



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107074947 B

(45) 授权公告日 2021.04.09

(21) 申请号 201580042199.7

(22) 申请日 2015.08.05

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107074947 A

(43) 申请公布日 2017.08.18

(30) 优先权数据
62/033,177 2014.08.05 US
62/053,366 2014.09.22 US
62/093,368 2014.12.17 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.02.06

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/IB2015/055943 2015.08.05

(87) PCT国际申请的公布数据
WO2016/020856 EN 2016.02.11

(73) 专利权人 马布奎斯特公司
地址 瑞士, 普利

(72) 发明人 G·潘塔莱奥 C·芬威克

(74) 专利代理机构 广州嘉权专利商标事务所有
限公司 44205
代理人 江侧燕

(51) Int.Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
A61P 37/02 (2006.01)
A61P 31/18 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)
G01N 33/569 (2006.01)

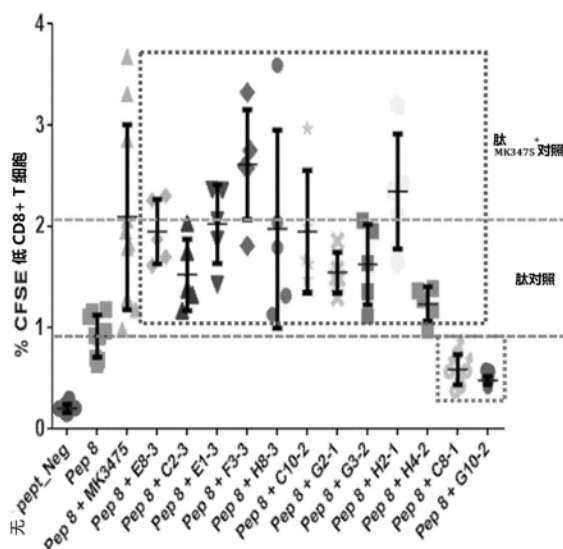
(56) 对比文件
CN 101899114 A, 2010.12.01
WO 2013126809 A1, 2013.08.29
审查员 刘婷

权利要求书1页 说明书26页 附图6页

(54) 发明名称
结合至PD-1的免疫试剂

(57) 摘要

本公开涉及对于程序性细胞死亡1 (PD-1) 具有特异性的结合剂, 并且涉及使用其治疗、预防和/或减轻传染病(例如, 人免疫缺陷病毒(HIV))、癌症和/或自身免疫的方法。



1. 一种结合人PD-1的抗体,其包括选自由下述组成的组的重链可变区VH和轻链可变区VL的组合:

包括分别如SEQ ID NOS: 17、40和63所示的互补决定区CDR1、CDR2和CDR3的VH;和,包括分别如SEQ ID NOS: 86、109和132所示的CDR1、CDR2和CDR3的VL;或

包括分别如SEQ ID NOS: 2、25和48所示的CDR1、CDR2和CDR3的VH;和,包括分别如SEQ ID NOS: 71、94和117所示的CDR1、CDR2和CDR3的VL。

2. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体是人抗体,犬抗体,鸡抗体,山羊抗体,小鼠抗体,猪抗体,大鼠抗体,Fab抗体,Fab₂抗体,或Fab'抗体。

3. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体是人IgG、人IgM、人IgA、人IgD、人IgE、犬IgGA、犬IgGB、犬IgGC、犬IgGD、鸡IgA、鸡IgD、鸡IgE、鸡IgG、鸡IgM、鸡IgY、山羊IgG或小鼠IgG。

4. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体是人IgG1、人IgG2、人IgG3、人IgG4、人IgA1、人IgA2、啮齿类IgG2a或啮齿类IgG2b。

5. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体是多价抗体。

6. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体是人源化抗体或犬化抗体。

7. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体是犬-人嵌合抗体或犬-小鼠嵌合抗体。

8. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体是包括犬Fc的抗体或CDR移植抗体。

9. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体是Fv单链抗体、单特异性抗体、双特异性抗体或三聚抗体。

10. 根据权利要求1所述的抗体,其中所述抗体是嵌合抗体。

11. 一种组合物,其包括权利要求1至10中任一项所述的抗体和药学上可接受的载体。

12. 一种组合物,其包括权利要求1至10中任一项所述的抗体,和至少一种对PD-1和PD-L1相互作用竞争的第二抗体。

13. 根据权利要求12所述的组合物,其中所述第二抗体包括:包括分别如SEQ ID NOS: 8、31和54所示的CDR1、CDR2和CDR3的VH;和,包括分别如SEQ ID NOS: 77、100和123所示的CDR1、CDR2和CDR3的VL,或

其中,所述第二抗体包括派母单抗。

14. 一种用于非治疗和/或诊断目的的结合细胞上的PD-1的方法,其包括将所述细胞与权利要求1至10中任一项所述的抗体接触。

15. 一种用于非治疗和/或诊断目的的结合细胞上的PD-1的方法,其包括将所述细胞与权利要求11所述的组合物,或与权利要求12或13所述的组合物接触。

16. 根据权利要求1至10中任一项所述的抗体,根据权利要求11所述的组合物,或根据权利要求12或13所述的组合物,在制备用于治疗哺乳动物中的疾病的药物中的用途,其中所述疾病选自由乳腺癌、结肠癌、胃癌、直肠癌、骨骼组织癌、皮肤癌、脑癌、肺癌、膀胱癌、肾癌、卵巢癌、肝癌和由人免疫缺陷病毒HIV引起的感染疾病组成的组。

17. 一种分离的多核苷酸,其编码根据权利要求1至10中任一项所述的抗体。

18. 一种表达载体,包括编码根据权利要求1至10中任一项所述的抗体的多核苷酸。

19. 一种宿主细胞,包括表达载体,所述表达载体包括编码根据权利要求1至10中任一项所述的抗体的多核苷酸。

结合至PD-1的免疫试剂

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2014年8月5日提交的美国系列号62/033,177、2014年9月22日提交的美国系列号62/053,366和2014年12月17日提交的美国系列号62/093,368的优先权,其每一篇以它们整体通过引用并入本公开。

技术领域

[0003] 本公开涉及对于程序性细胞死亡1 (PD-1) (例如,人PD-1) 具有特异性的结合剂和使用其治疗和/或预防感染(例如,被人免疫缺陷病毒(HIV)感染)、癌症和/或自身免疫(autoimmunity)的方法。

背景技术

[0004] 随着我们进入HIV流行的第四个十年,对于HIV发病机理的理解和开发出有效和安全的抗病毒药物已经取得了显著的进展。已经注册了超过30种抗病毒药物并且组合抗逆转录病毒疗法(ART)对于发病率和死亡率的影响已经是卓越的。但是,尽管以对ART的最佳坚持在患者中实现了HIV复制的长期抑制,但是HIV不可避免地在中断疗法之后出现反弹。此外,成功的疗法不诱导或使得恢复/发展病毒特异性免疫应答,该应答能够在没有ART的情况下控制HIV复制。因此,大部分HIV感染受试者需要终生ART,以控制HIV复制和相关的疾病。

[0005] 在血液中已经鉴定了潜在地被HIV感染的一群长期存活的中心记忆CD4T-细胞为HIV细胞库的重要组分和作为HIV持久性的主要原因。在存在以ART的充分HIV抑制的情况下该潜伏细胞库的寿命评估为约70年。但是,最近的研究已经表明存在于淋巴结中的两群CD4T-细胞用作HIV感染、复制和产生的主要CD4T-细胞区域。这两个CD4T-细胞群的特点在于表达PD-1和CXCR5并且包括PD-1+CXCR5+,即滤泡辅助性T细胞(T follicular helper cells) (Tfh) 和PD-1+CXCR5-CD4T-细胞群。

[0006] 已经提出了负责建立和维持HIV潜伏的细胞库的许多机制。一种机制是在可补充HIV细胞库的ART下持续的最小病毒复制。所以,ART不能诱导充分抑制HIV复制并且在ART下的“自然”HIV-1特异性免疫应答也不能完全抑制和消除持续进行的残留病毒复制。ART和HIV特异性免疫应答的失败提供了研究可选的干预以同样靶向持续的HIV细胞库的基本原理。

[0007] 过去已经研究了许多免疫学干预并且目前正被进一步开发,目标是实现HIV功能治愈,其中病毒复制被抑制,而不用持续的抗病毒疗法(9)。治疗性疫苗策略已经成为研究的主要的干预策略,但是结果已经显示出在实验动物模型和患者中的适度效力,除了基于CMV的载体HIV疫苗(在NHP模型中50%的效力;10)。最近的研究已经对于使用抗包膜广泛中和抗体(anti-envelope broad neutralizing antibodies) (bNabs) 作为HIV感染中治疗剂的可能性产生了有趣的结果(11,12)。此外,拮抗物PD-1Abs已经显示在HIV感染患者中恢复T-细胞功能并且已经提出了使用这些Abs作为治疗性策略,以加强HIV特异性T-细胞应答效

力的可能性(13,14)。

[0008] 非常确定的是浸润肿瘤特异性CD8T-细胞就增生和介导细胞毒素活性的能力而言,它们是功能失调的。大部分浸润肿瘤特异性CD8T-细胞处在所谓的衰竭功能状态。负责浸润肿瘤特异性CD8T-细胞衰竭的主要机制是许多调节受体和尤其PD-1调节受体增加的表达。PD-1/PDL-1/2 (PD-1配体)的阻断与CD8T-细胞从衰竭的恢复相关的观察已经提供了用于开发靶向衰竭的CD8T-细胞表达的PD-1分子的干预策略的基本原理。最近的研究使用具有拮抗物活性的PD-1抗体已经在患有晚期癌症相关疾病的患者中显示出了非常有希望的结果。研究已经显示在患有晚期黑素瘤、非小细胞肺癌和肾癌的患者中大量比例的应答,范围从18至40%。在这些研究中,抗PD-1抗体已经被单独使用或结合抗CTL-A4抗体使用。在这些初始研究之后,目前的研究在患有包括血液学肿瘤的各种肿瘤的患者中进行。

[0009] 本领域需要靶向PD-1的另外试剂和使用其的方法。本公开通过提供可用于靶向PD-1和表达其的细胞和/或组织的试剂和方法解决了那些需要。

附图说明

[0010] 图1.A.小鼠PD-1.B.人PD-1。

[0011] 图2.CFSE试验,以评估抗PD1抗体对HIV特异性CD8T细胞的增殖的功能效果。

[0012] 图3.抗PD-1抗体对激活的CD4T-细胞上的细胞表面PD-1的浓度应答结合。

[0013] 图4.抗体类别。

[0014] 图5a-f.相对于对照的增殖(NEG和肽8)。

[0015] 图6a-b.在功能衰竭恢复试验中由结合不同的表位的抗PD-1抗体介导的HIV肽特异性CD8T-细胞增殖的恢复。

[0016] 图7.在功能衰竭恢复试验中由结合不同的PD-1表位的抗PD-1抗体的组合介导的HIV肽特异性CD8T-细胞增殖的增强恢复。

[0017] 图8.阻断PD-1和PD-L1的相互作用的第一结合剂与不阻断PD-1和PD-L1的相互作用的第二结合剂之间的协同作用。

发明内容

[0018] 本公开涉及对于程序性细胞死亡1 (PD-1) (例如,人PD-1) 具有特异性的结合剂和使用其,比如治疗、预防和/或减轻感染(例如,被人免疫缺陷病毒(HIV))、癌症和/或自身免疫疾病的方法。也提供了鉴定与PD-1相互作用的结合剂的功能试验。也提供了结合剂,比如阻断PD-1和PD-L1的相互作用的第一结合剂与不阻断PD-1和PD-L1的相互作用的第二结合剂的组合,其协同用于救援(rescue) T细胞避免衰竭。

[0019] 发明详述

[0020] 本公开涉及体外和/或体内结合细胞表面上的程序性细胞死亡(PD-1)蛋白质(例如,美国专利号5,698,520(Honjo等)的SEQ ID NO:1,图1A、图1B,该专利通过引用以其整体并入本文)(例如,人PD-1)的结合剂。结合剂也可通常在体外结合分离的PD-1多肽(例如,人PD-1)和/或其片段和/或衍生物。也提供了使用这种结合剂诊断、治疗、预防和/或减轻与存在表达PD-1的细胞相关的一种或多种疾病的方法。例如,结合剂可以是与PD-1的表位作用和/或结合PD-1的表位的抗体(例如,单克隆抗体)。本文所述的“结合剂”可包括例如

PD-1的激动剂或拮抗物。激动剂结合剂是通常不能恢复T-细胞功能和/或PD-1的表达的结合剂。激动剂PD-1结合剂可用于治疗自身免疫性疾病和其中PD-1表达细胞参与疾病进展的其他疾病。而拮抗物结合剂是能够恢复T-细胞功能和/或PD-1的表达的结合剂。例如,PD-1拮抗物结合剂可能从如已知在HIV感染和各种肿瘤中出现的功能衰竭中恢复PD-1表达T-细胞的功能。T细胞功能的恢复可通过例如测量这种细胞的增殖、细胞因子产生、细胞毒素活性或其他特征来确定。本文所述的结合剂的另一用途是选择性靶向和消除包含有复制能力的HIV的感染HIV的CD4T细胞群(例如,在潜伏和/或复制状态)。已知这种表达PD-1的PD-1表达细胞用作有复制能力的HIV的主要细胞库。用于消除这些CD4T-细胞群的潜在机制是使用本文所述的结合剂(例如,单特异性PD-1抗体和/或双特异性PD-1抗体)的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)。在一些实施方式中,具有例如不同特异性(例如,识别不同的表位)的一种或多种PD-1拮抗结合剂可被组合,以诱导救援抗原特异性CD8T-细胞避免由在那些细胞中的PD-1表达而造成的功能衰竭(例如,恢复或改善增殖、细胞因子产生和/或细胞毒素活性)。在一些实施方式中,也可提供本文所述的结合剂用于选择性消除和/或抑制PD-1表达细胞。在一些实施方式中,本文所述的PD-1激动剂结合剂可用于抑制和/或消除PD-1表达细胞,以治疗,例如,传染病(例如,HIV)、癌症和/或,尤其,自身免疫病症。下面描述了其他实施方式、用途等。

