



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102203132 A

(43) 申请公布日 2011. 09. 28

(21) 申请号 200980142256. 3

(51) Int. Cl.

(22) 申请日 2009. 08. 25

C07K 16/00 (2006. 01)

C07K 14/00 (2006. 01)

(30) 优先权数据

61/091, 709 2008. 08. 25 US

61/091, 705 2008. 08. 25 US

61/091, 694 2008. 08. 25 US

61/211, 697 2009. 04. 02 US

(85) PCT申请进入国家阶段日

2011. 04. 25

(86) PCT申请的申请数据

PCT/US2009/004825 2009. 08. 25

(87) PCT申请的公布数据

W02010/027423 EN 2010. 03. 11

(71) 申请人 安普利穆尼股份有限公司

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 所罗门·兰格曼 琳达·刘

(74) 专利代理机构 北京市柳沈律师事务所

11105

代理人 张红春

权利要求书 4 页 说明书 40 页

序列表 22 页 附图 12 页

(54) 发明名称

PD-1 拮抗剂的组合物和使用方法

(57) 摘要

描述了利用下述治疗方案来治疗癌症和感染性疾病的方法, 该治疗方案包括与增强剂诸如环磷酸胺联合施用降低 T 细胞中抑制性信号转导的化合物以生成有力的 T 细胞介导的应答。还公开了在本发明的方法中有用的包含 PD-1 拮抗剂和增强剂的组合物。

1. 一种在哺乳动物中提高 T 细胞应答的方法,其包括一种有效的治疗方案,所述方案包括对哺乳动物施用降低 T 细胞中抑制性信号转导的化合物和增强剂,其中所述治疗方案有效提高所述哺乳动物中的 T 细胞应答。

2. 权利要求 1 的方法,其中所述化合物是包含第一和第二肽部分的融合蛋白,其中所述第一肽部分包含 PD-1 拮抗剂多肽的活性片段且所述第二肽部分包含免疫球蛋白 (Ig) 的一部分。

3. 权利要求 2 的方法,其中所述 PD-1 拮抗剂多肽是野生型 B7-DC 多肽。

4. 权利要求 3 的方法,其中所述 B7-DC 是人 B7-DC。

5. 权利要求 4 的方法,其中所述活性片段不包含所述 B7-DC 多肽跨膜部分的任何实质性部分。

6. 权利要求 5 的方法,其中所述活性片段包含所述 B7-DC 多肽的可溶性部分且所述第二肽部分包含抗体的 Fc 区但不包含所述抗体的任何可变区。

7. 权利要求 5 的方法,其中所述活性片段包含 SEQ ID NO:3 的氨基酸序列且所述第二多肽部分包含抗体的 Fc 区但不包含所述抗体的任何可变区。

8. 权利要求 4 的方法,其中所述第一肽部分由与 SEQ ID NO:1 氨基酸 20-221 或 20-121 具有至少 80% 同一性的氨基酸序列组成。

9. 权利要求 4 的方法,其中所述第一肽部分由 SEQ ID NO:1 氨基酸 20-221 或 20-121 的氨基酸序列组成。

10. 权利要求 5 的方法,其中所述 PD-1 结合片段包含 SEQ ID NO:1 的至少 10 个连续氨基酸、或至少 25 个连续氨基酸、或至少 50 个连续氨基酸、或至少 75 个连续氨基酸、或至少 90 个连续氨基酸、或至少 100 个连续氨基酸。

11. 权利要求 2 的方法,其中所述融合蛋白包含与 SEQ ID NO:9,10,12 或 13 的序列具有至少 80% 同一性的氨基酸序列。

12. 权利要求 2 的方法,其中所述融合蛋白包含 SEQ ID NO:9,10,12 或 13 的氨基酸序列。

13. 权利要求 2 的方法,其中所述融合蛋白是单体。

14. 权利要求 2 的方法,其中所述融合蛋白是二聚物的一部分。

15. 权利要求 14 的方法,其中所述二聚物是同二聚物。

16. 权利要求 14 的方法,其中所述二聚物是异二聚物。

17. 权利要求 1 的方法,其中所述增强剂是环磷酰胺或环磷酰胺类似物。

18. 权利要求 1 的方法,其中所述增强剂是降低调节性 T 淋巴细胞 (T-reg) 活性的药剂。

19. 权利要求 1 的方法,其中所述增强剂在施用所述化合物之前施用。

20. 权利要求 19 的方法,其中所述增强剂在施用所述化合物之前至少 X 小时施用,其中 X 选自 1,2,3,5,10,15,20,24 和 30。

21. 权利要求 1 的方法,其中所述治疗方案进一步包括施用至少一种别的选自下组的药剂:抗 PD-1 抗体,抗 CTLA4 抗体,有丝分裂抑制剂,芳香酶抑制剂,A2AR 拮抗剂,和血管发生抑制剂。

22. 权利要求 1 的方法,其中所述化合物是包含野生型 B7-DC 多肽之活性片段的多肽。

23. 权利要求 22 的方法,其中所述活性片段不包含此类多肽跨膜部分的任何部分。
24. 权利要求 22 的方法,其中所述 B7-DC 多肽是人 B7-DC 多肽。
25. 权利要求 24 的方法,其中所述活性片段包含与 SEQ ID NO :1 氨基酸 20-221 或 20-121 具有至少 80%同一性的氨基酸序列。
26. 权利要求 24 的方法,其中所述活性片段由 SEQ ID NO :1 氨基酸 20-221 或 20-121 的氨基酸序列组成。
27. 权利要求 23 的方法,其中所述 PD-1 结合片段包含 SEQ ID NO :1 或 19 的至少 10 个连续氨基酸、或至少 25 个连续氨基酸、或至少 50 个连续氨基酸、或至少 75 个连续氨基酸、或至少 90 个连续氨基酸、或至少 100 个连续氨基酸。
28. 权利要求 1 的方法,其中所述化合物是包含野生型 B7-H1 多肽之活性片段的多肽。
29. 权利要求 28 的方法,其中所述活性片段不包含此类多肽跨膜部分的任何部分。
30. 权利要求 28 的方法,其中所述 B7-H1 多肽是人 B7-H1 多肽。
31. 权利要求 28 的方法,其中所述活性片段包含 SEQ ID NO :16 的至少 10 个连续氨基酸、或至少 25 个连续氨基酸、或至少 50 个连续氨基酸、或至少 75 个连续氨基酸、或至少 90 个连续氨基酸、或至少 100 个连续氨基酸。
32. 权利要求 1 的方法,其中所述化合物是包含野生型 PD-1 多肽之活性片段的多肽。
33. 权利要求 32 的方法,其中所述活性片段不包含此类多肽跨膜部分的任何部分。
34. 权利要求 32 的方法,其中所述 PD-1 多肽是人 PD-1 多肽。
35. 权利要求 32 的方法,其中所述活性片段包含 SEQ ID NO :17 或 18 的至少 10 个连续氨基酸、或至少 25 个连续氨基酸、或至少 50 个连续氨基酸、或至少 75 个连续氨基酸、或至少 90 个连续氨基酸、或至少 100 个连续氨基酸。
36. 权利要求 1 的方法,其中所述化合物是抗 PD-1 抗体或其活性片段。
37. 权利要求 36 的方法,其中所述增强剂是环磷酰胺或环磷酰胺类似物。
38. 权利要求 36 的方法,其中所述增强剂在施用所述化合物之前施用。
39. 权利要求 38 的方法,其中所述增强剂在施用所述化合物之前至少 X 小时施用,其中 X 选自 1,2,3,5,10,15,20,24 和 30。
40. 权利要求 1 的方法,其中所述化合物是抗 CTLA4 抗体或其活性片段。
41. 权利要求 40 的方法,其中所述增强剂是环磷酰胺或环磷酰胺类似物。
42. 权利要求 40 的方法,其中所述增强剂在施用所述化合物之前施用。
43. 权利要求 42 的方法,其中所述增强剂在施用所述化合物之前至少 X 小时施用,其中 X 选自 1,2,3,5,10,15,20,24 和 30。
44. 权利要求 1 的方法,其中所述化合物由 B7-DC、B7-H1、PD-1 或 B7. 1 的细胞外结构域组成,或由 B7-DC、B7-H1、PD-1 或 B7. 1 中任一活性片段组成。
45. 权利要求 44 的方法,其中所述活性片段包含至少 10 个连续氨基酸、或至少 25 个连续氨基酸、或至少 50 个连续氨基酸、或至少 75 个连续氨基酸、或至少 90 个连续氨基酸、或至少 100 个连续氨基酸。
46. 权利要求 1 的方法,其中所述化合物以足以治疗下述疾病的量存在,该疾病适合通过提高的 T 细胞介导的免疫应答来治疗。
47. 权利要求 46 的方法,其中所述化合物选自下组:

(a) 包含第一和第二肽部分的融合蛋白,其中所述第一肽部分包含 PD-1 拮抗剂多肽的活性片段且所述第二肽部分包含免疫球蛋白 (Ig) 的一部分;

(b) 抗 PD-1 抗体,包括其活性片段;

(c) 抗 CTLA4 抗体,包括其活性片段;

(d) PD-1 结合多肽或 PD-1 配体结合多肽;和

(e) (a), (b), (c) 和 (d) 中任何两项或更多项的组合。

48. 权利要求 47 的方法,其中所述增强剂是环磷酰胺或环磷酰胺类似物。

49. 权利要求 47 的方法,其中所述增强剂是降低调节性 T 淋巴细胞 (T-reg) 活性的药剂。

50. 权利要求 47 的方法,其中所述增强剂是 Sunitinib (SUTENT®)、抗 TGNF β 或 Imatinib (GLEEVAC®)、蒽环类抗生素、奥沙利铂、多柔比星、TLR4 拮抗剂、和 IL-18 拮抗剂。

51. 权利要求 47 的方法,进一步包括施用至少一种别的选自下组的药剂:抗 PD-1 抗体,抗 CTLA4 抗体,有丝分裂抑制剂,芳香酶抑制剂, A2AR 拮抗剂,和血管发生抑制剂。

52. 权利要求 46 的方法,其中所述疾病是感染性疾病。

53. 权利要求 46 的方法,其中所述疾病是癌症。

54. 权利要求 53 的方法,其中所述癌症是膀胱癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、食管癌、肾癌、肝癌、肺癌、鼻咽癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、胃癌、子宫癌、卵巢癌、睾丸癌、或血液学癌症。

55. 一种治疗性组合物,其在药学可接受载体中包含阻止经由 T 细胞上程序性细胞死亡-1 (PD-1) 的抑制性信号转导化合物和增强剂,其中所述化合物和所述增强剂一起以足以提高哺乳动物中 T 细胞应答的量存在。

56. 权利要求 55 的组合物,其中所述化合物选自下组:

(a) 包含第一和第二肽部分的融合蛋白,其中所述第一肽部分包含 PD-1 拮抗剂多肽的活性片段且所述第二肽部分包含免疫球蛋白 (Ig) 的一部分;

(b) 抗 PD-1 抗体,包括其活性片段;

(c) 抗 CTLA4 抗体,包括其活性片段;

(d) PD-1 结合多肽、PD-1 配体结合多肽、PD-1 多肽、或其活性片段;

和

(e) (a), (b), (c) 和 (d) 中任何两项或更多项的组合。

57. 权利要求 55 的组合物,其中所述增强剂是环磷酰胺或环磷酰胺类似物。

58. 权利要求 55 的组合物,其中所述增强剂是 Sunitinib (SUTENT®)、抗 TGNF β 或 Imatinib (GLEEVAC®)、蒽环类抗生素、奥沙利铂、多柔比星、TLR4 拮抗剂、和 IL-18 拮抗剂。

59. 权利要求 47 的组合物,进一步包含至少一种别的选自下组的药剂:抗 PD-1 抗体,抗 CTLA4 抗体,有丝分裂抑制剂,芳香酶抑制剂, A2AR 拮抗剂,和血管发生抑制剂。

60. 降低 T 细胞中抑制性信号转导的化合物在制备通过联合疗法来提高 T 细胞应答的药物中的用途,其中所述化合物与增强剂联合施用。

61. 权利要求 60 的用途,其中所述降低 T 细胞中抑制性信号转导的化合物和所述增强

剂作为分开的药物提供,供不同时间施用。

62. 权利要求 61 的用途,其中所述增强剂在所述抑制性化合物之前早至 24 小时施用。

63. 权利要求 60 的化合物和增强剂在治疗感染性疾病中的用途。

64. 权利要求 60 的化合物和增强剂在治疗癌症中的用途。

65. 权利要求 64 的用途,其中所述癌症是膀胱癌、脑癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠直肠癌、食管癌、肾癌、肝癌、肺癌、鼻咽癌、胰腺癌、前列腺癌、皮肤癌、胃癌、子宫癌、卵巢癌、睾丸癌、或血液学癌症。

66. 权利要求 60 的化合物和增强剂在治疗感染性疾病中的用途。

67. 一种用于与增强剂联合施用降低 T 细胞中抑制性信号转导的化合物的医学试剂盒,所述试剂盒包含:

(a) 降低 T 细胞中抑制性信号转导的化合物的剂量供应;

(b) 增强剂的供应;

(c) 药学可接受载体的供应;和

(d) 关于依照权利要求 59-64 任一的用途施用所述化合物的印刷的用法说明。

68. 权利要求 1 的方法,其中所述化合物由 B7-DC, B7-H1, PD-1, 或 B7-1 的细胞外结构域组成,或由与 B7-DC, B7-H1, PD-1, 或 B7-1 只相差保守性氨基酸替代的多肽组成,和由前述项的片段组成。

PD-1 拮抗剂的组合物和使用方法

[0001] 本申请要求均 2009 年 4 月 2 日提交的美国临时申请流水号 61/211,697, 2008 年 8 月 25 日提交的 61/091,694, 2008 年 8 月 25 日提交的 61/091,709, 和 2008 年 8 月 25 日提交的 61/091,705 的优先权,通过述及而将它们的公开内容完整收入本文。

发明领域

[0002] 本发明涉及治疗性组合物,该组合物包含与增强剂组合的阻止 T 细胞上抑制性信号转导的化合物,以及所述成分一起或分开用于诱导疾病治疗中有价值的 T 细胞应答的用途。

[0003] 发明背景

[0004] T 淋巴细胞对疾病状态(诸如感染和慢性病例如癌症)的应答是复杂的且涉及细胞间相互作用和可溶性介导物(称作细胞因子或淋巴因子)生成。T 细胞活化在正常情况中依赖于 T 细胞受体(TCR)与经主要组织相容性复合物(MHC)呈递的抗原性肽的接触后的抗原特异性信号,而这种反应的程度受自多种共刺激分子发出的正的和负的抗原不依赖性信号控制。后者通常是 CD28/B7 家族的成员。相反,程序性死亡-1(PD-1)是 CD28 受体家族的成员,其在 T 细胞上被诱导时传递负的免疫应答。PD-1 与其配体之一(B7-H1 或 B7-DC)之间的接触诱导抑制性应答,其降低 T 细胞扩增和/或 T 细胞应答的强度和/或持续时间。

[0005] 如此, T 淋巴细胞应答受到多种因素的调节,包括起受体作用的细胞表面分子,其中后者包括 TCR 复合物以及其它表面分子二者。

[0006] 总之,抗原特异性 T 细胞应答是由两种信号介导的:1) TCR 与在 HC 背景中呈递的抗原性肽的衔接(信号 1),及 2) 通过不同受体/配体对之间的接触来递送的第二抗原不依赖性信号(信号 2)。这种“第二信号”在决定 T 细胞应答的类型(活化或耐受)以及该应答的强度和持续时间方面是至关重要的,而且受来自共刺激分子,诸如 B7 蛋白质家族的正和负两种信号调节。

[0007] 最广泛表征的 T 细胞共刺激途径是 B7-CD28,其中 B7-1(CD80)和 B7-2(CD86)各自能参与刺激性 CD28 受体和抑制性 CTLA-4(CD152)受体。与经由 T 细胞受体的信号传导联合,CD28 连接提高 T 细胞的抗原特异性增殖,增强细胞因子的生成,刺激分化和效应器功能,及促进 T 细胞的存活(Lenschow 等, *Annu. Rev. Immunol.*, 14:233-258(1996); Chambers 和 Allison, *Curr. Opin. Immunol.*, 9:396-404(1997); 及 Rathmell 和 Thompson, *Annu. Rev. Immunol.*, 17:781-828(1999))。相反,认为经由 CTLA-4 的信号传导递送抑制 T 细胞增殖、IL-2 生成、和细胞周期行进的负信号(Krummel 和 Allison, *J. Exp. Med.*, 183:2533-2540(1996); 及 Walunas 等, *J. Exp. Med.*, 183:2541-2550(1996))。B7 共刺激分子家族的其它成员包括 B7-H1(Dong 等, *Nature Med.*, 5:1365-1369(1999); 及 Freeman 等, *J. Exp. Med.*, 192:1-9(2000))、B7-DC(Tseng 等, *J. Exp. Med.*, 193:839-846(2001); 及 Latchman 等, *Nature Immunol.*, 2:261-268(2001))、B7-H2(Wang 等, *Blood*, 96:2808-2813(2000); Swallow 等, *Immunity*, 11:423-432(1999); 及 Yoshinaga 等, *Nature*, 402:827-832(1999))、B7-H3(Chapoval 等, *Nature Immunol.*, 2:269-274(2001)) 和 B7-H4(Choi 等, *J. Immunol.*,

171:4650-4654(2003);Sica 等, Immunity, 18:849-861(2003);Prasad 等, Immunity, 18:863-873(2003); 及 Zang 等, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., 100:10388-10392(2003))。B7-H5(记载于 WO 2006/012232) 是一种新近发现的 B7 家族成员。

[0008] B7 家族分子具有近膜 IgC(恒定)结构域和远膜 IgV(可变)结构域。这些配体的 CD28 样受体家族共享共同的细胞外 IgV 样结构域。受体-配体对的相互作用主要经由配体和受体的 IgV 结构域中的残基来介导(Schwartz 等, Nature Immunol., 3:427-434(2002))。通常, IgV 结构域被描述为具有两个片层, 每个含有一层 β 链(Williams 和 Barclay, Annu. Rev. Immunol., 6:381-405(1988))。CTLA-4 的前和后片层分别含有链 A' GFC' C 和 ABEDC(Ostrov 等, Science, 290:816-819(2000)), 而 B7IgV 结构域的前和后片层分别包含链 AGFCC' C" 和 BED(Schwartz 等, Nature, 410:604-608(2001);Stamper 等, Nature, 410:608-611(2001);及 Ikemizu 等, Immunity, 12:51-60(2000))。结晶学分析揭示了 CTLA-4/B7 结合界面受来自 CTLA-4 包含 MYPPPY 基序的 CDR3 类似环与 B7 上主要由 G、F、C、C' 和 C" 链形成的表面的相互作用支配(Schwartz 等, Nature, 410:604-608(2001);及 Stamper 等, Nature, 410:608-611(2001))。来自氨基酸同源性、突变、和计算机建模的数据给这种基序也是 CD28 的主要 B7 结合位点的观念提供了支持(Bajorath 等, J. Mol. Graph. Model., 15:135-139(1997))。虽然 MYPPPY 基序在 ICOS(B7-H2 的受体)中没有得到保留, 但是研究指示具有序列 FDPDPF 且位于类似位置的一种相关基序是 ICOS 结合 B7-H2 的主要决定子(Wand 等, J. Exp. Med., 195:1033-1041(2002))。

[0009] B7-DC(也称作 PD-L2 或 CD273) 是 B7 家族的一个相对较新的成员, 而且具有与 B7-H1(也称作 PD-L1) 约 34% 相同的氨基酸序列。人和小鼠 B7-DC 直向同源物共享约 70% 氨基酸同一性。虽然在多种组织中找到了 B7-H1 和 B7-DC 转录物(Dong 等, Nature Med., 5:1365-1369(1999);Latchman 等, Nature Immunol., 2:261-268(2001);及 Tamura, Blood, 97:1809-1816(2001)), 但是这两种蛋白质的表达谱是相当不同的。B7-H1 在极其多种组织和细胞类型上广泛表达, 而 B7-DC 表达主要限于活化的树突细胞(DC) 和巨噬细胞。

[0010] 已经显示了 B7-H1 和 B7-DC 都结合 PD-1(Freeman 等, J. Exp. Med., 192:1027-1034(2000)), CD28 家族的一个远亲成员, 在它的细胞质结构域中有免疫受体基于酪氨酸的抑制性基序(ITIM)(Ishida 等, EMBO J., 11:3887-3895(1992))。PD-1(CD28 受体家族的一个成员) 在活化的 T 细胞、B 细胞、天然杀伤(NK) 细胞、单核细胞、DC、和巨噬细胞上诱导性表达(Keir, et al Curr. Opin. Immunol. 19:309-314(2007))。

[0011] PD-1 被其配体连接的主要结果是抑制 T 细胞受体(TCR) 下游的信号传导。因此, 经由 PD-1 的信号转导通常给 T 细胞提供遏制或抑制信号, 导致降低的 T 细胞增殖或 T 细胞活化的其它降低。B7-H1 是在 T 细胞中引起抑制性信号转导的主要 PD-1 配体。通过提供结合 PD-1 并如此阻止抑制性信号转导, 或者结合 PD-1 的配体诸如 B7-H1, 由此阻止配体结合 PD-1 来递送抑制性信号的药剂, 本发明解决了不想要的 T 细胞抑制的问题。在任一情况中, T 细胞应答(诸如 T 细胞增殖或活化) 受到刺激。

[0012] B7-H1 是主要的 PD-1 配体, 有可能是由于其较宽的分布和较高的表达水平。PD-1 抑制只在 PD-1 和 TCR 在免疫突触的背景中彼此极近地结合时发生。PD-1 及其配体已经成为数篇综述的话题。

[0013] B7-H1 还在多种癌症(包括乳腺癌、结肠癌、食管癌、胃癌、胶质瘤、白血病、肺癌、

黑素瘤、多发性骨髓瘤、卵巢癌、胰腺癌、肾细胞癌、和泌尿道上皮癌)中过表达,而且已经与不良预后联系起来。B7-H1 由多种肿瘤细胞系表达,尤其是在用干扰素 γ (IFN- γ) 刺激后,而且还在浸润肿瘤的髓样衍生抑制细胞 (MDSC) 上上调。例如,PD-1 在肿瘤特异性 CD8T 细胞上上调,而且与功能缺损、无反应性、衰竭、和凋亡有关。PD-1 上调还已经与别的细胞类型(诸如调节性 T 细胞 (Treg) 和天然杀伤 T (NKT) 细胞上的功能障碍性和/或遏制性表型关联起来。

[0014] 通过提供经由升高的 T 细胞活性来治疗疾病(尤其是癌症和感染性疾病)的治疗方案,本发明利用此类分子功能。

[0015] 发明概述

[0016] 在一个方面,本发明涉及一种在需要下述提高的哺乳动物中提高 T 细胞应答(例如针对抗原的)的方法,包括对所述哺乳动物施用降低免疫细胞(尤其是 T 细胞)中抑制性信号转导的化合物和增强剂,其中所述治疗方案有效提高所述哺乳动物的 T 细胞应答。

[0017] 在本发明的治疗方案中有用的化合物包括结合及阻断 T 细胞上的 PD-1 受体且不触发抑制性信号转导的化合物,结合 PD-1 配体以阻止它们结合 PD-1 的化合物,二者都行的化合物和阻止编码 PD-1 或 PD-1 天然配体任一基因表达的化合物。此类化合物在本文中称作“PD-1 拮抗剂”。结合 PD-1 天然配体的化合物包括 PD-1 自身、以及 PD-1 的活性片段、和(在 B7-H1 配体的情况中)B7.1 蛋白和片段。此类拮抗剂包括蛋白质、抗体、反义分子和小有机物。在一个优选的实施方案中,所述 T 细胞应答大于由所述 PD-1 拮抗剂或所述增强剂任一在任一(没有另一)的情况中施用生成的 T 细胞应答。

[0018] 在另一个实施方案中,在本发明的方法中有用的化合物是结合 T 细胞表面分子诸如 CTLA4 以阻止由其天然配体的结合触发的抑制性信号的化合物或结合所述天然配体的化合物。此类拮抗剂包括蛋白质、抗体、反义分子和小的有机物。

[0019] 在一个一般的实施方案中,在本发明的治疗方案和组合物中有用的化合物包括结合 PD-1 且不触发、诱导、提高、促进和/或允许 PD-1 与 TCR 共连接的化合物。

[0020] 阻止经由 PD-1 的抑制性信号转导并如此起 PD-1 拮抗剂作用的优选化合物包括但不限于如下的 B7-DC 多肽,尤其是这些的可溶性部分,包括这些的活性片段、这些的变体和同系物,以及掺入任何上述的融合蛋白,它们结合 PD-1 且不触发抑制性信号转导。在一个优选的实施方案中,B7-DC 包含 SEQID NO:1,2,3 或 4 的氨基酸序列。优选的此类化合物是掺入 B7-DC 可溶性结构域(即没有跨膜序列)的化合物。合适的 B7-DC 多肽片段包括含有 IgV 和/或 IgC 域的片段或只含有 IgV 域的片段,后者是一个优选的实施方案,SEQ IDNO:1 的氨基酸 20-121 是 IgV 域的一个优选例。

[0021] 优选的 PD-1 拮抗剂还包括但不限于 PD-1 天然配体诸如 B7-H1 多肽(披露于美国专利 No. 6,803,192,通过本文中的述及而完整收录)的活性片段,尤其是这些的可溶性部分,包括这些的变体和同系物,以及掺入任何上述的融合蛋白,它们结合 PD-1 且不触发抑制性信号转导。

[0022] 本发明的优选化合物还包括但不限于结合 PD-1 天然配体(诸如结合 B7-H1 的 B7-1 片段)的化合物,包括活性片段、变体和同系物,以及掺入任何上述的融合蛋白,它们结合 PD-1 的配体以阻止后者结合 PD-1 以触发抑制性信号转导。

[0023] 在另一个实施方案中,组合物及其使用方法包括结合及阻断 PD-1 受体的 PD-1 受

体拮抗剂和结合及阻断 PD-1 受体配体的不同的 PD-1 受体拮抗剂的组合。本发明的另一个实施方案提供如下的 PD-1 受体拮抗剂,其结合 PD-1 受体且不触发经由 PD-1 受体的抑制性信号转导,而且还具有结合及拮抗 PD-1 受体配体诸如 B7-H1 (其在其它情况中会触发经由 PD-1 受体的抑制性信号转导) 的能力。其它所涵盖的 PD-1 受体拮抗剂包括如下的双特异性抗体,其能结合 PD-1 受体和 PD-1 受体配体二者。

[0024] 在本发明中有用的化合物的优选实施方案还包括如下的抗体,其结合 PD-1 或 CTLA4,由此降低或消除由这些来源介导的抑制性信号转导。

[0025] 供本发明的方法中使用的优选化合物还包括但不限于 CTLA4 的配体 (诸如 B7-1 和 B7-2) 的活性片段,其结合 CTLA4 以降低后续抑制性信号,但不结合 CD28 或以其它方式抑制由 CD28 进行的正信号转导。

[0026] 阻止经由 PD-1 的抑制性信号转导并如此起 PD-1 拮抗剂作用的优选化合物包括但不限于 B7-DC 拮抗剂,尤其是这些的可溶性部分,包括这些活性片段,这些的变体和同系物,以及掺入任何上述的融合蛋白,它们结合 B7-DC。

[0027] 在一个实施方案中, B7-DC 多肽、其片段或变体偶联至其它多肽以形成融合蛋白,其通过结合 PD-1 受体来拮抗 PD-1 受体且不引起经由 PD-1 的抑制性信号转导,由此降低或干扰配体结合 PD-1,特别是 B7-H1 结合,并由此干扰经由 PD-1 受体的抑制性信号转导。此类融合蛋白的例子是包含 SEQ ID NO:9,10,12 或 13 的氨基酸序列的多肽,及其同系物。在一个优选的实施方案中, B7-DC 的整个或部分细胞外结构域 (ECD) 是融合蛋白的一部分,其中它连接至含有免疫球蛋白 Fc 部分的第二多肽。这种的一个优选例是 B7-DC-Ig,尤其是这种构建物是同二聚物的一部分的情况,其中两个 B7-DC-Ig 分子彼此连接,诸如通过二硫化物连接。

[0028] 在具体的实施方案中,在本发明的化合物中有用的片段由具有期望的拮抗剂活性的多肽的至少 10,15,25,50,75,100,150,200 或更多个连续氨基酸组成。此类片段通常还是供本发明中使用的融合蛋白的一部分。

[0029] 在另一个方面,本发明涉及一种在有下列需要的哺乳动物中提高 T 细胞应答的方法,包括对所述哺乳动物施用一种有效的治疗方案,其包含抗 PD-1 抗体和增强剂,其中所述治疗方案有效提高所述哺乳动物中的 T 细胞应答。

[0030] 在另一个方面,本发明涉及一种在有下列需要的哺乳动物中提高 T 细胞应答的方法,包括对所述哺乳动物施用一种有效的治疗方案,其包含免疫调控剂和增强剂,其中所述治疗方案有效提高所述哺乳动物中的 T 细胞应答。此类免疫调控剂包括拮抗抑制 T 细胞应答的其它 CD28 家族受体 (诸如 CTLA4) 的分子。一个优选的实施方案使用抗 CTLA4 抗体和增强剂。别的免疫调控剂包括:激发活化 T 细胞应答的 CD28 家族受体 (诸如 CD28 和 ICOS) 的分子;拮抗抑制 T 细胞应答的 B7 家族配体 (诸如 B7-H1、B7-DC、B7-H4) 的分子;和激发活化 T 细胞应答的 B7 家族配体 (诸如 B7.1 和 B7.2) 的分子。

