R1-4D8	4.17×10 ⁵	3.96×10 ⁻³	9.49×10 ⁻⁹		2.84×10 ⁵	9.55×10 ⁻³	3.37×10 ⁻⁸		3.20×10 ⁵	8.33×10 ⁻³	2.60×10 ⁻⁸	
AP17R1-2H2-Z1-R1-6E1	4.39×10 ⁵	3.28×10 ⁻³	7.48×10 ⁻⁹		2.87×10 ⁵	1.46×10 ⁻²	5.08×10 ⁻⁸		3.41×10 ⁵	7.54×10 ⁻³	2.21×10 ⁻⁸	
AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1	5.43×10 ⁵	1.12×10 ⁻³	2.06×10 ⁻⁹		3.81×10 ⁵	4.70×10 ⁻³	1.23×10 ⁻⁸		4.24×10 ⁵	2.13×10 ⁻³	5.04×10 ⁻⁹	
AP17R1-2H2-Z1-R1-14F1	4.11×10 ⁵	1.35×10 ⁻³	3.28×10 ⁻⁹		2.80×10 ⁵	2.18×10 ⁻³	7.80×10 ⁻⁹		3.09×10 ⁵	2.77×10 ⁻³	8.98×10 ⁻⁹	
AP17R1-2H2-Z1-R1-14B3	4.89×10 ⁵	2.49×10 ⁻³	5.09×10 ⁻⁹		3.44×10 ⁵	5.96×10 ⁻³	1.73×10 ⁻⁸		3.66×10 ⁵	4.84×10 ⁻³	1.32×10 ⁻⁸	
AP17R1-2H2-Z1-R1-14F3	4.65×10 ⁵	1.09×10 ⁻³	2.35×10 ⁻⁹		2.70×10 ⁵	7.32×10 ⁻³	2.71×10 ⁻⁸		3.44×10 ⁵	2.47×10 ⁻³	7.18×10 ⁻⁹	
AP17R1-2H2-Z1-R1-27A2	3.87×10 ⁵	3.31×10 ⁻³	8.56×10 ⁻⁹		2.65×10 ⁵	8.94×10 ⁻³	3.37×10 ⁻⁸		3.02×10 ⁵	7.45×10 ⁻³	2.46×10 ⁻⁸	
AP17R1-2H2-Z1-R1-29B2	4.06×10 ⁵	3.47×10 ⁻³	8.54×10 ⁻⁹		2.64×10 ⁵	1.48×10 ⁻²	5.58×10 ⁻⁸		3.18×10 ⁵	8.17×10 ⁻³	2.57×10 ⁻⁸	
AP17R1-2H2-Z1-R1-29B6	4.25×10 ⁵	2.98×10 ⁻³	7.01×10 ⁻⁹		2.77×10 ⁵	1.08×10 ⁻²	3.91×10 ⁻⁸		3.23×10 ⁵	6.46×10 ⁻³	2.00×10 ⁻⁸	
AP17R1-2H2-Z1-R1-30D3	4.16×10 ⁵	2.82×10 ⁻³	6.79×10 ⁻⁹		2.77×10 ⁵	1.18×10 ⁻²	4.25×10 ⁻⁸		3.25×10 ⁵	6.24×10 ⁻³	1.92×10 ⁻⁸	
AP17R1-2H2-Z1	3.07×10 ⁵	3.92×10 ⁻³	1.27×10 ⁻⁸		2.05×10 ⁵	1.36×10 ⁻²	6.62×10 ⁻⁸		2.37×10 ⁵	8.63×10 ⁻³	3.64×10 ⁻⁸	

[0320] 在表3中,证明了在亲和力成熟后,亲和力成熟的VHH分别结合hPro1.ECD.hFc、mPro1.ECD.hFc和cynoPro1.ECD.hFc,并且其亲和力比亲和力成熟前(例如,AP17R1-2H2-

z1, 人源化AP17R1-2H2) 有所提高。

[0321] 表3中列出的VHH蛋白的序列信息在上表A和随附的序列表中提供。

[0322] 实施例4

[0323] 体外表征: 通过FACS测量与人、小鼠和食蟹猴PD-1的结合

[0324] 1.1人PD-1结合

[0325] 将细胞CHO-S.hPro1.C6 (2×10^5 个细胞/孔) 与各种浓度的抗-PD-1抗体(从133.3nM以4倍连续稀释至0.008nM) 在4℃孵育1小时。用1×PBS/1%BSA洗涤后, 施加二抗PE标记的山羊抗人IgG, 并与细胞在4℃孵育1小时。使用抗人PD-1抗体BMK1和BMK3作为阳性对照。使用人IgG4同种型抗体作为阴性对照。然后洗涤细胞并重悬于1×PBS/1%BSA中。通过流式细胞仪(BD) 测量细胞的MFI并通过FlowJo (版本7.6.1) 分析。数据显示在图1和表4中。

[0326] 表4. 通过FACS测量与人PD-1的结合 EC_{50}

[0327]	抗体	EC_{50} (nM)
	W3056-AP17R1-2H2-FC(IgG4.SP)	1.872
	W3056-AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1-FC(IgG4.SP)	0.612
	WBP305-BMK1.hIgG4	0.409 -0.749
	WBP305-BMK3.hIgG4	3.103

[0328] 如图1和表4所示, 包括抗体W3056-AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1-FC (IgG4.SP) 和抗体AP17R1-2H2-FC (IgG4) 的W3056抗体以剂量依赖性方式有效地结合至细胞表面人PD-1。

[0329] 1.2小鼠PD-1结合

[0330] 将细胞293F.mPro1.B4 (2×10^5 个细胞/孔) 与各种浓度的抗-PD-1抗体(从133.3nM以3倍连续稀释至0.008nM) 在4℃孵育1小时。用1×PBS/1%BSA洗涤后, 施加二抗PE标记的山羊抗人IgG, 并与细胞在4℃孵育1小时。使用人IgG4同种型抗体作为阴性对照。然后洗涤细胞并重悬于1×PBS/1%BSA中。通过流式细胞仪测量细胞的MFI并通过FlowJo (版本7.6.1) 分析。数据显示在图2和表5中。

[0331] 表5. 通过FACS测量与小鼠PD-1的结合 EC_{50}

	抗体	EC ₅₀ (nM)
[0332]	W3056-AP17R1-2H2-FC (IgG4.SP)	4.77
	W3056-AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1-FC(IgG4.SP)	4.257
	WBP305-BMK1.hIgG4	NA
	WBP305-BMK3.hIgG4	NA

[0333] 如图2和表5所示,包括抗体W3056-AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1-FC (IgG4.SP) 和抗体AP17R1-2H2-FC (IgG4) 的W3056抗体以剂量依赖性方式与细胞表面小鼠PD-1有效结合。

[0334] 1.3食蟹猴PD-1结合

[0335] 将食蟹猴PD-1 (GenBank登录号NP_001271065.1) 瞬时转染的293F细胞 (2×10^5 个细胞/孔) 与各种浓度的抗PD-1抗体 (从133.4nM以3倍连续稀释至0.008nM) 在4℃孵育1小时。用1×PBS/1%BSA洗涤后,施加二抗PE标记的山羊抗人IgG,并与细胞在4℃孵育1小时。使用抗人PD-1抗体BMK1和BMK3作为阳性对照。使用人IgG4同种型抗体作为阴性对照。然后洗涤细胞并重悬于1×PBS/1%BSA中。通过流式细胞仪测量细胞的MFI并通过FlowJo (版本7.6.1) 分析。数据显示在图3和表6中。

[0336] 表6. 在两次分开的实验中通过FACS测量与食蟹猴PD-1的结合EC₅₀

	抗体	EC ₅₀ (nM) (实验1)	EC ₅₀ (nM) (实验2)
[0337]	W3056-AP17R1-2H2-FC (IgG4.SP)	0.98	/
	W3056-AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1-FC(IgG4.SP)	/	1.975
	W305-BMK1.hIgG4	0.55	1.981
	W305-BMK3.hIgG4	1.03	2.293

[0338] 如图3和表6所示,包括抗体W3056-AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1-FC (IgG4.SP) 和抗体AP17R1-2H2-FC (IgG4) 的W3056抗体以剂量依赖性方式与细胞表面食蟹猴PD-1有效结合。

[0339] 2. 阻断PD-L1或PD-L2与PD1的结合

[0340] 2.1通过FACS测量的人PD-1/PD-L1阻断

[0341] 将人PD-1转染的CHO-S.hPro1.C6细胞以 2×10^5 个细胞/孔的密度转移到96孔U形底平板中。将各种浓度的抗体(从133.3nM以4倍连续稀释至0.008nM)和恒定浓度的小鼠Fc标记的PD-L1-ECD蛋白(hProL1.ECD.mFc)(5 μ g/mL)预先混合并与细胞在4℃下孵育1小时。用1 \times PBS/1%BSA洗涤后,施加二抗PE标记的山羊抗小鼠IgG,并与细胞在4℃孵育1小时。然后洗涤细胞并重悬于1 \times PBS/1%BSA中。通过流式细胞仪测量细胞的MFI并通过FlowJo(版本7.6.1)分析。数据显示在图4和表7中。

[0342] 表7. 阻断人PD-L1与细胞表面人PD-1的结合

抗体	IC50 (nM)
W3056-AP17R1-2H2-Fc (IgG4.SP)	1.000
W3056-AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1-FC (IgG4.SP)	0.655
WBP305-BMK1.hIgG4	0.544
WBP305-BMK3.hIgG4K	1.763

[0344] 如图4和表7所示,包括抗体W3056-AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1-FC (IgG4.SP) 和抗体AP17R1-2H2-FC (IgG4) 的W3056抗体以剂量依赖性方式有效阻断人PD-L1与细胞表面人PD-1的结合。

[0345] 2.2通过FACS测量的小鼠PD-1/PD-L1阻断

[0346] 将小鼠PD-1转染的293F.mPro1.B4细胞以 2×10^5 个细胞/孔的密度转移到96孔U形底平板中。将不同浓度的抗PD-1抗体(从1334nM以3倍连续稀释至0.07nM)和恒定浓度的小鼠Fc标记的小鼠PD-L1 ECD蛋白(mProL1.ECD.mFc)(5 μ g/mL)预先混合并与细胞在4℃孵育1小时。用1 \times PBS/1%BSA洗涤后,施加二抗PE标记的山羊抗小鼠IgG,并与细胞在4℃孵育1小时。然后洗涤细胞并重悬于1 \times PBS/1%BSA中。通过流式细胞仪测量细胞的MFI并通过FlowJo(版本7.6.1)分析。数据显示在图5和表8中。

[0347] 表8. 阻断小鼠PD-L1与细胞表面小鼠PD-1的结合

抗体	IC50 (nM)
W3056-AP17R1-2H2-FC (IgG4.SP)	22.09
W3056-AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1-FC (IgG4.SP)	10.19
WBP305-BMK1.hIgG4	NA
WBP305-BMK3.hIgG4K	NA

[0349] 如图5和表8所示,包括抗体W3056-AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1-FC (IgG4.SP) 和抗体AP17R1-2H2-FC (IgG4) 的W3056抗体以剂量依赖性方式有效阻断小鼠PD-L1与细胞表面PD-1的结合。

[0350] 2.3通过ELISA测量的人PD-1/PD-L2阻断

[0351] 用1 μ g/mL,每孔100 μ L的人PD-1 ECD(hPro1.ECD.mFc)在4℃预包被板过夜。在使用200 μ L 1 \times PBS/2%BSA封闭1小时后,将恒定浓度的his标记的人PD-L2 ECD(hProL2.ECD.His)和各种浓度的测试抗体(从66.7nM以3倍连续稀释至0.003nM)预先混合并加入板中。在环境温度下孵育2小时后,通过HRP标记的山羊抗His抗体检测配体与固定化蛋白的结合。通过分配100 μ L的TMB底物来显色,然后用100 μ L的2N HCl停止显色。使用微孔板分光光度计在450nm和540nm处读取吸光度。数据显示在图6和表9中。

[0352] 表9. 在两次分开的实验中阻断人PD-L2与固定的人PD-1的结合

[0353]

抗体	IC50 (nM) (实验 1)	IC50 (nM) (实验 2)
W3056-AP17R1-2H2-FC(IgG4.SP)	2.02	/
W3056-AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1-FC(IgG4.SP)	/	0.8856
WBP305-BMK1.hIgG4	0.95	0.5338
WBP305-BMK3.hIgG4K	2.19	1.499

[0354] 如图6和表9所示,包括抗体W3056-AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1-FC (IgG4.SP) 和抗体AP17R1-2H2-FC (IgG4) 的W3056抗体以剂量依赖性方式有效阻断人PD-L2与固定的PD-1的结合。

[0355] 2.4通过ELISA测量的食蟹猴PD-1/PD-L1阻断

[0356] 用1 μ g/mL,每孔100 μ L的食蟹猴PD-1 ECD蛋白 (cynoPro1.ECD.hFc) 在4 $^{\circ}$ C预包被板过夜。使用200 μ L 1 \times PBS/2% BSA封闭1小时后,将恒定浓度的生物素化食蟹猴PD-L1 (cynoProL1.ECD.hFc.生物素) (2.5 μ g/mL) 和各种浓度的测试抗体、阳性和阴性对照(从133.4nM以3倍连续稀释至0.007nM) 预先混合并加入板中。将板在环境温度下孵育1小时。通过链霉亲和素-HRP检测配体与固定化蛋白的结合。通过分配100 μ L的TMB底物来显色,然后用100 μ L的2M HCl终止。使用微孔板分光光度计在450nm和540nm处读取吸光度。数据显示在图7和表10中。

[0357] 表10.在两次分开的实验中阻断食蟹猴PD-L1与固定的食蟹猴PD-1的结合

[0358]

抗体	IC50 (nM) (实验 1)	IC50 (nM) (实验 2)
W3056-AP17R1-2H2-FC(IgG4.SP)	1.30	/
W3056-AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1-FC(IgG4.SP)	/	0.8534
WBP305-BMK1.hIgG4	0.47	0.5848
WBP305-BMK3.hIgG4K	14.21	14.59

[0359] 如图7和表10所示,包括抗体W3056-AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1-FC (IgG4.SP) 和抗体AP17R1-2H2-FC (IgG4) 的W3056抗体以剂量依赖性方式有效阻断食蟹猴PD-L1与固定化食蟹

猴PD-1的结合。

[0360] 3.通过ELISA测量的跨家族蛋白结合测定

[0361] 用1 μ g/mL,每孔100 μ L的hPD-1.ECD.mFc、hCD28.ECD.mFc、hCTLA-4.ECD.His、hICOS.ECD.mFc或hBTLA.ECD.His在4 $^{\circ}$ C预包被过夜。用200 μ L 1 \times PBS/2%BSA封闭1小时后,以100nM的浓度向板中加入测试抗体。将板在环境温度下孵育1小时。用HRP标记的山羊抗人IgG抗体检测抗体与固定化蛋白质的结合。通过分配100 μ L的TMB底物来显色,然后用100 μ L的2N HCl停止显色。使用微孔板分光光度计在450nm和540nm处读取吸光度。数据显示在图8中。