[0021] 结合剂可以是抗体比如单克隆抗体,可包括例如表1中显示的氨基酸序列中的任何一条或多条(和/或其一个或多个片段和/或衍生物)。本公开也提供了这种单克隆抗体分离、鉴定和/或靶向(target)表达PD-1的细胞的用途。在某些实施方式中,这些单克隆抗体可对于在细胞的表面上表达的PD-1是有活性的。术语“抗体(antibody)”或“抗体(antibodies)”可指未纯化形式或部分纯化形式(例如,杂交瘤上清液、腹水、多克隆抗血清)或纯化形式的完整抗体或片段化抗体。抗体可具有任何适当的来源或形式,包括例如鼠源的(murine)(例如,通过鼠杂交瘤细胞产生),或作为人源化抗体、嵌合抗体、人抗体等表达的。例如,抗体可全部或部分源自例如人(例如,IgG(IgG1、IgG2、IgG2a、Ig2b、IgG3、IgG4)、IgM、IgA(IgA1和IgA2)、IgD和IgE)、犬(例如,IgGA、IgGB、IgGC、IgGD)、鸡(例如,IgA、IgD、IgE、IgG、IgM、IgY)、山羊(例如,IgG)、小鼠(例如,IgG、IgD、IgE、IgG、IgM),和/或猪(例如,IgG、IgD、IgE、IgG、IgM)、大鼠(例如,IgG、IgD、IgE、IgG、IgM)抗体。制备、利用和储存各种类型的抗体的方法是本领域技术人员熟知的并且可适当地在本发明中实施(见,例如,Harlow等Antibodies:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,1988;Harlow等Using Antibodies:A Laboratory Manual,Portable Protocol No.1,1998;Kohler and Milstein,Nature,256:495(1975));Jones等Nature,321:522-525(1986);Riechmann等Nature,332:323-329(1988);Presta(Curr.Op.Struct.Biol.,2:593-596(1992);Verhoeyen等(Science,239:1534-1536(1988);Hoogenboom等J.Mol.Biol.,227:381(1991);Marks等J.Mol.Biol.,222:581(1991);Cole等Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,p.77(1985);Boerner等J.Immunol.,147(1):86-95(1991);Marks等Bio/Technology 10,779-783(1992);Lonberg等Nature 368 856-859(1994);Morrison,Nature 368 812-13(1994);Fishwild等Nature Biotechnology 14,845-51(1996);Neuberger,Nature Biotechnology 14,826(1996);Lonberg and Huszar,Intern.Rev.Immunol.13 65-93(1995);以及美国专利号4,816,567、5,545,807、5,545,

806、5,569,825、5,625,126、5,633,425和5,661,016)。在某些应用中,抗体可包含在杂交瘤上清液或腹水中并且如此直接使用或使用标准技术浓缩之后使用。在其他应用中,可使用例如盐分馏和离子交换色谱,或使用蛋白质A、蛋白质G、蛋白质A/G和/或共价结合至固体载体比如琼脂糖磁珠的蛋白质L配体的亲和性色谱或这些技术的组合,将抗体进一步纯化。抗体可以任何适当的方式储存,包括作为冻干制剂(例如,-20℃或-70℃),以冻干形式,或在通常的冷藏条件下(例如,4℃)。例如,当以液体形式储存时,优选地使用适当的缓冲液比如Tris缓冲生理盐水(TBS)或磷酸盐缓冲液(PBS)。在一些实施方式中,结合剂可制备为可注射的制剂,比如以在无毒性肠胃外可接受的稀释剂或溶剂中的悬浮液。可使用的适当的媒介和溶剂包括水、林格溶液和等渗氯化钠溶液、TBS和/或PBS等等。可适于体外或体内使用这种制剂可如本领域已知的来制备并且具体的制备可取决于具体的应用。

[0022] 但是,描述的结合剂决不得以任何方式限于抗体。例如,结合剂可以是展示与另一个(例如,模拟物)类似结合性质的任何化合物。例如,示例性结合剂可以是结合PD-1和/或可与其具有特异性的结合剂(例如,单克隆抗体)竞争的结合剂。在一些实施方式中,模拟物在结合试验中可展示与被相比较的结合剂(例如,单克隆抗体)基本上相同的亲和力。可通过任何适当的试验测量特定的结合剂的亲和力,包括但不限于激活的CD4T细胞上内源细胞表面PD-1的FACS染色,如在实施例描述。当量度(例如,nm)在另一结合剂的约任何1-20、1-5、5-10、10-15或15-20百分比范围内时,可认为一种结合剂具有与另一结合剂“基本上相同的亲和力”。示例性模拟物可包括例如特异性结合PD-1的有机化合物,或亲和体(affibody)(Nygren等FEBS J.275(11):2668-76(2008))、affilin(Ebersbach等J.Mol.Biol.372(1):172-85(2007))、affitin(Krehenbrink等J.Mol.Biol.383(5):1058-68(2008))、anticalin(Skerra,A.FEBS J.275(11):2677-83(2008))、avimer(Silverman等Nat.Biotechnol.23(12):1556-61(2005))、DARPin(Stumpp等Drug Discov.Today13(15-16):695-701(2008))、Fynomer(Grabulovski等J.Biol.Chem.282(5):3196-3204(2007))、Kunitz结构域肽(Nixon等Curr.Opin.Drug Discov.Devel.9(2):261-8(2006)),和/或单体(monobody)(Koide等Methods Mol.Biol.352:95-109(2007))。其他模拟物可包括例如抗体的衍生物(例如,单克隆抗体1E4、1G10和/或1G1的衍生物)比如,例如,F_{ab}、F_{ab2}、Fab' 单链抗体、F_v、单结构域抗体、单特异性抗体、双特异性抗体、三特异性抗体、多价抗体、嵌合抗体、犬-人嵌合抗体、犬-小鼠嵌合抗体、包括犬Fc的抗体、人源化抗体、人抗体、犬化的CDR移植抗体、鲨鱼抗体、纳米抗体、骆驼化抗体(camelid antibody)、微体和/或胞内抗体,或其衍生物。本文也提供了本领域普通技术人员理解的其他结合剂。

[0023] 本领域技术人员已知的任何方法可用于产生对于PD-1具有特异性(例如,结合)的结合剂。例如,为了产生和分离单克隆抗体,可以一种或多种PD-1蛋白(例如,PD-1Fc融合蛋白和/或PD-1组氨酸标记蛋白)施予(例如,免疫)动物比如小鼠。可然后选择对在激活的人T淋巴细胞上表达的PD-1展示血清反应性(如通过例如,流式细胞术和/或显微镜测定)的动物,用于产生抗PD-1杂交瘤细胞系。这可以重复多轮。例如,结合剂选择的第一轮的主要标准可包括但不限于:i)通过流式细胞术,在激活的人T淋巴细胞上PD-1染色的水平;(ii)与现有抗PD-1抗体的那些相比,CDR VH和VL序列的多样性;和(iii)通过与PD-1缀合的与PD-L1预偶联的Luminex磁珠或数种商业上可获得的结合至PD-1上不同表位的抗PD-1抗体之一的竞争结合研究而进行的表位定位(epitope mapping)。选择的示例性第一或第二轮也可

包括例如亲和性结合(不是主要标准,因为其可能与抗PD-1抗体的刺激潜能不相关);和/或功能表征,以将结合剂鉴定为激动剂或拮抗物。

[0024] 如本文实施例1所描述,可使用例如衰竭功能恢复试验(EFRA)。在该试验中,测试结合剂可被测试救援免疫细胞比如T细胞避免衰竭的能力。这可通过在存在抗原,比如源自病毒比如人免疫缺陷病毒(HIV)的测试肽的情况下,测量结合剂恢复这种细胞增殖的能力来测定。在CFSE试验中,与对照,比如单独测试肽或阳性对照抗PD-1抗体比如MK-3475(派母单抗(pembrolizumab))比较测量增殖。在一些实施方式中,当与单独肽对照或具有同种型对照小鼠IgG1抗体的肽相比较,该比较显示显著差异(比如P值<0.001)时,确定结合剂恢复增殖。该试验可用于鉴定与结合至PD-1(比如PD-L1或PD-L2)的其他结合剂竞争和/或引起免疫细胞的功能恢复的结合剂(比如抗体)。实施例1也描述了使用基于Luminex的试验,将表2中列举的抗体进行表位定位的两种方法。在一种生物化学试验中,PD-1Fc融合蛋白与磁珠结合,并且在表2中描述的抗PD-1抗体和两个不同商业上可获得的抗PD-1抗体中的一个之间进行竞争结合研究。实施例1描述了结合至PD-1上不同表位的四类单克隆抗体,它们是:类别1(与阻断PD-1与PD-L1的相互作用的第一单克隆抗体竞争)、类别2(与结合PD-1但是不阻断PD-1与PD-L1的相互作用的第二单克隆抗体竞争)、类别3(与第一和第二单克隆抗体都竞争),和类别4(不与第一或第二抗体竞争)。在单独的试验中,对于表2中列举的抗PD-1抗体和生物素化的PD-L1重组蛋白,评估结合至重组PD-1蛋白的竞争。从推测结合至PD-1上不同表位的所有四个结合类别中鉴定出了在EFRA中诱导增殖的抗体。同样地,EFRA允许鉴定与PD-1/PD-L1相互作用是竞争的、部分竞争的或非竞争的并且特异性恢复HIV特异性CD8T-细胞的增殖功能的抗PD-1抗体。

[0025] 也可鉴定结合剂的组合,比如实施例2中描述的那些。在一些实施方式中,可鉴定组合,以提供与使用仅仅一种或多种结合剂并且没有其他获得的结果统计学上显著的差异。在一些实施方式中,可鉴定展示对于恢复免疫细胞功能协同能力的组合。在一些实施方式中,组合可包括阻断PD-1和PD-L1的相互作用的第一结合剂与不阻断PD-1和PD-L1的相互作用的第二结合剂。第一和第二结合剂可以是不同的实体,比如两种或更多种不同单克隆抗体或其衍生物,或可出现在相同的实体上,比如双功能抗体(单抗体或其衍生物,其包括多种结合特异性)。例如,示例性双功能抗体可包括阻断PD-1和PD-L1的相互作用的第一结合区域和不阻断PD-1和PD-L1的相互作用的第二结合区域。也考虑提供多种类型的各个结合剂的组合。例如,组合可包括阻断PD-1和PD-L1的相互作用的多种类型的结合剂与不阻断PD-1和PD-L1的相互作用的一种或多种结合剂。在一些实施方式中,组合可包括阻断PD-1和PD-L1的相互作用的一种或多种结合剂和不阻断PD-1和PD-L1的相互作用的多种结合剂。在一些实施方式中,组合可包括阻断PD-1和PD-L1的相互作用的多种结合剂和不阻断PD-1和PD-L1的相互作用的多种结合剂。如本文所描述的这种组合也可结合可影响免疫细胞功能的一种或多种其他试剂,比如针对CTLA-4的抗体等等。本领域普通技术人员将认识到许多这种组合可适于如本文所述的用途。

[0026] 在结合剂是抗体的情况下,其可参考对应于其变异和/或互补决定区(“CDR”)的核苷酸和/或氨基酸序列来鉴定。可变区/CDR序列可结合一个或多个其他可变区/CDR氨基酸序列使用。可变区/CDR氨基酸序列可以可选地和/或也可连接至抗体分子的一类或多类恒定区多肽。例如,表1A和1B中显示的CDR氨基酸序列可与相同或不同物种(例如,人、山羊、大

鼠、绵羊、鸡)的任何抗体分子的恒定区和/或衍生CDR氨基酸序列的抗体亚型邻接(adjointed)或结合(associated)。例如,示例性结合剂可以是,或可衍生自,或可相关于列举的杂交瘤所产生的单克隆抗体,和/或可具有大约相同的亲和力和/或增殖效果,和/或具备表2中显示的相同结合类别,和/或可具有SEQ ID NOS.1-138和/或表1A和1B中显示的任何一个或多个氨基酸序列。结合剂可包括抗体重链和/或轻链,其各自包括一个或多个恒定区和/或可变区。可变区通常包括可确定抗体的结合特异性的一个或多个CDR。单克隆抗体也可通过分析这种可变区的氨基酸序列(例如,其可通过这种核苷酸序列编码)来鉴定。例如,结合PD-1的结合剂的重链CDR的示例性氨基酸序列可包括选自下述的至少一条氨基酸序列的任何一个或多个:SEQ ID NOS.1-138,和/或表1A和/或1B中显示的任何其他序列。使用标准技术,本文所述的任何氨基酸序列,和/或其任何片段和/或衍生物也可以任何顺序与任何其他可变区和/或CDR和/或组合结合,以形成混合和/或融合结合剂,和/或被插入至其他重链和/或轻链可变区。可出现在本公开的PD-1(例如,人PD-1)结合剂中的CDR的示例性组合(例如,重链和/或轻链CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列的组合)可包括例如表1A和/或1B中显示的实施方式。

[0027] 表1A

[0028]

	重链：氨基酸序列		
克隆	CDR1	CDR2	CDR3
122F10	DDFLH (SEQ ID NO: 1)	RIDPANGESRYAPK FQD (SEQ ID NO: 24)	TDYRGYYYAMD Y (SEQ ID NO: 47)
139D6	NYYIH (SEQ ID NO: 2)	SIYPNYGDTNYNQ KVKD (SEQ ID NO: 25)	GYSYAMDY (SEQ ID NO: 48)
135D1	NYYIH (SEQ ID NO: 3)	SIYPNYGETNYNQ EFKG (SEQ ID NO: 26)	GYSYAMDY (SEQ ID NO: 49)
134D2	SNWMH (SEQ ID NO: 4)	AVNPGNSDTTYNQ KFKG (SEQ ID NO: 27)	GRSYDGSFDY (SEQ ID NO: 50)
121G1	RYWMH (SEQ ID NO: 5)	NIDPSDSTTHYNPK FRD (SEQ ID NO: 28)	DLDDFYVGSHED FDY (SEQ ID NO: 51)
136B5	SNWMH (SEQ ID NO: 6)	AVYPGNSDTTYNQ NFKG (SEQ ID NO: 29)	GRSYDGSFDY (SEQ ID NO: 52)
127C2	NSYIH (SEQ ID NO: 7)	WISPGDGSTNYNE KFKG (SEQ ID NO: 30)	EEYDYDNY (SEQ ID NO: 53)
137F2	NYWIG (SEQ ID NO: 8)	DIYPGGGYTNYNE KFKG (SEQ ID NO: 31)	GYDFVLDR (SEQ ID NO: 54)

[0029]

