



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 118922441 A

(43) 申请公布日 2024.11.08

(21) 申请号 202280091132.2

(22) 申请日 2022.12.09

(30) 优先权数据

63/288,284 2021.12.10 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.08.07

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2022/081297 2022.12.09

(87) PCT国际申请的公布数据

W02023/108138 EN 2023.06.15

(71) 申请人 宾夕法尼亚大学董事会

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 D·L·西格尔 N·J·梅森

N·切斯特 K·帕兹

(74) 专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

专利代理师 张全信

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/70 (2006.01)

权利要求书10页 说明书71页

序列表(电子公布) 附图16页

(54) 发明名称

全犬抗犬PD-1抗体及其用途

(57) 摘要

本公开内容涉及对犬程序性死亡蛋白1(PD-1)具有特异性的抗体、结合多肽和scFv,编码其的核酸、治疗方法及其它方法或其用途。

1. 一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

- (a) 重链互补决定区1 (HCDR1), 其包括SEQ ID NO: 1、27或43中所列的氨基酸序列,
- (b) 重链互补决定区2 (HCDR2), 其包括SEQ ID NO: 2、28或44中所列的氨基酸序列,
- (c) 重链互补决定区3 (HCDR3), 其包括SEQ ID NO: 3、29或45中所列的氨基酸序列,
- (d) 轻链互补决定区1 (LCDR1), 其包括SEQ ID NO: 4、30或46中所列的氨基酸序列,
- (e) 轻链互补决定区2 (LCDR2), 其包括SEQ ID NO: 5、31或47中所列的氨基酸序列, 和
- (f) 轻链互补决定区3 (LCDR3), 其包括SEQ ID NO: 6、32或48中所列的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

- (a) 重链可变区, 其包括与SEQ ID NO: 7、9、33或49中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列; 和
- (b) 轻链可变区, 其包括与SEQ ID NO: 11、35或51中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

3. 根据权利要求1或2所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

- (a) 免疫球蛋白重链, 其包括与SEQ ID NO: 19、21、23、39或55中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列, 和
- (b) 免疫球蛋白轻链, 其包括与SEQ ID NO: 25、41或57中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

4. 一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

- (a) 重链可变区, 其包括与SEQ ID NO: 7、9、33或49中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列; 和
- (b) 轻链可变区, 其包括与SEQ ID NO: 11、35或51中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

5. 一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

- (a) 重链可变区, 其包括SEQ ID NO: 7、9、33或49中所列的氨基酸序列; 和
- (b) 轻链可变区, 其包括SEQ ID NO: 11、35或51中所列的氨基酸序列。

6. 一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

- (a) 免疫球蛋白重链, 其包括与SEQ ID NO: 19、21、23、39或55中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列, 和
- (b) 免疫球蛋白轻链, 其包括与SEQ ID NO: 25、41或57中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

7. 一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

- (a) 免疫球蛋白重链, 其包括SEQ ID NO: 19、21、23、39或55中所列的氨基酸序列, 和

(b) 免疫球蛋白轻链,其包括SEQ ID NO:25、41或57中所列的氨基酸序列。

8. 一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

- (a) 重链互补决定区1(HCDR1),其包括SEQ ID NO:1中所列的氨基酸序列,
- (b) 重链互补决定区2(HCDR2),其包括SEQ ID NO:2中所列的氨基酸序列,
- (c) 重链互补决定区3(HCDR3),其包括SEQ ID NO:3中所列的氨基酸序列,
- (d) 轻链互补决定区1(LCDR1),其包括SEQ ID NO:4中所列的氨基酸序列,
- (e) 轻链互补决定区2(LCDR2),其包括SEQ ID NO:5中所列的氨基酸序列,和
- (f) 轻链互补决定区3(LCDR3),其包括SEQ ID NO:6中所列的氨基酸序列。

9. 根据权利要求8所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

- (a) 重链可变区,其包括与SEQ ID NO:7或9中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;和
- (b) 轻链可变区,其包括与SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

10. 根据权利要求8或9所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

- (a) 免疫球蛋白重链,其包括与SEQ ID NO:19、21或23中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列,和
- (b) 免疫球蛋白轻链,其包括与SEQ ID NO:25中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

11. 一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

- (a) 重链可变区,其包括与SEQ ID NO:7或9中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;和
- (b) 轻链可变区,其包括与SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

12. 一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

- (a) 重链可变区,其包括SEQ ID NO:7中所列的氨基酸序列;和
- (b) 轻链可变区,其包括SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列。

13. 一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

- (a) 重链可变区,其包括SEQ ID NO:9中所列的氨基酸序列;和
- (b) 轻链可变区,其包括SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列。

14. 一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

- (a) 免疫球蛋白重链,其包括与SEQ ID NO:19、21或23中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列,和

(b) 免疫球蛋白轻链,其包括与SEQ ID NO:25中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

15. 一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

(a) 免疫球蛋白重链,其包括SEQ ID NO:19中所列的氨基酸序列,和

(b) 免疫球蛋白轻链,其包括SEQ ID NO:25中所列的氨基酸序列。

16. 一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

(a) 免疫球蛋白重链,其包括SEQ ID NO:21中所列的氨基酸序列,和

(b) 免疫球蛋白轻链,其包括SEQ ID NO:25中所列的氨基酸序列。

17. 一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

(a) 免疫球蛋白重链,其包括SEQ ID NO:23中所列的氨基酸序列,和

(b) 免疫球蛋白轻链,其包括SEQ ID NO:25中所列的氨基酸序列。

18. 一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

(a) 重链互补决定区1(HCDR1),其包括SEQ ID NO:27中所列的氨基酸序列,

(b) 重链互补决定区2(HCDR2),其包括SEQ ID NO:28中所列的氨基酸序列,

(c) 重链互补决定区3(HCDR3),其包括SEQ ID NO:29中所列的氨基酸序列,

(d) 轻链互补决定区1(LCDR1),其包括SEQ ID NO:30中所列的氨基酸序列,

(e) 轻链互补决定区2(LCDR2),其包括SEQ ID NO:31中所列的氨基酸序列,和

(f) 轻链互补决定区3(LCDR3),其包括SEQ ID NO:32中所列的氨基酸序列。

19. 根据权利要求18所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

(a) 重链可变区,其包括与SEQ ID NO:33中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;和

(b) 轻链可变区,其包括与SEQ ID NO:35中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

20. 根据权利要求18或19所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

(a) 免疫球蛋白重链,其包括与SEQ ID NO:39中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列,和

(b) 免疫球蛋白轻链,其包括与SEQ ID NO:41中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

21. 一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

(a) 重链可变区,其包括与SEQ ID NO:33中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;和

(b) 轻链可变区,其包括与SEQ ID NO:35中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、

90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

22. 一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

(a) 重链可变区, 其包括SEQ ID NO:33中所列的氨基酸序列; 和

(b) 轻链可变区, 其包括SEQ ID NO:35中所列的氨基酸序列。

23. 一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

(a) 免疫球蛋白重链, 其包括与SEQ ID NO:39中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列, 和

(b) 免疫球蛋白轻链, 其包括与SEQ ID NO:41中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

24. 一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

(a) 免疫球蛋白重链, 其包括SEQ ID NO:39中所列的氨基酸序列, 和

(b) 免疫球蛋白轻链, 其包括SEQ ID NO:41中所列的氨基酸序列。

25. 一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

(a) 重链互补决定区1 (HCDR1), 其包括SEQ ID NO:43中所列的氨基酸序列,

(b) 重链互补决定区2 (HCDR2), 其包括SEQ ID NO:44中所列的氨基酸序列,

(c) 重链互补决定区3 (HCDR3), 其包括SEQ ID NO:45中所列的氨基酸序列,

(d) 轻链互补决定区1 (LCDR1), 其包括SEQ ID NO:46中所列的氨基酸序列,

(e) 轻链互补决定区2 (LCDR2), 其包括SEQ ID NO:47中所列的氨基酸序列, 和

(f) 轻链互补决定区3 (LCDR3), 其包括SEQ ID NO:48中所列的氨基酸序列。

26. 根据权利要求25所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

(a) 重链可变区, 其包括与SEQ ID NO:49中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列; 和

(b) 轻链可变区, 其包括与SEQ ID NO:51中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

27. 根据权利要求25或26所述的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

(a) 免疫球蛋白重链, 其包括与SEQ ID NO:55中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列, 和

(b) 免疫球蛋白轻链, 其包括与SEQ ID NO:57中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

28. 一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段, 其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

(a) 重链可变区, 其包括与SEQ ID NO:49中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列; 和

(b) 轻链可变区,其包括与SEQ ID NO:51中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

29. 一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

(a) 重链可变区,其包括SEQ ID NO:49中所列的氨基酸序列;和

(b) 轻链可变区,其包括SEQ ID NO:51中所列的氨基酸序列。

30. 一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

(a) 免疫球蛋白重链,其包括与SEQ ID NO:55中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列,和

(b) 免疫球蛋白轻链,其包括与SEQ ID NO:57中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

31. 一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

(a) 免疫球蛋白重链,其包括SEQ ID NO:55中所列的氨基酸序列,和

(b) 免疫球蛋白轻链,其包括SEQ ID NO:57中所列的氨基酸序列。

32. 根据权利要求1-31中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段为IgG、IgM、IgE、IgA或IgD分子,或源自这些中的一种。

33. 根据权利要求1-32中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段选自全长抗体、Fab、单链可变片段(scFv)、sc(Fv)₂、dsFv、Fab、Fab'、(Fab')₂和双抗体。

34. 根据权利要求1-33中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体为全长抗体。

35. 根据权利要求1-34中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体为犬抗体或犬源化抗体。

36. 根据权利要求1-35中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体为犬抗体。

37. 根据权利要求1-33中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗原结合片段为scFv。

38. 根据权利要求1-37中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段与cPD-1的特异性结合破坏了cPD-1与cPD-1的配体(犬程序性死亡配体1)的相互作用。

39. 一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的犬抗体或其抗原结合片段。

40. 一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的犬抗体或其抗原结合片段,其包括根据权利要求1-36中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

41. 根据权利要求39或40所述的犬抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段与cPD-1的特异性结合破坏了cPD-1与cPD-1的配体(例如,犬程序性死亡配体1)的相互作用。

42. 一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的单链可变片段(scFv),其包括:

(a) 重链可变区,其包括重链互补决定区1 (HCDR1)、HCDR2和HCDR3,其中HCDR1包括选自SEQ ID NO:1、27和43的氨基酸序列,HCDR2包括选自SEQ ID NO:2、28和44的氨基酸序列,和HCDR3包括选自SEQ ID NO:3、29和45的氨基酸序列;和

(b) 轻链可变区,其包括轻链互补决定区1 (LCDR1)、LCDR2和LCDR3,其中LCDR1包括选自SEQ ID NO:4、30和46的氨基酸序列,LCDR2包括选自SEQ ID NO:5、31和47的氨基酸序列,和LCDR3包括选自SEQ ID NO:6、32和48的氨基酸序列,

其中所述重链可变区和所述轻链可变区由接头连接。

43. 一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的单链可变片段 (scFv),其包括:

(a) 重链可变区,其包括SEQ ID NO:7、9、33或49中所列的氨基酸序列;和

(b) 轻链可变区,其包括SEQ ID NO:11、35或51中所列的氨基酸序列,

其中所述重链可变区和所述轻链可变区由接头连接。

44. 一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的单链可变片段 (scFv),其包括SEQ ID NO:13、15、17、37或53中所列的氨基酸序列。

45. 根据权利要求42-44中任一项所述的scFv,其中所述抗体或其抗原结合片段与cPD-1的特异性结合破坏了cPD-1与cPD-1的配体(犬程序性死亡配体1)的相互作用。

46. 一种双特异性分子,其包括与具有第二结合特异性的分子连接的根据权利要求1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求39-41中任一项所述的犬抗体或根据权利要求42-45中任一项所述的scFv。

47. 一种免疫缀合物,其包括与治疗剂连接的根据权利要求1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求39-41中任一项所述的犬抗体、或根据权利要求42-45中任一项所述的scFv、或根据权利要求46所述的双特异性分子。

48. 一种分离核酸,其编码根据权利要求1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求39-41中任一项所述的犬抗体或根据权利要求42-45中任一项所述的scFv。

49. 一种编码抗体或其抗原结合片段的分离核酸,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

(a) 重链可变区,其由包括与SEQ ID NO:8、10、34或50中所列的多核苷酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的多核苷酸序列的核酸编码;和

(b) 轻链可变区,其由包括与SEQ ID NO:12、36或52中所列的多核苷酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的多核苷酸序列的核酸编码。

50. 根据权利要求49所述的分离核酸,其中所述重链可变区由包括SEQ ID NO:8、10、34或50中所列的多核苷酸序列的核酸编码。

51. 根据权利要求49或50所述的分离核酸,其中所述轻链可变区由包括SEQ ID NO:12、36或52中所列的多核苷酸序列的核酸编码。

52. 一种编码抗体或其抗原结合片段的分离核酸,其包括:

(a) 重链可变区,其由包括SEQ ID NO:8中所列的多核苷酸序列的核酸序列编码;和

(b) 轻链可变区,其由包括SEQ ID NO:12中所列的多核苷酸序列的核酸序列编码。

53. 一种编码抗体或其抗原结合片段的分离核酸,其包括:

(a) 重链可变区,其由包括SEQ ID NO:10中所列的多核苷酸序列的核酸序列编码;和

(b) 轻链可变区,其由包括SEQ ID NO:12中所列的多核苷酸序列的核酸序列编码。

54. 一种编码抗体或其抗原结合片段的分离核酸,其包括:
- (a) 重链可变区,其由包括SEQ ID NO:34中所列的多核苷酸序列的核酸序列编码;和
 - (b) 轻链可变区,其由包括SEQ ID NO:36中所列的多核苷酸序列的核酸序列编码。
55. 一种编码抗体或其抗原结合片段的分离核酸,其包括:
- (a) 重链可变区,其由包括SEQ ID NO:50中所列的多核苷酸序列的核酸序列编码;和
 - (b) 轻链可变区,其由包括SEQ ID NO:52中所列的多核苷酸序列的核酸序列编码。
56. 根据权利要求49-55中任一项所述的分离核酸,其中所述抗体或其抗原结合片段为IgG、IgM、IgE、IgA或IgD分子,或源自这些中的一种。
57. 根据权利要求49-56中任一项所述的分离核酸,其中所述抗体或其抗原结合片段选自全长抗体、Fab、单链可变片段(scFv)、sc(Fv)₂、dsFv、Fab、Fab'、(Fab')₂和双抗体。
58. 根据权利要求49-57中任一项所述的分离核酸,其中所述抗体为全长抗体。
59. 根据权利要求49-58中任一项所述的分离核酸,其中所述抗体为犬抗体或犬源化抗体。
60. 根据权利要求49-59中任一项所述的分离核酸,其中所述抗体为犬抗体。
61. 一种编码单链可变片段(scFv)的分离核酸,其包括:
- (a) 重链可变区,其包括SEQ ID NO:8、10、34或50中所列的核苷酸序列;和
 - (b) 轻链可变区,其包括SEQ ID NO:12、36或52中所列的核苷酸序列,
- 其中所述重链可变区和所述轻链可变区由接头连接。
62. 一种编码单链可变片段(scFv)的分离核酸,其包括SEQ ID NO:14、16、18、38或54中所列的多核苷酸序列。
63. 根据权利要求49-62中任一项所述的分离核酸,其中所述抗体或其抗原结合片段或所述scFv与犬程序性死亡蛋白1(cPD-1)特异性结合。
64. 根据权利要求56所述的分离核酸,其中所述抗体或其抗原结合片段或所述scFv与cPD-1的特异性结合破坏了cPD-1与cPD-1的配体(例如,犬程序性死亡配体1)的相互作用。
65. 一种载体,其包括根据权利要求48-64中任一项所述的分离核酸。
66. 根据权利要求65所述的载体,其中所述载体是表达载体。
67. 根据权利要求65或66所述的载体,其中所述载体选自DNA载体、RNA载体、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体、腺伴随病毒载体和逆转录病毒载体。
68. 一种宿主细胞,其包括根据权利要求48-64中任一项所述的分离核酸或根据权利要求65-67中任一项所述的载体。
69. 根据权利要求68所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是真核或原核来源的。
70. 根据权利要求68或69所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是哺乳动物来源的。
71. 根据权利要求68或69所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是细菌来源的。
72. 根据权利要求68-70中任一项所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞为中国仓鼠卵巢细胞。
73. 一种药物组合物,其包括根据权利要求1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求39-41中任一项所述的犬抗体、或根据权利要求42-45中任一项所述的scFv、根据权利要求46所述的双特异性分子或根据权利要求47所述的免疫缀合物,以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

74. 根据权利要求73所述的药物组合物,其被配制用于静脉内施用。

75. 根据权利要求73所述的药物组合物,其被配制用于皮下施用。

76. 根据权利要求73所述的药物组合物,其被配制用于瘤内施用。

77. 一种试剂盒,其包括根据权利要求1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求39-41中任一项所述的犬抗体、或根据权利要求42-45中任一项所述的scFv、根据权利要求46所述的双特异性分子,根据权利要求47所述的免疫缀合物,或根据权利要求73所述的药物组合物,和使用说明书。

78. 一种在有需要的受试者中增加T细胞增殖和降低T细胞衰竭的方法,其包括向所述受试者施用根据权利要求1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求39-41中任一项所述的犬抗体或根据权利要求42-45中任一项所述的scFv、根据权利要求46所述的双特异性分子、或根据权利要求47所述的免疫缀合物、或根据权利要求73所述的药物组合物。

79. 一种在有需要的受试者中增加IFN γ 产生的方法,其包括向所述受试者施用根据权利要求1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求39-41中任一项所述的犬抗体、或根据权利要求42-45中任一项所述的scFv、根据权利要求46所述的双特异性分子、或根据权利要求47所述的免疫缀合物、或根据权利要求73所述的药物组合物。

80. 一种在有需要的受试者中抑制犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 信号传导途径的方法,其包括向所述受试者施用根据权利要求1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求39-41中任一项所述的犬抗体、或根据权利要求42-45中任一项所述的scFv、根据权利要求46所述的双特异性分子、或根据权利要求47所述的免疫缀合物或根据权利要求73所述的药物组合物。

81. 根据权利要求78-80中任一项所述的方法,其中所述受试者患有癌症、败血症或败血性休克、或慢性感染。

82. 一种在有需要的受试者中治疗疾病或病症的方法,其包括向所述受试者施用根据权利要求1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求39-41中任一项所述的犬抗体、或根据权利要求42-45中任一项所述的scFv、根据权利要求46所述的双特异性分子、或根据权利要求47所述的免疫缀合物、或根据权利要求73所述的药物组合物。

83. 根据权利要求82所述的方法,其中所述疾病或病症包括癌症、败血症或败血性休克、或慢性感染。

84. 根据权利要求78-83中任一项所述的方法,进一步包括施用一种或多种另外的疗法或干预。

85. 根据权利要求81、83或84中任一项所述的方法,其中所述癌症与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 信号传导途径相关。

86. 根据权利要求85所述的方法,其中用于cPD-1的配体(犬程序性死亡配体1)在所述受试者的癌细胞上表达。

87. 根据权利要求80-86中任一项所述的方法,其中cPD-1在所述受试者的免疫细胞上表达。

88. 根据权利要求87所述的方法,其中所述免疫细胞包括T细胞、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、调节性T细胞、巨噬细胞、树突状细胞(DC)或肿瘤浸润淋巴细胞。

89. 根据权利要求81-88中任一项所述的方法,其中所述癌症包括黑素瘤、前列腺癌、头颈癌、宫颈癌、甲状腺癌、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、白血病、淋巴瘤、肾上腺癌、AIDS相关癌症、肺泡软组织肉瘤、星状细胞瘤、骨癌、脑癌和脊髓癌、转移性脑瘤、颈动脉体瘤、软骨瘤、脊索瘤、嫌色细胞肾细胞癌、透明细胞癌、皮肤良性纤维组织细胞瘤、促结缔组织增生小圆细胞瘤、室管膜细胞瘤、尤文氏肿瘤、骨外粘液样软骨瘤、骨纤维发育不全、骨骼纤维发育不良、胆囊癌或胆管癌、妊娠性滋养层疾病、生殖细胞瘤、血液恶性肿瘤、肝细胞癌、胰岛细胞肿瘤、卡波西氏肉瘤、肾癌、脂肪瘤/良性脂肪瘤、脂肪肉瘤/恶性脂肪瘤、成神经管细胞瘤、脑膜瘤、默克尔细胞癌瘤、多发性内分泌瘤、多发性骨髓瘤、脊髓发育不良综合征、神经母细胞瘤、神经内分泌肿瘤、甲状腺乳头状癌、副甲状腺瘤、小儿癌症、周围神经鞘瘤、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、前列腺癌、后葡萄膜黑素瘤、罕见血液系统疾病、肾转移癌、横纹肌样瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、睾丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺转移癌、子宫癌或其任何组合。

90. 根据权利要求81-88中任一项所述的方法,其中所述癌症包括宫颈癌、肺癌、肝癌、卵巢癌、包括黑素瘤和鳞状细胞癌的皮肤病、结肠癌、膀胱癌、乳腺癌、肾癌、食管癌、胃癌、胰腺癌、头部癌和颈部癌。

91. 根据权利要求78-90中任一项所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段、所述犬抗体、所述scFv、所述双特异性分子或所述免疫缀合物与cPD-1特异性结合。

92. 根据权利要求91所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段、所述犬抗体、所述scFv、所述双特异性分子或所述免疫缀合物与cPD-1的结合破坏了cPD-1与cPD-1的配体(例如,犬程序性死亡配体1)的相互作用。

93. 根据权利要求78-92中任一项所述的方法,其中所述受试者是犬。

94. 一种制造根据权利要求73所述的药物组合物的方法,其包括将根据权利要求1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求39-41中任一项所述的犬抗体或根据权利要求42-45中任一项所述的scFv、根据权利要求46所述的双特异性分子、或根据权利要求47所述的免疫缀合物以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂混合。

95. 一种制造用于治疗癌症、败血症或败血性休克、或慢性感染的组合物的方法,其包括将根据权利要求1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求39-41中任一项所述的犬抗体、或根据权利要求42-45中任一项所述的scFv、根据权利要求46所述的双特异性分子、或根据权利要求47所述的免疫缀合物以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂混合。

96. 根据权利要求95所述的方法,其中所述癌症包括黑素瘤(例如,转移性恶性黑素瘤)、前列腺癌(例如,激素难治性前列腺腺癌)、头颈癌(例如,头颈部的鳞状细胞癌)、宫颈癌、甲状腺癌、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、白血病、淋巴瘤(例如,B细胞淋巴瘤)、肾上腺癌、AIDS相关癌症、肺泡软组织肉瘤、星状细胞瘤、骨癌、脑癌和脊髓癌、转移性脑瘤、颈动脉体瘤、软骨瘤、脊索瘤、嫌色细胞肾细胞癌、透明细胞癌、皮肤良性纤维组织细胞瘤、促结缔组织增生小圆细胞瘤、室管膜细胞瘤、尤文氏肿瘤、骨外粘液样软骨瘤、骨纤维发育不全、骨骼纤维发育不良、胆囊癌或胆管癌、妊娠性滋养层疾病、生殖细胞瘤、血液恶性肿瘤、肝细胞癌、胰岛细胞肿瘤、卡波西氏肉瘤、肾癌、脂肪瘤/良性脂肪瘤、脂肪肉瘤/恶性脂肪瘤、成神经管细胞瘤、脑膜瘤、默克尔细胞癌瘤、多发性内分泌瘤、多发性骨髓瘤、脊髓发育不良综合

征、神经母细胞瘤、神经内分泌肿瘤、甲状腺乳头状癌、副甲状腺瘤、小儿癌症、周围神经鞘瘤、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、前列腺癌、后葡萄膜黑素瘤、罕见血液系统疾病、肾转移癌、横纹肌样瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、睾丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺转移癌、子宫癌或其任何组合。

97. 根据权利要求95所述的方法, 其中所述癌症包括宫颈癌、肺癌、肝癌、卵巢癌、包括黑素瘤和鳞状细胞癌的皮肤癌、结肠癌、膀胱癌、乳腺癌、肾癌、食管癌、胃癌、胰腺癌、头部癌和颈部癌。

98. 根据权利要求1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求39-41中任一项所述的犬抗体、或根据权利要求42-45中任一项所述的scFv、根据权利要求46所述的双特异性分子、根据权利要求47所述的免疫缀合物或根据权利要求73所述的药物组合物, 其用作药物。

99. 根据权利要求1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求39-41中任一项所述的犬抗体、或根据权利要求42-45中任一项所述的scFv、根据权利要求46所述的双特异性分子、根据权利要求47所述的免疫缀合物、或根据权利要求73所述的药物组合物, 其用于用于治疗癌症、败血症或败血性休克、或慢性感染的药物。

100. 根据权利要求1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求39-41中任一项所述的犬抗体、或根据权利要求42-45中任一项所述的scFv、根据权利要求46所述的双特异性分子、根据权利要求47所述的免疫缀合物、或根据权利要求73所述的药物组合物用于制造药物的用途。

101. 根据权利要求1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求39-41中任一项所述的犬抗体、或根据权利要求42-45中任一项所述的scFv、根据权利要求46所述的双特异性分子、根据权利要求47所述的免疫缀合物、或根据权利要求73所述的药物组合物用于制造用于治疗癌症、败血症或败血性休克、或慢性感染的药物的用途。

102. 一种产生根据权利要求1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求39-41中任一项所述的犬抗体或根据权利要求42-45中任一项所述的scFv的方法, 所述方法包括培养根据权利要求68-72中任一项所述的宿主细胞。

103. 根据权利要求102所述的方法, 进一步包括在足以允许根据权利要求1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、根据权利要求39-41中任一项所述的犬抗体或根据权利要求42-45中任一项所述的scFv的表达和分泌的条件下, 在细胞培养基中温育根据权利要求68-72中任一项所述的宿主细胞。

全犬抗犬PD-1抗体及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 根据35 U.S.C.§119(e),本申请要求2021年12月10日提交的美国临时专利申请号63/288,284的优先权,此处将其通过引用以其整体并入本文。

背景技术

[0003] 免疫检查点抑制剂(ICI)培布利珠单抗(pembrolizumab)和纳武单抗(nivolumab)已经彻底改变了对不同癌症患者的治疗,包括黑素瘤、肾细胞癌和非小细胞肺癌。这类ICI疗法通过阻断负面调控细胞毒性T细胞的功能的受体来发挥作用。实际上,ICI起到阻断以其他方式抑制T细胞功能的信号传导途径的作用。免疫检查点受体通常在防止免疫反应产生毒性方面发挥关键作用,但许多癌症通常通过表达细胞毒性T细胞上表达的免疫检查点受体的配体,利用这些负面信号来削弱针对它们的T细胞免疫反应。

[0004] 具有免疫能力的狗会出现自发性肿瘤,表现出特征,比如染色体畸变、分子亚型、免疫特征、肿瘤异质性、转移行为和对化疗的反应。然而,由于目前在兽医领域缺乏全犬的、商业上可获得的抗犬PD-1(cPD-1)抗体,因此无法实现检查点抑制在治疗犬类癌症患者中的潜在临床益处。

[0005] 本领域需要开发针对免疫检查点分子的非免疫原性犬抗体,这种抗体可通过阻断肿瘤特异性T细胞上的PD-1来治疗犬受试者中的兽医癌症。

发明内容

[0006] 在一个方面中,本文公开了一种与犬程序性死亡蛋白1(cPD-1)特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包括:重链互补决定区1(HCDR1),其包括SEQ ID NO:1、27或43中所列的氨基酸序列,重链互补决定区2(HCDR2),其包括SEQ ID NO:2、28或44中所列的氨基酸序列,重链互补决定区3(HCDR3),其包括SEQ ID NO:3、29或45中所列的氨基酸序列,轻链互补决定区1(LCDR1),其包括SEQ ID NO:4、30或46中所列的氨基酸序列,轻链互补决定区2(LCDR2),其包括SEQ ID NO:5、31或47中所列的氨基酸序列,和轻链互补决定区3(LCDR3),其包括SEQ ID NO:6、32或48中所列的氨基酸序列。

[0007] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段包括:重链可变区,其包括与SEQ ID NO:7、9、33或49中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;和轻链可变区,其包括与SEQ ID NO:11、35或51中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0008] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段包括:免疫球蛋白重链,其包括与SEQ ID NO:19、21、23、39或55中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列,和免疫球蛋白轻链,其包括与SEQ ID NO:25、41或57中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0009] 在一个方面中,本文公开了一种与犬程序性死亡蛋白1(cPD-1)特异性结合的抗体

或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包括:重链可变区,其包括与SEQ ID NO:7、9、33或49中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;和轻链可变区,其包括与SEQ ID NO:11、35或51中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0010] 在一个方面中,本文公开了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包括:重链可变区,其包括SEQ ID NO:7、9、33或49中所列的氨基酸序列;和轻链可变区,其包括SEQ ID NO:11、35或51中所列的氨基酸序列。

[0011] 在一个方面中,本文公开了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包括:免疫球蛋白重链,其包括与SEQ ID NO:19、21、23、39或55中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列,和免疫球蛋白轻链,其包括与SEQ ID NO:25、41或57中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0012] 在一个方面中,本文公开了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包括:免疫球蛋白重链,其包括SEQ ID NO:19、21、23、39或55中所列的氨基酸序列,和免疫球蛋白轻链,其包括SEQ ID NO:25、41或57中所列的氨基酸序列。

[0013] 在一个方面中,本文公开了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包括:重链互补决定区1 (HCDR1),其包括SEQ ID NO:1中所列的氨基酸序列,重链互补决定区2 (HCDR2),其包括SEQ ID NO:2中所列的氨基酸序列,重链互补决定区3 (HCDR3),其包括SEQ ID NO:3中所列的氨基酸序列,轻链互补决定区1 (LCDR1),其包括SEQ ID NO:4中所列的氨基酸序列,轻链互补决定区2 (LCDR2),其包括SEQ ID NO:5中所列的氨基酸序列,和轻链互补决定区3 (LCDR3),其包括SEQ ID NO:6中所列的氨基酸序列。

[0014] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段包括:重链可变区,其包括与SEQ ID NO:7或9中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;和轻链可变区,其包括与SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0015] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段包括:免疫球蛋白重链,其包括与SEQ ID NO:19、21或23中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列,和免疫球蛋白轻链,其包括与SEQ ID NO:25中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0016] 在一个方面中,本文公开了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包括:重链可变区,其包括与SEQ ID NO:7或9中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;和轻链可变区,其包括与SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0017] 在一个方面中,本文公开了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体

或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包括:重链可变区,其包括SEQ ID NO:7中所列的氨基酸序列;和轻链可变区,其包括SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列。

[0018] 在一个方面中,本文公开了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包括:重链可变区,其包括SEQ ID NO:9中所列的氨基酸序列;和轻链可变区,其包括SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列。

[0019] 在一个方面中,本文公开了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包括:免疫球蛋白重链,其包括与SEQ ID NO:19、21或23中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列,和免疫球蛋白轻链,其包括与SEQ ID NO:25中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0020] 在一个方面中,本文公开了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包括:免疫球蛋白重链,其包括SEQ ID NO:19中所列的氨基酸序列,和免疫球蛋白轻链,其包括SEQ ID NO:25中所列的氨基酸序列。

[0021] 在一个方面中,本文公开了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包括:免疫球蛋白重链,其包括SEQ ID NO:21中所列的氨基酸序列,和免疫球蛋白轻链,其包括SEQ ID NO:25中所列的氨基酸序列。

[0022] 在一个方面中,本文公开了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包括:免疫球蛋白重链,其包括SEQ ID NO:23中所列的氨基酸序列,和免疫球蛋白轻链,其包括SEQ ID NO:25中所列的氨基酸序列。

[0023] 在一个方面中,本文公开了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包括:重链互补决定区1 (HCDR1),其包括SEQ ID NO:27中所列的氨基酸序列,重链互补决定区2 (HCDR2),其包括SEQ ID NO:28中所列的氨基酸序列,重链互补决定区3 (HCDR3),其包括SEQ ID NO:29中所列的氨基酸序列,轻链互补决定区1 (LCDR1),其包括SEQ ID NO:30中所列的氨基酸序列,轻链互补决定区2 (LCDR2),其包括SEQ ID NO:31中所列的氨基酸序列,和轻链互补决定区3 (LCDR3),其包括SEQ ID NO:32中所列的氨基酸序列。

[0024] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段包括:重链可变区,其包括与SEQ ID NO:33中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;和轻链可变区,其包括与SEQ ID NO:35中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0025] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段包括:免疫球蛋白重链,其包括与SEQ ID NO:39中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列,和免疫球蛋白轻链,其包括与SEQ ID NO:41中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0026] 在一个方面中,本文公开了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包括:重链可变区,其包括与SEQ ID NO:33中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;和轻链可变区,其包括与SEQ ID NO:35中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0027] 在一个方面中,本文公开了一种与犬程序性死亡蛋白1(cPD-1)特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包括:重链可变区,其包括SEQ ID NO:33中所列的氨基酸序列;和轻链可变区,其包括SEQ ID NO:35中所列的氨基酸序列。