[0362] 如图8所示,包括抗体W3056-AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1-FC (IgG4.SP) 和抗体AP17R1-2H2-FC (IgG4) 的W3056抗体与固定的人PD-1特异性结合,并且与人CD28、CTLA-4、ICOS和BTLA不交叉反应。

[0363] 4.通过FACS表位分仓

[0364] 将人PD-1转染的细胞CHO-S.hPro1.C6以1~2 $\times 10^5$ 个细胞/孔的密度转移到96孔U形底平板中。分别将恒定浓度的生物素化的BMK1 (1 μ g/mL) 或生物素化的BMK3 (1 μ g/mL) 与测试抗体的连续稀释液(从133.3nM以4倍连续稀释至0.008nM) 混合。然后将混合物加入到96孔板中的细胞中并在4 $^{\circ}$ C孵育1小时。用1 \times PBS/1%BSA洗涤后,施加二抗SA-PE并与细胞在4 $^{\circ}$ C下孵育1小时。然后洗涤细胞并重悬于1 \times PBS/1%BSA中。通过流式细胞仪测量细胞的MFI并通过FlowJo分析。数据如图9所示。

[0365] 如图9所示,W3056抗体W3056-AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1-FC (IgG4.SP) 和AP17R1-2H2与BMK1和BMK3共享相似的表位仓。

[0366] 5.基于人细胞的功能测定

[0367] 使用单向混合淋巴细胞反应(单向MLR) 来测试PD-1抗体对人CD4 $^{+}$ T细胞的细胞因子分泌的激动作用。

[0368] i) 细胞分离、细胞培养和诱导

[0369] 使用Ficoll-Paque PLUS梯度离心从健康供体新鲜分离人PBMC。将分离的PBMC培养在补充有100U/mL重组人IL-2的完全RPMI-1640 (含有10%FBS和1%PS) 中。

[0370] 根据制造商的说明使用人单核细胞富集试剂盒分离人单核细胞。在补充有800U/mL的重组人GM-CSF和50ng/mL的IL-4的完全RPMI-1640培养基中将细胞浓度调节至2 $\times 10^6$ 个细胞/mL。将细胞悬液以2.5mL/孔接种在6孔板中。细胞培养5-7天以分化成树突细胞(DC)。每2-3天通过用补充有细胞因子的新鲜培养基替换一半培养基来补充细胞因子。

[0371] 根据制造商的方案使用人CD4 $^{+}$ T细胞富集试剂盒分离人CD4 $^{+}$ T细胞。

[0372] ii) 混合的淋巴细胞反应

[0373] 对于人同种异体MLR,将纯化的CD4 $^{+}$ T细胞与同种异体不成熟的DC (iDC) 共同培养。对于人自体同源MLR,在CD4 $^{+}$ T细胞分离之前,将PBMC用CMV肽处理5天。在测定那天,将DC用CMV肽处理1小时,然后与自体同源人CD4 $^{+}$ T细胞共同培养。

[0374] 使用完全RPMI-1640培养基在96孔圆底培养板中设置MLR。将CD4 $^{+}$ T细胞、各种浓度的抗体和同种异体DC以适当的比率加入平板中。平板在37 $^{\circ}$ C,5%CO $_2$ 下孵育。孵育3-5天后,检测细胞因子产生或细胞增殖。

[0375] iii) 细胞因子检测

[0376] 使用匹配的抗体对通过ELISA测量人IL-2和IFN- γ 释放。使用重组人IL-2和IFN- γ 作为标准。IL-2的系列浓度为2ng/ml、1ng/ml、0.5ng/ml、0.25ng/ml、0.125ng/ml、0.063ng/ml、0.031ng/ml、0.016ng/ml、0.008ng/ml,并且IFN- γ 的系列浓度为8ng/ml、4ng/ml、2ng/ml、1ng/ml、0.5ng/ml、0.25ng/ml、0.125ng/ml、0.063ng/ml、0.031ng/ml。将平板分别用对人IL-2或IFN- γ 特异的捕获抗体预包被。封闭后,将100 μ L标准品或样品移液至每个孔中并在环境温度下孵育2小时。除去未结合的物质后,将生物素缀合的检测抗体加入孔中并孵育1小时。然后在环境温度下将链霉抗生物素蛋白-HRP加入孔中30分钟。通过分配100 μ L的TMB底物来显色,然后用100 μ L的2N HCl终止。使用微孔板分光光度计在450nm处读取吸光度。从标准曲线计算上清液中细胞因子的浓度。

[0377] iv) 增殖检测

[0378] 通过CellTiter-Glo荧光细胞存活力测定按照供应商的说明确定培养物中存活细胞的数量。

[0379] 如图10A和10B所示,在人allo-MLR反应中,包括W3056-AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1-FC (IgG4.SP) 和AP17R1-2H2-FC (IgG4) 的W3056抗体以剂量依赖性方式促进IL-2和IFN- γ 产生。图11A和11B显示在auto-MLR反应中W3056抗体AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1-FC (IgG4.SP) 促进IFN- γ 产生和T细胞增殖。

[0380] v) 抑制性Treg抑制作用测定

[0381] 从一名健康的捐献者的PBMC富集人CD4⁺T淋巴细胞,并从另一名健康的捐献者分离人单核细胞。使用人CD4⁺CD25^{HIGH} T细胞分离试剂盒从人CD4⁺T细胞分离调节T细胞(Tregs),并且剩余的T淋巴细胞为CD4⁺CD25⁻T细胞。如上文所述从单核细胞诱导DC。

[0382] 将一万个不成熟的DC、 1×10^5 个CD4⁺CD25⁻T效应细胞、 1×10^5 个CD4⁺CD25⁺Treg细胞和166.7nM抗PD-1抗体以200 μ L的总体积在96孔板中孵育。将板在5%CO₂培养箱中在37℃保持5天。检验IFN- γ 释放和T细胞增殖。使用BMK1和BMK3作为阳性对照,使用人IgG4同种型抗体作为阴性对照。还包括没有Treg细胞或抗PD-1抗体的孔作为对照。

[0383] 如图12所示,W3056抗体W3056-AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1-FC (IgG4.SP) 能够逆转人Treg诱导的T效应细胞抑制,这通过IFN- γ 产生(图12A)和T细胞增殖(图12B)测量。

[0384] vi) 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)

[0385] 将人PD-1转染的细胞系WBP305-CHO-S.hPro1.C6细胞与各种浓度的测试抗体在96孔板中混合,并且以50:1的效应子/靶标比加入PBMC。将板在5%CO₂培养箱中在37℃保持4-6小时。通过基于LDH的细胞毒性检测试剂盒确定靶标细胞裂解。将赫赛汀(Herceptin)在SK-Br-3细胞上诱导的ADCC作用用作阳性对照。结果表明,W3056抗体W3056-AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1-FC (IgG4.SP) 对人PD-1转染的细胞不诱导ADCC作用,如图13所示。

[0386] 6. 通过表面等离子体共振 (SPR) 检测针对人、小鼠和食蟹猴PD-1的亲合力

[0387] 使用Biacore 8K检测针对人、小鼠和食蟹猴PD-1的抗体结合亲和力。将W3056-AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1-FC (IgG4.SP) 捕获在固定有抗人Fc IgG抗体的CM5传感器芯片(GE)上。在该传感器芯片上以30 μ L/min的流速注入不同浓度的人、小鼠和食蟹猴PD-1,缔合相为120s,接着是150s解离。然后,在每一结合循环后,通过pH 1.5的10mM甘氨酸使芯片再生。

[0388] 从测试传感图中减去空白表面和缓冲液通道的传感图。使用Langmuir分析将实验

数据拟合至1:1模型。使用40、45和40kDa的分子量分别计算分析物人、小鼠和食蟹猴PD-1的摩尔浓度。SPR结果显示W3056-AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1-FC (IgG4.SP) 对人、食蟹猴和小鼠PD-1的亲合力分别为 $3.45\text{E}-09\text{M}$ 、 $8.53\text{E}-09\text{M}$ 和 $2.87\text{E}-08\text{M}$ (表11)。

[0389] 表11.通过表面等离子体共振 (SPR) 检测的结合动力学亲和力

	配体	与人 PD-1 的结合			与食蟹猴 PD-1 的结合			与小鼠 PD-1 的结合		
		ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
[0390]	W3056-AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1-FC(IgG4.SP)	2.48E+05	8.57E-04	3.45E-09	2.08E+05	1.77E-03	8.53E-09	1.47E+05	4.22E-03	2.87E-08
	WBP305-BMK1.IgG4	4.05E+05	1.16E-03	2.87E-09	3.01E+05	6.72E-04	2.23E-09	无/弱结合		
	WBP305-BMK3.hlgG4K	1.77E+05	6.63E-04	3.74E-09	1.84E+05	5.17E-02	2.81E-07			

[0391] 7.通过DSF测定热稳定性

[0392] 使用实时荧光定量PCR (QuantStudio 7Flex,Thermo Fisher Scientific) 进行DSF测定。简而言之,将19 μL 抗体溶液与1 μL 62.5X SYPRO Orange溶液(Invitrogen)混合并加入到96孔板(Biosystems)中。以2 $^{\circ}\text{C}$ /分钟的速率将平板从26 $^{\circ}\text{C}$ 加热至95 $^{\circ}\text{C}$,并收集得到的荧光数据。计算相对于不同温度的荧光变化的负导数,并将最大值定义为解链温度 T_m 。如果蛋白质具有多个解折叠转变,则报告前两个 T_m ,命名为 T_{m1} 和 T_{m2} 。 T_{m1} 总是被解释为正式解链温度 T_m 以便于不同蛋白质之间的比较。在软件(QuantStudio Real-Time PCR PCR Software v1.3)报告了不同温度的负导数图后,数据收集和 T_m 计算由其操作软件自动进行。DST结果显示在表12中,DSF谱显示在图14中。W3056抗体具有正常的DSF谱,并且 T_m 值为60.3-62 $^{\circ}\text{C}$ 。

[0393] 表12.通过DSF检测的热稳定性

[0394]	蛋白名称	W3056-AP17R1-2H2-Fc(IgG4.SP)	W3056-AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1-FC(IgG4.SP)
	同种型	hIgG4	hIgG4
	pI	6.4	6.4
	缓冲液	PBS	PBS
	浓度(mg/ml)	2.8	3.5
	$T_m(^{\circ}\text{C})$	62.0	60.3

[0395] 8.人血清稳定性测定

[0396] 通过离心从健康捐献者新鲜分离人血清。将抗体以10倍稀释在人血清中。将五份样品等分试样在37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育。分别在第0天、第1天、第4天、第7天和第14天收集样品并冷冻在液氮中。

[0397] 将人PD-1转染的细胞系WBP305-CHO-S.hPro1.C6细胞(1×10^5 个细胞/孔)用各种浓度的血清处理的W3056抗PD-1抗体(从129.9nM以3倍连续稀释至0.0007nM)在4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1小时。用1 \times PBS/1%BSA洗涤后,施加二抗PE标记的山羊抗人IgG并与细胞在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育1小时。使用人IgG4同种型抗体作为阴性对照。然后洗涤细胞并重悬于1 \times PBS/1%BSA中。通过流式

细胞仪 (BD) 测量细胞的MFI并通过FlowJo分析。

[0398] 图15所示的结合表明,W3056抗体W3056-AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1-FC (IgG4.SP) 在人血清中稳定至少14天。

[0399] 本领域技术人员将进一步认识到,在不脱离其精神或中心特征的情况下,本发明可以以其他具体形式来实施。由于本发明的前述描述仅公开了其示例性实施方案,应该理解的是,其他变化被认为是在本发明的范围内。因此,本发明不限于在此详细描述的具体实施方案。相反,应当参考所附权利要求来指示本发明的范围和内容。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 上海药明生物技术有限公司
- [0003] <120> 新型抗-PD-1抗体
- [0004] <130> IDC206033
- [0005] <160> 62
- [0006] <170> PatentIn version 3.5
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 10
- [0009] <212> PRT
- [0010] <213> 人工序列
- [0011] <220>
- [0012] <223> AP17R1-2H2或AP17R1-2H2-Z1的CDR1
- [0013] <400> 1
- [0014] Asp Ser Ile Asp Ser Leu Val Asn Met Gly
- [0015] 1 5 10
- [0016] <210> 2
- [0017] <211> 15
- [0018] <212> PRT
- [0019] <213> 人工序列
- [0020] <220>
- [0021] <223> AP17R1-2H2或AP17R1-2H2-Z1的CDR2
- [0022] <400> 2
- [0023] Leu Ile Ala Asn Tyr Ile Thr His Tyr Ala Asp Phe Val Lys Gly
- [0024] 1 5 10 15
- [0025] <210> 3
- [0026] <211> 7
- [0027] <212> PRT
- [0028] <213> 人工序列
- [0029] <220>
- [0030] <223> AP17R1-2H2或AP17R1-2H2-Z1的CDR3
- [0031] <400> 3
- [0032] Arg Asn Ile Ile Val Asp Tyr
- [0033] 1 5
- [0034] <210> 4
- [0035] <211> 10
- [0036] <212> PRT
- [0037] <213> 人工序列
- [0038] <220>

[0039] <223> AP17R1-2H2-Z1-R1-4B2的CDR1
[0040] <400> 4
[0041] Asp Ser Ile Ser Ser Leu Val Asn Met Gly
[0042] 1 5 10
[0043] <210> 5
[0044] <211> 15
[0045] <212> PRT
[0046] <213> 人工序列
[0047] <220>
[0048] <223> AP17R1-2H2-Z1-R1-4B2的CDR2
[0049] <400> 5
[0050] Leu Ile Ala Asn Tyr Ile Thr His Tyr Ala Asp Phe Val Lys Gly
[0051] 1 5 10 15
[0052] <210> 6
[0053] <211> 7
[0054] <212> PRT
[0055] <213> 人工序列
[0056] <220>
[0057] <223> AP17R1-2H2-Z1-R1-4B2的CDR3
[0058] <400> 6
[0059] Arg Asn Ile Ile Val Asp Tyr
[0060] 1 5
[0061] <210> 7
[0062] <211> 10
[0063] <212> PRT
[0064] <213> 人工序列
[0065] <220>
[0066] <223> AP17R1-2H2-Z1-R1-4D8的CDR1
[0067] <400> 7
[0068] Asp Ser Ile Gln Ser Leu Val Asn Met Gly
[0069] 1 5 10
[0070] <210> 8
[0071] <211> 15
[0072] <212> PRT
[0073] <213> 人工序列
[0074] <220>
[0075] <223> AP17R1-2H2-Z1-R1-4D8的CDR2
[0076] <400> 8
[0077] Leu Ile Ala Asn Tyr Ile Thr His Tyr Ala Asp Phe Val Lys Gly