138H5	SYAMS (SEQ ID NO: 9)	TISGGGADTYILD NVKG (SEQ ID NO: 32)	QRGENLFAH (SEQ ID NO: 55)
140A1	SDYAWN (SEQ ID NO: 10)	YINYSGYTNYNPF LKS (SEQ ID NO: 33)	YGGSYPWNFVDV (SEQ ID NO: 56)
135H12	SYWIN (SEQ ID NO: 11)	NIYPGSSSTDYNEK FKS (SEQ ID NO: 34)	GLYWYFDV (SEQ ID NO: 57)
131D11	SSYIH (SEQ ID NO: 12)	WIFPGDGKTNYNE KFRD (SEQ ID NO: 35)	NDFDRGVY (SEQ ID NO: 58)
132F7	NHGMS (SEQ ID NO: 13)	SINTGGYSTYYPD NVKG (SEQ ID NO: 36)	DDYNWFAY (SEQ ID NO: 59)
126E4	NYWIG (SEQ ID NO: 14)	DIYPGSEYENYNE KFKG (SEQ ID NO: 37)	GYDFVLDH (SEQ ID NO: 60)
135G1	DSYIH (SEQ ID NO: 15)	RIDPAHGNVIYASK FRD (SEQ ID NO: 38)	IYYDYGEGDF (SEQ ID NO: 61)
136E10	DTYIH (SEQ ID NO: 16)	RIDLANDDILYASK FQG (SEQ ID NO: 39)	IYYDYGEGDY (SEQ ID NO: 62)
135C12	NFYIH (SEQ ID NO: 17)	SIYPNYGDTAYNQ KFKD (SEQ ID NO: 40)	GYSYAMDY (SEQ ID NO: 63)
136F4	DSYIH (SEQ ID NO: 18)	RIDPARDNIIYASKF RD (SEQ ID NO: 41)	IYYDYGEGDY (SEQ ID NO: 64)
136B4	DDFLH (SEQ ID NO: 19)	RIDPANGESRYAPQ FQD (SEQ ID NO: 42)	TDYRGYYYAMD Y (SEQ ID NO: 65)
135E10	SYFMS (SEQ ID NO: 20)	GISTGGADTYAD SMKG (SEQ ID NO: 43)	LSHYDGIPLDC (SEQ ID NO: 66)
140G5	NHGMS (SEQ ID NO: 21)	SISGGGDNTYYPD NLKG (SEQ ID NO: 44)	VRQLGLHRAAM DY (SEQ ID NO: 67)
122H2	NYWIG (SEQ ID NO: 22)	DIYPGGDHKNYNE KFKD (SEQ ID NO: 45)	GFDFVLDY (SEQ ID NO: 68)

[0030]

139F11	SFAMS (SEQ ID NO: 23)	TITGGGVNTYYPD TVKG (SEQ ID NO: 46)	QAIYDGHYVLDY (SEQ ID NO: 69)
--------	--------------------------	--	---------------------------------

[0031]

表1B

[0032]

	轻链：氨基酸序列		
克隆	CDR1	CDR2	CDR3
122F10	KSSQSVLYSSNQK NYLA (SEQ ID NO: 70)	WASTRES (SEQ ID NO: 93)	HQYLSSYT (SEQ ID NO: 116)
139D6	SASQGISDGLN (SEQ ID NO: 71)	HTSTLHS (SEQ ID NO: 94)	QQYSKFPLT (SEQ ID NO: 117)
135D1	SASQGISNGLN (SEQ ID NO: 72)	HTSTLHS (SEQ ID NO: 95)	QQYSKFPLT (SEQ ID NO: 118)
134D2	KASQDINKYIA (SEQ ID NO: 73)	YTSTLRP (SEQ ID NO: 96)	LQYDNLWT (SEQ ID NO: 119)
121G1	RSSQSIVYSNGNT YLE (SEQ ID NO: 74)	KVSHRFS (SEQ ID NO: 97)	FQGSHVPYT (SEQ ID NO: 120)
136B5	KASQDINKYMA (SEQ ID NO: 75)	YTSTLRP (SEQ ID NO: 98)	LQYDNLWT (SEQ ID NO: 121)
127C2	KASQNVGTNVG (SEQ ID NO: 76)	SASYRYN (SEQ ID NO: 99)	QQYNTYPWT (SEQ ID NO: 122)
137F2	KSSQSLFNSETQK NYLA (SEQ ID NO: 77)	WASTRES (SEQ ID NO: 100)	KQSYTLRT (SEQ ID NO: 123)
138H5	LASQTIGTWLA (SEQ ID NO: 78)	AATSLAD (SEQ ID NO: 101)	QQLYSTPWT (SEQ ID NO: 124)
140A1	RSSQTIVHNNGDT YLE (SEQ ID NO: 79)	KISNRFF (SEQ ID NO: 102)	FQGSHVPYT (SEQ ID NO: 125)
135H12	KSSQSLFNNSGTRK NYLA (SEQ ID NO: 80)	WASTRDS (SEQ ID NO: 103)	KQSYNLYT (SEQ ID NO: 126)
131D11	KASQNVDTNVA (SEQ ID NO: 81)	SASYRYN (SEQ ID NO: 104)	QQYNNYPYT (SEQ ID NO: 127)
132F7	KSSQSLLNSGNQK NYLT (SEQ ID NO: 82)	WASTRES (SEQ ID NO: 105)	QSDYSYPLT (SEQ ID NO: 128)
126E4	KSSQSLFNNSGTRKS	WASTRET	MQSYNLRT

[0033]

	YLA (SEQ ID NO: 83)	(SEQ ID NO: 106)	(SEQ ID NO: 129)
135G1	HASQNINWLS (SEQ ID NO: 84)	KASNLHT (SEQ ID NO: 107)	QQGQSWPLT (SEQ ID NO: 130)
136E10	HASQNINWLS (SEQ ID NO: 85)	KASNLHT (SEQ ID NO: 108)	QQGQSYPLT (SEQ ID NO: 131)
135C12	SASQGISGDLN (SEQ ID NO: 86)	HTSSLHS (SEQ ID NO: 109)	QYYSKDLLT (SEQ ID NO: 132)
136F4	HASQNINWLS (SEQ ID NO: 87)	KASNLHT (SEQ ID NO: 110)	QQGQSWPLT (SEQ ID NO: 133)
136B4	KSSQSVLYSSNQK NYLA (SEQ ID NO: 88)	WASTRES (SEQ ID NO: 111)	HQYLSSYT (SEQ ID NO: 134)
135E10	RASESVDNSGVSF LT (SEQ ID NO: 89)	AASNQGS (SEQ ID NO: 112)	QQTKEVPWT (SEQ ID NO: 135)
140G5	KASQSVSDDVS (SEQ ID NO: 90)	SAFFRYP (SEQ ID NO: 113)	QQDYSSPLT (SEQ ID NO: 136)
122H2	KSSQSLFNSGTRK NYLA (SEQ ID NO: 91)	WASTRES (SEQ ID NO: 114)	MQSFNLRT (SEQ ID NO: 137)
139F11	RTSGNIHNYLA (SEQ ID NO: 92)	NVKTLD (SEQ ID NO: 115)	QQFWSIPWT (SEQ ID NO: 138)

[0034] 另外,任何SEQ ID NOS.1-69可与任何一个或多个SEQ ID NOS.70-138组合为结合剂。在优选的实施方式中,各个克隆的重链CDR与它们各自的轻链CDR组合为结合剂。在一些实施方式中,结合剂可包括下面显示的重链CDR和轻链CDR:

[0035] 122F10 (SEQ ID NOS.1、24、47、70、93和116) ;

[0036] 139D6 (SEQ ID NOS.2、25、48、71、94和117) ;

[0037] 135D1 (SEQ ID NOS.3、26、49、72、95和118) ;

[0038] 134D2 (SEQ ID NOS.4、27、50、73、96和119) ;

[0039] 121G1 (SEQ ID NOS.5、28、51、74、97和120) ;

[0040] 136B5 (SEQ ID NOS.6、29、52、75、98和121) ;

[0041] 127C2 (SEQ ID NOS.7、30、53、76、99和122) ;

[0042] 137F2 (SEQ ID NOS.8、31、54、77、100和123) ;

[0043] 138H5 (SEQ ID NOS.9、32、55、78、101和124) ;

[0044] 140A1 (SEQ ID NOS.10、33、56、79、102和125) ;

[0045] 135H12 (SEQ ID NOS.11、34、57、80、103和126) ;

[0046] 131D11 (SEQ ID NOS.12、35、58、81、104和127) ;

[0047] 132F7 (SEQ ID NOS.13、36、59、82、105和128) ;

[0048] 126E4 (SEQ ID NOS.14、37、60、83、106和129) ;

[0049] 135G1 (SEQ ID NOS.15、38、61、84、107和130) ;

- [0050] 136E10 (SEQ ID NOS.16、39、62、85、108和131) ;
 [0051] 135C12 (SEQ ID NOS.17、40、63、86、109和132) ;
 [0052] 136F4 (SEQ ID NOS.18、41、64、87、110和133) ;
 [0053] 136B4 (SEQ ID NOS.19、42、65、88、111和134) ;
 [0054] 135E10 (SEQ ID NOS.20、43、66、89、112和135) ;
 [0055] 140G5 (SEQ ID NOS.21、44、67、90、113和136) ;
 [0056] 122H2 (SEQ ID NOS.22、45、68、91、114和137) ;或
 [0057] 139F11 (SEQ ID NOS.23、46、69、92、115和138) 。
 [0058] 其他组合也可能是有用的,如本领域普通技术人员可确定的。
 [0059] 包括表1A和/或1B,或就在前段的那些的CDR的结合剂,也可展示下述特征:
 [0060] 表2

[0061]

克隆	亲和力 * (nM)	结合类别**	与 PD-1/PD-L1 相互作用的抗体竞争***	相对于单独肽刺激的 EFRA %†
122F10	2.2	4	非竞争	146%
139D6	2.4	2	部分竞争	195%
135D1	6.5	2	部分竞争	187%
134D2	4.8	4	竞争	205%
121G1	11.9	4	非竞争	120%
136B5	7.7	4	竞争	200%
127C2	1.0	2	非竞争	100%
137F2	1.5	1	竞争	250%
138H5	1.6	3	竞争	210%
140A1	1.4	3	竞争	160%
135H12	1.9	1	竞争	190%
131D11	2.7	1	竞争	180%
132F7	100	2	非竞争	210%
126E4	0.5	4	竞争	130%
135G1	32	4	NA	138%

[0062]

136E10	7.1	4	非竞争	148%
135C12	1.7	2	部分竞争	195%
136F4	8.3	4	非竞争	108%
136B4	1.4	2	非竞争	185%
135E10	1.5	3	竞争	165%
140G5	1.6	1	竞争	205%
122H2	4.3	1	竞争	200%
139F11	3.1	1	竞争	250%

- [0063] *通过激活的CD4T细胞上内源细胞表面PD-1的FACS染色来评估表1中列举的抗体

的结合亲和力。

[0064] **通过Luminex试验竞争结合研究确定结合类别。结合类别1mAb克隆与EH12.2H7克隆商业抗体竞争,类别2mAb克隆与J116克隆商业抗体竞争,类别3mAb克隆与EH12.2H7和J116抗体都竞争,并且类别4mAb克隆在EH12.2H7和J116抗体都存在的情况下结合。

[0065] ***在第二Luminex结合试验中确定与PD-1/PD-L1相互作用的抗体竞争。在该试验中,在没有或存在来自表2中浓度为20nM的抗PD-1抗体的情况下培育PD-1Fc融合蛋白包被的磁珠。固定浓度的1.25nM生物素化的PD-L1,约等于PD-1/PD-L1相互作用的IC₅₀,用PD-1/抗体复合物培育,并且通过以藻红蛋白标记的链霉抗生物素的荧光检测PD-L1结合。基于结合至PD-1/抗体复合物的PD-L1,抗体被定义为与PD-1/PD-L1相互作用是竞争性的、部分竞争的或非竞争的。

[0066] ‡使用CFSE试验评估增殖效果(衰竭功能恢复试验的实施方式,“EFRA”)。在存在或没有抗PD-1抗体的情况下,用HIV特异性肽刺激从慢性感染的HIV受试者分离的PBMC。6天培育之后,相对于单独肽对照,在抗PD-1处理的样品中评估HIV特异性CD8T细胞的增殖。

[0067] NA=未获得

[0068] 可通过本领域普通技术人员可用的任何技术确定结合亲和力。通过流式细胞术染色用植物血凝素(PHA)刺激3至6天时间的CD4T细胞上的内源细胞表面PD-1,来评估表2中呈现的结合亲和力数据。也可通过本领域普通技术人员可用的任何技术确定结合类别。通过Luminex试验竞争结合研究测定表2中呈现的结合类别数据。在表2中,结合类别1mAb抗体是被测定与EH12.2H7克隆商业抗体(可获得自BioLegend, San Diego, CA(例如,货号329905))竞争的那些;类别2抗体是被测定与J116克隆商业抗体(可获得自Affymetrix eBioscience, San Diego, CA(例如,货号16-9989-80))竞争的那些;和类别3抗体是被测定与EH12.2H7和J116抗体都竞争的那些;和类别4mAb克隆抗体是被测定在EH12.2H7和J116抗体都存在的情况下结合PD-1的那些。

[0069] 可通过本领域普通技术人员可用的任何技术测定增殖效果。例如,可使用上述的和实施例1中使用的EFRA系统。这种试验用于确定表2中呈现的增殖效果数据。简言之,羧基荧光素琥珀酰亚胺基酯(CFSE)试验,其中从慢性感染的HIV受试者分离外周血单核细胞(PBMC)并且用HIV特异性肽在存在和缺少抗PD-1抗体的情况下刺激。也测试对照抗PD1抗体(Merck抗体MK-3475)作为阳性对照。培育六天之后,相对于单独肽对照,在抗PD-1处理的样品中评估HIV特异性CD8T细胞的增殖并且结果表达为超过对照的百分数(percentage above control) (“增殖效果”)。

[0070] 在一些实施方式中,可结合用于鉴定和表征PD-1结合剂比如抗体的技术,以提供用于鉴定和表征这种结合剂的系统。例如,一种或多种候选结合剂,比如一种或多种单克隆抗体可通过EFRA或类似的试验测定,以确定候选结合剂恢复免疫细胞功能的能力,如通过例如,在存在免疫原性肽的情况下增殖所测量的。在一些实施方式中,这类试验可用作初始筛选,以确保进一步研究的候选结合剂能够恢复免疫细胞功能。在一些实施方式中,这些类型的试验之后可以是确定对免疫细胞比如激活的外周血单核细胞(PBMC)的结合亲和力的试验。在一些实施方式中,该试验可使用技术比如荧光激活细胞分选(FACS)。在一些实施方式中,试验可包括存在或没有非特异性结合和/或使用已知的结合试剂比如抗PD1抗体(例如,Merck抗体MK-3475,也称为派母单抗)的竞争结合研究。这些试验可然后是比如上面表

1A和/或1B中提供的候选结合剂的CDR的测序。然后,本文所述的EFRA、亲和力测定、表位定位研究和CDR鉴定方法一起提供了可鉴定候选结合剂的系统。

[0071] 表1A和/或1B中的任何氨基酸序列(和/或其任何一个或多个片段和/或衍生物)也可被任何其他氨基酸替换,如本领域普通技术人员期望的。例如,本领域技术人员通过用如下面表3中显示的其他氨基酸替换具体的氨基酸,可进行保守替换。所选择的特异性氨基酸替换可取决于选择的位点的位置。这种保守氨基酸替换可涉及用非自然残基替换天然氨基酸残基,使得几乎不影响在该位置的氨基酸残基的尺寸、极性、电荷、疏水性或亲水性,并且尤其不产生降低的PD-1结合。