[0028] 在一个方面中,本文公开了一种与犬程序性死亡蛋白1(cPD-1)特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包括:免疫球蛋白重链,其包括与SEQ ID NO:39中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列,和免疫球蛋白轻链,其包括与SEQ ID NO:41中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0029] 在一个方面中,本文公开了一种与犬程序性死亡蛋白1(cPD-1)特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包括:免疫球蛋白重链,其包括SEQ ID NO:39中所列的氨基酸序列,和免疫球蛋白轻链,其包括SEQ ID NO:41中所列的氨基酸序列。

[0030] 在一个方面中,本文公开了一种与犬程序性死亡蛋白1(cPD-1)特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包括:重链互补决定区1(HCDR1),其包括SEQ ID NO:43中所列的氨基酸序列,重链互补决定区2(HCDR2),其包括SEQ ID NO:44中所列的氨基酸序列,重链互补决定区3(HCDR3),其包括SEQ ID NO:45中所列的氨基酸序列,轻链互补决定区1(LCDR1),其包括SEQ ID NO:46中所列的氨基酸序列,轻链互补决定区2(LCDR2),其包括SEQ ID NO:47中所列的氨基酸序列,和轻链互补决定区3(LCDR3),其包括SEQ ID NO:48中所列的氨基酸序列。

[0031] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段包括:重链可变区,其包括与SEQ ID NO:49中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;和轻链可变区,其包括与SEQ ID NO:51中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0032] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段包括:免疫球蛋白重链,其包括与SEQ ID NO:55中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列,和免疫球蛋白轻链,其包括与SEQ ID NO:57中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0033] 在一个方面中,本文公开了一种与犬程序性死亡蛋白1(cPD-1)特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包括:重链可变区,其包括与SEQ ID NO:49中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;和轻链可变区,其包括与SEQ ID NO:51中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0034] 在一个方面中,本文公开了一种与犬程序性死亡蛋白1(cPD-1)特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包括:重链可变区,其包括SEQ ID NO:49中所列的氨基酸序列;和轻链可变区,其包括SEQ ID NO:51中所列的氨基酸序列。

[0035] 在一个方面中,本文公开了一种与犬程序性死亡蛋白1(cPD-1)特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包括:免疫球蛋白重链,其包括与SEQ ID NO:55中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列,和免疫球蛋白轻链,其包括与SEQ ID NO:57中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0036] 在一个方面中,本文公开了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中抗体或其抗原结合片段包括:免疫球蛋白重链,其包括SEQ ID NO: 55中所列的氨基酸序列,和免疫球蛋白轻链,其包括SEQ ID NO:57中所列的氨基酸序列。

[0037] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段为IgG、IgM、IgE、IgA或IgD分子,或源自这些中的一种。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段选自全长抗体、Fab、单链可变片段(scFv)、sc(Fv)2、dsFv、Fab、Fab'、(Fab')2和双抗体。在一些实施方式中,抗体为全长抗体。在一些实施方式中,抗体为犬或犬源化抗体。在一些实施方式中,抗体为犬抗体。在一些实施方式中,抗原结合片段为scFv。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段与cPD-1的特异性结合破坏了cPD-1与cPD-1的配体(例如,犬程序性死亡配体1)的相互作用。

[0038] 在一个方面中,本文公开了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的犬抗体或其抗原结合片段。

[0039] 在一个方面中,本文公开了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的犬抗体或其抗原结合片段,其包括本文所描述的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段与cPD-1的特异性结合破坏了cPD-1与cPD-1的配体(例如,犬程序性死亡配体1)的相互作用。

[0040] 在一个方面中,本文公开了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的单链可变片段(scFv),其包括:重链可变区,其包括重链互补决定区1(HCDR1)、HCDR2和HCDR3,其中HCDR1包括选自SEQ ID NO:1、27和43的氨基酸序列,HCDR2包括选自SEQ ID NO:2、28和44的氨基酸序列,和HCDR3包括选自SEQ ID NO:3、29和45的氨基酸序列;和轻链可变区,其包括轻链互补决定区1(LCDR1)、LCDR2和LCDR3,其中LCDR1包括选自SEQ ID NO:4、30和46的氨基酸序列,LCDR2包括选自SEQ ID NO:5、31和47的氨基酸序列,和LCDR3包括选自SEQ ID NO:6、32和48的氨基酸序列,其中重链可变区和轻链可变区由接头连接。

[0041] 在一个方面中,本文公开了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的单链可变片段(scFv),其包括:重链可变区,其包括SEQ ID NO:7、9、33或49中所列的氨基酸序列;和轻链可变区,其包括SEQ ID NO:11、35或51中所列的氨基酸序列,其中重链可变区和轻链可变区由接头连接。

[0042] 在一个方面中,本文公开了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的单链可变片段(scFv),其包括SEQ ID NO:13、15、17、37或53中所列的氨基酸序列。

[0043] 在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段与cPD-1的特异性结合破坏了cPD-1与cPD-1的配体(例如,犬程序性死亡配体1)的相互作用。

[0044] 在一个方面中,本文公开了一种双特异性分子,其包括与具有第二结合特异性的分子连接的本文所描述的抗体或其抗原结合片段、本文所描述的犬抗体或本文所描述的scFv。

[0045] 在一个方面中,本文公开了一种免疫缀合物,其包括与治疗剂连接的本文所描述的抗体或其抗原结合片段、本文所描述的犬抗体或本文所描述的scFv、或本文所描述的双特异性分子。

[0046] 在一个方面中,本文公开了一种分离核酸,其编码本文所描述的抗体或其抗原结合片段、本文所描述的犬抗体或本文所描述的scFv。

[0047] 在一个方面中,本文公开了一种编码抗体或其抗原结合片段的分离核酸,其中抗

体或其抗原结合片段包括：重链可变区，其由包括与SEQ ID NO:8、10、34或50中所列的多核苷酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的多核苷酸序列的核酸编码；和轻链可变区，其由包括与SEQ ID NO:12、36或52中所列的多核苷酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的多核苷酸序列的核酸编码；

[0048] 在一些实施方式中，重链可变区由包括SEQ ID NO:8、10、34或50中所列的多核苷酸序列的核酸编码。在一些实施方式中，轻链可变区由包括SEQ ID NO:12、36或52中所列的多核苷酸序列的核酸编码。

[0049] 在一个方面中，本文公开了一种编码抗体或其抗原结合片段的分离核酸，其包括：重链可变区，其由包括SEQ ID NO:8中所列的多核苷酸序列的核酸序列编码；和轻链可变区，其由包括SEQ ID NO:12中所列的多核苷酸序列的核酸序列编码。

[0050] 在一个方面中，本文公开了一种编码抗体或其抗原结合片段的分离核酸，其包括：重链可变区，其由包括SEQ ID NO:10中所列的多核苷酸序列的核酸序列编码；和轻链可变区，其由包括SEQ ID NO:12中所列的多核苷酸序列的核酸序列编码。

[0051] 在一个方面中，本文公开了一种编码抗体或其抗原结合片段的分离核酸，其包括：重链可变区，其由包括SEQ ID NO:34中所列的多核苷酸序列的核酸序列编码；和轻链可变区，其由包括SEQ ID NO:36中所列的多核苷酸序列的核酸序列编码。

[0052] 在一个方面中，本文公开了一种编码抗体或其抗原结合片段的分离核酸，其包括：重链可变区，其由包括SEQ ID NO:50中所列的多核苷酸序列的核酸序列编码；和轻链可变区，其由包括SEQ ID NO:52中所列的多核苷酸序列的核酸序列编码。

[0053] 在一些实施方式中，抗体或其抗原结合片段为IgG、IgM、IgE、IgA或IgD分子，或源自这些中的一种。在一些实施方式中，抗体或其抗原结合片段选自全长抗体、Fab、单链可变片段(scFv)、sc(Fv)₂、dsFv、Fab、Fab'、(Fab')₂和双抗体。在一些实施方式中，抗体为全长抗体。在一些实施方式中，抗体为犬或犬源化抗体。在一些实施方式中，抗体为犬抗体。

[0054] 在一个方面中，本文公开了一种编码单链可变片段(scFv)的分离核酸，其包括：重链可变区，其包括SEQ ID NO:8、10、34或50中所列的核苷酸序列；和轻链可变区，其包括SEQ ID NO:12、36或52中所列的核苷酸序列，其中重链可变区和轻链可变区由接头连接。

[0055] 在一个方面中，本文公开了一种编码单链可变片段(scFv)的分离核酸，其包括SEQ ID NO:14、16、18、38或54中所列的多核苷酸序列。

[0056] 在一些实施方式中，抗体或其抗原结合片段或scFv与犬程序性死亡蛋白1(cPD-1)特异性结合。在一些实施方式中，抗体或其抗原结合片段或scFv与cPD-1的特异性结合破坏了cPD-1与cPD-1的配体(例如，犬程序性死亡配体1)的相互作用。

[0057] 在一个方面中，本文公开了一种载体，其包括本文所描述的分离核酸。在一些实施方式中，载体是表达载体。在一些实施方式中，载体选自DNA载体、RNA载体、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体、腺伴随病毒载体和逆转录病毒载体。

[0058] 在一个方面中，本文公开了一种宿主细胞，其包括本文所描述的分离核酸或本文所描述的载体。在一些实施方式中，宿主细胞是真核或原核来源的。在一些实施方式中，宿主细胞是哺乳动物来源的。在一些实施方式中，宿主细胞是细菌来源的。在一些实施方式中，宿主细胞为中国仓鼠卵巢细胞。

[0059] 在一个方面中,本文公开了一种药物组合物,该药物组合物包括本文所描述的抗体或其抗原结合片段、本文所描述的犬抗体或本文所描述的scFv、本文所描述的双特异性分子或本文所描述的免疫缀合物,以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。在一些实施方式中,药物组合物被配制用于静脉内施用。在一些实施方式中,药物组合物被配制用于皮下施用。在一些实施方式中,药物组合物被配制用于瘤内施用。

[0060] 在一个方面中,本文公开了一种试剂盒,其包括本文所描述的抗体或其抗原结合片段、本文所描述的犬抗体或本文所描述的scFv、本文所描述的双特异性分子、本文所描述的免疫缀合物或本文所描述的药物组合物,和使用说明书。

[0061] 在一个方面中,本文公开了一种在有需要的受试者中增加T细胞增殖和降低T细胞衰竭的方法,其包括向受试者施用本文所描述的抗体或其抗原结合片段、本文所描述的犬抗体或本文所描述的scFv、本文所描述的双特异性分子、本文所描述的免疫缀合物或本文所描述的药物组合物。

[0062] 在一个方面中,本文公开了一种在有需要的受试者中增加IFN γ 产生的方法,其包括向受试者施用本文所描述的抗体或其抗原结合片段、本文所描述的犬抗体或本文所描述的scFv、本文所描述的双特异性分子、本文所描述的免疫缀合物或本文所描述的药物组合物。

[0063] 在一个方面中,本文公开了一种在有需要的受试者中抑制犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 信号传导途径的方法,其包括向受试者施用本文所描述的抗体或其抗原结合片段、本文所描述的犬抗体或本文所描述的scFv、本文所描述的双特异性分子、本文所描述的免疫缀合物或本文所描述的药物组合物。

[0064] 在一些实施方式中,受试者患有癌症、败血症或败血性休克、或慢性感染(例如,病毒感染)。

[0065] 在一个方面中,本文公开了一种在有需要的受试者中治疗疾病或病症的方法,其包括施用本文所描述的抗体或其抗原结合片段、本文所描述的犬抗体或本文所描述的scFv、本文所描述的双特异性分子、本文所描述的免疫缀合物或本文所描述的药物组合物。在一些实施方式中,疾病或病症包括癌症、败血症或败血性休克、或慢性感染(例如,病毒感染)。在一些实施方式中,该方法进一步包括施用一种或多种另外的疗法(例如,化疗)或干预。

[0066] 在一些实施方式中,癌症与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 信号传导途径相关。在一些实施方式中,用于cPD-1的配体(例如,犬程序性死亡配体1)在受试者的癌细胞上表达。在一些实施方式中,cPD-1在受试者的免疫细胞上表达。在一些实施方式中,免疫细胞包括T细胞(例如,激活的T细胞)、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、调节性T细胞、巨噬细胞或树突状细胞(DC)。在一些情况下,免疫细胞包括激活的T细胞。在一些情况下,免疫细胞包括肿瘤浸润淋巴细胞。在一些实施方式中,癌症包括黑素瘤(例如,转移性恶性黑素瘤)、前列腺癌(例如,激素难治性前列腺腺癌)、头颈癌(例如,头颈部的鳞状细胞癌)、宫颈癌、甲状腺癌、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、白血病、淋巴瘤(例如,B细胞淋巴瘤)、肾上腺癌、AIDS相关癌症、肺泡软组织肉瘤、星状细胞瘤、骨癌、脑癌和脊髓癌、转移性脑瘤、颈动脉体瘤、软骨瘤、脊索瘤、嫌色细胞肾细胞癌、透明细胞癌、皮肤良性纤维组织细胞瘤、促结缔组织增生小圆细胞瘤、室管膜细胞瘤、尤文氏肿瘤、骨外粘液样软骨瘤、骨纤维发育不全、骨骼纤维发育不良、胆囊

癌或胆管癌、妊娠性滋养层疾病、生殖细胞瘤、血液恶性肿瘤、肝细胞癌、胰岛细胞肿瘤、卡波西氏肉瘤、肾癌、脂肪瘤/良性脂肪瘤、脂肪肉瘤/恶性脂肪瘤、成神经管细胞瘤、脑膜瘤、默克尔细胞癌瘤、多发性内分泌瘤、多发性骨髓瘤、脊髓发育不良综合征、神经母细胞瘤、神经内分泌肿瘤、甲状腺乳头状癌、副甲状腺瘤、小儿癌症、周围神经鞘瘤、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、前列腺癌、后葡萄膜黑素瘤、罕见血液系统疾病、肾转移癌、横纹肌样瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、睾丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺转移癌、子宫癌或其任何组合。在一些实施方式中，癌症包括宫颈癌、肺癌、肝癌、卵巢癌、包括黑素瘤和鳞状细胞癌的皮肤癌、结肠癌、膀胱癌、乳腺癌、肾癌、食管癌、胃癌、胰腺癌、头部癌和颈部癌。

[0067] 在一些实施方式中，抗体或其抗原结合片段、犬抗体、scFv、双特异性分子或免疫缀合物与cPD-1特异性结合。在一些实施方式中，抗体或其抗原结合片段、犬抗体、scFv、双特异性分子或免疫缀合物与cPD-1的结合破坏了cPD-1与cPD-1的配体(例如，犬程序性死亡配体1)的相互作用。在一些实施方式中，受试者是犬。

[0068] 在一个方面中，本文公开了一种制造本文所描述的藥物組合物的方法，其包括將本文所描述的抗体或其抗原结合片段、本文所描述的犬抗体或本文所描述的scFv、本文所描述的双特异性分子或本文所描述的免疫缀合物以及药學上可接受的賦形劑、载体或稀释剂混合。

[0069] 在一个方面中，本文公开了一种制造用于治疗癌症、败血症或败血性休克、或慢性感染(例如，病毒感染)的組合物的方法，其包括將本文所描述的抗体或其抗原结合片段、本文所描述的犬抗体或本文所描述的scFv、本文所描述的双特异性分子或本文所描述的免疫缀合物以及药學上可接受的賦形劑、载体或稀释剂混合。在一些实施方式中，癌症包括黑素瘤(例如，转移性恶性黑素瘤)、前列腺癌(例如，激素难治性前列腺腺癌)、头颈癌(例如，头颈部的鳞状细胞癌)、宫颈癌、甲状腺癌、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、白血病、淋巴瘤(例如，B细胞淋巴瘤)、肾上腺癌、AIDS相关癌症、肺泡软组织肉瘤、星状细胞瘤、骨癌、脑癌和脊髓癌、转移性脑瘤、颈动脉体瘤、软骨瘤、脊索瘤、嫌色细胞肾细胞癌、透明细胞癌、皮肤良性纤维组织细胞瘤、促结缔组织增生小圆细胞瘤、室管膜细胞瘤、尤文氏肿瘤、骨外粘液样软骨瘤、骨纤维发育不全、骨骼纤维发育不良、胆囊癌或胆管癌、妊娠性滋养层疾病、生殖细胞瘤、血液恶性肿瘤、肝细胞癌、胰岛细胞肿瘤、卡波西氏肉瘤、肾癌、脂肪瘤/良性脂肪瘤、脂肪肉瘤/恶性脂肪瘤、成神经管细胞瘤、脑膜瘤、默克尔细胞癌瘤、多发性内分泌瘤、多发性骨髓瘤、脊髓发育不良综合征、神经母细胞瘤、神经内分泌肿瘤、甲状腺乳头状癌、副甲状腺瘤、小儿癌症、周围神经鞘瘤、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、前列腺癌、后葡萄膜黑素瘤、罕见血液系统疾病、肾转移癌、横纹肌样瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、睾丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺转移癌、子宫癌或其任何组合。在一些实施方式中，癌症包括宫颈癌、肺癌、肝癌、卵巢癌、包括黑素瘤和鳞状细胞癌的皮肤癌、结肠癌、膀胱癌、乳腺癌、肾癌、食管癌、胃癌、胰腺癌、头部癌和颈部癌。

[0070] 在一个方面中，本文公开了本文所描述的抗体或其抗原结合片段、本文所描述的犬抗体或本文所描述的scFv、本文所描述的双特异性分子或本文所描述的免疫缀合物或本文所描述的藥物組合物，其用作藥物。

[0071] 在一个方面中，本文公开了本文所描述的抗体或其抗原结合片段、本文所描述的

犬抗体或本文所描述的scFv、本文所描述的双特异性分子或本文所描述的免疫缀合物,或本文所描述的药物组合物,其用于治疗癌症、败血症或败血性休克、或慢性感染(例如,病毒感染)的药物。

[0072] 在一个方面中,本文公开了本文所描述的抗体或其抗原结合片段、本文所描述的犬抗体或本文所描述的scFv、本文所描述的双特异性分子或本文所描述的免疫缀合物或本文所描述的药物组合物用于制造药物的用途。

[0073] 在一个方面中,本文公开了本文所描述的抗体或其抗原结合片段、本文所描述的犬抗体或本文所描述的scFv、本文所描述的双特异性分子或本文所描述的免疫缀合物,或本文所描述的药物组合物用于制造用于治疗癌症、败血症或败血性休克、或慢性感染(例如,病毒感染)的药物的用途。

[0074] 在一个方面中,本文公开了一种产生本文所描述的抗体或其抗原结合片段、本文所描述的犬抗体或本文所描述的scFv、本文所描述的双特异性分子的方法,包括培养本文所描述的宿主细胞。在一些实施方式中,该方法进一步包括在足以允许本文所描述的抗体或其抗原结合片段、本文所描述的犬抗体或本文所描述的scFv的表达和分泌的条件下,在细胞培养基中温育本文所描述的宿主细胞。

[0075] 通过引用并入

[0076] 本说明书中提及的所有出版物、专利和专利申请均通过引用并入本文,这与每篇单独的出版物、专利或专利申请具体地且单独地指出通过引用被并入的程度相同。

附图说明

[0077] 当结合附图阅读时,将更好地理解本公开内容的优选实施方式的以下详细描述。出于图解本公开内容的目的,在附图中显示了目前优选的实施方式。然而,应当理解,本公开内容不限于附图中所示实施方式的精确布置和手段。

[0078] 图1图解了在针对犬PD-1抗原淘选(panning)后犬scFv噬菌体展示文库的富集。将重组犬PD-1吸附到微孔板上,在4°C下过夜。冲洗各孔并在37°C下用2%牛奶的PBS溶液(MPBS)阻断1小时。将最初未淘选的库(P0)和每轮选择后获得的噬菌体库(P1至P4)加入涂布板中,并在37°C下温育1小时。用补充有0.1% Tween的PBS(PBST)冲洗平板,并使用MPBS中HRP缀合的抗M13 mAb的1:5000稀释液检测结合的噬菌体。用ABTS底物检测结合的抗M13 mAb。30分钟后使用Molecular Devices SpectraMax 340分光光度计在405nm处读取OD值。

[0079] 图2A-2B图解了从第三轮和第四轮淘选中随机选择的表达scFv的噬菌体克隆与犬PD-1的结合。来自针对cPD-1的第四轮淘选的多克隆噬菌体在孔涂有cPD-1的情况下作为阳性对照,并且在孔涂有人(h)CD19的情况下作为阴性对照(图2A)。在一项无关的研究中来自针对hCD19的第三轮淘选的多克隆噬菌体在孔涂有hCD19的情况下被用作阳性对照,并且在孔涂有cPD-1的情况下被用作阴性对照(图2A)。在图2B中,在一项无关研究中针对犬(c)IL13Ra2的第四轮淘选的多克隆噬菌体以及涂有cPD-1和cIL13Ra2的孔被分别地类似地用作阴性对照和阳性对照。

[0080] 图3通过ELISA图解了独特的可溶性scFv克隆与cPD-1结合的能力。通过ELISA测试了19种独特的可溶性scFv与cPD-1的结合。在涂布链霉亲和素(SA)的ELISA板上捕获了增加量的生物素化的犬PD-1。在孔中加入0.25μg/ml可溶性血凝素(HA)标记的scFv,并使用AP缀

合的抗-HA抗体检测结合的scFv。将来自不同项目的针对MERS (中东呼吸综合征) 抗原的无关的可溶性HA标记的scFv用作阴性对照。

[0081] 图4图解了PD-1:PD-L1抑制试验。ELISA板上涂有链霉亲和素。将可溶性生物素化的犬PD-1与增加浓度的犬PD-L1-Fc单独温育,或在有选定的可溶性抗PD-1scFv或针对MERS的不相关可溶性scFv的存在下温育。将预温育的混合物加入ELISA板中,并使用抗Fc-AP缀合物检测PD-L1与PD-1的结合。带方框和编号的克隆抑制了PD-1:PD-L1的相互作用。

[0082] 图5图解了可溶性犬抗PD-1scFv与细胞表面表达的PD-1的结合。对支架人红细胞白血病细胞系K562进行了基因编辑,以消除Fc γ RII (CD32) (KT δ 32)。对编辑过的细胞进行逆转录病毒转导以表达cPD-1,并在嘌呤霉素中筛选出PD-1阳性靶细胞。将可溶性的、纯化的、HA标记的scFv与靶细胞温育,并使用抗-HA抗体检测结合的scFv。将ELISA显示与cPD-1低亲和力结合的抗MERS和克隆3-7的可溶性scFv用作阴性对照。

[0083] 图6图解了通过流式细胞术评估了全犬抗PD-1IgG4与细胞表面表达的PD-1的结合。对KT δ 32细胞进行了逆转录病毒转导以表达cPD-1,并使用嘌呤霉素筛选靶标阳性细胞。用针对犬PD-1的全犬IgG4-HA标记的克隆或无关的MERS抗体对KT δ 32和KT δ 32.cPD-1染色。使用抗-HA抗体检测结合的IgG4分子。

[0084] 图7图解了P3C6抗体突变体与cPD-1的结合。基于功能分析和细胞表面结合,筛选出P3C6用于进一步开发和测试。为了提高P3C6的产量/可开发性,在框架区域引入了突变。生产出了全长IgG,并通过ELISA测试了突变体与可溶性cPD-1结合的能力。来自母本P3C6克隆的P3C6mut3.1和P3C6mut3.2分别有4个和5个氨基酸置换,突变序列之间只有一个氨基酸差异。P4B1和P4-14被用作阳性对照。

[0085] 图8图解了P3C6抗体突变体与cPD-1的结合。对KT δ 32细胞进行逆转录病毒转导以表达cPD-1,并使用嘌呤霉素选择靶标阳性细胞。用两种P3C6突变体 (mut3.1和mut3.2) 或P4B1标记细胞,以确认与细胞表面表达的PD-1的结合。使用抗-HA抗体检测结合的抗体。无关的抗MERS抗体用作阴性对照。图中针对活的7AAD-细胞进行设门 (gate)。

[0086] 图9A-9B显示了由293T细胞瞬时转染的P3C6抗体突变体的产量。

[0087] 图10图解了P3C6突变抗体增强犬T细胞的增殖能力。用cell trace violet (CTV) 标记犬PBMC,并在P4B1、P3C6 (mut3.1和mut3.2) 全长IgG或无关的MERS对照抗体的存在下用2.5 μ g/ml伴刀豆球蛋白A刺激。将细胞用抗CD5抗体标记,并在96小时通过流式细胞术分析。图中针对活的CD5+细胞进行设门。显示了一条狗的数据。与MERS抗体相比,当在抗PD-1IgG存在下刺激时细胞显示出增殖能力的增强和预测的倍数扩增。

[0088] 图11图解了P3C6 IgG4突变体促进有丝分裂原激活的犬T细胞的IFN- γ 产生。在P4B1、P3C6 (mut3.1和mut3.2) IgG4或无关的MERS抗体的存在下,用2.5mg/ml伴刀豆球蛋白A刺激犬PBMC。在96小时后收集上清液,并通过ELISA测定IFN- γ 的存在。图中显示了两条狗的数据。与抗MERS抗体和第二种抗PD-1克隆 (P4B1) 相比,P3C6突变体二者均显示IFN- γ 产量增加。

[0089] 图12图解了克隆A6与细胞表面cPD-1的结合。用两个P3C6突变体 (mut3.1和mut3.2) 或重新格式化为IgG4的克隆A6标记KT δ 32和KT δ 32.cPD-1细胞,以确认与细胞表面表达的cPD-1的结合。使用抗-HA抗体检测结合的抗体。针对无关的MERS病毒抗原的抗体被用作阴性对照。图中针对活的7AAD-细胞进行设门。在指示的地方,克隆与可溶性cPD-1预温

育以阻断抗原结合位点。预阻断导致克隆A6的结合消失以及克隆P3C6 mut 3.1和3.2的细胞表面标记的减少。

具体实施方式

[0090] 犬抗体噬菌体展示文库可用于鉴定与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗原特异性单链可变片段 (scFv) 融合蛋白。然后, 这些犬PD-1特异性scFv可以转化为包括犬源恒定区的全长抗体, 使其适合在犬受试者体内使用。与小鼠抗体、嵌合抗体或犬源化抗体相比, 全犬抗体具有的在犬受试者体内诱发免疫反应的风险更低。在一些情况下, 全犬抗PD-1可以是非免疫原性的, 并且在治疗犬类癌症患者时有效抑制检查点。将这种全犬抗犬PD-1抗体疗法并入兽医器械 (veterinary arsenal) 可改善患有恶性肿瘤的宠物狗的治疗效果。

[0091] 此外, 本公开内容可揭示人类免疫肿瘤学中的问题。将全犬抗PD-1用于具有与人类相应肿瘤具有相似特征的自发性肿瘤的免疫能力强的犬类癌症患者可为人类临床试验设计提供有参考价值的结果。全犬抗PD-1的开发为人类免疫肿瘤学的转化研究提供了重要的比较工具, 并使某些正在评估的联合疗法包括检查点抑制。

[0092] 本公开内容提供了与犬程序性死亡蛋白1 (PD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段, 其包括: (a) 重链互补决定区1 (HCDR1), 其包括SEQ ID NO:1、27或43中所列的氨基酸序列, (b) 重链互补决定区2 (HCDR2), 其包括SEQ ID NO:2、28或44中所列的氨基酸序列, (c) 重链互补决定区3 (HCDR3), 其包括SEQ ID NO:3、29或45中所列的氨基酸序列, (d) 轻链互补决定区1 (LCDR1), 其包括SEQ ID NO:4、30或46中所列的氨基酸序列, (e) 轻链互补决定区2 (LCDR2), 其包括SEQ ID NO:5、31或47中所列的氨基酸序列, 和 (f) 轻链互补决定区3 (LCDR3), 其包括SEQ ID NO:6、32或48中所列的氨基酸序列。

[0093] 在一些方面中, 本文公开了一种与犬程序性死亡蛋白1 (PD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段, 其包括: (a) 重链可变区, 其包括与SEQ ID NO:7、9、33或49中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列; 和 (b) 轻链可变区, 其包括与SEQ ID NO:11、35或51中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0094] 在一些方面中, 本文公开了一种与犬程序性死亡蛋白1 (PD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段, 其包括: (a) 免疫球蛋白重链, 其包括与SEQ ID NO:19、21、23、39或55中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列, 和 (b) 免疫球蛋白轻链, 其包括与SEQ ID NO:25、41或57中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0095] 在一些方面中, 本文中提供了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的犬抗体或其抗原结合片段。

[0096] 在一些方面中, 本文中提供了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的单链可变片段 (scFv), 其包括: (a) 重链可变区, 其包括重链互补决定区1 (HCDR1)、HCDR2和HCDR3, 其中HCDR1包括选自SEQ ID NO:1、27和43的氨基酸序列, HCDR2包括选自SEQ ID NO:2、28和44的氨基酸序列, 和HCDR3包括选自SEQ ID NO:3、29和45的氨基酸序列; 和 (b) 轻链可变区, 其包括轻链互补决定区1 (LCDR1)、LCDR2和LCDR3, 其中LCDR1包括选自SEQ ID NO:

4、30和46的氨基酸序列,LCDR2包括选自SEQ ID NO:5、31和47的氨基酸序列,和LCDR3包括选自SEQ ID NO:6、32和48的氨基酸序列,其中重链可变区和轻链可变区由接头连接。

[0097] 在一些方面中,本文中提供了一种单链可变片段(scFv),其包括:(a)重链可变区,其包括SEQ ID NO:7、9、33或49中所列的氨基酸序列;和(b)轻链可变区,其包括SEQ ID NO:11、35或51中所列的氨基酸序列,其中重链可变区和轻链可变区由接头连接。

[0098] 在一些方面中,本文中提供了一种与犬程序性死亡蛋白1(cPD-1)特异性结合的单链可变片段(scFv),其包括SEQ ID NO:13、15、17、37或53中所列的氨基酸序列。

[0099] 还提供了本文所描述的双特异性分子、免疫缀合物、核酸、载体、宿主细胞、试剂盒、对犬PD-1具有特异性的抗体和抗原结合片段的组合物或scFv,以及生产和使用其治疗受试者(例如,犬受试者)中的癌症的方法。

[0100] 定义

[0101] 在详细描述中,阐释了某些具体细节以提供对各种实施方式的透彻理解。然而,本领域的技术人员将理解,所提供的实施方式可以在没有这些细节的情况下实施。除非上下文另有所指,否则在整篇说明书和权利要求书中,词语“包括(comprise)”及其变型,比如“包括(comprises)”和“包括(comprising)”应理解为开放、包容的含义,即“包括但不限于(including, but not limited to)”。除非内容另有明确规定,否则如本说明书和所附权利要求书中使用的,单数形式“一(a)”、“一(an)”和“所述(the)”包括复数指代。还应注意的是,除非内容另有明确规定,否则术语“或(or)”通常是指包括“和/或(and/or)”的含义。此外,本文提供的标题仅为方便起见,并不解释所要求保护的实施方式的范围或含义。

[0102] 冠词“一(a)”和“一(an)”在本文中用于指该冠词的语法对象中的一个或多个(即,至少一个)。举例来说,“一个元件”是指一个元件或多于一个元件。

[0103] 如本文所使用的,术语“约(about)”是指接近所述量的10%或更少的量。如本文所使用的,术语“个体(individual)”、“患者(patient)”或“受试者(subject)”是指被诊断患有、怀疑患有或处于罹患所描述的组合物和方法可用于治疗的至少一种疾病的风险中的个体。在某些实施方式中,个体是哺乳动物。在某些实施方式中,哺乳动物是小鼠、大鼠、兔子、狗、猫、马、牛、绵羊、猪、山羊、美洲驼、羊驼或牦牛。在某些实施方式中,个体是狗或犬。

[0104] 如本文所使用的,术语“抗体(antibody)”是指与抗原特异性结合的免疫球蛋白分子。抗体可以是源自天然来源或重组来源的完整免疫球蛋白,并且可以是完整免疫球蛋白的免疫活性部分。抗体通常是包括两条重链和两条轻链多肽的免疫球蛋白分子的四聚体。每条多肽链包含与抗原结合并限定抗体的抗原特异性的三个互补决定区(CDR)。

[0105] 如本文所使用的,术语“抗体(antibody)”和“抗体(antibodies)”还可包括从全长抗体衍生的多肽或多肽复合物。这些多肽复合物可以是天然存在的,或者可以由单链抗体或抗体片段构建,并保持抗原特异性结合能力。本公开内容的抗体可以以多种形式存在,包括例如多克隆抗体、单克隆抗体、Fv、Fab和F(ab')₂,以及单链抗体、scFv、犬源化抗体、犬抗体、人源化抗体和人抗体(Harlow等人,1999,In:Using Antibodies:ALaboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY; Harlow等人1989, In:Antibodies:ALaboratory Manual, Cold Spring Harbor, New York; Houston等人,1988, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883; Bird等人,1988, Science 242:423-426)。为了制备合适的抗体,例如,重组抗体、单克隆抗体或多克隆抗体,可以使用本领域已知的许多技