[0078]	1	5	10	15
[0079]	<210> 9			
[0080]	<211> 7			
[0081]	<212> PRT			
[0082]	<213> 人工序列			
[0083]	<220>			
[0084]	<223> AP17R1-2H2-Z1-R1-4D8的CDR3			
[0085]	<400> 9			
[0086]	Arg Asn Ile Ile Val Asp Tyr			
[0087]	1	5		
[0088]	<210> 10			
[0089]	<211> 10			
[0090]	<212> PRT			
[0091]	<213> 人工序列			
[0092]	<220>			
[0093]	<223> AP17R1-2H2-Z1-R1-6E1的CDR1			
[0094]	<400> 10			
[0095]	Asp Ser Ile Asp Ser Met Val Asn Met Gly			
[0096]	1	5	10	
[0097]	<210> 11			
[0098]	<211> 15			
[0099]	<212> PRT			
[0100]	<213> 人工序列			
[0101]	<220>			
[0102]	<223> AP17R1-2H2-Z1-R1-6E1的CDR2			
[0103]	<400> 11			
[0104]	Leu Ile Ala Asn Tyr Ile Thr His Tyr Ala Asp Phe Val Lys Gly			
[0105]	1	5	10	15
[0106]	<210> 12			
[0107]	<211> 7			
[0108]	<212> PRT			
[0109]	<213> AP17R1-2H2-Z1-R1-6E1的CDR3			
[0110]	<220>			
[0111]	<223> IEC180034PCT			
[0112]	<400> 12			
[0113]	Arg Asn Ile Ile Val Asp Tyr			
[0114]	1	5		
[0115]	<210> 13			
[0116]	<211> 10			

[0117] <212> PRT
[0118] <213> 人工序列
[0119] <220>
[0120] <223> AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1的CDR1
[0121] <400> 13
[0122] Asp Ser Ile Asp Ser Leu Val Asn Met Gly
[0123] 1 5 10
[0124] <210> 14
[0125] <211> 15
[0126] <212> PRT
[0127] <213> 人工序列
[0128] <220>
[0129] <223> AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1的CDR2
[0130] <400> 14
[0131] Leu Ile Ala Thr Tyr Ile Thr His Tyr Ala Asp Phe Val Lys Gly
[0132] 1 5 10 15
[0133] <210> 15
[0134] <211> 7
[0135] <212> PRT
[0136] <213> 人工序列
[0137] <220>
[0138] <223> AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1的CDR3
[0139] <400> 15
[0140] Arg Asn Ile Ile Val Asp Tyr
[0141] 1 5
[0142] <210> 16
[0143] <211> 10
[0144] <212> PRT
[0145] <213> 人工序列
[0146] <220>
[0147] <223> AP17R1-2H2-Z1-R1-14F1的CDR1
[0148] <400> 16
[0149] Asp Ser Ile Asp Ser Leu Val Asn Met Gly
[0150] 1 5 10
[0151] <210> 17
[0152] <211> 15
[0153] <212> PRT
[0154] <213> 人工序列
[0155] <220>

[0156] <223> AP17R1-2H2-Z1-R1-14F1的CDR2
[0157] <400> 17
[0158] Leu Ile Ala Tyr Tyr Ile Thr His Tyr Ala Asp Phe Val Lys Gly
[0159] 1 5 10 15
[0160] <210> 18
[0161] <211> 7
[0162] <212> PRT
[0163] <213> 人工序列
[0164] <220>
[0165] <223> AP17R1-2H2-Z1-R1-14F1的CDR3
[0166] <400> 18
[0167] Arg Asn Ile Ile Val Asp Tyr
[0168] 1 5
[0169] <210> 19
[0170] <211> 10
[0171] <212> PRT
[0172] <213> 人工序列
[0173] <220>
[0174] <223> AP17R1-2H2-Z1-R1-14B3的CDR1
[0175] <400> 19
[0176] Asp Ser Ile Asp Ser Leu Val Asn Met Gly
[0177] 1 5 10
[0178] <210> 20
[0179] <211> 15
[0180] <212> PRT
[0181] <213> 人工序列
[0182] <220>
[0183] <223> AP17R1-2H2-Z1-R1-14B3的CDR2
[0184] <400> 20
[0185] Leu Ile Ala Arg Tyr Ile Thr His Tyr Ala Asp Phe Val Lys Gly
[0186] 1 5 10 15
[0187] <210> 21
[0188] <211> 7
[0189] <212> PRT
[0190] <213> 人工序列
[0191] <220>
[0192] <223> AP17R1-2H2-Z1-R1-14B3的CDR3
[0193] <400> 21
[0194] Arg Asn Ile Ile Val Asp Tyr

[0195]	1	5	
[0196]	<210>	22	
[0197]	<211>	10	
[0198]	<212>	PRT	
[0199]	<213>	人工序列	
[0200]	<220>		
[0201]	<223>	AP17R1-2H2-Z1-R1-14F3的CDR1	
[0202]	<400>	22	
[0203]	Asp Ser Ile Asp Ser Leu Val Asn Met Gly		
[0204]	1	5	10
[0205]	<210>	23	
[0206]	<211>	15	
[0207]	<212>	PRT	
[0208]	<213>	人工序列	
[0209]	<220>		
[0210]	<223>	AP17R1-2H2-Z1-R1-14F3的CDR2	
[0211]	<400>	23	
[0212]	Leu Ile Ala Trp Tyr Ile Thr His Tyr Ala Asp Phe Val Lys Gly		
[0213]	1	5	10 15
[0214]	<210>	24	
[0215]	<211>	7	
[0216]	<212>	PRT	
[0217]	<213>	人工序列	
[0218]	<220>		
[0219]	<223>	AP17R1-2H2-Z1-R1-14F3的CDR3	
[0220]	<400>	24	
[0221]	Arg Asn Ile Ile Val Asp Tyr		
[0222]	1	5	
[0223]	<210>	25	
[0224]	<211>	10	
[0225]	<212>	PRT	
[0226]	<213>	人工序列	
[0227]	<220>		
[0228]	<223>	AP17R1-2H2-Z1-R1-27A2的CDR1	
[0229]	<400>	25	
[0230]	Asp Ser Ile Asp Ser Leu Val Asn Met Gly		
[0231]	1	5	10
[0232]	<210>	26	
[0233]	<211>	15	

[0234] <212> PRT
[0235] <213> 人工序列
[0236] <220>
[0237] <223> AP17R1-2H2-Z1-R1-27A2的CDR2
[0238] <400> 26
[0239] Leu Ile Ala Asn Tyr Ile Thr His Tyr Ala Asp Phe Val Lys Gly
[0240] 1 5 10 15
[0241] <210> 27
[0242] <211> 7
[0243] <212> PRT
[0244] <213> 人工序列
[0245] <220>
[0246] <223> AP17R1-2H2-Z1-R1-27A2的CDR3
[0247] <400> 27
[0248] Arg Ser Ile Ile Val Asp Tyr
[0249] 1 5
[0250] <210> 28
[0251] <211> 10
[0252] <212> PRT
[0253] <213> 人工序列
[0254] <220>
[0255] <223> AP17R1-2H2-Z1-R1-29B2的CDR1
[0256] <400> 28
[0257] Asp Ser Ile Asp Ser Leu Val Asn Met Gly
[0258] 1 5 10
[0259] <210> 29
[0260] <211> 15
[0261] <212> PRT
[0262] <213> 人工序列
[0263] <220>
[0264] <223> AP17R1-2H2-Z1-R1-29B2的CDR2
[0265] <400> 29
[0266] Leu Ile Ala Asn Tyr Ile Thr His Tyr Ala Asp Phe Val Lys Gly
[0267] 1 5 10 15
[0268] <210> 30
[0269] <211> 7
[0270] <212> PRT
[0271] <213> 人工序列
[0272] <220>

[0273] <223> AP17R1-2H2-Z1-R1-29B2的CDR3
[0274] <400> 30
[0275] Arg Asn Ile Arg Val Asp Tyr
[0276] 1 5
[0277] <210> 31
[0278] <211> 10
[0279] <212> PRT
[0280] <213> 人工序列
[0281] <220>
[0282] <223> AP17R1-2H2-Z1-R1-29B6的CDR1
[0283] <400> 31
[0284] Asp Ser Ile Asp Ser Leu Val Asn Met Gly
[0285] 1 5 10
[0286] <210> 32
[0287] <211> 15
[0288] <212> PRT
[0289] <213> 人工序列
[0290] <220>
[0291] <223> AP17R1-2H2-Z1-R1-29B6的CDR2
[0292] <400> 32
[0293] Leu Ile Ala Asn Tyr Ile Thr His Tyr Ala Asp Phe Val Lys Gly
[0294] 1 5 10 15
[0295] <210> 33
[0296] <211> 7
[0297] <212> PRT
[0298] <213> 人工序列
[0299] <220>
[0300] <223> AP17R1-2H2-Z1-R1-29B6的CDR3
[0301] <400> 33
[0302] Arg Asn Ile Tyr Val Asp Tyr
[0303] 1 5
[0304] <210> 34
[0305] <211> 10
[0306] <212> PRT
[0307] <213> 人工序列
[0308] <220>
[0309] <223> AP17R1-2H2-Z1-R1-30D3的CDR1
[0310] <400> 34
[0311] Asp Ser Ile Asp Ser Leu Val Asn Met Gly

[0312]	1	5	10
[0313]	<210> 35		
[0314]	<211> 15		
[0315]	<212> PRT		
[0316]	<213> 人工序列		
[0317]	<220>		
[0318]	<223> AP17R1-2H2-Z1-R1-30D3的CDR2		
[0319]	<400> 35		
[0320]	Leu Ile Ala Asn Tyr Ile Thr His Tyr Ala Asp Phe Val Lys Gly		
[0321]	1	5	10 15
[0322]	<210> 36		
[0323]	<211> 7		
[0324]	<212> PRT		
[0325]	<213> 人工序列		
[0326]	<220>		
[0327]	<223> AP17R1-2H2-Z1-R1-30D3的CDR3		
[0328]	<400> 36		
[0329]	Arg Asn Ile Ile Glu Asp Tyr		
[0330]	1	5	
[0331]	<210> 37		
[0332]	<211> 114		
[0333]	<212> PRT		
[0334]	<213> 人工序列		
[0335]	<220>		
[0336]	<223> AP17R1-2H2的全长序列		
[0337]	<400> 37		
[0338]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0339]	1	5	10 15
[0340]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Asp Ser Ile Asp Ser Leu Val		
[0341]	20	25	30
[0342]	Asn Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val		
[0343]	35	40	45
[0344]	Ala Leu Ile Ala Asn Tyr Ile Thr His Tyr Ala Asp Phe Val Lys Gly		
[0345]	50	55	60
[0346]	Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ala Ala Lys Asn Thr Val Asn Leu Gln		
[0347]	65	70	75 80
[0348]	Met Ser Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala		
[0349]	85	90	95
[0350]	Arg Asn Ile Ile Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val		

[0351]	100	105	110
[0352]	Ser Ser		
[0353]	<210> 38		
[0354]	<211> 114		
[0355]	<212> PRT		
[0356]	<213> 人工序列		
[0357]	<220>		
[0358]	<223> AP17R1-2H2-Z1的全长序列		
[0359]	<400> 38		
[0360]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly		
[0361]	1 5 10 15		
[0362]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Asp Ser Ile Asp Ser Leu Val		
[0363]	20 25 30		
[0364]	Asn Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val		
[0365]	35 40 45		
[0366]	Ala Leu Ile Ala Asn Tyr Ile Thr His Tyr Ala Asp Phe Val Lys Gly		
[0367]	50 55 60		
[0368]	Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln		
[0369]	65 70 75 80		
[0370]	Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala		
[0371]	85 90 95		
[0372]	Arg Asn Ile Ile Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val		
[0373]	100 105 110		
[0374]	Ser Ser		
[0375]	<210> 39		
[0376]	<211> 114		
[0377]	<212> PRT		
[0378]	<213> 人工序列		
[0379]	<220>		
[0380]	<223> AP17R1-2H2-Z1-R1-4B2的全长序列		
[0381]	<400> 39		
[0382]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly		
[0383]	1 5 10 15		
[0384]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Asp Ser Ile Ser Ser Leu Val		
[0385]	20 25 30		
[0386]	Asn Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val		
[0387]	35 40 45		
[0388]	Ala Leu Ile Ala Asn Tyr Ile Thr His Tyr Ala Asp Phe Val Lys Gly		
[0389]	50 55 60		

[0390]	Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
[0391]	65 70 75 80
[0392]	Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala
[0393]	85 90 95
[0394]	Arg Asn Ile Ile Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
[0395]	100 105 110
[0396]	Ser Ser
[0397]	<210> 40
[0398]	<211> 114
[0399]	<212> PRT
[0400]	<213> 人工序列
[0401]	<220>
[0402]	<223> AP17R1-2H2-Z1-R1-4D8的全长序列
[0403]	<400> 40
[0404]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
[0405]	1 5 10 15
[0406]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Asp Ser Ile Gln Ser Leu Val
[0407]	20 25 30
[0408]	Asn Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
[0409]	35 40 45
[0410]	Ala Leu Ile Ala Asn Tyr Ile Thr His Tyr Ala Asp Phe Val Lys Gly
[0411]	50 55 60
[0412]	Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
[0413]	65 70 75 80
[0414]	Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala
[0415]	85 90 95
[0416]	Arg Asn Ile Ile Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
[0417]	100 105 110
[0418]	Ser Ser
[0419]	<210> 41
[0420]	<211> 114
[0421]	<212> PRT
[0422]	<213> 人工序列
[0423]	<220>
[0424]	<223> AP17R1-2H2-Z1-R1-6E1的全长序列
[0425]	<400> 41
[0426]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
[0427]	1 5 10 15
[0428]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Asp Ser Ile Asp Ser Met Val

[0429]	20	25	30
[0430]	Asn Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val		
[0431]	35	40	45
[0432]	Ala Leu Ile Ala Asn Tyr Ile Thr His Tyr Ala Asp Phe Val Lys Gly		
[0433]	50	55	60
[0434]	Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln		
[0435]	65	70	75
[0436]	Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala		
[0437]	85	90	95
[0438]	Arg Asn Ile Ile Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val		
[0439]	100	105	110
[0440]	Ser Ser		
[0441]	<210> 42		
[0442]	<211> 114		
[0443]	<212> PRT		
[0444]	<213> 人工序列		
[0445]	<220>		
[0446]	<223> AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1的全长序列		
[0447]	<400> 42		
[0448]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly		
[0449]	1	5	10
[0450]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Asp Ser Ile Asp Ser Leu Val		
[0451]	20	25	30
[0452]	Asn Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val		
[0453]	35	40	45
[0454]	Ala Leu Ile Ala Thr Tyr Ile Thr His Tyr Ala Asp Phe Val Lys Gly		
[0455]	50	55	60
[0456]	Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln		
[0457]	65	70	75
[0458]	Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala		
[0459]	85	90	95
[0460]	Arg Asn Ile Ile Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val		
[0461]	100	105	110
[0462]	Ser Ser		
[0463]	<210> 43		
[0464]	<211> 114		
[0465]	<212> PRT		
[0466]	<213> 人工序列		
[0467]	<220>		