[0031] 在本发明的任何方法的别的实施方案中,PD-1 拮抗剂化合物和增强剂的治疗方案进一步包含至少一种别的治疗剂。所涵盖的别的治疗剂包括免疫调控剂。此类方法的例示性免疫调控剂包括抗 PD-1 和抗 CTLA4 抗体。

[0032] 在一个实施方案中,增强剂选自环磷酰胺 (cyclophosphamide) 和环磷酰胺类似物、Sunitinib (Sutent)、抗 TGF β 和 Imatinib (Gleevec)、有丝分裂抑制剂诸如帕立他

塞 (paclitaxel)、芳香酶抑制剂诸如来曲唑 (letrozole)、A2a 腺苷受体 (A2AR) 拮抗剂、血管发生抑制剂、蒽环类抗生素 (anthracyclines)、奥沙利铂 (oxaliplatin)、多柔比星 (doxorubicin)、TLR4 拮抗剂、和 IL-18 拮抗剂。这些药剂中的一些降低肿瘤微环境内的 Treg (即调节性 T 淋巴细胞或 T-reg) 数目。在另一个实施方案中,本发明的方法和 / 或组合物具体涵盖任何合适佐剂作为所述方法和 / 或组合物一部分的用途。

[0033] 依照本发明,可以在体外、离体或在体内使 T 细胞接触 PD-1 受体拮抗剂和 / 或其含有增强剂的组合物。使用 PD-1 受体拮抗剂和 / 或其含有增强剂的组合物接触 T 细胞可发生于活化 T 细胞之前、期间或之后。

[0034] 在一个具体的实施方案中,阻止或降低经由 PD-1 的抑制性信号转导的分子和增强剂在不同时间施用,诸如在施用 PD-1 拮抗剂之前施用增强剂的情况。此类施用可以与别的治疗剂联合。

[0035] 在本发明的任何方法的具体实施方案中,治疗方案包括在施用任何或所有 PD-1 拮抗剂、抗 PD-1 抗体、抗 CTLA4 抗体、和 / 或别的治疗剂之前至少 1 小时、或至少 2 小时、或至少 3 小时、或至少 5 小时、或至少 10 小时、或至少 15 小时、或至少 20 小时、或至少 24 小时、或至少 30 小时或甚至更长时间施用增强剂。施用增强剂也可以发生于使用任何或所有 PD-1 拮抗剂、抗 PD-1 抗体、抗 CTLA4 抗体和 / 或别的治疗剂之后,诸如施用 PD-1 拮抗剂之后不超过 1 小时、2 小时、3 小时、5 小时、10 小时、15 小时、20 小时、24 小时、或甚至长达 30 小时,或者可以与施用 PD-1 拮抗剂联合发生。

[0036] 因本发明的方法而实现的升高的 T 细胞应答足以治疗疾病,包括癌症、病毒感染、细菌感染和寄生虫感染中的一项或多项。若疾病为癌症,则此类癌症是膀胱、脑、乳腺、宫颈、结肠直肠、食管、肾、肝、肺、鼻咽、胰腺、前列腺、皮肤、胃、子宫、卵巢、睾丸、或血液学癌症中任一项或多项。

[0037] 在另一个方面,本发明包括药学可接受载体中的在本发明的方法中使用的拮抗剂组合物,而且其中所述 PD-1 结合分子和所述增强剂各自以有效生成升高的 T 细胞刺激的量存在。

[0038] 在一个优选的实施方案中,本发明包括医学试剂盒,其包含装有一种或多种供本发明中使用的药剂以及供稀释用的药用载体的容器和关于施用的用法说明。另外,当下述成分要在相同时间施用,所述 PD-1 受体拮抗剂和增强剂都可以作为单一容器中成分存在于药学可接受载体中。

[0039] 附图简述

[0040] 图 1 显示 B7-DC-Ig 结合 PD-1。将经标记的 B7-DC-Ig 以多种浓度与组成性表达 PD-1 的 CHO 细胞系或不表达 PD-1 的亲本 CHO 细胞一起温育。通过流式细胞术来分析结合。作为探针浓度 (x 轴) 的函数来显示 B7-DC-Ig 的中值荧光强度 (MFI) (y 轴)。B7-DC-Ig 结合 CHO, PD-1 细胞 (实心圆圈), 但是不结合未转染的 CHO 细胞 (灰色三角形)。

[0041] 图 2 显示 B7-DC-Ig 与 B7-H1 竞争对 PD-1 的结合。首先将未标记的 B7-DC-Ig 以多种浓度与组成性表达 PD-1 的 CHO 细胞系一起温育,之后将经标记的 B7-H1-Ig 添加至细胞混合物。作为所添加的未标记的 B7-DC-Ig 竞争物的浓度 (x 轴) 的函数,显示 B7-H1-Ig 的中值荧光强度 (MFI) (y 轴)。随着未标记 B7-DC-Ig 的浓度升高,结合 CHO 细胞的经标记 B7-H1-Ig 的量降低,从而证明了 B7-DC-Ig 与 B7-H1 竞争对 PD-1 的结合。

[0042] 图 3 显示如下实验的结果,其中环磷酰胺 (CTX 或 Cytosan®) 和二聚物鼠 B7-DC-Ig 的组合导致小鼠中已建立的 CT26 肿瘤 (结肠癌瘤) 根除。图 A 显示第 10 天用 100mg/kg 的 CTX 处理的小鼠中肿瘤体积 (mm^3) 相对的肿瘤攻击后天数,而图 B 显示第 10 天用 CTX 处理,接着一天后施用第一次 B7-DC-Ig 的小鼠中肿瘤体积 (mm^3) 相对的肿瘤攻击后天数。每幅图中的每条线代表一只小鼠。黑色箭头代表 B7-DC-Ig 施用。图 C 显示平均肿瘤体积。

[0043] 图 4 显示如下实验的结果,其中 CTX 和二聚物鼠 B7-DC-Ig 的组合根除小鼠中已建立的 CT26 肿瘤 (结肠癌瘤) 及针对 CT26 再攻击提供保护。用肿瘤再攻击用 CTX 和 B7-DC-Ig 处理的且发现肿瘤接种后第 44 天没有肿瘤生长的小鼠。稍后第 70 天再次再攻击小鼠。到第 100 天没有小鼠展现肿瘤生长。

[0044] 图 5 显示 CTX 和 B7-DC-Ig 处理导致肿瘤特异性记忆 CTL 的产生。用 CT26 细胞再攻击 CTX 和 B7-DC-Ig 处理后根除了已建立的 CT26 皮下肿瘤的小鼠。7 天后,分离脾细胞并用卵清蛋白 (一种无关肽) 或 AH1 (一种 CT26 特异性肽) 任一脉冲。将细胞首先用抗 CD8 抗体染色,接着用抗 IFN γ 抗体细胞内染色,之后进行 FACS 分析。

[0045] 图 6 显示不同剂量的 B7-DC-Ig 与 CTX 组合对小鼠中已建立 CT26 肿瘤根除的影响。给 9 至 11 周龄的 Balb/C 小鼠皮下植入 1×10^5 个 CT26 细胞。在第 9 天,给小鼠 IP 注射 100mg/kg CTX。24 小时后,在第 10 天,用 30, 100 或 300ug B7-DC-Ig 处理小鼠,接着每周注射 2 次,总共 8 次处理。每周两次测量肿瘤生长。

[0046] 图 7 显示如下实验的结果,其中 CTX 和抗 PD-1 抗体的组合导致小鼠中已建立 CT26 肿瘤 (结肠癌瘤) 根除。图 A 显示未处理小鼠 (即仅仅用媒介处理的小鼠) 中肿瘤体积 (mm^3) 相对的肿瘤攻击后天数,图 B 显示第 11 天开始仅仅用抗 PD-1 处理 (每次注射 300ug, 每周 3 次,总共 12 次注射) 的小鼠中肿瘤体积 (mm^3) 相对的肿瘤攻击后天数,而图 C 显示第 11 天用 CTX 处理及第 12 天第一次施用抗 PD-1 (每次注射 300ug, 每周 3 次,总共 12 次注射) 的小鼠中肿瘤体积 (mm^3) 相对的肿瘤攻击后天数。每幅图中的每条线代表一只小鼠。黑色箭头代表抗 PD-1 施用。

[0047] 图 8 显示如下实验的结果,其中 CTX 和抗 CTLA4 抗体的组合导致小鼠中已建立 CT26 肿瘤 (结肠癌瘤) 根除。这里,图 A 显示第 11 天用 100mg/kg CTX 处理的小鼠中肿瘤体积 (mm^3) 相对的肿瘤攻击后天数,而图 B 显示第 11 天用 CTX 处理及第 12 天用抗 CTLA4 处理 (每次注射 100ug, 每周 2 次,总共 8 次注射) 的小鼠中肿瘤体积 (mm^3) 相对的肿瘤攻击后天数。每幅图中的每条线代表一只小鼠。黑色箭头代表抗 CTLA-4 施用。

[0048] 图 9 显示如下实验的结果,其中给 9-11 周龄的 Balb/C 小鼠皮下植入 1×10^5 个 CT26 细胞。在第 9 天,给小鼠 IP 注射 100mg/kg CTX。24 小时后,在第 10 天,用 100ug B7-DC-Ig 处理小鼠。有 5 个组:不接受任何肿瘤细胞的无处理的 (naïve) 小鼠,注射媒介,仅 CTX, CTX+B7-DC-Ig 或仅 B7-DC-Ig。在第 11 天 (CTX 后 2 天) 和第 16 天 (CTX 后 7 天) 自研究取出 2 只无处理小鼠和 4 只来自其它组的小鼠供 T 细胞分析用。左边小图显示在第 11 天 (CTX 注射后 2 天),用 CTX 处理的小鼠的脾中的 Treg 显著低于植入肿瘤且注射媒介的小鼠。右边小图显示在第 16 天 (CTX 后 7 天和 B7-DC-Ig 处理后 6 天),B7-DC-Ig 显著降低表达高 PD-1 的 CD4+T 细胞。这在 B7-DC-Ig 处理的和 CTX+B7-DC-Ig 处理的小鼠中都有观察到。与无处理小鼠相比,植入肿瘤细胞的小鼠趋于在引流 LN 中具有更多的 PD-1+/CD4+T 细胞。

[0049] 图 10 显示如下实验的结果,其中 CTX 和 B7-DC-Ig 的组合导致尾静脉注射小鼠前列腺肿瘤细胞系的小鼠中升高的存活。自小鼠肺分离转移自 TRAMP 前列腺肿瘤细胞注射的 SP-1 细胞。首先经尾静脉注射给 B10. D2 小鼠注射 3×10^5 个 SP-1 细胞。在第 5, 12 和 19 天,给小鼠注射 50mg/kg CTX,如所示的。在第 6, 13 和 20 天,给小鼠施用 5mg/kg B7-DC-Ig,如所示的。这里,“NT”指“未处理”。

[0050] 图 11。使用半脾注射技术给予 11-13 周龄的 Balb/C 小鼠以分离的肝转移物。将麻醉小鼠的脾分成两半,并夹住两半。将 CT26 细胞 (1E05) 注射入一个半脾,并且,并在 30 秒后切出该脾并夹住脾引流静脉。在第 10 天,小鼠接受 50mg/kg CTX 的一次 IP 注射。24 小时后,即在第 11 天,以 $0.1 \times LD_{50}$ (1×10^7 CFU) 用携带 AH1 肽 (CT26 的一种免疫显性表位) 的重组李斯特氏菌 (*Listeria*),然后在第 14 和 17 天处理小鼠。还在第 11 天,然后在第 18 天用 B7-DC-Ig 处理小鼠。监测小鼠总体存活。

[0051] 定义

[0052] 除非另有定义,本文中使用的所有技术和科学术语具有与所公开的发明所属领域的技术人员的普遍理解相同的含义。特别地,下列术语和短语具有下述含义。

[0053] 术语“抑制性信号转导”指具有如下效果的任何信号转导,其消除或降低针对抗原的 T 细胞应答,或是通过减低 T 细胞增殖或是通过任何其它抑制性机制,由此免疫原性 T 细胞应答的程度或持续时间降低或缩短。此类抑制性信号转导可以是由于 PD-1 结合天然配体,诸如 B7-H1 或此类配体的一些其它成员 (B7-DC) 结合 PD-1,或者可以是由于 CTLA4 结合配体,诸如 B7-1 或 B7-2。一般地,本发明的化合物降低此类抑制性信号转导,而且包括但不限于 PD-1 拮抗剂和 CTLA4 拮抗剂。

[0054] 术语“PD-1 拮抗剂”意指削弱由 PD-1 介导的抑制性信号转导的任何分子,PD-1 见于 T 细胞、B 细胞、天然杀伤 (NK) 细胞、单核细胞、DC、和巨噬细胞的表面上。此类拮抗剂包括破坏由 T 细胞上的 PD-1 分子生成的任何抑制性信号的分子。在本发明的具体例中,PD-1 拮抗剂是抑制、降低、消除或以其它方式降低经由 PD-1 受体信号传导途径的抑制性信号转导的分子。此类降低可源自:(i) 本发明的 PD-1 拮抗剂结合 PD-1 受体且不触发信号转导,以降低或阻断抑制性信号转导;(ii) PD-1 拮抗剂结合 PD-1 受体的配体 (例如激动剂),从而阻止两者的结合 (例如所述激动剂是 B7-H1 的情况);(iii) PD-1 拮抗剂结合或以其它方式抑制作为如下调节链一部分的分子的活性,该调节链在不受抑制时具有刺激或促进 PD-1 抑制性信号转导的结果;或 (iv) PD-1 拮抗剂抑制 PD-1 受体表达或其配体表达,尤其是通过降低或消除一种或多种编码 PD-1 或其一种或多种天然配体的基因表达。如此,本发明的 PD-1 拮抗剂是如下的分子,其实现 PD-1 抑制性信号转导的降低,由此提高针对一种或多种抗原的 T 细胞应答。

[0055] 如本文中使用的,术语“CTLA4 拮抗剂”意指降低 CTLA4 介导的对 T 细胞反应的抑制的化合物。例如,在 T 细胞,CTLA4 在 B7 配体诸如 B7-1 和 B7-2 结合时递送抑制性脉冲。CTLA4 拮抗剂破坏所述配体对活化的 T 细胞上 CTLA4 的结合。在一个实施方案中,拮抗剂是结合 CTLA4 以阻止配体结合的抗 CTLA4 抗体。

[0056] 如本文中使用的,术语“活性片段”指天然多肽或与天然多肽具有序列同源性 (例如至少 80%、85%、90%、95%、98%、或 99% 氨基酸序列同一性) 的多肽的一部分,其展现 PD-1 拮抗剂活性,例如通过结合 PD-1 或通过结合 PD-1 的配体。在优选的实施方案中,此类

片段会由 B7-DC 蛋白结合 PD-1 的细胞外结构域 (ECD) 组成, 诸如 SEQ ID NO:3, 优选其氨基酸 20 至 221。在 PD-1 多肽的情况中, 活性片段会是所述多肽包含结合域的一部分, 其结合 PD-1 的天然配体以阻止所述配体对 PD-1 介导的抑制性信号转导的刺激。活性片段可以通过它们与衍生它们的分子竞争对天然结合位点的结合的能力来鉴定。例如, 活性片段会与野生型 B7-DC 竞争对 PD-1 的结合。

[0057] 关于抗体, 术语“活性片段”意指抗体的抗原结合部分, 其小于完整免疫球蛋白。此类片段包括 Fab 和 F(ab')₂ 片段, 其能够与本文中作为受体或配体公开的任何多肽反应及结合本文中作为受体或配体公开的任何多肽。这些 Fab 和 F(ab')₂ 片段缺少完整抗体的 Fc 部分, 更加快速地自循环清除, 而且可具有比完整抗体要少的非特异性组织结合 (Wahl 等, J. Nuc. Med. 24:316-325 (1983))。还包括 Fv 片段 (Hochman, J. 等 (1973) Biochemistry 12:1130-1135; Sharon, J. 等 (1976) Biochemistry 15:1591-1594)。这些各种片段是使用常规技术生成的, 诸如蛋白酶切割或化学切割 (参见例如 Rousseaux 等, Meth. Enzymol., 121:663-69 (1986))。

[0058] 如本文中使用的, 术语 PD-1 拮抗剂的“可溶性部分”意指全长多肽的一部分, 其不包括跨膜部分或区段的任何部分。例如, 关于 B7-DC, 可溶性部分会包括细胞外部分 (有或无 N 端信号序列), 但是不会包括跨膜部分的任何部分 (或至少不足以降低溶解度)。如此, 人 B7-DC 的 ECD 显示为 SEQ ID NO:3, 而且由全长分子的 IgV 样和 IgC 样域二者 (即全长序列 (SEQ ID NO:1) 的氨基酸 20-221) 组成。

[0059] 如本文中使用的, “共刺激多肽”为在与 T 细胞上的细胞表面分子相互作用时调控 T 细胞活性的多肽。如此, T 细胞的应答可以是效应器 (例如 CTL 或抗体生成 B 细胞) 应答、为一种或多种效应器 (例如 CTL 或抗体生成 B 细胞) 应答提供帮助的辅助应答、或阻遏应答。

[0060] 如本文中使用的, 术语“治疗方案”指对疾病的治疗或用于实现期望的生理变化的方法, 期望的生理变化诸如升高的或降低的免疫系统对抗原或免疫原的应答, 诸如涉及此类应答的一种或多种细胞的数目或活性的升高的或降低或涉及此类应答的细胞类型的增多或减少, 其中所述治疗或方法包括对动物诸如哺乳动物尤其是人施用足够量的所述方案的两种或更多种化学药剂或成分以有效治疗疾病或生成所述生理变化, 其中所述化学药剂或成分一起施用, 诸如作为同一组合物的一部分, 或者在相同时间或在不同时间分开且独立施用 (即每种药剂或成分的施用与一种或多种化学药剂或成分隔开限定的一段时间) 且其中所述一种或多种药剂或成分的施用实现比任何所述药剂或成分单独或孤立地施用时的结果要大的结果。

[0061] 如本文中使用的, 术语“分离的”意图描述处于如下环境中的感兴趣化合物 (例如多核苷酸或多肽), 所述环境是与该化合物天然存在的环境不同的, 例如与其天然环境分开, 诸如通过将肽浓缩至如下的浓度, 在自然界中找不到处于该浓度的该肽。“分离的”意图包括感兴趣化合物得到实质性富集和 / 或感兴趣化合物得到部分或实质性纯化的样品内的化合物。

[0062] 如本文中使用的, 术语“多肽”指任何长度的氨基酸链, 不管修饰 (例如磷酸化或糖基化)。本发明的多肽可以是重组多肽、天然多肽或合成多肽, 优选重组多肽。

[0063] 如本文中使用的, “变异”多肽与相应野生型多肽的氨基酸序列相比含有至少一处

氨基酸序列改变。

[0064] 如本文中使用的,“氨基酸序列改变”可以是例如一个或多个氨基酸的替代、删除、或插入。

[0065] 如本文中使用的,术语“部分”、“区段”、和“片段”在涉及多肽使用时指残基诸如氨基酸残基的连续序列,该序列形成更大序列的子集。例如,若多肽进行任何常见内肽酶诸如胰蛋白酶或糜蛋白酶处理,则源自此类处理的寡肽会呈现起始多肽的部分、区段或片段。多肽的“片段”如此指多肽的任何子集,其是比全长蛋白质要短的多肽。通常,片段的长度会是五个或更多个氨基酸。

[0066] 本发明的多肽(或其片段)的衍生物、类似物或同系物可以是(i)如下的,其中一个或多个氨基酸残基用保守的或非保守的氨基酸残基(优选保守的氨基酸残基)替代,且此类替代的氨基酸残基可以是或不是由遗传密码编码的,或(ii)如下的,其中一个或多个氨基酸残基包括取代基,或(iii)如下的,其中成熟多肽与另一化合物融合,诸如延长多肽半衰期的化合物(例如聚乙二醇),或(iv)如下的,其中别的氨基酸融合至成熟多肽,诸如前导或分泌序列或为纯化成熟多肽或前蛋白(proprotein)序列而采用的序列。根据本文中的教导,此类衍生物和类似物被认为是在本领域技术人员的范围内。

[0067] 如本文中使用的,“效价”指每个分子可得的结合位点数目。

[0068] 依照本发明,术语“百分比同一性”或“百分比相同”在涉及序列时意指将要比较的序列(“比较序列”)与描述的或主张的序列(“参照序列”)比对后,将序列与主张的或描述的序列比较。然后依照下面的公式确定%同一性:

[0069] 百分比同一性 = $100[1 - (C/R)]$

[0070] 其中 C 为参照序列与比较序列之间比对的长度上参照序列与比较序列之间差异的数目,其中(i)参照序列中在比较序列中没有相应比对碱基或氨基酸的每个碱基或氨基酸和(ii)参照序列中的每个缺口和(iii)参照序列中与比较序列中的比对碱基或氨基酸不同的每个比对碱基或氨基酸构成差异;而 R 为在与比较序列比对的长度上参照序列中的碱基或氨基酸的数目,其中参照序列中创建的任何缺口也作为碱基或氨基酸来计数。若比较序列和参照序列之间有如上所述计算得到的百分比同一性大约等于或大于规定的最小百分比同一性的比对,则比较序列与参照序列具有规定的最小百分比同一性,即使可能有如上计算得到的百分比同一性小于规定的百分比同一性的比对。

[0071] 如本文中使用的,术语“保守性氨基酸”意指为如下的替代,其中替代的氨基酸具有相似的结构或化学特性,而“非保守性”氨基酸替代为如下的替代,其中替代的氨基酸的电荷、疏水性、或体积有显著改变。非保守性替代在它们维持下述各项的效果方面会更加显著不同:(a)替代区域中肽骨架的结构,例如作为片层或螺旋构象;(b)分子在靶位点处的电荷或疏水性;或(c)侧链的体积。保守性氨基酸替代的例子包括那些其中替代在下述五组之一内的:1)小的、脂肪族的、非极性的或微极性的残基(Ala, Ser, Thr, Pro, Gly);2)极性的、带负电荷的残基及其酰胺(Asp, Asn, Glu, Gln);极性的、带正电荷的残基(His, Arg, Lys);大的、脂肪族的、非极性的残基(Met, Leu, Ile, Val, Cys);和大的、芳香族的残基(Phe, Tyr, Trp)。非保守性氨基酸替代的例子是那些其中1)亲水性残基(例如丝氨酰或苏氨酰)替代(或被替代)疏水性残基(例如亮氨酰、异亮氨酰、苯丙氨酰、缬氨酰、或丙氨酰);2)半胱氨酸或脯氨酸替代(或被替代)任何其它残基;3)具有正电性侧链的残基(例

如赖氨酰、精氨酰、或组氨酰)替代(或被替代)负电性残基(例如谷氨酰或天冬氨酰);或 4)具有大侧链的残基(例如苯丙氨酸)替代(或被替代)没有侧链的残基(例如甘氨酸)。

[0072] 术语“个体”、“宿主”、“受试者”、和“患者”在本文中可互换使用,而且指哺乳动物,包括但不限于灵长类动物例如人,以及啮齿类动物诸如小鼠和大鼠,及其它实验室动物。

[0073] 如本文中使用的,术语“有效量”或“治疗有效量”意指足以治疗、抑制、或减轻所治疗疾病状态的一种或多种症状或以其它方式提供想要的药理学和/或生理学效果(尤其是增强针对选定抗原的 T 细胞应答)的剂量。精确的剂量会随多种因素而变化,诸如受试者依赖性变量(例如年龄、免疫系统健康、等)、疾病、和所施用的治疗。

[0074] 如本文中使用的,“药学可接受载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、涂层、抗菌剂和抗真菌剂、等张和吸收延迟剂、等等。此类介质和药剂对药学活性物质的使用是本领域公知的。除非任何常规介质或药剂与活性化合物不相容,涵盖其治疗性组合物中的使用。补充性活性化合物也可掺入组合物。

[0075] 术语“抗体”意图包括完整分子以及其包括抗原结合位点的片段二者。完整抗体结构常常以 H₂L₂ 给出,而且指抗体通常包含 2 条轻(L)氨基酸链和 2 条重(H)氨基酸链的实情。这两种链都具有能够与结构互补的抗原靶相互作用的区。与靶相互作用的区称作“可变”或“V”区,而且以来自抗原特异性不同的抗体的氨基酸序列的差异来表征。H 或 L 链任一的可变区含有能够特异性结合抗原靶的氨基酸序列。这些序列内是因它们在特异性不同的抗体间的极度可变性而称作“高变”的较小序列。此类高变区也称作“互补决定区”或“CDR”区。这些 CDR 区负责抗体对特定抗原决定簇结构的基本特异性。CDR 呈现可变区内的非连续氨基酸段,但是不管物种,已经发现这些关键氨基酸序列在可变重和轻链区内的位置定位具有可变链氨基酸序列内的相似定位。所有抗体的可变重和轻链各具有 3 个 CDR 区,各轻(L)链和重(H)链的每个 CDR 区彼此不相连(称作 L1、L2、L3、H1、H2、H3)。公认的 CDR 区记载于 Kabat et al, J. Biol. Chem. 252:6609-6616(1977)。依照本发明公开的抗体还可以是完全合成的,其中抗体的多肽链是合成的,而且可能为结合本文中作为受体公开的多肽而优化。此类抗体可以是嵌合的或人源化的抗体,而且可以是结构上完整四聚物的,或者可以是二聚物的且只包含一条重链和一条轻链。

[0076] 发明详述

[0077] 本发明提供了用于在哺乳动物中治疗疾病的治疗方案或联合疗法,其包含降低或消除 T 细胞优选人 T 细胞中抑制性信号转导的化合物,该化合物与增强剂联合施用以提高免疫应答。

[0078] 本发明的方法还涉及广谱免疫调控剂及其组合物的使用。一般地,这些方法引起的升高的 T 细胞应答大于单独施用相同剂量的所述 PD-1 拮抗剂或所述增强剂任一引起的任何升高的 T 细胞应答。

[0079] 所公开的组合物和方案可用于刺激或增强涉及 T 细胞的免疫应答。如此,本发明的方法在治疗如下疾病状况中最有用,该疾病状况会受益于 T 细胞活性的升高及其中升高的 T 细胞应答是治疗所述疾病所必需的或足够的,即使该疾病不是由降低的 T 细胞应答特异性引起的或加重的。在一个优选的实施方案中,要治疗或预防的疾病类型是恶性肿瘤或由受到攻击(即由细胞毒性 T 淋巴细胞进行的)的细菌、病毒、原生动物、蠕虫

(helminth)、或其它细胞内微生物病原体引起的慢性感染性疾病。使用所公开的组合物活化 T 细胞也有利于治疗或预防以免疫遏制为特征的状况。

[0080] 依照本发明, T 细胞应答可通过结合 T 细胞表面上的受体的分子和结合此类受体之配体的分子来调节。在 PD-1 的情况中, 结合 PD-1 以降低其抑制效果的分子和 / 或结合一种或多种 PD-1 配体以降低其结合 PD-1 的能力的分子具有如下的效果, 即降低 PD-1 抑制 T 细胞应答的能力, 由此提高这种应答及其免疫学效应。

[0081] A. PD-1 受体拮抗剂

[0082] 提供了含有 PD-1 受体拮抗剂的组合物, 其包括结合及阻断 PD-1 的配体以干扰或抑制所述配体结合 PD-1 受体, 或者直接结合及阻断 PD-1 受体且不诱导经由 PD-1 受体的抑制性信号转导的化合物或药剂。在另一个实施方案中, PD-1 受体拮抗剂直接结合 PD-1 受体且不触发抑制性信号转导, 而且还结合 PD-1 受体的配体以降低或抑制配体触发经由 PD-1 受体的信号转导。通过降低结合 PD-1 受体及触发抑制性信号转导的配体的数目和 / 或量, 更少的细胞受到由 PD-1 信号转导递送的负信号所致的削弱, 而且能实现更有力的免疫应答。

[0083] 依照本发明, PD-1 信号传导要求结合与由主要组织相容性复合物 (MHC) 呈递的肽抗原密切接近的 PD-1 配体 (诸如 B7-H1 或 B7-DC) (参见例如 Freeman Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 105 :10275-10276 (2008))。因此, 阻止 T 细胞膜上 PD-1 和 TCR 共连接的蛋白质、抗体或小分子是本发明涵盖的有用 PD-1 拮抗剂。

[0084] 例示性 PD-1 受体拮抗剂包括但不限于 B7-DC 多肽, 包括这些的同系物和变体, 以及任何上述的活性片段, 和掺入任何这些的融合蛋白。在一个优选的实施方案中, 所述融合蛋白包含 B7-DC 的可溶性部分, 其偶联至抗体诸如人 IgG 的 Fc 部分, 但是不掺入人 B7-DC 的整个或部分跨膜部分。PD-1 受体拮抗剂也可以是小分子拮抗剂或抗体, 其通过结合 PD-1 的配体或 PD-1 自身来降低或干扰 PD-1 受体信号转导, 尤其是此类结合后没有 PD-1 与 TCR 的共连接, 由此不触发经由 PD-1 受体的抑制性信号转导的情况。

[0085] 本文中提供的 PD-1 受体拮抗剂作为免疫应答刺激性治疗剂在体内和离体一般是有用的。一般而言, 所公开的拮抗剂组合物对于治疗具有或倾向于任何如下疾病或病症的受试者是有用的, 其中受试者的免疫系统针对所述疾病或病症发起免疫应答。

[0086] 1. B7-DC 多肽

[0087] 在某些实施方案中, B7-DC 蛋白可用作 PD-1 受体拮抗剂。B7-DC 是 PD-1 的一种天然配体且以比 B7-H1 要高的亲和力结合 PD-1, 而且如此能抑制 B7-H1 :PD-1 相互作用。合适的 B7-DC 多肽 (包括其变体、同系物和片段) 可得自下述全长人 B7-DC 多肽, 有 (SEQ ID NO :1) 或无 (SEQ ID NO :2) 内源信号肽。