术(参见,例如Kohler&Milstein,Nature 256:495-497(1975);Kozbor等人Immunology Today 4:72(1983);Cole等人,pp.77-96in Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Alan R.Liss,Inc.(1985);Coligan,Current Protocols in Immunology(1991);Harlow&Lane,Antibodies,A Laboratory Manual(1988);和Goding,Monoclonal Antibodies:Principles and Practice(第2版,1986))。可以从细胞中克隆出编码感兴趣的抗体的重链和轻链的基因,例如,可以从杂交瘤中克隆出编码单克隆抗体的基因,并用于生产重组单克隆抗体。编码单克隆抗体的重链和轻链的基因库也可以从杂交瘤或浆细胞中制成。重链和轻链基因产物的随机组合产生大量具有不同抗原特异性的抗体(参见,例如Kuby,Immunology(第3版,1997))。生产单链抗体或重组抗体的技术(美国专利号:4,946,778、4,816,567)可用于生产本公开内容的抗体。此外,转基因小鼠或其他生物,比如其他哺乳动物,可用于表达人源化抗体或人抗体以及犬源化抗体或犬抗体(参见,例如,美国专利号5,545,807;5,545,806;5,569,825;5,625,126;5,633,425;5,661,016,Marks等人,Bio/Technology 10:779-783(1992);Lonberg等人,Nature 368:856-859(1994);Morrison,Nature 368:812-13(1994);Fishwild等人,Nature Biotechnology 14:845-51(1996);Neuberger,Nature Biotechnology 14:826(1996);and Lonberg&Huszar,Intern.Rev.Immunol.13:65-93(1995))。可选地,噬菌体展示技术也可用于鉴定特异性结合选定抗原的抗体和异源Fab片段(参见,例如McCafferty等人,Nature 348:552-554(1990);Marks等人,Biotechnology 10:779-783(1992))。抗体也可被制成双特异性,即,能够识别两种不同的抗原(参见,例如WO 93/08829,Traunecker等人,EMBO J.10:3655-3659(1991);和Suresh等人,Methods in Enzymology 121:210(1986))。抗体也可以是异源缀合物,例如,两种共价连接的抗体或免疫毒素(参见,例如美国专利号4,676,980,WO 91/00360;WO 92/200373;和EP 03089)。

[0106] 在本文中,分子、肽、多肽、抗体或抗体片段可称为是“双特异性的(bispecific)”或“双特异性的(dual-specific)”,包括语法等同物。双特异性分子具有与至少两个结构不同的靶标特异性结合的能力。该特异性结合可以是下述的结果:在分子水平结构不同的两个不同的结合部分,包括但不限于不同的非同一氨基酸序列;或者是能够以高亲和力(例如,小于约 1×10^{-6} 的KD)与两个结构不同的靶标特异性结合的单个结合部分。被称为“多特异性(multi-specific)”的分子、肽、多肽、抗体或抗体片段是指具有与至少三个结构不同的靶标特异性结合能力的分子。包括语法等同物的“双特异性抗体(bispecific antibody)”是指这样的双特异性分子,它保留了至少一个能够与靶标,例如来自抗体分子的可变区、重链或轻链、或一个或多个互补决定区特异性结合的抗体片段。包括语法等同物的“多特异性抗体(multi-specific antibody)”是指这样的多特异性分子,它保留了至少一个能够与靶标,例如来自抗体分子的可变区、重链或轻链、或互补决定区特异性结合的抗体片段。

[0107] 本文中的“接头(linker)”也称为“接头序列(linker sequence)”、“间隔区(spacer)”、“系链序列(tethering sequence)”或其语法等同物。本文所提及的“接头”连接两个不同的分子,这两个分子本身具有靶标结合力、催化活性,或自然表达并组装成独立的多肽,或包括同一多肽的单独结构域。例如,两个不同的结合部分或一对重链/轻链。可以使用多种策略将分子共价连接在一起。本文所描述的接头可用于连接scFv分子中的轻链可变区和重链可变区;或用于将scFv或其他抗原结合片段系在抗体重链的N-或C-末端;或轻链

的N-或C-末端以创建双特异性或多特异性结合分子。这些包括但不限于蛋白质或蛋白质结构域的N端和C端之间的多肽连接、经由二硫键的连接以及通过化学交联试剂的连接。在本实施方式的一个方面中,接头是通过重组技术或肽合成产生的肽键。接头肽可主要包括以下氨基酸残基:Gly、Ser、Ala或Thr。接头肽应具有足以连接两个分子的长度,使得其相对于彼此具有正确的构象,从而保持所需的活性。在一个实施方式中,接头的长度为约1至50个氨基酸,或为约1至30个氨基酸。在一个实施方式中,可以使用长度为1至20个氨基酸的接头。有用的接头包括甘氨酸-丝氨酸聚合物(包括例如(GS)_n、(GSGGS)_n(SEQ ID NO:65)、(GGGGS)_n(SEQ ID NO:67)和(GGGGS)_n(SEQ ID NO:66),其中n为至少1的整数)、甘氨酸-丙氨酸聚合物、丙氨酸-丝氨酸聚合物和其它柔性接头。用于连接抗体片段或单链可变片段的示例性接头可包括AAEPKSS(SEQ ID NO:78)、AAEPKSSDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:79)、GGGG(SEQ ID NO:80)或GGGGDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:81)。可选地,各种非蛋白聚合物,包括但不限于聚乙二醇(PEG)、聚丙二醇、聚氧化烯(polyoxyalkylene)或聚乙二醇和聚丙二醇的共聚物,也可用作接头。

[0108] 术语“互补决定区(complementarity determining region)”和“CDR”与“超变异区(hypervariable region)”或“HVR”同义,在本领域已知用于指抗体可变区内非连续的氨基酸序列,这些氨基酸序列赋予抗原特异性和/或结合亲和力。一般来说,在每个重链可变区中有三个CDR(CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3),并且在每个轻链可变区中有三个CDR(CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3)。“框架区(Framework region)”和“FR”在本领域已知用于指重链和轻链可变区中的非CDR部分。一般来说,在每个全长重链可变区中有四个FR(FR-H1、FR-H2、FR-H3和FR-H4),并且在每个全长轻链可变区中有四个FR(FR-L1、FR-L2、FR-L3和FR-L4)。给定CDR或FR的精确氨基酸序列边界可使用大量众所周知的方法中的任一种轻松确定,包括在下述文献中描述的那些:Kabat等人,(1991),“Sequences of Proteins of Immunological Interest”,第5版,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(“Kabat”编号方案),Al-Lazikani等人,(1997)JMB 273,927-948(“Chothia”编号方案);MacCallum等人,J.Mol.Biol.262:732-745(1996),“Antibody-antigen interactions: Contact analysis and binding site topography”,J.Mol.Biol.262,732-745.”(“Contact”编号方案);Lefranc MP等人,“IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains”,Dev Comp Immunol,2003Jan;27(1):55-77(“IMGT”编号方案);Honegger A和Plückthun A,“Yet another numbering scheme for immunoglobulin variable domains:an automatic modeling and analysis tool”,J Mol Biol,2001Jun 8;309(3):657-70,(“Aho”编号方案);以及Whitelegg NR和Rees AR,“WAM:an improved algorithm for modelling antibodies on the WEB”,Protein Eng.2000Dec;13(12):819-24(“AbM”编号方案)。在某些实施方式中,本文所描述的抗体的CDR可通过选自Kabat、Chothia、IMGT、Aho、AbM或其组合的方法定义。

[0109] 给定CDR或FR的边界会随着用于识别的方案变化。例如,Kabat方案基于结构排列,而Chothia方案基于结构信息。Kabat和Chothia方案二者的编号都是基于最常见的抗体区域序列长度,插入处用插入字母表示,例如“30a”,并且缺失出现在一些抗体中。这两种方案将某些插入和缺失(“插缺(indel)”)放在不同的位置,导致不同的编号。Contact方案基于

对复杂晶体结构的分析,并且在许多方面与Chothia编号方案相似。在某些实施方式中,本文所描述的抗体的CDR可通过IMGT方法定义。

[0110] 术语“可变区(variable region)”或“可变结构域(variable domain)”是指参与抗体与抗原结合的抗体重链或轻链的结构域。原生抗体的重链和轻链(分别为 V_H 和 V_L)的可变结构域通常具有相似的结构,每个结构域包括四个保守的框架区(FR)和三个CDR(参见,例如Kindt等人,Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman和合作者,第91页(2007))。单个 V_H 或 V_L 结构域足以赋予抗原结合特异性。此外,分别地,可以使用 V_H 或 V_L 结构域从结合抗原的抗体分离结合具体抗原的抗体以筛选出互补的 V_L 或 V_H 结构域库(参见,例如Portolano等人,J.Immunol.150:880-887(1993);Clarkson等人,Nature 352:624-628(1991))。

[0111] 本文所描述的抗体分子的特异性结合或结合是指由抗体的一个或多个CDR部分介导的结合。特异性结合不一定需要所有的CDR。特异性结合可通过例如针对特定所述靶标或抗原的ELISA证明,与同种型对照抗体相比,该特定所述靶标或抗原显示出明显的结合增加。

[0112] “表位(epitope)”是指抗体或其片段与靶抗原特异性结合最低需要的本文所描述的抗体或抗体片段的结合决定簇。当靶抗原是多肽时,表位将是连续的或不连续的表位。连续表位由靶抗原的一个区域形成,而不连续表位可由两个或多个独立区域形成。例如,当靶抗原采用将两个氨基酸序列结合在一起并形成由抗体结合的三维结构的三级结构时,就会形成不连续表位。当靶抗原是多肽时,表位通常是连接成多肽链的多个氨基酸。连续的表位可包括5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个连续的氨基酸。虽然表位可包括连续的氨基酸聚合物,但并非聚合物中的每个氨基酸都能通过抗体的氨基酸残基接触。这种非接触氨基酸仍将构成表位的一部分,因为它们对接触氨基酸的结构和连接可能很重要。技术人员可以通过例如与参考抗体的交叉阻断实验来确定任何给定抗体是否与参考抗体的表位结合。在某些实施方式中,本文描述了与所描述的抗体结合相同表位的抗体。在某些实施方式中,本文描述了可被所描述的抗体竞争性阻断的抗体。在某些实施方式中,本文描述了与所描述的抗体竞争性结合的抗体。

[0113] 术语“抗体片段(antibody fragment)”是指包括完整抗体的一部分或由其一部分衍生的多肽,并且包括完整抗体的抗原结合决定可变区。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、 $F(ab')_2$ 和Fv片段、线性抗体、scFv抗体、单结构域抗体比如骆驼科动物抗体(Riechmann,1999,Journal of Immunological Methods 231:25-38)(由展现对靶标的足够亲和力的VL或VH结构域组成)以及由抗体片段形成的多特异性抗体。抗体片段可以通过各种技术制成,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及通过重组宿主细胞产生。在一些实施方式中,抗体是重组产生的片段,比如包括非天然存在的排列的片段,比如具有通过合成接头(例如,多肽接头)连接的两个或更多个抗体区或抗体链的片段,和/或不是通过酶消化天然存在的完整抗体产生的片段。在一些方面中,抗体片段是scFv。

[0114] Fab或Fab片段包含轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(CH1)。Fab'或Fab'片段与Fab片段的区别在于重链CH1结构域的羧基末端增加了几个残基,包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'片段是通过裂解 $F(ab')_2$ 胃蛋白酶消化产物的铰链半胱氨酸处的二硫键产生的。本领域普通技术人员知晓抗体片段的另外的化学偶联。Fab和 $F(ab')_2$ 片段缺少完整抗体的片段可结晶(Fc)区,更快地从动物的血液循环中清除,并且与

完整抗体相比,非特异性组织结合力更低。“Fv”片段是抗体中包含完整靶标识别和结合位点的最小片段。该区域由紧密的、非共价缔合的一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域的二聚体(VH-VL二聚体)组成。其构型为这样的:每个可变结构域的三个CDR相互作用,以在VHVL二聚体表面限定靶标结合位点。在一些情况下,六个CDR赋予抗体与靶标结合的特异性。然而,在一些情况下,即使是单个可变结构域(或仅包括三个靶标特异性CDR的Fv的一半)也具有识别和结合靶标的能力。单结构域抗体(sdAb)/单链片段由对抗原展现足够的亲和力的单个VH或VL结构域组成。抗体片段还包括犬抗体或犬源化抗体或犬抗体或犬源化抗体的一部分。scFv(单链Fv)是指包括抗体的VH和VL结构域的抗体结合片段,其中这些结构域存在于单个多肽链中。一般来说,scFv多肽进一步包括VH和VL结构域之间的多肽接头,它能使scFv形成有利于靶标结合的结构。

[0115] 术语“双抗体(diabody)”是指通过在VH和VL结构域之间构建带有短接头(约5-10个残基)的scFv片段制备的小的抗体片段,使得实现可变结构域的链间配对而非链内配对,产生二价片段,即,具有两个抗原结合位点的片段。双特异性双抗体是两个“交叉(crossover)”scFv片段的异二聚体,其中两种抗体的VH和VL结构域存在于不同的多肽链上。

[0116] 术语“线性抗体(linear antibody)”通常是指包括一对串联的Fd片段(VH-CH1-VH-CH1)的抗体,Fd片段与互补的轻链多肽一起形成一对抗原结合区。线性抗体可以是双特异性的或单特异性的。

[0117] 如本文所使用的,“抗体重链(antibody heavy chain)”是指所有抗体分子中以其天然存在构象存在的两条多肽链中较大的一条。

[0118] 本文中使用的“抗体轻链(antibody light chain)”是指所有抗体分子中以其天然存在构象存在的两条多肽链中较小的一条。 κ 和 λ 轻链是指两种主要的抗体轻链同种型。

[0119] 如本文所使用的,术语“合成抗体(synthetic antibody)”是指使用重组DNA技术生成的抗体,诸如例如本文所述的由噬菌体表达的抗体。该术语也应理解为通过合成编码抗体的DNA分子而产生的抗体,并且该DNA分子表达抗体蛋白或指定抗体的氨基酸序列,其中DNA或氨基酸序列是使用本领域可用的并且众所周知的合成DNA或氨基酸序列技术获得的。

[0120] 本文所使用的术语“抗原”或“Ag”定义为引起免疫应答的分子。这种免疫应答可涉及抗体的产生,或特定免疫学上的感受态细胞的激活,或两者。技术人员将理解,任何大分子,包括基本上所有的蛋白质或肽都可以用作抗原。此外,抗原可以源自重组DNA或基因组DNA。因此,技术人员将理解,包括编码引发免疫应答的蛋白质的核苷酸序列或部分核苷酸序列的任何DNA均编码本文所使用的术语“抗原”。此外,本领域技术人员将理解抗原不必仅由基因的全长核苷酸序列编码。容易显而易见的是,本公开内容包括但不限于使用一个以上基因的部分核苷酸序列,并且这些核苷酸序列以各种组合排列以引发期望的免疫应答。此外,技术人员将理解,抗原根本不需要由“基因”编码。容易显而易见的是,抗原可以合成产生或可以源自生物样品。这样的生物样品可以包括但不限于组织样品、肿瘤样品、细胞或生物流体。

[0121] 如本文所使用的,术语“抗肿瘤作用(anti-tumor effect)”是指表现为肿瘤体积缩小、肿瘤细胞数量减少、转移灶数量减少、预期寿命延长或与癌症病症相关的各种生理症

状得到改善的生物效应。“抗肿瘤作用”还可以表现为本公开内容的肽、多核苷酸、细胞和抗体预防肿瘤在初始位置出现的能力。

[0122] 如本文所使用的,术语“自体的 (autologous)”是指源自相同个体的任何材料,随后将其重新引入该个体中。

[0123] “同种异体的 (allogeneic)”是指源自相同物种的不同动物的移植物。

[0124] “异种异体的 (xenogeneic)”是指源自不同物种的动物的移植物。

[0125] 如本文所使用的,术语“癌症 (cancer)”是指以异常细胞的快速且不受控制的生长为特征的疾病。癌细胞可以在局部扩散,或通过血液和淋巴系统扩散到身体的其他部位。各种癌症的实例包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结肠直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、淋巴瘤、白血病、肺癌等。在某些实施方式中,癌症是甲状腺髓样癌。

[0126] 如本文所使用的,术语“保守序列修饰 (conservative sequence modification)”是指不显著影响或改变含有该氨基酸序列的抗体的结合特性的氨基酸修饰。这样的保守修饰包括氨基酸取代、添加和缺失。可以通过本领域已知的标准技术将修饰引入本公开内容的抗体中,比如定点诱变和PCR介导的诱变。保守氨基酸取代是其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基取代的氨基酸取代。已在本领域中定义了具有相似侧链的氨基酸残基家族。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸 (例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、具有酸性侧链的氨基酸 (例如,天冬氨酸、谷氨酸)、具有不带电荷的极性侧链 (例如,甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸)、具有非极性侧链的氨基酸 (例如,丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸)、具有 β -支链侧链的氨基酸 (例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸) 和具有芳族侧链的氨基酸 (例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,本公开内容的抗体的CDR区内的一个或多个氨基酸残基可以用相同侧链家族的其他氨基酸残基取代,并且可以使用本文描述的功能测定法测试改变后的抗体结合GFR α 4的能力。

[0127] 如本文所使用的,“共刺激配体”包括由抗原呈递细胞 (例如,aAPC、树突细胞、B细胞等) 表达的分子,该分子特异性结合T细胞上的关联共刺激分子,从而除了通过例如TCR/CD3复合物与载有肽的MHC分子结合提供的主要信号外,还提供介导T细胞应答包括但不限于增殖、激活、分化等的信号。共刺激配体可包括但不限于CD7、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、诱导型共刺激配体 (ICOS-L)、细胞间粘附分子 (ICAM)、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、淋巴毒素 β 受体、3/ TR6、ILT3、ILT4、HVEM、结合Toll配体受体的激动剂或抗体以及与B7-H3特异性结合的配体。共刺激配体还包括与T细胞上存在的共刺激分子特异性结合的抗体等,比如,但不限于CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40L、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3和与CD83特异性结合的配体。

[0128] “共刺激分子 (co-stimulatory molecule)”是指由T细胞表达的细胞表面分子,该T细胞与由抗原呈递细胞 (APC) 表达的共刺激配体特异性结合,从而提供“次级信号 (secondary signal)”,该信号与通过MHC/HLA-抗原与T细胞受体 (TCR) 相互作用传递的“初级信号 (primary signal)”相结合,导致最佳的T细胞活化,包括但不限于细胞因子的产生和增殖。共刺激分子包括但不限于CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40L、PD-1、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3和与CD83特异性结合的配体。

[0129] 当在PD-1或其配体(PD-L1和PD-L2)的表达水平或活性的上下文中使用时,术语“失调(dysregulated)”是指与在其它相同的健康动物、生物体、组织、细胞或其组成部分中的PD-1或其配体的表达水平或活性不同的表达水平或活性。术语“失调”也指与在其它相同的健康动物、生物体、组织、细胞或其组成部分中的调节相比,PD-1、PD-L1的表达水平和活性的改变的调节。

[0130] “编码”是指多核苷酸中的特定核苷酸序列比如基因、cDNA或mRNA在生物过程中用于合成其他聚合物和大分子的模板的固有特性,该聚合物或大分子具有定义的核苷酸序列(即,rRNA、tRNA和mRNA)或定义的氨基酸序列,以及由此产生的生物学特性。因此,如果对应于该基因的mRNA的转录和翻译在细胞或其他生物系统中产生蛋白质,则该基因编码该蛋白质。编码链和非编码链二者都可以称为编码该基因或cDNA的蛋白质或其他产物,编码链的核苷酸序列与mRNA序列相同并且通常在序列表中提供,非编码链用作基因或cDNA转录的模板。

[0131] 除非另有说明,否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括彼此为简并形式并且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。编码蛋白质和RNA的核苷酸序列可包括内含子。

[0132] “有效量”或“治疗有效量”在本文中可互换使用,并且是指如本文所描述的有效的实现特定生物学结果的化合物、制剂、材料或组合物的量。这样的结果可包括但不限于通过本领域任何合适的方式确定的病毒感染的抑制。

[0133] 如本文所使用的,“内源的(endogenous)”是指来自生物体、细胞、组织或系统内部或在生物体、细胞、组织或系统内部产生的任何材料。

[0134] 如本文所使用的,术语“外源的(exogenous)”是指从生物体、细胞、组织或系统引入或在生物体、细胞、组织或系统外部产生的任何材料。

[0135] 如本文所使用的,术语“表达”定义为由其启动子驱动的特定核苷酸序列的转录和/或翻译。

[0136] “表达载体”是指包括重组多核苷酸的载体,该重组多核苷酸包括可操作地连接至待表达的核苷酸序列的表达控制序列。表达载体包括足够的用于表达的顺式作用元件;用于表达的其他元件可以由宿主细胞供应或在体外表达系统中供应。表达载体包括本领域已知的所有载体,比如粘粒、质粒(例如,裸露或包含在脂质体中)和病毒(例如,慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺伴随病毒),其并入重组多核苷酸。

[0137] 如本文所使用的,“同源的”是指两个聚合物分子之间,例如两个核酸分子,比如两个DNA分子或两个RNA分子之间,或两个多肽分子之间的亚基序列同一性。当两个分子中两个亚基的位置都被相同的单体亚基占据时;例如,如果两个DNA分子中每个分子的位置被腺嘌呤占据,那么它们在该位置是同源的。两个序列之间的同源性是匹配数目或同源位置数目的直接函数;例如,如果两个序列中一半的位置(例如,长度为十个亚基的聚合物中的五个位置)是同源的,则两个序列是50%同源的;如果90%的位置(例如10个中的9个)是匹配的或同源的,则两个序列是90%同源的。

[0138] “人源化(humanized)”或“犬源化(caninized)”和“嵌合(chimeric)”形式的非人或非犬(例如,小鼠)抗体是免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(比如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗体的其他抗原结合子序列),它们含有源自非人或非犬免疫球蛋白的最小序列。在大多数情况下,人源化、犬源化和嵌合抗体是人或犬免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的

抗体互补决定区 (CDR) 的残基被具有期望的特异性、亲和力和能力的来自非人或非犬物种 (比如小鼠、大鼠或兔子) 的 CDR 的残基 (供体抗体) 取代。在一些情况下, 人或犬免疫球蛋白的 Fv 框架区 (FR) 残基被相应的非人或非犬残基取代。此外, 人源化抗体、犬源化抗体和嵌合抗体还可包括既不存在于受体抗体中也不存在于输入的 CDR 或框架序列中的残基。这些修饰是为了进一步完善和优化抗体的性能。一般来说, 人源化、犬源化和嵌合抗体将包括至少一个 (并且通常是两个) 可变结构域的基本上全部, 其中所有或基本所有的 CDR 区都与非人免疫球蛋白的可变结构域相对应, 并且所有或基本所有的 FR 区都是人或犬免疫球蛋白序列的可变结构域。犬源化抗体和嵌合抗体还将最佳地包括免疫球蛋白恒定区 (Fc), 通常是犬免疫球蛋白恒定区的至少一部分。

[0139] “全犬 (fully canine)” 或 “犬抗体 (canine antibody)” 是指这样的免疫球蛋白, 比如抗体, 其氨基酸序列与犬或犬细胞或利用犬抗体库或包括犬抗体文库的其他犬抗体编码序列的非犬来源产生的抗体的氨基酸序列相对应。该术语不包括包含非犬抗原结合区的非犬抗体的犬源化形式, 比如全部或基本上全部 CDR 都是非犬的那些。在一些情况下, 全犬抗体不包括来自非犬物种的部分抗体序列。犬抗体可通过向转基因动物施用免疫原来制备, 该转基因动物已被修饰成能在抗原攻击下产生完整的犬抗体或带有犬可变区的完整抗体。这种动物通常含有全部或部分犬免疫球蛋白基因座, 该基因座取代了内源性免疫球蛋白基因座或以染色体外方式存在或随机整合到动物的染色体中。在这种转基因动物中, 内源性免疫球蛋白基因座通常已失活。犬抗体也可以源自包括噬菌体展示文库和无细胞文库的犬抗体文库, 其包含来自犬基因库的抗体编码序列。

[0140] 如本文所使用的, “说明材料” 包括出版物、记录、图表或可用于传达本公开内容的组合物和方法的有用性的任何其他表达介质。本公开内容的试剂盒的说明材料可以例如贴附在装有本公开内容的核酸、肽和/或组合物的容器上, 或者与含有核酸、肽和/或组合物的容器一起运输。可替代地, 说明材料可与容器分开地运输, 以使说明材料和化合物由受体协同使用。

[0141] 如本文所使用的 “同一性 (identity)” 是指相对于参照多肽序列的序列同一性百分比 (%), 其为在对序列进行比对并在必要时引入间隙以达到最大序列同一性百分比之后, 候选序列中与参照多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比, 并且不将任何保守取代作为序列同一性的一部分。为确定氨基酸序列同一性百分比而进行的比对可以通过各种已知的方法实现, 例如, 使用可公开获得的计算机软件, 比如 BLAST、BLAST-2、ALIGN 或 Megalign (DNASTAR) 软件。能够确定序列比对的适当参数, 包括在比对序列全长范围内实现最大比对所需的算法。然而, 出于本文的目的, 使用 ALIGN-2 序列比对计算机程序生成氨基酸序列同一性百分比值。ALIGN-2 序列比对计算机程序由 Genentech, Inc. 编写, 并且源代码已与用户文档一起提交给美国 Copyright Office, Washington D.C., 20559, 其中以美国版权注册号 TXU510087 注册。ALIGN-2 程序可从加利福尼亚州南旧金山的 Genentech, Inc. 公开获得, 或从源代码编译。ALIGN-2 程序应在 UNIX 操作系统 (包括数字 UNIX V4.0D) 上编译使用。所有序列比对参数都由 ALIGN-2 程序设定, 并且不会改变。

[0142] 在使用 ALIGN-2 进行氨基酸序列比对的情况下, 给定氨基酸序列 A 与给定氨基酸序列 B 或针对给定氨基酸序列 B 的氨基酸序列同一性百分比 (其可以可选地表述为与给定氨基酸序列 B 或针对氨基酸序列 B 具有或包括一定氨基酸序列同一性百分比的给定氨基酸序列

A) 计算如下: X/Y分数的100倍, 其中, X是在A和B的程序比对中通过序列比对程序ALIGN-2得到为相同匹配的氨基酸残基的数量, 并且其中Y是B中的氨基酸残基的总数。将认识到, 在氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度的情况下, A与B的氨基酸序列同一性百分比将不等于B与A的氨基酸序列同一性百分比。除非另有特别说明, 否则本文中使用的所有氨基酸序列同一性百分比值都是使用ALIGN-2计算机程序按紧接的前一段所述的方法获得的。

[0143] “分离的(isolated)”是指从天然状态改变或去除。例如, 没有“分离”天然存在于活体动物中的核酸或肽, 而是“分离”与天然状态的共存材料部分或完全分开的相同核酸或肽。分离的核酸或蛋白质可以以基本上纯化的形式存在, 或者可以存在于非天然环境, 诸如例如宿主细胞中。

[0144] 在本公开内容的上下文中, 对于常见的核酸碱基使用以下缩写。“A”是指腺苷, “C”是指胞嘧啶, “G”是指鸟苷, “T”是指胸苷, “U”是尿苷。

[0145] 除非另有说明, 否则“编码氨基酸序列的核苷酸序列”包括彼此为简并形式并且编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。短语编码蛋白质或RNA的核苷酸序列还可包括内含子, 大意是说(to the extent that), 一些形式的编码蛋白质的核苷酸序列可包含内含子(一个或多个)。

[0146] 术语“可操作地连接”是指调控序列和异源核酸序列之间的功能性连接, 导致后者表达。例如, 当第一核酸序列与第二核酸序列处于功能关系时, 第一核酸序列与第二核酸序列可操作地连接。例如, 如果启动子影响编码序列的转录或表达, 则将启动子与编码序列可操作地连接。通常, 可操作地连接的DNA序列是连续的, 并且在需要连接两个蛋白质编码区的地方处于同一阅读框中。

[0147] 免疫原性组合物的“肠胃外”施用包括例如皮下(s.c.)、静脉内(i.v.)、肌肉内(i.m.)或胸骨内注射或输注技术。

[0148] 如本文所使用的, 术语“多核苷酸(polynucleotide)”定义为核苷酸链。此外, 核酸是核苷酸的聚合物。因此, 本文所使用的核酸和多核苷酸是可互换的。本领域技术人员具有核酸是可被水解成单体“核苷酸”的多核苷酸的常识。单体核苷酸可以被水解成核苷。如本文所使用的, 多核苷酸包括但不限于通过本领域可用的任何手段获得的所有核酸序列, 包括但不限于重组手段, 即, 使用普通克隆技术和PCRTM等, 并通过合成手段从重组文库或细胞基因组克隆核酸序列。

[0149] 如本文所使用的, 术语“肽”、“多肽”和“蛋白质”可互换使用, 并且是指由通过肽键共价连接的氨基酸残基组成的化合物。蛋白质或肽必须包含至少两个氨基酸, 并且对构成蛋白质或肽序列的氨基酸的最大数量没有限制。多肽包括包含通过肽键相互连接的两个或更多个氨基酸的任何肽或蛋白质。如本文使用的, 该术语是指短链和长链, 短链在本领域中通常也称为例如肽、寡肽和寡聚体, 长链在本领域中通常称为蛋白质, 其具有很多类型。“多肽”包括例如生物活性片段、基本上同源的多肽、寡肽、同源二聚体、异源二聚体、多肽变体、修饰的多肽、衍生物、类似物、融合蛋白等。多肽包括天然肽、重组肽、合成肽或其组合。

[0150] 如本文所使用的, 术语“启动子”被定义为启动多核苷酸序列的特异性转录所需的细胞的合成机制或引入的合成机制识别的DNA序列。

[0151] 如本文所使用的, 术语“启动子/调控序列”是指可操作地连接至启动子/调控序列的基因产物的表达所需的核酸序列。在一些情况下, 该序列可以是核心启动子序列, 而在其

他情况下,该序列还可以包括基因产物的表达所需的增强子序列和其他调控元件。启动子/调控序列可以是例如以组织特异性方式表达基因产物的启动子/调控序列。

[0152] “组成型(constitutive)”启动子是这样的核苷酸序列,当其与编码或指定基因产物的多核苷酸可操作地连接时,在细胞的大多数或全部生理条件下引起该基因产物在细胞中产生。

[0153] “诱导型(inducible)”启动子是这样的核苷酸序列,当其与编码或指定基因产物的多核苷酸可操作地连接时,基本上仅当对应于该启动子的诱导物存在于细胞中时,才引起该基因产物在细胞中产生。

[0154] “组织特异性”启动子是这样的核苷酸序列,当其与编码或指定基因的多核苷酸可操作地连接时,仅当该细胞是对应于该启动子的组织类型的细胞时,才引起该基因产物在细胞中产生。

[0155] “信号转导途径”是指在信号从细胞的一部分传输到细胞的另一部分中起作用的多种信号转导分子之间的生化关系。短语“细胞表面受体”包括能够接收信号并跨细胞质膜传输信号的分子和分子的复合物。“细胞表面受体”的实例是人GFR α 4。

[0156] “单链抗体(single chain antibody)”是指通过重组DNA技术形成的抗体,其中免疫球蛋白重链和轻链片段使用工程化的氨基酸跨度彼此连接以使抗体的Fv区再现为单个多肽。产生单链抗体的各种方法是已知的,包括美国专利号4,694,778;Bird(1988) Science242:423-442;Huston等人,(1988) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883;Ward等人,(1989) Nature 334:54454;Skerra等人,(1988) Science 242:1038-1041中描述的那些。

[0157] 术语“受试者”旨在包括可以引发免疫应答的活生物体(例如,哺乳动物)。如其中所使用的,“受试者(subject)”或“患者(patient)”可以是人类或非人类哺乳动物。非人类哺乳动物包括,例如家畜和宠物,比如绵羊、牛、猪、犬、猫和鼠类哺乳动物。优选地,受试者是犬。

[0158] 如本文所使用的,“基本上纯化的”细胞是基本上不含其他细胞类型的细胞。基本上纯化的细胞还指已经与通常以其天然存在的状态与其结合的其他细胞类型分离的细胞。在一些情况下,基本上纯化的细胞群是指同质的细胞群。在其他情况下,该术语仅指与以其天然状态与其天然结合的细胞分离的细胞。在一些实施方式中,细胞在体外培养。在其他实施方式中,细胞不在体外培养。

[0159] 如本文所使用的,术语“治疗的(therapeutic)”是指治疗和/或预防。通过抑制、缓解或消除疾病状态可获得治疗效果。

[0160] 如本文所使用的,术语“转染的(transfected)”或“转化的(transformed)”或“转导的(transduced)”是指将外源核酸转移或引入宿主细胞中的过程。“转染的”或“转化的”或“转导的”细胞是已经用外源核酸转染、转化或转导的细胞。该细胞包括原代受试者细胞及其子代。

[0161] 如本文所使用的,短语“在转录控制下”或“可操作地连接的”是指启动子相对于多核苷酸处于正确的位置和方向,以控制RNA聚合酶的转录起始和多核苷酸的表达。

[0162] “载体”是包括分离的核酸并且可用于将分离的核酸递送至细胞内部的物质组合物。许多载体是本领域已知的,包括但不限于线性多核苷酸、与离子或两亲性分子化合物相

关的多核苷酸、质粒和病毒。因此,术语“载体”包括自主复制质粒或病毒。该术语还应解释为包括有助于将核酸转移到细胞中的非质粒和非病毒化合物,诸如例如聚赖氨酸化合物、脂质体等。病毒载体的实例包括但不限于腺病毒载体、腺伴随病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体等。