[0072] 表3

[0073]

SEQ ID NOS. 1-138 中的初始氨基酸残基	SEQ ID NOS. 1-138 的初始氨基酸残基的示例性保守替换	SEQ ID NOS. 1-138 的初始氨基酸残基的优选的保守替换
Ala	Val、Leu、Ile	Val
Arg	Lys、Gln、Asn	Lys
Asn	Gln	Gln
Asp	Glu	Glu
Cys	Ser、Ala	Ser
Gln	Asn	Asn
Glu	Asp	Asp
Gly	Pro、Ala	Ala
His	Asn、Gln、Lys、Arg	Arg
Ile	Leu、Val、Met、Ala、Phe、正亮氨酸	Leu
Leu	正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe	Ile
Lys	Arg、1,4 二氨基-丁酸、Gln、Asn	Arg
Met	Leu、Phe、Ile	Leu
Phe	Leu、Val、Ile、Ala、Tyr	Leu
Pro	Ala	Gly
Ser	Thr、Ala、Cys	Thr
Thr	Ser	Ser
Trp	Tyr、Phe	Tyr
Tyr	Trp、Phe、Thr、Ser	Phe
Val	Ile、Met、Leu、Phe、Ala、正亮氨酸	Leu

[0074] 在一些实施方式中,本公开提供了具有多特异性的结合剂,使得PD-1和至少一种其他第二抗原(例如,细胞表面蛋白)可被单结合剂结合。在一些实施方式中,第二抗原可以由感染传染剂的细胞表达的抗原。例如,示例性第二抗原可以是HIV Env抗原。这种结合剂可结合第二抗原和/或可用于中和传染剂。例如,在某些实施方式中,比如对于双特异性结合剂,其具有对于PD-1和HIV抗原比如env和/或另一抗原的双特异性。HIV免疫原可源自

本文所述的任何亚型,或任何其他。在一些实施方式中,这种结合剂可包括:PD-1激动剂/Env结合;PD-1激动剂PD-1/Env结合和中和;PD-1拮抗物/Env结合;和/或PD-1拮抗物/PD-1/Env结合和中和。考虑各种亚型的普遍性,可优先选择来自HIV-1亚型B和/或C的抗原。也可期望在单个组合物中包括对于来自多种HIV亚型(例如,HIV-1亚型B和C、HIV-2亚型A和B或HIV-1和HIV-2亚型的组合)的抗原具有特异性的结合剂。对于治疗疾病比如癌症,可有益地获得具有多种PD-1特异性(例如,对于两个不同表位特异性的双特异性PD-1a/PD1b拮抗物PD-1抗体)和/或对于PD-1和一种或多种肿瘤抗原(例如,癌症-睾丸(CT)抗原(即,MAGE、NY-ESO-1);黑素细胞分化抗原(即,Melan A/MART-1,酪氨酸酶,gp100);突变抗原(即,MUM-1、p53、CDK-4);过表达的‘自体’抗原(即,HER-2/neu,p53);和/或病毒抗原(即,HPV、EBV))都特异性的结合剂。结合剂(例如,单克隆抗体)可大体上如上述产生。这种结合剂的特异性可使用本领域普通技术人员广泛可用的技术重组成单结合剂。在一些实施方式中,多种单特异性结合剂也可被组合和使用(例如,施用),以提供有效的多特异性试剂。

[0075] 在一些实施方式中,本文所述的结合剂可被缀合至活性试剂,以靶向和抑制表达PD-1(和/或在结合剂具有多特异性的情况下的另一抗原)的细胞群的功能和/或消除表达PD-1(和/或在结合剂具有多特异性的情况下的另一抗原)的细胞群。例如,可使用结合剂/药物缀合物(例如,抗体-药物缀合物(ADC)),靶向并且消除包含复制能力的HIV的CD4⁺T-细胞群。单特异性和/或双特异性候选结合剂可与一类或多类药物(例如,破坏DNA、靶向微管的药物)缀合。本文所述的结合剂和/或其衍生物也可连接至和/或缀合至功能剂,用于体外和/或体内使用。例如,结合剂可连接至和/或缀合至功能部分,比如细胞毒素药物或毒素,和/或其活性片段,比如白喉A链、外毒素A链、蓖麻毒素A链、相思子毒素A链、麻疯树毒蛋白、巴豆毒素、酚霉素、伊诺霉素等等。适当的功能部分也可包括放射化学品。使用本领域的标准技术,结合剂,比如抗体,可被连接至和/或缀合至一种或多种功能剂。

[0076] 在一些实施方式中,结合剂可结合其他试剂比如抗感染剂(例如,抗生素、抗病毒药剂)施用。例如,本文所述的结合剂可结合单克隆抗体和/或其他试剂比如尼伏鲁单抗(也称为MDX-1106、BMS-936558(Topalian等N.Eng.J.Med.2012;366(26):2443-2454)、MDX-1106、ONO-4538,全人IgG4mAb,可获得自Bristol-Myers Squibb)、Lambrolizumab(也称为MK-3475和SCH 900475,人源化的IgG4单克隆抗体,可获得自Merck)、皮地珠单抗(人源化的IgG1单克隆抗体,可获得自CureTech)、AMP-224(B7-DC/IgG1融合蛋白,可获得自GlaxoSmithKline/Amplimmune),和/或任何美国专利号8,354,509B2(Carven等)、美国专利号8,008,449B2(Korman等)、WO 2012/135408A1(Manoj,等)、US 2010/026617(Carven等)、WO 2011/110621A1(Tyson等)、美国专利号7,488,802B2(Collins等)、WO 2010/029435A1(Simon等)、WO 2010/089411A2(Olive,D.)、WO 2012/145493A1(Langermann等)、WO 2013/043556A1(Rolland等)、WO 2011/159877A2(Kuchroo等)、美国专利号7,563,869B2(Ono Pharm.)、美国专利号7,858,746B2(Honjo等)、美国专利号8,728,474B2(Ono Pharm.)、美国专利号9,067,999(Ono Pharm.)和/或美国专利号9,067,999中描述的抗体或其他试剂或方法,每一篇专利以其整体并入本公开。

[0077] 如上述,本文所述的PD-1结合剂(例如,PD-1拮抗物)可用于治疗和/或预防和/或减轻HIV感染的症状。如本领域熟知的,HIV分离物现被划分为不同的基因亚型。已知HIV-1包括至少十种亚型(A1、A2、A3、A4、B、C、D、E、F1、F2、G、H、J和K)(Taylor等NEJM,359(18):

1965-1966 (2008))。已知HIV-2包括至少五种亚型(A、B、C、D和E)。世界范围内,亚型B与男同性恋和静脉内药物使用者中的HIV流行病相关。大部分HIV-1免疫原,实验室采用的分离物、试剂和定位的表位属于亚型B。在撒哈拉以南非洲、印度和中国,新HIV感染发病率高的地区,HIV-1亚型B仅仅占感染的小部分,并且亚型HIV-1C好像是最常见的感染亚型。任何这些类型的分离物可使用本文所述的结合剂处理。一种或多种结合剂也可与一种或多种用于预防、治疗和/或减轻HIV的试剂比如例如,蛋白酶抑制剂、HIV进入抑制剂、逆转录酶抑制剂和/或抗逆转录病毒核苷类似物施用或结合。可使用适当的化合物包括例如Agenerase(安普那韦)、Combivir(Retrovir/Epivir)、Crixivan(茚地那韦)、Emtriva(恩曲他滨)、Epivir(3tc/拉米夫定)、Epzicom、Fortovase/Invirase(沙奎那韦)、Fuzeon(恩夫韦地)、Hivid(ddc/扎西他滨)、Kaletra(洛匹那韦)、Lexiva(福沙那韦)、Norvir(利托那韦)、Rescriptor(迪拉夫定)、Retrovir/AZT(齐多夫定)、Reyatax(阿扎那韦,BMS-232632)、Sustiva(依法韦仑)、Trizivir(阿巴卡韦/齐多夫定/拉米夫定)、Truvada(恩曲他滨/泰诺福韦DF)、Videx(ddI/地达诺欣)、Videx EC(ddI,地达诺欣)、Viracept(奈韦拉平)、Viread(富马酸替诺福韦酯)、Zerit(d4T/司他夫定)和Ziagen(阿巴卡韦)。其他适当的试剂是本领域技术人员已知的并且可适于如本文所描述的用途。这种试剂可在施用结合剂和/或使用本文所述的方法之前、期间或之后使用。

[0078] 如上述,本文所述的PD-1结合剂(例如,PD-1拮抗物)可用于治疗和/或预防和/或减轻癌症的症状。示例性癌症可包括例如乳腺癌、血液癌、结肠癌、胃癌、直肠癌、骨骼组织癌、皮肤癌(例如,黑素瘤)、脑癌、肺癌、膀胱癌、肾癌、卵巢癌和/或肝癌等等中的任意。一种或多种结合剂也可与用于预防、治疗和/或减轻癌症的一种或多种试剂结合和/或施用或联合,这种试剂比如例如,烷基化试剂(例如,任何氮芥、亚硝基脲、四嗪、氮丙啶、顺铂和/或其衍生物)、抗代谢物(例如,任何甲氨蝶呤、培美曲塞、氟尿嘧啶和/或其衍生物)、抗微管试剂(例如,长春花生物碱、紫杉烷、鬼臼毒素和/或其衍生物)、拓扑异构酶I和/或II抑制剂(例如,喜树碱、伊立替康、拓扑替康、足叶乙甙、多柔比星、米托蒽醌、替尼泊甙、新生霉素、美巴龙(merbarone)、阿柔比星和/或其衍生物)和/或细胞毒素抗生素(例如、任何蒽环类、放线菌素、博来霉素、普卡霉素和丝裂霉素和/或其衍生物)。一种或多种结合剂也可,或可选地,结合一种或多种本领域普通技术人员可得的用于治疗、预防和/或减轻癌症的其他结合剂,比如例如,尼伏鲁单抗、Lambrolizumab、皮地珠单抗和/或其他类似的试剂和/或其衍生物。其他适当的试剂是本领域技术人员已知的并且可适于如本文所描述的用途。这种试剂可在施用结合剂和/或使用本文所述的方法之前、期间或之后施用。

[0079] 如上述,本文所述的PD-1结合剂(例如,PD-1激动剂)可用于治疗和/或预防和/或减轻自身免疫的症状。示例性自身免疫病症可包括例如其中PD-1参与保持自身耐受的任何病症和/或涉及炎症T细胞(例如,自体反应或自身抗原特异性T细胞)的病症,比如,例如,系统性红斑狼疮(SLE)、I型糖尿病、类风湿性关节炎、肾小球性肾炎和多发性硬化。这种PD-1结合剂也可与其他试剂比如抗CTLA-4试剂(例如,伊匹单抗)组合。一种或多种结合剂也可与用于预防、治疗和/或减轻自身免疫的一种或多种试剂组合和/或施用或结合,比如例如糖皮质激素、细胞抑制剂(例如,烷基化试剂、抗代谢物、氨甲喋呤、硫唑嘌呤、巯基嘌呤、细胞毒素抗生素(例如,更生霉素、蒽环类、丝裂霉素C、博来霉素、光辉霉素)、抗体(例如,Atgam、即复宁(Thymoglobuline)、舒莱(Simulect)、赛尼哌(Zenapax))、作用于免疫亲和素

的药物(例如,环孢素、他克莫司、西罗莫司)、干扰素、阿片类、TNF-结合剂(例如,类克(Remicade)、恩利(Enbrel)、修美乐(Humira))、麦考酚酯、芬戈莫德、多球壳菌素和/或其衍生物。其他适当的试剂是本领域技术人员已知的并且可适于如本文所描述的用途。这种试剂可在施用结合剂和/或使用本文所述的方法之前、期间或之后施用。

[0080] 在一些实施方式中,结合剂可连接至和/或缀合至一种或多种可检测的标签。例如,适当的可检测的标签可包括例如荧光素(例如,DyLight、Cy3、Cy5、FITC、HiLyte Fluor 555、HiLyte Fluor 647;5-羧基-2,7-二氯荧光素;5-羧基荧光素(5-FAM);5-HAT(羟基色胺);5-羟基色胺(HAT);6-JOE;6-羧基荧光素(6-FAM);FITC;6-羧基-1,4-二氯-2',7'-二氯荧光素(TET);6-羧基-1,4-二氯-2',4',5',7'-四-氯荧光素(HEX);6-羧基-4',5'-二氯-2',7'-二甲氧基荧光素(JOE);Alexa fluors(例如,350、405、430、488、500、514、532、546、555、568、594、610、633、635、647、660、680、700、750);BODIPY荧光团(例如,492/515、493/503、500/510、505/515、530/550、542/563、558/568、564/570、576/589、581/591、630/650-X、650/665-X、665/676、FL、FL ATP、FI-神经酰胺、R6G SE、TMR、TMR-X缀合物、TMR-X、SE、TR、TR ATP、TR-X SE))、若丹明(例如,110、123、B、B 200、BB、BG、B extra、5-羧基四甲基若丹明(5-TAMRA)、5GLD、6-羧基若丹明6G、丽丝胺、丽丝胺若丹明B、Phallicidine、鬼笔环肽、Red、Rhod-2、ROX(6-羧基-X-若丹明)、5-ROX(羧基-X-若丹明)、磺酰若丹明B can C、磺酰若丹明G extra、TAMRA(6-羧基四甲基若丹明)、四甲基若丹明(TRITC)、WT)、德克萨斯红,和/或德克萨斯红-X。本领域已知的其他可检测的标签也可适于使用。使用本领域的标准技术,结合剂,比如抗体,可连接至和/或缀合至一种或多种可检测的标签。

[0081] 在某些实施方式中,编码本文所述的一种或多种结合剂的核酸分子可插入一种或多种表达载体,如下面更详细地讨论。在这种实施方式中,结合剂可由对应于氨基酸序列的核苷酸编码。编码各种氨基酸(AA)的核苷酸(密码子)的具体的组合是本领域熟知的,如在本领域技术人员使用的各种参考中描述的(例如,Lewin,B.Genes V,Oxford University Press,1994)。例如,编码所述结合剂的氨基酸的核苷酸序列可参考表4确定。核酸变体可使用编码结合剂的核苷酸的任何组合。

[0082] 表4

[0083] 编码其变体的SEQ ID NOS.1-138的氨基酸(AA)的密码子

[0084]