[0468]	<223> AP17R1-2H2-Z1-R1-14F1的全长序列															
[0469]	<400> 43															
[0470]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
[0471]	1				5					10					15	
[0472]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Asp	Ser	Ile	Asp	Ser	Leu	Val
[0473]					20					25					30	
[0474]	Asn	Met	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gln	Arg	Glu	Leu	Val
[0475]					35					40					45	
[0476]	Ala	Leu	Ile	Ala	Tyr	Tyr	Ile	Thr	His	Tyr	Ala	Asp	Phe	Val	Lys	Gly
[0477]					50					55					60	
[0478]	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln
[0479]	65					70					75					80
[0480]	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Tyr	Ala
[0481]					85					90					95	
[0482]	Arg	Asn	Ile	Ile	Val	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val
[0483]					100					105					110	
[0484]	Ser	Ser														
[0485]	<210> 44															
[0486]	<211> 114															
[0487]	<212> PRT															
[0488]	<213> 人工序列															
[0489]	<220>															
[0490]	<223> AP17R1-2H2-Z1-R1-14B3的全长序列															
[0491]	<400> 44															
[0492]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Val	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
[0493]	1				5					10					15	
[0494]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Asp	Ser	Ile	Asp	Ser	Leu	Val
[0495]					20					25					30	
[0496]	Asn	Met	Gly	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gln	Arg	Glu	Leu	Val
[0497]					35					40					45	
[0498]	Ala	Leu	Ile	Ala	Arg	Tyr	Ile	Thr	His	Tyr	Ala	Asp	Phe	Val	Lys	Gly
[0499]					50					55					60	
[0500]	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln
[0501]	65					70					75					80
[0502]	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Tyr	Ala
[0503]					85					90					95	
[0504]	Arg	Asn	Ile	Ile	Val	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val
[0505]					100					105					110	
[0506]	Ser	Ser														

[0507]	<210>	45
[0508]	<211>	114
[0509]	<212>	PRT
[0510]	<213>	人工序列
[0511]	<220>	
[0512]	<223>	AP17R1-2H2-Z1-R1-14F3的全长序列
[0513]	<400>	45
[0514]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly	
[0515]	1 5 10 15	
[0516]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Asp Ser Ile Asp Ser Leu Val	
[0517]	20 25 30	
[0518]	Asn Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val	
[0519]	35 40 45	
[0520]	Ala Leu Ile Ala Trp Tyr Ile Thr His Tyr Ala Asp Phe Val Lys Gly	
[0521]	50 55 60	
[0522]	Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln	
[0523]	65 70 75 80	
[0524]	Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala	
[0525]	85 90 95	
[0526]	Arg Asn Ile Ile Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val	
[0527]	100 105 110	
[0528]	Ser Ser	
[0529]	<210>	46
[0530]	<211>	114
[0531]	<212>	PRT
[0532]	<213>	人工序列
[0533]	<220>	
[0534]	<223>	AP17R1-2H2-Z1-R1-27A2的全长序列
[0535]	<400>	46
[0536]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly	
[0537]	1 5 10 15	
[0538]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Asp Ser Ile Asp Ser Leu Val	
[0539]	20 25 30	
[0540]	Asn Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val	
[0541]	35 40 45	
[0542]	Ala Leu Ile Ala Asn Tyr Ile Thr His Tyr Ala Asp Phe Val Lys Gly	
[0543]	50 55 60	
[0544]	Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln	
[0545]	65 70 75 80	

[0546]	Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala
[0547]	85 90 95
[0548]	Arg Ser Ile Ile Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
[0549]	100 105 110
[0550]	Ser Ser
[0551]	<210> 47
[0552]	<211> 114
[0553]	<212> PRT
[0554]	<213> 人工序列
[0555]	<220>
[0556]	<223> AP17R1-2H2-Z1-R1-29B2的全长序列
[0557]	<400> 47
[0558]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
[0559]	1 5 10 15
[0560]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Asp Ser Ile Asp Ser Leu Val
[0561]	20 25 30
[0562]	Asn Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
[0563]	35 40 45
[0564]	Ala Leu Ile Ala Asn Tyr Ile Thr His Tyr Ala Asp Phe Val Lys Gly
[0565]	50 55 60
[0566]	Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
[0567]	65 70 75 80
[0568]	Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala
[0569]	85 90 95
[0570]	Arg Asn Ile Arg Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
[0571]	100 105 110
[0572]	Ser Ser
[0573]	<210> 48
[0574]	<211> 114
[0575]	<212> PRT
[0576]	<213> 人工序列
[0577]	<220>
[0578]	<223> AP17R1-2H2-Z1-R1-29B6的全长序列
[0579]	<400> 48
[0580]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
[0581]	1 5 10 15
[0582]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Asp Ser Ile Asp Ser Leu Val
[0583]	20 25 30
[0584]	Asn Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val

[0585]	35	40	45
[0586]	Ala Leu Ile Ala Asn Tyr Ile Thr His Tyr Ala Asp Phe Val Lys Gly		
[0587]	50	55	60
[0588]	Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln		
[0589]	65	70	75
[0590]	Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala		
[0591]	85	90	95
[0592]	Arg Asn Ile Tyr Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val		
[0593]	100	105	110
[0594]	Ser Ser		
[0595]	<210> 49		
[0596]	<211> 114		
[0597]	<212> PRT		
[0598]	<213> 人工序列		
[0599]	<220>		
[0600]	<223> AP17R1-2H2-Z1-R1-30D3的全长序列		
[0601]	<400> 49		
[0602]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly		
[0603]	1	5	10
[0604]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Asp Ser Ile Asp Ser Leu Val		
[0605]	20	25	30
[0606]	Asn Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val		
[0607]	35	40	45
[0608]	Ala Leu Ile Ala Asn Tyr Ile Thr His Tyr Ala Asp Phe Val Lys Gly		
[0609]	50	55	60
[0610]	Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln		
[0611]	65	70	75
[0612]	Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Tyr Ala		
[0613]	85	90	95
[0614]	Arg Asn Ile Ile Glu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val		
[0615]	100	105	110
[0616]	Ser Ser		
[0617]	<210> 50		
[0618]	<211> 342		
[0619]	<212> DNA		
[0620]	<213> 人工序列		
[0621]	<220>		
[0622]	<223> 编码AP17R1-2H2的核苷酸序列		
[0623]	<400> 50		

- [0624] caggtgcagc tcgtggagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctgggggggtc tctgagactc 60
[0625] tcctgtgcag cctctgatag catcgacagt ttggttaata tggggtggta ccgccaggct 120
[0626] ccagggaagc agcgcgagtt ggtcgcactt attgctaatt atatcacgca ctatgcggac 180
[0627] ttcgtgaagg gccgattcac catctccaga gacgccgcca agaacacggg aaatctgcaa 240
[0628] atgagcagcc tgaagccaga ggacacggcc gtctattact gttatgccag gaatattatt 300
[0629] gtagactact ggggccaggg gaccaggtc accgtctcct ca 342
[0630] <210> 51
[0631] <211> 342
[0632] <212> DNA
[0633] <213> 人工序列
[0634] <220>
[0635] <223> 编码AP17R1-2H2-Z1的核苷酸序列
[0636] <400> 51
[0637] caagttcagc tgggtgaaag cgggtggtggt gtggtgcagc cgggtggttc tttacgtctg 60
[0638] agctgtgccg caagcgacag cattgattct ttagtgaaca tgggctggta tcgccaagct 120
[0639] ccgggtaaac agcgcgaact ggtggcttta attgccaaact acatcaccca ctacccgat 180
[0640] ttcgtgaaag gtcgcttcac catcagccgc gacaacagca aaaacacttt atatctgcag 240
[0641] atgaattctt tacgcgccga agataccgcc gtgtattact gctatgcacg caacatcatc 300
[0642] gtggattatt ggggtcaagg tacttttagtg accgtgagca gc 342
[0643] <210> 52
[0644] <211> 342
[0645] <212> DNA
[0646] <213> 人工序列
[0647] <220>
[0648] <223> 编码AP17R1-2H2-Z1-R1-4B2的核苷酸序列
[0649] <400> 52
[0650] caagttcagc tgggtgaaag cgggtggtggt gtggtgcagc cgggtggttc tttacgtctg 60
[0651] agctgtgccg caagcgacag catttcgtct ttagtgaaca tgggctggta tcgccaagct 120
[0652] ccgggtaaac agcgcgaact ggtggcttta attgccaaact acatcaccca ctacccgat 180
[0653] ttcgtgaaag gtcgcttcac catcagccgc gacaacagca aaaacacttt atatctgcag 240
[0654] atgaattctt tacgcgccga agataccgcc gtgtattact gctatgcacg caacatcatc 300
[0655] gtggattatt ggggtcaagg tacttttagtg accgtgagca gc 342
[0656] <210> 53
[0657] <211> 342
[0658] <212> DNA
[0659] <213> 人工序列
[0660] <220>
[0661] <223> 编码AP17R1-2H2-Z1-R1-4D8的核苷酸序列
[0662] <400> 53

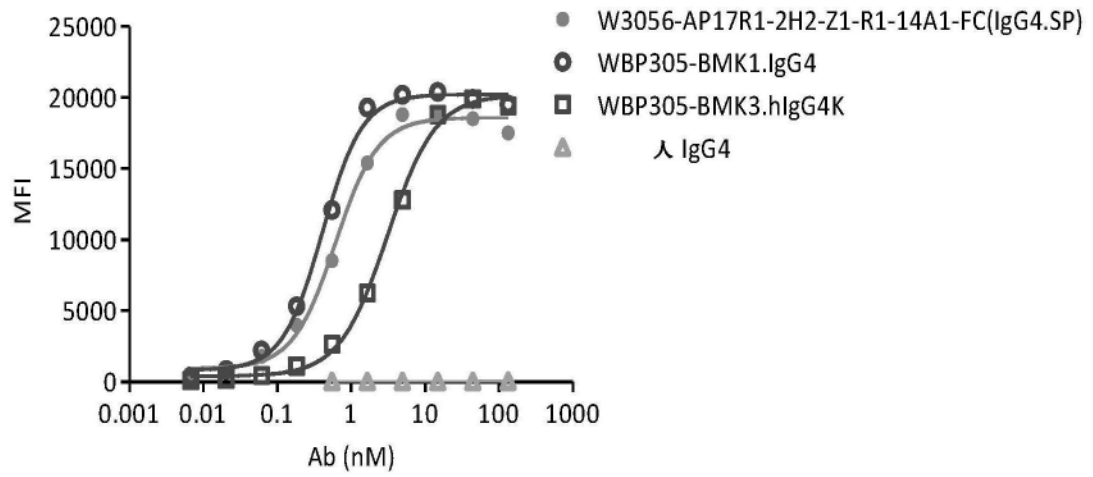
- [0663] caagttcagc tgggtgaaag cgggtggtggt gtggtgcagc cgggtggttc tttacgtctg 60
[0664] agctgtgccg caagcgacag cattcagtct ttagtgaaca tgggctggta tcgccaagct 120
[0665] ccgggtaaac agcgcgaact ggtggcttta attgccaaact acatcaccca ctacgccgat 180
[0666] ttcgtgaaag gtcgcttcac catcagccgc gacaacagca aaaacacttt atatctgcag 240
[0667] atgaattctt tacgcgccga agataccgcc gtgtattact gctatgcacg caacatcatc 300
[0668] gtggattatt ggggtcaagg tacttttagtg accgtgagca gc 342
[0669] <210> 54
[0670] <211> 342
[0671] <212> DNA
[0672] <213> 人工序列
[0673] <220>
[0674] <223> 编码AP17R1-2H2-Z1-R1-6E1的核苷酸序列
[0675] <400> 54
[0676] caagttcagc tgggtgaaag cgggtggtggt gtggtgcagc cgggtggttc tttacgtctg 60
[0677] agctgtgccg caagcgacag cattgattct atggtgaaca tgggctggta tcgccaagct 120
[0678] ccgggtaaac agcgcgaact ggtggcttta attgccaaact acatcaccca ctacgccgat 180
[0679] ttcgtgaaag gtcgcttcac catcagccgc gacaacagca aaaacacttt atatctgcag 240
[0680] atgaattctt tacgcgccga agataccgcc gtgtattact gctatgcacg caacatcatc 300
[0681] gtggattatt ggggtcaagg tacttttagtg accgtgagca gc 342
[0682] <210> 55
[0683] <211> 342
[0684] <212> DNA
[0685] <213> 人工序列
[0686] <220>
[0687] <223> 编码AP17R1-2H2-Z1-R1-14A1的核苷酸序列
[0688] <400> 55
[0689] caagttcagc tgggtgaaag cgggtggtggt gtggtgcagc cgggtggttc tttacgtctg 60
[0690] agctgtgccg caagcgacag cattgattct ttagtgaaca tgggctggta tcgccaagct 120
[0691] ccgggtaaac agcgcgaact ggtggcttta attgccacct acatcaccca ctacgccgat 180
[0692] ttcgtgaaag gtcgcttcac catcagccgc gacaacagca aaaacacttt atatctgcag 240
[0693] atgaattctt tacgcgccga agataccgcc gtgtattact gctatgcacg caacatcatc 300
[0694] gtggattatt ggggtcaagg tacttttagtg accgtgagca gc 342
[0695] <210> 56
[0696] <211> 342
[0697] <212> DNA
[0698] <213> 人工序列
[0699] <220>
[0700] <223> 编码AP17R1-2H2-Z1-R1-14F1的核苷酸序列
[0701] <400> 56

[0702] caagttcagc tgggtgaaag cgggtggtggt gtggtgcagc cgggtggttc tttacgtctg 60
[0703] agctgtgccg caagcgacag cattgattct ttagtgaaca tgggctggta tcgccaagct 120
[0704] ccgggtaaac agcgcgaact ggtggcttta attgcctact acatcaccca ctacccgat 180
[0705] ttcgtgaaag gtcgcttcac catcagccgc gacaacagca aaaacacttt atatctgcag 240
[0706] atgaattctt tacgcgccga agataccgcc gtgtattact gctatgcacg caacatcatc 300
[0707] gtggattatt ggggtcaagg tacttttagtg accgtgagca gc 342
[0708] <210> 57
[0709] <211> 342
[0710] <212> DNA
[0711] <213> 人工序列
[0712] <220>
[0713] <223> 编码AP17R1-2H2-Z1-R1-14B3的核苷酸序列
[0714] <400> 57
[0715] caagttcagc tgggtgaaag cgggtggtggt gtggtgcagc cgggtggttc tttacgtctg 60
[0716] agctgtgccg caagcgacag cattgattct ttagtgaaca tgggctggta tcgccaagct 120
[0717] ccgggtaaac agcgcgaact ggtggcttta attgcccgt acatcaccca ctacccgat 180
[0718] ttcgtgaaag gtcgcttcac catcagccgc gacaacagca aaaacacttt atatctgcag 240
[0719] atgaattctt tacgcgccga agataccgcc gtgtattact gctatgcacg caacatcatc 300
[0720] gtggattatt ggggtcaagg tacttttagtg accgtgagca gc 342
[0721] <210> 58
[0722] <211> 342
[0723] <212> DNA
[0724] <213> 人工序列
[0725] <220>
[0726] <223> 编码AP17R1-2H2-Z1-R1-14F3的核苷酸序列
[0727] <400> 58
[0728] caagttcagc tgggtgaaag cgggtggtggt gtggtgcagc cgggtggttc tttacgtctg 60
[0729] agctgtgccg caagcgacag cattgattct ttagtgaaca tgggctggta tcgccaagct 120
[0730] ccgggtaaac agcgcgaact ggtggcttta attgcctggt acatcaccca ctacccgat 180
[0731] ttcgtgaaag gtcgcttcac catcagccgc gacaacagca aaaacacttt atatctgcag 240
[0732] atgaattctt tacgcgccga agataccgcc gtgtattact gctatgcacg caacatcatc 300
[0733] gtggattatt ggggtcaagg tacttttagtg accgtgagca gc 342
[0734] <210> 59
[0735] <211> 342
[0736] <212> DNA
[0737] <213> 人工序列
[0738] <220>
[0739] <223> 编码AP17R1-2H2-Z1-R1-27A2的核苷酸序列
[0740] <400> 59