[0163] 如本文使用的,术语“特异性结合”意思是识别并结合样品中存在的关联结合伴侣(例如,T细胞上存在的刺激和/或共刺激分子)蛋白的抗体或配体,但是该抗体或配体基本上不识别或结合样品中的其他分子。

[0164] 术语“刺激”是指通过刺激分子(例如,TCR/CD3复合物)与其关联配体结合,从而介导信号转导事件,比如但不限于经由TCR/CD3复合物。刺激可以介导某些分子改变的表达,例如TGF- β 的下调和/或细胞骨架结构的重组等。

[0165] 本文使用的术语“刺激分子”是指T细胞上与抗原呈递细胞和/或肿瘤细胞上存在的关联刺激配体特异性结合的分子。

[0166] 如本文所使用的,“刺激配体”是指当存在于抗原呈递细胞(例如,aAPC、树突细胞、B细胞等)或肿瘤细胞上时可以与关联结合伴侣(在本文中称为“刺激分子”)特异性结合的配体,从而介导T细胞的初级应答,包括但不限于激活、免疫应答的起始、增殖等。刺激配体在本领域中是众所周知的,并且尤其包括装载有肽、抗CD3抗体、超激动剂抗CD28抗体和超激动剂抗CD2抗体的MHC I类分子。

[0167] 范围:在整篇公开内容中,可以用范围格式来呈现本公开内容的各个方面。应当理解,范围格式的描述仅是为了方便和简洁,而不应被解释为对本公开内容的范围的僵化限制。因此,应该将范围的描述解释为已具体公开了所有可能的子范围以及该范围内的各个数值。例如,范围比如从1至6的描述应解释为具体地公开了子范围,比如1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等,以及该范围内的单个数字,例如,1、2、2.7、3、4、5、5.3和6。无论该范围的广度如何,这都适用。

[0168] 结合多肽、抗体和scFv

[0169] 在方面中,本文公开了抗体或其抗原结合片段(或“结合多肽”,其可互换使用),其特征在于抗体或其抗原结合片段的特定功能特征或特性。例如,结合多肽和抗体与犬程序性死亡蛋白1(“cPD-1”或“犬PD-1”互换使用)特异性结合。本公开内容的结合多肽和抗体可以高亲和力与犬PD-1结合。本公开内容的结合多肽和抗体可特异性识别细胞上天然表达的犬PD-1蛋白。在一些情况下,本公开内容的结合多肽和抗体不会与这种细胞上的其他表面分子交叉反应。本公开内容的结合多肽和抗体可与细胞上天然表达的犬PD-1蛋白特异性结合,使得这种结合阻止犬PD-1与犬PD-1的天然配体比如犬程序性死亡配体1(“cPD-L1”或“犬PD-L1”)结合。在一些情况下,细胞是肿瘤细胞(例如,黑色素瘤、非小细胞肺癌和肝细胞癌)。在一些情况下,细胞为免疫细胞。在一些情况下,免疫细胞包括T细胞(例如,激活的T细胞)、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、调节性T细胞、巨噬细胞或树突状细胞(DC)。在一些情况下,免疫细胞包括激活的T细胞。在一些情况下,免疫细胞包括肿瘤浸润淋巴细胞。在一些情况下,cPD-L1在肿瘤细胞上过表达。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段可与cPD-1结合并抑制cPD-1信号传导途径。

[0170] 在某些方面中,本公开内容提供了与犬程序性死亡蛋白1(PD-1)特异性结合的抗体或其抗原结合片段。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段包括重链互补决定区1

(HCDR1)。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段包括重链互补决定区2(HCDR2)。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段包括重链互补决定区3(HCDR3)。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段包括轻链互补决定区1(LCDR1)。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段包括轻链互补决定区2(LCDR2)。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段包括轻链互补决定区3(LCDR3)。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段包括与犬程序性死亡蛋白1(PD-1)特异性结合的抗原结合结构域。在某些实施方式中,抗原结合结构域包括包含三个重链互补决定区(HCDR)的重链可变区和包含三个轻链互补决定区(LCDR)的轻链可变区。

[0171] 在某些方面中,本公开内容提供了一种分离的结合多肽,其包括包含SEQ ID NO:1、27或43中所列的氨基酸序列的HCDR1。还提供了一种分离的结合多肽,其包括包含SEQ ID NO:2、28或44中所列的氨基酸序列的HCDR2。还提供了一种分离的结合多肽,其包括包含SEQ ID NO:3、29或45中所列的氨基酸序列的HCDR3。还提供了一种包括轻链可变区的分离的结合多肽,轻链可变区包括包含SEQ ID NO:4、30或46中所列的氨基酸序列的LCDR1。还提供了一种分离的结合多肽,其包括包含SEQ ID NO:5、31或47中所列的氨基酸序列的LCDR2。还提供了一种分离的结合多肽,其包括包含SEQ ID NO:6、32或48中所列的氨基酸序列的LCDR3。

[0172] 在某些方面中,本公开内容提供了一种抗体或其抗原结合片段,其包括:包括SEQ ID NO:1、27或43中所列的氨基酸序列的重链互补决定区1(HCDR1)、包括SEQ ID NO:2、28或44中所列的氨基酸序列的重链互补决定区2(HCDR2)、包括SEQ ID NO:3、29或45中所列的氨基酸序列的重链互补决定区3(HCDR3)、包括SEQ ID NO:4、30或46中所列的氨基酸序列的轻链互补决定区1(LCDR1)、包括SEQ ID NO:5、31或47中所列的氨基酸序列的轻链互补决定区2(LCDR2)和包括SEQ ID NO:6、32或48中所列的氨基酸序列的轻链互补决定区3(LCDR3)。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段与犬程序性死亡蛋白1(PD-1)特异性结合。在一些情况下,抗体或抗原结合片段包括重链可变区,该重链可变区包括与SEQ ID NO:7、9、33或49中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。在一些情况下,抗体或抗原结合片段包括轻链可变区,该轻链可变区包括与SEQ ID NO:11、35或51中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。在一些情况下,抗体或抗原结合片段包括免疫球蛋白重链,该免疫球蛋白重链包括与SEQ ID NO:19、21、23、39或55中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。在一些情况下,抗体或抗原结合片段包括免疫球蛋白轻链,其包括与SEQ ID NO:25、41或57中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0173] 在某些方面中,本公开内容提供了一种包括重链可变区和轻链可变区的抗体或其抗原结合片段,该重链可变区包括与SEQ ID NO:7、9、33或49中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列,该轻链可变区包括与SEQ ID NO:11、35或51中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段与犬程序性死亡蛋白1(PD-1)特异性结合。

[0174] 在某些方面中,本公开内容提供了一种包括重链可变区和轻链可变区的抗体或其抗原结合片段,该重链可变区包括SEQ ID NO:7、9、33或49中所列的氨基酸序列;该轻链可变区包括SEQ ID NO:11、35或51中所列的氨基酸序列。在一些情况下,抗体或其抗原结合片

段与犬程序性死亡蛋白1 (PD-1) 特异性结合。

[0175] 在某些方面中,本公开内容提供了一种包括免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链的抗体或其抗原结合片段,该免疫球蛋白重链包括与SEQ ID NO:19、21、23、39或55中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列,该免疫球蛋白轻链包括与SEQ ID NO:25、41或57中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段与犬程序性死亡蛋白1 (PD-1) 特异性结合。

[0176] 在某些方面中,本公开内容提供了一种包括免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链的抗体或其抗原结合片段,该免疫球蛋白重链包括SEQ ID NO:19、21、23、39或55中所列的氨基酸序列,该免疫球蛋白轻链包括SEQ ID NO:25、41或57中所列的氨基酸序列。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段与犬程序性死亡蛋白1 (PD-1) 特异性结合。

[0177] 在某些方面中,本公开内容提供了一种分离的结合多肽,其包括:包括SEQ ID NO:1中所列的氨基酸序列的HCDR1、包括SEQ ID NO:2中所列的氨基酸序列的HCDR2、包括SEQ ID NO:3中所列的氨基酸序列的HCDR3、包括SEQ ID NO:4中所列的氨基酸序列的LCDR1、包括SEQ ID NO:5中所列的氨基酸序列的LCDR2和包括SEQ ID NO:6中所列的氨基酸序列的LCDR3。在一些实施方式中,分离的结合多肽是与犬程序性死亡蛋白1 (PD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段包括重链可变区,该重链可变区包括与SEQ ID NO:7或9中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段包括轻链可变区,该轻链可变区包括与SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段包括免疫球蛋白重链,该免疫球蛋白重链包括与SEQ ID NO:19、21或23中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段包括免疫球蛋白轻链,该免疫球蛋白轻链包括与SEQ ID NO:25中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0178] 在某些方面中,本公开内容提供了一种包括重链可变区和轻链可变区的抗体或其抗原结合片段,该重链可变区包括与SEQ ID NO:7或9中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;该轻链可变区包括与SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段与犬程序性死亡蛋白1 (PD-1) 特异性结合。

[0179] 在某些方面中,本公开内容提供了一种包括重链可变区和轻链可变区的抗体或其抗原结合片段,该重链可变区包括SEQ ID NO:7中所列的氨基酸序列;该轻链可变区包括SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段与犬程序性死亡蛋白1 (PD-1) 特异性结合。

[0180] 在某些方面中,本公开内容提供了一种包括重链可变区和轻链可变区的抗体或其抗原结合片段,该重链可变区包括SEQ ID NO:9中所列的氨基酸序列;该轻链可变区包括SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段与犬程序性死

亡蛋白1 (PD-1) 特异性结合。

[0181] 在某些方面中,本公开内容提供了一种包括免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链的抗体或其抗原结合片段,该免疫球蛋白重链包括与SEQ ID NO:19、21或23中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列,该免疫球蛋白轻链包括与SEQ ID NO:25中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段与犬程序性死亡蛋白1 (PD-1) 特异性结合。

[0182] 在某些方面中,本公开内容提供了一种包括免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链的抗体或其抗原结合片段,该免疫球蛋白重链包括SEQ ID NO:19中所列的氨基酸序列,该免疫球蛋白轻链包括SEQ ID NO:25中所列的氨基酸序列。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段与犬程序性死亡蛋白1 (PD-1) 特异性结合。

[0183] 在某些方面中,本公开内容提供了一种包括免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链的抗体或其抗原结合片段,该免疫球蛋白重链包括SEQ ID NO:21中所列的氨基酸序列,该免疫球蛋白轻链包括SEQ ID NO:25中所列的氨基酸序列。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段与犬程序性死亡蛋白1 (PD-1) 特异性结合。

[0184] 在某些方面中,本公开内容提供了一种包括免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链的抗体或其抗原结合片段,该免疫球蛋白重链包括SEQ ID NO:23中所列的氨基酸序列,该免疫球蛋白轻链包括SEQ ID NO:25中所列的氨基酸序列。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段与犬程序性死亡蛋白1 (PD-1) 特异性结合。

[0185] 在某些方面中,本公开内容提供了一种分离的结合多肽,其包括:包括SEQ ID NO:27中所列的氨基酸序列的HCDR1、包括SEQ ID NO:28中所列的氨基酸序列的HCDR2、包括SEQ ID NO:29中所列的氨基酸序列的HCDR3、包括SEQ ID NO:30中所列的氨基酸序列的LCDR1、包括SEQ ID NO:31中所列的氨基酸序列的LCDR2和包括SEQ ID NO:32中所列的氨基酸序列的LCDR3。在一些实施方式中,分离的结合多肽是与犬程序性死亡蛋白1 (PD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段包括重链可变区,该重链可变区包括与SEQ ID NO:33中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段包括轻链可变区,该轻链可变区包括与SEQ ID NO:35中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段包括免疫球蛋白重链,该免疫球蛋白重链包括与SEQ ID NO:39中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段包括免疫球蛋白轻链,该免疫球蛋白轻链包括与SEQ ID NO:41中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0186] 在某些方面中,本公开内容提供了一种包括重链可变区和轻链可变区的抗体或其抗原结合片段,该重链可变区包括与SEQ ID NO:33中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;该轻链可变区包括与SEQ ID NO:35中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段与犬程序性死亡蛋白1 (PD-1)

特异性结合。

[0187] 在某些方面中,本公开内容提供了一种包括重链可变区和轻链可变区的抗体或其抗原结合片段,该重链可变区包括SEQ ID NO:33中所列的氨基酸序列;该轻链可变区包括SEQ ID NO:35中所列的氨基酸序列。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段与犬程序性死亡蛋白1 (PD-1) 特异性结合。

[0188] 在某些方面中,本公开内容提供了一种包括免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链的抗体或其抗原结合片段,该免疫球蛋白重链包括与SEQ ID NO:39中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列,该免疫球蛋白轻链包括与SEQ ID NO:41中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段与犬程序性死亡蛋白1 (PD-1) 特异性结合。

[0189] 在某些方面中,本公开内容提供了一种包括免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链的抗体或其抗原结合片段,该免疫球蛋白重链包括SEQ ID NO:39中所列的氨基酸序列,该免疫球蛋白轻链包括SEQ ID NO:41中所列的氨基酸序列。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段与犬程序性死亡蛋白1 (PD-1) 特异性结合。

[0190] 在某些方面中,本公开内容提供了一种分离的结合多肽,其包括:包括SEQ ID NO:43中所列的氨基酸序列的HCDR1、包括SEQ ID NO:44中所列的氨基酸序列的HCDR2、包括SEQ ID NO:45中所列的氨基酸序列的HCDR3、包括SEQ ID NO:46中所列的氨基酸序列的LCDR1、包括SEQ ID NO:47中所列的氨基酸序列的LCDR2和包括SEQ ID NO:48中所列的氨基酸序列的LCDR3。在一些实施方式中,分离的结合多肽是与犬程序性死亡蛋白1 (PD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段包括重链可变区,该重链可变区包括与SEQ ID NO:49中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段包括轻链可变区,该轻链可变区包括与SEQ ID NO:51中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段包括免疫球蛋白重链,该免疫球蛋白重链包括与SEQ ID NO:55中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段包括免疫球蛋白轻链,该免疫球蛋白轻链包括与SEQ ID NO:57中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0191] 在某些方面中,本公开内容提供了一种包括重链可变区和轻链可变区的抗体或其抗原结合片段,该重链可变区包括与SEQ ID NO:49中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;该轻链可变区包括与SEQ ID NO:51中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段与犬程序性死亡蛋白1 (PD-1) 特异性结合。

[0192] 在某些方面中,本公开内容提供了一种包括重链可变区和轻链可变区的抗体或其抗原结合片段,该重链可变区包括SEQ ID NO:49中所列的氨基酸序列;该轻链可变区包括SEQ ID NO:51中所列的氨基酸序列。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段与犬程序性死

亡蛋白1 (PD-1) 特异性结合。

[0193] 在某些方面中,本公开内容提供了一种包括免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链的抗体或其抗原结合片段,该免疫球蛋白重链包括与SEQ ID NO:55中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列,该免疫球蛋白轻链包括与SEQ ID NO:57中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段与犬程序性死亡蛋白1 (PD-1) 特异性结合。

[0194] 在某些方面中,本公开内容提供了一种包括免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链的抗体或其抗原结合片段,该免疫球蛋白重链包括SEQ ID NO:55中所列的氨基酸序列,该免疫球蛋白轻链包括SEQ ID NO:57中所列的氨基酸序列。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段与犬程序性死亡蛋白1 (PD-1) 特异性结合。

[0195] 互补决定区 (CDR) 序列的可容许变化是本领域技术人员已知的。例如,在一些实施方式中,分离的结合多肽包括这样的互补决定区 (HCDR或LCDR),该互补决定区包括与SEQ ID NO:1、2、3、4、5、6、27、28、29、30、31、32、43、44、45、46、47或48中所列的任一个氨基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,分离的结合多肽包括这样的互补决定区 (HCDR或LCDR),该互补决定区包括与SEQ ID NO:1、2、3、4、5或6中所列的任一个氨基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,分离的结合多肽包括这样的互补决定区 (HCDR或LCDR),该互补决定区包括与SEQ ID NO:27、28、29、30、31或32中所列的任一个氨基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,分离的结合多肽是与犬程序性死亡蛋白1 (PD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段。

[0196] 在一些实施方式中,分离的结合多肽与程序性死亡蛋白1 (PD-1),例如,犬PD-1结合。在一些实施方式中,结合多肽包括抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段为IgG、IgM、IgE、IgA或IgD分子。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段源自IgG、IgM、IgE、IgA或IgD分子。在一些实施方式中,抗原结合片段选自全长抗体、Fab、单链可变片段 (scFv)、单结构域抗体、sc (Fv) 2、dsFv、Fab、Fab'、(Fab') 2和双抗体。在进一步的实施方式中,抗体为全长抗体。在又进一步的实施方式中,抗体或抗原结合片段为犬抗体或犬源化抗体或其抗原结合片段。在一些实施方式中,抗体或抗原结合片段为犬抗体或

其抗原结合片段。在一些实施方式中,抗体或抗原结合片段为犬抗体。在一些实施方式中,抗体或抗原结合片段为犬IgG4抗体。在一些实施方式中,抗体或抗原结合片段为scFv。在一些实施方式中,抗体或抗原结合片段为犬或犬源化的scFv。在一些实施方式中,抗体或抗原结合片段为犬scFv。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段与cPD-1的特异性结合破坏了cPD-1与cPD-1的配体(例如,犬程序性死亡配体1)的相互作用。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段与cPD-1的特异性结合抑制了cPD-1与cPD-1的配体(例如,犬程序性死亡配体1)的相互作用。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段与cPD-1的特异性结合抑制了通过cPD-1与cPD-1的配体(例如,犬程序性死亡配体1)的相互作用激活的信号传导途径。在一些实施方式中,抗体或其抗原结合片段与cPD-1的特异性结合抑制了cPD-1信号传导途径。

[0197] 在某些实施方式中,结合多肽包括重链可变区,该重链可变区包括与SEQ ID NO: 7、9、33或49中所列的重链可变区的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中,结合多肽包括包含SEQ ID NO: 7、9、33或49中所列的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施方式中,结合多肽包括由SEQ ID NO: 7、9、33或49中所列的氨基酸序列组成的重链可变区。

[0198] 在某些实施方式中,结合多肽包括轻链可变区,该轻链可变区包括与SEQ ID NO: 11、35或51中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。在某些实施方式中,结合多肽包括包含SEQ ID NO: 11、35或51中所列的氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施方式中,结合多肽包括包含SEQ ID NO: 11、35或51中所列的氨基酸序列的轻链可变区。

[0199] 还提供了一种分离的结合多肽,其包括:包括SEQ ID NO: 7或9中所列的氨基酸序列的重链可变区和包括SEQ ID NO: 11中所列的氨基酸序列的轻链可变区。

[0200] 还提供了一种分离的结合多肽,其包括:包括SEQ ID NO: 33中所列的氨基酸序列的重链可变区和包括SEQ ID NO: 35中所列的氨基酸序列的轻链可变区。

[0201] 还提供了一种分离的结合多肽,其包括:包括SEQ ID NO: 49中所列的氨基酸序列的重链可变区和包括SEQ ID NO: 51中所列的氨基酸序列的轻链可变区。

[0202] 在某些实施方式中,本公开内容包括与本公开内容的抗体结合到犬PD-1上相同表位的抗体(即,具有与本公开内容的任何抗体交叉竞争结合犬PD-1的能力的抗体)。在一个优选的实施方式中,用于交叉竞争研究的参考抗体可以是本文所述的抗体中的一种(例如,表1和实施例1中的P3C6mut3.1、P3C6mut3.2、P4B1或A6)。例如,Biacore分析、ELISA检测或流式细胞术可用于证明与本公开内容的抗体的交叉竞争。测试抗体抑制例如P3C6mut3.1或P3C6mut3.2与cPD-1结合的能力表明该测试抗体能与P3C6mut3.1或P3C6mut3.2竞争结合cPD-1,并且因此被认为与P3C6mut3.1或P3C6mut3.2结合至PD-1的相同表位。

[0203] 本公开内容的抗体可以使用具有一个或多个本文所公开的VH和/或VL序列或其任何片段的抗体作为起始材料来制备,以工程化修饰的抗体,与起始抗体相比,修饰的抗体可以具有改变的特性。可通过修饰一个或两个可变区(即,VH和/或VL)中,例如一个或多个CDR区内和/或一个或多个框架区内的一个或多个氨基酸来工程化抗体。此外或可选地,也可以通过修饰恒定区(一个或多个)内的残基来工程化抗体,例如以改变抗体的效应功能(一种或多种)。

[0204] 还提供了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的犬抗体或其抗原结合片段。犬抗体或其抗原结合片段可以由犬抗体噬菌体展示文库产生。在实施例1中阐释了用于产生与cPD-1特异性结合的犬抗体或其抗原结合片段的方法。在一些情况下,这种犬抗体包括本文公开的任何抗原结合片段或结合肽。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段与cPD-1的特异性结合破坏了cPD-1与cPD-1的配体(例如,犬程序性死亡配体1)的相互作用。

[0205] 还提供了一种与犬程序性死亡蛋白1 (PD-1) 特异性结合的单链可变片段(scFv)。在一些情况下,scFv包括抗原结合结构域。在一些情况下,抗体或其抗原结合片段与cPD-1的特异性结合破坏了cPD-1与cPD-1的配体(例如,犬程序性死亡配体1)的相互作用。

[0206] 如本文中所使用的,术语“单链可变片段(single-chain variable fragment)”或“scFv”是免疫球蛋白(例如,小鼠、犬或人)的重链(VH)和轻链(VL)的可变区共价连接以形成VH:VL异源二聚体的融合蛋白。可变重链(VH)和轻链(VL)直接连接或者通过编码肽的接头连接,编码肽的接头连接VH的N-末端和VL的C-末端,或者VH的C-末端和VL的N-末端。在一些实施方式中,抗原结合结构域(例如,PD-1结合结构域)包括从N-末端到C-末端的构型为VH-接头-VL的scFv。在某些实施方式中,抗原结合结构域包括从N-末端到C-末端的构型为VL-接头-VH的scFv。本领域技术人员能够选择适当的构型用于本公开内容。

[0207] 接头通常富含甘氨酸以提高灵活性,以及丝氨酸或苏氨酸以提高溶解性。接头可以连接细胞外抗原结合结构域的重链可变区和轻链可变区。接头的非限制性实例在Shen等人,Anal.Chem.80(6):1910-1917(2008)和WO 2014/087010中公开,其内容通过引用以其整体并入。各种接头序列在本领域是已知的,包括但不限于甘氨酸丝氨酸(GS)接头,比如 $(GS)_n$ 、 $(GSGGS)_n$ (SEQ ID NO:65)、 $(GGGS)_n$ (SEQ ID NO:66)和 $(GGGGS)_n$ (SEQ ID NO:67),其中n代表至少1的整数。示例性接头序列可包括氨基酸序列,该序列包括但不限于GGSG(SEQ ID NO:68)、GGSGG(SEQ ID NO:69)、GSGSG(SEQ ID NO:70)、GSGGG(SEQ ID NO:71)、GGGSG(SEQ ID NO:72)、GSSSG(SEQ ID NO:73)、GGGGS(SEQ ID NO:74)、GGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:75)、GGGSSRSSSGGGSGGGG(SEQ ID NO:76)等。本领域技术人员能够选择适当的接头序列用于本公开。在一个实施方式中,本公开内容的scFv包括重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),其中VH和VL通过具有氨基酸序列GGGSSRSSSGGGSGGGG(SEQ ID NO:76)的接头序列连接,其可由核酸序列GGCGGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGGTGG CGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGG(SEQ ID NO:77)编码,其中由于包括了限制性内切核酸酶Xba I的核苷酸序列存在精氨酸残基R。本领域的技术人员会认识到,接头中限制酶切位点以及scFv构建体侧翼的限制酶切位点的存在有助于在需要时进行重链/轻链“交换(swap)”实验,以优化抗体。

[0208] 尽管去除了恒定区并引入了接头,但是scFv蛋白仍保留了原始免疫球蛋白的特异性。单链Fv多肽抗体可由包括VH和VL编码序列的核酸表达,如Huston等人(Proc.Nat.Acad.Sci.USA,85:5879-5883,1988)所描述的。另外参见美国专利号5,091,513、5,132,405和4,956,778;以及美国专利公开号20050196754和20050196754。具有抑制活性的拮抗scFv已被描述(例如,参见Zhao等人,Hybridoma(Larchmt)2008 27(6):455-51;Peter等人,JCachexia Sarcopenia Muscle,2012年8月12日;Shieh等人,J Immunol 2009 183(4):2277-85;Giomarelli等人,Thromb Haemost 2007 97(6):955-63;Fife et al.,J Clin Invest 2006 116(8):2252-61;Brooks等人,Immunotechnology 1997 3(3):173-84;Moosmayer等人,Ther Immunol 1995 2(10):31-40)。已经描述了具有刺激活性的拮抗scFv

(例如,参见Peter等人,J Bioi Chem 2003 25278(38):36740-7;Xie等人,Nat Biotech 1997 15(8):768-71;Ledbetter等人,Crit Rev Immunol 1997 17(5-6):427-55;Ho等人,BioChim Biophys Acta 20031638(3):257-66)。

[0209] 在某些实施方式中,scFv的抗原结合结构域包括包含三个重链互补决定区(HCDR)的重链可变区和包含三个轻链互补决定区(LCDR)的轻链可变区。HCDR1包括氨基酸序列(SEQ ID NO:1、27或43),和/或HCDR2包括氨基酸序列(SEQ ID NO:2、28或44),和/或HCDR3包括氨基酸序列(SEQ ID NO:3、29或45)和/或LCDR1包括氨基酸序列(SEQ ID NO:4、30或46),和/或LCDR2包括氨基酸序列(SEQ ID NO:5、31或47),和/或LCDR3包括氨基酸序列(SEQ ID NO:6、32或48)。重链可变区和轻链可变区由接头连接。

[0210] 还提供了一种单链可变片段(scFv),其包括包含SEQ ID NO:7、9、33或49中所列的氨基酸序列的重链可变区和包含SEQ ID NO:11、35或51中所列的氨基酸序列的轻链可变区。重链可变区和轻链可变区由接头连接。

[0211] 在另一方面中,提供了一种包括SEQ ID NO:13、15、17、37或53中所列的氨基酸序列的单链可变片段(scFv)。在另一方面中,提供了一种由SEQ ID NO:13、15、17、37或53中所列的氨基酸序列组成的单链可变片段(scFv)。

[0212] scFv序列的可容许变化是本领域技术人员已知的。例如,在一些实施方式中,scFv包括与SEQ ID NO:13、15、17、37或53中所列的任一个氨基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0213] 在另一方面中,提供了一种全长抗体,其包括包含SEQ ID NO:19、21、23、39或55中所列的氨基酸序列的重链和包含SEQ ID NO:25、41或57中所列的氨基酸序列的轻链。在另一方面中,提供了一种全长抗体,其由包括SEQ ID NO:19、21、23、39或55中所列的氨基酸序列的重链和包括SEQ ID NO:25、41或57中所列的氨基酸序列的轻链组成。

[0214] 全长抗体序列的可容许变化将是本领域技术人员已知的。例如,在一些实施方式中,抗体包括包含与SEQ ID NO:19、21、23、39或55中所列的任一个氨基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列的重链和包含与SEQ ID NO:25、41或57中所列的任一个氨基酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列的轻链。

[0215] 在某些实施方式中,本公开内容的抗体或其抗原结合片段的全长重链或轻链进一步包括前导序列。在某些实施方式中,前导序列包括SEQ ID NO:60中所列的氨基酸序列。在某些实施方式中,前导序列由SEQ ID NO:59中所列的核苷酸序列编码。

[0216] 在某些实施方式中,本公开内容的抗体或其抗原结合片段的全长重链进一步包括多肽羧基末端的接头和HA或血凝素标记。在某些实施方式中,重链接头和HA标记包括SEQ ID NO:62中所列的氨基酸序列。在某些实施方式中,重链接头和HA标记由SEQ ID NO:61中

所列的核苷酸序列编码。

[0217] 在某些实施方式中,本公开内容的scFv进一步包括多肽羧基末端的IgG片段和6x HIS或组氨酸-血凝素标记。在某些实施方式中,scFv IgG片段-6x HIS-血凝素标记包括SEQ ID NO:64中所列的氨基酸序列。在某些实施方式中,scFv IgG片段-6x HIS-血凝素标记由SEQ ID NO:63所列的核酸序列编码。

[0218] 表1:本公开内容中使用的序列

[0219]

SEQ ID NO:	名称	类型	序列
1	P3C6 HCDR1	蛋白质	GFTFSKYG
2	P3C6 HCDR2	蛋白质	IAANGGTY
3	P3C6 HCDR3	蛋白质	RWGGAPFDY
4	P3C6 LCDR1	蛋白质	QSVSSY
5	P3C6 LCDR2	蛋白质	GTS
6	P3C6 LCDR3	蛋白质	QQGLQYPIT
7	P3C6mut3.1 VH	蛋白质	EVQLVQSGGDVVKPGGSLRLSCMASGFTFSKYGMSWVRQ SPGKGLQWVADIAANGGTYTDAVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARWGGAPFDYWGQGTTLTVSS
8	P3C6mut3.1 VH	DNA	GAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGGAGACGTGGTGA AGCCTGGAGGAAGCCTGAGGCTGAGCTGCATGGCAAGC GGATTACCTTCAGCAAGTACGGAATGAGCTGGGTGAG GCAGAGCCCCGGCAAGGGCCTGCAGTGGGTGGCCGACA TCGCCGCCAACGCGGCACCTACTACACCGACGCCGTG AAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGACAAACGCCAAGAA CACCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGTGGGGCGGCGCC CCCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGT GAGCAGC
9	P3C6mut3.2 VH	蛋白质	EVQLVQSGGDVVKPGGSLRLSCVASGFTFSKYGMSWVRQ SPGKGLQWVADIAANGGTYTDAVKGRFTISRDNKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARWGGAPFDYWGQGTTLTVSS
10	P3C6mut3.2 VH	DNA	GAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGGCGACGTGGTGAA GCCCCGCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCGTGGCCAGCG GCTTCACCTTCAGCAAGTACGGCATGAGCTGGGTGAGG

[0220]

			CAGAGCCCCGGCAAGGGCCTGCAGTGGGTGGCCGACAT CGCCGCCAACGGCGGCACCTACTACACCGACGCCGTGA AGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAAC ACCCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGA CACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGTGGGGCGGCGCCC CCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGA CTGTG AGCAGC
11	P3C6 VL	蛋白质	EIVMTQSPASLSLSQEEKVTITCRASQSVSSYLAWYQQKPG QAPKLLIYGTSNRATGVPSRFSGSGSGTDFSFITISLEPEDVA VYYCQQGLQYPITFGKGTHLEIK
12	P3C6 VL	DNA	GAAATCGTGATGACCCAGTCTCCAGCCTCCCTCTCCTTG TCTCAGGAGGAAAAAGTCACCATCACCTGCCGGGCCAG TCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAAAA ACCTGGGCAGGCTCCCAAGCTCCTCATCTATGGTACATC CAACAGGGCCACTGGTGTCCCATCCCGGTTCA GTGGCA GTGGGTCTGGGACAGACTTCAGCTTCACCATCAGCAGCC TGGAGCCTGAAGATGTTGCAGTTTATTACTGCCAGCAAG GTCTACAGTATCCGATCACCTTTGGCAAAGGGACACATC TGGAGATTAAA
13	P3C6 scFv	蛋白质	EIVMTQSPASLSLSQEEKVTITCRASQSVSSYLAWYQQKPG QAPKLLIYGTSNRATGVPSRFSGSGSGTDFSFITISLEPEDVA VYYCQQGLQYPITFGKGTHLEIKGGSSRSSSSGGGSGGG GEVQLVQSGGDLVKPGGSLRLSCMASGFTFSKYGMSWVR QSPGKGLQWVADIAANGGTYYTDAVKGRFTISRDNKNA LYLQMDLRAEDTAVYYCARWGGAPFDYWGQGLTVTS S
14	P3C6 scFv	DNA	GAAATCGTGATGACCCAGTCTCCAGCCTCCCTCTCCTTG TCTCAGGAGGAAAAAGTCACCATCACCTGCCGGGCCAG TCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAAAA ACCTGGGCAGGCTCCCAAGCTCCTCATCTATGGTACATC CAACAGGGCCACTGGTGTCCCATCCCGGTTCA GTGGCA GTGGGTCTGGGACAGACTTCAGCTTCACCATCAGCAGCC TGGAGCCTGAAGATGTTGCAGTTTATTACTGCCAGCAAG GTCTACAGTATCCGATCACCTTTGGCAAAGGGACACATC TGGAGATTAAAGGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCTCTGG TGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGGAGGTCCAGCTGG TGCAGTCTGGGGGAGACCTGGTGAAGCCTGGGGGGTCC TTGAGACTGTCCTGTATGGCCTCTGGATTACCTTCAGTA AATATGGCATGAGCTGGGTCCGTCAGTCTCCAGGGAAGG GGCTGCAGTGGGTGCGAGATATTGCCGCTAATGGAGGCA CATACTACACGACGCTGTGAAGGGCCGATTACCATCT CCAGAGACAACGCCAAGAACGCGCTATATCTGCAGATGG ACGATCTGAGAGCCGAGGACACGGCTGTCTATTATTGTG CGAGGTGGGGGGGGGCCCTTTGACTACTGGGGCCAG