AA	密码子	AA	密码子	AA	密码子	AA	密码子
Phe (F)	TTT	Ser (S)	TCT	Tyr (Y)	TAT	Cys (C)	TGT
	TTC		TCC		TAC		TGC
Leu (L)	TTA		TCA	TERM	TAA	TERM	TGA
	TTG		TCG		TAG	Trp (W)	TGG
	CTT	Pro (P)	CCT	His (H)	CAT	Arg (R)	CGT
	CTC		CCC		CAC		CGC
	CTA		CCA	Gln (Q)	CAA		CGA
	CTG		CCG		CAG		CGG
Ile (I)	ATT	Thr (T)	ACT	Asn (N)	AAT	Ser (S)	AGT
	ATC		ACC		AAC		AGC
	ATA		ACA	Lys (K)	AAA	Arg (R)	AGA
Met (M)	ATG		ACG		AAG		AGG
Val (V)	GTT	Ala (A)	GCT	Asp (D)	GAT	Gly (G)	GGT
	GTC		GCC		GAC		GGC
	GTA		GCA	Glu (E)	GAA		GGA
	GTG		GCG		GAG		GGG

[0085] 本领域技术人员理解编码具体氨基酸序列的核苷酸序列可容易地衍生自氨基酸序列和表4中呈现的信息。例如,可从氨基酸序列DDFLH (SEQ ID NO.:1) 和表4中呈现的信息推断,氨基酸序列可由核苷酸序列GAT GAT TTT TTA CAT (SEQ ID NO.:139) 编码。本领域普通技术人员将理解,编码SEQ ID NOS.2-138的核苷酸序列可以以相同的方式推断,并且本文考虑这种核苷酸序列。在结合剂是抗体的情况下,编码其可变区的核苷酸序列也可分离自噬菌体和/或表达其的克隆至表达载体的杂交瘤细胞,以产生某些制剂(例如,人源化抗体)。产生这种制剂的方法是本领域熟知的。

[0086] 为了确定感兴趣的可变区(例如,CDR)的氨基酸序列,可使用本文所述的功能试验和本领域普通技术人员容易获得的克隆技术选择来自用PD-1抗原/免疫原免疫的小鼠的杂交瘤细胞。例如,为了分离和测序编码所选择的杂交瘤的重链和轻链可变区的核酸,可使用TRIzol试剂根据制造商的方案从新鲜杂交瘤细胞提取总RNA。可使用同种型特异性反义引物或通用引物使用标准技术(例如,根据PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit的技术手册),从RNA合成cDNA。可然后进行聚合酶链式反应(PCR),以扩增由选择的杂交瘤产生的抗体的编码可变区(重链和轻链)的核酸,其可然后分别被克隆至标准克隆载体并且被测序。可然后进行集落PCR筛选,以鉴定具有正确尺寸的插入片段(insert)的克隆。优选地,对不小于五个具有正确尺寸的插入片段的单集落的抗体可变区进行测序。标准方案可然后用于抗PD-1抗体的表达和纯化。例如,杂交瘤克隆可在无血清培养基中生长并且使细胞培养发酵液离心并且然后过滤。可然后将所过滤的包含抗体的上清液上载在亲和性柱(例如,蛋白质A)柱子上,用适当的缓冲液(例如,Pierce IgG洗脱缓冲液)冲洗和洗脱。可然后聚集所洗脱的馏分并且缓冲液交换成PBS, pH 7.2。可然后经由SDS-PAGE和蛋白质印迹通

过使用对于分子量、产率和纯度的标准方案分析所纯化的抗体。可然后在适当的柱子(例如,TSK GEL-G3000SWXL柱(Tosoh))上进行尺寸排阻色谱HPLC,用于生物物理学表征,以确保高的抗体纯度(一般>90%),具有少的蛋白质聚集物。这些程序用于从所选择的杂交瘤细胞分离和测序编码SEQ ID NOS.1-138的核酸。如本领域普通技术人员将理解的,这些技术,其变型,和/或其他技术也可用于这些目的。

[0087] 编码一种或多种PD-1结合剂的核酸分子可包含在病毒和/或非病毒载体中。在一个实施方式中,DNA载体用于将编码一种或多种PD-1结合剂的核酸递送至患者。这样做时,各种策略可用于提高这种机制的效率,包括例如使用自复制病毒复制子(Caley等1999.Vaccine,17:3124-2135;Dubensky等2000.Mol.Med.6:723-732;Leitner等2000.Cancer Res.60:51-55);密码子优化(Liu等2000.Mol.Ther.,1:497-500;Dubensky, supra;Huang等2001.J.Virol.75:4947-4951);体内电穿孔(Widera等2000.J.Immunol.164:4635-3640);并入编码共刺激分子、细胞因子和/或趋化因子的核酸(Xiang等1995.Immunity,2:129-135;Kim等1998.Eur.J.Immunol.,28:1089-1103;Iwasaki等1997.J.Immunol.158:4591-3601;Sheerlinck等2001.Vaccine,19:2647-2656);并入刺激基序比如CpG(Gurunathan,上文;Leitner,上文);靶向内吞或泛素加工途径的序列(Thomson等1998.J.Virol.72:2246-2252;Velders等2001.J.Immunol.166:5366-5373);初免加强策略(prime-boost regimen)(Gurunathan,supra;Sullivan等2000.Nature,408:605-609;Hanke等1998.Vaccine,16:439-445;Amara等2001.Science,292:69-74);蛋白酶体-敏感切割位点;和使用粘膜递送载体比如沙门氏菌(Darji等1997.Cell,91:765-775;Woo等2001.Vaccine,19:2945-2954)。其他方法是本领域已知的,下面描述了其中的一些。已经成功用于将核酸引入至宿主的各种病毒载体包括逆转录病毒、腺病毒、腺伴随病毒(AAV)、疱疹病毒和痘病毒等等。可使用本领域技术人员广泛可用的标准重组体技术构建载体。这种技术可见于常规的分子生物学参考中,比如Molecular Cloning:A Laboratory Manual(Sambrook等1989,Cold Spring Harbor Laboratory Press)、Gene Expression Technology(Methods in Enzymology,Vol.185,edited by D.Goeddel,1991.Academic Press,San Diego,CA)和PCR Protocols:A Guide to Methods and Applications(Innis等1990.Academic Press,San Diego,ca)。“非病毒”质粒载体也可适于某些实施方式。优选的质粒载体与细菌、昆虫和/或哺乳宿主细胞兼容。这种载体包括例如PCR-ii、PCR3和pcDNA3.1(Invitrogen,San Diego,CA)、pBSii(Stratagene,La Jolla,CA)、pet15(Novagen,Madison,WI)、pGEX(Pharmacia Biotech,Piscataway,NJ)、pEGFp-n2(Clontech,Palo Alto,CA)、pET1(Bluebaccii,Invitrogen)、pDSR- α (PCT公开号W0 90/14363)和pFASTBACdual(Gibco-BRL,Grand island,NY)以及Bluescript[®]质粒衍生物(基于高拷贝数COLel1的噬菌粒,Stratagene Cloning Systems,La Jolla,CA)、设计用于克隆TAQ-扩增的PCR产物的PCR克隆质粒(例如,TOPO[™] TAcloning[®]试剂盒,PCR2.1[®]质粒衍生物,Invitrogen,Carlsbad,CA)。也可使用细菌载体。这些载体包括例如志贺氏杆菌、沙门氏菌、霍乱弧菌、乳杆菌、卡介苗(BCG)和链球菌(见例如,W0 88/6626、W0 90/0594、W0 91/13157、W0 92/1796和W0 92/21376)。许多其他非病毒质粒表达载体和系统是本领域已知的并且可被使用。也可使用(suffice)其他递送技术,包括例如DNA-配体复合物、腺病毒-配体-DNA复

合物、DNA的直接注射、CaPO₄沉淀、基因枪技术、电穿孔和胶体分散系统。胶体分散系统包括大分子复合物、纳米胶囊、微球、磁珠和包括水包油乳液的基于脂质的系统、胶束、混合胶束和脂质体。优选的胶体系统是脂质体,其是用作体外和体内递送媒介的人工膜囊。RNA、DNA和完整的病毒粒子可被封装在水性内部并且以生物活性形式被递送至细胞 (Fraley, R. 等 1981, Trends Biochem. Sci., 6:77)。脂质体的组合物通常是磷脂,尤其是高相变温度磷脂的组合,通常与类固醇类,尤其胆固醇结合。也可使用其他磷脂或其他脂质。脂质体的物理特征取决于pH、离子强度和二价阳离子的存在。用于脂质体生产的脂质的例子包括磷脂酰化合物,比如磷脂酰甘油、磷脂酰胆碱、磷脂酰丝氨酸、磷脂酰乙醇胺、鞘脂类、脑苷脂和神经节苷脂。尤其有用的是二酰基磷脂酰甘油,其中脂质部分包含14-18个碳原子,尤其16-18个碳原子,并且是饱和的。示意性磷脂包括卵磷脂酰胆碱、二棕榈酰磷脂酰胆碱和二硬脂酰磷脂酰胆碱。

[0088] 也提供了包括载体的培养的细胞。培养的细胞可以是以载体转染的培养的细胞或细胞的子代,其中细胞表达免疫原性多肽。适当的细胞系是本领域技术人员已知的并且是商业上可获得的,例如,通过美国模式培养物研究所 (American Type Culture Collection) (ATCC)。转染的细胞可用于产生免疫原性多肽的方法。该方法包括在允许表达免疫原性多肽的条件下,任选地在表达序列的控制下培养包括载体的细胞。可使用标准蛋白质纯化方法从细胞或培养基分离免疫原性多肽。

[0089] 技术人员掌握许多适当的技术用于使用本文所述的结合剂(例如,抗体)来鉴定包含与其结合的蛋白质的生物样品。例如,使用例如免疫沉淀或其他捕获类型试验,抗体可用于分离PD-1。通过将抗体附着至固体载体或层析材料(例如,包被有蛋白质A、蛋白质G和/或蛋白质L的磁珠)来进行该熟知的技术。接着,将结合的抗体引入至包含或认为包含PD-1的溶液(例如,感染HIV的T细胞裂解物)。PD-1可然后结合至抗体并且在PD-1保持与抗体结合的条件下冲洗掉非结合材料。结合的蛋白质可然后与抗体分离并且根据需要来分析。使用抗体用于分离蛋白质的类似的方法是本领域熟知的。结合剂(例如,抗体)也可用于检测生物样品中的PD-1。例如,抗体可用于试验比如,例如,流式细胞术分析、ELISA、免疫印迹(例如,蛋白质印迹)、原位测定、免疫细胞化学和/或免疫组织化学。进行这种试验的方法是本领域熟知的。

[0090] 本文所述的结合剂也可用于确定患者中疾病状态的存在,以预测预后或确定化疗或其他治疗方案的效力。如本文所描述进行的或如本领域另外已知的表达谱分析(expression profile assay)可用于确定PD-1的表达的相对水平。可然后,使表达的水平与基础(例如,对照)水平相关联,以确定患者中是否存在具体的疾病、患者的预后,或具体的治疗方案是否有效。例如,如果患者用具体的抗感染方案治疗,则患者组织(例如,外周血、乳腺组织活检组织)中增加或降低的PD-1的表达水平可指示方案恶化或改善了宿主中传染剂的载荷。表达的增加或降低可指示方案具有或没有期望的作用并且所以可选择另一治疗形式。

[0091] 也可能使用本文所述的结合剂作为药物筛选试验中的试剂,以测试,例如,新的候选药物。试剂可用于确定药物候选物对患者的细胞系或细胞或组织中免疫原性靶标的表达的作用。表达谱技术可与高通量筛选技术结合,以允许快速鉴定有用的化合物和监测用药物候选物治疗的效力(见,例如,Zlokarnik等,Science 279,84-8(1998))。药物候选物可以

是化学化合物、核酸、蛋白质、抗体,或其衍生物,无论是天然存在的或合成衍生的。这样鉴定的药物候选物可用作施用至患者或用于进一步筛选试验的药物组合物等其他用途。

[0092] 在一些实施方式中,结合剂为纯化的形式。“纯化的”结合剂(例如,抗体)可以是分离自至少约50%的与其最初一起存在的蛋白质和/或其他组分的结合剂(例如,在单克隆抗体的情况下,作为杂交瘤上清液或腹水制剂的一部分)。纯化的结合剂(例如,抗体)可以是分离自至少约50%、60%、75%、90%、或95%的与其最初一起存在的蛋白质和/或其他组分的结合剂。

[0093] 在施用至宿主之前,本文所述的多肽和核酸可结合一种或多种药学上可接受的载体。药学上可接受的载体是非生物或以其他方式非期望的材料,例如,该材料可施用至受试者,而不造成任何非期望的生物作用或以有害的方式与包含其的药物组合物的任何其他组分相互作用。载体可以是自然选择的,以使活性成分的任何降解最小化并且以使受试者中任何不利副作用最小化,如本领域技术人员熟知的。适当的药学载体和它们的制剂描述在,例如,Remington's: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, David B. Troy, ed., Lippicott Williams & Wilkins (2005) 中。典型地,适量的药学上可接受的盐用于制剂,以使制剂等渗。药学上可接受的载体的例子包括但不限于无菌水、生理盐水、缓冲溶液,如林格溶液和右旋糖溶液。溶液的pH一般是约5至约8或约7至约7.5。其他载体包括持续释放制剂,比如包含多肽或其片段的固体疏水聚合物的半渗透基质。基质可以为有形物体的形式,例如,膜、脂质体或微粒。对于本领域技术人员显而易见的,某些载体可以是更优选的,这取决于,例如,被施用的组合物的施用的路径和浓度。载体是适于施用多肽和/或其片段至人或受试者的那些。除了免疫原性多肽,药物组合物也可包括载体、增稠剂、稀释剂、缓冲剂、防腐剂、表面活性剂、佐剂、免疫刺激剂。药物组合物也可包括一种或多种活性成分,比如抗微生物剂、消炎剂和麻醉剂。药物组合物可被口服、肠胃外、吸入喷雾、直肠、节点内(intranodally)或局部施用,以包含常规的药学上可接受的载体、佐剂和媒介的剂量单位制剂。如本文使用的,术语“药学上可接受的载体”或“生理学上可接受的载体”指适于实现或增强作为药物组分的核酸、多肽或肽的递送的一种或多种制剂材料。“药物组合物”是包括治疗有效量的核酸或多肽的组合物。术语“有效量”和“治疗有效量”分别指用于观察期望的疗效(例如,恢复T细胞功能)的结合剂、核酸等的量。