[0088] MIFLLMLSL ELQLHQIAAL FTVTPKELY IIEHGSNVT L ECFDGTGSHV NLGAIASLQ 60

[0089] KVENDTSPHR ERATLLEEQL PLGKASFHIP QVQVRDEGQY QCIIYGVAV DYKYLTLKVK 120

[0090] ASYRKINTHI LKVPETDEVE LTCQATGYPL AEVSWPNVSV PANTSHSRTP EGLYQVTSVL 180

[0091] RLKPPPGRNF SCVFWNTHVR ELTLASIDLQ SQMEPRTHPT WLLHIFIPFC IIAFIFIATV 240

[0092] IALRKQLCQK LYSSKDTTKR PVTITTKREVN SAI 273

[0093] (SEQ IDNO :1)

[0094] LFTVTPKEL YIIEHGSNVT L ECFDGTGSH VNLGAIASL QKVENDTSPH RERATLLEEQ 60

[0095]	LPLGKASFHI PQVQVRDEGQ YQCIIIIYGVA WDYKYLTLKV KASYRKINTH ILKVPETDEV	120
[0096]	ELTCQATGYP LAEVSHPNVS VPANTSHSRT PEGLYQVTSV LRLKPPPGRN FSCVFWNTHV	180
[0097]	RELTLASIDL QSQMEPRTHP TWLLHIFIPF CIIAFIFIAT VIALRKQLCQ KLYSSKDTTK	240
[0098]	RPVTTTKREV NSAI	254
[0099]	(SEQ ID NO :2)	

[0100] B7 分子家族 (包括 B7-DC) 在细胞表面处表达, 有一个近膜恒定 IgC 域和一个远膜 IgV 域。这些配体的受体共享共同的胞外 IgV 样域。受体 - 配体对的相互作用主要经由配体和受体的 IgV 域中的残基来介导。通常, IgV 域被描述为具有两个片层, 每个含有一层 β 链。这些 β 链称作 A'、B、C、C'、C''、D、E、F 和 G。此类多肽的结构记载于文献 (参见 Molnar 等, Crystal structure of the complex between programmed death-1 (PD-1) and its ligand PD-L2, PNAS, Vol. 105, pp. 10483-10488 (29 July 2008))。

[0101] B7-DC (一种跨膜蛋白) 以其单体形式包含 IgV 和 IgC 域, 它们构成分子的细胞外部分 (细胞外结构域, 或 ECD), 其中 IgV 样域完全或部分负责 PD-1 结合以及本发明方法中叙述的其它功能。对于人蛋白, IgV 域的特征在于它拥有连接 B 和 F 链 (见上文) 的二硫键, 这看来是多种 IgV 域特征性的, 而且拥有与 B7-1 和 B7-2 二者的 IgV 域 (参见 Molnar 等 (2008), 见上文) 相似的三维结构。

[0102] 在一个实施方案中, B7-DC 变体多肽在一个或多个这些 β 链内含有氨基酸改变 (即替代、删除或插入), 为任何可能组合。在另一个实施方案中, B7-DC 变体在 A'、C、C'、C''、D、E、F 或 G β 链内含有一处或多处氨基酸改变 (即替代、删除或插入)。在一个优选的实施方案中, B7-DC 变体在 G β 链内含有一处或多处氨基酸改变。在另一个实施方案中, 变异 B7-DC 多肽片段包括 B7-DC 的 IgC 和 IgV 域。在另一个实施方案中, 变异 B7-DC 多肽片段包括 B7-DC 的 IgV 域。人和小鼠 B7-DC 蛋白含有短的胞质内结构域、单一跨膜结构域和细胞外结构域。细胞外结构域含有两个 Ig 域; 一个近膜 IgC 域和一个远膜 IgV 域。变异 B7-DC 多肽的有用片段包括可溶性片段。可溶性 B7-DC 片段为可以自生成细胞脱落、分泌或以其它方式提取的 B7-DC 片段。在一个实施方案中, 变异 B7-DC 多肽片段包括 B7-DC 的整个细胞外结构域。B7-DC 的细胞外结构域包括鼠或人 B7-DC 的氨基酸约 20 至约氨基酸 221 或其活性片段。在另一个实施方案中, 变异 B7-DC 多肽片段包括 B7-DC 的 IgC 和 IgV 域。在另一个实施方案中, 变异 B7-DC 多肽片段包括 B7-DC 的 IgV 域。

[0103] 认为 PD-1 信号传导要求结合与由主要组织相容性复合物 (MHC) 呈递的肽抗原密切接近的 PD-1 配体 (通常是 B7-H1) (Freeman, Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A 105 : 10275-10276 (2008))。因此, 阻止 T 细胞膜上 PD-1 和 TCR 共连接的蛋白质、抗体或小分子是本发明涵盖的有用 PD-1 拮抗剂。

[0104] 在本发明的方法和组合物中有用的 PD-1 拮抗剂包括掺入 ECD 的 B7-DC 蛋白片段。或者, B7-DC 的片段包括包含 IgV 或 IgV 样域的细胞外结构域的一部分, 优选氨基酸 20-221, 更优选 20-121, 其足以结合 PD-1 受体以干扰或阻止或以其它方式降低经由 PD-1 受体的抑制性信号转导。在一个优选的实施方案中, B7-DC 片段与 B7-H1 竞争对 PD-1 受体的结合。

[0105] 在一个实施方案中, 变异 B7-DC 多肽片段可以含有多肽中对于结合 PD-1 而言重要的区。这些多肽片段可用于竞争对 PD-1 的结合及阻止天然 B7-DC 结合 PD-1。通过竞争对

PD-1 的结合,这些片段可用于增强免疫应答,因为抑制 B7-H1 和 B7-DC 与 PD-1 的相互作用抑制在其它情况中会发生的对免疫应答的遏制。小鼠或人 B7-DC 的会竞争性结合 PD-1 的多肽片段可含有例如氨基酸 101-108 或 110-114。与所述野生型 B7-DC 的片段缺失情况下野生型 B7-DC 对 PD-1 的结合水平相比,野生型 B7-DC 对 PD-1 的结合通常被抑制至少 50%、60%、70%、75%、80%、90%、95%、或超过 95%。在本发明的方法和/或组合物中有用的例示性 B7-DC 片段包括但绝不限于下述 B7-DC 细胞外结构域:人 B7-DC 细胞外结构域 (ECD):

[0106] LFTVTVPKEL YIIHGSNVT LECNFDTGSH VNLGAIASL QKVENDTSPH RERATLLEEQ 60

[0107] LPLGKASFHI PQVQVRDEGQ YQCIIIIYGVA WDYKYLTLKV KASYRKINTH ILKVPETDEV 120

[0108] ELTCQATGYP LAEVSWPNVS VPANTSHSRT PEGLYQVTSV LRLKPPPGRN FSCVFWNTHV 180

[0109] RELTLASIDL QSQMEPRTHP TW 202

[0110] (SEQ ID NO :3)

[0111] 和小鼠 B7-DC ECD :

[0112] LFTVTAPKEV YTVDVGSSVS LECDFDRREC TELEGIRASL QKVENDTSLQ SERATLLEEQ 60

[0113] LPLGKALFHI PSVQVRDSGQ YRCLVICGAA WDYKYLTVKV KASYMRIDTR ILEVPGTGEV 120

[0114] QLTCQARGYP LAEVSQNVNS VPANTSHIRT PEGLYQVTSV LRLKPQPSRN FSCMFWNAHM 180

[0115] KELTSAIDP LSRMEPKVPR TW 202

[0116] (SEQ ID NO :4)

[0117] 猕猴 B7-DC ECD :

[0118] LFTVTVPKEL YIIHGSNVT LECNFDTGSH VNLGAIASL QKVENDTSPH RERATLLEEQ 60

[0119] LPLGKASFHI PQVQVRDEGQ YQCIIIIYGVA WDYKYLTLKV KASYRKINTH ILKVPETDEV 120

[0120] ELTCQATGYP LAEVSWPNVS VPANTSHSRT PEGLYQVTSV LRLKPPPGRN FSCVFWNTHV 180

[0121] RELTLASIDL QSQMEPRTHP TW 202

[0122] (Seq ID NO :15)

[0123] 在本发明的方法和组合物中有用的众多其它灵长类动物序列提供于 Onlamoon 等, Immunology, Vol. 124, pp. 277-293 (2008)。

[0124] 在本发明的组合物和方法中有用的 PD-1 拮抗剂还包括融合蛋白(如下文描述的),其包含第一和第二多肽部分,其中所述融合蛋白或至少其第一多肽部分拥有 PD-1 拮抗剂活性,尤其是所述融合蛋白结合及阻断 PD-1 或结合及阻断 PD-1 之配体的情况。此类融合蛋白的第一多肽部分可包含本文中其它地方叙述的在本发明的方法中用作 PD-1 拮抗剂的任何 PD-1 拮抗剂多肽或其 PD-1 结合片段,或由其组成。在一个优选的实施方案中,在此类融合蛋白中,所述第一多肽部分在所述第二多肽部分的 N 端。在另一个实施方案中,通过构成所述第一和第二多肽部分的氨基酸以外的寡肽,所述第一多肽部分连接至所述第二多肽部分,其中所述连接氨基酸没有实质性降低所述融合蛋白的 PD-1 拮抗剂活性。

[0125] 在一种优选的二聚物融合蛋白中,二聚物源自两条 Ig 重链的 CH 区中的 Cys 残基的共价键合,该 Cys 残基与二聚化的正常 Ig 重链中二硫化物连接的 Cys 残基相同。

[0126] 例行用作融合蛋白结合配偶的多种多肽序列是本领域公知的。有用的多肽结合配偶的例子包括但不限于绿色荧光蛋白 (GFP)、谷胱甘肽 S- 转移酶 (GST)、多组氨酸、myc、血凝素、Flag™ 标签 (Kodak, New Haven, CT)、麦芽糖 E 结合蛋白和蛋白 A。

[0127] 又一个实施方案提供一种四聚物构建物,该构建物具有 BirA 底物,其融合至变

异 B7-DC 多肽的细胞外结构域。用于生成四聚物构建物的方法是本领域已知的（参见 Pertovas 等, J. Exp. Med., 203 :2281 (2006)）。

[0128] 例示性小鼠 B7-DC 融合蛋白含有小鼠 B7-DC 的氨基酸 20-221, 其融合至小鼠 IgG2a(CAA49868) 的氨基酸 237-469。在一个非限制性例子中, 人 B7-DC 融合蛋白含有人 B7-DC 的氨基酸 20-221, 其融合至人 IgG1(AAA02914) 的氨基酸 245-476。用于 B7-DC 融合蛋白的信号肽包括内源信号肽或任何其它信号肽, 其促进宿主分泌融合蛋白。在另一个实施方案中, 第一多肽会只包括 IgV 域。其它实施方案可包含 IgG 抗体诸如 IgG1 的铰链和 Fc 域, 不存在可变区。其它实施方案包括使用 IgG2 或 IgG4 的铰链和 Fc 区, 尤其是具有 N297Q 或其它降低效应器功能的突变。

[0129] 依照本发明的方法和组合物, 可用作 PD-1 拮抗剂的多肽或可用作 PD-1 拮抗剂的融合蛋白的第一多肽部分包含与 SEQ ID NO :1 的氨基酸 1-221、优选 SEQ ID NO :1 的氨基酸 20-221、或 SEQ ID NO :1 的氨基酸 26-221, 或者 SEQ ID NO :3 或 4 的氨基酸 1-202、更优选 SEQ ID NO :1 的氨基酸 20-121 或 SEQ ID NO :3 或 4 的氨基酸 1-102 具有至少 60%、或至少 65%、或至少 70%、或至少 75%、或至少 80%、或至少 85%、或至少 90%、或至少 95%、或至少 99% 同一性的氨基酸序列。

[0130] 在一个实施方案中, 可用作 PD-1 拮抗剂的多肽或可用作 PD-1 拮抗剂的融合蛋白的第一多肽部分由 SEQ ID NO :1 的氨基酸 1-221 组成, 或由 SEQ ID NO :1 的氨基酸 20-221 组成, 或由 SEQ ID NO :1 的氨基酸 26-221 组成, 或由 SEQ ID NO :3 或 4 的氨基酸 1-202 组成。在一个实施方案 (SEQ ID NO :2) 中, 它不包含 SEQ ID NO :1 的氨基酸 1-19。

[0131] 在其它具体的例子中, PD-1 拮抗剂多肽或 PD-1 拮抗剂融合蛋白的第一多肽部分包含 SEQ ID NO :1 的氨基酸序列 20-121, 优选地其中它包含其残基 110-114 处的氨基酸序列 WDYKY, 或者包含 SEQ ID NO :3 的氨基酸 1-102, 优选地其中它包含其残基 91-95 处的氨基酸序列 WDYKY。

[0132] 在一个优选的实施方案中, 此类百分比同一性是通过依赖如本文中别处定义的保守性氨基酸替代实现的。

[0133] 在一个此类实施方案中, PD-1 拮抗剂多肽或 PD-1 拮抗剂融合蛋白的第一多肽部分不包含 SEQ ID NO :1 的氨基酸 1-19, 或者不包含跨膜结构域的任何部分, 尤其是不包含整个此类结构域, 或者不包含 PD-1 配体或其它 PD-1 拮抗剂蛋白的胞内 (或可溶性) 结构域的任何部分, 尤其是不包含整个此类结构域。在一个优选的实施方案中, 此类拮抗剂或第一多肽部分只包含 SEQ ID NO :1 的细胞外结构域 (ECD), 而且如此只包含所述序列的多肽的可溶性部分或所述可溶性部分的片段。

[0134] 在其它此类实施方案中, PD-1 拮抗剂多肽或 PD-1 拮抗剂融合蛋白的第一多肽部分包含 PD-1 配体的 IgV 域或 IgV 样域或其 PD-1 结合片段, 或者由 PD-1 配体的 IgV 域或 IgV 样域或其 PD-1 结合片段组成。在具体的例子中, 此类 PD-1 配体是野生型 B7-DC 或 B7-H1 分子, 优选小鼠或灵长类动物, 优选人野生型 B7-DC 或 B7-H1 分子。

[0135] 在其它此类实施方案中, PD-1 拮抗剂多肽或 PD-1 拮抗剂融合蛋白的第一多肽部分, PD-1 配体的 IgV 域或 IgV 样域的 PD-1 结合片段, 尤其是 IgV 域或 IgV 样域的情况, 由 SEQ ID NO :1 的氨基酸 20-121 或 SEQ ID NO :3 的氨基酸 1-102 组成。

[0136] 本发明的 PD-1 拮抗剂还包括 SEQ ID NO :1 (人全长) 氨基酸 20-121 或 SEQ ID NO :

3(细胞外结构域或ECD)氨基酸1-102的PD-1结合片段。

[0137] 在其具体实施方案中,所述多肽或PD-1结合片段还掺入SEQ ID NO:1残基110-114处的氨基酸WDYKY或SEQ ID NO:3残基91-95处的WDYKY。作为非限制性例子,此类PD-1结合片段包含SEQ ID NO:1氨基酸20-121序列的至少10个、或至少20个、或至少30个、或至少40个、或至少50个、或至少60个、或至少70个、或至少75个、或至少80个、或至少85个、或至少90个、或至少95个、或至少100个连续氨基酸,其中每一种此类PD-1结合片段的一个优选的实施方案会包含SEQ ID NO:1残基110-114处找到的氨基酸WDYKY或SEQ ID NO:3残基91-95处找到的WDYKY作为子片段。

[0138] 本发明具体涵盖的其它优选多肽和PD-1结合片段包括SEQ ID NO:1(人全长)氨基酸20-121及其PD-1结合片段的多肽序列,其中在此类多肽或PD-1结合片段中,残基42和/或102处存在半胱氨酸,优选这两个位置都有半胱氨酸,和/或其中残基21处存在苯丙氨酸,和/或其中残基28处存在谷氨酸,和/或其中苏氨酸,和/或其中残基60处存在谷氨酰胺,和/或其中残基101处存在谷氨酸,和/或其中残基103处存在异亮氨酸,和/或其中残基105处存在异亮氨酸,和/或其中残基107处存在甘氨酸,和/或其中残基108处存在缬氨酸,和/或其中残基110处存在色氨酸,和/或其中残基111处存在天冬氨酸,和/或其中残基112处存在酪氨酸,和/或其中残基113处存在赖氨酸,和/或其中残基114处存在酪氨酸,前提是在PD-1结合片段的情况中,所述片段大得足以包括此类氨基酸位置。

[0139] 本发明具体涵盖的别的优选多肽和PD-1结合片段包括SEQ ID NO:3(人ECD)或SEQ ID NO:4(小鼠ECD)氨基酸1-102及其PD-1结合片段的多肽序列,其中在此类多肽或PD-1结合片段中,残基23和/或83处存在半胱氨酸,优选这两个位置都有半胱氨酸,和/或其中残基2处存在苯丙氨酸,和/或其中残基9处存在谷氨酸,和/或其中残基37处存在苏氨酸或精氨酸,优选苏氨酸,和/或其中残基41处存在谷氨酰胺,和/或其中残基82处存在精氨酸,和/或其中残基84处存在亮氨酸,和/或其中残基86处存在异亮氨酸,和/或其中残基88处存在甘氨酸,和/或其中残基89处存在丙氨酸,和/或其中残基91处存在色氨酸,和/或其中残基92处存在天冬氨酸,和/或其中残基93处存在酪氨酸,和/或其中残基94处存在赖氨酸,和/或其中残基95处存在酪氨酸,前提是在PD-1结合片段的情况中,所述片段大得足以包括此类氨基酸位置。

[0140] 在别的实施方案中,任何上述多肽还可掺入取自B7-DC或B7-H1多肽(诸如小鼠或灵长类动物的,优选人的)信号、跨膜或C端域的部分或片段,例如1至10个连续氨基酸的。

[0141] 此类多肽和/或PD-1结合片段还可存在于本发明的任何融合蛋白中,例如此类多肽或PD-1结合片段呈现此类融合蛋白之“第一多肽”的情况。

[0142] 在具体的例子中,在本发明的治疗方案中与增强剂组合使用的分子包含SEQ ID NO:1的氨基酸20-221的PD-1结合片段。在一个此类实施方案中,所述片段来自SEQ ID NO:1的氨基酸20-121,优选所述片段含有SEQ ID NO:1氨基酸110-114的情况。在一些实施方案中,存在一个以上此类片段(如本文中别处描述的),而且所述分子包含B7-DC蛋白的至少2,3,4,5或更多个片段,尤其是所述片段是SEQ ID NO:1氨基酸20-221的一部分或包含SEQ ID NO:1氨基酸20-221一部分的情况。在其一个优选的实施方案中,至少一个所述片段来自SEQ ID NO:1的氨基酸20-121,更优选其中至少一个所述片段包括SEQ ID NO:

1 的氨基酸 110-114(即序列 WDYKY(SEQ ID NO:14))。在优选的实施方案中,PD-1 结合片段在长度上包含至少 10 个、或至少 25 个、或至少 50 个、或至少 75 个、或至少 100 个连续氨基酸。

[0143] 内源人信号肽具有如下序列 MIFLLLMLSL ELQLHQIAA(SEQ IDNO:5),而且呈现 SEQ ID NO:1 的头 19 个氨基酸。在某些实施方案中,B7-DC 的多肽片段可包括内源或异源信号肽的 1,2,3,4,5,6,7,8,9 或 10 个连续氨基酸(其可用于通过在经转化细胞中表达及自经转化细胞分泌来生成重组 B7-DC 多肽)。还会领会,有用的 B7-DC 多肽可包括 B7-DC 跨膜结构域的 1,2,3,4,5,6,7,8,9 或 10 个连续氨基酸和/或胞质结构域的 1,2,3,4,5,6,7,8,9 或 10 个连续氨基酸或其组合,前提是 B7-DC 片段保留拮抗 PD-1 受体的能力。

[0144] PD-1^{-/-}小鼠的表型为在体内 PD-1 是免疫应答的负调节物提供了直接证据。在 PD-1 缺失下,C57BL/6 背景上的小鼠缓慢发生狼疮样肾小球肾炎和进行性关节炎(Nishimura 等,Immunity,11:141-151(1999))。BALB/c 背景上的 PD-1^{-/-}小鼠迅速发生致命的自身免疫性扩张型心肌病(Nishimura 等,Science. 291:319-322(2001))。然而,实质性证据指示 B7-DC 能发挥共刺激活化 T 细胞应答的功能。在亚最佳 TCR 信号存在下,在体外 B7-DC 引起升高的增殖和细胞因子生成(Tseng 等,J. Exp. Med. 193:839-846(2001))。另一方面,体外研究指示 B7-DC 在 T 细胞应答中的负调节作用。T 细胞上 PD-1 以外的别的 B7-DC 受体的表达最好地解释了这些表面上矛盾的数据。

[0145] 因此,B7-DC 蛋白、其变体、片段和融合物可具有如下优点,即在通过阻止 PD-1 介导的抑制性信号转导来增强 T 细胞应答之外,通过结合活化 T 细胞的未知受体来直接增强 T 细胞应答。

[0146] 2. B7-H1 多肽

[0147] 在另一个实施方案中,在本发明的治疗方案中与增强剂组合使用的化合物是或包含哺乳动物 B7-H1(优选来自小鼠或灵长类动物,优选人)的片段,其中所述片段结合及阻断 PD-1 但不导致经由 PD-1 的抑制性信号转导且所述片段长度为至少 10 个、或至少 20 个、或至少 30 个、或至少 40 个、或至少 50 个、或至少 60 个、或至少 70 个、或至少 80 个、或至少 90 个、或至少 100 个连续氨基酸。在其它实施方案中,片段的长度可以是可变的,只要它具有结合 PD-1 但不生成导致 T 细胞增殖降低的抑制性信号转导的功能。此类 B7-H1 片段还可用作本发明融合蛋白第一多肽部分的一部分。

[0148] B7-H1 序列如下:

[0149] 人 B7-H1 多肽(SEQ ID NO:16):

[0150]	MRIFAVFIFM TYWHLLNAFT VTPKDLVVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME	60
[0151]	DKNIIQFVHG EEDLKVQHSS YRQARLLKD QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG	120
[0152]	ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPTSE HELTCQAEY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT	180
[0153]	TTNSKREEKL FNVSTLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAEVPIPELP LAHPPNERTH	240
[0154]	LVILGAILLC LGVALTIFIR LKGRMMDVK KCGIQDTNSK KQSDTHLEET	290

[0155] 小鼠 B7-H1(SEQ ID NO:17)

[0156]	MRIFAGIIFT ACCHLLRAFT ITAPKDLVVV EYGSNVTMEC RFPVERELDL LALVYWEKE	60
[0157]	DEQVIQFVAG EEDLKPQHSN FRGRASLPKD QLLKGNAALQ ITDVKLQDAG VYCCIIISYGG	120
[0158]	ADYKRITLKV NAPIRKINQR ISVDPATSEH ELICQAEQYP EAEVIWTNSD HQPVSGKRSV	280

[0159]	TTSRTEGMLL NVTSSLRVNA TANDVFYCTF WRSQPGQNHT AELIIPELPA THPPQNRTHW	240
[0160]	VLLGS ILLFL IVVSTVLLFL RKQVRMLDVE KCGVEDTSSK NRNDTQFEET	290
[0161]	猕猴 (Macaca mulatta)PD-L 1 (SEQ ID NO :18)	
[0162]	MRIFAVFIFT IYWHLLNAFT VTVPKDLYVV EYGSNMTIEC RFPVEKQLGL	60
[0163]	TSLIVYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVQHSN YRQRAQLLKD QLSLGNAALR	120
[0164]	ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPTSE	180
[0165]	HELTCAEGY PKAEVIWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL LNVSTSLRIN	240
[0166]	TTANEIFYCI FRRLGPEENH TAEVIPELP LALPPNERTH LVILGAIFLL	300
[0167]	LGVALTFIFY LRGKRMMDMK KSGIRVTNSK KQRDTQLEET	340

[0168] B7-H1-Ig 蛋白记载于 WO/2001/014557 (公布于 2001 年 3 月 1 日) 和 WO/2002/079499 (公布于 2002 年 10 月 10 日)。

[0169] 3. PD-1 和其它多肽

[0170] 本发明的其它有用多肽包括那些结合 PD-1 受体之配体的多肽。这些包括 PD-1 受体蛋白或其可溶性片段,其能结合 PD-1 配体诸如 B7-H1 或 B7-DC,及阻止结合内源 PD-1 受体,由此阻止抑制性信号转导。B7-H1 还显示出结合蛋白 B7.1 (Butte 等, Immunity, Vol. 27, pp. 111-122 (2007))。此类片段还包括如下的 PD-1 蛋白可溶性 ECD 部分,其包括提高对天然配体的结合的突变诸如 A99L 突变 (Molnar 等, Crystal structure of the complex between programmeddeath-1 (PD-1) and its ligand PD-L2, PNAS, Vol. 105, pp. 10483-10488 (29 July 2008))。如下的 B7-1 或可溶性其片段也是有用的,其能结合 B7-H1 配体及阻止结合内源 PD-1 受体,由此阻止抑制性信号转导。

[0171] 在本发明的方法中有用的 PD-1 多肽如下:

[0172]	人 PD-1 (SEQ ID NO :19)	
[0173]	MQIPQAPWPV VWAVLQLGWR PGWFELDSPDR PWNPTFFPA LLVTEGDNA TFTCSFSNTS	60
[0174]	ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRTVL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT	120
[0175]	YLCGAISLAP KAIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS	180
[0176]	LVLLVWVLAV ICSRAARGTI GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP	240
[0177]	CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL	288
[0178]	猕猴 (Cynomolgus monkey)PD-1 (SEQ ID NO :20)	
[0179]	MQIPQAPWPV VWAVLQLGWR PGWFLESPDR PWNAPTFFPA LLLVTEGDNA TFTCSFSNAS	60
[0180]	ESFVLNWYRM SPSNQTDKLA AFPEDRSQPG QDCRFRTVL PNGRDFHMSV VRARRNDSGT	120
[0181]	YLCGAISLAP KAIKESLRA ELRVTERRAE VPTAHPSPP RPAGQFQTLV VGVVGGLLGS	180
[0182]	LVLLVWVLAV ICSRAARGTI GARRTGQPLK EDPSAVPVFS VDYGELDFQW REKTPEPPVP	240
[0183]	CVPEQTEYAT IVFPSGMGTS SPARRGSADG PRSAQPLRPE DGHCSWPL	288

[0184] 依照本发明,因为 B7-1 及其片段还能结合 B7-H1 及经由 B7-H1 将抑制性转导传送至 T 细胞,所以阻断这种相互作用也能降低经由 B7-H1 发生的抑制性信号转导。在本发明中使用的化合物包括那些阻断这种类型相互作用的分子。此类分子披露于 Butte 等 (2007), 见上文,而且包括具有双特异性的抗 B7-H1 抗体,其阻断 B7-H1 :B7-1 和 B7-H1 :PD-1 任一相互作用,以及展现单特异性的抗体,其阻断 PD-L1 :B7-1 相互作用。通过阻断 B7-1 来阻断这种相互作用的化合物也是有用的,而且包括抗 B7-1 抗体。

[0185] 4. 变异多肽

[0186] 如描述的,在本发明中有用的多肽包括那些经过突变以含有一处或多处氨基酸替代、删除、或插入的多肽。用于诱变的方法是本领域已知的。通过结合 PD-1 的配体,突变或变异多肽抑制或降低经由 PD-1 受体的抑制性信号转导受体。或者,变体(例如 B7-DC 多肽)能结合 PD-1 受体及抑制、降低、或阻断经由 PD-1 受体的抑制性信号转导。变异多肽可以是任何物种起源的。在一个实施方案中,变异多肽来自哺乳动物物种。在一个优选的实施方案中,变异多肽是鼠或灵长类动物,优选人起源的。

[0187] 在一个实施方案中,变异多肽是如下的 B7-DC 多肽,具有与野生型或非变异 B7-DC 相同的对 PD-1 的结合亲和力,但是具有相对于未突变的 B7-DC 多肽不到 10% 的触发经由 PD-1 受体的抑制性信号转导的能力或不具有该能力。在其它实施方案中,变异 B7-DC 多肽具有比野生型 B7-DC 大 10%、20%、30%、40%、50%、或 60% 的对 PD-1 的结合亲和力且不触发 PD-1 抑制性信号转导。

[0188] 变异多肽(例如变异 B7-DC 多肽)包括那些具有氨基酸替代、删除或插入的任何组合的变异多肽,只要 PD-1 拮抗活性相对于野生型没有实质性降低。然而,在有此类降低的情况中,这应当不超过野生型的一半,使得所述变体具有野生型蛋白质的 PD-1 拮抗剂活性的至少 50%,优选至少 60%,更优选至少 80%,最优选至少 90% 或 95%,尤其优选至少 100%。甚至更加想要源自所述变体的此类活性升高。在一个实施方案中,分离的 B7-DC 变异多肽具有氨基酸改变,使得它们的氨基酸序列与野生型 B7-DC 多肽(尤其是来自哺乳动物的,优选野生型小鼠或野生型灵长类动物,优选人 B7-DC 多肽)的氨基酸序列共享至少 60、70、80、85、90、95、97、98、99、99.5 或 100% 同一性。

[0189] 多肽序列同一性可以使用上文提供的百分比同一性的定义来计算。

[0190] 多肽中的氨基酸替代可以是“保守的”或“非保守的”。

[0191] B7 家族分子(包括 B7-DC)在细胞表面处表达,有一个近膜恒定 IgC 域和一个远膜 IgV 域。这些配体的受体共享共同的胞外 IgV 样域。受体-配体对的相互作用主要经由配体和受体的 IgV 域中的残基来介导。通常,IgV 域被描述为具有两个片层,每个含有一层 β 链。这些 β 链称作 A'、B、C、C'、C''、D、E、F 和 G。在一个实施方案中,B7-DC 变异多肽在一个或多个这些 β 链内含有任何可能组合形式的氨基酸改变(即替代、删除或插入)。在另一个实施方案中,B7-DC 变体在 A'、C、C'、C''、D、E、F 或 G β 链内含有一处或多处氨基酸改变(即替代、删除或插入)。在一个实施方案中,B7-DC 变体在 G β 链内含有一处或多处氨基酸改变。