- [0741] caagttcagc tgggtgaaag cgggtggtggt gtggtgcagc cgggtggttc tttacgtctg 60
[0742] agctgtgccg caagcgacag cattgattct ttagtgaaca tgggctggta tcgccaagct 120
[0743] ccgggtaaac agcgcgaact ggtggcttta attgccaaact acatcaccca ctacgccgat 180
[0744] ttcgtgaaag gtcgcttcac catcagccgc gacaacagca aaaacacttt atatctgcag 240
[0745] atgaattctt tacgcgccga agataccgcc gtgtattact gctatgcacg ctccatcatc 300
[0746] gtggattatt ggggtcaagg tacttttagtg accgtgagca gc 342
[0747] <210> 60
[0748] <211> 342
[0749] <212> DNA
[0750] <213> 人工序列
[0751] <220>
[0752] <223> 编码AP17R1-2H2-Z1-R1-29B2的核苷酸序列
[0753] <400> 60
[0754] caagttcagc tgggtgaaag cgggtggtggt gtggtgcagc cgggtggttc tttacgtctg 60
[0755] agctgtgccg caagcgacag cattgattct ttagtgaaca tgggctggta tcgccaagct 120
[0756] ccgggtaaac agcgcgaact ggtggcttta attgccaaact acatcaccca ctacgccgat 180
[0757] ttcgtgaaag gtcgcttcac catcagccgc gacaacagca aaaacacttt atatctgcag 240
[0758] atgaattctt tacgcgccga agataccgcc gtgtattact gctatgcacg caacatccgc 300
[0759] gtggattatt ggggtcaagg tacttttagtg accgtgagca gc 342
[0760] <210> 61
[0761] <211> 342
[0762] <212> DNA
[0763] <213> 人工序列
[0764] <220>
[0765] <223> 编码AP17R1-2H2-Z1-R1-29B6的核苷酸序列
[0766] <400> 61
[0767] caagttcagc tgggtgaaag cgggtggtggt gtggtgcagc cgggtggttc tttacgtctg 60
[0768] agctgtgccg caagcgacag cattgattct ttagtgaaca tgggctggta tcgccaagct 120
[0769] ccgggtaaac agcgcgaact ggtggcttta attgccaaact acatcaccca ctacgccgat 180
[0770] ttcgtgaaag gtcgcttcac catcagccgc gacaacagca aaaacacttt atatctgcag 240
[0771] atgaattctt tacgcgccga agataccgcc gtgtattact gctatgcacg caacatctac 300
[0772] gtggattatt ggggtcaagg tacttttagtg accgtgagca gc 342
[0773] <210> 62
[0774] <211> 342
[0775] <212> DNA
[0776] <213> 人工序列
[0777] <220>
[0778] <223> 编码AP17R1-2H2-Z1-R1-30D3的核苷酸序列
[0779] <400> 62

[0780] caagttcagc tgggtgaaag cgggtggtggt gtggtgcagc cgggtggttc tttacgtctg 60
[0781] agctgtgccg caagcgacag cattgattct ttagtgaaca tgggctggta tcgccaagct 120
[0782] ccgggtaaac agcgcgaaact ggtggcttta attgccaact acatcaccca ctacgccgat 180
[0783] ttcgtgaaag gtcgcttcac catcagccgc gacaacagca aaaacacttt atatctgcag 240
[0784] atgaattctt tacgcgccga agataccgcc gtgtattact gctatgcacg caacatcatc 300
[0785] gaggattatt ggggtcaagg tacttttagtg accgtgagca gc 342

A.



B.

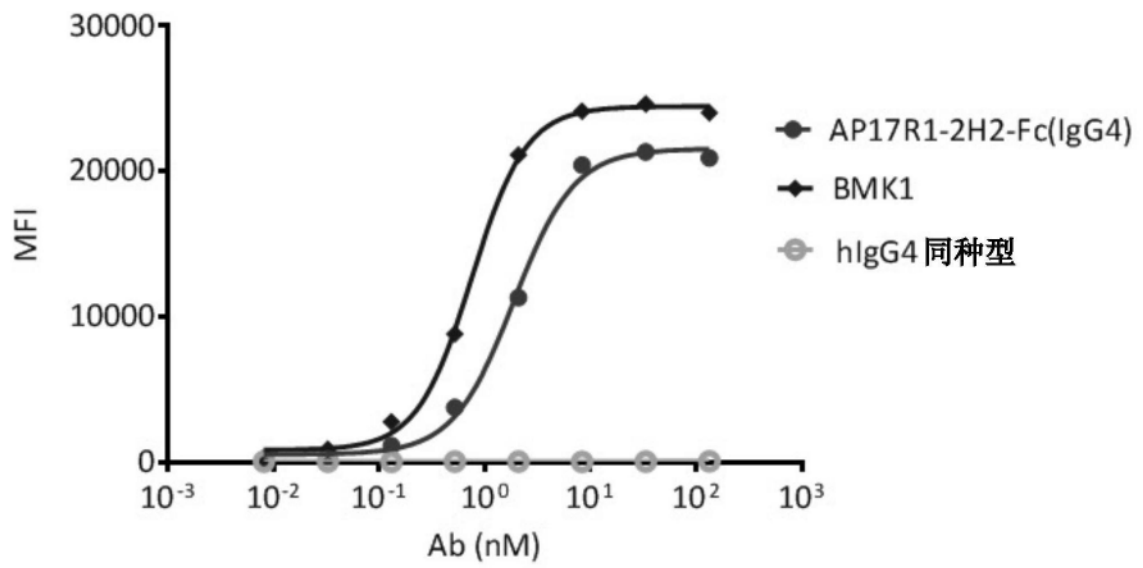
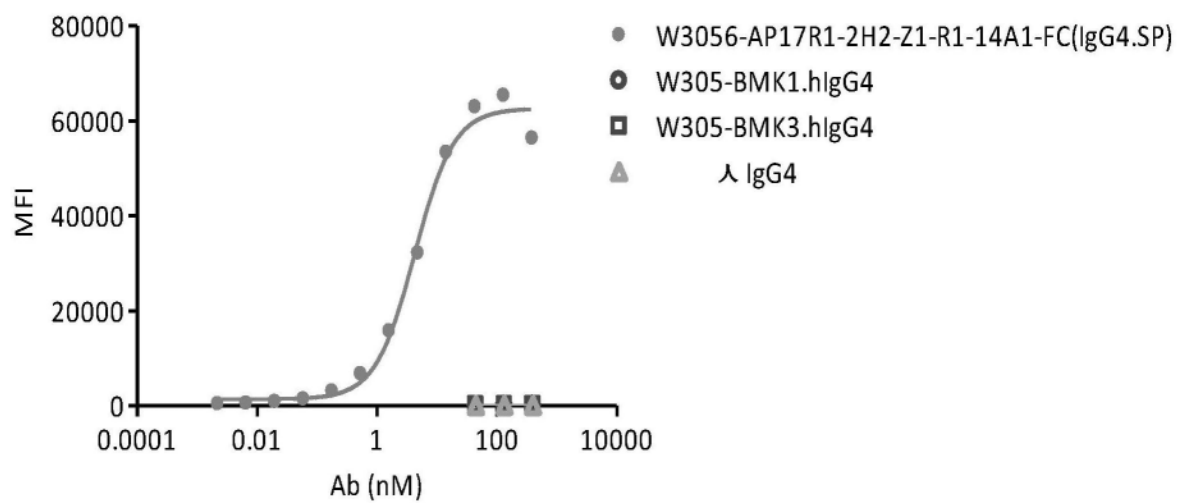


图1

A.



B.

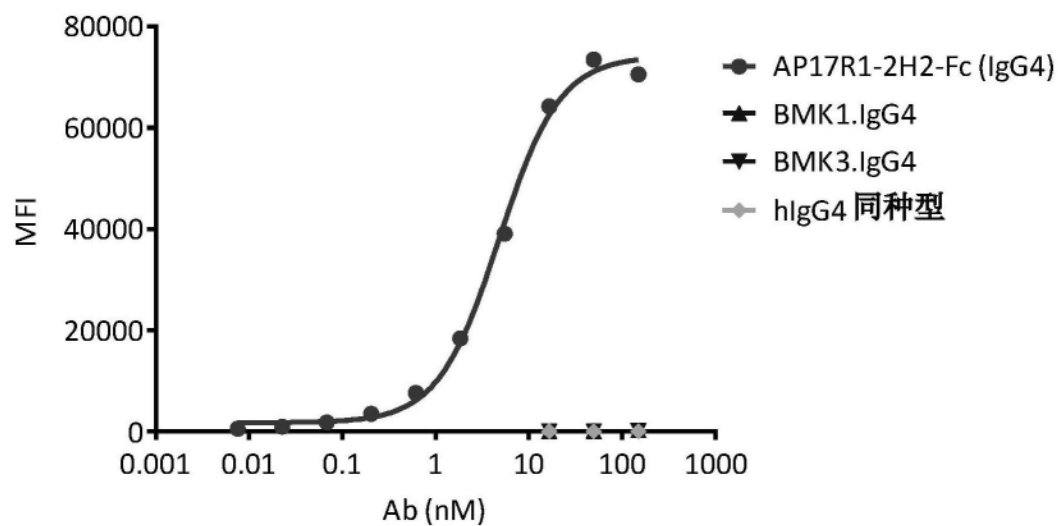
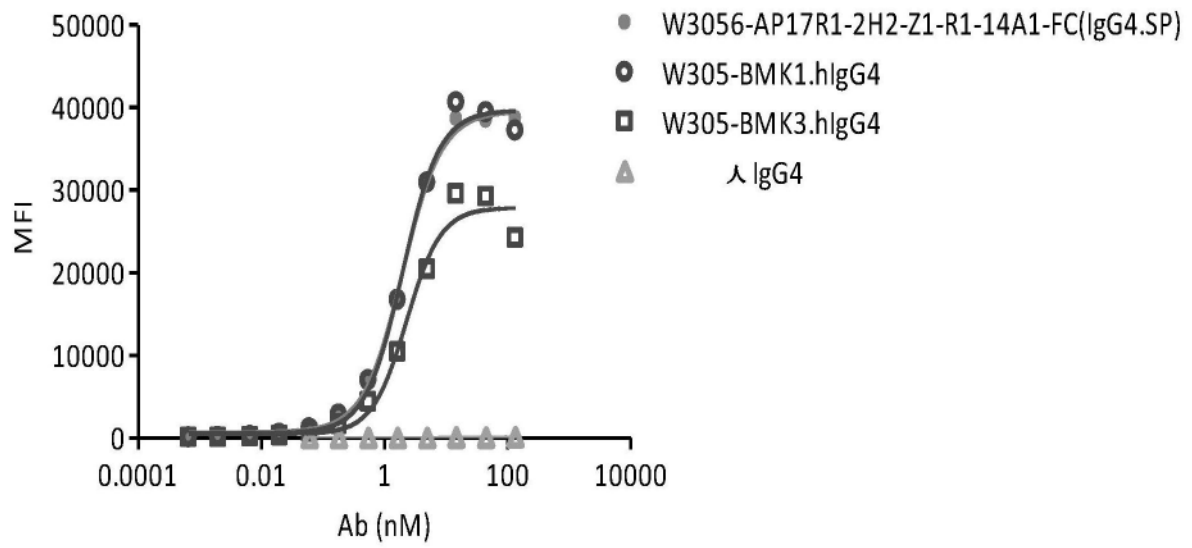


图2

A.



B.

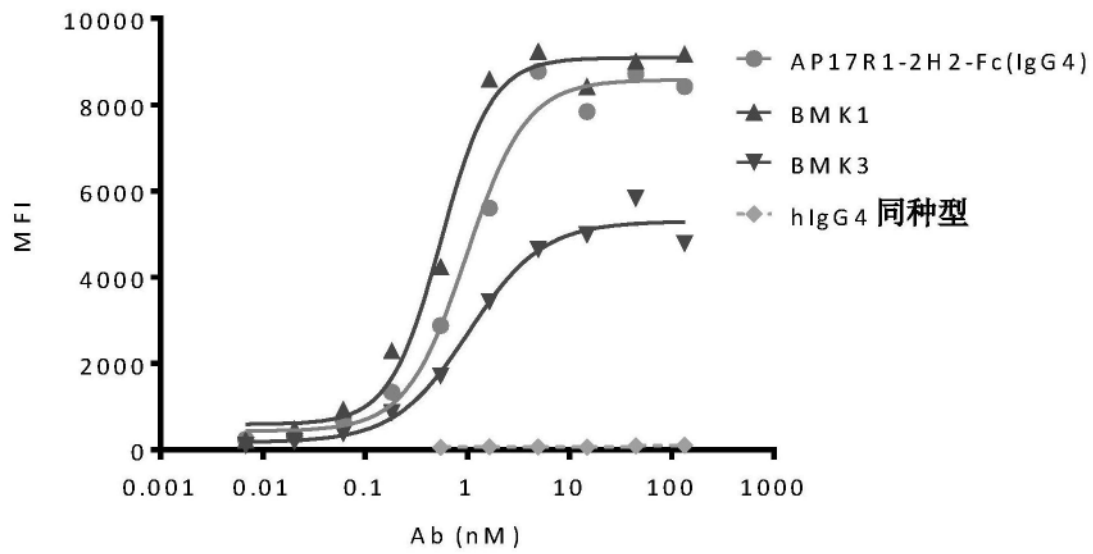
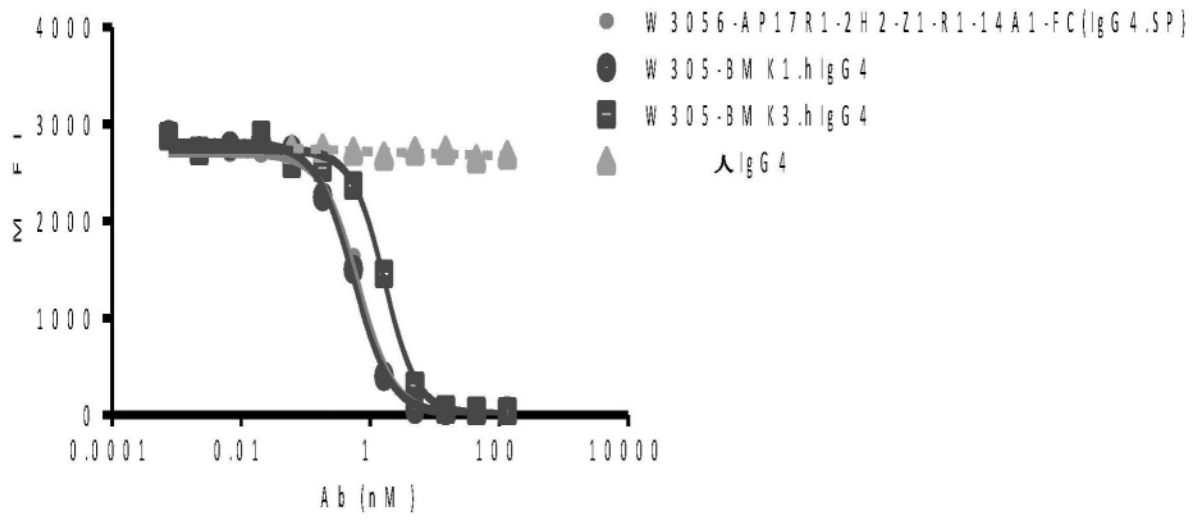


图3

A.