[0221]

			GGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA
15	P3C6mut3.1 scFv	蛋白质	EIVMTQSPASLSLSQEEKVTITCRASQSVSSYLAWYQQKPG QAPKLLIYGTSNRATGVPSRFSGSGSGTDFSFITISLEPEDVA VYYCQQGLQYPITFGKGTHLEIKGGSSRSSSSGGGSGGG GEVQLVQSGGDVVKPGGSLRLSCMASGFTFSKYGMSWVR QSPGKGLQWVADIAANGGTYTDAVKGRFTISRDNANT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGGAPFDYWGQGLTVTVSS
16	P3C6 mut3.1 scFv	DNA	GAAATCGTGATGACCCAGTCTCCAGCCTCCCTCTCCTTG TCTCAGGAGGAAAAAGTCACCATCACCTGCCGGGCCAG TCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAAAA ACCTGGGCAGGCTCCCAAGCTCCTCATCTATGGTACATC CAACAGGGCCACTGGTGTCCCATCCCGGTTCACTGGCA GTGGGTCTGGGACAGACTTCAGCTTCACCATCAGCAGCC TGGAGCCTGAAGATGTTGCAGTTTATTACTGCCAGCAAG GTCTACAGTATCCGATCACCTTTGGCAAAGGGACACATC TGGAGATTAAAGGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCTCTGG TGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGGAGGTGCAGCTGG TGCAGAGCGGAGGAGACGTGGTGAAGCCTGGAGGAAG CCTGAGGCTGAGCTGCATGGCAAGCGGATTCACCTTCAG CAAGTACGGAATGAGCTGGGTGAGGCAGAGCCCCGGCA AGGGCCTGCAGTGGGTGGCCGACATCGCCGCCAACGGC GGCACCTACTACACCGACGCCGTGAAGGGCAGGTTCAC CATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGC AGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTAC TACTGCGCCAGGTGGGGCGGCGCCCCCTCGACTACTGG GGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC
17	P3C6mut3.2 scFv	蛋白质	EIVMTQSPASLSLSQEEKVTITCRASQSVSSYLAWYQQKPG QAPKLLIYGTSNRATGVPSRFSGSGSGTDFSFITISLEPEDVA VYYCQQGLQYPITFGKGTHLEIKGGSSRSSSSGGGSGGG GEVQLVQSGGDVVKPGGSLRLSCVASGFTFSKYGMSWVR QSPGKGLQWVADIAANGGTYTDAVKGRFTISRDNANT LYLQMNSLRAEDTAVYYCARWGGAPFDYWGQGLTVTVSS
18	P3C6mut3.2 scFv	DNA	GAAATCGTGATGACCCAGTCTCCAGCCTCCCTCTCCTTG TCTCAGGAGGAAAAAGTCACCATCACCTGCCGGGCCAG TCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAAAA ACCTGGGCAGGCTCCCAAGCTCCTCATCTATGGTACATC CAACAGGGCCACTGGTGTCCCATCCCGGTTCACTGGCA GTGGGTCTGGGACAGACTTCAGCTTCACCATCAGCAGCC TGGAGCCTGAAGATGTTGCAGTTTATTACTGCCAGCAAG GTCTACAGTATCCGATCACCTTTGGCAAAGGGACACATC TGGAGATTAAAGGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCTCTGG TGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGGAGGTGCAGCTGG TGCAGAGCGGCGGCGACGTGGTGAAGCCCGCGGCAGC CTGAGGCTGAGCTGCGTGGCCAGCGGCTTCACCTTCAG

[0222]

			CAAGTACGGCATGAGCTGGGTGAGGCAGAGCCCCGGCA AGGGCCTGCAGTGGGTGGCCGACATCGCCGCCAACGGC GGCACCTACTACACCGACGCCGTGAAGGGCAGGTTAC CATCAGCAGGGACAACGCCAAGAACACCCTGTACCTGC AGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGACACCGCCGTGTAC TACTGCGCCAGGTGGGGCGGCGCCCCCTTCGACTACTGG GGCCAGGGCACCCCTGGTGACTGTGAGCAGC
19	P3C6mut3.1 重链全长 IgG4	蛋白质	EVQLVQSGGDVVKPGGSLRLSCMASGFTFSKYGMSWVRQ SPGKGLQWVADIAANGGTYYTDAVKGRFTISRDNANKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCARWGGAPFDYWQGQTLTVSS ASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSIFYPEPVTVSW NSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTC NVVHPASNTKVDKPVPKESTCKCISPCVPESLGGPSVFIFP PKPKDILRITRTEITCVVLDLGREDPEVQISWFVDGKEVHT AKTQPREQQFNSTYRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNI GLPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPSPKELSSSDTVTLTC LIKDFPPEIDVEWQSNGQPEPESKYHTTAPQLDEDGSYFL YSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMHEALQNHYTDLSLSHSP GK
20	P3C6mut3.1 重链全长 IgG4	DNA	GAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGAGGAGACGTGGTGA AGCCTGGAGGAAGCCTGAGGCTGAGCTGCATGGCAAGC GGATTACCTTCAGCAAGTACGGAATGAGCTGGGTGAG GCAGAGCCCCGGCAAGGGCCTGCAGTGGGTGGCCGACA TCGCCGCCAACGGCGGCACCTACTACACCGACGCCGTG AAGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAA CACCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGG ACACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGTGGGGCGGCGCC CCCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGT GAGCAGCGCTAGCACACGGCCCCCTCGGTTTTCCCACT GGCCCCAGCTGCGGGTCCACTTCCGGCTCCACGGTGG CCCTAGCCTGCCTGGTGTGACGGCTACTTCCCCGAGCCTG TAACTGTGTCTTGGAACCTCCGGCTCCTTGACCAGCGGTG TGACACACCTTCCCGTCCGTCTGTCAGTCTCAGGGCTCT ACTCCCTCAGCAGCATGGTGACAGTGCCCTCCAGCAGGT GGCCAGCGAGACCTTCACCTGCAACGTGGTCCACCCG GCCAGCAACACTAAAGTAGACAAGCCAGTGCCCAAAGA GTCCACCTGCAAGTGTATATCCCCATGCCAGTCCCTGAA TCACTGGGAGGGCCTTCGGTCTTCATCTTTCCCCGAAA CCCAAGGACATCCTCAGGATTACCCGAACACCCGAGATC ACCTGTGTGGTGTTAGATCTGGGCCGTGAGGACCCTGAG GTGCAGATCAGCTGGTTCGTGGATGGTAAGGAGGTGCA CACAGCCAAGACGCAGCCTCGTGAGCAGCAGTTCAACA GCACCTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCCCCATTGAGCACC AGGACTGGCTCACCGGAAAGGAGTTCAAGTGACAGATC

[0223]

			AACCACATAGGCCTCCCGTCCCCATCGAGAGGACCATC TCCAAAGCCAGAGGGCAAGCCCATCAGCCCAGTGTGTA TGTCTGCCACCATCCCCAAAGGAGTTGTCATCCAGTGA CACGGTCACCCTGACCTGCCTGATCAAAGACTTCTTCCC ACCTGAGATTGATGTGGAGTGGCAGAGCAATGGACAGC CAGAGCCTGAGAGCAAGTACCACACGACTGCACCCAG CTGGACGAGGACGGGTCCTACTTCCTGTACAGCAAGCTC TCTGTGGACAAGAGCCGCTGGCAGCAGGGAGACCCCTT CACATGTGCGGTGATGCATGAAGCTCTACAGAACCACTA CACAGATCTATCCCTCTCCCATCTCCGGGTAAA
21	P3C6mut3.2 重链全长 IgG4	蛋白质	EVQLVQSGGDVVKPGGSLRLSCVASGFTFSKYGMSWVRQ SPGKGLQWVADIAANGGTYTDAVKGRFTISRDNAKNTL YLQMNSLR AEDTAVYYCARWGGAPFDYWGQGLTVTVSS ASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSIFYPEPVTVSW NSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTC NVVHPASNTKVDKPVPKESTCKCISPCVPESLGGPSVFIFP PKPKDILRITRTEITCVVLDLGREDPEVQISWFVDGKEVHT AKTQPREQQFNSTYRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNH GLPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPSPKELSSSDTVTLTC LIKDFFPPEIDVEWQSNGQPEPESKYHTTAPQLDEDGSYFL YSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMHEALQNHYTDLSLSHSP GK
22	P3C6mut3.2 重链全长 IgG4	DNA	GAGGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGGCGACGTGGTGAA GCCCCGCGGCAGCCTGAGGCTGAGCTGCGTGGCCAGCG GCTTCACCTTCAGCAAGTACGGCATGAGCTGGGTGAGG CAGAGCCCCGCAAGGGCCTGCAGTGGGTGGCCGACAT CGCCGCCAACGGCGGCACCTACTACACCGACGCCGTGA AGGGCAGGTTACCATCAGCAGGGACAACGCCAAGAAC ACCTGTACCTGCAGATGAACAGCCTGAGGGCCGAGGA CACCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGTGGGGCGGCGCCC CCTTCGACTACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGA CTGTG AGCAGCGCTAGCACCACGGCCCCCTCGGTTTTCCCACTG GCCCCAGCTGCGGGTCCACTTCCGGCTCCACGGTGGCC CTAGCCTGCCTGGTGTGAGGCTACTTCCCCGAGCCTGTA ACTGTGTCCTGGAAC TCCGGCTCCTTGACCAGCGGTGTG CACACCTTCCCGTCCGTCTCAGTCCCTCAGGGCTCTAC TCCCTCAGCAGCATGGTGACAGTGCCCTCCAGCAGGTG GCCCAGCGAGACCTTACCTGCAACGTGGTCCACCCGG CCAGCAACACTAAAGTAGACAAGCCAGTGCCCCAAGAG TCCACCTGCAAGTGTATATCCCCATGCCAGTCCCTGAAT CACTGGGAGGGCCTTCGGTCTTCATCTTCCCCGAAAC CCAAGGACATCCTCAGGATTACCCGAACACCCGAGATCA CCTGTGTGGTGTTAGATCTGGGCCGTGAGGACCCTGAGG TGCAGATCAGCTGGTTCGTGGATGGTAAGGAGGTGCAC

[0224]

			ACAGCCAAGACGCAGCCTCGTGAGCAGCAGTTCAACAG CACCTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCCCCATTGAGCACCA GGACTGGCTCACCGGAAAGGAGTTCAAGTGCAGAGTCA ACCACATAGGCCTCCCGTCCCCATCGAGAGGACCATCT CCAAAGCCAGAGGGCAAGCCCATCAGCCCAGTGTGTAT GTCCTGCCACCATCCCCAAAGGAGTTGTCATCCAGTGAC ACGGTCACCCTGACCTGCCTGATCAAAGACTTCTTCCCA CCTGAGATTGATGTGGAGTGGCAGAGCAATGGACAGCC AGAGCCTGAGAGCAAGTACCACACGACTGCACCCCAGC TGGACGAGGACGGGTCCTACTTCCTGTACAGCAAGCTCT CTGTGGACAAGAGCCGCTGGCAGCAGGGAGACCCCTTC ACATGTGCGGTGATGCATGAAGCTCTACAGAACCACTAC ACAGATCTATCCCTCTCCCATCTCCGGGTAAA
23	P3C6 重链全 长 IgG4	蛋白质	EVQLVQSGGDLVKPGGSLRLSCMASGFTFSKYGMSWVRQ SPGKGLQWVADIAANGGTYTDAVKGRFTISRDNAKNAL YLQMDDLRAEDTAVYYCARWGGAPFDYWQGTLVTVSS ASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSIFYPEPVTVSW NSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTC NVVHPASNTKVDKPVPESTCKCISPCVPESLGGPSVFIFP PKPKDILRITRTEITCVVLDLGREDEPVQISWFDVGKEVHT AKTQPREQQFNSTYRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNH GLPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPSPKELSSSDTVTLTC LIKDFPPEIDVEWQSNGQPEPEKYHTTAPQLDEDGSYFL YSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMHEALQNHYTDLSLSHSP GK
24	P3C6 重链全 长 IgG4	DNA	GAGGTCCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGACCTGGTGAA GCCTGGGGGGTCTTGAGACTGTCCTGTATGGCCTCTGG ATTACCTTCAGTAAATATGGCATGAGCTGGGTCCGTCA GTCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGGTCGAGATATTG CCGCTAATGGAGGCACATACTACACGGACGCTGTGAAGG GCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACGCG CTATATCTGCAGATGGACGATCTGAGAGCCGAGGACACG GCTGTCTATTATTGTGCGAGGTGGGGGGGGGCCCCCTTT GACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTC AGCTAGCACACGGCCCCCTCGGTTTTCCCACTGGCCCC CAGCTGCGGGTCCACTTCCGGCTCCACGGTGGCCCTAGC CTGCCTGGTGTGACGGCTACTTCCCCGAGCCTGTAAGTGT GTCCTGGAACCTCCGGCTCCTTGACCAGCGGTGTGCACAC CTTCCCGTCCGTCTGTCAGTCTCAGGGCTCTACTCCCT CAGCAGCATGGTGACAGTGCCCTCCAGCAGGTGGCCCA GCGAGACCTTCACCTGCAACGTGGTCCACCCGGCCAGC AACACTAAAGTAGACAAGCCAGTGCCCAAAGAGTCCAC CTGCAAGTGTATATCCCCATGCCAGTCCCTGAATCACTG GGAGGGCCTTCGGTCTTCATCTTCCCCCGAAACCCAAG

[0225]

			GACATCCTCAGGATTACCCGAACACCCGAGATCACCTGT GTGGTGTTAGATCTGGGCCGTGAGGACCCTGAGGTGCA GATCAGCTGGTTCGTGGATGGTAAGGAGGTGCACACAG CCAAGACGCAGCCTCGTGAGCAGCAGTTCAACAGCACC TACCGTGTGGTCAGCGTCCTCCCCATTGAGCACCAGGAC TGGCTCACCGGAAAGGAGTTCAAGTGCAGAGTCAACCA CATAGGCCTCCCGTCCCCCATCGAGAGGACCATCTCCAA AGCCAGAGGGCAAGCCCATCAGCCCAGTGTGTATGTCCT GCCACCATCCCCAAAGGAGTTGTCATCCAGTGACACGGT CACCTGACCTGCCTGATCAAAGACTTCTTCCCACCTGA GATTGATGTGGAGTGGCAGAGCAATGGACAGCCAGAGC CTGAGAGCAAGTACCACACGACTGCACCCCAGCTGGAC GAGGACGGGTCCTACTTCTGTACAGCAAGCTCTCTGTG GACAAGAGCCGCTGGCAGCAGGGAGACCCCTTCACATG TGCGGTGATGCATGAAGCTCTACAGAACCACTACACAGA TCTATCCCTCTCCATTCTCCGGGTAAA
25	P3C6 轻链全 长	蛋白质	EIVMTQSPASLSLSQEEKVTITCRASQSVSSYLAWYQQKPG QAPKLLIYGTSNRATGVPSRFSGSGSGTDFSFITISLEPEDVA VYYCQQGLQYPITFGKGTHLEIKRTDAQPAVYLFQSPDQL HTGSASVVCLLNSFYPKDINVKWKVDGVIQDTGIQESVTE QDKDSTYSLSSLTMSSTEYLSHELYSCEITHKSLPSTLIKSF QRSECQRVD
26	P3C6 轻链全 长	DNA	GAAATCGTGATGACCCAGTCTCCAGCCTCCCTCTCCTTG TCTCAGGAGGAAAAAGTCACCATCACCTGCCGGGCCAG TCAGAGTGTTAGCAGCTACTTAGCCTGGTACCAGCAAAA ACCTGGGCAGGCTCCCAAGCTCCTCATCTATGGTACATC CAACAGGGCCACTGGTGTCCCATCCCGGTTCAAGTGGA GTGGGTCTGGGACAGACTTCAGCTTCACCATCAGCAGCC TGGAGCCTGAAGATGTTGCAGTTTATTACTGCCAGCAAG GTCTACAGTATCCGATCACCTTTGGCAAAGGGACACATC TGGAGATTAAACGTACGGATGCCAGCCAGCCGTCTATT TGTTCCAACCATCTCCAGACCAGTTACACACAGGAAGTG CCTCTGTTGTGTGTTTGCTGAATAGCTTCTACCCCAAAGA CATCAATGTCAAGTGGAAGTGGATGGTGTCTATCCAAGA CACAGGCATCCAGGAAAGTGTCACAGAGCAGGACAAGG ACAGTACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGATGTCCA GTACTGAGTACCTAAGTCATGAGTTGTACTCCTGTGAGA TCACTCACAAGAGCCTGCCCTCCACCCTCATCAAGAGCT TCCAAAGGAGCGAGTGTGTCAGAGAGTGGAC
27	P4B1 HCDR1	蛋白质	GFTFNTYG
28	P4B1 HCDR2	蛋白质	IANSGSTY
29	P4B1 HCDR3	蛋白质	SGIWGDWFYY
30	P4B1 LCDR1	蛋白质	SLTKYY
31	P4B1 LCDR2	蛋白质	KDT

[0226]

32	P4B1 LCDR3	蛋白质	ESAVSADAVV
33	P4B1 VH	蛋白质	EVQLVQSGGDVVKPGGSLRLSCVASGFTFNTYGMNWVRQ SPGKGLQWVAAIANSYSTYYADAVRGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDAAIYYCASGIWGDWFIYYWGQGLTVSS
34	P4B1 VH	DNA	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGACGTGGTGAA GCCTGGGGGGTCTTGAGACTGTCCTGTGTGGCCTCTGG ATTCACCTTTAATACCTATGGCATGAACTGGGTCCTGTCAG TCTCCTGGGAAGGGGCTGCAGTGGGTCGCGGCTATTGCC AATAGTGAAGCACATATTACGCAGACGCTGTGAGGGGC CGGTTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACACT TTATCTTCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGATGCGGC CATATATTACTGTGCGAGTGGTATTTGGGGTGACTGGTTC TACTACTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACTGTGTCTCTCA
35	P4B1 VL	蛋白质	SSVLTQPPSVSVSLGQTATISCSGESLTKYYAQWFQKPGQ APMLVIYKDTERPSGIPDRFSGSSSGNTHLTISGARAEDEA DYYCESAVSADAVVFGGGTHLTVL
36	P4B1 VL	DNA	TCCAGTGTGCTGACTCAGCCTCCCTCGGTATCAGTGTCT CTGGGACAGACAGCAACCATCTCCTGCTCTGGAGAGAG TCTGACTAAATATTATGCACAATGGTTCCAGCAGAAGCC AGGCCAAGCCCCTATGTTGGTCATATATAAGGACACTGA GCGGCCCTCTGGGATCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAG TTCAGGAAACACACACACCCTGACCATCAGCGGGGCTC GGGCCGAGGACGAGGCCGACTATTACTGCGAGTCAGCG GTCAGTGTGCTGATGCTGTTGTGTTTCGGCGGGGGCACCCAT CTGACCGTCCTC
37	P4B1 scFv	蛋白质	SSVLTQPPSVSVSLGQTATISCSGESLTKYYAQWFQKPGQ APMLVIYKDTERPSGIPDRFSGSSSGNTHLTISGARAEDEA DYYCESAVSADAVVFGGGTHLTVLGGSSRSSSSGGGGSG GGGEVQLVQSGGDVVKPGGSLRLSCVASGFTFNTYGMNW VRQSPGKGLQWVAAIANSYSTYYADAVRGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDAAIYYCASGIWGDWFIYYWGQGLTVT VSS
38	P4B1 scFv	DNA	TCCAGTGTGCTGACTCAGCCTCCCTCGGTATCAGTGTCT CTGGGACAGACAGCAACCATCTCCTGCTCTGGAGAGAG TCTGACTAAATATTATGCACAATGGTTCCAGCAGAAGCC AGGCCAAGCCCCTATGTTGGTCATATATAAGGACACTGA GCGGCCCTCTGGGATCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAG TTCAGGAAACACACACACCCTGACCATCAGCGGGGCTC GGGCCGAGGACGAGGCCGACTATTACTGCGAGTCAGCG GTCAGTGTGCTGATGCTGTTGTGTTTCGGCGGGGGCACCCAT CTGACCGTCCTCGGTGGTGGTTCCTCTAGATCTTCCTCCT CTGGTGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGGGAGGTGCAG CTGGTGCAGTCTGGGGGAGACGTGGTGAAGCCTGGGGG GTCCTTGAGACTGTCCTGTGTGGCCTCTGGATTACCTTT

[0227]

			AATACCTATGGCATGAACTGGGTCCGTCAGTCTCCTGGG AAGGGGCTGCAGTGGGTGCGGGCTATTGCCAATAGTGGA AGCACATATTACGCAGACGCTGTGAGGGGGCCGGTTCACC ATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACACTTTATCTTCAG ATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGATGCGGCCATATATTAC TGTGCGAGTGGTATTGGGGTGACTGGTTCTACTACTGG GGCCAAGGGACCCTGGTCACTGTGTCTCTCA
39	P4B1 重链全 长 IgG4	蛋白质	EVQLVQSGGDVVKPGGSLRLSCVASGFTFNTYGMNWVRQ SPGKGLQWVAIAANSYSTYYADAVRGRFTISRDNKNTLY LQMNSLRAEDAAIYYCASGIWGDWFIYWGQGLTVVSS ASTTAPSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSIFYPEPVTVSW NSGSLTSGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRWPSETFTC NVVHPASNTKVDKVPKESTCKCISPCVPESLGGPSVFIFP PKPKDILRITRTEITCVVLDLGREDPEVQISWFVDGKEVHT AKTQPREQQFNSTYRVVSVLPIEHQDWLTGKEFKCRVNH GLPSPIERTISKARGQAHQPSVYVLPSPKELSSSDTVTLTC LIKDFPPEIDVEWQSNGQPEPESKYHTTAPQLDEDGSYFL YSKLSVDKSRWQQGDPFTCAVMHEALQNHYTDLSSLHSP GK
40	P4B1 重链全 长 IgG4	DNA	GAGGTGCAGCTGGTGCAGTCTGGGGGAGACGTGGTGAA GCCTGGGGGGTCTTGAGACTGTCCTGTGTGGCCTCTGG ATTACCTTTAATACCTATGGCATGAACTGGGTCCGTCAG TCTCCTGGGAAGGGGCTGCAGTGGGTGCGGGCTATTGCC AATAGTGGAAGCACATATTACGCAGACGCTGTGAGGGGC CGGTTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACACACT TTATCTTCAGATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGATGCGGC CATATATTACTGTGCGAGTGGTATTGGGGTGACTGGTTC TACTACTGGGGCCAAGGGACCCTGGTCACTGTGTCTCTCA GCTAGCACACGCGCCCCCTCGGTTTTCCCACTGGCCCC AGCTGCGGGTCCACTTCCGGCTCCACGGTGGCCCTAGCC TGCCTGGTGTGAGGCTACTTCCCCGAGCCTGTAAGTGTG TCCTGGAAGTCCGGCTCCTTGACCAGCGGTGTGCACACC TTCCCGTCCGTCCTGCAGTCCTCAGGGCTCTACTCCCTC AGCAGCATGGTGACAGTGCCCTCCAGCAGGTGGCCCAG CGAGACCTTCACCTGCAACGTGGTCCACCCGGCCAGCA ACACTAAAGTAGACAAGCCAGTGCCCAAAGAGTCCACC TGCAAGTGTATATCCCCATGCCAGTCCCTGAATCACTGG GAGGGCCTTCGGTCTTCATCTTTCCCCCGAAACCCAAGG ACATCCTCAGGATTACCCGAACACCCGAGATCACCTGTG TGGTGTTAGATCTGGGCCGTGAGGACCCTGAGGTGCAGA TCAGCTGGTTCGTGGATGGTAAGGAGGTGCACACAGCC AAGACGCAGCCTCGTGAGCAGCAGTTCAACAGCACCTA CCGTGTGGTCAGCGTCCTCCCCATTGAGCACCAGGACTG GCTCACCGGAAAGGAGTTCAAGTGCAGAGTCAACCACA

[0228]

			TAGGCCTCCCGTCCCCATCGAGAGGACCATCTCCAAAG CCAGAGGGCAAGCCCATCAGCCCAGTGTGTATGTCCTGC CACCATCCCCAAAGGAGTTGTCATCCAGTGACACGGTCA CCCTGACCTGCCTGATCAAAGACTTCTTCCCACCTGAGA TTGATGTGGAGTGGCAGAGCAATGGACAGCCAGAGCCT GAGAGCAAGTACCACACGACTGCACCCCAGCTGGACGA GGACGGGTCTACTTCCTGTACAGCAAGCTCTCTGTGGA CAAGAGCCGCTGGCAGCAGGGAGACCCCTTCACATGTG CGGTGATGCATGAAGCTCTACAGAACCACTACACAGATC TATCCCTCTCCCATCTCCGGGTAAA
41	P4B1 轻链全 长	蛋白质	SSVLTQPPSVSVSLGQTATISCSGESLTKYYAQWFQQKPGQ APMLVIYKDTERPSGIPDRFSGSSSGNTHLTISGARAEDEA DYICESAVSADAVVFGGGTHLTVLGQPKASPSVTLFPPSSE ELGANKATLVCLISDFYPSGVTVAWKADGSPITQGVETTKP SKQSNKYAASSYLSLTPDKWKSHSSFCLVTHEGSTVEK KVAPAECS
42	P4B1 轻链全 长	DNA	TCCAGTGTGCTGACTCAGCCTCCCTCGGTATCAGTGTCT CTGGGACAGACAGCAACCATCTCCTGCTCTGGAGAGAG TCTGACTAAATATTATGCACAATGGTTCCAGCAGAAGCC AGGCCAAGCCCCTATGTTGGTCATATATAAGGACACTGA GCGGCCCTCTGGGATCCCTGACCGATTCTCTGGCTCCAG TTCAGGAAACACACACACCCTGACCATCAGCGGGGCTC GGGCCGAGGACGAGGCCGACTATTACTGCGAGTCAGCG GTCAGTGTCTGATGCTGTTGTGTTTCGGCGGGGGCACCCAT CTGACCGTCCTCGGTCAGCCCAAGGCCTCCCCCTCGGTC ACACTCTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTCGGCGCCAAC AAGGCCACCCTGGTGTGCCTCATCAGCGACTTCTACCCC AGCGGCGTGACGGTGGCCTGGAAGGCAGACGGCAGCCC CATCACCCAGGGCGTGGAGACCACCAAGCCCTCCAAGC AGAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTACCTGAGC CTGACGCCTGACAAGTGGAATCTCACAGCAGCTTCAG CTGCCTGGTCACGCACGAGGGGAGCACCGTGGAGAAGA AGGTGGCCCCCGCAGAGTGCTCT
43	A6 HCDR1	蛋白质	GFTFSSYD
44	A6 HCDR2	蛋白质	ITTSGGST
45	A6 HCDR3	蛋白质	AVGALGD
46	A6 LCDR1	蛋白质	ASNIGLIG
47	A6 LCDR2	蛋白质	SDG
48	A6 LCDR3	蛋白质	QSIDSSLGDHFV
49	A6 VH	蛋白质	EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSSYDMNWVRQS PGKGLQWVAAITTSGGSTYYTDAVKGRFTISRDNKNTLY LQMNNLRAEDTAVYYCAVGALGDWGQGTLVTVSS
50	A6 VH	DNA	GAGGTACAGCTGGTGAATCTGGGGGAGACTTGGTGAA

[0229]

			GCCTGGGGGGTCCCTTGAGACTGTCCTGTGTGGCCTCTGG ATTACCTTCAGTAGCTATGACATGAACTGGGTCCGTCA GTCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGGTTCGACGCTATTAC CACTAGTGGAGGTAGTACATACTACACAGACGCTGTGAA GGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACA CACTATATCTGCAGATGAACAACCTGAGAGCCGAGGACA CGGCTGTGTATTATTGTGCAGTAGGGGCTCTTGGTGACT GGGGCCAGGGCACCTGGTCACTGTCTCCTCA
51	A6 VL	蛋白质	QPVLTPPPSVSGALGQKVTISCSGSASNI GLIGAGWYQQVP GKAPKLLVYSDGNRPPQIPARFSGSNSGNSATLTIAGLQAE DEADYYCQSIDSSLGDHVFVGGGTHLTVL
52	A6 VL	DNA	CAGCCTGTGCTCACTCAGCCGCCCTCAGTGTGCGGGGCC CTTGCCAGAAAGGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCGCG AGCAACATCGGTCTTATTGGTGC GGGCTGGTACCAACAA GTCCCAGGAAAGGCCCTAAACTCCTCGTGACAGTGAT GGGAATCGACCGCCACAAATCCCTGCCCGGTTCTCCGGC TCCAACCTCTGGCAACTCAGCCACCCTGACTATCGCTGGG CTTCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGTCAGTCT ATTGATTCCAGCCTTGGTGATCATTTTGTGTTCGGCGGAG GCACCCATCTGACCGTCCTC
53	A6 scFv	蛋白质	QPVLTPPPSVSGALGQKVTISCSGSASNI GLIGAGWYQQVP GKAPKLLVYSDGNRPPQIPARFSGSNSGNSATLTIAGLQAE DEADYYCQSIDSSLGDHVFVGGGTHLTVLGGGSSRSSSSG GGGSGGGGEVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSSY DMNWVRQSPGKGLQWVAAITSSGGSTYYTDAVKGRFTIS RDNAKNTLYLQMNNLRAEDTAVYYCAVGALGDWQGQTL VTVSS
54	A6 scFv	DNA	CAGCCTGTGCTCACTCAGCCGCCCTCAGTGTGCGGGGCC CTTGCCAGAAAGGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCGCG AGCAACATCGGTCTTATTGGTGC GGGCTGGTACCAACAA GTCCCAGGAAAGGCCCTAAACTCCTCGTGACAGTGAT GGGAATCGACCGCCACAAATCCCTGCCCGGTTCTCCGGC TCCAACCTCTGGCAACTCAGCCACCCTGACTATCGCTGGG CTTCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGTCAGTCT ATTGATTCCAGCCTTGGTGATCATTTTGTGTTCGGCGGAG GCACCCATCTGACCGTCCTCGGTGGTGGTTCCCTCTAGAT CTTCCTCCTCTGGCGGCGGTGGCTCGGGCGGTGGTGGG GAGGTACAGCTGGTGGAATCTGGGGGAGACTTGGTGAA GCCTGGGGGGTCCCTTGAGACTGTCCTGTGTGGCCTCTGG ATTACCTTCAGTAGCTATGACATGAACTGGGTCCGTCA GTCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGGTTCGACGCTATTAC CACTAGTGGAGGTAGTACATACTACACAGACGCTGTGAA GGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACA CACTATATCTGCAGATGAACAACCTGAGAGCCGAGGACA

[0230]

			CGGCTGTGTATTATTGTGCAGTAGGGGCTCTTGGTGACT GGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCA
55	A6 重链全长 IgG4	蛋白质	EVQLVESGGDLVKPGGSLRLSCVASGFTFSSYDMNWVRQS PGKGLQWVAAITTSGGSTYYTDAVKGRFTISRDNANKNTLY LQMNNLRAEDTAVYYCAVGALGDWQGGLTVTVSSASTTA PSVFPLAPSCGSTSGSTVALACLVSIFYPEPVTVSWNSGSLT SGVHTFPSVLQSSGLYSLSSMVTVPSSRPSETFTCNVVHP ASNTKVDKVPKESTCKCISPCVPPELGGPSVFIFPPKPKDI LRITRTPEITCVVLDLGREDPEVQISWFVDGKEVHTAKTQP REQQFNSTYRVVSVLPIDHQDWLTGKEFKCRVNHIGLPSPI ERTISKARGQAHQPSVYVLPSPKELSSSDTVTLTCLIKDFF PPEIDVEWQSNQPEPEISKYHTTAPQLDEDGSYFLYSKLSV DKSRWQQGDPFTCAVMHEALQNHYTDLSSLHSPGK
56	A6 重链全长 IgG4	DNA	GAGGTACAGCTGGTGAATCTGGGGGAGACTTGGTGAA GCCTGGGGGGTTCCTTGAGACTGTCCTGTGTGGCCTCTGG ATTCACCTTCAGTAGCTATGACATGAAGTGGGTCCGTC GTCTCCAGGGAAGGGGCTGCAGTGGGTGCGCAGCTATTAC CACTAGTGGAGGTAGTACATACTACACAGACGCTGTGAA GGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACA CACTATATCTGCAGATGAACAACCTGAGAGCCGAGGACA CGGCTGTGTATTATTGTGCAGTAGGGGCTCTTGGTGACT GGGGCCAGGGCACCCCTGGTCACTGTCTCCTCAGCTAGC ACCACGGCCCCCTCGGTTTTCCCACTGGCCCCCAGCTGC GGGTCCACTTCCGGCTCCACGGTGGCCCTAGCCTGCCTG GTGTCAGGCTACTTCCCCGAGCCTGTAACTGTGTCTCTGG AACTCCGGCTCCTTGACCAGCGGTGTGCACACCTTCCCG TCCGTCCTGCAGTCTCAGGGCTCTACTCCCTCAGCAGC ATGGTGACAGTGCCTTCCAGCAGGTGGCCAGCGAGAC CTTACCTGCAACGTGGTCCACCCGGCCAGCAACACTA AAGTAGACAAGCCAGTGCCCAAAGAGTCCACCTGCAAG TGTATATCCCCATGCCAGTCCCTGAATCACTGGGAGGG CCTTCGGTCTTCATCTTTCCCCGAAACCCAAGGACATC CTCAGGATTACCCGAACACCCGAGATCACCTGTGTGGTG TTAGATCTGGGCCGTGAGGACCCTGAGGTGCAGATCAGC TGGTTCGTGGATGGTAAGGAGGTGCACACAGCCAAGAC GCAGCCTCGTGAGCAGCAGTTCAACAGCACCTACCGTG TGGTCAGCGTCCTCCCCATTGAGCACCAGGACTGGCTCA CCGGAAGGAGTTCAAGTGCAGAGTCAACCACATAGGC CTCCCGTCCCCCATCGAGAGGACCATCTCCAAAGCCAGA GGGCAAGCCCATCAGCCAGTGTGTATGTCCTGCCACCA TCCCCAAAGGAGTTGTCATCCAGTGACACGGTCACCCCTG ACCTGCCTGATCAAAGACTTCTTCCCACCTGAGATTGAT GTGGAGTGGCAGAGCAATGGACAGCCAGAGCCTGAGAG CAAGTACCACACGACTGCACCCAGCTGGACGAGGACG