[0192] 关于小鼠或灵长类动物,优选人 B7-DC,变异 B7-DC 多肽可以在相对于未突变的 B7-DC 不会实质性降低对 PD-1 的结合的位置处含有但不限于替代、删除或插入。然而,可以理解的是,所述氨基酸位置处的替代可以使用任何氨基酸或氨基酸类似物来进行。例如,所述位置处的替代可以用任何天然存在氨基酸(例如丙氨酸、天冬氨酸、天冬酰胺、精氨酸、半胱氨酸、甘氨酸、谷氨酸、谷氨酰胺、组氨酸、亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、脯氨酸、苏氨酸、丝氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、或酪氨酸)来进行。

[0193] 虽然本文中描述的替代是关于小鼠和灵长类动物,尤其是人 B7-DC 的,但是,注意到,本领域普通技术人员能容易地在来自其它物种(例如大鼠、仓鼠、豚鼠、沙鼠、家兔、犬、猫、马、猪、绵羊、牛或非人灵长类动物)的相应多肽中进行等同改变。

[0194] 优选的片段包括 B7-DC 的有效结合 PD-1 的整个或部分细胞外结构域。

[0195] 在一个实施方案中,变异 B7-DC 多肽片段是那些保留结合 PD-1 的能力且不触发 PD-1 抑制性信号转导的。一个实施方案提供变异 B7-DC 多肽,其是全长 B7-DC 的片段且通常具有全长变异 B7-DC 多肽的至少 20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%、100%、或甚至超过 100% 的 PD-1 拮抗剂活性。

[0196] 变异 B7-DC 多肽的有用片段包括可溶性片段。可溶性 B7-DC 片段是可以自生成细胞脱落、分泌或以其它方式提取的 B7-DC 片段。在一个实施方案中,变异 B7-DC 多肽片段包括 B7-DC 的整个细胞外结构域。B7-DC 的细胞外结构域包括小鼠或灵长类动物,优选人 B7-DC 的氨基酸约 20 至约氨基酸 221。在另一个实施方案中,变异 B7-DC 多肽片段包括 B7-DC 的 IgC 和 IgV 域。在另一个实施方案中,变异 B7-DC 多肽片段包括 B7-DC 的 IgV 域。

[0197] 在一个实施方案中,变异 B7-DC 多肽片段含有多肽中对于对 PD-1 的结合亲和力重要的区。这些多肽片段可用于结合及阻断 PD-1 受体以阻止天然配体结合 PD-1 受体,由此增强免疫应答。抑制天然 B7-H1 或 B7-DC 与 PD-1 的相互作用抑制在其它情况中会发生的对免疫应答的遏制。作为非限制性例子,小鼠或灵长类动物,优选人 B7-DC 的结合 PD-1 的多肽片段含有氨基酸 101-105 或 111-113。与片段缺失情况下 B7-H1 对 PD-1 的结合水平相比,B7-H1 对 PD-1 受体的结合通常被抑制至少 50%、或至少 60%、或至少 70%、或至少 75%、或至少 80%、或至少 90%、或至少 95%、或更多。

[0198] 人 PD-1 突变体 A99L 以比未突变的人 PD-1 要高的亲和力结合 B7-DC 和 B7-H1 (Lazar Molnar 等 PNAS 105p. 10483-10488 (2008))。在本发明的一个实施方案中,起降低抑制性信号转导的作用的化合物是可溶性蛋白质,诸如掺入这种突变的 PD-1 的 ECD。

[0199] 5. 经修饰的多肽

[0200] 如所述的,在本发明中有用的多肽(包括其变体、同系物和片段)可以通过在正常细胞环境中发现与多肽关联的化学模块来修饰,例如通过多肽的磷酸化、甲基化、酰胺化、硫酸化、酰化、糖基化、sumoylation 和遍在蛋白化。

[0201] 此类多肽也可以通过在细胞环境中正常情况下不是多肽一部分的化学模块来修饰。通过使多肽的靶定氨基酸残基与有机衍生试剂(其能够与选定侧链或末端残基反应)反应,可以将此类修饰引入分子。另一种有用的修饰是蛋白质的环化。此类修饰还包括引入能够直接或间接提供可检测信号的标记物,包括但不限于放射性同位素和荧光化合物。

[0202] 多肽的化学衍生物的例子包括用琥珀酸或其它羧酸酐衍生化的赖氨酰和氨基末端残基。用环状羧酸酐衍生化具有逆转赖氨酰残基的电荷的效果。用于衍生化含氨基残基的其它合适试剂包括亚氨酸酯诸如甲基吡啶亚胺甲酯;吡哆醛磷酸;吡哆醛;氯硼氢化物;三硝基苯磺酸;0-甲基异脲;2,4-戊二酮;和转氨酶催化的与乙醛酸盐的反应。侧链羧基天冬氨酰或谷氨酰可以通过与碳二亚胺($R-N=C=N-R'$)诸如 1-环己基-3-(2-吗啉基)-(4-乙基)碳二亚胺或 1-乙基-3-(4-氮阳离子-4,4-二甲基苯基)碳二亚胺反应来选择性修饰。此外,通过与氨反应,天冬氨酰和谷氨酰残基可以转变成天冬酰胺酰和谷氨酰胺酰残基。本发明的多肽也可以包括一种或多种 D-氨基酸,其替代一种或多种 L-氨基酸。

[0203] 在其它实施方案中,增强剂诸如 CTX 自身可以是降低抑制性信号转导的化合物的一部分,诸如增强剂化学连接至本发明 PD-1 拮抗剂的情况。

[0204] 6. 融合蛋白

[0205] 还提供了融合多肽,其具有第一融合配偶或多肽部分,该第一融合配偶或多肽部分包含整个或部分PD-1拮抗剂蛋白,例如B7-DC多肽,包括其变体、同系物及其片段,(i)直接融合至第二多肽或(ii)任选融合至接头肽序列,接头肽序列融合至第二多肽。融合配偶的存在能改变例如PD-1拮抗剂多肽的溶解度、亲和力和/或效价。所公开的融合蛋白包括如上所述的PD-1拮抗剂多肽的氨基酸改变(即替代、删除或插入)、片段、和/或修饰的任何组合。在一个实施方案中,B7-DC融合蛋白包括B7-DC蛋白的细胞外结构域作为第一结合配偶。在另一个实施方案中,此类B7-DC融合蛋白包括B7-DC蛋白的IgV和IgC域作为第一结合配偶。在另一个实施方案中,变异B7-DC融合蛋白包括B7-DC蛋白的IgV域作为第一结合配偶。

[0206] 代表性第一融合配偶包括上文公开的灵长类动物优选人或小鼠B7-DC多肽、其片段、和其变体。优选片段包括B7-DC的细胞外结构域。如所述的,细胞外结构域可以包括信号肽、B7-DC跨膜结构域、或二者的1-10个连续氨基酸。

[0207] 在一个实施方案中,本发明的组合物和/或产物和/或方法利用PD-1受体拮抗剂,尤其是多肽,包括其变体、同系物和片段,它们偶联至其它多肽以形成融合蛋白,通过结合PD-1配体诸如B7-H1,由此抑制配体与PD-1相互作用来拮抗PD-1受体。在另一个实施方案中,PD-1受体拮抗剂多肽或其变体偶联至其它多肽以形成融合蛋白,其通过结合及阻断PD-1受体来拮抗PD-1受体及抑制或降低经由PD-1的抑制性信号转导。

[0208] 相对于PD-1拮抗剂多肽,第二多肽结合配偶或第二多肽部分可以在N端或C端。在一个优选的实施方案中,第二多肽在PD-1拮抗剂多肽的C端。

[0209] 在一个优选的实施方案中,为在本发明的方法和组合物和/或产物中使用而涵盖的融合蛋白至少包含抗体的一部分。随着重组技术和分子生物学方法的出现,现在有可能通过重组手段生成抗体分子,及由此生成编码在抗体的多肽结构中的特定氨基酸序列的基因序列。此类抗体可以如下生成,或是克隆编码所述抗体之多肽链的基因序列或是直接合成所述多肽链,在体外装配合成的链以形成对特定表位和抗原决定簇具有亲和力的活性四聚物(H_2L_2)结构。这允许容易地生成具有来自不同物种和来源的中和性抗体的特征性序列的抗体。

[0210] 不管抗体的来源,或它们是如何重组构建的,或它们是如何合成的,在体外或在体内,使用转基因动物,诸如牛、山羊和绵羊,使用实验室或商业规模的大量细胞培养,在生物反应器中或通过直接化学合成(其在工艺的任何阶段都不采用活的生物体),所有抗体具有相似的总体三维结构。这种结构常常以 H_2L_2 给出,而且指抗体通常包含2条轻(L)氨基酸链和2条重(H)氨基酸链。这两种链都具有能够与结构互补的抗原靶相互作用的区。与靶相互作用的区称作“可变”或“V”区,而且以来自抗原特异性不同的抗体的氨基酸序列的差异来表征。

[0211] 在优选的实施方案中,PD-1受体拮抗剂多肽,包括片段、突变体和其它变体,具有第一融合配偶,该第一融合配偶具有整个或部分B7-DC蛋白或其变体,其(i)直接融合至第二多肽或(ii)任选融合至接头肽序列,接头肽序列融合至第二多肽。融合配偶的存在能改变B7-DC多肽的溶解度、亲和力和/或效价。在更优选的实施方案中,B7-DC多肽融合至Ig重链恒定区的一种或多种域,更优选与人免疫球蛋白C γ 1链的C μ 2和C μ 3区或与鼠免疫球

蛋白 C γ 2a 链的铰链、C μ 2 和 C μ 3 区对应的氨基酸序列。在一个优选的实施方案中,恒定区优选包括突变(例如 N297Q)来消除或降低 Fc 受体结合。

[0212] 人免疫球蛋白 C γ 1 链的铰链、C μ 2 和 C μ 3 区具有如下氨基酸序列:

[0213] EPKSCDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF 60
 [0214] NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT 120
 [0215] ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTTP 180
 [0216] PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTKSLSLSP GK 232
 [0217] (SEQ ID NO :6)。

[0218] 小鼠免疫球蛋白 C γ 2a 链的铰链、C μ 2 和 C μ 3 区具有如下氨基酸序列:

[0219] EPRGPTIKPC PPCKCPAPNL LGGPSVFIFP PKIKDVLMS LSPIVTCVVV DVSEDDPDVQ 60
 [0220] ISWVNNVEV HTAQTQTHRE DYNSTLRVVS ALPIQHQQW DM SGKEFKCKVN NKDLPAPIER 120
 [0221] TISKPKGSVR APQVYVLP PP EEEMTKKQVT LTCMVTDFMP EDIYVEWTNN GKTELNYKNT 180
 [0222] EPVLDSGDSY FMYSKLRVEK KNWVERNSYS CSVVHEGLHN HHTTKSFSRT PGK 233
 [0223] (SEQ ID NO :7)

[0224] 例示性小鼠 B7-DC 融合蛋白含有小鼠 B7-DC 的氨基酸 20-221,其融合至鼠 IgG2a(CAA49868)的氨基酸 237-469。人 B7-DC 融合蛋白可含有人 B7-DC 的氨基酸 20-221,其融合至人 IgG1(AAA02914)的氨基酸 245-476。用于 B7-DC 融合蛋白的信号肽可以是内源信号肽或任何其它信号肽,其促进宿主分泌融合蛋白。

[0225] 一种代表性小鼠 B7-DC-Ig 融合蛋白由 SEQ ID NO :8 的核酸序列编码。

[0226] 会领会,所公开的核酸序列可进行密码子优化以提高合成在本发明的方法和组合物中有用的融合蛋白的表达水平。用于密码子优化的方法是本领域已知的。

[0227] 由 SEQ ID NO :8 编码的小鼠 B7-DC-Ig 融合蛋白具有如下氨基酸序列:

[0228] MLLLLPILNL SLQLHPVAAL FTVTAPKEVY TVDVGSSVSL ECDFFDRRECT ELEGIRASLQ 60
 [0229] KVENDTSLQS ERATLLEEQL PLGKALFHIP SVQVRDSGQY RCLVICGA AW DYKYLTVKVK 120
 [0230] ASYMRIDTRI LEVPGTGEVQ LTCQARGYPL AEVSWQNVSV PANTSHIRTP EGLYQVTSVL 180
 [0231] RLKPQPSRNF SCMFVNAHMK ELTSAIIDPL SRMEPKVPR T WEPRGPTIKP CPPCKCPAPN 240
 [0232] LLGGPSVFIF PPKIKDVLMI SLSPIVTCVV VDVSEDDPDV QISWVNNVE VHTAQTQTHR 300
 [0233] EDYNSTLRVV SALPIQHQQW MSGKEFKCKV NNKDLPAPIE RTISKPKGSV RAPQVYVLP 360
 [0234] PEEEMTKKQV TLTCMVTDFM PEDYIYVEWTN NGKTELNYKN TEPVLDSGDS YFMYSKLRVE 420
 [0235] KKNWVERNSY SCSVHEGLH NHHTTKSFSR TPGK 454
 [0236] (SEQ ID NO :9)

[0237] SEQ ID NO :10 提供小鼠 B7-DC-Ig 融合蛋白的氨基酸序列,没有信号序列。

[0238] LFTVTAPKEV YTV DVGSSVS LECDFDRREC TELEGIRASLQKVENDTSLQ SERATLLEE Q 60
 [0239] LPLGKALFHI PSVQVRDSGQ YRCLVICGAA W DYKYLTVKV KASYMRIDTR ILEVPGTGEV 120
 [0240] QLTCQARGYP LAEVSQNV S VPANTSHIRT PEGLYQVTSV LRLKPQPSRN FSCMFVNAHM 180
 [0241] KELTSAIIDP LSRMEPKVPR TWEPRGPTIK PCPPCKCPAP NLLGGPSVFI FPPKIKDVL M 240
 [0242] ISLSPIVTCV VDVSEDDPD VQISWVNNV EVHTAQTQTH REDYNSTLRV VSALPIQHQQ 300
 [0243] WMSGKEFKCK VNNKDLPAPI ERTISKPKGS VRAPQVYVLP PPEEEMTKKQ VT LTCMVTDF 360
 [0244] MPEDIYVEWT NNGKTELNYK NTEPVLDSG SYFMYSKLRV EKKNWVERNS YSCSVHEGL 420

[0245] HNHHTTKSFS RTPGK 435

[0246] (SEQ ID NO :10)

[0247] 在一个实施方案中,人 B7-DC-Ig 由编码人 B7-DC-Ig 之氨基酸序列的 SEQID NO : 11 的核酸序列编码:

[0248] MIFLLLMLSL ELQLHQIAAL FTVTVPKELY IIEHGSNVTI ECNFDTGSHV NLGAITASLQ 60

[0249] KVENDTSPHR ERATLLEEQL PLGKASFHIP QVQVRDEGQY QCIIIIYGVAW DYKYLTLKVK 120

[0250] ASYRKINTHI LKVPETDEVE LTCQATGYPL AEVSWPNVSV PANTSHSRTP EGLYQVTSVL 180

[0251] RLKPPPGRNF SCVFWNTHVR ELTLASIDLQ SQMEPRTHPT WEPKSCDKTH TCPPCAPEL 240

[0252] LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE 300

[0253] QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS 360

[0254] RDELTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSGSGF FLYSKLTVDK 420

[0255] SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTKSLSLS PGK 453

[0256] (SEQ ID NO :12)

[0257] 本发明具体涵盖如下的实施方案,其中在本发明的方法和组合物中有用的成熟融合蛋白切除了信号序列。在一个优选的实施方案中,信号序列被完全切除。

[0258] SEQ ID NO :13 提供人 B7-DC-Ig 的氨基酸序列,没有信号序列。

[0259] LFTVTVPKEL YIIEHGSNVT LECNFDTGSH VNLGITASL QKVENDTSPH RERATLLEEQ 60

[0260] LPLGKASFIH PQVQVRDEGQ YQCIIIIYGVA WDYKYLTLKV KASYRKINTH ILKVPETDEV 120

[0261] ELTCQATGYP LAEVSWPVNS VPANTSHSRT PEGLYQVTSV LRLKPPPGRN FSCVFWNTHV 180

[0262] RELTLASIDL QSQMEPRTHP TWEPKSCDKT HTCPPCAPE LLGGPSVFLF PPKPKDTLMI 240

[0263] SRTPEVTCVV VDVSHEDPEV KFNWYVDGVE VHNKTKPRE EQYNSTYRVV SVLTVLHQDW 300

[0264] LNGKEYKCKV SNKALPAPIE KTISKAKGQP REPQVYTLPP SRDELTKNQV SLTCLVKGFY 360

[0265] PSDIAVEWES NGQPENNYKT TPPVLDSGSG FFLYSKLTVD KSRWQQGNVF SCSVMHEALH 420

[0266] NHYTKSLSL SPGK 434

[0267] (SEQ ID NO :13)。

[0268] 本发明具体涵盖如下的实施方案,其中在本文中公开的方法和组合物中使用的所公开的 B7-DC-Ig 融合蛋白与 SEQ ID NO :9, 10, 12 或 13 具有至少约 80%、85%、90%、99% 或 100% 序列同一性。

[0269] 在本发明的另一个实施方案中,融合多肽可具有双特异性功能,由此第一融合配偶结合 PD-1 的配体,诸如 B7-H1,而第二融合配偶结合 PD-1 受体且不触发经由 PD-1 受体的抑制性信号转导。

[0270] 虽然在本发明中有用的多肽可以是单体或二聚物,融合蛋白自身可以以单体或二聚物形式存在,优选二聚物。在具体的实施方案中,可用作本发明方法和组合物中的 PD-1 拮抗剂的融合蛋白可自发装配成寡聚物,尤其是二聚物形式,或者可以通过本领域公知手段化学连接以形成此类寡聚物。例如,可用于实施本发明的融合蛋白自身可以包含 B7-DC 多肽的一部分,其融合至抗体的一部分,而且这些可以进一步装配成二聚物。在一个此类例子中,用于本发明的多肽作为单一氨基酸链融合至抗体的 Fc 区(诸如这种构建物自单一重组多核苷酸表达的情况),之后两个此类融合产物彼此连接以形成同二聚物,诸如通过各 Fc 区之间二硫化物连接。

[0271] 此类二聚物产物可以是同二聚物（两个单体融合蛋白相同的情况）或者可以是异二聚物（两个不同融合蛋白彼此连接的情况）。此类二聚物的各个单体可以通过本领域已知的任何手段来连接，诸如通过共价连接（例如二硫键）或通过非共价连接（诸如离子相互作用）。在本发明的实施例中使用的 B7-DC-Ig 以同二聚物的形式存在，其具有 2 个拷贝的 SEQ ID NO:10，通过二硫化物连接连接在一起。另外，本发明的异二聚物包括双特异性蛋白和融合蛋白，其中一种单体部分结合 PD-1，而另一种结合 PD-1 的天然配体。此类异二聚物通过偶联本文中别处全面描述的多肽和融合蛋白来形成。

[0272] 在本发明的另一个有用的实施方案中，PD-1 拮抗剂是异二聚物，诸如两个融合蛋白连接在一起但它们不是相同氨基酸序列的情况。在一个具体的例子中，每个单体可包含抗体 Fc 部分，其连接至 B7-DC 多肽的活性片段，其中这些活性片段来自 B7-DC 多肽的不同部分，或其中包含与全长天然 B7-DC 多肽融合的抗体 Fc 部分的融合蛋白连接（例如交联）至包含抗体 Fc 部分和全长天然 B7-DC 多肽之活性片段的融合蛋白。在每一种此类情况中，形成每个单体融合蛋白中使用的部分抗体在两个单体单元之间可以是不同的。本发明的方法和组合物具体涵盖任何此类二聚物组合。

[0273] 在一种优选的二聚物融合蛋白中，二聚物源自两条 Ig 重链的 CH 区中的 Cys 残基的共价键合，该 Cys 残基与二聚化的正常 Ig 重链中二硫化物连接的 Cys 残基相同。

[0274] 又一个实施方案提供一种四聚物构建物，该构建物具有 BirA 底物，其融合至变异 B7-DC 多肽的细胞外结构域。用于生成四聚物构建物的方法是本领域已知的（参见 Pertovas 等, J. Exp. Med., 203:2281 (2006)）。

[0275] 7. 抗 PD-1 和其它抗体

[0276] 本发明的方法涵盖的其它 PD-1 拮抗剂包括结合 PD-1 或 PD-1 配体的抗体和其它抗体。

[0277] 在一个发明，本发明涉及一种在有下列需要的哺乳动物中提高 T 细胞应答的方法，包括对所述哺乳动物施用包含抗 PD-1 抗体和增强剂的有效治疗方案，其中所述治疗方案有效提高所述哺乳动物对所述抗原的 T 细胞应答。

[0278] 在本发明的治疗方案中有用的抗 PD-1 抗体包括但不限于那些记载于下述出版物的：

[0279] PCT/IL03/00425 (Hardy 等, WO/2003/099196)

[0280] PCT/JP2006/309606 (Korman 等, WO/2006/121168)

[0281] PCT/US2008/008925 (Li 等, WO/2009/014708)

[0282] PCT/JP03/08420 (Honjo 等, WO/2004/004771)

[0283] PCT/JP04/00549 (Honjo 等, WO/2004/072286)

[0284] PCT/IB2003/006304 (Collins 等, WO/2004/056875)

[0285] PCT/US2007/088851 (Ahmed 等, WO/2008/083174)

[0286] PCT/US2006/026046 (Korman 等, WO/2007/005874)

[0287] PCT/US2008/084923 (Terrett 等, WO/2009/073533)

[0288] Berger 等, Clin. Cancer Res., Vol. 14, pp. 30443051 (2008)。

[0289] 在本发明的方法中有用的抗 PD-1 抗体的一个具体的例子是 MDX-1106 (参见 Kosak, US 20070166281 (pub. 19 July 2007) at par. 42)，一种人抗 PD-1 抗体，优选以 3mg/

kg 的剂量施用。

[0290] 在另一个发明,本发明涉及一种在有下列需要的哺乳动物中提高 T 细胞应答的方法,包括对所述哺乳动物施用包含抗 PD-1 配体抗体(例如抗 B7-H1 抗体)和增强剂的有效治疗方案,其中所述治疗方案有效提高所述哺乳动物对所述抗原的 T 细胞应答。

[0291] 在本发明的治疗方案中有用的抗 B7-H1 抗体包括但不限于那些记载于下述出版物的:

[0292] PCT/US06/022423(WO/2006/133396, pub. 14December 2006)

[0293] PCT/US07/088851(WO/2008/083174, pub. 10July 2008)

[0294] US 2006/0110383(pub. 25May 2006)

[0295] 在本发明的方法中有用的抗 B7-H1 抗体的一个具体的例子是 MDX-1105(WO/2007/005874, published 11 January 2007),一种人抗 B7-H1 抗体。

[0296] 对于抗 B7-DC 抗体,参见 7,411,051、7,052,694、7,390,888、20060099203。

[0297] 本发明的另一个实施方案包括一种双特异性抗体,其包含结合 PD-1 受体的抗体和与该抗体桥接的结合 PD-1 配体诸如 B7-H1 的抗体。在一个优选的实施方案中,PD-1 结合部分降低或抑制经由 PD-1 受体的信号转导。

[0298] 在本发明中使用的抗体不必是抗 PD-1 或抗 PD-1 配体抗体,但是可以是可用于介导 T 细胞在免疫应答中的作用的其它抗体。在这个方面,本发明涉及一种在有下列需要的哺乳动物中提高针对抗原的 T 细胞应答的方法,包括对所述哺乳动物施用包含抗 CTLA4 抗体和增强剂的有效治疗方案,其中所述治疗方案有效提高所述哺乳动物对所述抗原的 T 细胞应答。为在本发明的方法中使用而涵盖的抗 CTLA4 抗体的一个例子包括 PCT/US2006/043690(Fischkoff 等,WO/2007/056539)中记载的抗体。

[0299] 在本发明的方法中有用的抗 CTLA4 抗体的具体例子是 Ipilimumab,也称作 MDX-010 或 MDX-101,一种人抗 CTLA4 抗体,优选以 10mg/kg 的剂量施用,及 Tremelimumab,一种人抗 CTLA4 抗体,优选以 15mg/kg 的剂量施用。

[0300] 8. 小分子 PD-1 拮抗剂

[0301] PD-1 受体拮抗剂也可以是小分子拮抗剂。术语“小分子”指具有大于 100 且小于约 2,500 道尔顿的分子量的有机小化合物,优选介于 100 和 2000 之间,更优选介于约 100 和约 1250 之间,更优选介于约 100 和约 1000 之间,更优选介于约 100 和约 750 之间,更优选介于约 200 和约 500 道尔顿之间。小分子常常包括环状碳或杂环结构和/或芳香族或多芳香族结构,被一种或多种官能团取代。通过结合 PD-1 的配体诸如 B7-H1 和 B7-DC 及阻止配体与 PD-1 相互作用或者通过直接结合及阻断 PD-1 受体且不触发经由 PD-1 受体的信号转导,小分子拮抗剂降低或干扰 PD-1 受体信号转导。

[0302] 在一个实施方案中,此类小分子可以与另一种 PD-1 拮抗剂或 CTLA4 拮抗剂,诸如对 PD-1 或其配体之一特异性的抗体或对 CTLA4 或其配体之一特异性的抗体组合施用。如此,此类小分子可以作为化合物在本发明的一种或多种方法中施用,或者可以与在本发明的方法中有用的其它化合物组合施用。例如,一系列有机小化合物显示出结合 B7-1 配体以阻止结合 CTLA4(参见 Erbe 等, J. Biol. Chem., Vol. 277, pp. 7363-7368(2002))。此类小有机物可以单独地或与抗 CTLA4 抗体一起地,与 CTX 施用联合施用以降低 T 细胞的抑制性信号转导。

[0303] 在一个实施方案中,为在本发明的方法中使用而涵盖 PD-1 拮抗剂或 CTLA4 拮抗剂包括反义核酸, DNA 和 RNA 皆可,以及 siRNA 分子。此类反义分子阻止 PD-1 在 T 细胞上表达以及 T 细胞配体诸如 B7-H1、PD-L1 和 PD-L2 生成。例如,与载体诸如聚乙烯亚胺(参见 Cubillos-Ruiz 等, J. Clin. Invest. 119(8):2231-2244(2009)) 复合的 siRNA(例如长度为约 21 个核苷酸的,对编码 PD-1 或编码 PD-1 配体的基因特异性的,且该寡核苷酸可以容易地购得)易于被表达 PD-1 以及 PD-1 配体的细胞摄取,并降低这些受体和配体的表达以实现 T 细胞中的抑制性信号转导降低,由此活化 T 细胞。

[0304] B. 增强剂

[0305] 依照本发明,在增强剂存在下,PD-1 拮抗剂的活性升高,优选协同地升高。增强剂起提高 PD-1 受体拮抗剂的功效的作用,可能通过超过一种机制,尽管确切的作用机制对于本发明的广泛实施不是至关重要的。

[0306] 在优选的实施方案中,增强剂是环磷酰胺。环磷酰胺 (CTX, **Cytosan®**, 或 **Neosar®**) 是一种 oxazaphosphorine 药物,而类似物包括异环磷酰胺 (IFO, **Ifex**)、过磷酰胺 (perfosfamide)、曲磷酰胺 (trofosfamide) (trofosfamide, **Ixoten**), 及其药学可接受盐、溶剂合物、前药和代谢物(美国专利申请 20070202077, 完整收入本文)。异环磷酰胺 (**MITOXANA®**) 是环磷酰胺的一种结构类似物,而且认为它的作用机制与环磷酰胺的相同或实质性相似。过磷酰胺 (4-氢过氧环磷酰胺) 和曲磷酰胺也是烷化剂,它们在结构上与环磷酰胺相关。例如,过磷酰胺烷化 DNA, 由此抑制 DNA 复制及 RNA 和蛋白质合成。已经设计并评估了新的 oxazaphosphorine 衍生物,试图改善选择性和应答及降低宿主毒性 (Liang J, Huang M, Duan W, Yu XQ, Zhou S. Design of new oxazaphosphorine anticancer drugs. Curr Pharm Des. 2007;13(9):963-78. Review)。这些包括马磷酰胺 (NSC 345842)、葡磷酰胺 (D19575, β -D-葡萄糖基异磷酰胺芥)、S-(-)-溴异丙异烟肼 (CBM-11)、NSC 612567 (醛磷酰胺全氢噻嗪) 和 NSC 613060 (醛磷酰胺噻唑烷)。马磷酰胺是一种 oxazaphosphorine 类似物,它是 4-羟基-CPA 的化学稳定的 4-硫乙烷磺酸盐。葡磷酰胺是 IFO 衍生物,其中异磷酰胺芥 (IFO 的烷化代谢物) 以糖苷键连接至 β -D-葡萄糖分子。别的环磷酰胺类似物记载于题为 "Cyclophosphamide analogs useful as anti-tumor agents" 的美国专利 5,190,929, 通过述及完整收入本文。

[0307] 在其它实施方案中,增强剂是降低调节性 T 淋巴细胞 (T-reg) 活性和 / 或减少调节性 T 淋巴细胞 (T-reg) 数目的药剂,优选 Sunitinib (**SUTENT®**)、抗 TGF β 或 Imatinib (**GLEEVEC®**)。所述治疗方案也可以包括施用佐剂。