B.

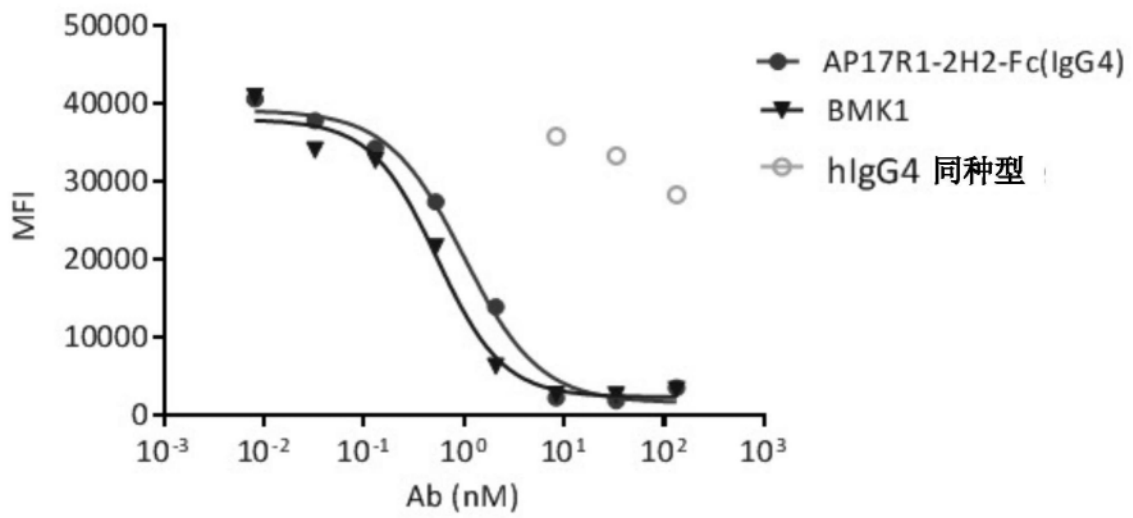
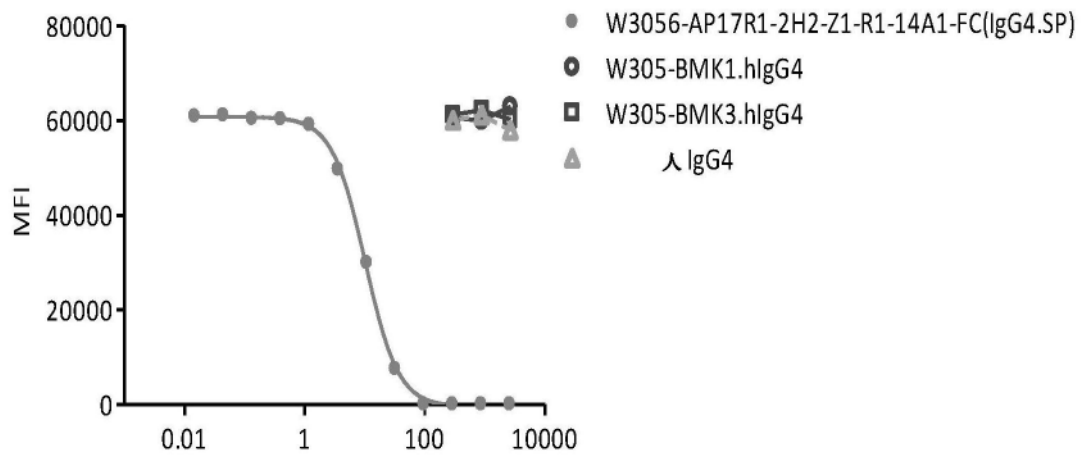


图4

A.



B.

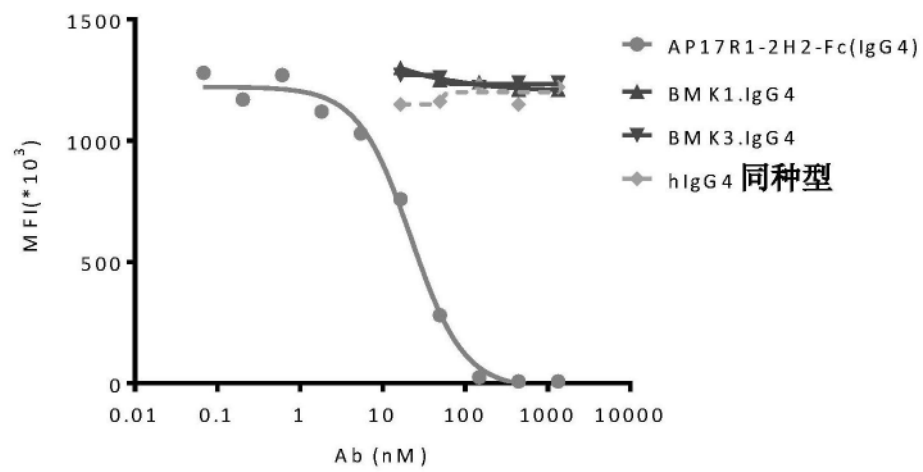
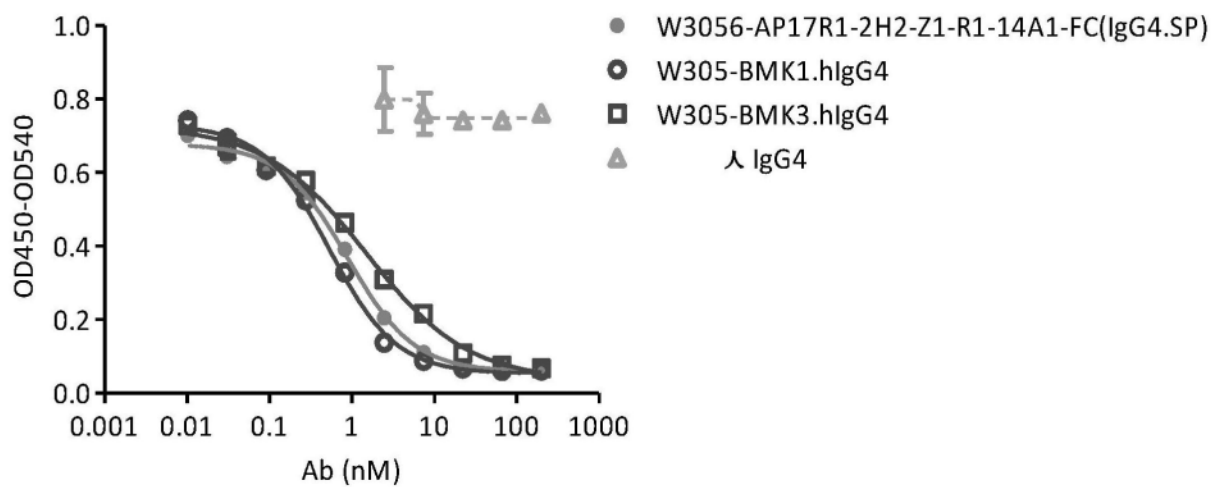


图5

A.



B.

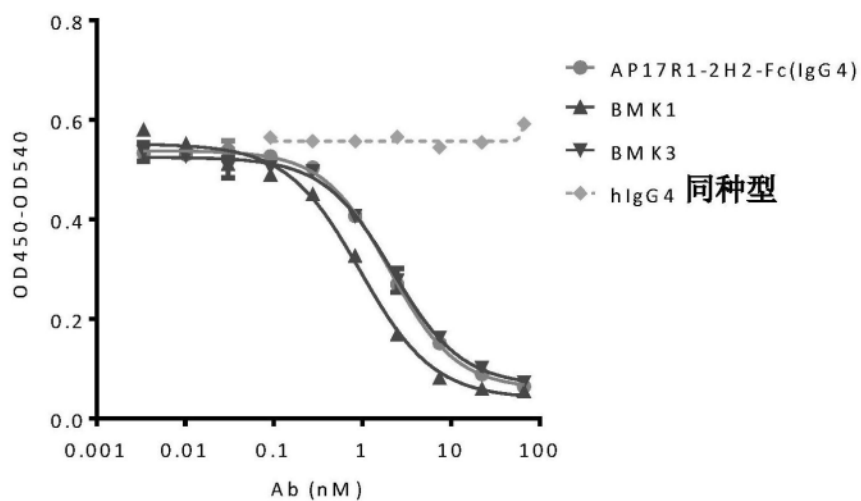
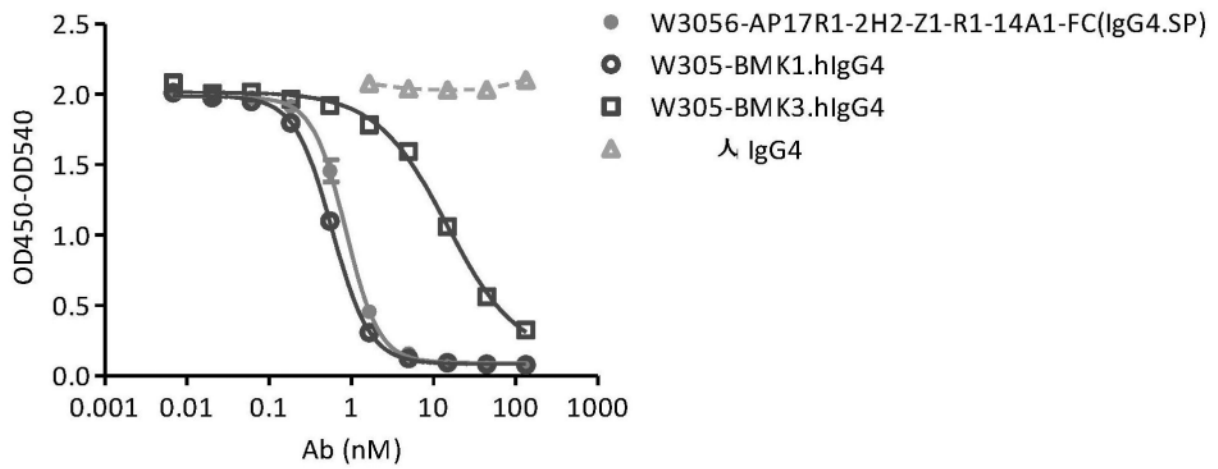


图6

A.



B.

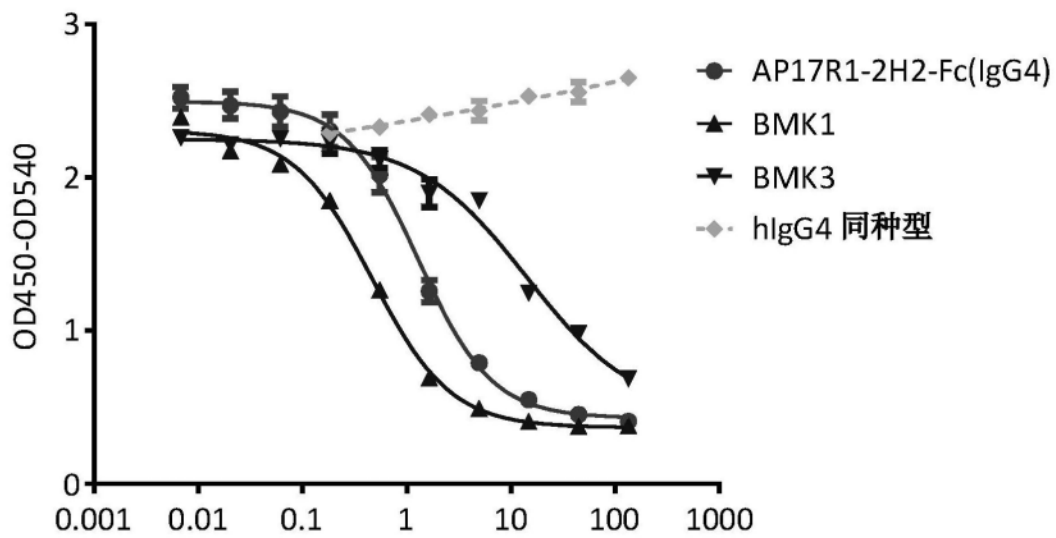
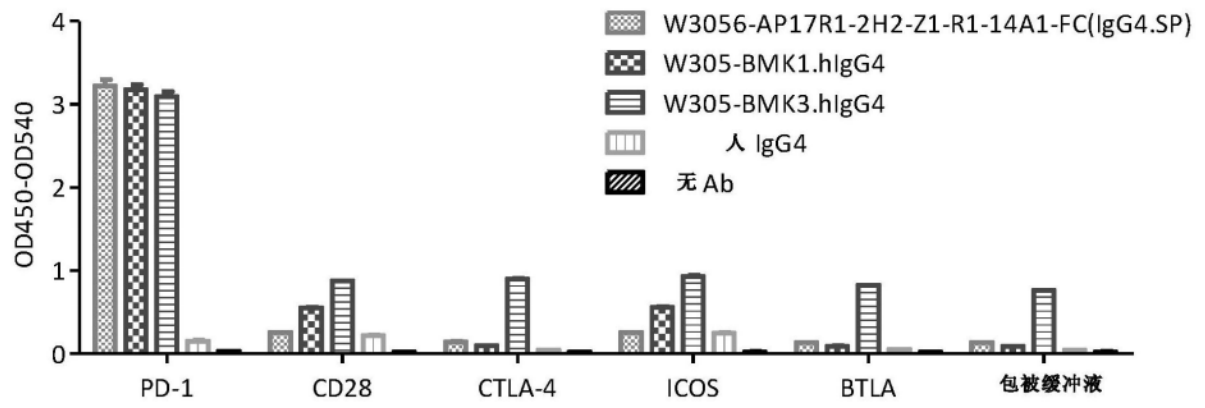


图7

A.