[0231]

			GGTCCTACTTCCTGTACAGCAAGCTCTCTGTGGACAAGA GCCGCTGGCAGCAGGGAGACCCCTTCACATGTGCGGTG ATGCATGAAGCTCTACAGAACCCTACACAGATCTATCC CTCTCCCATTTCTCCGGGTA
57	A6 轻链全长 IgG4	蛋白质	QPVLTQPPSVSGALGQKVTISCSGSASNIGLIGAGWYQQVP GKAPKLLVYSDGNRPPQIPARFSGSNSGNSATLTIAQLQAE DEADYYCQSIDSSLGDHFVFGGGTHLTVLGQPKASPSVTL FPPSSEELGANKATLVCLISDFYPSGVTVAWKADGSPITQG VETTKPSKQSNKYYAASSYLSLTPDKWKSHSSFSLVTHEG STVEKKVAPAECS
58	A6 轻链全长 IgG4	DNA	CAGCCTGTGCTCACTCAGCCGCCCTCAGTGTGCGGGGCC CTTGCCAGAAGGTCACCATCTCCTGCTCTGGAAGCGCG AGCAACATCGGTCTTATTGGTGCAGGGCTGGTACCAACAA GTCCAGGAAAGGCCCTAAACTCCTCGTGTACAGTGAT GGGAATCGACCGCCACAAATCCCTGCCGGTTCTCCGGC TCCAACCTGTGCAACTCAGCCACCCTGACTATCGCTGGG CTTCAGGCTGAGGACGAGGCTGATTATTACTGTCAGTCT ATTGATTCCAGCCTTGGTGATCATTTTGTGTTGCGCGGAG GCACCCATCTGACCGTCCTAGGTCAGCCCAAGGCCTCCC CCTCGGTCACACTCTTCCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTCG GCGCAACAAGGCCACCCTGGTGTGCCTCATCAGCGAC TTCTACCCAGCGCGGTGACGGTGGCCTGGAAGGCAGA CGGCAGCCCCATCACCCAGGGCGTGGAGACCACCAAGC CCTCCAAGCAGAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGC TACCTGAGCCTGACGCCTGACAAGTGGAATCTCACAG CAGCTTCAGCTGCCTGGTCACGCACGAGGGGAGCACCG TGGAGAAGAAGGTGGCCCCCGCAGAGTGCTCT
59	全长 HC/LC 的前导序列	DNA	ATGTACAGGATGCAACTCCTGTCTTGCATTGCACTAAGTC TTGCACTTGTCACGAATTCG
60	全长 HC/LC 的前导序列	蛋白质	MYRMQLLSICIALSLALVTNS
61	接头和 HA 标 记	DNA	GGCGGAGGCTCCGGAGGCGGATCTTACCCATACGATGTT CCAGATTACGCT
62	接头和 HA 标 记	蛋白质	GGSGGGSYPYDVPDYA
63	scFv 的 IgG 片 段和 6x HIS 标记	DNA	GCCTCCACCACGGCCCCCTCGGTCACTAGTGGCCAGGCC GGCCAGCACCATCACCATCACCATGGCGCATACCCGTAC GACGTTCCGGACTACGCTTCT
64	scFv 的 IgG 片 段和 6x HIS 标记	蛋白质	ASTTAPSVTSGQAGQHSHHHHHGAYPYDVPDYAS

[0232] PD-1阻断

[0233] 在一些方面中,本公开内容中描述的结合多肽、抗体或其抗原结合片段可与犬PD-1结合,并且因此可阻断犬PD-1与其天然配体的相互作用以及与这种相互作用相关的任何下游信号传导途径。在一些情况下,本文所描述的抗体或抗原结合片段可与犬PD-1上与犬

PD-1的天然配体识别的区域相同的区域结合。在一些情况下,本文所描述的抗体或抗原结合片段可与犬PD-1上与犬PD-1的天然配体识别的区域不同的区域结合。在一些情况下,本文所描述的抗体或抗原结合片段与犬PD-1的结合会阻碍犬PD-1的天然配体识别的区域。在一些情况下,本文所描述的抗体或抗原结合片段与犬PD-1的结合可阻止犬PD-1与其天然配体(例如,犬PD-L1)的相互作用。在一些情况下,本文所描述的抗体或抗原结合片段与犬PD-1的结合可抑制可被犬PD-1的天然配体(比如PD-L1)激活的犬PD-1信号传导途径。

[0234] 程序性死亡蛋白1 (PD-1或PD1) 又称“程序性细胞死亡蛋白1”和CD279,是跨膜受体的免疫球蛋白超家族的成员,包括刺激性受体和调节性受体。PD-1的胞内结构域包括位于基于免疫受体酪氨酸的抑制基序 (ITIM) 中的两个磷酸化位点,其经由T细胞受体 (TCR) 传递阻止T细胞激活的信号。虽然PD-1在初始(naïve)、静止的CD4⁺和CD8⁺T细胞上不表达,但在激活的T细胞表面会强烈上调。PD-1的配体是PD-L1和PD-L2,其为B7受体家族的部分,并且都能向T细胞传递负信号。两种PD-1配体的表达可以是组成型的,或者可以在多种细胞类型中被诱导。PD-L1通常响应信号比如脂多糖 (LPS)、IFN γ 和GM-CSF在抗原递呈细胞比如巨噬细胞和树突状细胞上表达,但也可在包括微血管内皮细胞的外周非淋巴细胞以及器官组织比如心脏和肺上发现。具体而言,IFN γ 信号传导导致PD-L1表达,其中它有助于限制炎症。PD-L2主要由抗原递呈细胞表达,但也可在包括胃肠道、骨骼肌和胰腺的多种组织中发现。

[0235] PD-L1和PD-L2二者通过许多癌症强有力地表达,作为逃避免疫识别和杀伤,有效减弱针对它们的T细胞反应的机制。事实上,PD-1配体的高表达通常与预后不良和更具侵袭性的疾病有关。类似地,肿瘤微环境中的IFN γ 信号传导,例如通过抗肿瘤细胞毒性CD8⁺T细胞的存在所产生的IFN γ 信号传导,可刺激多种类型的肿瘤细胞表达PD-L1。在许多原发性癌症中发现了肿瘤浸润T细胞上PD-1和肿瘤细胞上PD-L1的肿瘤相关表达,这些癌症包括但不限于宫颈癌、肺癌、肝癌、卵巢癌、皮肤癌(包括黑素瘤和鳞状细胞癌)、结肠癌、膀胱癌、乳腺癌、肾癌、食管癌、胃癌、胰腺癌、头颈癌等。

[0236] PD-1信号传导途径的阻断和抑制被用作慢性感染的治疗策略,其中抑制PD-1可逆转或防止T细胞衰竭并保持细胞毒性功能。慢性感染包括病毒感染。这种感染的特征通常是CD8⁺T细胞的衰竭或功能受损,这导致受试者无法解决感染。在慢性感染的动物模型(例如,犬或宠物狗)中阻断PD-1可以防止T细胞衰竭,并维持有反应的T细胞的数量和功能,并提高病原体清除率和受试者存活率。

[0237] 本文公开的全犬抗PD-1可用于抑制PD-1信号传导途径,并且因此用作狗的抗肿瘤疗法和人类免疫肿瘤学转化研究的重要比较工具。

[0238] 核酸和表达载体

[0239] 本公开内容提供了一种编码多肽的分离核酸。本公开内容的核酸可包括编码本文公开的结合多肽、scFv、抗体或其任何片段中的任一个的多核苷酸序列。

[0240] 本公开内容的一个方面包括一种编码结合多肽的分离核酸,其包括与犬程序性死亡蛋白1 (PD-1) 特异性结合的抗原结合结构域。

[0241] 在某些实施方式中,核酸包括抗原结合结构域,该抗原结合结构域包括包含三个重链互补决定区 (HCDR) 的重链可变区和包含三个轻链互补决定区 (LCDR) 的轻链可变区。HCDR1包括氨基酸序列 (SEQ ID NO:1、27或43),和/或HCDR2包括氨基酸序列 (SEQ ID NO:2、28或44),和/或HCDR3包括氨基酸序列 (SEQ ID NO:3、29或45) 和/或LCDR1包括氨基酸序列

(SEQ ID NO:4、30或46),和/或LCDR2包括氨基酸序列(SEQ ID NO:5、31或47),和/或LCDR3包括氨基酸序列(SEQ ID NO:6、32或48)。

[0242] 在某些实施方式中,结合多肽包括抗体或其抗原结合片段。在某些实施方式中,抗原结合片段选自Fab、单链可变片段(scFv)、单结构域抗体、sc(Fv)2、dsFv、Fab、Fab'、(Fab')2和双抗体。在某些实施方式中,抗体为全长抗体。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段是犬抗体或犬源化抗体或其片段。

[0243] 在某些实施方式中,重链可变区由包括与SEQ ID NO:8、10、34或50具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的多核苷酸序列的核酸编码。

[0244] 在某些实施方式中,重链可变区由包括SEQ ID NO:8、10、34或50中所列的多核苷酸序列的核酸编码。

[0245] 在某些实施方式中,重链可变区通过由SEQ ID NO:8、10、34或50中所列的多核苷酸序列组成的核酸编码。

[0246] 在某些实施方式中,轻链可变区由包括与SEQ ID NO:12、36或52中所列的轻链可变区的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的多核苷酸序列的核酸编码。在某些实施方式中,轻链可变区由包括SEQ ID NO:12、36或52中所列的多核苷酸序列的核酸编码。在某些实施方式中,轻链可变区通过由SEQ ID NO:12、36或52中所列的多核苷酸序列组成的核酸编码。

[0247] 还提供了一种编码结合多肽的分离核酸,该结合多肽包括由包括SEQ ID NO:8或10中所列的多核苷酸序列的核酸序列编码的重链可变区和由包括SEQ ID NO:12中所列的多核苷酸序列的核酸序列编码的轻链可变区。

[0248] 还提供了一种编码结合多肽的分离核酸,该结合多肽包括由包括SEQ ID NO:34中所列的多核苷酸序列的核酸序列编码的重链可变区和由包括SEQ ID NO:36中所列的多核苷酸序列的核酸序列编码的轻链可变区。

[0249] 还提供了一种编码结合多肽的分离核酸,该结合多肽包括由包括SEQ ID NO:50中所列的多核苷酸序列的核酸序列编码的重链可变区和由包括SEQ ID NO:52中所列的多核苷酸序列的核酸序列编码的轻链可变区。

[0250] 还提供了一种编码单链可变片段(scFv)的分离核酸,该单链可变片段包括包含三个重链互补决定区(HCDR)的重链可变区和包含三个轻链互补决定区(LCDR)的轻链可变区。HCDR1包括氨基酸序列(SEQ ID NO:1、27和43),和/或HCDR2包括氨基酸序列(SEQ ID NO:2、28或44),和/或HCDR3包括氨基酸序列(SEQ ID NO:3、29和45),和/或LCDR1包括氨基酸序列(SEQ ID NO:4、30或46,和/或LCDR2包括氨基酸序列(SEQ ID NO:5、31或47),和/或LCDR3包括氨基酸序列(SEQ ID NO:6、32或48)。

[0251] 还提供了一种编码单链可变片段(scFv)的分离核酸,该单链可变片段包括:包括SEQ ID NO:8或10中所列的核苷酸序列的重链可变区;和/或包括SEQ ID NO:12中所列的核苷酸序列的轻链可变区。重链可变区和轻链可变区由接头连接。

[0252] 还提供了一种编码单链可变片段(scFv)的分离核酸,该单链可变片段包括SEQ ID NO:14、16、18、38或54中所列的多核苷酸序列。还提供了一种编码单链可变片段(scFv)的分离核酸,该单链可变片段由SEQ ID NO:14、16、18、38或54中所列的多核苷酸序列组成。

[0253] 还提供了一种编码全长抗体的分离核酸,该全长抗体包括SEQ ID NO:20、22、40或

56中所列的重链多核苷酸序列和SEQ ID NO:26、42或58中所列的轻链多核苷酸序列。还提供了一种编码全长抗体的分离核酸,该全长抗体由SEQ ID NO:20、22、40或56中所列的重链多核苷酸序列和SEQ ID NO:26、42或58中所列的轻链多核苷酸序列组成。

[0254] 核酸序列的可容许变化将是本领域技术人员已知的。例如,在一些实施方式中,编码全长重链的核酸包括与SEQ ID NO:20、22、40或56中所列的任一个核苷酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的核苷酸序列,并且编码全长轻链的核酸包括与SEQ ID NO:26、42或58中所列的任一个核苷酸序列具有至少80%、至少81%、至少82%、至少83%、至少84%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性的核苷酸序列。

[0255] 在某些实施方式中,本公开内容的核酸包括第一多核苷酸序列和第二多核苷酸序列。第一和第二多核苷酸序列可以通过接头连接。例如,在某些实施方式中,scFv的重链可变区和轻链可变区通过接头连接。在某些实施方式中,核酸包括从5'至3'的第一多核苷酸序列、接头和第二多核苷酸序列。在某些实施方式中,核酸包括从5'至3'的第二多核苷酸序列、接头和第一多核苷酸序列。

[0256] 本公开内容的另一方面提供了一种包括本文公开的任一种分离核酸的载体。在某些实施方式中,载体选自DNA载体、RNA载体、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体、腺伴随病毒载体和逆转录病毒载体。在某些实施方式中,载体是表达载体。

[0257] 还提供了一种包括本文公开的任何载体或核酸的宿主细胞。宿主细胞可以是真核生物、原核生物、哺乳动物或细菌来源的。可用于表达本文公开的抗PD-1抗体或scFv的抗原结合片段的细胞的非限制性实例包括人类胚胎肾(HEK)细胞系(例如,HEK293)、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系、小鼠肾(BHK)细胞系、COS细胞系、马丁达比犬肾(MDCK)细胞系和HeLa细胞系。在一些情况下,宿主细胞是中国仓鼠卵巢细胞。

[0258] 本文还提供了一种生产与犬PD-1结合的抗体、结合多肽或scFv的方法,其中该方法包括培养宿主细胞。在一些实施方式中,该方法进一步包括在足以使本文描述的抗PD-1抗体或其抗原结合片段或scFv表达和分泌的条件下,在细胞培养基中培养宿主细胞。

[0259] 在一些实施方式中,本公开内容的核酸可与转录控制元件,例如,启动子和增强子等可操作地连接。合适的启动子和增强子元件是本领域技术人员已知的。

[0260] 在某些实施方式中,核酸与启动子可操作地连接。在某些实施方式中,启动子是磷酸甘油酸激酶-1(PGK)启动子。

[0261] 对于在细菌细胞中的表达,合适的启动子包括但不限于lacI、lacZ、T3、T7、gpt、lambda P和trc。对于在真核细胞中的表达,合适的启动子包括但不限于轻链和/或重链免疫球蛋白基因启动子和增强子元件;巨细胞病毒即早期启动子;单纯疱疹病毒胸苷激酶启动子;早期和晚期SV40启动子;存在于逆转录病毒长末端重复序列中的启动子;小鼠金属硫蛋白-I启动子;以及各种本领域已知的组织特异性启动子。合适的可逆启动子,包括可逆的诱导型启动子,都是本领域已知的。这种可逆启动子可以从许多生物体,例如,真核生物和原核生物中分离和提取。对源自第一种生物的可逆启动子进行修饰以用于第二种生物,例

如,第一种原核生物和第二种真核生物、第一种真核生物和第二种原核生物等,在本领域是众所周知的。这种可逆启动子以及基于这种可逆启动子但还包括另外的控制蛋白的系统包括但不限于醇调控启动子(例如,醇脱氢酶I(alcA)基因启动子、对醇转化激活因子蛋白(A1cR)有反应的启动子等)、四环素调控启动子(例如,包括TetActivators、TetON、TetOFF等的启动子系统)、类固醇调控启动子(例如,大鼠糖皮质激素受体启动子系统、人雌激素受体启动子系统、类维生素A启动子系统、甲状腺启动子系统、蜕皮激素启动子系统、米非司酮启动子系统等)、金属调控启动子(例如,金属硫蛋白启动子系统等)、发病机制相关调控启动子(例如,水杨酸调控启动子、乙烯调控启动子、苯并噻二唑调控启动子等)、温度调控启动子(例如,热休克诱导型启动子(例如,HSP-70、HSP-90、大豆热休克启动子等)、光调控启动子、合成诱导型启动子等。

[0262] 对于在酵母细胞中的表达,合适的启动子是组成型启动子,比如ADH1启动子、PGK1启动子、ENO启动子、PYK1启动子等;或可调控的启动子比如GAL1启动子、GAL10启动子、ADH2启动子、PHOS启动子、CUP1启动子、GALT启动子、MET25启动子、MET3启动子、CYC1启动子、HIS3启动子、ADH1启动子、PGK启动子、GAPDH启动子、ADC1启动子、TRP1启动子、URA3启动子、LEU2启动子、ENO启动子、TP1启动子和AOX1(例如,用于毕赤酵母属)。选择合适的载体和启动子完全在本领域技术人员的水平内。用于原核宿主细胞的合适的启动子包括但不限于:噬菌体T7 RNA聚合酶启动子;trp启动子;lac操作子启动子;混合启动子,例如:lac/tac混合启动子、lac/tac混合启动子、tac/trc混合启动子、trp/lac启动子、T7/lac启动子;trc启动子;tac启动子等;araBAD启动子;体内调控启动子,比如ssaG启动子或相关启动子(参见,例如美国专利公布号20040131637)、pagC启动子(Pulkkinen和Miller, J. Bacteriol. (1991) 173 (1): 86-93; Alpuche-Aranda等人, Proc. Natl. USA (1992) 89 (21): 10079-83)、nirB启动子(Harborne等人, Mol. Micro. (1992) 6: 2805-2813)等(参见,例如Dunstan等人, Infect. Immun. (1999) 67: 5133-5141; McKelvie等人, Vaccine (2004) 22: 3243-3255; 以及Chatfield等人, Biotechnol. (1992) 10: 888-892); σ 70启动子,例如,共有 σ 70启动子(参见,例如GenBank登录号AX798980、AX798961和AX798183); 静止期启动子,例如,dps启动子、spv启动子等; 源自致病性岛SPI-2的启动子(参见,例如W096/17951); actA启动子(参见,例如Shetron-Rama等人, Infect. Immun. (2002) 70: 1087-1096); rpsM启动子(参见,例如Valdivia和Falkow Mol. Microbiol. (1996) .22: 367); tet启动子(参见,例如Hillen, W. 和Wissmann, A. (1989) In Saenger, W. and Heinemann, U. (编), Topics in Molecular and Structural Biology, Protein--Nucleic Acid Interaction. Macmillan, London, UK, 第10卷, 第143-162页); SP6启动子(参见,例如Melton等人, Nucl. Acids Res. (1984) 12: 7035); 等。用于原核生物(比如,大肠杆菌)的合适的强启动子包括但不限于Trc、Tac、T5、T7和PLambda。用于细菌宿主细胞的操作子的非限制性实例包括乳糖启动操作子(LacI抑制蛋白与乳糖接触时会改变构象,从而阻止Lad抑制蛋白与操作子结合)、色氨酸启动操作子(与色氨酸复合时, TrpR抑制蛋白具有与操作子结合的构象; 在没有色氨酸的情况下, TrpR抑制蛋白具有不与操作子结合的构象), 以及tac启动操作子(参见,例如deBoer等人, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1983) 80: 21-25)。

[0263] 合适的启动子的其他实例包括即刻早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。该启动子序列是一种能够驱动与其可操作地连接的任何多核苷酸序列的高水平表达的强组成型启

动子序列。也可使用其他组成型启动子序列,包括但不限于猿猴病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)或人体免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复(LTR)启动子、MoMuLV启动子、禽类白血病毒启动子、埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr virus)即早期启动子、劳斯肉瘤(Rous sarcom)病毒启动子、EF-1 α 启动子以及人基因启动子比如,但不限于肌动蛋白启动子、肌球蛋白启动子、血红蛋白启动子和肌酸激酶启动子。此外,本公开内容不应限于组成型启动子的使用。还考虑使用诱导型启动子作为本公开内容的一部分。诱导型启动子的使用提供了一种分子开关,当需要这种表达时,它能够开启与之可操作地连接的多核苷酸序列的表达,或者当不需要表达时关闭表达。诱导型启动子的实例包括但不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子。

[0264] 在一些实施方式中,含有合适启动子的基因座或构建体或转基因通过诱导系统的诱导进行不可逆转换。诱导不可逆转换的合适系统在本领域是众所周知的,例如,不可逆转换的诱导可利用Cre-lox介导的重组(参见例如Fuhrmann-Benzakein等人,Proc.Natl.Sci.USA(2000)28:e99,其公开内容通过引用并入本文)。本领域已知的重组酶、内切核酸酶、连接酶、重组位点等的任何适当组合都可用于产生不可逆转换启动子。本文其它地方描述的进行位点特异性重组的方法、机制和要求可用于产生不可逆转换启动子,并且是本领域众所周知的,参见,例如Grindley等人,Annual Review of Biochemistry(2006)567-605;和Tropp,Molecular Biology(2012)(Jones&Bartlett Publishers,Sudbury,Mass.),其公开内容通过引用并入本文。

[0265] 本公开内容的核酸可存在于表达载体和/或克隆载体中。表达载体可包括选择标记、复制原点和提供复制和/或维持载体的其他特征。合适的表达载体包括例如,质粒、病毒载体等。本领域技术人员已知大量合适的载体和启动子;许多在商业上可获得用于产生重组构建体。通过举例提供以下载体,并且不应以任何方式解释为限制性的:细菌的:pBs、phagescript、PsiX174、pBluescript SK、pBs KS、pNH8a、pNH16a、pNH18a、pNH46a(Stratagene,La Jolla,Calif.,USA);pTrc99A、pKK223-3、pKK233-3、pDR540和pRIT5(Pharmacia,Uppsala,Sweden)。真核的:pWNeo、pSV2cat、pOG44、PXR1、pSG(Stratagene)pSVK3、pBPV、pMSG和pSVL(Pharmacia)。

[0266] 表达载体通常在启动子序列附近有方便的限制酶切位点,以提供插入编码异源蛋白的核酸序列。表达宿主中可能存在可操作的选择标记。合适的表达载体包括但不限于病毒载体(例如基于痘苗病毒的病毒载体;脊髓灰质炎病毒;腺病毒(参见,例如Li等人,Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.(1994)35:2543-2549;Borras等人,Gene Ther.(1999)6:515-524;Li和Davidson,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1995)92:7700-7704;Sakamoto等人,H.Gene Ther.(1999)5:1088-1097;W094/12649,W093/03769;W0 93/19191;W0 94/28938;W0 95/11984和W0 95/00655);腺相关病毒(参见,例如Ali等人,Hum.Gene Ther.(1998)9:81-86,Flannery等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1997)94:6916-6921;Bennett等人,Invest.Ophthalmol.Vis.Sci.(1997)38:2857-2863;Jomary等人,Gene Ther.(1997)4:683-690;Rolling等人,Hum.Gene Ther.(1999)10:641-648;Ali等人,Hum.Mol.Genet.(1996)5:591-594;W0 93/09239、Samulski等人,J.Vir.(1989)63:3822-3828中的Srivastava;Mendelson等人,Virol.(1988)166:154-165;和Flotte等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1993)90:10613-10617);SV40;单纯疱疹病毒;人体免疫缺陷病毒(参见,例如Miyoshi等

人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA(1997) 94:10319-23;Takahashi等人,J.Virol.(1999) 73:7812-7816);逆转录病毒载体(例如,鼠白血病病毒、脾坏死病毒和源自逆转录病毒的载体,比如劳斯肉瘤病毒、哈维肉瘤病毒、禽白血病病毒、人体免疫缺陷病毒、骨髓增生性肉瘤病毒和乳腺肿瘤病毒);等。

[0267] 适合使用的另外的表达载体是例如但不限于慢病毒载体、 γ 逆转录病毒载体、泡沫病毒载体、腺相关病毒载体、腺病毒载体、痘病毒载体、疱疹病毒载体、工程化的杂交病毒载体、转座子介导的载体等。病毒载体技术在本领域是众所周知的,并且例如在Sambrook等人,2012,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第1-4卷,Cold Spring Harbor Press,NY)以及其他病毒学和分子生物学手册中进行了描述。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒和慢病毒。

[0268] 一般来说,合适的载体包含在至少一种生物体中起作用的复制原点、启动子序列、方便的限制性内切酶位点和一个或多个选择标记(例如,WO 01/96584;WO 01/29058;和美国专利号6,326,193)。

[0269] 在一些实施方式中,可使用表达载体(例如,慢病毒载体)将核酸导入宿主细胞中。因此,本公开内容的表达载体(例如,慢病毒载体)可包括编码多肽的核酸。在一些实施方式中,表达载体(例如,慢病毒载体)将包括有助于其中编码的多肽的功能性表达的附加元件。在一些实施方式中,包括编码多肽的核酸的表达载体进一步包括哺乳动物启动子。在一个实施方式中,载体进一步包括一个延伸因子-1- α 启动子(EF-1 α 启动子)。使用EF-1 α 启动子可提高下游转基因的表达效率。生理启动子(例如,EF-1 α 启动子)不太可能诱导整合介导的遗传毒性,并且可能削弱逆转录病毒载体转化干细胞的能力。适合用于载体(例如,慢病毒载体)的其他生理启动子是本领域技术人员已知的,并且可并入本公开内容的载体中。在一些实施方式中,载体(例如,慢病毒载体)进一步包括可提高滴度和基因表达的非必需顺式作用序列。非必要顺式作用序列的一个非限制性实例是中心多嘌呤束和中心终止序列(cPPT/CTS),它对有效的逆转录和核导入非常重要。其他非必要顺式作用序列是本领域技术人员已知的,并且可整合到本公开内容的载体(例如,慢病毒载体)中。在一些实施方式中,载体进一步包括转录后调控元件。转录后调控元件可改善RNA翻译、改善转基因表达和稳定RNA转录体。转录后调控元件的一个实例是土拨鼠肝炎病毒转录后调控元件(WPRE)。因此,在一些实施方式中,本公开内容的载体进一步包含WPRE序列。各种转录后调控元件是本领域技术人员已知的,并且可整合到本公开内容的载体(例如,慢病毒载体)中。本公开内容的载体可进一步包括另外的元件,比如用于RNA转运的rev反应元件(RRE)、包装序列以及5'和3'长末端重复序列(LTR)。术语“长末端重复序列(long terminal repeat)”或“LTR”是指位于逆转录病毒DNA末端的碱基对结构域,其包括U3、R和U5区域。LTR通常提供逆转录病毒基因表达(例如,基因转录体的促进、起始和多腺苷酸化)和病毒复制所需的功能。在一个实施方式中,本公开内容的载体(例如,慢病毒载体)包括3' U3删除的LTR。因此,本公开内容的载体(例如,慢病毒载体)包括本文所述的元件的任何组合,以提高转基因功能表达的效率。例如,除了编码CAR的核酸外,本公开内容的载体(例如,慢病毒载体)可包括WPRE序列、cPPT序列、RRE序列、5' LTR、3' U3删除的LTR'。

[0270] 本公开内容的载体可以是自失活载体。如本文所使用的,术语“自失活载体(self-inactivating vector)”是指3' LTR增强子启动子区(U3区)已被修饰(例如,通过删除或替

换)的载体。自失活载体可防止病毒转录超过第一轮病毒复制。因此,自失活载体只能感染宿主基因组(例如,哺乳动物基因组)一次,并且然后整合到其中,并且不能继续传递。因此,自失活载体可以大大降低产生具有复制能力病毒的风险。

[0271] 在一些实施方式中,本公开内容的核酸可以是RNA,例如,体外合成的RNA。体外合成RNA的方法是本领域技术人员已知的;任何已知的方法都可用来合成包括编码本公开内容的多肽的序列的RNA。将RNA导入宿主细胞中的方法在本领域是已知的。例如,参见Zhao等人,Cancer Res. (2010) 15:9053。将包括编码本公开内容的多肽的核苷酸序列的RNA导入宿主细胞中可在体外、离体或体内进行。例如,宿主细胞(例如,NK细胞、细胞毒性T淋巴细胞等)可在体外或离体用包括编码本公开内容的多肽的核苷酸序列的RNA电穿孔。

[0272] 为了评估多肽或其部分的表达,要导入细胞的表达载体还可含有选择标记基因或报告基因,或两者,以便于从试图通过病毒载体转染或感染的细胞群中鉴定和选择表达细胞。在一些实施方式中,选择标记可携带在单独的DNA片段上,并在共转染过程中使用。选择标记和报告基因的侧翼都可以有适当的调控序列,以实现在宿主细胞中的表达。有用的选择标记包括但不限于抗生素抗性基因。

[0273] 报告基因可用于识别潜在的转染细胞和评估调控序列的功能。一般来说,报告基因是在受体生物体或组织中不存在或不被其表达并且编码多肽的基因,其表达表现为某种易于检测的特性,例如,酶活性。在DNA导入受体细胞后的适当时间对报告基因的表达进行评估。合适的报告基因可包括但不限于编码荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰转移酶、分泌型碱性磷酸酶或绿色荧光蛋白基因的基因(例如,Ui-Tei等人,2000FEBS Letters 479:79-82)。

[0274] 在一些实施方式中,提供本公开内容的核酸用于在例如宿主细胞中生产本文所述的多肽。在一些实施方式中,本公开内容的核酸提供了编码多肽的核酸的扩增。

[0275] 免疫缀合物

[0276] 本公开内容还提供了包括本文公开的抗PD-1抗体或抗原结合片段或scFv的任一种的免疫缀合物。在一些实施方式中,免疫缀合物包括与试剂连接的公开的抗体或抗原结合片段或scFv。在一些实施方式中,免疫缀合物包括与试剂连接的本文公开的双特异性分子。试剂可以是治疗剂。试剂可以是诊断剂。

[0277] 对于诊断剂,合适的试剂可以包括可检测标签。可检测标签的非限制性实例包括用于全身成像的放射性同位素,以及用于样品测试的放射性同位素、酶、荧光标签和其他合适的抗体标记。可与本文所描述的任何抗PD-1抗体连接的可检测标签可以是体外诊断领域目前使用的各种类型中的任何一种,包括颗粒物标签,其包括金属溶胶(比如胶体金);同位素,比如例如与N2S2、N3S或N4类型的肽螯合剂一起存在的 I^{125} 或 ^{99m}Tc ;发色团,包括荧光标记、发光标记、磷光标记等;以及将给定底物转化为可检测标记的酶标记;以及在扩增(比如通过聚合酶链反应)后显现的多核苷酸标记。合适的酶标签包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶等。例如,标签可以通过测量在1,2-氧杂环丁烷底物(比如金刚烷基甲氧基磷酰氧基苯基二氧杂环丁烷(AMPPD)、3-(4-(甲氧基螺{1,2-二氧杂环丁烷-3,2'-(5'-氯)三环{3.3.1.1^{3,7}}癸烷)-4-基)苯基磷酸二钠(CSPD)以及CDP和CDP-STAR®)或本领域技术人员众所周知的其他发光底物(例如,合适的镧系元素比如铽(III)和铕(III)的螯合物)转化后化学发光的存在或形成来检测的碱性磷酸酶。检测手段由所选择的标签决定。标签或其

反应产物的外观可以使用肉眼(在标签是颗粒物并以适当的水平聚集的情况下)或者使用仪器比如分光光度计、发光计、荧光计来获得,所有均按照标准实践。

[0278] 在一些实施方式中,缀合方法产生基本上(或接近)非免疫原性的键,例如肽键(即,酰胺键)、硫键(立体位阻)、二硫键、胺键和醚键。这些键是接近非免疫原性的,并在血清中显示出合理的稳定性;参见例如, Senter, P.D., *Curr. Opin. Chem. Biol.* 13 (2009) 235-244; WO 2009/059278; WO 95/17886。