[0308] 有用的增强剂还包括有丝分裂抑制剂诸如帕立他塞、芳香酶抑制剂(例如来曲唑)和血管发生抑制剂 (VEGF 抑制剂,例如 Avastin、VEGF-Trap) (参见例如 Li 等, Vascular endothelial growth factor blockade reduces intratumoral regulatory T cells and enhances the efficacy of a GM-CSF-secreting cancer immunotherapy. Clin Cancer Res. 2006 Nov 15;12(22):6808-16)、蒽环类抗生素、奥沙利铂、多柔比星、TLR4 拮抗剂、和 IL-18 拮抗剂。

[0309] C. 药物组合物

[0310] 在一个方面,本发明涉及一种治疗组合物,其在药学可接受载体中包含阻止经由 PD-1 的抑制性信号转导的分子或 CTLA4 拮抗剂和增强剂。所述组合物的成分以有效提高哺

乳动物中的 T 细胞应答的量存在。在具体的实施方案中,增强剂是环磷酰胺或环磷酰胺类似物,上文描述了此类类似物的例子。

[0311] 在其它具体的例子中,增强剂是降低调节性 T 淋巴细胞 (T-reg) 活性的药剂,优选活性是由于所述 T-reg 数目减少而降低的情况。在优选的非限制性实施方案中,所述药剂是 Sunitinib (SUTENT®)、抗 TGF β 或 Imatinib (GLEEVEC®)。

[0312] 可用于配制本发明组合物的增强剂还包括有丝分裂抑制剂诸如帕立他塞、芳香酶抑制剂(例如来曲唑)、血管发生抑制剂(VEGF 抑制剂,例如 Avastin、VEGF-Trap)、蒽环类抗生素、奥沙利铂、多柔比星、TLR4 拮抗剂、和 IL-18 拮抗剂。

[0313] 本发明的治疗组合物还任选包含至少一种别的药剂,其可以是一种或多种抗 PD-1 抗体、抗 CTLA4 抗体、有丝分裂抑制剂、芳香酶抑制剂、A2a 腺苷受体 (A2AR) 拮抗剂、或血管发生抑制剂。任何本发明治疗组合物还可含有一种或多种佐剂,如上所述。

[0314] 可用作本发明治疗组合物的成分的 PD-1 拮抗剂包括本文中为在任何本发明方法中使用而描述的任何 PD-1 拮抗剂。例如,此类 PD-1 拮抗剂包括任何本文所述融合蛋白。此类拮抗剂也可以是本文中为用作任何融合蛋白(为在任何本发明方法中使用而描述的)之第一多肽部分而描述的任何多肽或 PD-1 结合片段。此类拮抗剂还可以是抗体,诸如本文中提到的任何已知的抗 PD-1、B7-DC 或 B7-H1 抗体。

[0315] 在上述 PD-1 拮抗剂之外或替代上述 PD-1 拮抗剂,本发明的治疗组合物还包括抗 CTLA4 抗体。此类组合物会因此含有此类抗 CTLA4 抗体和本文早就描述的所述种类的增强剂。

[0316] 本发明的治疗组合物可用于本文中公开的任何本发明方法。虽然意图用作疾病状况的积极治疗,但是此类组合物还可用作预防组合物来预防本文中描述的任何疾病。

[0317] 在一个方面,本发明涵盖在药学可接受载体中包含 PD-1 拮抗剂和增强剂的治疗组合物,其中 PD-1 拮抗剂和增强剂一起以有效提高哺乳动物中的 T 细胞应答的量存在。

[0318] 本发明范围内的治疗组合物包括如下的组合物,其包含本文中公开的 PD-1 拮抗剂和 / 或抗体与任何所述增强剂的任何和所有组合。作为非限制性例子,本发明的治疗组合物包括如下的组合物,其包含有效量的一种或多种 PD-1 拮抗剂,诸如任何或所有本文中作为具体 SEQ ID NO 列出的全长多肽或其同系物以及任何所述多肽的一种或多种片段的组合,包括任何或所有这些融合至其它蛋白质,诸如融合至一种或多种本文所述免疫球蛋白,或者不这样融合的情况,而且包含一种或多种增强剂,诸如单独的环磷酰胺,或环磷酰胺加一种或多种其类似物,或仅仅是一种或多种环磷酰胺类似物,或者增强剂可以由环磷酰胺和在接受组合物的哺乳动物中减少 T reg 数目的药剂组成,或者可以由环磷酰胺类似物加减少 Treg 数目的药剂组成,或者增强剂可以仅仅由一种或多种减少 Treg 数目或降低其它 Treg 活性的药剂组成。本发明涵盖所有此类组合,只要组合物包含至少一种介导 T 细胞活性的 PD-1 拮抗剂和 / 或抗体和至少一种增强剂。

[0319] 本发明的组合物还可包括别的活性剂。在任何本发明组合物的优选实施方案中,药物或治疗组合物进一步包含至少一种别的药剂,其选自下组:抗 PD-1 抗体,抗 CTLA4 抗体,有丝分裂抑制剂诸如帕立他塞,芳香酶抑制剂诸如来曲唑, A2AR 拮抗剂,血管发生抑制剂,蒽环类抗生素,奥沙利铂,多柔比星, TLR4 拮抗剂,和 IL-18 拮抗剂。

[0320] PD-1 拮抗剂和 / 或增强剂可以通过任何合适的手段来施用。在一个优选的实施

方案中,PD-1 拮抗剂和 / 或增强剂在水溶液中通过胃肠外注射来施用。配制剂也可以处于悬浮液或乳状液的形式。一般地,提供如下的药物组合物,其包括有效量的肽或多肽,而且任选包括药学可接受稀释剂、防腐剂、增溶剂、乳化剂、佐剂和 / 或载体。此类组合物包括稀释剂无菌水,各种缓冲剂内容(例如 Tris-HCl、乙酸盐、磷酸盐)、pH 和离子强度的缓冲盐水;和任选的添加剂,诸如去污剂和增溶剂(例如 TWEEN 20、TWEEN 80、Polysorbate 80)抗氧化剂(例如抗坏血酸、偏亚硫酸氢钠)、和防腐剂(例如 Thimersol、苯甲醇)和填充物质(例如乳糖、甘露醇)。非水溶剂或媒介的例子有丙二醇、聚乙二醇、植物油诸如橄榄油和玉米油、明胶、和可注射有机酯诸如油酸乙酯。配制剂可以冻干及临使用前重溶解 / 重悬浮。配制剂可以灭菌,例如通过经由细菌保留滤器过滤、通过将灭菌剂掺入组合物、通过照射组合物、或通过加热组合物来灭菌。

[0321] 本发明的药物组合物可以通过通过胃肠外(肌肉内、腹膜内、静脉内(IV)或皮下注射)、经皮(被动地或使用离子透入或电穿孔)、或经粘膜(鼻、阴道、直肠、或舌下)施用路径来施用。本发明的方法不排除通过分开的和不同的路径(例如表面)来施用 PD-1 拮抗剂和增强剂。

[0322] PD-1 拮抗剂和增强剂可以在相同时间或在不同时间(增强剂在 PD-1 拮抗剂之前或之后)施用。在一个实施方案中,在 PD-1 拮抗剂之前和之后都施用增强剂。在一个此类实施方案中,在 PD-1 拮抗剂之前和之后施用相同的增强剂。在另一个实施方案中,在 PD-1 拮抗剂之前使用增强剂。

[0323] 如本文中使用的,术语“有效量”或“治疗有效量”意指足以治疗、抑制、或减轻所治疗病症的一种或多种症状或以其它方式提供想要的药理学和 / 或生理学效果的剂量。精确的剂量会随多种因素而变化,诸如受试者依赖性变量(例如年龄、免疫系统健康、等)、疾病、和所施用的治疗。治疗有效量的 PD-1 受体拮抗剂和 / 或抗体与增强剂一起引起免疫应答活化或持续。

[0324] 所选择的剂量取决于期望的治疗效果、施用的路径、和期望的治疗持续时间。一般地,给哺乳动物施用每天 0.001 至 50mg/kg 体重的剂量水平。优选地,所述剂量是 1 至 50mg/kg,更优选 1 至 40mg/kg,或甚至 1 至 30mg/kg,其中 2 至 20mg/kg 的剂量也是一种优选的剂量。其它剂量的例子包括 2 至 15mg/kg,或 2 至 10mg/kg,或甚至 3 至 5mg/kg,其中约 4mg/kg 的剂量是一个具体的例子。

[0325] 对于使用增强剂和抗体诸如抗 PD-1 抗体或抗 CTLA4 抗体的治疗方案,剂量通常在 0.1 至 100mg/kg 的范围中,优选更窄的范围 1 至 50mg/kg,而且更优选范围 10 至 20mg/kg。用于人受试者的一种适宜剂量介于 5 和 15mg/kg 之间,最优选 10mg/kg 抗体(例如人抗 PD-1 抗体,像 MDX-1106)(加合适剂量的环磷酸胺或其它增强剂,在抗体之前多至约 24 小时给予)。

[0326] 一般地,仅作为例子,在本发明的方法中有用的任何信号转导拮抗剂基于体重的剂量形式包括范围 5-300mg/kg、或 5-290mg/kg、或 5-280mg/kg、或 5-270mg/kg、或 5-260mg/kg、或 5-250mg/kg、或 5-240mg/kg、或 5-230mg/kg、或 5-220mg/kg、或 5-210mg/kg、或 20-180mg/kg、或 30-170mg/kg、或 40-160mg/kg、或 50-150mg/kg、或 60-140mg/kg、或 70-130mg/kg、或 80-120mg/kg、或 90-110mg/kg、或 95-105mg/kg 中的剂量,剂量 3mg/kg、5mg/kg、7mg/kg、10mg/kg、15mg/kg、20mg/kg、25mg/kg、30mg/kg、50mg/kg 和 100mg/kg 是优

选剂量的具体例子。此类剂量当然可以重复。剂量当然会与接受所述剂量的哺乳动物的身份有关。上述 mg/kg 范围中的剂量对于哺乳动物（包括啮齿类动物，诸如小鼠和大鼠，和灵长类动物，尤其是人）是方便的，剂量约 5mg/kg、约 10mg/kg 和约 15mg/kg 尤其优选用于治疗人。

[0327] 依照本发明的治疗方案，增强剂例如环磷酰胺以随动物而变化的无毒剂量来施用。在具体的实施方案中，增强剂通过任何合适的施用路径来施用，包括胃肠外或口服，前者包括系统施用，诸如静脉内。例如，增强剂像环磷酰胺在正常情况中口服施用。此类施用可以是任何方便的剂量，取决于增强剂。每种情况中的剂量可以基于体重，或者可以以单位剂量来施用。

[0328] 虽然 CTX 自身是无毒的，但是它的一些代谢物是细胞毒性烷化剂，其诱导 DNA 交联及在较高的剂量诱导链断裂。许多细胞对 CTX 有抗性，因为它们表达高水平的解毒酶醛脱氢酶 (ALDH)。CTX 靶向增殖中的淋巴细胞，因为淋巴细胞（但不是造血干细胞）只表达低水平的 ALDH，而且循环中的细胞对 DNA 烷化剂最敏感。

[0329] 低剂量的 CTX ($< 200\text{mg/kg}$) 可具有免疫刺激效果，包括在人和小鼠癌症模型中刺激抗肿瘤免疫应答 (Brode 和 Cooke, Crit. Rev. Immunol. 28 :109-126 (2008))。这些低剂量是亚治疗性的，而且不具有直接的抗肿瘤活性。相反，高剂量的 CTX 抑制抗肿瘤应答。数种机制可解释 CTX 在加强抗肿瘤免疫应答中的作用：(a) 消减 CD4+CD25+FoxP3+Treg（及特异性增殖 Treg，其尤其可以是遏制性的）；(b) 消减 B 淋巴细胞；(c) 诱导一氧化氮 (NO)，导致对肿瘤细胞生长的遏制；(d) 动员和扩增 CD11b+Gr-1+MDSC。这些初级效果具有众多次级效果；例如 Treg 消减后，巨噬细胞生成更多 IFN- γ 和更少 IL-10。CTX 还显示出诱导 I 型 IFN 表达及促进淋巴细胞的稳态增殖。

[0330] Treg 消减被最多地引用为 CTX 加强抗肿瘤免疫应答的机制。这个结论部分基于过继转移实验的结果。在 AB1-HA 肿瘤模型中，第 9 天的 CTX 处理给出 75% 的治愈率。在第 12 天转移纯化的 Treg 几乎完全抑制 CTX 应答 (van der Most 等, Cancer Immunol. Immunother. 58 :1219-1228 (2009))。在 HHD2 肿瘤模型中观察到类似的结果：CTX 预处理后过继转移 CD4+CD25+Treg 消除针对疫苗的治疗性应答 (Taieb J., J. Immunol. 176 : 2722-2729 (2006))。

[0331] 众多人临床试验证明了低剂量 CTX 对于促进抗肿瘤免疫应答是安全的、耐受较好的、且有效的药剂 (Bas 和 Mastrangelo, Cancer Immunol. Immunother. 47 :1-12 (1998))。

[0332] CTX 用于加强抗肿瘤免疫应答的最佳剂量是如下的剂量，其通过降低 Treg 水平至正常范围以下来降低总体 T 细胞计数但是是亚治疗性的（参见 Machiels 等, Cancer Res. 61 :3689-3697 (2001)）。

[0333] 在 CTX 用作免疫增强剂的人临床试验中，通常使用 300mg/m^2 的剂量。对于正常男性 (6 英尺, 170 磅 (78kg)，体表面积 1.98m^2)， 300mg/m^2 为 8mg/kg 或 624mg 总蛋白质。在癌症的小鼠模型中，在 15-150mg/kg 的剂量范围看到了功效，相当于 30g 小鼠 0.45-4.5mg 总蛋白质 (Machiels 等, Cancer Res. 61 :3689-3697 (2001)；Hengst 等, Cancer Res. 41 : 2163-2167 (1981)；Hengst, Cancer Res. 40 :2135-2141 (1980))。

[0334] 对于大型哺乳动物（诸如灵长类动物，优选人）患者，可以使用此类 mg/m^2 剂量，但是可能优选在限定时间间隔上施用单位剂量。此类单位剂量可以以每天一次施用限定时间

间段,诸如长达3天、或长达5天、或长达7天、或长达10天、或长达15天、或长达20天、或长达25天都被本发明具体涵盖。相同的方案可应用于本文中描述的其它增强剂。

[0335] 所有此类施用可发生于施用本发明的PD-1结合分子之前或之后。或者,一剂或多剂本发明PD-1结合分子的施用与增强剂的施用可以在时间上交错以形成均匀的或不均匀的治疗过程,由此施用一剂或多剂增强剂,接着是一剂或多剂PD-1结合化合物,接着是一剂或多剂增强剂,都依照施用所述药剂的科研人员或临床医师选择或想要的无论什么进度表。

[0336] 在其它具体的实施方案中,治疗方案包括多次施用一种或多种PD-1拮抗剂。在一些实施方案中,此类多次施用PD-1拮抗剂联合多次施用相同或不同的增强剂。

[0337] 如在本发明的其它实施方案中,这里增强剂在施用PD-1拮抗剂之前或之后至少1,2,3,5,10,15,20,24或30小时施用。

[0338] 在本文中有用的药物组合物还含有药学可接受载体,包括任何合适的稀释剂或赋形剂,其包括自身不诱导对接受组合物的个体有害的抗体生成,且施用时没有不当毒性的任何药剂。药学可接受载体包括但不限于液体,诸如水、盐水、甘油和乙醇等等,包括可用于形成供鼻和其它呼吸道投递或投递至眼系统的喷雾剂的载体。关于药学可接受载体、稀释剂、和其它赋形剂的深入讨论见REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (Mack Pub. Co., N. J. current edition)。

[0339] 疫苗组合物(如下文讨论的)可进一步掺入别的物质以稳定pH,或发挥佐剂、湿润剂、或乳化剂的功能,其可有助于改善疫苗的有效性。

[0340] 疫苗一般配制成供胃肠外施用,而且皮下或肌肉内注射。使用本领域已知的方法,此类疫苗还可配制成栓剂或供口服施用,或供经由鼻或呼吸路径施用。

[0341] D. 制备方法

[0342] 分离的PD-1拮抗剂多肽,包括其变体、同系物和片段,野生型的或突变型的,及包含任何这些的融合蛋白(都为在本发明中使用而涵盖)可以通过例如活性合成或通过宿主细胞中重组生产来获得。为了重组生产共刺激多肽,可以用含有编码多肽的核苷酸序列的核酸转化、转导、或转染细菌或真核宿主细胞(例如昆虫、酵母、或哺乳动物细胞)。会领会,核苷酸序列可以进行密码子优化以提高蛋白质表达在特定种类的宿主细胞中的水平。用于密码子优化的方法是本领域公知的。一般而言,核酸构建物包括与编码共刺激多肽的核苷酸序列可操作连接的调节序列。调节序列(在本文中也称作表达控制序列)通常不编码基因产物,而是影响与它们可操作连接的核酸序列的表达。用于自细胞分泌蛋白质的信号肽可以是内源信号肽或任何其它信号肽,其促进宿主分泌融合蛋白。

[0343] 对于在实施本发明中有一般分子生物学规程,可得到多种标准参考书,它们含有分子生物学和遗传工程领域公知的规程,而且这些规程无需在本文中进一步描述。有用的参考书包括Sambrook等,Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition, Cold Spring Harbor, N. Y., (1989); Wu et al, Methods in Gene Biotechnology (CRC Press, New York, NY, 1997); 及 Recombinant Gene Expression Protocols, in Methods in Molecular Biology, Vol. 62, (Tuan, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 1997), 通过述及其公开内容收入本文。

[0344] E. 疾病治疗

[0345] 要通过施用由本发明提供的治疗剂组合来治疗或预防的疾病包括恶性肿瘤或由细菌、病毒、原生动物、蠕虫、或其它进入细胞内的微生物病原体引起的慢性感染性疾病。此类疾病常常经由细胞毒性 T 淋巴细胞的攻击来抗击。因为本发明提供了可用于经由升高的 T 细胞活性、升高的 T 细胞增殖和降低的 T 细胞抑制性信号来增强 T 细胞应答的联合疗法，所以本发明的联合疗法在治疗（或甚至预防）此类疾病中具有独特优点。

[0346] 在一个实施方案中，因为病毒感染主要通过 T 细胞来清除，T 细胞活性的升高在治疗上可用于增强自动物或灵长类动物（优选人）受试者清除病毒感染物（infectious agent）。如此，所公开的具有 PD-1 受体拮抗剂活性的本发明化合物与增强剂一起组合地运作来治疗局部或系统病毒感染。要通过本发明的化合物来治疗的感染包括但不限于免疫缺陷（例如 HIV）、乳头瘤（例如 HPV）、疱疹（例如 HSV）、脑炎、流感（例如人流感病毒 A）、肝炎（例如 HCV、HBV）、和感冒（例如人鼻病毒）病毒感染。也可以施用 PD-1 受体拮抗剂组合物的药物配制剂来治疗系统性病毒病，包括但不限于 AIDS、流感、感冒、或脑炎。

[0347] 通过本发明的化合物可治疗的非病毒感染包括但不限于由微生物引起的感染，包括但不限于放线菌属 (*Actinomyces*)、鱼腥藻属 (*Anabaena*)、芽孢杆菌属 (*Bacillus*)、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、蛭弧菌属 (*Bdellovibrio*)、博德特氏菌属 (*Bordetella*)、疏螺旋体属 (*Borrelia*)、弯曲杆菌属 (*Campylobacter*)、柄杆菌属 (*Caulobacter*)、衣原体属 (*Chlamydia*)、绿菌属 (*Chlorobium*)、产色菌属 (*Chromatium*)、梭菌属 (*Clostridium*)、棒状杆菌属 (*Corynebacterium*)、噬纤维菌属 (*Cytophaga*)、异常球菌属 (*Deinococcus*)、埃希氏菌属 (*Escherichia*)、弗朗西斯氏菌属 (*Francisella*)、盐杆菌属 (*Halobacterium*)、螺杆菌属 (*Helicobacter*)、嗜血杆菌属 (*Haemophilus*)、B 型流感嗜血杆菌 (*Hemophilus influenzae* type B) (HIB)、生丝微菌属 (*Hyphomicrobium*)、军团杆菌属 (*Legionella*)、钩端螺旋体属 (*Leptospira*)、李斯特氏菌属 (*Listeria*)、脑膜炎球菌 (*Meningococcus*) A、B 和 C、甲烷杆菌属 (*Methanobacterium*)、细球菌属 (*Micrococcus*)、分枝杆菌属 (*Mycobacterium*)、支原体属 (*Mycoplasma*)、粘球菌属 (*Myxococcus*)、奈瑟氏菌属 (*Neisseria*)、硝化杆菌属 (*Nitrobacter*)、颤藻属 (*Oscillatoria*)、原绿蓝细菌属 (*Prochloron*)、变形菌属 (*Proteus*)、假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、红螺菌属 (*Phodospirillum*)、立克次氏体属 (*Rickettsia*)、沙门氏菌属 (*Salmonella*)、志贺氏菌属 (*Shigella*)、螺菌属 (*Spirillum*)、螺旋体属 (*Spirochaeta*)、葡萄球菌属 (*Staphylococcus*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、链霉菌属 (*Streptomyces*)、硫叶菌属 (*Sulfolobus*)、热原体属 (*Thermoplasma*)、硫杆菌属 (*Thiobacillus*)、密螺旋体属 (*Treponema*)、弧菌属 (*Vibrio*)、耶尔森氏菌属 (*Yersinia*)、新型细球菌 (*Cryptococcus neoformans*)、组织胞浆菌 (*Histoplasma* sp.) 诸如荚膜组织胞浆菌 (*Histoplasma capsulatum*)、白色假丝酵母 (*Candida albicans*)、热带假丝酵母 (*Candida tropicalis*)、星形诺卡菌 (*Nocardia asteroides*)、立氏立克次氏体 (*Rickettsia rickettsii*)、斑疹伤寒立克次氏体 (*Rickettsia typhi*)、利什曼原虫属 (*Leishmania*)、肺炎支原体 (*Mycoplasma pneumoniae*)、鹦鹉热衣原体 (*Chlamydia psittaci*)、砂眼衣原体 (*Chlamydia trachomatis*)、疟原虫 (*Plasmodium* sp.) 诸如恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*)、布氏锥虫 (*Trypanosoma brucei*)、溶组织内阿米巴 (*Entamoeba histolytica*)、鼠弓形体 (*Toxoplasma gondii*)、阴道毛滴虫 (*Trichomonas vaginalis*) 和曼氏血吸虫 (*Schistosoma mansoni*)。在一个实施方案中，本发明提供了用

于在宿主中诱导或增强免疫应答以治疗癌症的方法和组合物。可以用所提供的组合物和方法来治疗的癌症的类型包括但不限于下述：膀胱、脑、乳腺、宫颈、结肠直肠、食管、肾、肝、肺、鼻咽、胰腺、前列腺、皮肤、胃、子宫、卵巢、睾丸、和血液学癌症。

[0348] 可以治疗的恶性肿瘤在本文中依据衍生肿瘤的组织的胚胎起源来归类。癌瘤 (Carcinoma) 为源自内胚层或外胚层组织的肿瘤，诸如皮肤或内脏和腺的上皮层。不太频繁产生的肉瘤 (Sarcoma) 衍生自中胚层结缔组织，诸如骨、脂肪、和软骨。白血病 (leukemia) 和淋巴瘤 (lymphoma) 为骨髓的造血细胞的恶性肿瘤。白血病作为单细胞来增殖，而淋巴瘤趋于作为肿瘤块来生长。恶性肿瘤可以在身体的多种器官或组织处显露出来以形成癌症。

[0349] 作为本发明治疗方案的价值的证明，在结肠癌、肥大细胞瘤、和其它肿瘤类型的同基因小鼠肿瘤模型中测试了 B7-DC-Ig 的鼠类似物（其中与人蛋白共享 72% 序列同一性的小鼠 B7-DC ECD 融合至小鼠 IgG2a Fc 域），其中如本文所述掺入环磷酰胺 (CTX) 预处理。

[0350] 结果显示用单个亚治疗剂量的 CTX（其起免疫增强剂的作用），接着用小鼠 B7-DC-IG 处理在多达 80% 的动物中根除了已建立的 CT26 结肠癌瘤肿瘤。另外，在 CT26 结肠癌瘤肿瘤再攻击研究中，在先前在 CTX+ 小鼠 B7-DC-Ig 处理后根除了肿瘤的小鼠中没有检测到肿瘤再生长。这些小鼠还显示出具有相对于无处理小鼠升高的肿瘤特异性 CTL 群。

[0351] 在一个实施方案中，本发明涵盖本文中别处描述的降低 T 细胞中抑制性信号转导的化合物在制造用于通过联合疗法来提高 T 细胞应答的药物中的用途，其中所述化合物与增强剂联合施用。另外，降低 T 细胞中抑制性信号转导的化合物和所述增强剂作为分开的药物提供，供不同时间施用，优选增强剂在降低抑制性信号转导的化合物之前，例如在抑制性化合物之前多至 24 小时（或本文所述其它时间间隔）施用的情况。优选地，所述化合物和增强剂用于治疗感染性疾病或癌症，包括本文中别处描述的由任何感染物引起的疾病或癌症。

[0352] 在一个优选的实施方案中，在这些方法中有用的化合物是由人 B7-DC 的 ECD 融合人 IgG1 的 Fc 域而构成的重组蛋白，在本文中称作 B7-DC-Ig。

[0353] 在一个实施方案中，本发明涉及一种用于与增强剂联合施用本文中公开的降低 T 细胞中抑制性信号转导的化合物的医学试剂盒，所述试剂盒包含：

[0354] (a) 供应剂量的降低 T 细胞中抑制性信号转导的化合物；

[0355] (b) 增强剂；

[0356] (c) 药学可接受载体；和

[0357] (d) 关于在上文所述用途中施用化合物的印刷的用法说明。

[0358] F. 联合疗法

[0359] 疫苗要求强烈的 T 细胞应答来消除癌细胞和受到感染的细胞或感染物 (infectious agent)。本文中描述的 PD-1 受体拮抗剂可以作为疫苗的成分与增强剂一起施用以给 T 细胞提供共刺激信号。本文中公开的疫苗包括抗原，PD-1 受体拮抗剂和任选的佐剂和靶向分子。

[0360] 通过本发明的方法和组合物来增强的 T 细胞应答所针对的抗原包括肽、蛋白质、多糖、糖、脂、核酸、或其组合。在疾病的情况中，所述抗原是由于疾病过程而存在的。

[0361] 所公开的 PD-1 受体拮抗剂组合物可以与预防性疫苗（其赋予受试者患者对后续暴露于感染物的抗性）或治疗性疫苗（其可用于启动或增强受试者对预先存在的抗原（诸

如具有癌症的受试者中的肿瘤抗原或受到病毒感染的受试者中的病毒抗原)的免疫应答)联合施用。

[0362] 基于本领域公知的原则,预防、治疗或消除对免疫应答敏感性的期望结果可以随疾病而变化。例如,针对感染物的免疫应答可以完全阻止感染物建群(colonization)和复制,实现“无菌免疫(sterile immune)”和任何疾病症状的消失。然而,若针对感染物的疫苗较少症状的数目、降低症状的严重性或缩短症状的持续时间;若它减少群体中有症状的个体的数目;或减少感染物的传播,则可以认为它是有效的。类似地,针对癌症、变应原或感染物的免疫应答可以完全治疗疾病,可以减轻症状,或者可以是针对疾病的总体治疗干预中的一个方面。例如,刺激针对癌症的免疫应答可以与手术、化疗、放射学、激素和/或其它免疫学办法联用以进行治疗。

[0363] 本发明的方法和产物不排除在增强剂之外佐剂的使用。此类佐剂可以例如与PD-1拮抗剂一起施用。在本发明的组合物和方法中有用的佐剂包括但不限于下述一种或多种:油乳剂(例如弗氏佐剂);皂苷配制剂;病毒体(virosome)和病毒样颗粒;细菌和微生物衍生物;免疫刺激性寡核苷酸;ADP-核糖基化毒素和去毒衍生物;明矾;BCG;含矿物组合物(例如矿物盐,诸如铝盐和钙盐、氢氧化物、磷酸盐、硫酸盐、等);生物粘附剂和/或粘膜粘附剂;微粒;脂质体;聚氧乙烯醚和聚氧乙烯酯配制剂;胞壁酰基肽;聚磷腈;咪唑并喹诺酮化合物;和表面活性物质(例如溶血卵磷脂、Pluronic多元醇、聚阴离子、肽、油乳剂、匙孔藻血蓝蛋白、和二硝基酚)。有用的佐剂还包括免疫调控剂,诸如细胞因子、白介素(例如IL-1、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-12、等)、干扰素(例如干扰素- γ)、巨噬细胞集落刺激因子、和肿瘤坏死因子。

[0364] 本文中并没有排除所公开的PD-1受体拮抗剂(包括本文中公开的任何多肽、片段、变体、同系物和融合蛋白)与一种或多种别的治疗剂(在增强剂之外)联合施用于有此需要的受试者。别的治疗剂基于所处理的状况、病症或疾病来选择。例如,PD-1受体拮抗剂可以与一种或多种别的药剂共施用,所述别的药剂发挥增强或促进免疫应答的功能,而且在本文中被认为是活性剂。此类药剂包括但不限于安吡啶(amsacrine)、博来霉素(bleomycin)、白消安(busulfan)、卡培他滨(capecitabine)、卡铂(carboplatin)、卡莫司汀(carmustine)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、顺铂(cisplatin)、克拉屈滨(cladribine)、氯法齐明(clofarabine)、crisantaspase、阿糖胞苷(cytarabine)、达卡巴嗪(dacarbazine)、放线菌素D(dactinomycin)、柔红霉素(daunorubicin)、多西他赛(docetaxel)、多柔比星(doxorubicin)、表柔比星(epirubicin)、依托泊苷(etoposide)、氟达拉滨(fludarabine)、氟尿嘧啶(flourouracil)、吉西他滨(gemcitabine)、羟基脲(hydroxycarbamide)、伊达比星(idarubicin)、异环磷酰胺(ifosfamide)、伊立替康(irinotecan)、亚叶酸(leucovorin)、多柔比星(liposomal doxorubicin)、柔红霉素脂质体(liposomal daunorubicin)、洛莫司汀(lomustine)、美法仑(melphalan)、巯嘌呤(mercaptopurine)、美司钠(mesna)、甲氨蝶呤(methotrexate)、丝裂霉素(mitomycin)、米托蒽醌(mitoxantrone)、奥沙利铂(oxaliplatin)、帕立他塞(paclitaxel)、培美曲塞(pemetrexed)、喷司他丁(pentostatin)、丙卡巴肼(procarbazine)、雷替曲塞(raltitrexed)、沙铂(satraplatin)、链唑星(streptozocin)、替加氟-尿嘧啶(tegafur-uracil)、替莫唑胺(temozolomide)、替尼泊苷(teniposide)、塞替派