B.

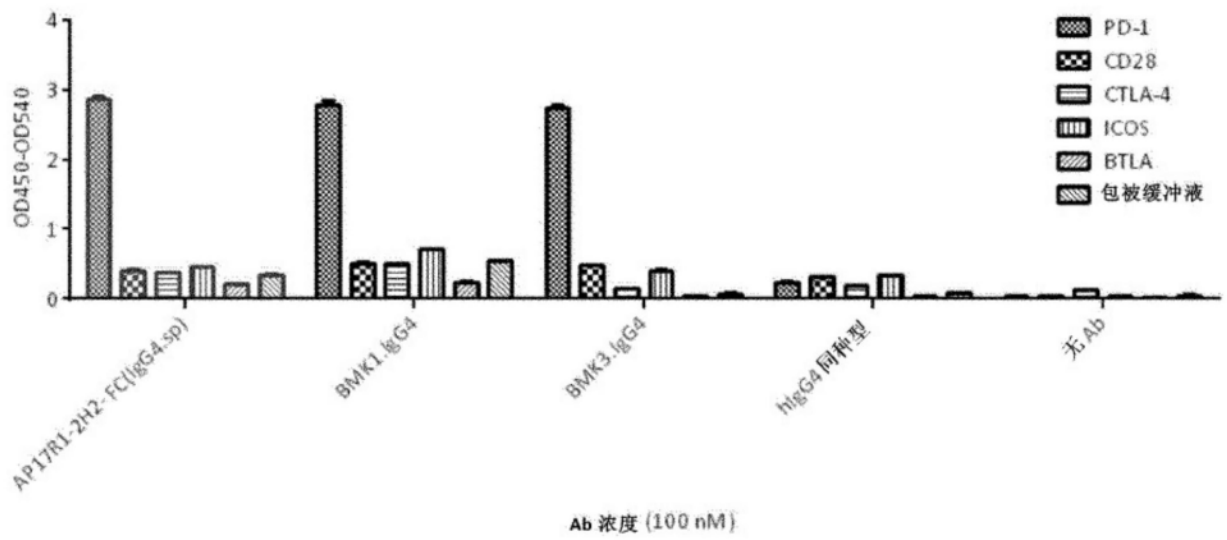
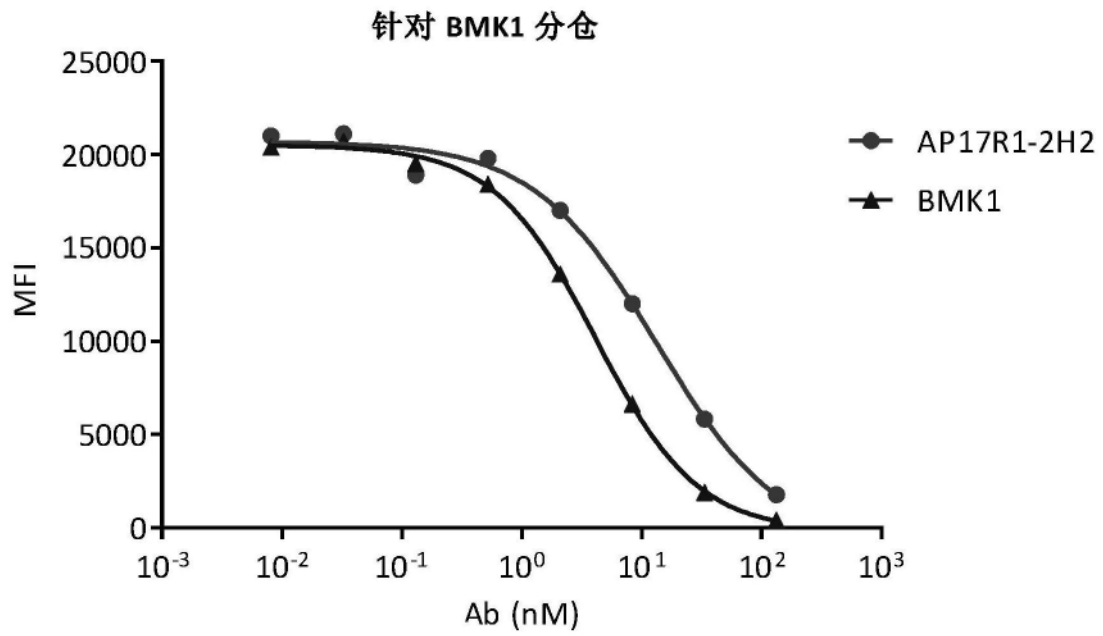


图8

A.



B.

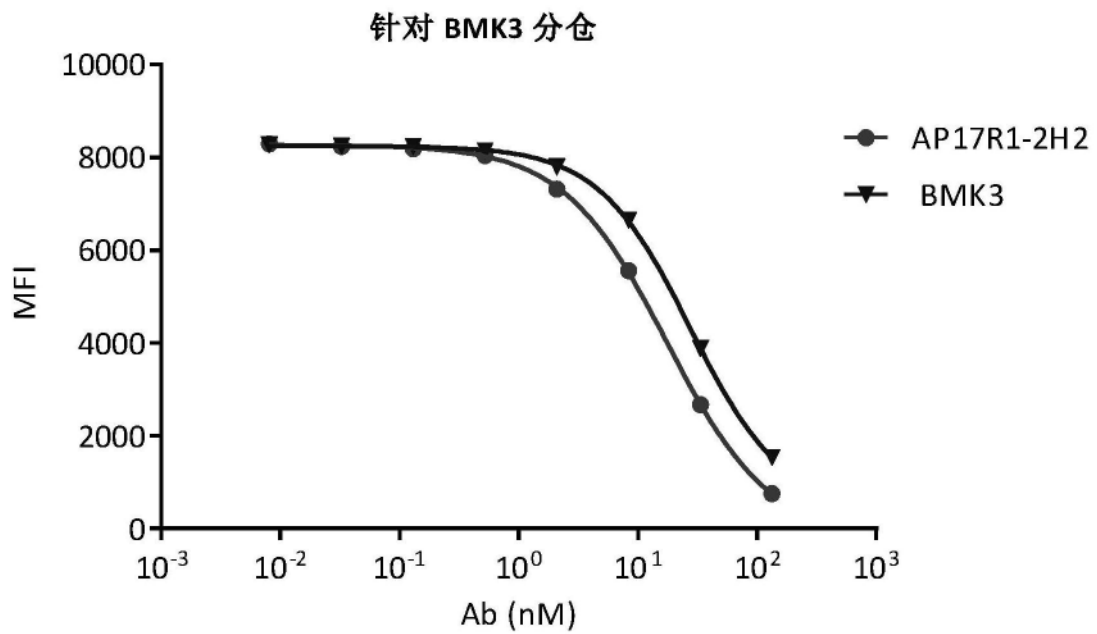
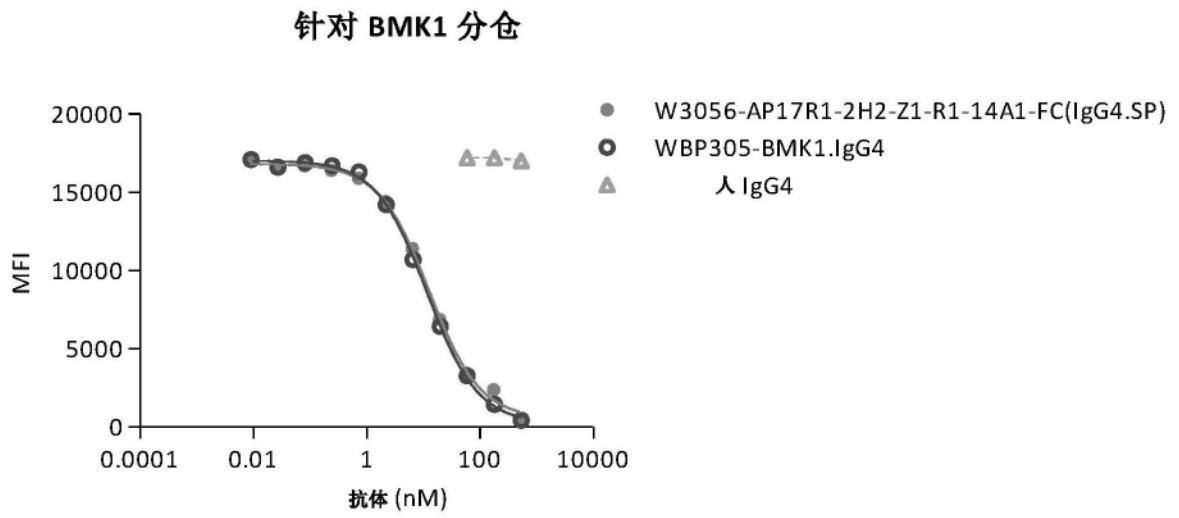


图9

C.



D.

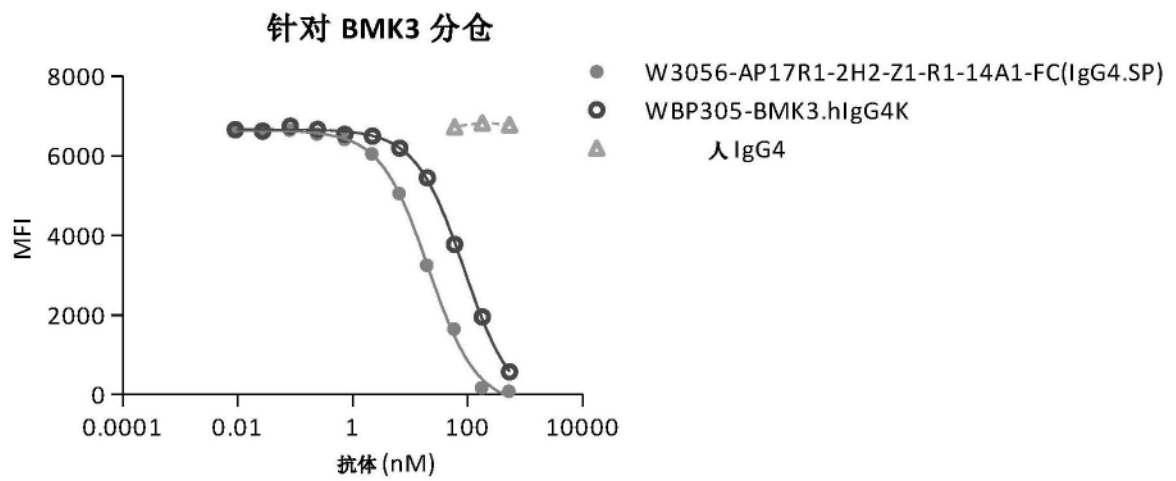


图9(续)

A. 人 IL-2 产生(Allo-MLR)

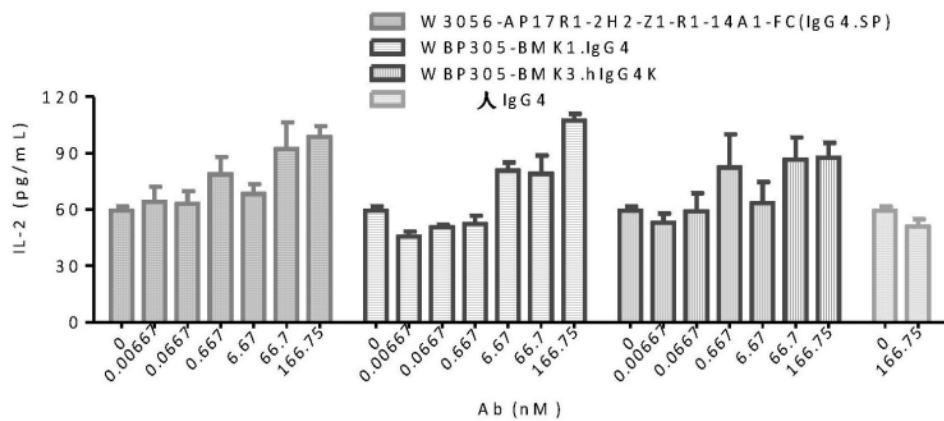
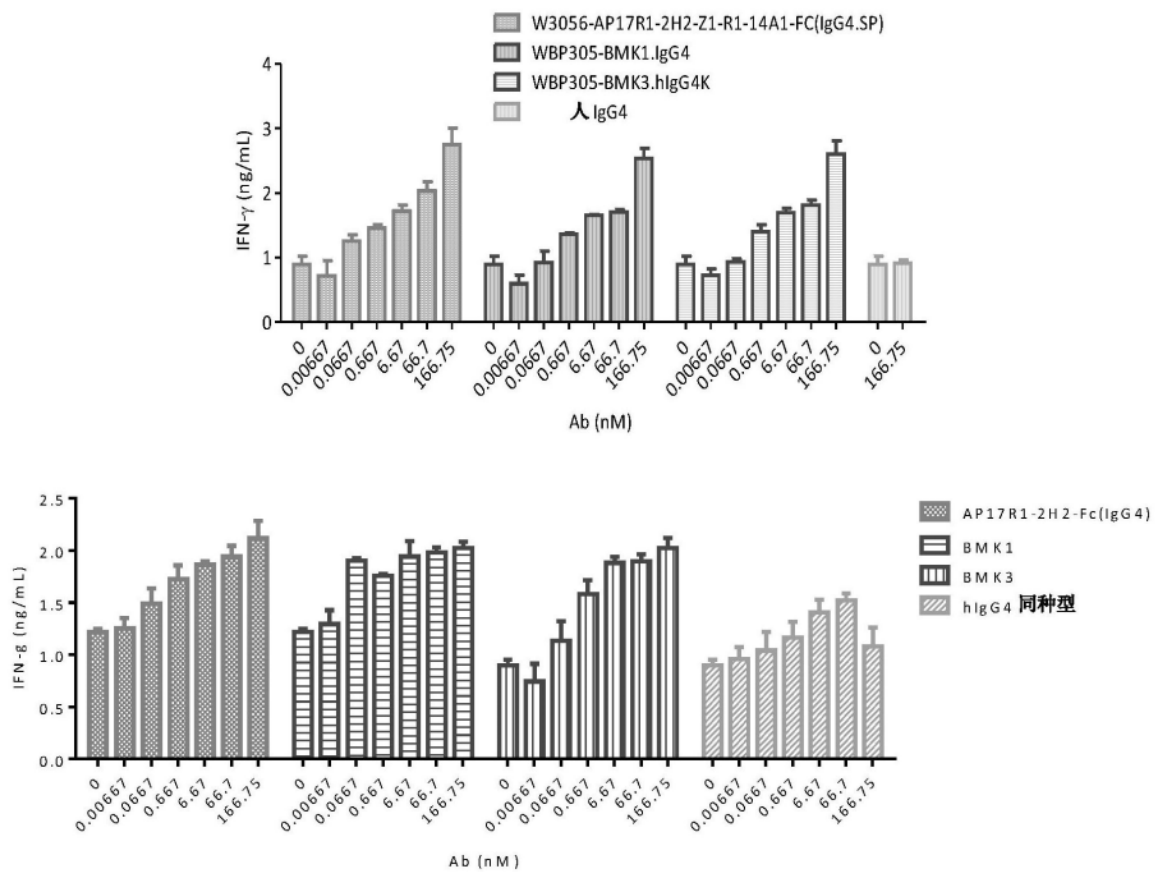
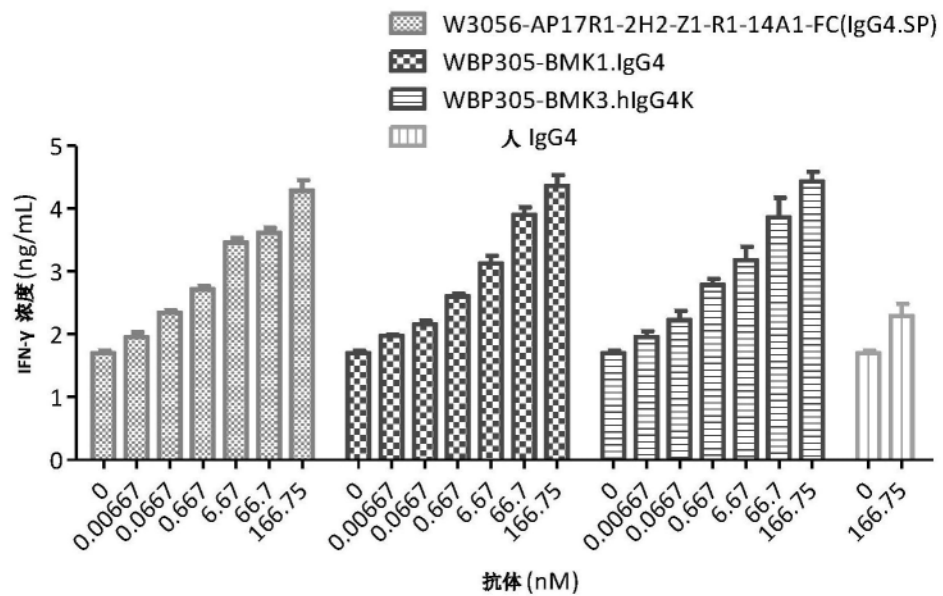
B. 人 IFN- γ 产生(Allo-MLR)