[0279] 可采用不同的缀合策略,这取决于试剂和抗PD-1抗体或scFv的生化性质。在试剂是天然存在的或50至500个之间的氨基酸的重组体的情况下,教科书中有描述蛋白质缀合物合成化学的标准程序,技术人员可以很容易地遵循这些程序(参见,例如, Hackenberger, C.P.R. 和 Schwarzer, D., *Angew. Chem. Int. Ed.* 47 (2008) 10030-10074)。在一些实施方式中,使用马来酰亚胺试剂与抗体或试剂内的半胱氨酸残基反应。在使用例如抗体的Fab或Fab'-片段的情况下,这是一种特别合适的偶联化学反应。可选地,在一些实施方式中,与抗体或试剂的C-末端进行偶联。蛋白质,例如Fab片段的C-末端修饰可按所描述的进行(Sunbul, M. 和 Yin, J., *Org. Biomol. Chem.* 7 (2009) 3361-3371)。

[0280] 一般来说,位点特异性反应和共价偶联基于将天然氨基酸转化为具有与其他存在的官能团的反应性正交的反应性的氨基酸。例如,稀有序列上下文中的特定半胱氨酸在醛中可以酶促地转化(参见 Frese, M.A. 和 Dierks, T., *ChemBioChem.* 10 (2009) 425-427)。通过利用某些酶与给定序列上下文中的天然氨基酸的特定酶反应性,也可能获得期望的氨基酸修饰(参见,例如, Taki, M. 等人, *Prot. Eng. Des. Sel.* 17 (2004) 119-126; Gautier, A. 等人, *Chem. Biol.* 15 (2008) 128-136; 和 Bordusa, F. 的 *Protease-catalyzed formation of C-N bonds is used, Highlights in Bioorganic Chemistry* (2004) 389-403)。通过末端氨基酸与适当的修饰剂的选择性反应,也可实现位点特异性反应和共价偶联。

[0281] N-末端半胱氨酸与苄腈的反应性(参见 Ren, H. 等人, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 48 (2009) 9658-9662)可用于实现位点特异性共价偶联。

[0282] 天然化学连接也可依赖于C-末端半胱氨酸残基(Taylor, E. Vogel; Imperiali, B., *Nucleic Acids and Molecular Biology* (2009), 22 (Protein Engineering), 65-96)。US6437095 B1描述了一种缀合方法,该方法基于带负电荷的氨基酸片段中的半胱氨酸与位于带正电荷的氨基酸片段中的半胱氨酸的更快速的反应。

[0283] 试剂也可以是合成肽或肽模拟物。在化学合成多肽的情况下,可以在这种合成期间并入具有正交化学反应性的氨基酸(参见例如, de Graaf, A.J. 等人, *Bioconjug. Chem.* 20 (2009) 1281-1295)。由于多种正交官能团处于得失攸关(at stake)并且可以引入合成肽中,因此这种肽与接头的缀合是标准化学。

[0284] 为了获得单标记多肽,可以通过色谱法将1:1化学计量的缀合物与其他缀合副产物分离。使用染料标记的结合对成员和带电荷的接头有利于这一过程。通过使用这种标记的、带高负电荷的结合对成员,单缀合多肽很容易与未标记的多肽和携带多于一个接头的多肽分离,因为电荷和分子量的差异可用于分离。荧光染料可用于从未结合的组分中纯化复合物,就像标记的单价结合剂一样。

[0285] 在一些实施方式中,与抗CPD-1抗体连接的试剂选自结合部分、标记部分和生物活性部分。

[0286] 本文所描述的抗-CPD-1抗体还可与治疗剂缀合以形成免疫缀合物,比如抗体-药物缀合物(ADC)。合适的治疗剂包括抗代谢物、烷化剂、DNA小沟结合剂、DNA嵌入剂、DNA交联剂、组蛋白脱乙酰酶抑制剂、核输出抑制剂、蛋白酶体抑制剂、拓扑异构酶I或II抑制剂、热休克蛋白抑制剂、酪氨酸激酶抑制剂、抗生素和抗有丝分裂试剂。在ADC中,抗体和治疗剂优选地经由可裂解的接头(比如肽基、二硫化物或脰接头)缀合。在一些实施方式中,接头是肽基接头,比如Val-Cit、Ala-Val、Val-Ala-Val、Lys-Lys、Pro-Val-Gly-Val-Val (SEQ ID NO:78)、Ala-Asn-Val、Val-Leu-Lys、Ala-Ala-Asn、Cit-Cit、Val-Lys、Lys、Cit、Ser或Glu。ADC可以按照美国专利号7,087,600;6,989,452;和7,129,261;PCT公开WO 02/096910;WO 07/038658;WO 07/051081;WO 07/059404;WO 08/083312;和WO 08/103693;美国专利公开20060024317;20060004081;和20060247295中所描述的制备。

[0287] 本文所描述的抗cPD-1抗体或scFv也可用于检测组织或组织样品中的犬PD-1,例如cPD-1。抗体可用于,例如ELISA测定或流式细胞术中。在一些实施方式中,抗cPD-1抗体与细胞(例如,组织中的细胞)接触适合发生特异性结合的时间,并且然后加入试剂(例如,检测抗cPD-1抗体的抗体)。实施例提供了示例性测定。抗cPD-1抗体可以是全犬抗体。抗cPD-1抗体可以是犬源化抗体或嵌合抗体。检测样品(细胞或组织样品)中的cPD-1的示例性方法包括:(i)将样品与抗cPD-1抗体接触足以使抗cPD-1抗体与样品中的cPD-1特异性结合的时间;(2)将样品与检测试剂(例如,抗体)接触,该检测试剂与抗cPD-1抗体,比如抗cPD-1抗体的Fc区特异性结合,从而检测出与抗cPD-1抗体结合的cPD-1。在与抗体和/或检测试剂温育后,还可包括冲洗步骤。这些方法中使用的抗cPD-1抗体不必与标签或检测试剂相连,因为可以使用单独的检测试剂。

[0288] 双特异性分子

[0289] 本文所述的抗cPD-1抗体、其抗原结合片段或scFv可用于形成双特异性分子。抗cPD-1抗体或其抗原结合片段可衍生或连接到另一种功能分子,例如另一种肽或蛋白质(例如,另一种抗体或受体配体),以生成与至少两个不同结合位点或靶分子结合的双特异性分子。

[0290] 例如,抗cPD-1抗体可与特异性结合任何蛋白质的抗体或scFv连接,这些蛋白质可用作联合治疗的潜在靶标。事实上,本文所述的抗体可以衍生或连接到多于一个的其他功能分子,以产生与多于两个不同结合位点和/或靶分子结合的多特异性分子;如本文所使用的,术语“双特异性分子”也旨在包含了这种多特异性分子。为了产生本文所述的双特异性分子,可以将本文所述的抗体与一个或多个其他结合分子(比如,另一种抗体、抗体片段、肽或结合模拟物)功能性连接(例如,通过化学偶联、基因融合、非共价缔合或其他方式),从而产生双特异性分子。

[0291] 本文提供了双特异性分子,其包括针对犬PD-1的至少一种第一结合特异性和针对第二靶表位的第二结合特异性。在本文所描述的双特异性分子具有多特异性的一些实施方式中,该分子可进一步包括第三结合特异性。

[0292] 在一些实施方式中,本文所描述的双特异性分子包括至少一种抗体或其抗体片段,包括例如Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv或单链Fv(scFv),作为结合特异性。抗体也可以是轻链或重链二聚体,或其任何最小片段,比如Fv或单链构建体。

[0293] 在一些实施方式中,犬单克隆抗体被用于双特异性分子中。在其它实施方式中,本

文所描述的双特异性分子中可以使用的其它抗体是鼠抗体、嵌合抗体和犬源化单克隆抗体。

[0294] 本文所描述的双特异性分子可通过使用本领域已知的方法缀合组成结合特异性来制备。例如,双特异性分子的每种结合特异性都可以单独生成,并且然后彼此缀合。当结合特异性是蛋白质或肽时,可使用各种偶联剂或交联剂进行共价缀合。交联剂的实例包括蛋白A、碳二亚胺、N-琥珀酰亚胺基-S-乙酰硫代乙酸酯(SATA)、5,5'-二硫双(2-硝基苯甲酸)(DTNB)、邻亚苯基二马来酰亚胺(oPDM)、N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶二硫)丙酸酯(SPDP)和4-(N-马来酰亚胺甲基)环己烷-1-羧酸磺基琥珀酰亚胺酯(sulfo-SMCC)(见,例如,Karpovsky等人,(1984) J. Exp. Med. 160:1686; Fiu, MA等人,(1985) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:8648)。其他方法包括Paulus (1985) Behring Ins. Mitt. No. 78, 118-132; Brennan等人,(1985) Science 229:81-83和Glennie等人,(1987) J. Immunol. 139:2367-2375中描述的那些。一些缀合试剂是SATA和sulfo-SMCC,二者均可获得自Pierce Chemical Co. (Rockford, IL)。

[0295] 当结合特异性为抗体时,可通过两条重链的C-末端铰链区的巯基键来缀合。在一些实施方式中,铰链区在缀合前被修饰成含有奇数个,优选地一个巯基残基。

[0296] 可选地,两种结合特异性可在同一载体中被编码,并在同一宿主细胞中表达和组装。当双特异性分子是mAb x mAb、mAb x Fab、mAb x (scFv)₂、Fab x F(ab')₂或配体x Fab融合蛋白时,这种方法是尤其有用的。双特异性抗体可包括在每条重链的C-末端含有scFv的抗体。本文所描述的双特异性分子可以是包括一个单链抗体和一个结合决定子的单链分子,或者是包括两个结合决定子的单链双特异性分子。双特异性分子可包括至少两个单个链分子。例如,在美国专利号5,260,203;美国专利号5,455,030;美国专利号4,881,175;美国专利号5,132,405;美国专利号5,091,513;美国专利号5,476,786;美国专利号5,013,653;美国专利号5,258,498;和美国专利号5,482,858中描述了用于制备双特异性分子的方法。

[0297] 双特异性分子与其特异性靶标的结合可使用本领域公认的方法确认,比如酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、FACS分析、生物测定(例如,生长抑制)或Western印迹测定。这些测定中的每一种通常都是通过使用对感兴趣的复合物特异性的标记试剂(例如,抗体)来检测特别感兴趣的蛋白质-抗体复合物的存在。

[0298] 治疗方法

[0299] 在一些方面中,本公开内容提供了一种在有需要的受试者中抑制犬程序性死亡蛋白1(cPD-1)信号传导途径的方法,其包括向受试者施用本文所描述的抗体、结合多肽和scFv,或双特异性分子、免疫缀合物或包括这些中的任一种的组合物。在一些情况下,受试者患有癌症、败血症或败血性休克、或慢性感染(例如,病毒感染)。组合物可包括药物组合物,并且进一步包括药学上可接受的载体。可以将治疗有效量的药物组合物施用至受试者(例如,狗或犬)。

[0300] 在一些方面中,本公开内容提供了一种在有需要的受试者中增加T细胞增殖和降低T细胞衰竭的方法,其包括向受试者施用本文所描述的抗体、结合多肽和scFv,或双特异性分子、免疫缀合物或包括这些中的任一种的组合物。在一些情况下,受试者患有癌症、败血症或败血性休克、或慢性感染(例如,病毒感染)。组合物可包括药物组合物并且进一步包

括药学上可接受的载体。可以将治疗有效量的药物组合物施用至受试者(例如,狗或犬)。在一些情况下,相对于未给予本文所描述的抗体、结合多肽和scFv,或本文所描述的双特异性分子、免疫缀合物或包括这些中的任一种的组合物的对照犬受试者,犬受试者中的T细胞增殖增加至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、400%、500%。在一些情况下,相对于未给予本文所描述的抗体、结合多肽和scFv,或本文所描述的双特异性分子、免疫缀合物或包括这些中的任一种的组合物的对照犬受试者,犬受试者中的T细胞衰竭降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%。在一些实施方式中,T细胞是效应T细胞。在一些实施方式中,T细胞是CD5+T细胞。

[0301] 在一些方面中,本公开内容提供了一种在有需要的受试者中增加IFN γ 产生的方法,其包括向受试者施用本文所描述的抗体、结合多肽和scFv,或双特异性分子、免疫缀合物或包括这些中的任一种的组合物。在一些情况下,受试者患有癌症、败血症或败血性休克、或慢性感染(例如,病毒感染)。组合物可包括药物组合物并且进一步包括药学上可接受的载体。可以将治疗有效量的药物组合物施用至受试者(例如,狗或犬)。在一些情况下,相对于未给予本文所描述的抗体、结合多肽和scFv,或本文所描述的双特异性分子、免疫缀合物或包括这些中的任一种的组合物的对照犬受试者,犬受试者中的IFN γ 产量增加至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、400%、500%。在一些实施方式中,T细胞为CD5+T细胞。

[0302] 在一个方面中,本公开内容提供了一种在有需要的受试者中治疗疾病或病症的方法,其包括向受试者施用本文所描述的抗体、结合多肽和scFv,或双特异性分子、免疫缀合物或包括这些中的任一种的组合物。疾病或病症包括癌症、败血症或败血性休克、或慢性感染(例如,病毒感染)。组合物可包括药物组合物并且进一步包括药学上可接受的载体。可以将治疗有效量的药物组合物施用至受试者(例如,狗或犬)。

[0303] 在某些实施方式中,本文描述了本文所描述的抗体、结合多肽和scFv,或双特异性分子、免疫缀合物或包括这些中的任一种的组合物,其用作药物。

[0304] 在某些实施方式中,本文所描述了本文所描述的抗体、结合多肽和scFv、或双特异性分子、免疫缀合物或包括这些中的任一种的组合物,其用于治疗癌症、败血症或败血性休克、或慢性感染的药物。

[0305] 在某些实施方式中,本文描述了本文所描述的抗体、结合多肽和scFv、或双特异性分子、免疫缀合物或包括这些中的任一种的组合物用于制造药物的用途。

[0306] 在某些实施方式中,本文描述了本文所描述的抗体、结合多肽和scFv,或双特异性分子、免疫缀合物或包括这些中的任一种的组合物用于制造用于治疗癌症、败血症或败血性休克、或慢性感染(例如,病毒感染)的药物的用途。

[0307] 治疗是指一种旨在改善或减轻所治疗的病症的方法。就癌症而言,治疗包括但不限于减少肿瘤体积、减少肿瘤体积的增长、提高无进展生存期或总体预期寿命。在某些实施方式中,治疗将影响所治疗癌症的缓解。在某些实施方式中,治疗包括用作预防或维持剂量,旨在防止先前治疗过的癌症或肿瘤复发或恶化。本领域技术人员了解,并非所有个体都会对所施用的治疗产生相同或完全的反应,尽管如此,这些个体仍被视为接受了治疗。

[0308] 该方法包括向受试者施用分离的结合多肽,该结合多肽包括重链可变区和轻链可变区,该重链可变区包括与SEQ ID NO:7、9、33或49至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、

98%、99%或100%相同的氨基酸序列,该轻链可变区包括与SEQ ID NO:11、35或51至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或100%相同的氨基酸序列。

[0309] 在某些实施方式中,癌症与程序性死亡蛋白1 (PD-1) 信号传导途径相关。在某些实施方式中,PD-1在受试者的免疫细胞上表达。在某些实施方式中,免疫细胞为T淋巴细胞。在某些实施方式中,免疫细胞为肿瘤浸润淋巴细胞。在某些实施方式中,PD-1的配体,比如PD-L1或PD-L2在受试者的癌细胞上表达。在某些实施方式中,犬程序性死亡配体1在受试者的癌细胞上过表达。

[0310] 在某些实施方式中,结合多肽与程序性死亡蛋白1 (PD-1) 特异性结合。在某些实施方式中,结合多肽包括抗体或其抗原结合片段。在某些实施方式中,抗原结合片段选自Fab,单链可变片段(scFv)、单结构域抗体、sc(Fv) 2、dsFv、Fab、Fab'、(Fab') 2和双抗体。在某些实施方式中,抗体为全长抗体。在某些实施方式中,抗体或抗原结合片段为犬抗体或其抗原结合片段。

[0311] 在某些实施方式中,该方法进一步包括施用一种或多种另外的疗法或干预。这种另外的疗法或干预不受限制,可包括任何有助于治疗有需要的受试者的治疗剂或小分子药物。在一些实施方式中,另外的疗法或干预与本文所述的抗体或其抗原结合片段或scFv,或双特异性分子或包括这些的免疫缀合剂一起作为联合疗法施用。另外的疗法或干预的非限制性实例包括化疗(例如,天冬酰胺酶、丁螺环素、卡铂、顺铂、道诺霉素、多柔比星、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、甲氨蝶呤、紫杉醇、利妥昔单抗、长春花碱和/或长春新碱)、放疗、免疫疗法和其他靶向疗法。

[0312] 在某些实施方式中,癌症或肿瘤是实体癌或肿瘤。在某些实施方式中,癌症或肿瘤是血癌或血瘤。在某些实施方式中,癌症或肿瘤包括乳腺、心脏、肺、小肠、结肠、脾脏、肾脏、膀胱、头部、颈部、卵巢、前列腺、脑、胰腺、皮肤、骨、骨髓、血液、胸腺、子宫、睾丸和肝脏肿瘤。在某些实施方式中,可以用本公开内容的抗体治疗的肿瘤包括腺瘤、腺癌、血管肉瘤、星形细胞瘤、上皮癌、生殖细胞瘤、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、血管内皮瘤(hemangioendothelioma)、血管肉瘤(hemangiosarcoma)、血肿、肝胚细胞瘤、白血病、淋巴瘤、成神经管细胞瘤、黑素瘤、成神经细胞瘤、骨肉瘤、成视网膜细胞瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤和/或畸胎瘤。在某些实施方式中,肿瘤/癌症选自肢端雀斑样(acral lentiginous)黑素瘤、光化角化症、腺癌、腺样囊性癌、腺瘤、腺肉瘤、腺鳞癌、星形细胞瘤、巴氏腺癌、基底细胞癌、支气管腺癌、毛细血管类癌、癌、癌肉瘤、胆管癌、软骨瘤、囊腺瘤、内皮窦肿瘤、子宫内膜增生症、子宫内膜间质肉瘤、子宫内膜腺癌、上皮肉瘤、Swing肉瘤、局灶结节性增生症、胃腺瘤、生殖系肿瘤、胶质母细胞瘤、胰高血糖素瘤、血管母细胞瘤、血管内皮瘤、血管瘤、肝腺瘤、肝腺瘤病、肝细胞癌、胰岛素瘤、上皮内瘤变、上皮内鳞状细胞瘤变、浸润性鳞状细胞癌、大细胞癌、脂肪肉瘤、肺癌、淋巴母细胞白血病、淋巴细胞白血病、平滑肌肉瘤、黑素瘤、恶性黑素瘤、恶性间皮瘤、神经鞘瘤、成神经管细胞瘤成神经管细胞瘤、髓上皮瘤、间皮瘤、黏液表皮样癌、骨髓性白血病、神经母细胞瘤、神经上皮腺癌、结节性黑素瘤、骨肉瘤、卵巢癌、乳头状浆液性腺癌、垂体瘤、浆细胞瘤、假肉瘤、前列腺癌、肺细胞瘤、肾细胞癌、成视网膜细胞瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、浆液性癌、鳞状细胞癌、小细胞癌、软组织癌、生长激素抑制素分泌肿瘤、鳞状癌、鳞状细胞癌、未分化癌、葡萄膜黑素瘤、疣状癌、阴道/外阴癌、VIPpoma、和Wilms肿瘤。在某些实施方式中,使用本公开内容的一种或多种抗体治疗的肿瘤/癌症包括脑癌、

头颈癌、结直肠癌、急性髓性白血病、前B细胞急性淋巴细胞白血病、膀胱癌、星形细胞瘤(优选地II、III或IV级星形细胞瘤)、胶质母细胞瘤、多形性胶质母细胞瘤、小细胞癌和非小细胞癌(优选地非小细胞肺癌)、肺腺癌、转移性黑素瘤、雄激素非依赖性转移性前列腺癌、雄激素依赖性转移性前列腺癌、前列腺腺癌和乳腺癌(breast cancer),优选地乳腺导管癌和/或乳腺癌(breast carcinoma)。在某些实施方式中,用本公开内容的抗体治疗的癌症包括胶质母细胞瘤。在某些实施方式中,用本公开内容的一种或多种抗体治疗的癌症包括胰腺癌。在某些实施方式中,用本公开内容的一种或多种抗体治疗的癌症包括卵巢癌。在某些实施方式中,用本公开内容的一种或多种抗体治疗的癌症包括肺癌。在某些实施方式中,用本公开内容的一种或多种抗体治疗的癌症包括前列腺癌。在某些实施方式中,用本公开内容的一种或多种抗体治疗的癌症包括结肠癌。在某些实施方式中,治疗的癌症包括胶质母细胞瘤、胰腺癌、卵巢癌、结肠癌、前列腺癌或肺癌。在某些实施方式中,癌症是其他治疗方法所难治的。在某些实施方式中,治疗的癌症是复发的。

[0313] 在一些实施方式中,癌症包括黑素瘤(例如,转移性恶性黑素瘤)、前列腺癌(例如,激素难治性前列腺腺癌)、头颈癌(例如,头颈部的鳞状细胞癌)、宫颈癌、甲状腺癌、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、白血病、淋巴瘤(例如,B细胞淋巴瘤)、肾上腺癌、AIDS相关癌症、肺泡软组织肉瘤、星状细胞瘤、骨癌、脑癌和脊髓癌、转移性脑瘤、颈动脉体瘤、软骨瘤、脊索瘤、嫌色细胞肾细胞癌、透明细胞癌、皮肤良性纤维组织细胞瘤、促结缔组织增生小圆细胞瘤、室管膜细胞瘤、尤文氏肿瘤、骨外粘液样软骨瘤、骨纤维发育不全、骨骼纤维发育不良、胆囊癌或胆管癌、妊娠性滋养层疾病、生殖细胞瘤、血液恶性肿瘤、肝细胞癌、胰岛细胞肿瘤、卡波西氏肉瘤、肾癌、脂肪瘤/良性脂肪瘤、脂肪肉瘤/恶性脂肪瘤、成神经管细胞瘤、脑膜瘤、默克尔细胞癌瘤、多发性内分泌瘤、多发性骨髓瘤、脊髓发育不良综合征、神经母细胞瘤、神经内分泌肿瘤、甲状腺乳头状癌、副甲状腺瘤、小儿癌症、周围神经鞘瘤、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、前列腺癌、后葡萄膜黑素瘤、罕见血液系统疾病、肾转移癌、横纹肌样瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、睾丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺转移癌、子宫癌或其任何组合。

[0314] 在一些情况下,癌症包括宫颈癌、肺癌、肝癌、卵巢癌、包括黑素瘤和鳞状细胞癌的皮肤癌、结肠癌、膀胱癌、乳腺癌、肾癌、食管癌、胃癌、胰腺癌、头部癌和颈部癌。

[0315] 本公开内容的组合物可以在适当的临床前和临床实验和试验中确定的剂量、途径和次数施用。组合物可以在这些范围内的剂量多次施用。组合物的施用可与本领域技术人员确定的治疗期望的疾病或病症的其他有用的方法相结合。在某些实施方式中,抗体可以通过任何适用于施用含抗体的药物组合物的途径,诸如例如,皮下、腹膜内、静脉内、肌肉内、瘤内或脑内等施用至需要其的受试者。在某些实施方式中,抗体通过静脉内施用。在某些实施方式中,抗体经皮下施用。在某些实施方式中,抗体经瘤内施用。在某些实施方式中,抗体按合适的剂量时间表施用,例如,每周一次、每周两次、每月一次、每月两次、每两周一次、每三周一次或每月一次等。在某些实施方式中,抗体每三周施用一次。抗体可以任何治疗有效量施用。在某些实施方式中,治疗上可接受的量在约0.1mg/kg和约50mg/kg之间。在某些实施方式中,治疗上可接受的量在约1mg/kg和约40mg/kg之间。在某些实施方式中,治疗上可接受的量在约1mg/kg和约20mg/kg之间。在某些实施方式中,治疗上可接受的量在约1mg/kg和约10mg/kg之间。在某些实施方式中,治疗上可接受的量在约5mg/kg和约30mg/kg

之间。在某些实施方式中,治疗上可接受的量在约5mg/kg和约20mg/kg之间。治疗有效量包括足以改善与待治疗疾病或痛苦相关的一种或多种症状的量。

[0316] 就本公开内容而言,预防性、缓解性、对症性和/或治疗性治疗可代表本公开内容的不同方面。本文公开的抗cPD-1抗体或其抗原结合片段或scFv可通过肠胃外,比如静脉内,比如肌肉内,比如皮下施用。可选地,本公开内容的抗体可以经由非肠道途径,比如口服或局部施用。本发明的抗体可以预防性施用。本公开内容的抗体可(按需)治疗性施用。

[0317] 药物组合物、试剂盒和组合物的制造方法

[0318] 还提供了包括本文公开的结合多肽、scFv、抗体或抗原结合片段的任一种的药物组合物。组合物中包括用于施用,例如用于治疗疾病或紊乱的药物组合物和制剂。还提供了对受试者(例如,犬)施用药物组合物的治疗方法。

[0319] 药物组合物和制剂一般包括一种或多种任选的药学上可接受的载体或赋形剂。在一些实施方式中,组合物包括至少一种另外的治疗剂。

[0320] 术语“药物制剂(pharmaceutical formulation)”是指这样的一种制剂,其形式可使其中所含的活性成分的生物活性有效,并且不含对施用该制剂的受试者具有不可接受的毒性的另外的成分。“药学上可接受的载体(pharmaceutically acceptable carrier)”是指药物制剂中除活性成分以外的对受试者无毒的成分。药学上可接受的载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。在一些方面,载体的选择部分取决于特定的组合物和/或施用方法。因此,有多种合适的制剂。例如,药物组合物可以含有防腐剂。合适的防腐剂可包括例如,对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸钠和苯扎氯铵。在一些方面,可使用两种或更多种防腐剂的混合物。防腐剂或其混合物的量通常为总组合物的按重量计约0.0001%至约2%。在例如Remington的Pharmaceutical Sciences,第16版,Osol, A. Ed. (1980)中描述了载体。药学上可接受的载体在使用剂量和浓度下一般对受体无毒,并且包括但不限于:缓冲剂比如磷酸盐、柠檬酸酯和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和蛋氨酸;防腐剂(比如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲基氯化铵;苯扎氯铵;苄索氯铵(benzethonium chloride);苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,比如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,比如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物比如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,比如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,比如EDTA;糖,比如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;形成盐的反离子,比如钠;金属络合物(例如Zn-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,比如聚乙二醇(PEG)。

[0321] 在一些方面,缓冲剂包括在组合物中。合适的缓冲剂包括柠檬酸、柠檬酸钠、磷酸、磷酸钾以及其他各种酸和盐。在一些方面,使用两种或更多种缓冲剂的混合物。缓冲剂或其混合物的量通常为总组合物的按重量计约0.001%至约4%。用于制备可施用的药物组合物的方法是已知的。例如,在Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins; 第21版(2005年5月1日)中描述了示例性方法。

[0322] 制剂可包括水溶液。制剂或组合物还可含有多于一种对组合物治疗的特定适应症、疾病或病症有用的活性成分,优选地是与组合物活性互补的那些,其中各自的活性不会对彼此产生不利影响。这些活性成分可以适当地以对预期目的有效的量组合。因此,在一些

实施方式中,药物组合物进一步包括其他药学活性剂或药物,比如化疗剂,例如,天冬酰胺酶、白消安、卡铂、顺铂、道诺霉素、多柔比星、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、甲氨蝶呤、紫杉醇、利妥昔单抗、长春碱和/或长春新碱。在一些实施方式中,药物组合物含有有效治疗或预防疾病或病症的量,比如治疗有效量或预防有效量的组合物。在一些实施方式中,治疗或预防效果是通过对所治疗的受试者进行定期评估来监测的。期望的剂量可通过单次推注施用组合物、多次推注施用组合物或连续输注组合物来实现。

[0323] 制剂包括用于口服、静脉、腹腔、皮下、肺部、透皮、肌肉内、鼻内、含服、舌下或栓剂施用的那些。在一些实施方式中,组合物经肠胃外施用。本文所使用的术语“肠胃外(parenteral)”包括静脉、肌肉内、皮下、直肠、阴道和腹腔施用。在一些实施方式中,使用通过静脉、腹腔或皮下注射的外周全身给药法向受试者施用组合物。在一些实施方式中,组合物以无菌液体制剂提供,例如等渗水溶液、悬浮液、乳剂、分散液或粘性组合物,在一些方面可缓冲至选定的pH值。液体制剂通常比凝胶、其他粘性组合物和固体组合物更容易制备。此外,液体制剂在某种程度上更便于施用,特别是通过注射。另一方面,粘性组合物可以在适当的粘度范围内配制以提供与特定组织的更长的接触时间。液体或粘性组合物可以包括载体,载体可以是含有例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇(例如,甘油、丙二醇、液态聚乙二醇)及其适当的混合物的溶剂或分散介质。

[0324] 无菌可注射溶液可通过将组合物并入溶剂中,比如与合适的载体、稀释剂或赋形剂,比如无菌水、生理盐水、葡萄糖、葡萄糖等混合来制备。基于施用途径和期望的制剂,组合物还可含有辅助物质,比如润湿剂、分散剂或乳化剂(例如,甲基纤维素)、pH缓冲剂、胶凝剂或粘度增强添加剂、防腐剂、调味剂和/或色素。在一些方面,可以参考标准文本来配制合适的制剂。

[0325] 还可以添加增强组合物的稳定性和无菌性的各种添加剂,包括抗菌防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲剂。通过各种抗菌剂和抗真菌剂(例如,对羟基苯甲酸酯、氯代丁醇、苯酚和山梨酸)可确保预防微生物的作用。通过使用延缓吸收的试剂,例如单硬脂酸铝和明胶可以延长可注射的药物形式的吸收。

[0326] 用于体内施用的制剂通常是无菌的。无菌可例如通过无菌过滤膜过滤来轻易实现。

[0327] 本文提及或引用的文章、专利和专利申请的内容,以及所有其他文件和可以以电子形式获得的信息均通过引用以其整体并入本文,其程度与每份单独出版物通过引用并入本文的程度相同。申请人保留将任何这种文章、专利、专利申请或其他实体和电子文件中的任何及所有材料和信息并入本申请的权利。

[0328] 在某些实施方式中,本公开内容的抗犬PD-1抗体包括在药物组合物中,该药物组合物包括一种或多种药学上可接受的赋形剂、载体和稀释剂。可以包括药学上可接受的赋形剂、载体和稀释剂,以提高抗体的保质期、稳定性或可施用性。这种化合物包括盐、pH缓冲剂、洗涤剂、抗凝剂和防腐剂。在某些实施方式中,本公开内容的抗体悬浮在无菌溶液中施用。在某些实施方式中,溶液包括约0.9%的NaCl。在某些实施方式中,溶液包括约5.0%的葡萄糖。在某些实施方式中,溶液进一步包括以下一种或多种:缓冲剂,例如醋酸盐、柠檬酸盐、组氨酸、琥珀酸盐、磷酸盐、碳酸氢盐和羟甲基氨基甲烷(Tris);表面活性剂,例如,聚山梨醇酯80(Tween 80)、聚山梨醇酯20(Tween 20)和泊洛沙姆188;多元醇/二糖/多糖,例如,

葡萄糖、右旋糖、甘露糖、甘露醇、山梨糖醇、蔗糖、海藻糖和葡聚糖40；氨基酸，例如，甘氨酸或精氨酸；抗氧化剂，例如，抗坏血酸、蛋氨酸；或螯合剂，例如，EDTA或EGTA。

[0329] 在某些实施方式中，本公开内容的抗体可以冻干运输/储存，并在施用前重构(reconstituted)。在某些实施方式中，冻干抗体制剂包括膨松剂，比如甘露醇、山梨糖醇、蔗糖、海藻糖、葡聚糖40或其组合。冻干制剂可以容纳在由玻璃或其他合适的非反应性材料组成的小瓶中。当配制(无论是否重构)时，抗体都可以在通常小于7.0的一定的pH下缓冲。在某些实施方式中，pH可以在4.5和7.0、4.5和6.5、4.5和6.0、4.5和5.5、4.5和5.0或5.0和6.0之间。

[0330] 本文还描述了试剂盒，其包括在适当容器中的本文所描述的一种或多种抗体，以及选自以下的一种或多种另外的组成部分：使用说明；稀释剂、赋形剂、载体和施用装置。

[0331] 在某些实施方式中，本文描述了一种用于治疗癌症、败血症或败血性休克、或慢性感染(如病毒感染)的组合物的制造方法，其包括将一种或多种药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂与本公开内容的抗体混合。在某些实施方式中，本文描述了一种制备用于储存或运输的癌症治疗剂的方法，其包括冻干一种或多种本公开内容的抗体。