[0094] 也提供了用于治疗哺乳动物宿主中的一种或多种疾病病症(例如,HIV或癌症)的方法,其包括向哺乳动物施用至少一个或多个有效剂量的本文所述的一种或多种结合剂(和/或其衍生物)。在一些实施方式中,结合剂是单克隆抗体或其片段或衍生物,其包括SEQ ID NOS. 1-138和/或表1A和1B中显示的一个或多个。一种或多种结合剂可被施用的剂量是约1至约50mg/kg、约1至约30mg/kg、或约5至约30mg/kg(例如,约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、35、或40mg/kg中的任何)。在某些实施方式中,一种或多种结合剂可以以约10mg/kg向哺乳动物施用(例如,皮内、静脉内、口服、直肠)一次或多次。当施用多个剂量时,在各自的给药中,剂量可包括大概相同或不同量的结合剂。给药也可彼此以相同或不同间隔的时间间隔。例如,给药可间隔约任何6、12、24、36、48、60、72、84或96小时,1周、2周、3周、1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、1.5年、2年、3年、4年、5年,或任何这些时间段之前、之后和/或之间的任何时间段。在一些实施方式中,结合剂可结合其他试剂(例

如,抗感染剂和/或化疗剂)施用。这种其他试剂可与结合剂大概同时,或在不同的时间和/或频率施用。这种方法的其他方式也可以是合适的,如可被本领域普通技术人员容易理解的。

[0095] 为了帮助技术人员使用本文所述的抗体,其可提供为试剂盒形式。提供了包括这种抗体和任选地对于使用抗体检测表达PD-1的细胞必要的其他组分的试剂盒。可以任何适当的形式提供试剂盒的抗体,包括冷冻、冻干或在药学上可接受的缓冲液比如TBS或PBS中。试剂盒也可包括体外或体内利用抗体所需的其他试剂,比如缓冲液(例如,TBS,PBS)、封闭剂(包括无脂奶粉、正常血清、Tween-20清洁剂、BSA或酪蛋白),和/或检测试剂(例如,山羊抗小鼠IgG生物素、链霉抗生物素-HRP缀合物、别藻蓝素、B-藻红蛋白、R-藻红蛋白、过氧化物酶、可检测的标签,和其他标签和/或染色试剂盒(例如,ABC染色试剂盒,Pierce))。试剂盒也可包括其他试剂和/或在上述常用试验中比如,例如,流式细胞术分析、ELISA、免疫印迹(例如,蛋白质印迹)、原位测定、免疫细胞化学、免疫组织化学中使用抗体的说明书。在一个实施方式中,试剂盒提供纯化形式的结合剂。在另一实施方式中,结合剂可提供为生物素化的形式,单独或与抗生物素蛋白-缀合的检测试剂(例如,抗体)一起。在另一实施方式中,试剂盒包括含有一种或多种可用于直接检测PD-1的可检测标签的结合剂。使用任何这些系统需要的缓冲液等是本领域熟知的和/或可通过终端使用者制备或提供为试剂盒的组分。试剂盒也可包括固体载体,其包含阳性和阴性对照蛋白质和/或组织样品。例如,用于进行斑点(spotting)或蛋白质印迹类型试验的试剂盒可包括用于SDS-PAGE的对照细胞或组织裂解物或包含对于实验样品具有另外的空间的预先固定的对照样品的尼龙或其他膜。用于在载玻片上可视化细胞中PD-1的试剂盒可包括预先格式化的载玻片,其包含对于实验样品具有空间的对照细胞或组织样品。本文也考虑试剂盒的其他实施方式,如本领域普通技术人员所理解的。

[0096] 因此,本公开提供了竞争地或拮抗地结合PD-1的结合剂。在一些实施方式中,结合剂是包括选自SEQ ID NOS.1-138和/或显示在表1A和1B的至少一条氨基酸序列的多肽。在一些实施方式中,结合剂是包括SEQ ID NOS.1-138(例如,如表1A和/或1B中显示)的一个或多个组合的多肽。在一些实施方式中,结合剂是抗体。在一些实施方式中,结合剂是多肽,比如包括选自SEQ ID NOS.1-23的重链CDR1氨基酸序列的抗体。在一些实施方式中,结合剂是多肽,比如包括选自SEQ ID NOS.24-46的重链CDR2氨基酸序列的抗体。在一些实施方式中,结合剂是多肽,比如包括选自47-69的重链CDR3氨基酸序列的抗体。在一些实施方式中,结合剂是多肽,比如包括选自SEQ ID NOS.70-92的轻链CDR1氨基酸序列的抗体。在一些实施方式中,结合剂是多肽,比如包括选自SEQ ID NOS.93-115的重链CDR2氨基酸序列的抗体。在一些实施方式中,结合剂是多肽,比如包括选自116-138的重链CDR3氨基酸序列的抗体。在一些实施方式中,结合剂包括表1A和/或1B中显示的CDR的组合和/或具有表2中描述的性质。在一些实施方式中,结合剂衍生自或相关于(例如,通过测序或衍生)人抗体、人IgG、人IgG1、人IgG2、人IgG2a、人IgG2b、人IgG3、人IgG4、人IgM、人IgA、人IgA1、人IgA2、人IgD、人IgE、犬抗体、犬IgGA、犬IgGB、犬IgGC、犬IgGD、鸡抗体、鸡IgA、鸡IgD、鸡IgE、鸡IgG、鸡IgM、鸡IgY、山羊抗体、山羊IgG、小鼠抗体、小鼠IgG、猪抗体和/或大鼠抗体和/或其衍生物。在一些实施方式中,衍生物可选自F_{ab}、F_{ab}2、F_{ab}' 单链抗体、F_v、单链单特异性抗体、双特异性抗体、三聚抗体、多特异性抗体、多价抗体、嵌合抗体、犬-人嵌合抗体、犬-小鼠嵌合抗体、包括

犬Fc的抗体、人源化抗体、人抗体、犬化抗体、CDR移植抗体、鲨鱼抗体、纳米抗体,和/或骆驼化抗体。在一些实施方式中,结合剂包括至少第一和第二特异性,第一特异性针对PD-1和第二特异性针对不同的抗原(例如,传染剂比如HIV(例如,env)的抗原和/或肿瘤抗原)。在一些实施方式中,结合剂和/或其衍生物可包括可固定地与其连接的可检测标签。在一些实施方式中,任何一种的结合剂和/或其衍生物包括可固定地与其连接的效应子部分(例如,细胞毒素药物、毒素、白喉A链、外毒素A链、蓖麻毒素A链、相思子毒素A链、麻疯树毒蛋白、巴豆毒素、酚霉素、伊诺霉素和放射化学品)。在一些实施方式中,也提供了编码一种或多种结合剂的多核苷酸(例如,表达载体)。也提供了包括和/或表达这种多核苷酸的多肽产物的宿主细胞。在一些实施方式中,也提供了组合物,其包括至少一种结合剂或衍生物;至少一种分离的多核苷酸;至少一种表达载体;和/或至少一种宿主细胞;或其组合;和药学上可接受的载体。

[0097] 本公开也提供了检测细胞上PD-1的方法,该方法包括使测试生物样品与本文所述的结合剂或衍生物接触并且检测与生物样品或其组分结合的结合剂。这种方法可以是体内方法或体外方法。在一些实施方式中,方法可包括比较结合至测试生物样品或其组分的量与结合至对照生物样品或其组分的量,其中相对于对照生物样品或其组分,与测试生物样品或其组分增加的结合指示测试生物样品(例如,哺乳动物血液)中存在表达PD-1的细胞。在一些实施方式中,提供了通过下述用于鉴定PD-1抗体结合剂的系统,由衰竭功能恢复试验(EFRA)测试候选结合剂;确定候选结合剂对于PD-1的亲合力;和,确定候选结合剂的CDR的核苷酸序列。

[0098] 在一些实施方式中,一种用于检测细胞中或细胞上PD-1表达的试剂盒,该试剂盒包括结合剂或其衍生物和使用说明书。在一些实施方式中,结合剂和/或其衍生物为冻干形式。

[0099] 在一些实施方式中,本公开提供了用于治疗、预防和/或减轻哺乳动物中传染病、癌症和/或自身免疫的方法,包括向哺乳动物施用至少一种有效剂量的包括结合剂或其衍生物的药物组合物。在一些实施方式中,传染病是人免疫缺陷病毒(HIV)。在一些实施方式中,用于治疗传染病和/或癌症的结合剂和/或其衍生物是PD-1拮抗剂。在一些实施方式中,用于治疗自身免疫病症的结合剂和/或其衍生物是PD-1激动剂。在一些实施方式中,向所述动物施用多个剂量。在一些实施方式中,可以约1至50mg/kg的剂量施用结合剂和/或其衍生物。

[0100] 本公开也提供了PD-1结合剂的组合。在一些实施方式中,组合包括阻断PD-1和PD-L1的相互作用的第一结合剂和不阻断PD-1和PD-L1的相互作用的第二结合剂。这种组合可用于本文所述的或本领域技术人员可另外确定的任何用途。例如,这种组合可用于本文所述的治疗、预防和/或减轻哺乳动物中传染病、癌症和/或自身免疫的方法中。

[0101] 本公开也提供了通过在细胞中表达结合剂和从细胞或细胞的培养物上清液分离结合剂,来产生本文所述的结合剂的方法。在一些实施方式中,这种方法可进一步包括表达编码这种结合剂的核酸。在一些实施方式中,这种方法也可包括将分离后的结合剂与一种或多种药学上可接受的赋形剂结合。

[0102] 本公开也提供了产生结合剂比如阻断PD-1和PD-L1的相互作用的第一结合剂和不阻断PD-1和PD-L1的相互作用的第二结合剂的组合的方法。在一些实施方式中,第二结合剂

结合PD-1。在一些实施方式中,第一和/或第二结合剂是抗体,如单克隆抗体或其片段或衍生物。在一些实施方式中,第二结合剂包括氨基酸序列SEQ ID NOS.2、25、48、71、94和117;或SEQ ID NOS.17、40、63、86、109和132。在一些实施方式中,这些方法可进一步包括添加药学上可接受的赋形剂。

[0103] 术语“大约(about)”、“大概(approximately)”等,当在一列数值或范围之前时,独立地指代该列或范围中的各个单独值,如同该术语就在该列或范围内的各个单独值之前。该术语意思是指代的值精确地是、接近或类似于该值。

[0104] 如本文所使用,受试者或宿主意思是个体。受试者可包括家养的动物,比如猫和狗、牲畜(例如,牛、马、猪、绵羊和山羊)、实验室动物(例如,小鼠、兔子、大鼠、豚鼠)和鸟类。在一个方面中,受试者是哺乳动物比如灵长类或人。

[0105] 任选的或任选地意思是随后描述的事件或情况可出现或不出现,并且该描述包括出现该事件或情况的例子和其不出现的例子。例如,短语任选地组合物可包括组合,意思是组合物可包括不同分子的组合或可不包括组合,使得描述即包括组合也包括没有组合(即,组合的个体成员)。

[0106] 范围在本文可表达为大约一个具体的值,和/或至大约另一具体的值。当表达这种范围时,另一方面包括从一个具体的值和/或至另一具体的值。类似地,当使用先前的大约或大概,值表达为近似值时,应当理解具体的值形成另一方面。应进一步理解,每个范围的端点即与另一端点显著有关系的,也独立于另一端点。范围(例如,90-100%)意思是包括范围本身以及范围内的每个独立值,如同单独地列出了每个值。

[0107] 术语“组合(combined)”或“组合(in combination)”或“结合(in conjunction)”可指一起施用的试剂的物理组合或在用于治疗、预防和/或减轻具体疾病的方案(例如,物理和/或时间上分别施用)中两种或更多种试剂的使用的物理组合。

[0108] 当本文结合用于给定的病症(例如,预防癌症、HIV感染)的给定治疗使用术语治疗、预防和/或减轻或其衍生字时,意思是表达治疗的患者根本不发展临床上可观察到水平的病症,或更缓慢地和/或比他/她没有治疗时更低程度地发展。无论什么,这些术语不仅仅限于患者未经历病症方面的情况。例如,如果在将患者暴露于可预期产生给定病症表现的刺激期间给予治疗,并且使得患者经受比另外预期的该病症更少的和/或轻微症状,则认为治疗已经预防了病症。例如,通过使患者仅仅展示感染的轻微明显症状,治疗可“预防”感染;这不意味着感染微生物必须不渗透任何细胞。

[0109] 类似地,如本文结合通过具体的治疗预防、治疗和/或减轻给定病症使用的减轻(reduce)、减轻(reducing)和减轻(reduction),通常指受试者与在没有治疗(例如,施用一种或多种PD-1结合剂)情况下发展感染的对照或基础水平相比,更缓慢地或较低程度地发展感染。感染风险的降低可使得患者仅仅展示感染的轻微明显的症状或延迟感染的症状;这并不意味着感染微生物必须不渗透任何细胞。

[0110] 本公开引用的所有参考文献通过引用以它们的整体并入本文。在下面的实施例中进一步描述某些实施方式。提供这些实施方式仅仅作为实施例并且决不旨在以任何方式限制权利要求的范围。

实施例

[0111] 实施例1

[0112] PD-1结合剂的产生和表征

[0113] 四种小鼠品种(总共16只小鼠)已经用两种PD-1蛋白,即人PD-1Fc融合蛋白和人PD-1单体蛋白免疫。已经选择对于激活的人T淋巴细胞上表达的PD-1显示血清反应性的小鼠,用于产生抗PD-1杂交瘤细胞系。选择了总共240个PD-1杂交瘤细胞系,用于产生结合至重组PD-1蛋白的抗体。用于第一轮抗体选择的主要标准是:i)通过流式细胞术激活的人T淋巴细胞上的PD-1的染色;ii)与现有抗PD-1抗体的那些相比,CDR VH和VL序列的多样性;和iii)通过PD-1缀合的Luminex磁珠与两个商业上可获得的结合至PD-1上不同表位的抗PD-1抗体的竞争结合研究进行表位定位。接着通过如下进行第二轮选择:iv)亲和力结合试验(不是主要标准,因为其与抗PD-1抗体的刺激潜能不相关);v)在Luminex生物化学试验中评估结合PD-1并且与PD-L1的结合是竞争、部分竞争或非竞争的抗PD-1抗体;和vi)抗体作为激动剂(不能从功能衰竭恢复T-细胞)或拮抗物(能够从功能衰竭恢复T-细胞)的功能表征。在这些研究中,测试抗体并且基于它们援救HIV特异性衰竭CD8T-细胞中的增殖能力来区分。