图10

A. 人 $IFN-\gamma$ 产生(Auto-MLR)

B. 人 T-细胞产生(Auto-MLR)

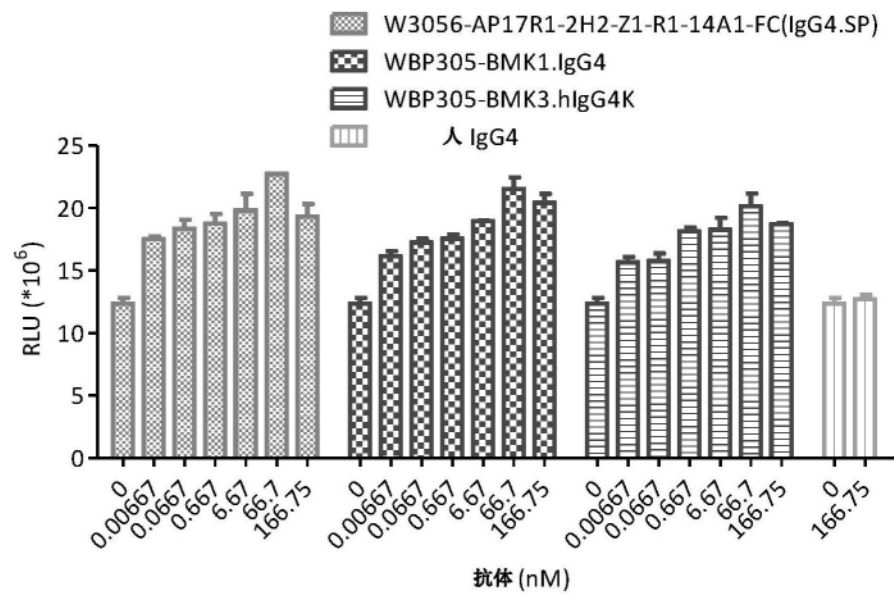
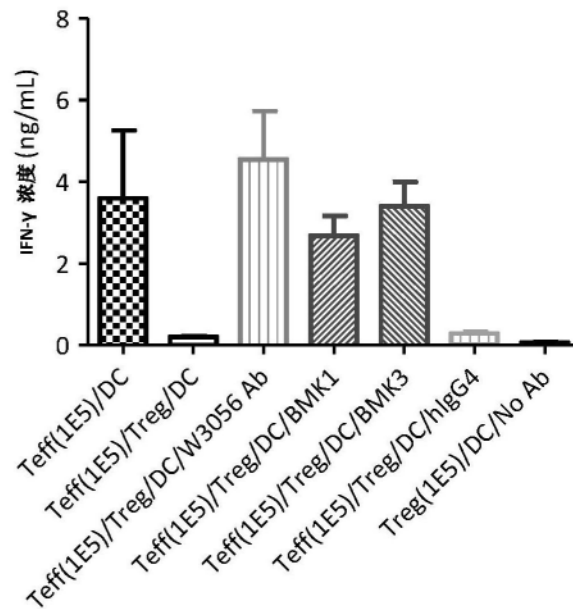


图11

A. 人 $IFN-\gamma$ 产生(Treg-MLR)

B. 人 T-细胞产生(Treg-MLR)

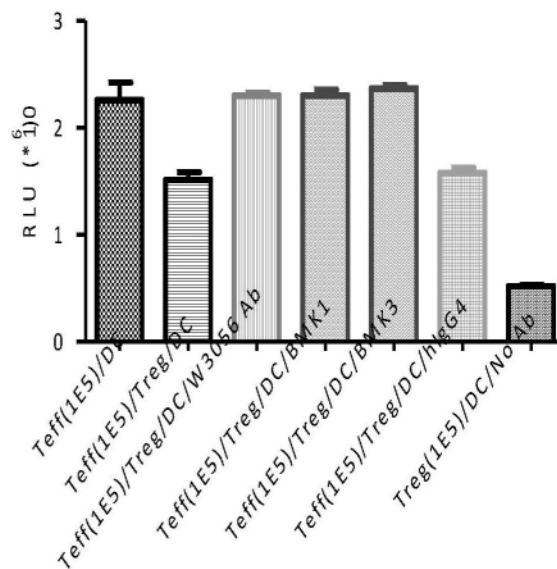


图12

ADCC 测定

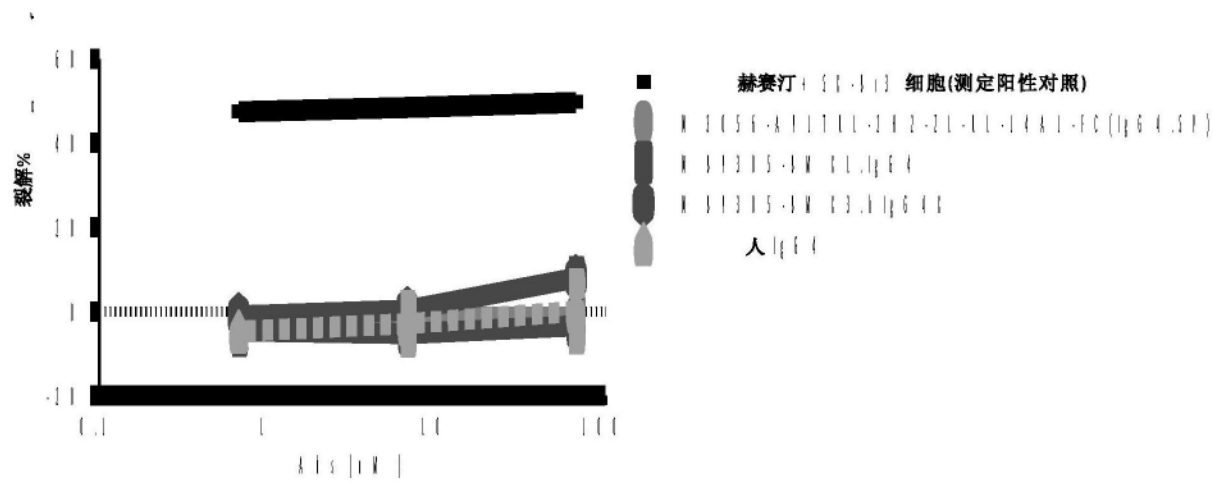
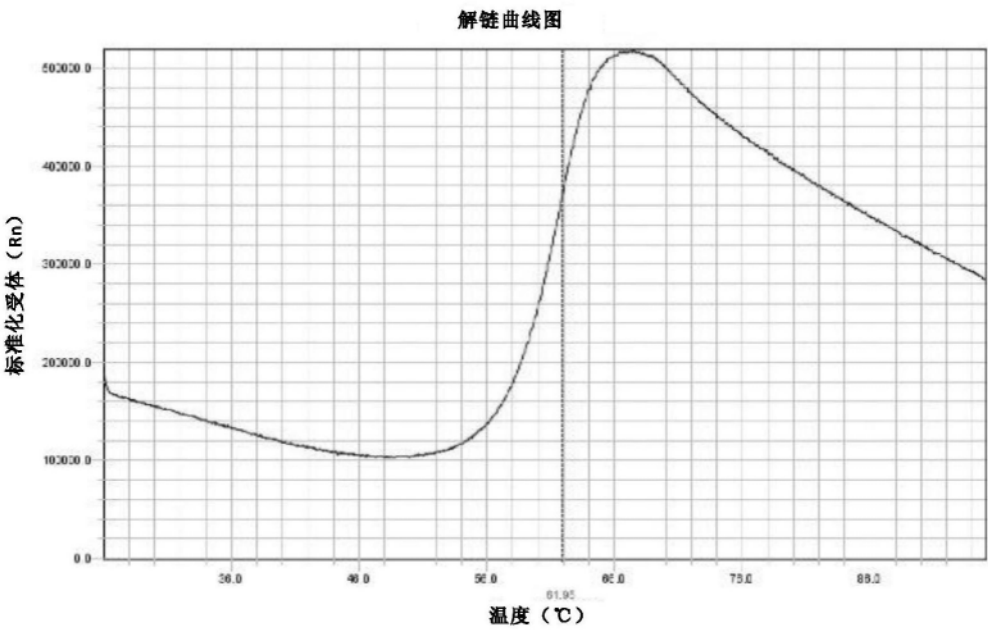


图13

A.



B.

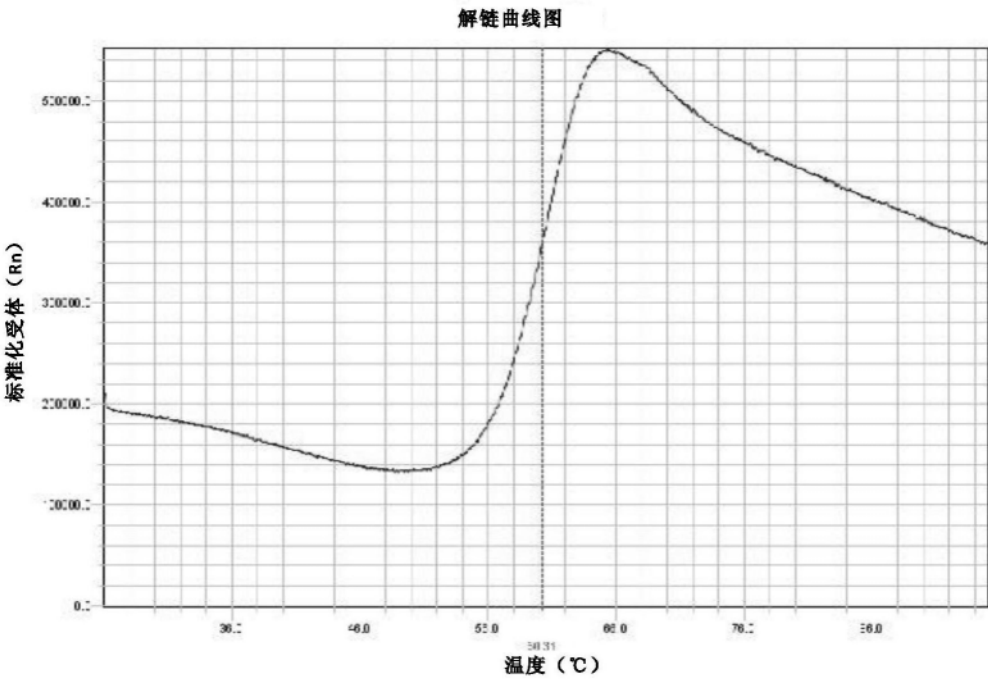


图14

血清稳定性测试

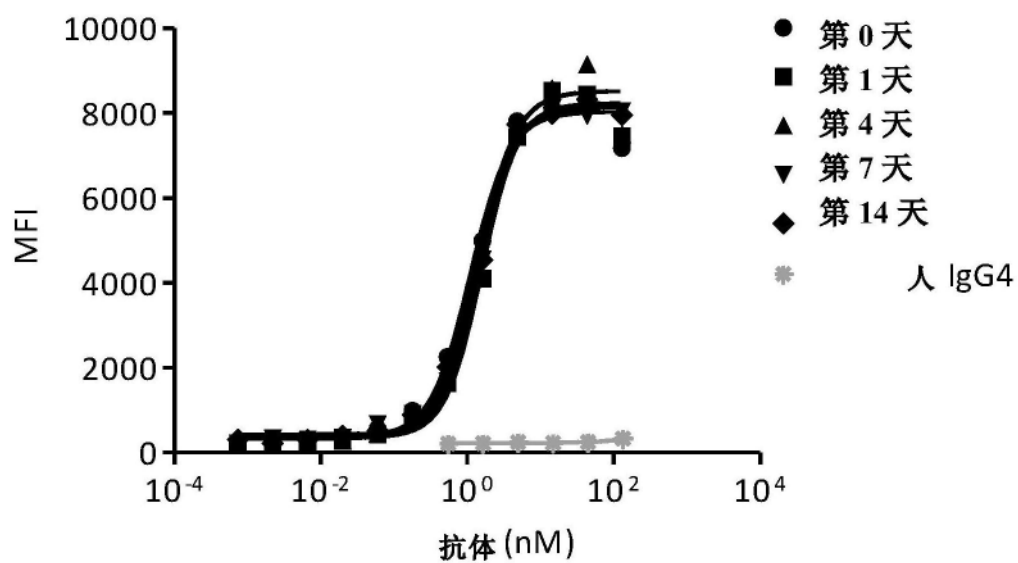


图15