(thiotepa)、硫鸟嘌呤 (tioguanine)、托泊替康 (topotecan)、曲奥舒凡 (treosulfan)、长春碱 (vinblastine)、长春新碱 (vincristine)、长春地辛 (vindesine)、长春瑞滨 (vinorelbine)、或其组合。代表性的促凋亡剂包括但不限于氟达拉滨 (fludarabine)、牛黄斯坦 (taurosporine)、环己酰亚胺 (cycloheximide)、放线菌素 D (actinomycin D)、乳糖苷神经酰胺 (lactosylceramide)、15d-PGJ(2) 及其组合。

[0365] 通过本发明的方法和组合物提供的疗法还可以与其它类型的疗法, 诸如辐照治疗、手术、等等联合使用。

[0366] G. 拮抗剂活性的测定法

[0367] 本发明描述了在实施本发明的方法中有用的多种具体结构。其它拥有拮抗剂活性且在本发明的方法中有用的化合物也可通过参照用于鉴定结合 PD-1、CTLA4、和任何这些的配体且还拥有降低 T 细胞中抑制性信号转导的能力的化学结构的公知检测规程来鉴定。一些此类测定法是可用于确定选定的化学结构是否结合受体的结合测定法; 这些是本领域公知的, 而且不需要在本文中详细讨论 (参见例如 2008 年 11 月 6 日公布的 U. S. 2008/0274490 和 2006 年 9 月 12 日公告的 U. S. 7, 105, 328, 均显示了使用 T 细胞的用于 PD-1 信号传导调控物的测定法, 通过述及将其公开内容完整收入本文)。使用其它测定法来测定本发明的药剂, 诸如活性片段通过提高增殖和 / 或细胞因子生成来活化 T 细胞的效果。此类测定法也是本领域公知的。例如, 升高的细胞增殖可以通过升高的 3H- 胸苷掺入 (由于细胞繁殖所需要的升高的 DNA 合成) 或用于检测培养物中 T 细胞生成细胞因子升高的 ELISA 和 / 或 RIA 来证明。

[0368] 在一个此类实验中, 通过 ELISA 评估人 B7-DC-Ig 的 PD-1 结合活性。96 孔 ELISA 板用在 BupH 碳酸盐 / 碳酸氢盐 pH 9.4 缓冲液 (Pierce) 中稀释的 100 μ L 0.75ug/mL 重组人 PD-1/Fc (R&D Systems) 包被 2 小时, 然后用 BSA 溶液 (Jackson ImmunoResearch) 封闭 90-120 分钟。容许连续稀释的人 B7-DC-Ig (野生型, 以及为降低的对 PD-1 的结合而选择的 D111S 突变蛋白和 K113S 突变体) 以及人 IgG1 同种型对照结合 90 分钟。使用 100 μ L 0.5ug/mL 生物素偶联的抗人 B7-DC 克隆 18 (eBioscience), 接着用 1 : 1000 稀释的 HRP- 链霉亲和素 (BDBioscience) 和 TMB 底物 (BioFX) 来检测结合的 B7-DC-Ig。使用读板仪 (Molecular Devices) 来读取 450nm 处的吸光度, 并在 SoftMax 中使用 4 参数对数拟合来分析数据。该数据显示人 B7-DC-Ig (野生型) 结合 PD-1, 但是 K113S 和 D111S 突变体不结合 PD-1。

[0369] 在实施本发明的规程时, 当然会理解, 提到具体的缓冲液、培养基、试剂、细胞、培养条件等等并非意图限制, 而是应当读作包括本领域普通技术人员会认识到在呈现该讨论的具体背景中感兴趣或有价值的所有相关材料。例如, 常常有可能用一种缓冲系统或培养基替换另一种, 而且仍实现相似的 (假如不是相同的话) 结果。本领域技术人员会具有此类系统和方法的足够知识, 从而能够无需过度实验就能做出此类替换, 正如在使用本文中公开的方法和规程时会最佳地实现其目的。

[0370] 在下面的非限制性实施例中更详细地描述本发明。要理解, 这些方法和实施例绝非将本发明限于本文中描述的实施方案, 而且其它实施方案和使用无疑会自己呈现给本领域技术人员。

实施例

[0371] 实施例 1 :B7-DC-Ig 结合表达 PD-1 的 CHO 细胞

[0372] 首先将 B7-DC-Ig 与别藻蓝素 (APC) 偶联,然后以多种浓度与组成性表达 PD-1 的 CHO 细胞系或不表达 PD-1 的亲本 CHO 细胞一起温育。通过流式细胞术来分析结合。作为探针浓度 (x 轴) 的函数,图 1 显示 B7-DC-Ig-APC 的中值荧光强度 (MFI) (y 轴)。B7-DC-Ig-APC 结合 CHO. PD-1 细胞 (实心圆圈),但是不结合未转染的 CHO 细胞 (灰色三角形)。

[0373] 实施例 2 :B7-DC-Ig 与 B7-H1 竞争对 PD-1 的结合

[0374] 首先将 B7-H1-Ig 与别藻蓝素 (APC) 偶联。首先将未标记的 B7-DC-Ig 以多种浓度与组成性表达 PD-1 的 CHO 细胞系一起温育,之后将 B7-H1-Ig-APC 添加至探针和细胞混合物。作为所添加的未标记 B7-DC-Ig 竞争物的浓度 (x 轴) 的函数,图 2 显示 B7-H1-Fc-APC 的中值荧光强度 (MFI) (y 轴)。随着未标记 B7-DC-Ig 的浓度升高,结合 CHO 细胞的 B7-H1-Ig-APC 的量降低,从而证明了 B7-DC-Ig 与 B7-H1 竞争对 PD-1 的结合。

[0375] 实施例 3 :CT26 肿瘤模型

[0376] 小鼠结肠直肠肿瘤细胞系, CT26, 得自 ATCC。遵循 ATCC 指导方针生成了处于第 4 代的原始细胞库 (master cell bank)。测试细胞,并确认没有支原体和其它病原体污染。自冷冻保存的原种融化一管肿瘤细胞,并培养两代,之后接种。

[0377] 用 30mL 完全培养基 (RPMI+10% FBS, 2mM L-Glu, 和 1x P/S) 以 1 : 5 稀释度 (用于 2 天培养) 或者用 30mL 完全培养基以 1 : 10 稀释度 (用于 3 天培养) 分开 CT26 细胞。

[0378] 如下收获 CT26 细胞,吸走培养基,用 5mL PBS 漂洗烧瓶,添加 5mL 胰蛋白酶,于 37°C 温育 2 分钟,然后用 10mL 完全培养基中和。以 600x g (~ 1000rpm) 离心 5 分钟后,吸走培养基,并通过用 10mL 单纯的 RPMI 反复吸取来重悬浮细胞团粒。此清洗步骤重复三次。

[0379] 最后一个清洗步骤期间,用适当的稀释度 (例如 1 : 5 稀释, 10 μ L 细胞 +40 μ L 锥虫蓝) 通过锥虫蓝染料染色来分析接种的细胞的细胞数和存活力,并通过 NOVA 细胞计数来确认。用于接种的细胞存活力一般大于 95%。

[0380] 用单纯的 RPMI 将 CT26 细胞稀释至 6.7x10⁵ 个细胞 /mL, 供初始接种,并保存于冰上。典型地,给每只小鼠接种 150 μ L (1x10⁵ 个细胞)。

[0381] 第 9 天,首先将所有携带肿瘤的小鼠分组入大鼠笼,并将小鼠随机分至实验组。用 1x PBS 重建 CTX 溶液至 4mg/mL。给 20 克的小鼠腹膜内 (IP) 注射 0.5mL CTX 溶液,则为 2mg,即 100mg/kg。

[0382] 第 10 天,给 20 克的小鼠 IP 注射 0.5mL B7-DC-Ig (0.2mg/mL),则为 0.1mg,即 5mg/kg。相同剂量每周给予 2 次,持续 4 周,总共 8 剂。通过每周两次经数字式测径器测量肿瘤来监测肿瘤生长,始于给予 B7-DC-Ig 那天。如下计算肿瘤体积:

[0383] 肿瘤体积 = $\pi (D_{短})^2 \times (D_{长}) / 6 = \sim 0.52 \times (D_{短})^2 \times (D_{长})$

[0384] 若肿瘤体积达到 2000mm³ 或者若肿瘤接种部位有皮肤溃疡和感染,则小鼠处以安乐死并退出研究。

[0385] 实施例 4 :环磷酰胺和 B7-DC-Ig 的组合能根除已建立的肿瘤

[0386] 如上所述给 9 至 11 周龄的 Balb/C 小鼠皮下植入 1.0x10⁵ 个 CT26 结肠直肠肿瘤细胞。植入肿瘤后第 10 天,小鼠接受 100mg/kg 环磷酰胺。1 天后,即第 11 天开始 B7-DC-Ig 处理。小鼠用 100 μ g B7-DC-Ig 处理,每周 2 剂,持续 4 周,总共 8 剂。75% 的接受 CTX+B7-DC-Ig 治疗方案的小鼠到第 44 天根除了已建立的肿瘤,而对照仅 CTX 组中的所有小鼠因肿瘤生长

而死亡或因肿瘤超过 IACUC 批准的大小而被处以安乐死（图 3 中显示的结果）。这些结果证明了所述治疗方案对已建立的肿瘤的有效性，而非仅仅预防。

[0387] 实施例 5：环磷酰胺和 B7-DC-Ig 的组合能根除已建立的肿瘤及针对肿瘤再攻击提供保护

[0388] 在第 44 天和第 70 天用 1×10^5 个 CT26 细胞再攻击来自上文所述实验的根除了已建立 CT26 结肠直肠肿瘤的小鼠。没有自再攻击长出肿瘤，从而提示它们自环磷酰胺和 B7-DC-Ig 组合处理形成了长期抗肿瘤免疫力。媒介对照组中的所有小鼠形成了肿瘤（图 4 中显示的结果）。这些结果显示所述治疗方案对已建立的肿瘤的有效性，及环磷酰胺和 B7-DC-Ig 组合治疗导致针对肿瘤抗原的记忆应答。

[0389] 实施例 6：环磷酰胺和 B7-DC-Ig 的组合能生成肿瘤特异性的记忆细胞毒性 T 淋巴细胞

[0390] 在第 44 天用 2.5×10^5 个 CT26 细胞再攻击来自上文所述实验的根除了已建立 CT26 结肠直肠肿瘤的小鼠。7 天后，分离小鼠脾。在高尔基体阻断剂 (BDBioScience) 存在下将小鼠脾细胞用 5 或 50ug/mL 卵清蛋白 (OVA) 或 AH1 肽脉冲 6 小时。通过评估 $CD8^+ / IFN \gamma^+$ T 细胞来分析记忆 T 效应细胞。图 5 中的结果显示根除了 CT26 肿瘤的小鼠中有显著量的 CT26 特异性 T 效应细胞。

[0391] 实施例 7：B7-DC-Ig 剂量依赖对肿瘤根除的影响

[0392] 给 9 至 11 周龄的 Balb/C 小鼠皮下植入 1.0×10^5 个 CT26 结肠直肠肿瘤细胞。肿瘤植入后第 9 天，小鼠接受单剂环磷酰胺 (100mg/kg)，并在第 10 天开始用 30, 100 或 300ug B7-DC-Ig 处理，每周 2 剂，持续 4 周，总共 8 剂。图 6 显示在 300ug 有 70% 的小鼠根除了肿瘤，在 100ug 有 40% 的小鼠根除了肿瘤，而 30ug 剂量发生了 10% 肿瘤根除。

[0393] 实施例 8：环磷酰胺和抗 PD-1 的组合能根除已建立的肿瘤

[0394] 用 1.0×10^5 个 CT26 结肠直肠肿瘤细胞皮下攻击 9 至 11 周龄的 Balb/C 小鼠。肿瘤攻击后第 11 天，小鼠接受单剂环磷酰胺 (100mg/kg) 并开始用抗 PD-1 抗体 (250ug, 克隆 G4, Hirano F. 等, 2005Cancer Research) 处理，每周施用 3 次，持续 4 周。70% 接受 CTX+ 抗 PD-1 方案的小鼠在肿瘤攻击后第 50 天根除了已建立的 CT26 肿瘤，而仅对照和仅抗 PD-1 的组中的所有小鼠因肿瘤生长而死亡或因肿瘤超过 IACUC 批准的大小而被处以安乐死。这些结果显示了所述治疗方案对已建立的肿瘤的有效性，而非仅仅预防。结果显示于图 7。

[0395] 实施例 9：环磷酰胺和抗 CTLA4 的组合能根除已建立的肿瘤

[0396] 用 1.0×10^5 个 CT26 结肠直肠肿瘤细胞皮下攻击 9 至 11 周龄的 Balb/C 小鼠。肿瘤攻击后第 11 天，小鼠接受 100mg/kg 环磷酰胺。1 天后，即第 12 天开始抗 CTLA4 (一种来自仓鼠杂交瘤 -ATCC 保藏物 UC10-4F10-11 的抗小鼠 CTLA4) 处理。用 100ug 抗 CTLA4 处理小鼠，每周 2 剂，持续 4 周。56% 的接受 CTX+ 抗 CTLA4 方案的小鼠在肿瘤攻击后第 50 天没有肿瘤，而对照组中的所有小鼠因肿瘤生长而死亡或因肿瘤超过 IACUC 批准的大小而被处以安乐死。结果显示于图 8。这些结果显示了所述治疗方案对已建立的肿瘤的有效性，而非仅仅预防。

[0397] 实施例 10：环磷酰胺和 B7-DC-Ig 组合方案导致肿瘤微环境中的 Treg 减少

[0398] 图 9 显示如下实验的结果，其中给 9 至 11 周龄的 Balb/C 小鼠皮下植入 1×10^5 个 CT26 细胞。在第 9 天，给小鼠 IP 注射 100mg/kg CTX。24 小时后，在第 10 天，用 100ug

B7-DC-Ig 处理小鼠。有 5 个组：不接受任何肿瘤细胞的无处理的 (naïve) 小鼠，注射媒介，仅 CTX，CTX+B7-DC-Ig 或仅 B7-DC-Ig。在第 11 天 (CTX 后 2 天) 和第 16 天 (CTX 后 7 天) 自研究取出 2 只无处理小鼠和 4 只来自其它组的小鼠供 T 细胞分析用。左边小图显示在第 11 天 (CTX 注射后 2 天)，用 CTX 处理的小鼠的脾中的 Treg 显著低于植入肿瘤且注射媒介的小鼠。右边小图显示在第 16 天 (CTX 后 7 天和 B7-DC-Ig 处理后 6 天)，B7-DC-Ig 显著降低表达高 PD-1 的 CD4⁺T 细胞。这在 B7-DC-Ig 处理的和 CTX+B7-DC-Ig 处理的小鼠中都已观察到。与无处理小鼠相比，植入肿瘤细胞的小鼠趋于在引流 LN 中具有更多的 PD-1⁺/CD4⁺T 细胞。

[0399] 实施例 11：环磷酰胺和 B7-DC-Ig 的组合在转移性前列腺肿瘤模型中能促进小鼠存活

[0400] 给 9 至 11 周龄 B10. D2 小鼠静脉内注射 3.0×10^5 个 SP-1 细胞，其分离自亲本 TRAMP 细胞注射后的肺转移。在第 5, 12 和 19 天，CTX 小鼠接受 3 剂 CTX, 50mg/kg。在第 6, 13 和 20 天，B7-DC-Ig 处理小鼠接受 3 剂 B7-DC-Ig, 5mg/kg。在第 100 天，对照组，无处理、仅 CTX、仅 B7-DC-Ig 中 17% 的小鼠存活，而接受 CTX 和 B7-DC-Ig 组合的 43% 的小鼠存活。结果显示于图 10。

[0401] 实施例 12：李斯特氏菌癌症疫苗和 B7-DC-Ig 的组合能增强 CT26 肝植入后的小鼠存活

[0402] 使用半脾注射技术 (Yoshimura K 等, 2007, Cancer Research), 给 11-13 周龄的 Balb/C 小鼠植入 CT26 细胞。在第 10 天，小鼠接受 1 次 IP 注射 CTX 50mg/kg。24 小时后，即在第 11 天，然后在第 14 和 17 天，以 $0.1 \times LD_{50}$ (1×10^7 CFU) 用携带 AH1 肽 (CT26 的一种免疫显性表位) 的重组李斯特氏菌处理小鼠。还在第 11 天，然后在第 18 天用 B7-DC-Ig 处理小鼠。图 11 显示没有任何处理或用 CTX 和李斯特氏菌癌症疫苗处理的小鼠都在第 45 天之前死亡。有 60% 的接受三重组合 CTX+ 李斯特氏菌癌症疫苗和 B7-DC-Ig 的小鼠存活。

[0403] 参考文献表

[0404] 1. Brode S, Cooke A. Immune-potentiating effects of the chemotherapeutic drug cyclophosphamide. Crit Rev. Immunol. 2008 ;28(2) :109-26

[0405] 2. van der Most RG, Currie AJ, Mahendran S, Prosser A, Darabi A, Robinson BW, Nowak AK, Lake RA. Tumor eradication after cyclophosphamide depends on concurrent depletion of regulatory T cells: a role for cycling TNFR2-expressing effector-suppressor T cells in limiting effective chemotherapy. Cancer Immunol. Immunother. 2009 Aug ;58(8) :1219-28

[0406] 3. Taieb J, Chaput N, Scharltz N, Roux S, Novault S, Menard C, Ghiringhelli F, Terme M, Carpentier AF, Darrasse-Jeze G, et al. Chemoimmunotherapy of tumors: cyclophosphamide synergizes with exosome based vaccines. J. Immunol. 2006 Mar 1 ;176(5) :2722-9

[0407] 4. Machiels JP, Reilly RT, Emens LA, Ercolini AM, Lei RY, Weintraub D, Okoye FI, Jaffee EM. Cyclophosphamide, doxorubicin, and paclitaxel enhance the antitumor immune response of granulocyte/macrophage-colony stimulating factor-secreting whole-cell vaccines in HER-2/neu tolerized mice. Cancer Res. 2001 May 1 ;61(9) :

3689-97

[0408] 5. Bass KK, Mastrangelo MJ. Immunopotential with low-dose cyclophosphamide in the active specific immunotherapy of cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 1998 Sep;47(1):1-12

[0409] 6. Hengst JC, Mokyr MB, Dray S. Cooperation between cyclophosphamide tumoricidal activity and host antitumor immunity in the cure of mice bearing large MOPC-315 tumors. *Cancer Res.* 1981 Jun;41(6):2163-7

[0410] 7. Hengst JC, Mokyr MB, Dray S. Importance of timing in cyclophosphamide therapy of MOPC-315 tumor-bearing mice. *Cancer Res.* 1980 Jul;40(7):2135-41

[0411] 8. Tsung K, Meko JB, Tsung YL, Peplinski GR, Norton JA. Immune response against large tumors eradicated by treatment with cyclophosphamide and IL-12. *J. Immunol.* 1998 Feb 1;160(3):1369-77

[0412] 9. Honeychurch J, Glennie MJ, Illidge TM. Cyclophosphamide inhibition of anti-CD40 monoclonal antibody-based therapy of B cell lymphoma is independent on CD11b+ cells. *Cancer Res.* 2005 Aug 15;65(16):7493-501

[0413] 10. Wada S, Yoshimura K, Hipkiss EL, Harris TJ, Yen HR, Goldberg MV, Grosso JF, Getnet D, Demarzo AM, Netto GJ, Anders R, Pardoll DM, Drake CG. Cyclophosphamide augments antitumor immunity: studies in an autochthonous prostate cancer model. *Cancer Res.* 2009 May 15;69(10):4309-18.

[0414] 11. Freeman, G. J. Structures of PD-1 with its ligands: sideways and dancing cheek to cheek. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 105, 10275-10276 (2008).

[0415] 12. Brode, S. & Cooke, A. Immune-potentiating effects of the chemotherapeutic drug cyclophosphamide. *Crit Rev. Immunol.* 28, 109-126 (2008).

[0416] 13. van der Most, R. G. et al. Tumor eradication after cyclophosphamide depends on concurrent depletion of regulatory T cells: a role for cycling TNFR2-expressing effector-suppressor T cells in limiting effective chemotherapy. *Cancer Immunol. Immunother.* 58, 1219-1228 (2009).

[0417] 14. Taieb, J. et al. Chemoimmunotherapy of tumors: cyclophosphamide synergizes with exosome based vaccines. *J. Immunol.* 176, 2722-2729 (2006).

[0418] 15. Bass, K. K. & Mastrangelo, M. J. Immunopotential with low-dose cyclophosphamide in the active specific immunotherapy of cancer. *Cancer Immunol. Immunother.* 47, 1-12 (1998).

[0419] 16. Machiels, J. P. et al. Cyclophosphamide, doxorubicin, and paclitaxel enhance the antitumor immune response of granulocyte/macrophage colony stimulating factor-secreting whole-cell vaccines in HER-2/neu tolerized mice. *Cancer Res.* 61, 3689-3697 (2001).

[0420] 17. Hengst, J. C., Mokyr, M. B., & Dray, S. Cooperation between cyclophosphamide

tumoricidal activity and host antitumor immunity in the cure of mice bearing large MOPC-315 tumors. *Cancer Res.* 41, 2163-2167 (1981).

[0421] 18. Hengst, J. C., Mokyr, M. B., & Dray, S. Importance of timing in cyclophosphamide therapy of MOPC-315 tumor-bearing mice. *Cancer Res.* 40, 2135-2141 (1980).

[0422] 19. Tsung, K., Meko, J. B., Tsung, Y. L., Peplinski, G. R., & Norton, J. A. Immuneresponse against large tumors eradicated by treatment with cyclophosphamide and IL-12. *J. Immunol.* 160, 1369-1377 (1998).

[0423] 20. Honeychurch, J., Glennie, M. J., & Illidge, T. M. Cyclophosphamide inhibition of anti-CD40 monoclonal antibody-based therapy of B cell lymphoma is dependent on CD11b⁺ cells. *Cancer Res.* 65, 7493-7501 (2005).

[0424] 21. Wada S, Yoshimura K, Hipkiss EL, Harris TJ, Yen HR, Goldberg MV, Grosso JF, Getnet D, Demarzo AM, Netto GJ, Anders R, Pardoll DM, Drake CG. Cyclophosphamide augments antitumor immunity: studies in an autochthonous prostate cancer model. *Cancer Res.* 2009 May 15; 69(10):4309-18.

[0001]

序列表

<110> 安普利穆尼股份有限公司 (AMPLIMUNE, INC.)

<120> PD-1 拮抗剂的组合物和使用方法

<130> 21682-7

<140>

<141>

<150> 61/211,697

<151> 2009-04-02

<150> 61/091,692

<151> 2008-08-25

<150> 61/091,709

<151> 2008-08-25

<150> 61/091,705

<151> 2008-08-25

<160> 20

<170> PatentIn version 3.4

<210> 1

<211> 273

<212> PRT

<213> 人

<400> 1

Met	Ile	Phe	Leu	Leu	Leu	Met	Leu	Ser	Leu	Glu	Leu	Gln	Leu	His	Gln
1			5						10					15	

Ile	Ala	Ala	Leu	Phe	Thr	Val	Thr	Val	Pro	Lys	Glu	Leu	Tyr	Ile	Ile
			20				25						30		

Glu	His	Gly	Ser	Asn	Val	Thr	Leu	Glu	Cys	Asn	Phe	Asp	Thr	Gly	Ser
		35					40					45			

His	Val	Asn	Leu	Gly	Ala	Ile	Thr	Ala	Ser	Leu	Gln	Lys	Val	Glu	Asn
	50					55					60				

Asp	Thr	Ser	Pro	His	Arg	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Leu	Glu	Glu	Gln	Leu
65					70					75					80

Pro	Leu	Gly	Lys	Ala	Ser	Phe	His	Ile	Pro	Gln	Val	Gln	Val	Arg	Asp
			85						90					95	

Glu	Gly	Gln	Tyr	Gln	Cys	Ile	Ile	Ile	Tyr	Gly	Val	Ala	Trp	Asp	Tyr
		100						105					110		

Lys	Tyr	Leu	Thr	Leu	Lys	Val	Lys	Ala	Ser	Tyr	Arg	Lys	Ile	Asn	Thr
		115					120					125			

His	Ile	Leu	Lys	Val	Pro	Glu	Thr	Asp	Glu	Val	Glu	Leu	Thr	Cys	Gln
		130				135					140				

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

[0002]

Pro Ala Asn Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val
 165 170 175
 Thr Ser Val Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys
 180 185 190
 Val Phe Trp Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp
 195 200 205
 Leu Gln Ser Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp Leu Leu His
 210 215 220
 Ile Phe Ile Pro Phe Cys Ile Ile Ala Phe Ile Phe Ile Ala Thr Val
 225 230 235 240
 Ile Ala Leu Arg Lys Gln Leu Cys Gln Lys Leu Tyr Ser Ser Lys Asp
 245 250 255
 Thr Thr Lys Arg Pro Val Thr Thr Thr Lys Arg Glu Val Asn Ser Ala
 260 265 270
 Ile
 <210> 2
 <211> 254
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 2
 Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile Glu His Gly
 1 5 10 15
 Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser His Val Asn
 20 25 30
 Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser
 35 40 45
 Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly
 50 55 60
 Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp Glu Gly Gln
 65 70 75 80
 Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu
 85 90 95
 Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr His Ile Leu
 100 105 110
 Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln Ala Thr Gly
 115 120 125

[0003]

Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val Pro Ala Asn
 130 135 140
 Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val Thr Ser Val
 145 150 155 160
 Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys Val Phe Trp
 165 170 175
 Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp Leu Gln Ser
 180 185 190
 Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp Leu Leu His Ile Phe Ile
 195 200 205
 Pro Phe Cys Ile Ile Ala Phe Ile Phe Ile Ala Thr Val Ile Ala Leu
 210 215 220
 Arg Lys Gln Leu Cys Gln Lys Leu Tyr Ser Ser Lys Asp Thr Thr Lys
 225 230 235 240
 Arg Pro Val Thr Thr Thr Lys Arg Glu Val Asn Ser Ala Ile
 245 250
 <210> 3
 <211> 202
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 3
 Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile Glu His Gly
 1 5 10 15
 Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser His Val Asn
 20 25 30
 Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser
 35 40 45
 Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly
 50 55 60
 Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp Glu Gly Gln
 65 70 75 80
 Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu
 85 90 95
 Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr His Ile Leu
 100 105 110
 Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln Ala Thr Gly
 115 120 125

[0004]

Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val Pro Ala Asn
 130 135 140
 Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val Thr Ser Val
 145 150 155 160
 Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys Val Phe Trp
 165 170 175
 Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp Leu Gln Ser
 180 185 190
 Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp
 195 200
 <210> 4
 <211> 202
 <212> PRT
 <213> 小鼠
 <400> 4
 Leu Phe Thr Val Thr Ala Pro Lys Glu Val Tyr Thr Val Asp Val Gly
 1 5 10 15
 Ser Ser Val Ser Leu Glu Cys Asp Phe Asp Arg Arg Glu Cys Thr Glu
 20 25 30
 Leu Glu Gly Ile Arg Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser
 35 40 45
 Leu Gln Ser Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly
 50 55 60
 Lys Ala Leu Phe His Ile Pro Ser Val Gln Val Arg Asp Ser Gly Gln
 65 70 75 80
 Tyr Arg Cys Leu Val Ile Cys Gly Ala Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu
 85 90 95
 Thr Val Lys Val Lys Ala Ser Tyr Met Arg Ile Asp Thr Arg Ile Leu
 100 105 110
 Glu Val Pro Gly Thr Gly Glu Val Gln Leu Thr Cys Gln Ala Arg Gly
 115 120 125
 Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Gln Asn Val Ser Val Pro Ala Asn
 130 135 140
 Thr Ser His Ile Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val Thr Ser Val
 145 150 155 160
 Leu Arg Leu Lys Pro Gln Pro Ser Arg Asn Phe Ser Cys Met Phe Trp
 165 170 175
 Asn Ala His Met Lys Glu Leu Thr Ser Ala Ile Ile Asp Pro Leu Ser

[0005]

	180	185	190
Arg Met Glu Pro Lys Val Pro Arg Thr Trp			
	195	200	
<210>	5		
<211>	19		
<212>	PRT		
<213>	人		
<400>	5		
Met Ile Phe Leu Leu Leu Met Leu Ser Leu Glu Leu Gln Leu His Gln			
	1	5	10 15
Ile Ala Ala			
<210>	6		
<211>	232		
<212>	PRT		
<213>	人		
<400>	6		
Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala			
	1	5	10 15
Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro			
		20 25	30
Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val			
	35	40	45
Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val			
	50	55	60
Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln			
	65	70	75 80
Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln			
	85	90	95
Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala			
	100	105	110
Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro			
	115	120	125
Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr			
	130	135	140
Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser			
	145	150	155 160
Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr			
	165	170	175

[0006]