[0114] 在从单个细胞培养的杂交瘤细胞克隆中初始筛选抗体上清液时,进行EFRA试验,以评估抗PD1抗体对HIV特异性CD8T细胞的增殖的功能效果(图2)。在上面框(box)中的抗体克隆(E8-3、C2-3、E1-3、F3-3、H8-3、C10-2、G2-1、G3-2、H2-1和H4-2)用作PD-1拮抗物并且刺激增殖,而在下面框中的抗体克隆(C8-1和G10-2)是竞争性的并且促进PD-1负调节作用。肽对照(Pep 8)诱导的增殖水平以较低水平线指示(仅在1%以下),并且Merck MK-3475抗PD1抗体诱导的增殖以较上水平线显示(仅在2%以上)。通过这些方法鉴定的感兴趣的抗体进行第二轮亚克隆并且所得杂交瘤克隆用于产生和纯化表2中的抗体。用纯化的抗PD-1抗体进行结合试验,以确保亚克隆保留它们对PD-1的亲和力。在激活的CD4T-细胞上,评估抗PD-1抗体对细胞表面PD-1的浓度应答结合(图3)。

[0115] EFRA提供用于选择从功能衰竭恢复T-细胞但是不必是拮抗的结合剂,意思是不必干扰PD-1和其生物配体(例如,PD-L1或PD-L2)的相互作用的那些结合剂。EFRA的实施方式鉴定结合PD-1的这种结合剂(抗体)。用两个独立的生物化学试验进行结合至PD-1的抗体的表位定位。在一个试验中,评估两个商业抗PD-1抗体(BMS-5C4和MK3475)之一和列举的抗PD-1抗体(也描述在表2中)之间与PD-1Fc融合蛋白标记的磁珠的竞争结合。基于该试验鉴定了结合至不同的表位的四类单克隆抗体。这些是:类别1(与阻断PD-1与PD-L1的相互作用的EH12.2H7商业单克隆抗体克隆竞争)、类别2(与结合PD-1但是不有效阻断PD-1与PD-L1相互作用的J116商业单克隆抗体克隆竞争)、类别3(与EH12.2H7和J116商业单克隆抗体都竞争),和类别4(与EH12.2H7或J116商业抗体不竞争)。这些抗体对于细胞表面PD-1的相对结合由相对于图4中对照抗PD-1抗体的平均荧光强度(MFI)来表示。这些结果显示从所有四个结合类别中鉴定了紧密的结合抗体。第二Luminex结合试验用于直接评估抗PD-1抗体是否阻断PD-1和PD-L1之间的相互作用。使用PD-1Fc融合蛋白包被的磁珠进行该试验,磁珠在没有或存在不同浓度的表2中列举的抗PD-1抗体的情况下培育。接着,将固定浓度的生物素化PD-L1,大概等于PD-1/PD-L1相互作用的IC₅₀,与PD-1/抗体复合物一起培育并且使用荧光标记的链霉抗生物素检测PD-L1结合(代表性结合曲线显示在图5a-c中)。使用该生物化学试

验,抗体定义为与PD-1/PD-L1相互作用是竞争的、部分竞争的或非竞争的。鉴定了竞争、部分竞争和非竞争的抗体,其结合PD-1上不同的位点并且展示高的结合亲和力(表2)。通过用20nM的来自表2的抗PD-1抗体培育PD-1Fc融合蛋白包被的Luminex磁珠,随后用不同浓度的生物素化的PD-L1培育PD-1/抗体复合物,进一步评估结合PD-1并且与PD-L1非竞争或部分竞争的抗体。图5d-f显示竞争的抗PD-1抗体完全阻断了PD-1和PD-L1之间的相互作用。表2中列举的部分竞争和非竞争的抗PD-1抗体导致PD-L1对PD-1结合亲和力的改变,但是当PD-L1的浓度增加时不阻断相互作用。这些抗体中的一些相对于对照也显示具备统计学上显著增加的增殖(单独肽8对照或肽和在图6a和6b中的IgG1同种型对照抗体)。类别1抗体(与阻断PD-1与PD-L1相互作用的EH12.2H7商业单克隆抗体竞争的)或在PD-1/PD-L1相互作用试验中竞争的通常确定为提供改善的增殖恢复。结合来自多个EFRA实验的数据和使用MK-3475作为常见的比较物,图7显示选择表2中描述的抗体与基准MK-3475抗体相比展示等同的或统计上改善的活性($p < 0.007$)。

[0116] 实施例2

[0117] 抗体组合

[0118] 在功能衰竭恢复试验中,发现结合至不同PD-1表位的抗体的组合增强恢复HIV肽特异性CD8T-细胞增殖(图8)。也观察到了抗体类型之间的协同作用。例如,确定了类别1(图8中的MK-3475)和类别2(图8中的139D6)抗体能够同时结合PD-1。尽管对于MK-3475观察到的最大刺激一致地相对于HIV肽是大约200%,但是5 μ g/ml的MK-3475和139D6单克隆抗体的组合展示了协同作用,HIV特异性CD8T细胞增殖相对于单独HIV肽对照288%的增加或相对于单独添加的MK-3475或139D6144%增加的增殖(图8)。在数个实验测试中观察到了增殖的该协同增加,统计学上显著的p值是0.007。作为比较,单独添加10 μ g/ml的MK-3475或139D6,在EFRA中不导致增加的增殖。因此,已经确定了阻断PD-1和PD-L1的相互作用的第一结合剂与不阻断PD-1和PD-L1的相互作用的第二结合剂的组合协同作用,以援救T细胞避免衰竭。

[0119] 尽管根据优选的实施方式已经描述了某些实施方式,但是应理解,本领域技术人员容易想到变型和改进。所以,期望所附的权利要求覆盖所有在所附权利要求范围内的这种等同变型。

[0120] 参考文献

- [0121] 1.Chun TW等人Nature 387:183-188,1997
- [0122] 2.Chun TW等人Proc Natl AcadSci USA 94:13193-13197,1997
- [0123] 3.Finzi D等人Science 278:1295-1300,1997
- [0124] 4.Chomont N等人Nat Med 15:893-900,2009
- [0125] 5.Siliciano JD等人Nat Med 9:727-728,2003
- [0126] 6.Perreau M等人J Exp Med 210:143-156,2013
- [0127] 7.Rong L和Perelson AJ Theoret Biol 260:308-331,2009
- [0128] 8.Sigal A等人Nature 477:95-98,2011
- [0129] 9.Katlama C等人Lancet 381:2109-2117,2013
- [0130] 10.Hansen SG等人Nature 503:100-106,2013
- [0131] 11.Klein F等人Nature 492:518-522,2012
- [0132] 12.Barouch DH等人Nature 503:224-228,2013

- [0133] 13.Trautmann L等人Nat Med 12:1198-1202,2006
- [0134] 14.Day CL等人Nature 443:350-354,2006
- [0135] 15.Archin NM等人Nature487:482-485,2012
- [0136] 16.Sievers EL和Senter PD Annu Rev Med.64:15-29,2013
- [0137] 17.Zolot RS等人Nat Rev Drug Discov 4:259-260,2013

A. 小鼠 PD-1 (GenBank 获取号 CAA48113.1; Ishida, 等 EMBO J. 11(11): 3887-3895 (1992))

```

1  mwvrqvpwfs twavqlslwg sgwllvpng pwrsltfypa wltvsegana tftcslsnws
61  edmlnlwnrl spsnqtekqa afcnglsqpv qdarfqiiql pnrhdfhmni ldtrrndsgi
121 ylcgaislhp kakieespga elvvtterile tstrypspsp kpegrfqgmvg igimsalvgi
181 pvlllllawal avfcstsmse argagskddt lkeepsaapv psvayeeldf qgrektpelp
241 tacvhteyat ivfteglgas amgrrgsadg lqgprprphe dghcswpl
(SAQ ID NO.:140)

```

B. 人 PD-1 (GenBank 获取号 AAC51773.1; Finger, 等 Gene 197(1-2): 177-187 (1997))

```

1  mqipqapwpv vwavlqlgwr pgwfldspdr pwnpntffpa llvvtgedna tftcfsnts
61  esfvlnwyrp spsnqtdkla afpedrsqpg qdcfrfvvtql pnrdfhmns vrarrndsgt
121 ylcgaislap kaqikeslra elrvterrae vptahpspsp rpagqfqtiv vgvggllgs
181 lvllvwvlav icsraargti garrtgqplk edpsavpvfs vdygeldfqw rektpeppvp
241 cvpeqteyat ivfpsgmgtg sparrgsadg prsaqplrpe dghcswpl
(SAQ ID NO.:141)

```

图1

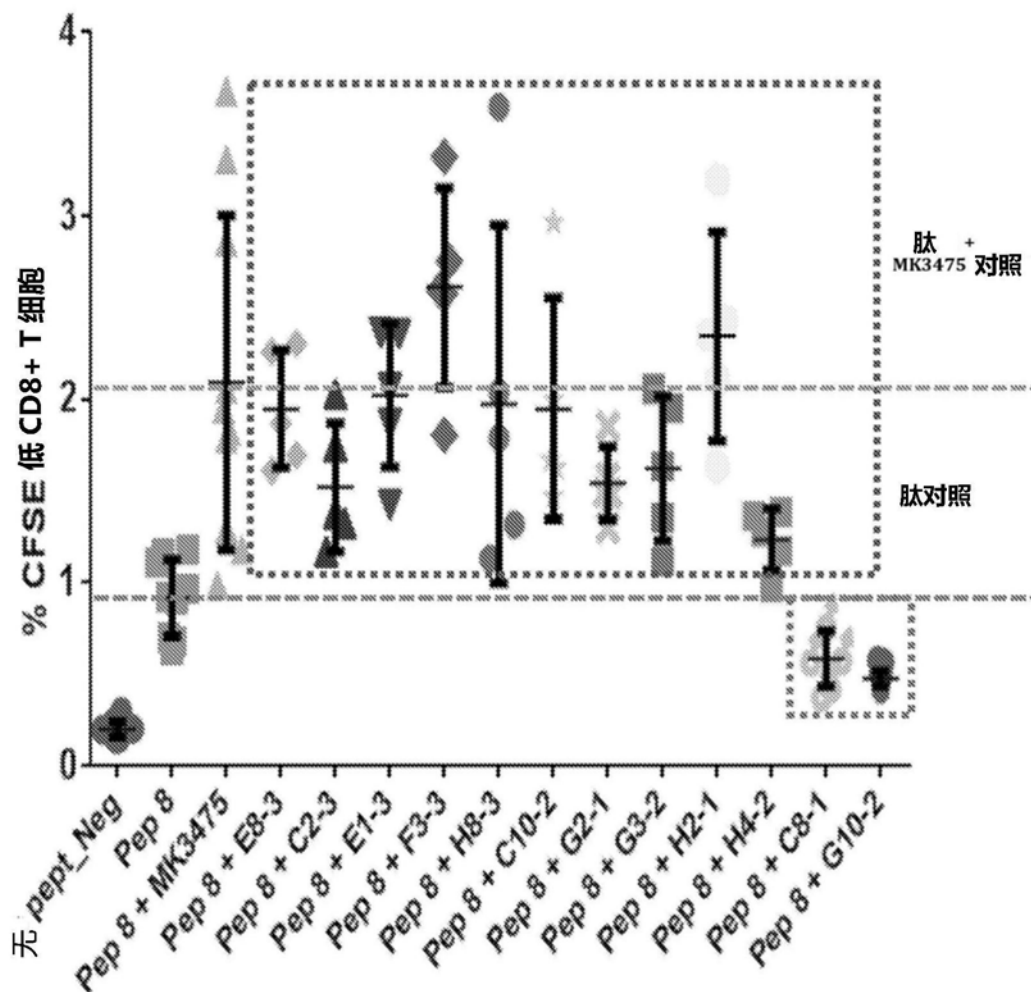


图2

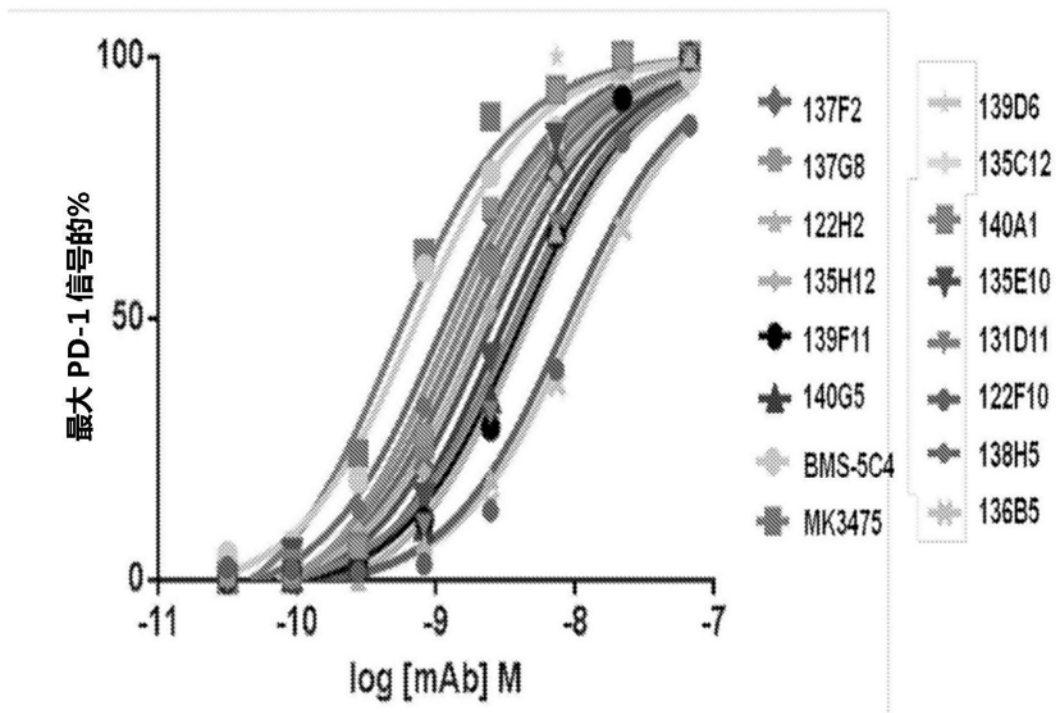


图3

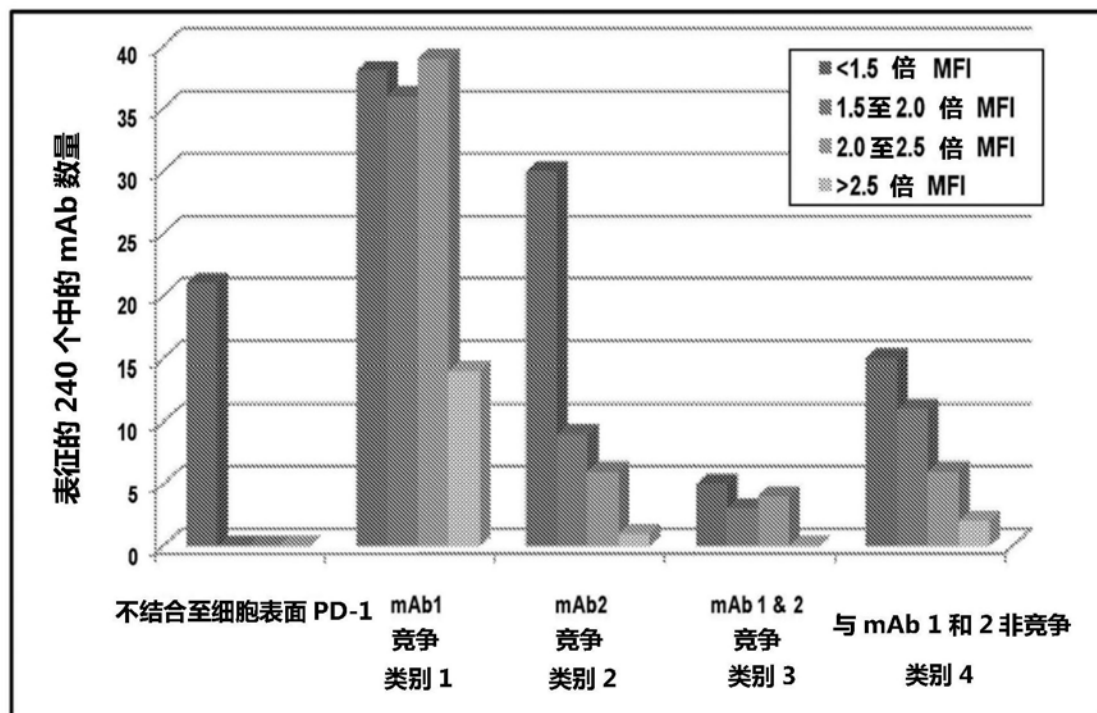


图4

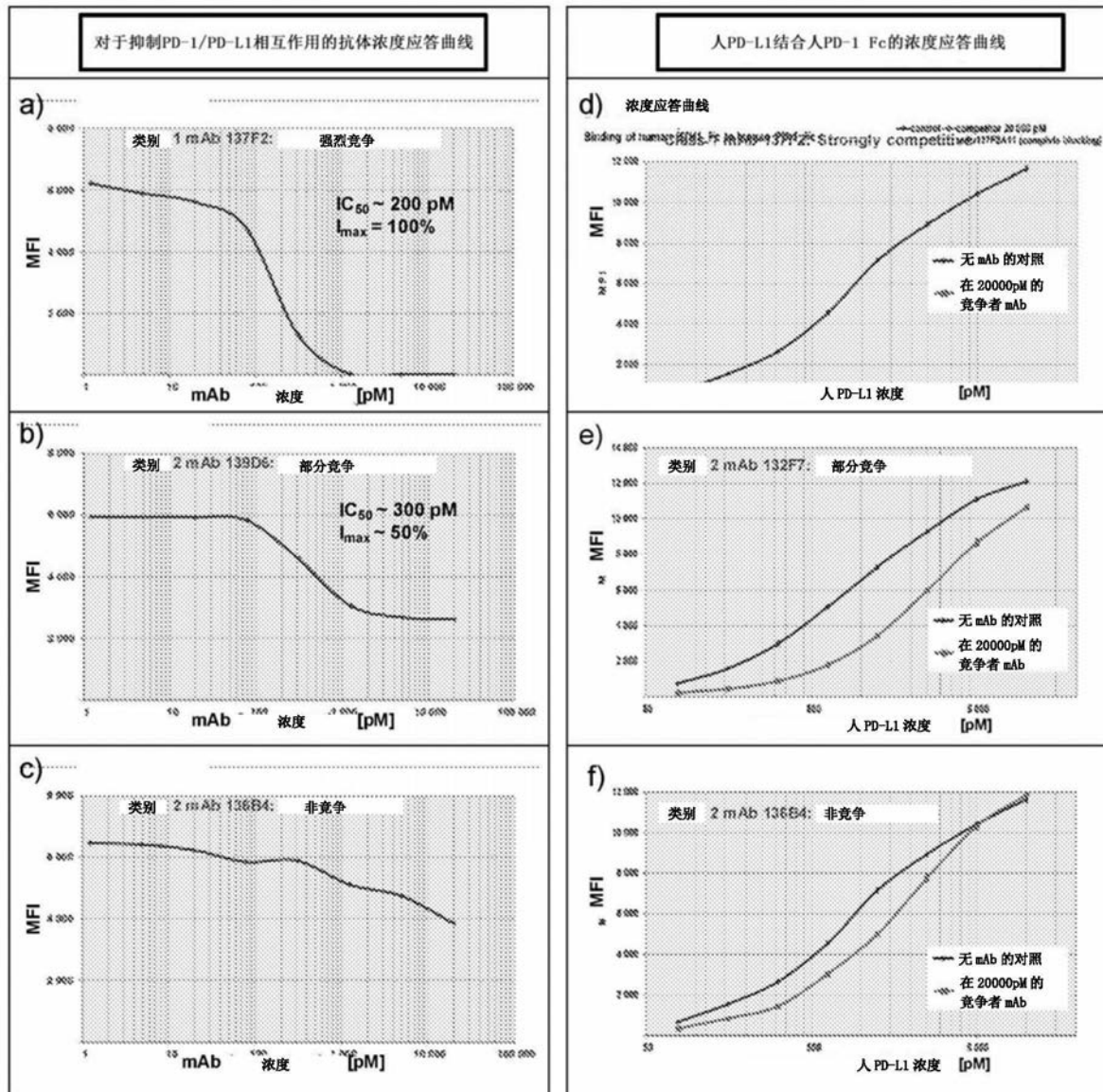


图5

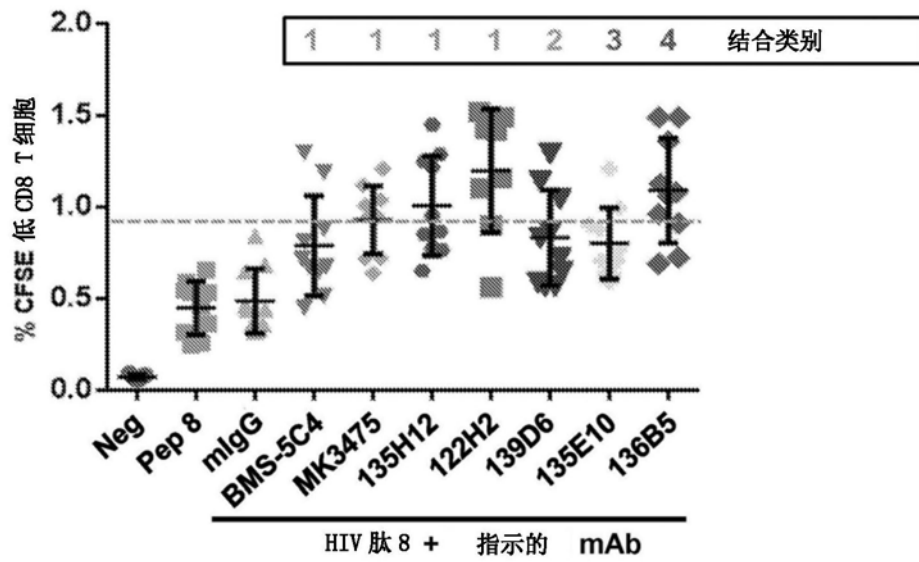


图6a

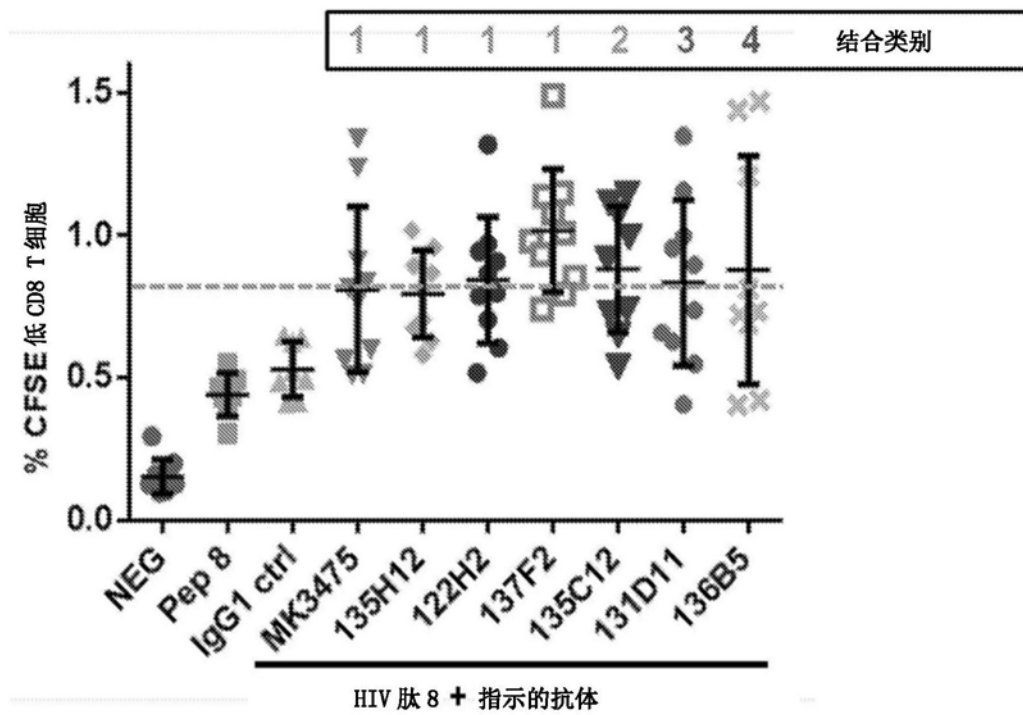


图6b

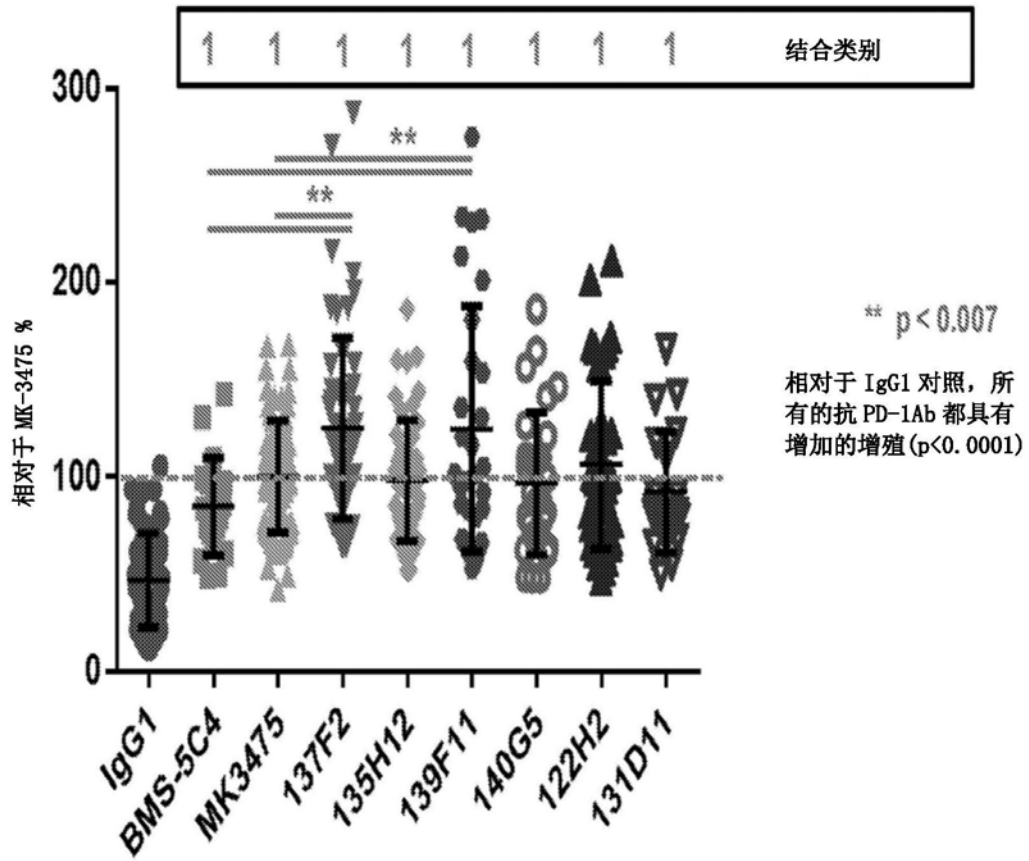


图7

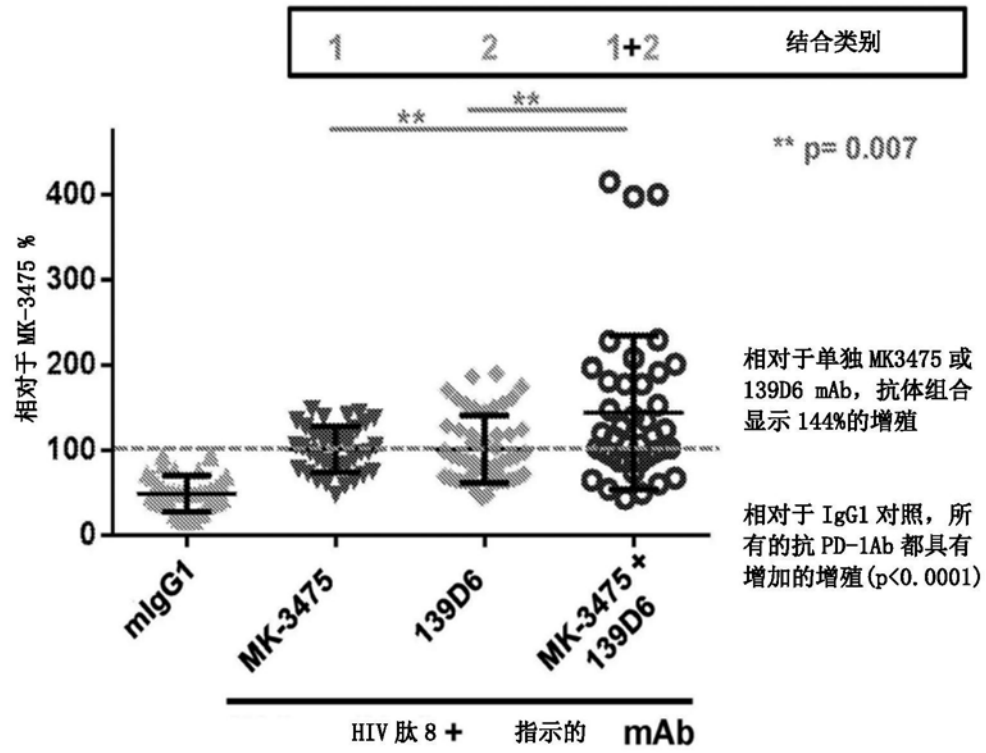


图8