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr
 180 185 190
 Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe
 195 200 205
 Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys
 210 215 220
 Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 225 230
 <210> 7
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> 小鼠
 <400> 7
 Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro
 1 5 10 15
 Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys
 20 25 30
 Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val
 35 40 45
 Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe
 50 55 60
 Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu
 65 70 75 80
 Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His
 85 90 95
 Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys
 100 105 110
 Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser
 115 120 125
 Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met
 130 135 140
 Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro
 145 150 155 160
 Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn
 165 170 175
 Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met
 180 185 190

[0007]

Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser
195 200 205

Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr
210 215 220

Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
225 230

<210> 8
<211> 1365
<212> DNA
<213> 人工的

<220>
<223> 小鼠 B7-DC-Ig

<400> 8
atgctgctcc tgcigccgat acigaaacctg agcctacaac ttcacccctg agcagcttta 60
ttcacctga cagccctaa agaagtgtac accgtagacg tcggcagcag tgtgagcctg 120
gagtgcgatt ttgaccgcag agaatgcact gaactggaag ggataagagc cagtttgacg 180
aaggtagaaa atgatacgtc tcigcaaagt gaaagagcca ccctgctgga ggagcagctg 240
cccttgaggaa aggcctttgtt ccacatccct agtgtccaag tgagagattc cgggcagtag 300
cgttgccctg tcattctcgg ggccgcctgg gactacaagt acctgacggt gaaagtcaaa 360
gcttcttaca tgaggataga cactaggatc ctggagggtc caggtacagg ggagggtcag 420
cttacctgcc aggcctagagg ttatccccta gcagaagtgt cctggcaaaa tgtcagtggt 480
cctgccaaaca ccagccacat caggaccccc gaaggcctct accaggtcac cagtgttctg 540
cgcccaaacg ctacagcctag cagaaacttc agctgcatgt tctggaaatg tcacatgaag 600
gagctgactt cagccatcat tgacctctg agtcggatgg aacccaaagt cccagaacg 660
tgaggagcaa gaggtcctac gatcaagccc tgcccgcctt gtaaatgccc agtcccaat 720
ttgctgggtg gaccgtcagt ctttatcttc ccgccaaga taaaggacgt cttgatgatt 780
agtctgagcc ccactgtgac atgcgttgtg gtggatgttt cagaggatga ccccgacgtg 840
caaatacagtt ggttcgttaa caacgtggag gtgcataccg ctcaaaccca gaccacaga 900
gaggattata acagcacctt gcgggtagtg tccgccctgc cgatccagca tcaggattgg 960
atgagcggga aagagttcaa gtgtaaggta aacaacaaag atctgccagc gccgattgaa 1020
cgaaccatta gcaagccgaa agggagcgtg cgcgcacctc aggtttacgt ccttcctcca 1080
ccagaagagg agatgacgaa aaagcagggtg accctgacat gcatggtaac tgactttatg 1140
ccagaagata ttacgtgga atggactaat aacggaaaga cagagctcaa ttacaagaac 1200
actgagcctg tcttggtatc tgatggcagc tactttatgt actccaaatt gagggctcag 1260
aagaagaatt gggtcgagag aaacagttat agttgctcag tgggtcatga gggcctccat 1320
aatcatcaca ccacaaagtc cttcagccga acgcccggga aatga 1365

<210> 9
<211> 454
<212> PRT
<213> 人工的

[0008]

```

<220>
<223> 小鼠 B7-DC-Ig
<400> 9
Met Leu Leu Leu Leu Pro Ile Leu Asn Leu Ser Leu Gln Leu His Pro
1 5 10 15
Val Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Ala Pro Lys Glu Val Tyr Thr Val
20 25 30
Asp Val Gly Ser Ser Val Ser Leu Glu Cys Asp Phe Asp Arg Arg Glu
35 40 45
Cys Thr Glu Leu Glu Gly Ile Arg Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn
50 55 60
Asp Thr Ser Leu Gln Ser Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu
65 70 75 80
Pro Leu Gly Lys Ala Leu Phe His Ile Pro Ser Val Gln Val Arg Asp
85 90 95
Ser Gly Gln Tyr Arg Cys Leu Val Ile Cys Gly Ala Ala Trp Asp Tyr
100 105 110
Lys Tyr Leu Thr Val Lys Val Lys Ala Ser Tyr Met Arg Ile Asp Thr
115 120 125
Arg Ile Leu Glu Val Pro Gly Thr Gly Glu Val Gln Leu Thr Cys Gln
130 135 140
Ala Arg Gly Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Gln Asn Val Ser Val
145 150 155 160
Pro Ala Asn Thr Ser His Ile Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val
165 170 175
Thr Ser Val Leu Arg Leu Lys Pro Gln Pro Ser Arg Asn Phe Ser Cys
180 185 190
Met Phe Trp Asn Ala His Met Lys Glu Leu Thr Ser Ala Ile Ile Asp
195 200 205
Pro Leu Ser Arg Met Glu Pro Lys Val Pro Arg Thr Trp Glu Pro Arg
210 215 220
Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn
225 230 235 240
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp
245 250 255
Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270

```

[0009]

Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn
275 280 285

Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn
290 295 300

Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp
305 310 315 320

Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro
325 330 335

Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala
340 345 350

Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys
355 360 365

Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile
370 375 380

Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn
385 390 395 400

Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys
405 410 415

Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys
420 425 430

Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe
435 440 445

Ser Arg Thr Pro Gly Lys
450

<210> 10

<211> 435

<212> PRT

<213> 人工的

<220>

<223> 小鼠 B7-DC-Ig 无信号序列的融合蛋白 (fusion protein without signal sequence)

<400> 10

Leu Phe Thr Val Thr Ala Pro Lys Glu Val Tyr Thr Val Asp Val Gly
1 5 10 15

Ser Ser Val Ser Leu Glu Cys Asp Phe Asp Arg Arg Glu Cys Thr Glu
20 25 30

Leu Glu Gly Ile Arg Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser
35 40 45

[0010]

Leu	Gln	Ser	Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Leu	Glu	Glu	Gln	Leu	Pro	Leu	Gly	50	55	60	
Lys	Ala	Leu	Phe	His	Ile	Pro	Ser	Val	Gln	Val	Arg	Asp	Ser	Gly	Gln	65	70	75	80
Tyr	Arg	Cys	Leu	Val	Ile	Cys	Gly	Ala	Ala	Trp	Asp	Tyr	Lys	Tyr	Leu	85	90	95	
Thr	Val	Lys	Val	Lys	Ala	Ser	Tyr	Met	Arg	Ile	Asp	Thr	Arg	Ile	Leu	100	105	110	
Glu	Val	Pro	Gly	Thr	Gly	Glu	Val	Gln	Leu	Thr	Cys	Gln	Ala	Arg	Gly	115	120	125	
Tyr	Pro	Leu	Ala	Glu	Val	Ser	Trp	Gln	Asn	Val	Ser	Val	Pro	Ala	Asn	130	135	140	
Thr	Ser	His	Ile	Arg	Thr	Pro	Glu	Gly	Leu	Tyr	Gln	Val	Thr	Ser	Val	145	150	155	160
Leu	Arg	Leu	Lys	Pro	Gln	Pro	Ser	Arg	Asn	Phe	Ser	Cys	Met	Phe	Trp	165	170	175	
Asn	Ala	His	Met	Lys	Glu	Leu	Thr	Ser	Ala	Ile	Ile	Asp	Pro	Leu	Ser	180	185	190	
Arg	Met	Glu	Pro	Lys	Val	Pro	Arg	Thr	Trp	Glu	Pro	Arg	Gly	Pro	Thr	195	200	205	
Ile	Lys	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Gly	210	215	220	
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	225	230	235	240
Ile	Ser	Leu	Ser	Pro	Ile	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	245	250	255	
Asp	Asp	Pro	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	260	265	270	
His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	275	280	285	
Arg	Val	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	290	295	300	
Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	305	310	315	320
Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly	Ser	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	325	330	335	

[0011]

Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr
 340 345 350
 Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu
 355 360 365
 Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro
 370 375 380
 Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val
 385 390 395 400
 Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val
 405 410 415
 His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr
 420 425 430
 Pro Gly Lys
 435

<210> 11
 <211> 1362
 <212> DNA
 <213> 人工的

<220>
 <223> 人 B7-DC-Ig

<400> 11
 atgatcttct tictcttgat gctgtctttg gaattgcaac ttacacaaat cgcggccctc 60
 ttacttgiga ccgigccaaa agaactglat atcatlgagc acgggtlcaa tglgacccct 120
 gaatgtaact ttgacaccgg cagccacgtt aacctggggg ccatcactgc cagcttgcaa 180
 aaagttgaaa acgacacttc acctcaccgg gagagggcaa ccctcttgga ggagcaactg 240
 ccatlgggga aggcctcctt tcataccct cagggtgcagg ttcgggatga gggacagtac 300
 cagtgcatta ttatctacgg cgtggcttgg gattacaagt atctgacct gaaggtgaaa 360
 gcgtcctatc ggaaaattaa cactcacatt cttaagggtgc cagagacgga cgaggtggaa 420
 ctgacatgcc aagccaccgg ctaccggtg gcagagggtca gctggcccaa cgtgagcgta 480
 cctgctaaca ctctctatc taggacaccc gagggcctct accaggttac atccgtgctc 540
 cgctcaaac cgccccagg ccggaatttt agttgctgt tttggaatac ccacgtgcga 600
 gagctgactc ttgcatctat lgaatlgcag tccagatgg agccacggac tcatccaact 660
 tgggaacctt aatcttgcca taaaactcat acctgtcccc cttgcccage ccccgagctt 720
 ctggggaggtc ccagtgtgtt tctgtttccc caaaaacctt aggacacact tatgatatcc 780
 cgaacgccgg aagtgacatg cgtggttgtg gacgtctcac acgaagacct ggaggtgaaa 840
 ttcaactggt acgttgacgg agttgaggtt cataacgcta agaccaagcc cagagaggag 900
 caatacaatt ccacctatcg agtggtagt gtactgaccg ttttgacca agactggctg 960
 aatggaaaag aatacaagtg caaagtatca aacaaggctt tgcctgcacc catcgagaag 1020
 acaatttcta aagccaaaagg gcagcccagg gaaccgcagg tgtacacact cccaccatcc 1080

[0012]

cgcgacgagc tgacaaagaa tcaagtatcc ctgacctgcc tggtgaaagg cttttacca 1140
tctgacattg ccgtggaatg ggaatcaaat ggacaacctg agaacaacta caaaaccact 1200
ccacctgtgc ttgacagcga cgggtccctt ttctgttaca gtaagctcac tgtcgataag 1260
tctcgctggc agcagggcaa cgtcttttca tgtagtgtga tgcacgaagc tctgcacaac 1320
cattacaccc agaagtctct gtcactgagc ccaggtaaat ga 1362

<210> 12
<211> 453
<212> PRT
<213> 人工的

<220>
<223> 人 B7-DC-Ig

<400> 12

Met Ile Phe Leu Leu Leu Met Leu Ser Leu Glu Leu Gln Leu His Gln
1 5 10 15

Ile Ala Ala Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile
20 25 30

Glu His Gly Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser
35 40 45

His Val Asn Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn
50 55 60

Asp Thr Ser Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu
65 70 75 80

Pro Leu Gly Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp
85 90 95

Glu Gly Gln Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr
100 105 110

Lys Tyr Leu Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr
115 120 125

His Ile Leu Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln
130 135 140

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

Pro Ala Asn Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val
165 170 175

Thr Ser Val Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys
180 185 190

Val Phe Trp Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp
195 200 205

[0013]

Leu Gln Ser Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp Glu Pro Lys
 210 215 220
 Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
 225 230 235 240
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 245 250 255
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 260 265 270
 Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 275 280 285
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 290 295 300
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 305 310 315 320
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 325 330 335
 Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 340 345 350
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
 355 360 365
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
 370 375 380
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
 385 390 395 400
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
 405 410 415
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
 420 425 430
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
 435 440 445
 Leu Ser Pro Gly Lys
 450

<210> 13
 <211> 434
 <212> PRT
 <213> 人工的
 <220>

[0014]

<223> 人 B7-DC-Ig 无信号序列

<400> 13

Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile Glu His Gly
1 5 10 15

Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser His Val Asn
20 25 30

Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser
35 40 45

Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly
50 55 60

Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp Glu Gly Gln
65 70 75 80

Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu
85 90 95

Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr His Ile Leu
100 105 110

Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln Ala Thr Gly
115 120 125

Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val Pro Ala Asn
130 135 140

Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val Thr Ser Val
145 150 155 160

Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys Val Phe Trp
165 170 175

Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp Leu Gln Ser
180 185 190

Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp Glu Pro Lys Ser Cys Asp
195 200 205

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly
210 215 220

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
225 230 235 240

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
245 250 255

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
260 265 270

[0015]

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
 275 280 285
 Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 290 295 300
 Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
 305 310 315 320
 Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 325 330 335
 Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 340 345 350
 Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 355 360 365
 Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
 370 375 380
 Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
 385 390 395 400
 Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
 405 410 415
 Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
 420 425 430
 Gly Lys
 <210> 14
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 14
 Trp Asp Tyr Lys Tyr
 1 5
 <210> 15
 <211> 202
 <212> PRT
 <213> 束状猕猴 (Macaca fascicularis)
 <400> 15
 Leu Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Glu Leu Tyr Ile Ile Glu His Gly
 1 5 10 15
 Ser Asn Val Thr Leu Glu Cys Asn Phe Asp Thr Gly Ser His Val Asn
 20 25 30
 Leu Gly Ala Ile Thr Ala Ser Leu Gln Lys Val Glu Asn Asp Thr Ser
 35 40 45

[0016]

Pro His Arg Glu Arg Ala Thr Leu Leu Glu Glu Gln Leu Pro Leu Gly
 50 55 60
 Lys Ala Ser Phe His Ile Pro Gln Val Gln Val Arg Asp Glu Gly Gln
 65 70 75 80
 Tyr Gln Cys Ile Ile Ile Tyr Gly Val Ala Trp Asp Tyr Lys Tyr Leu
 85 90 95
 Thr Leu Lys Val Lys Ala Ser Tyr Arg Lys Ile Asn Thr His Ile Leu
 100 105 110
 Lys Val Pro Glu Thr Asp Glu Val Glu Leu Thr Cys Gln Ala Thr Gly
 115 120 125
 Tyr Pro Leu Ala Glu Val Ser Trp Pro Asn Val Ser Val Pro Ala Asn
 130 135 140
 Thr Ser His Ser Arg Thr Pro Glu Gly Leu Tyr Gln Val Thr Ser Val
 145 150 155 160
 Leu Arg Leu Lys Pro Pro Pro Gly Arg Asn Phe Ser Cys Val Phe Trp
 165 170 175
 Asn Thr His Val Arg Glu Leu Thr Leu Ala Ser Ile Asp Leu Gln Ser
 180 185 190
 Gln Met Glu Pro Arg Thr His Pro Thr Trp
 195 200
 <210> 16
 <211> 290
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 16
 Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
 1 5 10 15
 Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
 20 25 30
 Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
 35 40 45
 Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
 50 55 60
 Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
 65 70 75 80
 Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
 85 90 95

[0017]

Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
 100 105 110
 Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
 115 120 125
 Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
 130 135 140
 Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
 145 150 155 160
 Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
 165 170 175
 Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
 180 185 190
 Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
 195 200 205
 Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
 210 215 220
 Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
 225 230 235 240
 Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
 245 250 255
 Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
 260 265 270
 Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
 275 280 285
 Glu Thr
 290
 <210> 17
 <211> 290
 <212> PRT
 <213> 小鼠
 <400> 17
 Met Arg Ile Phe Ala Gly Ile Ile Phe Thr Ala Cys Cys His Leu Leu
 1 5 10 15
 Arg Ala Phe Thr Ile Thr Ala Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
 20 25 30
 Gly Ser Asn Val Thr Met Glu Cys Arg Phe Pro Val Glu Arg Glu Leu
 35 40 45

[0018]

Asp Leu Leu Ala Leu Val Val Tyr Trp Glu Lys Glu Asp Glu Gln Val
 50 55 60
 Ile Gln Phe Val Ala Gly Glu Glu Asp Leu Lys Pro Gln His Ser Asn
 65 70 75 80
 Phe Arg Gly Arg Ala Ser Leu Pro Lys Asp Gln Leu Leu Lys Gly Asn
 85 90 95
 Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
 100 105 110
 Cys Cys Ile Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Leu
 115 120 125
 Lys Val Asn Ala Pro Tyr Arg Lys Ile Asn Gln Arg Ile Ser Val Asp
 130 135 140
 Pro Ala Thr Ser Glu His Glu Leu Ile Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro
 145 150 155 160
 Glu Ala Glu Val Ile Trp Thr Asn Ser Asp His Gln Pro Val Ser Gly
 165 170 175
 Lys Arg Ser Val Thr Thr Ser Arg Thr Glu Gly Met Leu Leu Asn Val
 180 185 190
 Thr Ser Ser Leu Arg Val Asn Ala Thr Ala Asn Asp Val Phe Tyr Cys
 195 200 205
 Thr Phe Trp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asn His Thr Ala Glu Leu Ile
 210 215 220
 Ile Pro Glu Leu Pro Ala Thr His Pro Pro Gln Asn Arg Thr His Trp
 225 230 235 240
 Val Leu Leu Gly Ser Ile Leu Leu Phe Leu Ile Val Val Ser Thr Val
 245 250 255
 Leu Leu Phe Leu Arg Lys Gln Val Arg Met Leu Asp Val Glu Lys Cys
 260 265 270
 Gly Val Glu Asp Thr Ser Ser Lys Asn Arg Asn Asp Thr Gln Phe Glu
 275 280 285
 Glu Thr
 290
 <210> 18
 <211> 290
 <212> PRT
 <213> 猕猴 (Macaca mulatta)
 <400> 18
 Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Thr Ile Tyr Trp His Leu Leu

[0019]

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

[0020]

290

<210> 19
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 19

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
 1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
 20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Phe Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
 35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
 50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
 65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
 85 90 95

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
 100 105 110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
 115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
 130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
 145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
 165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
 180 185 190

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
 195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
 210 215 220

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
 225 230 235 240

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
 245 250 255

[0021]

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
260 265 270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
275 280 285

<210> 20
 <211> 288
 <212> PRT
 <213> 束状猕猴(Macaca fascicularis)

<400> 20

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Glu Ser Pro Asp Arg Pro Trp
20 25 30

Asn Ala Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Leu Val Thr Glu Gly Asp
35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Ala Ser Glu Ser Phe Val
50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
65 70 75 80

Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp Cys Arg Phe Arg
85 90 95

Val Thr Arg Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg
100 105 110

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu
115 120 125

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val
130 135 140

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro
145 150 155 160

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly
165 170 175

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys
180 185 190

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
195 200 205

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
210 215 220

[0022]

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

1

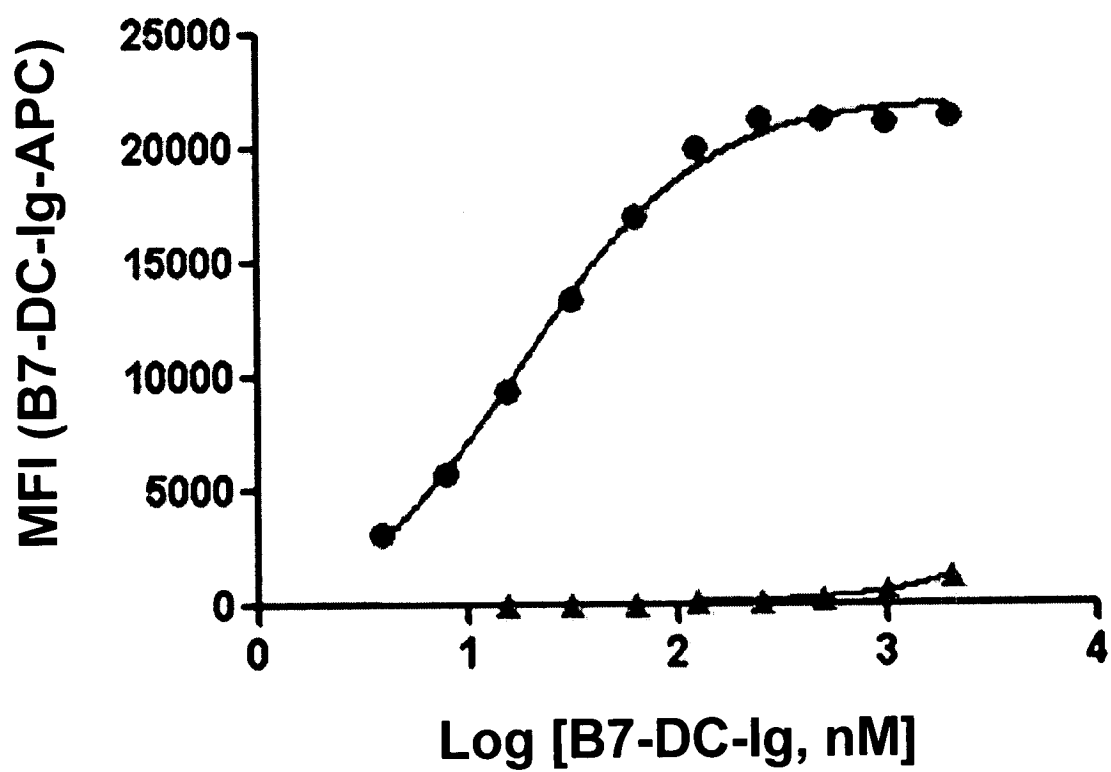


图 1 ;B7-DC-Ig 结合表达 PD-1 的 CHO 细胞

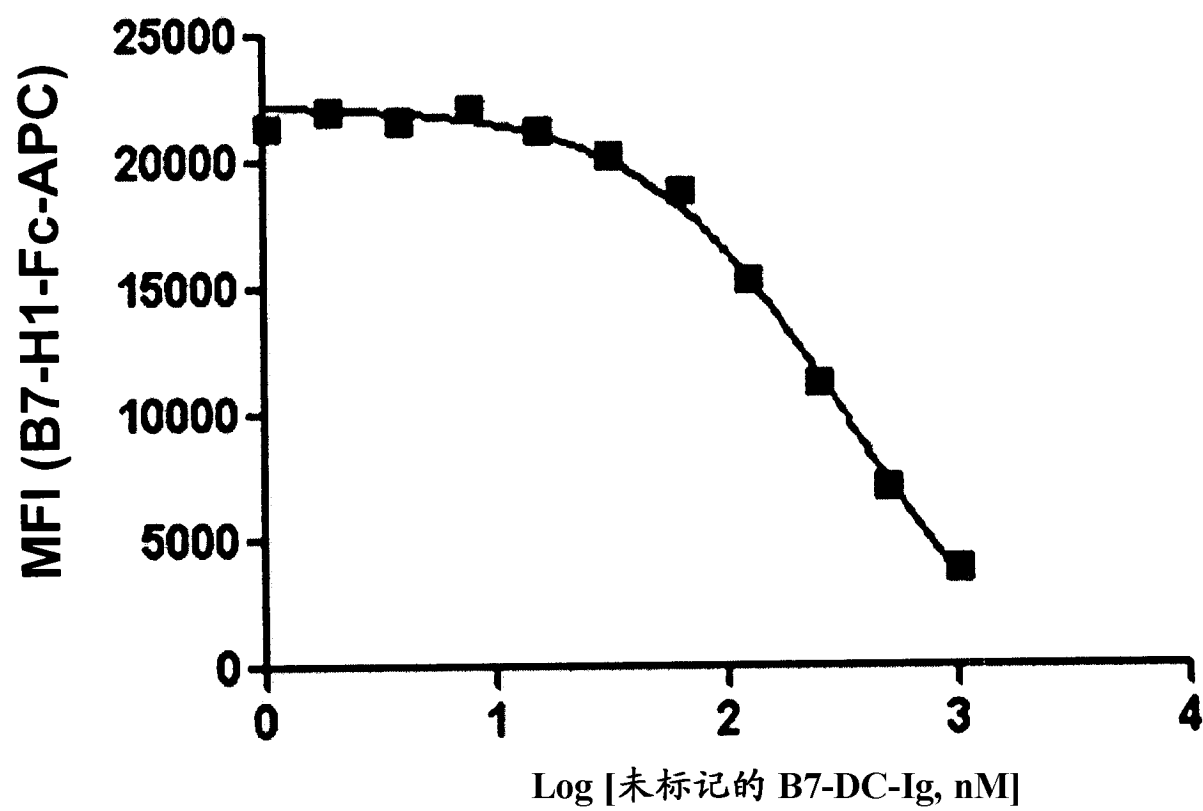


图 2 :B7-DC-Ig 与 B7-H1 竞争对 PD-1 的结合

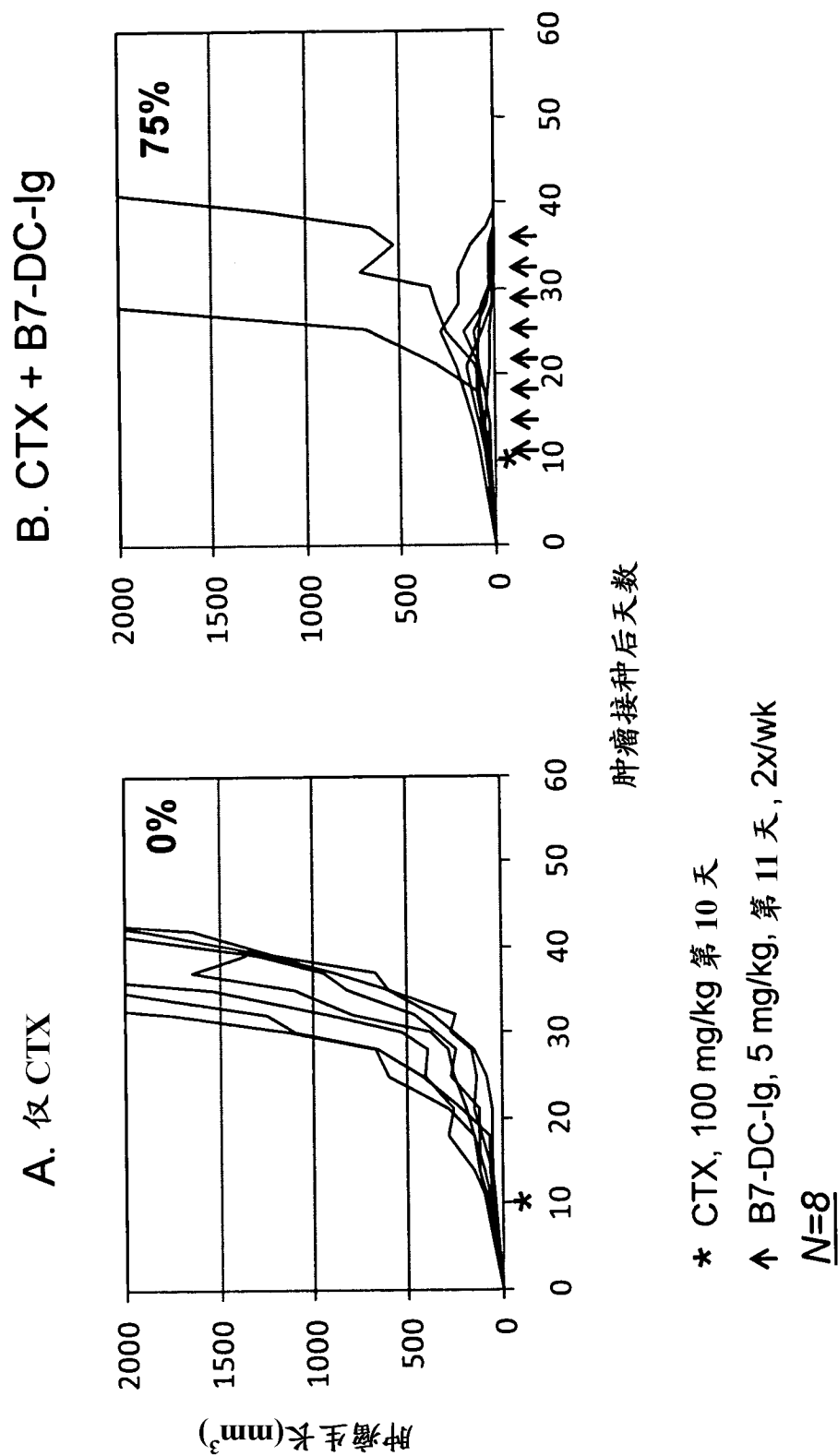


图 3-1 :CTX 与 B7-DC-Ig 组合

C. 平均肿瘤体积

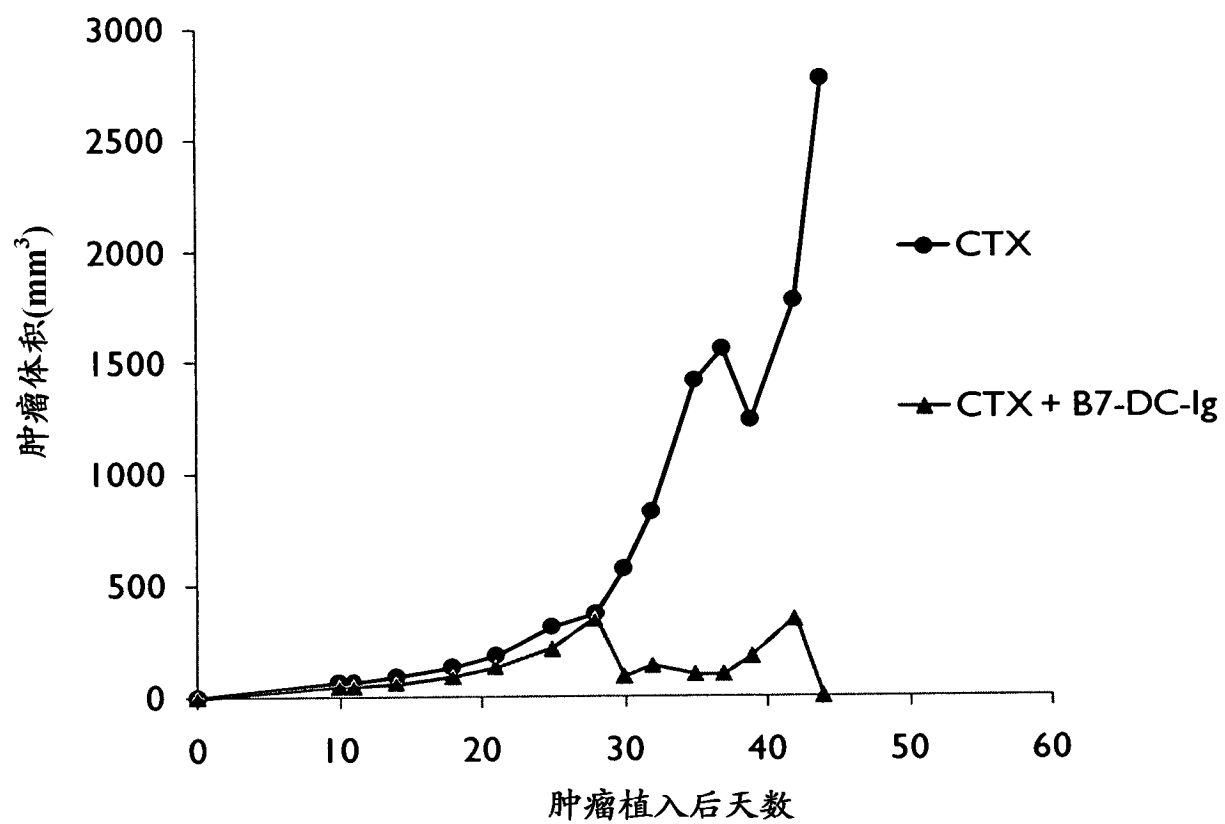


图 3-2 :CTX 与 B7-DC-Ig 组合

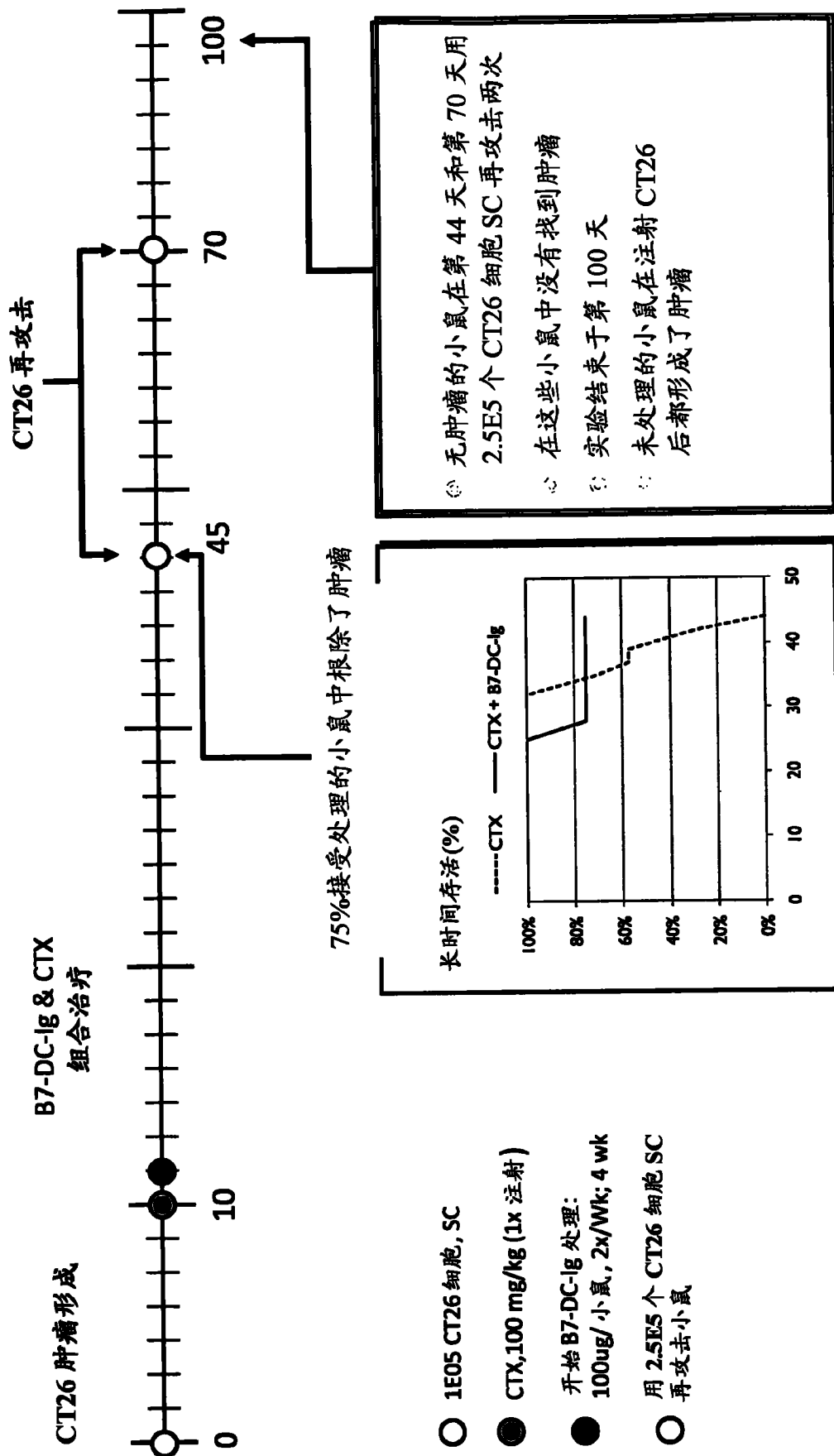


图 4: CTX+B7-DC-Ig 根除肿瘤及针对 CT26 再攻击提供保护

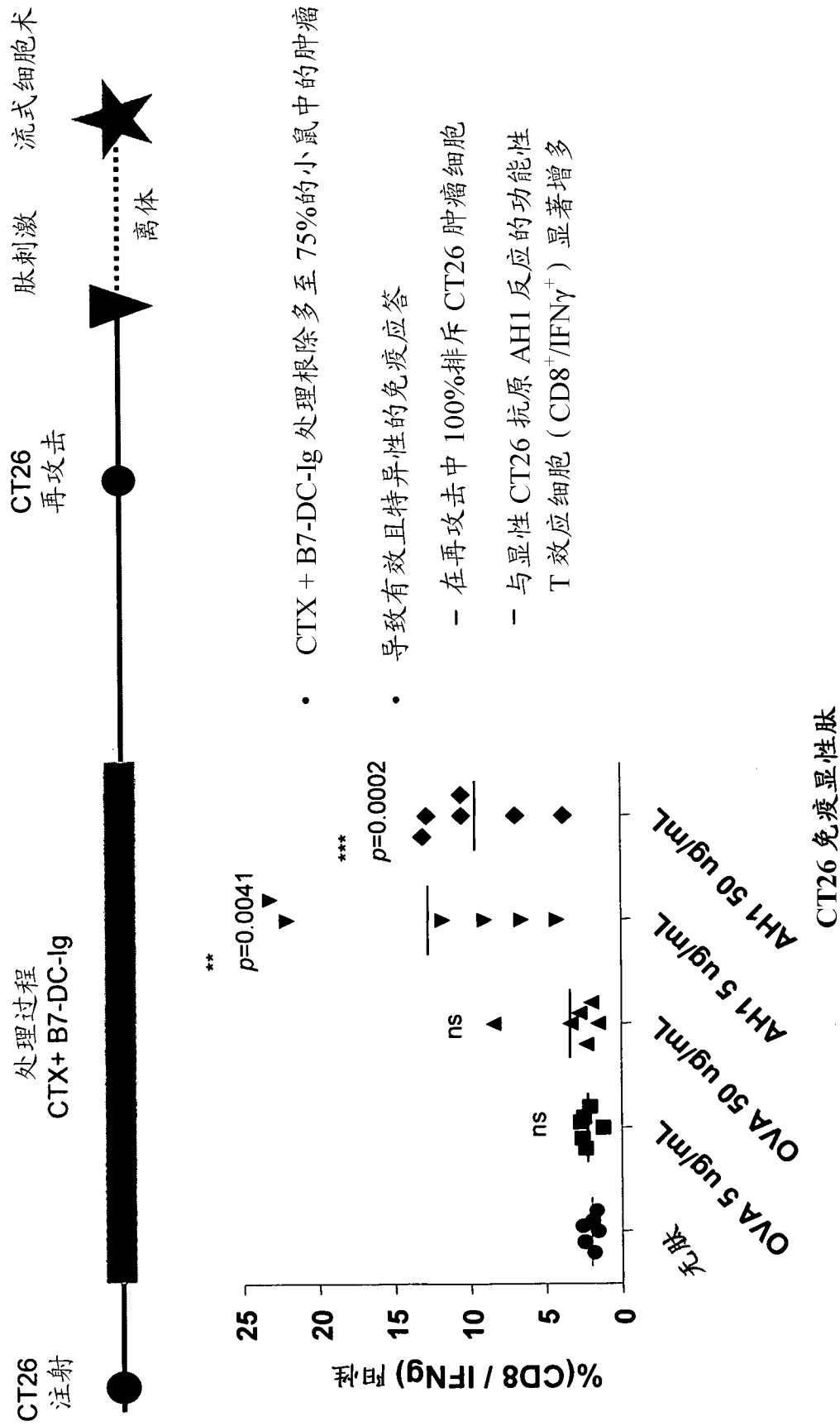


图 5 :CTX+B7-DC-Ig 处理导致肿瘤特异性的记忆细胞毒性 T 淋巴细胞

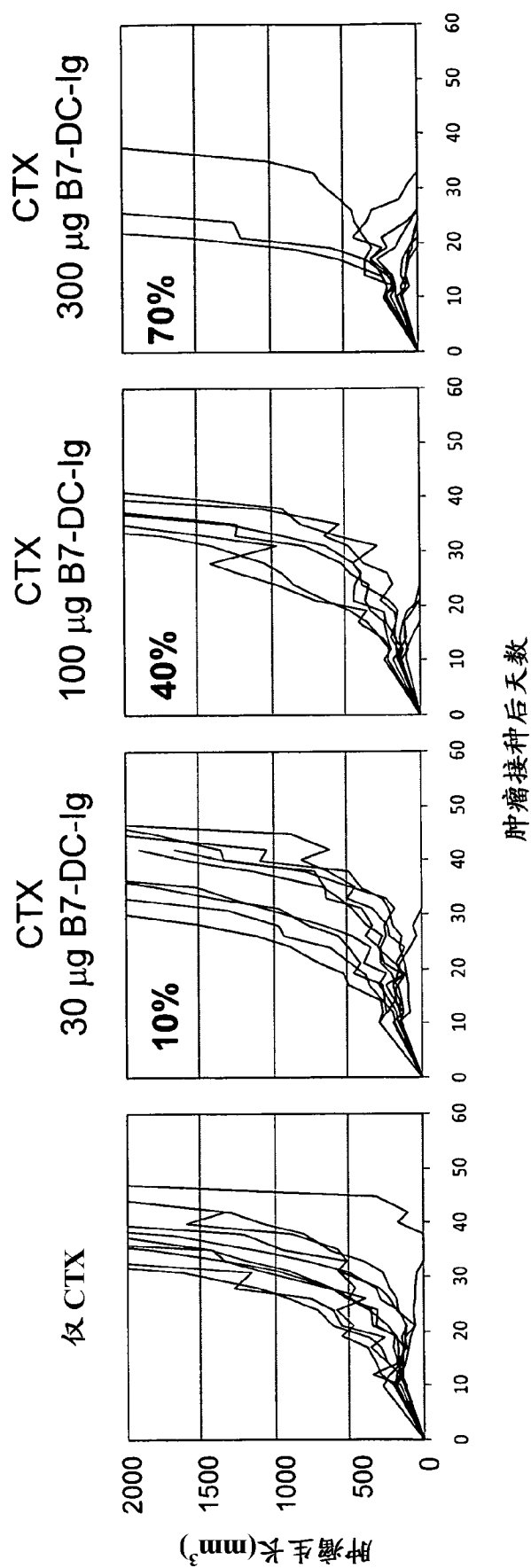


图 6 :B7-DC-Ig 与肿瘤根除的关系 :CT26 模型

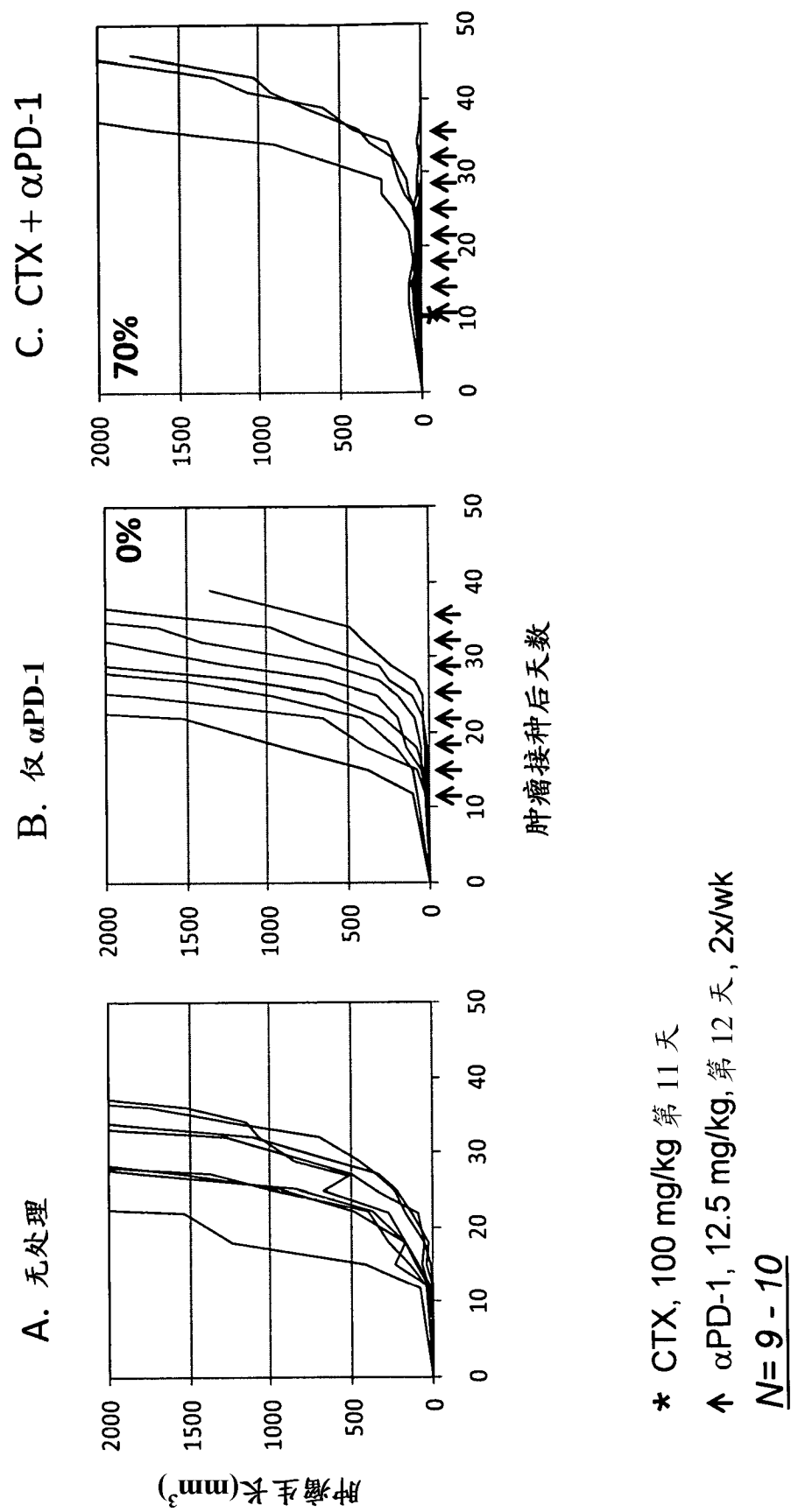


图 7 :CTX 与抗 PD-1 组合

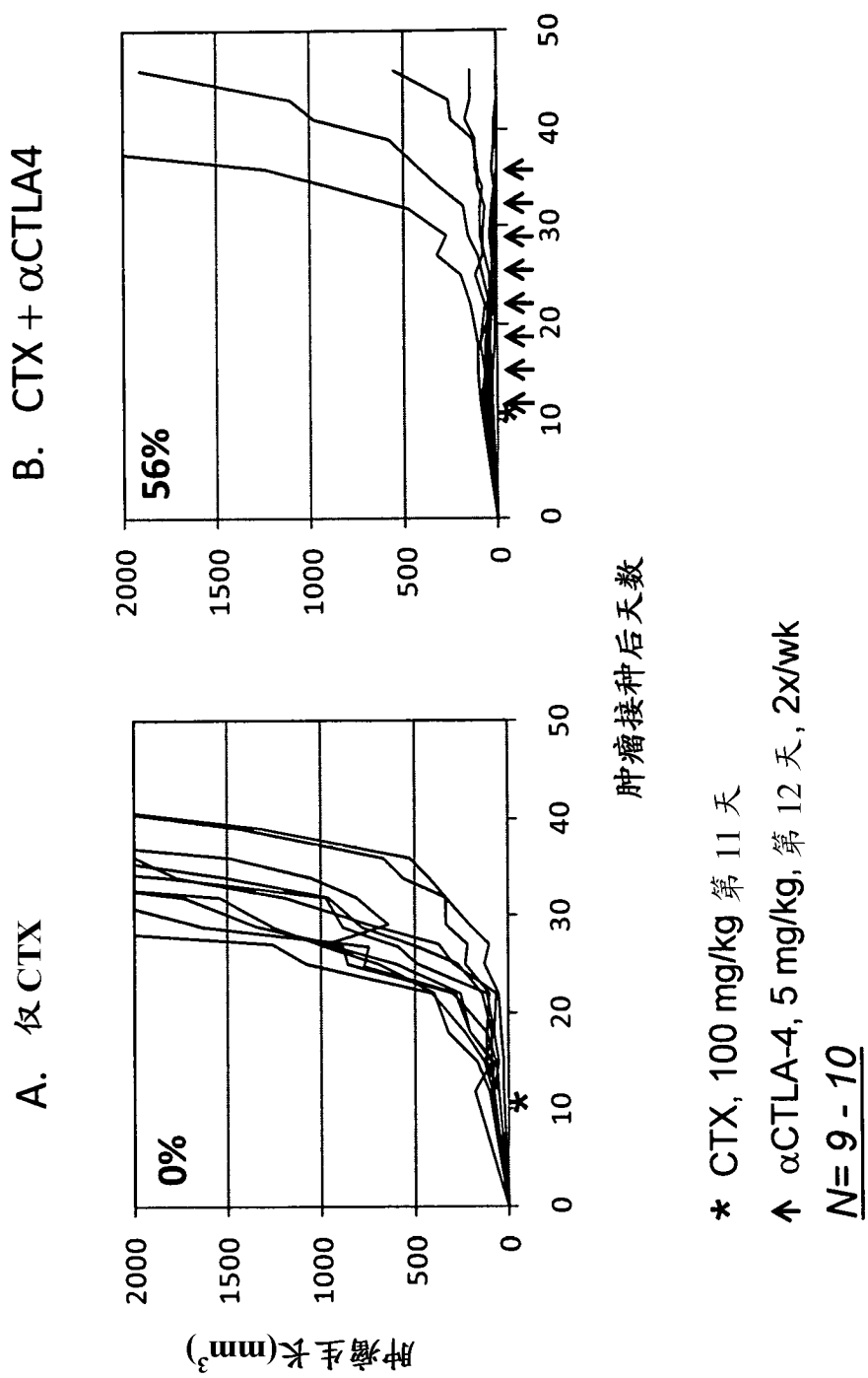


图 8 :CTX 与抗 CTLA4 组合

图 9: 在 B7-DC-Ig 方案中包括 CTX 导致 2 天后脾中的 Treg 减少。B7-DC-Ig 显著减少引流淋巴结中的 PD-1^高 CD4⁺ T 细胞

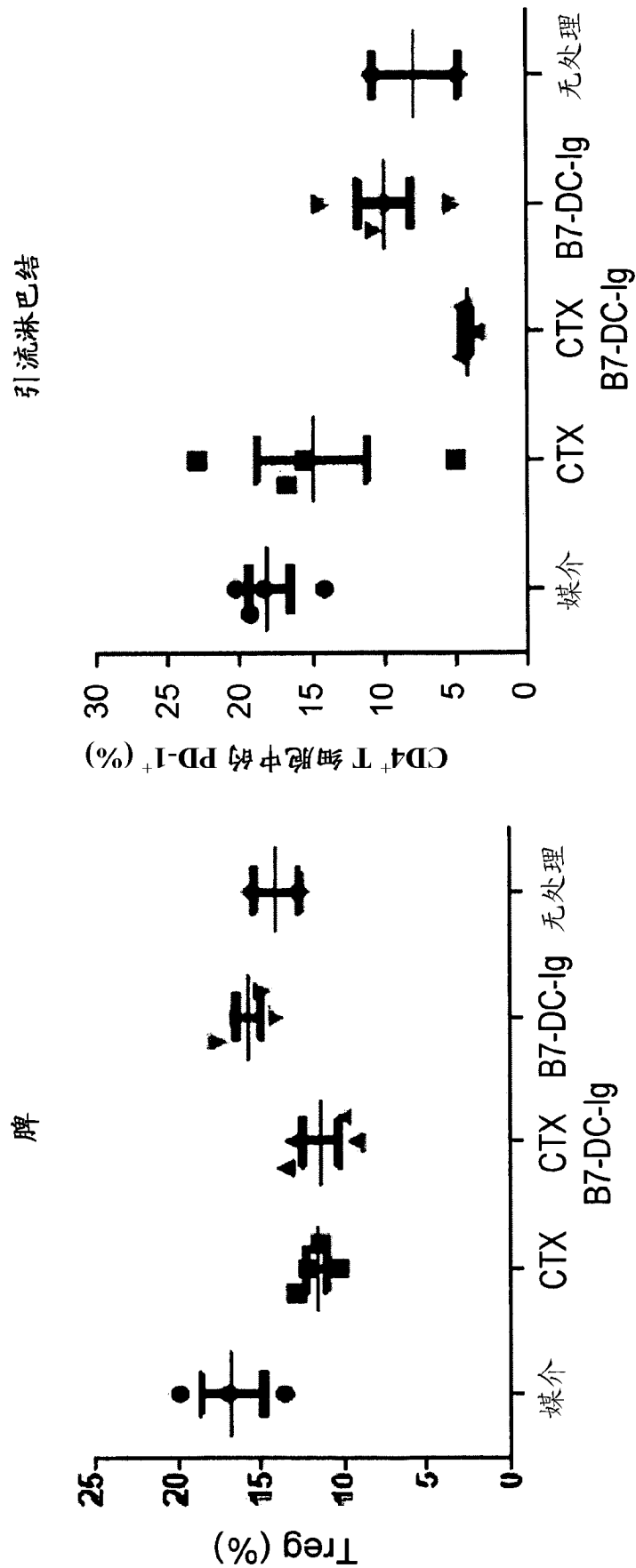


图 9：

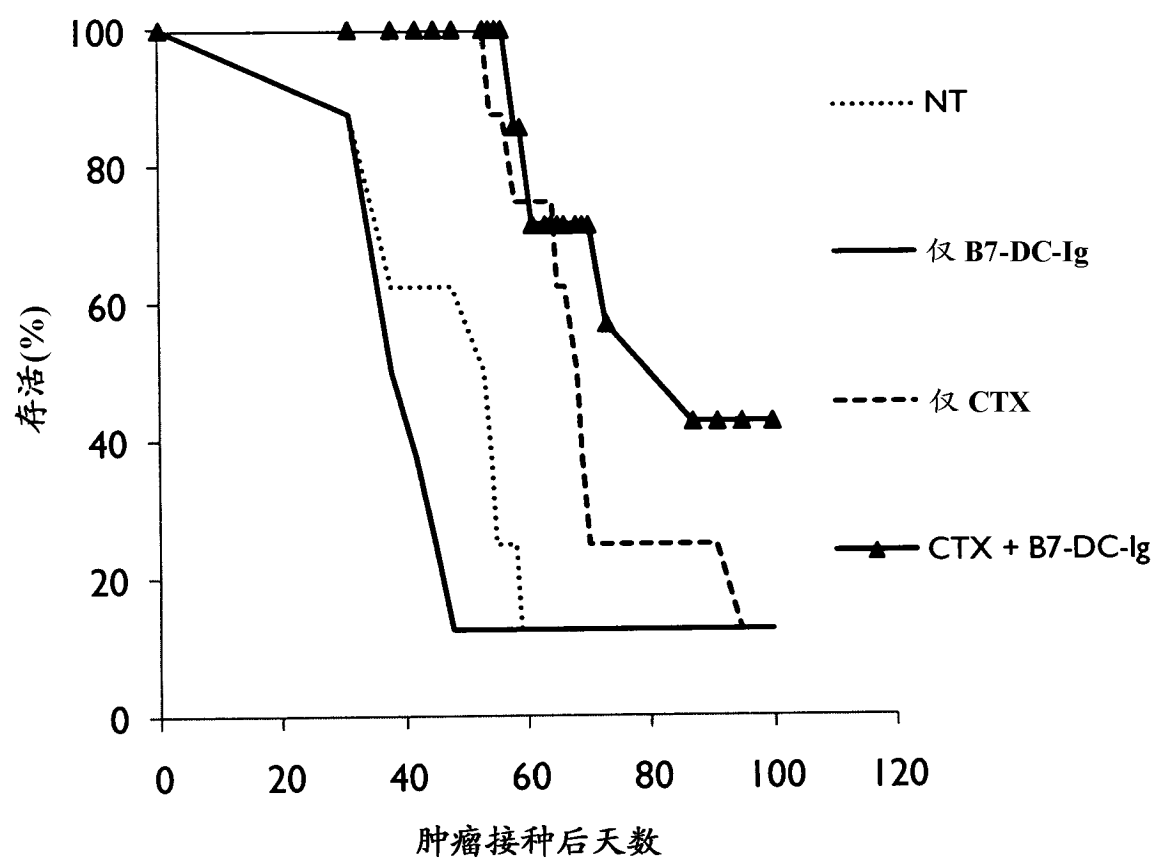


图 10 :在肺转移模型中 B7-DC-Ig 与 CTX 协同作用

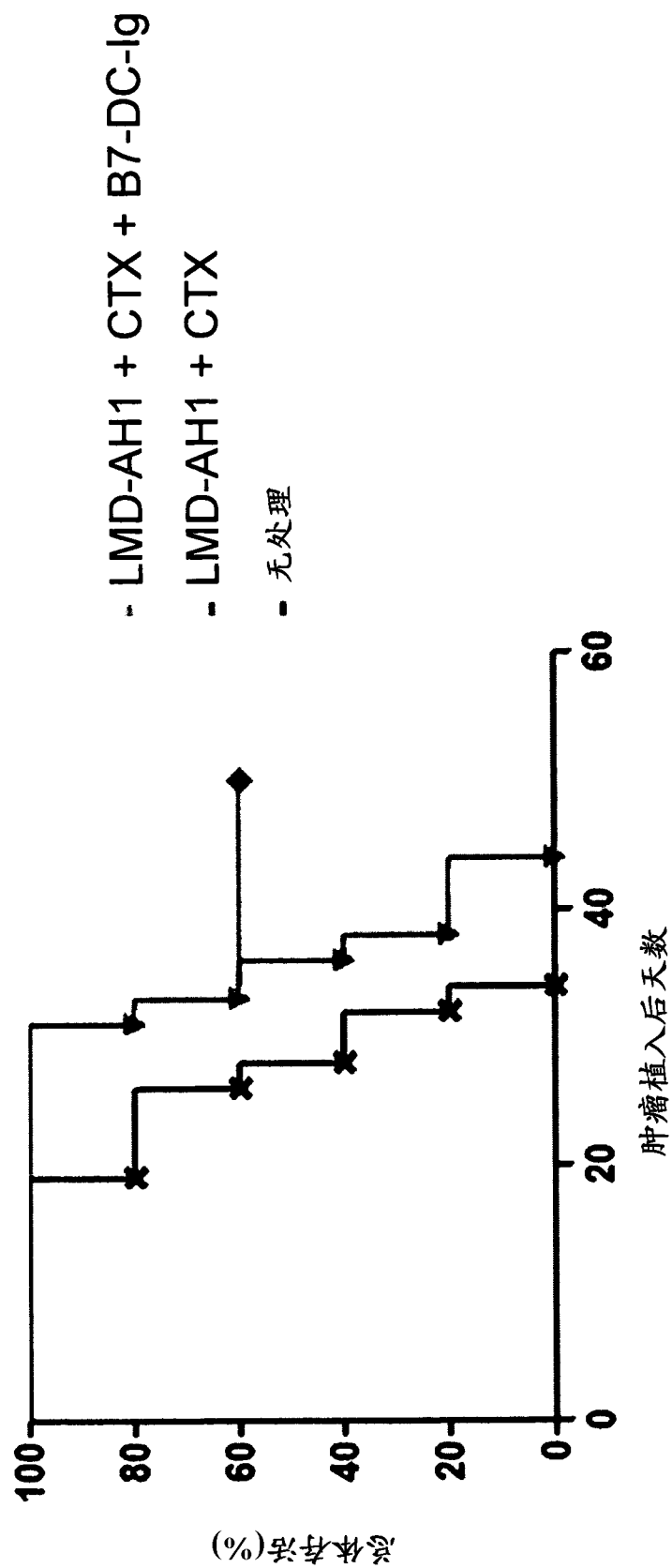


图 11 :在肝转移模型中 B7-DC-Ig 与 CTX 和李斯特氏菌疫苗协同作用