[0332] 虽然本公开内容已参照其具体实施方式进行了描述，但是本领域技术人员应理解，在不背离本公开内容的真实精神和范围的情况下可以进行各种改变，并且可以用等同物进行替代。对本领域技术人员来说显而易见的是，可以使用适当的等同物对本文所述的方法进行其他适当的修改和调整，而不会背离本文所公开的実施方式的范围。此外，可以进行许多修改以使具体情况、材料、物质组成、工艺、一个或多个工艺步骤适应本公开内容的目标、精神和范围。所有这些修改都在所附的权利要求书的范围内。在现在详细描述了本发明的某些实施方式之后，通过参考以下实施例可以更清楚地理解本发明。

[0333] 实施例

[0334] 通过参考以下实验实施例将进一步详细描述本公开内容。提供这些实施例仅为了阐释的目的，并且除非另有说明，否则不具有限制性。因此，本公开内容绝不应被解释为仅限于以下实施例，而应被解释为包括因本文所提供的教导而变得明显的任何及所有变型。虽然本文已经显示和描述了本发明的优选实施方式，但对于本领域的技术人员来说显而易见的是，这种实施方式仅通过举例的方式提供。在不背离本公开内容的前提下，本领域技术人员还可以做出许多变化、改变和替换。应当理解，在实施本公开内容时，可以采用本文所描述的本公开内容的实施方式的各种替代方案。

[0335] 本说明书中提及的所有出版物、专利申请、已授权专利和其它文件均通过引用并入本文，如同每份单独的出版物、专利申请、已授权专利或其它文件均通过引用具体和单独地并入其全文。包含在通过引用并入的文本中的定义，如果与本公开内容中的定义相矛盾，则被排除在外。

[0336] 无需进一步描述，相信本领域普通技术人员可以使用前面的说明和下面的说明性实施例，制造和利用本公开内容的化合物，并实施所要求保护的方法。因此，以下工作实施例具体指出了本公开内容的一些实施方式。

[0337] 实施例1：犬抗犬PD-1 scFv的产生

[0338] 如前所述，使用基于已发表的犬免疫球蛋白重链和轻链种系基因的寡核苷酸引物，从犬B细胞mRNA和pComb3X噬菌粒载体构建了犬IgM/IgG/1/k scFv噬菌体展示文库，其

包含约400亿个单独的大肠杆菌转化株。(Andris-Widhopf, J., Steinberger, P., Fuller, R., Rader, C., Barbas, C.F. Generation of antibody libraries: PCR amplification and assembly of light-and heavy-chain coding sequences in Barbas, C.F., Burton, D.R., Scott, J.K., Silverman G.J. Phage Display: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001) 和 Lefranc, M.P. 等人, IMGT, the international ImMunoGeneTics information system. Nucleic Acids Res 37, D1006-1012 (2009))。该文库的等分部分针对犬PD-1进行了4轮固相筛选(“淘选”)。为了验证筛选出的噬菌体含有cPD-1特异性scFv噬菌体颗粒,使用cPD-1作为靶抗原,通过scFv噬菌体ELISA评估了来自每轮淘选的多克隆scFv噬菌体(图1)。在第三轮淘选(P3)中发现了大量富含的cPD-1特异性结合剂的噬菌体,并且在第四轮淘选(P4)中增加。

[0339] 通过噬菌体ELISA测试它们与cPD-1结合的能力,检查了来自第三轮淘选的16个克隆和来自第四轮淘选的16个克隆,评估了阳性命中率的初步调查。来自P3的10/16个克隆和来自P4的15/16个克隆与cPD-1以明显的亲和力范围结合(图2A-2B)。通过核苷酸测序,从这25个结合者中鉴定出14个独特的克隆,并制成可溶性scFv,用于进一步表征(图3左图)。

[0340] 在该初步调查得到阳性率之后,对几百个另外的克隆进行了高通量筛选。分离出176个阳性克隆,其中进一步鉴定出8个独特的克隆。这8个克隆中有5个被制成了可溶性scFv,用于进一步表征。基于可溶性scFv与cPD-1结合的结果(图3),筛选出克隆3-4、3-8、3-13、4-2、4-9、4-14、P4B1、P3C6和P4F3,以进一步分析它们抑制PD-1与PD-L1相互作用的能力(图4)。

[0341] 检测到了五个克隆,显示其抑制PD-1和PD-L1之间相互作用的能力的证据(如图4中编号方框所示)。然后测试了这些克隆与膜表达的cPD-1结合的能力。使用携带嘌呤霉素选择盒(KT832.cPD-1)的逆转录病毒载体,对编辑为去除了CD32(KT832)(以减少非特异性结合)的人红细胞白血病细胞株K562进行工程化,以表达cPD-1。将经由抑制测定(图4)筛选出的HA标记可溶性scFv与KT832或KT832.cPD-1细胞一起温育,并使用抗HA抗体和流式细胞术测定结合(图5)。

[0342] 抑制PD-1:PD-L1蛋白相互作用并与细胞表面表达的PD-1结合的克隆P3C6和P4B1被重新格式化为全长的全犬IgG4分子,并通过流式细胞术再次测试它们与细胞表面PD-1结合的能力(图6)。

[0343] 通过瞬时转染293T细胞获得的P3C6产率低,并且链交换实验证实这与P3C6的VH链有关(数据未显示)。进行了策略性氨基酸替换,并将所得的突变的VH链与原始的P3C6轻链配对,并评估产量和cPD-1结合能力(图7和图8)。使P3C6突变的最初尝试也导致产量低(图9A)。经过多次尝试后,两个特定突变体(P3C6 mut 3.1和mut 3.2)的产量显著提高(图9B)。

[0344] 为了确定P3C6突变体是否能增加犬T细胞的增殖和IFN γ 的产生,用Cell Trace Violet (CTV) 标记犬PBMC,并在P3C6突变体IgG4分子存在的情况下用有丝分裂原刀豆球蛋白A进行刺激。在刺激后96小时,通过流式细胞术测定CD5⁺T细胞的增殖(图10),并且通过ELISA测定IFN γ 的产生(图11)。

[0345] 鉴于从初始筛选和随后的高通量筛选中鉴定出的独特scFv数量相对较少,因此进行了第二次高通量筛选,筛选出872个克隆,并通过ELISA鉴定出表达提取物中存在的超过200个可溶性scFv克隆与cPD-1结合。通过流式细胞术进一步评估了这些克隆的结合,并且

发现3个另外的与KT832细胞表面的cPD-1结合的独特scFv克隆。来自第3轮淘选的这些克隆中的仅一个,克隆A6,成功地重新格式化为全长犬IgG4。在流式细胞术中评估了该全长克隆与膜结合cPD-1特异性结合的能力(图12)。克隆A6与KT832.cPD-1细胞特异性结合,并且通过IgG4分子与可溶性cPD-1预温育阻断了这种结合。

[0346] 列举的实施方式

[0347] 提供了以下列举的实施方式,其编号不解释为指定其重要程度。

[0348] 实施方式1提供了一种与犬程序性死亡蛋白1(cPD-1)特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

[0349] 重链互补决定区1(HCDR1),其包括SEQ ID NO:1、27或43中所列的氨基酸序列,

[0350] 重链互补决定区2(HCDR2),其包括SEQ ID NO:2、28或44中所列的氨基酸序列,

[0351] 重链互补决定区3(HCDR3),其包括SEQ ID NO:3、29或45中所列的氨基酸序列,

[0352] 轻链互补决定区1(LCDR1),其包括SEQ ID NO:4、30或46中所列的氨基酸序列,

[0353] 轻链互补决定区2(LCDR2),其包括SEQ ID NO:5、31或47中所列的氨基酸序列,和

[0354] 轻链互补决定区3(LCDR3),其包括SEQ ID NO:6、32或48中所列的氨基酸序列。

[0355] 实施方式2提供了实施方式1所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

[0356] 重链可变区,其包括与SEQ ID NO:7、9、33或49中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;和

[0357] 轻链可变区,其包括与SEQ ID NO:11、35或51中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0358] 实施方式3提供了实施方式1或2所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

[0359] 免疫球蛋白重链,其包括与SEQ ID NO:19、21、23、39或55中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列,和

[0360] 免疫球蛋白轻链,其包括与SEQ ID NO:25、41或57中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0361] 实施方式4提供了一种与犬程序性死亡蛋白1(cPD-1)特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

[0362] 重链可变区,其包括与SEQ ID NO:7、9、33或49中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;和

[0363] 轻链可变区,其包括与SEQ ID NO:11、35或51中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0364] 实施方式5提供了一种与犬程序性死亡蛋白1(cPD-1)特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

[0365] 重链可变区,其包括SEQ ID NO:7、9、33或49中所列的氨基酸序列;和

[0366] 轻链可变区,其包括SEQ ID NO:11、35或51中所列的氨基酸序列。

[0367] 实施方式6提供了一种与犬程序性死亡蛋白1(cPD-1)特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

[0368] 免疫球蛋白重链,其包括与SEQ ID NO:19、21、23、39或55中所列的氨基酸序列具

有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列,和

[0369] 免疫球蛋白轻链,其包括与SEQ ID NO:25、41或57中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0370] 实施方式7提供了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

[0371] 免疫球蛋白重链,其包括SEQ ID NO:19、21、23、39或55中所列的氨基酸序列,和

[0372] 免疫球蛋白轻链,其包括SEQ ID NO:25、41或57中所列的氨基酸序列。

[0373] 实施方式8提供了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

[0374] 重链互补决定区1(HCDR1),其包括SEQ ID NO:1中所列的氨基酸序列,

[0375] 重链互补决定区2(HCDR2),其包括SEQ ID NO:2中所列的氨基酸序列,

[0376] 重链互补决定区3(HCDR3),其包括SEQ ID NO:3中所列的氨基酸序列,

[0377] 轻链互补决定区1(LCDR1),其包括SEQ ID NO:4中所列的氨基酸序列,

[0378] 轻链互补决定区2(LCDR2),其包括SEQ ID NO:5中所列的氨基酸序列,和

[0379] 轻链互补决定区3(LCDR3),其包括SEQ ID NO:6中所列的氨基酸序列。

[0380] 实施方式9提供了实施方式8所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

[0381] 重链可变区,其包括与SEQ ID NO:7或9中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;和

[0382] 轻链可变区,其包括与SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0383] 实施方式10提供了实施方式8或9所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

[0384] 免疫球蛋白重链,其包括与SEQ ID NO:19、21或23中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列,和

[0385] 免疫球蛋白轻链,其包括与SEQ ID NO:25中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0386] 实施方式11提供了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

[0387] 重链可变区,其包括与SEQ ID NO:7或9中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;和

[0388] 轻链可变区,其包括与SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0389] 实施方式12提供了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

[0390] 重链可变区,其包括SEQ ID NO:7中所列的氨基酸序列;和

[0391] 轻链可变区,其包括SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列。

[0392] 实施方式13提供了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

- [0393] 重链可变区,其包括SEQ ID NO:9中所列的氨基酸序列;和
- [0394] 轻链可变区,其包括SEQ ID NO:11中所列的氨基酸序列。
- [0395] 实施方式14提供了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:
- [0396] 免疫球蛋白重链,其包括与SEQ ID NO:19、21或23中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列,和
- [0397] 免疫球蛋白轻链,其包括与SEQ ID NO:25中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。
- [0398] 实施方式15提供了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:
- [0399] 免疫球蛋白重链,其包括SEQ ID NO:19中所列的氨基酸序列,和
- [0400] 免疫球蛋白轻链,其包括SEQ ID NO:25中所列的氨基酸序列。
- [0401] 实施方式16提供了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:
- [0402] 免疫球蛋白重链,其包括SEQ ID NO:21中所列的氨基酸序列,和
- [0403] 免疫球蛋白轻链,其包括SEQ ID NO:25中所列的氨基酸序列。
- [0404] 实施方式17提供了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:
- [0405] 免疫球蛋白重链,其包括SEQ ID NO:23中所列的氨基酸序列,和
- [0406] 免疫球蛋白轻链,其包括SEQ ID NO:25中所列的氨基酸序列。
- [0407] 实施方式18提供了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:
- [0408] 重链互补决定区1(HCDR1),其包括SEQ ID NO:27中所列的氨基酸序列,
- [0409] 重链互补决定区2(HCDR2),其包括SEQ ID NO:28中所列的氨基酸序列,
- [0410] 重链互补决定区3(HCDR3),其包括SEQ ID NO:29中所列的氨基酸序列,
- [0411] 轻链互补决定区1(LCDR1),其包括SEQ ID NO:30中所列的氨基酸序列,
- [0412] 轻链互补决定区2(LCDR2),其包括SEQ ID NO:31中所列的氨基酸序列,和
- [0413] 轻链互补决定区3(LCDR3),其包括SEQ ID NO:32中所列的氨基酸序列。
- [0414] 实施方式19提供了实施方式18所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:
- [0415] 重链可变区,其包括与SEQ ID NO:33中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;和
- [0416] 轻链可变区,其包括与SEQ ID NO:35中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。
- [0417] 实施方式20提供了实施方式18或19所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:
- [0418] 免疫球蛋白重链,其包括与SEQ ID NO:39中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列,和
- [0419] 免疫球蛋白轻链,其包括与SEQ ID NO:41中所列的氨基酸序列具有至少80%、

85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0420] 实施方式21提供了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

[0421] 重链可变区,其包括与SEQ ID NO:33中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;和

[0422] 轻链可变区,其包括与SEQ ID NO:35中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0423] 实施方式22提供了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

[0424] 重链可变区,其包括SEQ ID NO:33中所列的氨基酸序列;和

[0425] 轻链可变区,其包括SEQ ID NO:35中所列的氨基酸序列。

[0426] 实施方式23提供了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

[0427] 免疫球蛋白重链,其包括与SEQ ID NO:39中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列,和

[0428] 免疫球蛋白轻链,其包括与SEQ ID NO:41中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0429] 实施方式24提供了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

[0430] 免疫球蛋白重链,其包括SEQ ID NO:39中所列的氨基酸序列,和

[0431] 免疫球蛋白轻链,其包括SEQ ID NO:41中所列的氨基酸序列。

[0432] 实施方式25提供了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

[0433] 重链互补决定区1(HCDR1),其包括SEQ ID NO:43中所列的氨基酸序列,

[0434] 重链互补决定区2(HCDR2),其包括SEQ ID NO:44中所列的氨基酸序列,

[0435] 重链互补决定区3(HCDR3),其包括SEQ ID NO:45中所列的氨基酸序列,

[0436] 轻链互补决定区1(LCDR1),其包括SEQ ID NO:46中所列的氨基酸序列,

[0437] 轻链互补决定区2(LCDR2),其包括SEQ ID NO:47中所列的氨基酸序列,和

[0438] 轻链互补决定区3(LCDR3),其包括SEQ ID NO:48中所列的氨基酸序列。

[0439] 实施方式26提供了实施方式25所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

[0440] 重链可变区,其包括与SEQ ID NO:49中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;和

[0441] 轻链可变区,其包括与SEQ ID NO:51中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0442] 实施方式27提供了实施方式25或26所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

[0443] 免疫球蛋白重链,其包括与SEQ ID NO:55中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列,和

[0444] 免疫球蛋白轻链,其包括与SEQ ID NO:57中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0445] 实施方式28提供了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

[0446] 重链可变区,其包括与SEQ ID NO:49中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列;和

[0447] 轻链可变区,其包括与SEQ ID NO:51中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0448] 实施方式29提供了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

[0449] 重链可变区,其包括SEQ ID NO:49中所列的氨基酸序列;和

[0450] 轻链可变区,其包括SEQ ID NO:51中所列的氨基酸序列。

[0451] 实施方式30提供了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

[0452] 免疫球蛋白重链,其包括与SEQ ID NO:55中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列,和

[0453] 免疫球蛋白轻链,其包括与SEQ ID NO:57中所列的氨基酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%同一性的氨基酸序列。

[0454] 实施方式31提供了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

[0455] 免疫球蛋白重链,其包括SEQ ID NO:55中所列的氨基酸序列,和

[0456] 免疫球蛋白轻链,其包括SEQ ID NO:57中所列的氨基酸序列。

[0457] 实施方式32提供了实施方式1-31中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段为IgG、IgM、IgE、IgA或IgD分子,或源自这些中的一种。

[0458] 实施方式33提供了实施方式1-32中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段选自全长抗体、Fab、单链可变片段(scFv)、sc(Fv)2、dsFv、Fab、Fab'、(Fab')2和双抗体。

[0459] 实施方式34提供了实施方式1-33中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体为全长抗体。

[0460] 实施方式35提供了实施方式1-34中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体为犬抗体或犬源化抗体。

[0461] 实施方式36提供了实施方式1-35中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体为犬抗体。

[0462] 实施方式37提供了实施方式1-33中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗原结合片段为scFv。

[0463] 实施方式38提供了实施方式1-37中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段与cPD-1的特异性结合破坏了cPD-1与cPD-1的配体(例如,犬程序性死亡配体1)的相互作用。

[0464] 实施方式39提供了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的犬抗体或其

抗原结合片段。

[0465] 实施方式40提供了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的犬抗体或其抗原结合片段,其包括根据权利要求1-36中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

[0466] 实施方式41提供了实施方式39或40所述的犬抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段与cPD-1的特异性结合破坏了cPD-1与cPD-1的配体(例如,犬程序性死亡配体1)的相互作用。

[0467] 实施方式42提供了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的单链可变片段(scFv),其包括:

[0468] 重链可变区,其包括重链互补决定区1 (HCDR1)、HCDR2和HCDR3,其中HCDR1包括选自SEQ ID NO:1、27和43的氨基酸序列,HCDR2包括选自SEQ ID NO:2、28和44的氨基酸序列,和HCDR3包括选自SEQ ID NO:3、29和45的氨基酸序列;和

[0469] 轻链可变区,其包括轻链互补决定区1 (LCDR1)、LCDR2和LCDR3,其中LCDR1包括选自SEQ ID NO:4、30和46的氨基酸序列,LCDR2包括选自SEQ ID NO:5、31和47的氨基酸序列,和LCDR3包括选自SEQ ID NO:6、32和48的氨基酸序列,

[0470] 其中所述重链可变区和所述轻链可变区由接头连接。

[0471] 实施方式43提供了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的单链可变片段(scFv),其包括:

[0472] 重链可变区,其包括SEQ ID NO:7、9、33或49中所列的氨基酸序列;和

[0473] 轻链可变区,其包括SEQ ID NO:11、35或51中所列的氨基酸序列,

[0474] 其中所述重链可变区和所述轻链可变区由接头连接。

[0475] 实施方式44提供了一种与犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 特异性结合的单链可变片段(scFv),其包括SEQ ID NO:13、15、17、37或53中所列的氨基酸序列。

[0476] 实施方式45提供了实施方式42-44中任一项所述的scFv,其中所述抗体或其抗原结合片段与cPD-1的特异性结合破坏了cPD-1与cPD-1的配体(例如,犬程序性死亡配体1)的相互作用。

[0477] 实施方式46提供了一种双特异性分子,其包括与具有第二结合特异性的分子连接的实施方式1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、实施方式39-41中任一项所述的犬抗体或实施方式42-45中任一项所述的scFv。

[0478] 实施方式47提供了一种免疫缀合物,其包括与治疗剂连接的实施方式1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、实施方式39-41中任一项所述的犬抗体、或实施方式42-45中任一项所述的scFv、或实施方式46所述的双特异性分子。

[0479] 实施方式48提供了一种分离核酸,其编码实施方式1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、实施方式39-41中任一项所述的犬抗体或实施方式42-45中任一项所述的scFv。

[0480] 实施方式49提供了一种编码抗体或其抗原结合片段的分离核酸,其中所述抗体或其抗原结合片段包括:

[0481] 重链可变区,其由包括与SEQ ID NO:8、10、34或50中所列的多核苷酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的多核苷酸序列的核酸编码;和

[0482] 轻链可变区,其由包括与SEQ ID NO:12、36或52中所列的多核苷酸序列具有至少80%、85%、90%、95%、96%、96%、97%、98%、99%同一性的多核苷酸序列的核酸编码。

[0483] 实施方式50提供了实施方式49所述的分离核酸,其中所述重链可变区由包括SEQ ID NO:8、10、34或50中所列的多核苷酸序列的核酸编码。

[0484] 实施方式51提供了实施方式49或50所述的分离核酸,其中所述轻链可变区由包括SEQ ID NO:12、36或52中所列的多核苷酸序列的核酸编码。

[0485] 实施方式52提供了一种编码抗体或其抗原结合片段的分离核酸,其包括:

[0486] 重链可变区,其由包括SEQ ID NO:8中所列的多核苷酸序列的核酸序列编码;和

[0487] 轻链可变区,其由包括SEQ ID NO:12中所列的多核苷酸序列的核酸序列编码。

[0488] 实施方式53提供了一种编码抗体或其抗原结合片段的分离核酸,其包括:

[0489] 重链可变区,其由包括SEQ ID NO:10中所列的多核苷酸序列的核酸序列编码;和

[0490] 轻链可变区,其由包括SEQ ID NO:12中所列的多核苷酸序列的核酸序列编码。

[0491] 实施方式54提供了一种编码抗体或其抗原结合片段的分离核酸,其包括:

[0492] 重链可变区,其由包括SEQ ID NO:34中所列的多核苷酸序列的核酸序列编码;和

[0493] 轻链可变区,其由包括SEQ ID NO:36中所列的多核苷酸序列的核酸序列编码。

[0494] 实施方式55提供了一种编码抗体或其抗原结合片段的分离核酸,其包括:

[0495] 重链可变区,其由包括SEQ ID NO:50中所列的多核苷酸序列的核酸序列编码;和

[0496] 轻链可变区,其由包括SEQ ID NO:52中所列的多核苷酸序列的核酸序列编码。

[0497] 实施方式56提供了实施方式49-55中任一项所述的分离核酸,其中所述抗体或其抗原结合片段为IgG、IgM、IgE、IgA或IgD分子,或衍生自这些中的一种。

[0498] 实施方式57提供了实施方式49-56中任一项所述的分离核酸,其中所述抗体或其抗原结合片段选自全长抗体、Fab、单链可变片段(scFv)、sc(Fv)2、dsFv、Fab、Fab'、(Fab')2和双抗体。

[0499] 实施方式58提供了实施方式49-57中任一项所述的分离核酸,其中所述抗体为全长抗体。

[0500] 实施方式59提供了实施方式49-58中任一项所述的分离核酸,其中所述抗体为犬抗体或犬源化抗体。

[0501] 实施方式60提供了实施方式49-59中任一项所述的分离核酸,其中所述抗体为犬抗体。

[0502] 实施方式61提供了一种编码单链可变片段(scFv)的分离核酸,其包括:

[0503] 重链可变区,其包括SEQ ID NO:8、10、34或50中所列的核苷酸序列;和

[0504] 轻链可变区,其包括SEQ ID NO:12、36或52中所列的核苷酸序列,

[0505] 其中所述重链可变区和所述轻链可变区由接头连接。

[0506] 实施方式62提供了一种编码单链可变片段(scFv)的分离核酸,其包括SEQ ID NO:14、16、18、38或54中所列的多核苷酸序列。

[0507] 实施方式63提供了实施方式49-62中任一项所述的分离核酸,其中所述抗体或其抗原结合片段或所述scFv与犬程序性死亡蛋白1(cPD-1)特异性结合。

[0508] 实施方式64提供了实施方式56所述的分离核酸,其中所述抗体或其抗原结合片段或所述scFv与cPD-1的特异性结合破坏了cPD-1与cPD-1的配体(例如,犬程序性死亡配体1)

的相互作用。

[0509] 实施方式65提供了一种载体,其包括实施方式48-64中任一项所述的分离核酸。

[0510] 实施方式66提供了实施方式65所述的载体,其中所述载体是表达载体。

[0511] 实施方式67提供了实施方式65或66所述的载体,其中所述载体选自DNA载体、RNA载体、质粒、慢病毒载体、腺病毒载体、腺伴随病毒载体和逆转录病毒载体。

[0512] 实施方式68提供了一种宿主细胞,其包括实施方式48-64中任一项所述的分离核酸或实施方式65-67中任一项所述的载体。

[0513] 实施方式69提供了实施方式68所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是真核或原核来源的。

[0514] 实施方式70提供了实施方式68或69所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是哺乳动物来源的。

[0515] 实施方式71提供了实施方式68或69所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是细菌来源的。

[0516] 实施方式72提供了实施方式68-70中任一项所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞为中国仓鼠卵巢细胞。

[0517] 实施方式73提供了一种药物组合物,其包括实施方式1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、实施方式39-41中任一项所述的犬抗体、或实施方式42-45中任一项所述的scFv、实施方式46所述的双特异性分子或实施方式47所述的免疫缀合物,以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂。

[0518] 实施方式74提供了实施方式73所述的药物组合物,其被配制用于静脉内施用。

[0519] 实施方式75提供了实施方式73所述的药物组合物,其被配制用于皮下施用。

[0520] 实施方式76提供了实施方式73所述的药物组合物,其被配制用于瘤内施用。

[0521] 实施方式77提供了一种试剂盒,其包括实施方式1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、实施方式39-41中任一项所述的犬抗体、或实施方式42-45中任一项所述的scFv、实施方式46所述的双特异性分子,实施方式47所述的免疫缀合物,或实施方式73所述的药物组合物,和使用说明书。

[0522] 实施方式78提供了一种在有需要的受试者中增加T细胞增殖和降低T细胞衰竭的方法,其包括向所述受试者施用实施方式1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、实施方式39-41中任一项所述的犬抗体或实施方式42-45中任一项所述的scFv、实施方式46所述的双特异性分子、或实施方式47所述的免疫缀合物、或实施方式73所述的药物组合物。

[0523] 实施方式79提供了一种在有需要的受试者中增加IFN γ 产生的方法,其包括向所述受试者施用实施方式1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、实施方式39-41中任一项所述的犬抗体、或实施方式42-45中任一项所述的scFv、实施方式46所述的双特异性分子、或实施方式47所述的免疫缀合物、或实施方式73所述的药物组合物。

[0524] 实施方式80提供了一种在有需要的受试者中抑制犬程序性死亡蛋白1 (cPD-1) 信号传导途径的方法,其包括向所述受试者施用实施方式1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、实施方式39-41中任一项所述的犬抗体、或实施方式42-45中任一项所述的scFv、实施方式46所述的双特异性分子、或实施方式47所述的免疫缀合物或实施方式73所述的药物组合物。

[0525] 实施方式81提供了实施方式78-80中任一项所述的方法,其中所述受试者患有癌症、败血症或败血性休克、或慢性感染(例如,病毒感染)。

[0526] 实施方式82提供了一种在有需要的受试者中治疗疾病或病症的方法,其包括向所述受试者施用实施方式1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、实施方式39-41中任一项所述的犬抗体、或实施方式42-45中任一项所述的scFv、实施方式46所述的双特异性分子、或实施方式47所述的免疫缀合物、或实施方式73所述的药物组合物。

[0527] 实施方式83提供了实施方式82所述的方法,其中所述疾病或病症包括癌症、败血症或败血性休克、或慢性感染(例如,病毒感染)。

[0528] 实施方式84提供了实施方式78-83中任一项所述的方法,进一步包括施用一种或多种另外的疗法(例如,化疗)或干预。

[0529] 实施方式85提供了实施方式81、83或84中任一项所述的方法,其中所述癌症与犬程序性死亡蛋白1(cPD-1)信号传导途径相关。

[0530] 实施方式86提供了实施方式85所述的方法,其中用于cPD-1的配体(例如,犬程序性死亡配体1)在所述受试者的癌细胞上表达。

[0531] 实施方式87提供了实施方式80-86中任一项所述的方法,其中cPD-1在所述受试者的免疫细胞上表达。

[0532] 实施方式88提供了实施方式87所述的方法,其中所述免疫细胞包括T细胞(例如,激活的T细胞)、B细胞、自然杀伤(NK)细胞、调节性T细胞、巨噬细胞、树突状细胞(DC)或肿瘤浸润淋巴细胞。

[0533] 实施方式89提供了实施方式81-88中任一项所述的方法,其中所述癌症包括黑素瘤(例如,转移性恶性黑素瘤)、前列腺癌(例如,激素难治性前列腺腺癌)、头颈癌(例如,头颈部的鳞状细胞癌)、宫颈癌、甲状腺癌、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、白血病、淋巴瘤(例如,B细胞淋巴瘤)、肾上腺癌、AIDS相关癌症、肺泡软组织肉瘤、星状细胞瘤、骨癌、脑癌和脊髓癌、转移性脑瘤、颈动脉体瘤、软骨瘤、脊索瘤、嫌色细胞肾细胞癌、透明细胞癌、皮肤良性纤维组织细胞瘤、促结缔组织增生小圆细胞瘤、室管膜细胞瘤、尤文氏肿瘤、骨外粘液样软骨瘤、骨纤维发育不全、骨骼纤维发育不良、胆囊癌或胆管癌、妊娠性滋养层疾病、生殖细胞瘤、血液恶性肿瘤、肝细胞癌、胰岛细胞肿瘤、卡波西氏肉瘤、肾癌、脂肪瘤/良性脂肪瘤、脂肪肉瘤/恶性脂肪瘤、成神经管细胞瘤、脑膜瘤、默克尔细胞癌瘤、多发性内分泌瘤、多发性骨髓瘤、脊髓发育不良综合征、神经母细胞瘤、神经内分泌肿瘤、甲状腺乳头状癌、副甲状腺瘤、小儿癌症、周围神经鞘瘤、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、前列腺癌、后葡萄膜黑素瘤、罕见血液系统疾病、肾转移癌、横纹肌样瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、睾丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺转移癌、子宫癌或其任何组合。

[0534] 实施方式90提供了实施方式81-88中任一项所述的方法,其中所述癌症包括宫颈癌、肺癌、肝癌、卵巢癌、包括黑素瘤和鳞状细胞癌的皮肤癌、结肠癌、膀胱癌、乳腺癌、肾癌、食管癌、胃癌、胰腺癌、头部癌和颈部癌。

[0535] 实施方式91提供了实施方式78-90中任一项所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段、所述犬抗体、所述scFv、所述双特异性分子或所述免疫缀合物与cPD-1特异性结合。

[0536] 实施方式92提供了实施方式91所述的方法,其中抗体或其抗原结合片段、所述犬

抗体、所述scFv、所述双特异性分子或所述免疫缀合物与cPD-1的结合破坏了cPD-1与cPD-1的配体(例如,犬程序性死亡配体1)的相互作用。

[0537] 实施方式93提供了实施方式78-92中任一项所述的方法,其中所述受试者是犬。

[0538] 实施方式94提供了一种制造实施方式73所述的药物组合物的方法,其包括将实施方式1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、实施方式39-41中任一项所述的犬抗体或实施方式42-45中任一项所述的scFv、实施方式46所述的双特异性分子、或实施方式47所述的免疫缀合物以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂混合。

[0539] 实施方式95提供了一种制造用于治疗癌症、败血症或败血性休克、或慢性感染(例如,病毒感染)的组合物,其包括将实施方式1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、实施方式39-41中任一项所述的犬抗体、或实施方式42-45中任一项所述的scFv、实施方式46所述的双特异性分子、或实施方式47所述的免疫缀合物以及药学上可接受的赋形剂、载体或稀释剂混合。

[0540] 实施方式96提供了实施方式95所述的方法,其中所述癌症包括黑素瘤(例如,转移性恶性黑素瘤)、前列腺癌(例如,激素难治性前列腺腺癌)、头颈癌(例如,头颈部的鳞状细胞癌)、宫颈癌、甲状腺癌、胶质母细胞瘤、神经胶质瘤、白血病、淋巴瘤(例如,B细胞淋巴瘤)、肾上腺癌、AIDS相关癌症、肺泡软组织肉瘤、星状细胞瘤、骨癌、脑癌和脊髓癌、转移性脑瘤、颈动脉体瘤、软骨瘤、脊索瘤、嫌色细胞肾细胞癌、透明细胞癌、皮肤良性纤维组织细胞瘤、促结缔组织增生小圆细胞瘤、室管膜细胞瘤、尤文氏肿瘤、骨外粘液样软骨瘤、骨纤维发育不全、骨骼纤维发育不良、胆囊癌或胆管癌、妊娠性滋养层疾病、生殖细胞瘤、血液恶性肿瘤、肝细胞癌、胰岛细胞肿瘤、卡波西氏肉瘤、肾癌、脂肪瘤/良性脂肪瘤、脂肪肉瘤/恶性脂肪瘤、成神经管细胞瘤、脑膜瘤、默克尔细胞癌瘤、多发性内分泌瘤、多发性骨髓瘤、脊髓发育不良综合征、神经母细胞瘤、神经内分泌肿瘤、甲状腺乳头状癌、副甲状腺瘤、小儿癌症、周围神经鞘瘤、嗜铬细胞瘤、垂体瘤、前列腺癌、后葡萄膜黑素瘤、罕见血液系统疾病、肾转移癌、横纹肌样瘤、横纹肌肉瘤、肉瘤、软组织肉瘤、鳞状细胞癌、胃癌、滑膜肉瘤、睾丸癌、胸腺癌、胸腺瘤、甲状腺转移癌、子宫癌或其任何组合。

[0541] 实施方式97提供了实施方式95所述的方法,其中所述癌症包括宫颈癌、肺癌、肝癌、卵巢癌、包括黑素瘤和鳞状细胞癌的皮肤癌、结肠癌、膀胱癌、乳腺癌、肾癌、食管癌、胃癌、胰腺癌、头部癌和颈部癌。

[0542] 实施方式98提供了实施方式1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、实施方式39-41中任一项所述的犬抗体、或实施方式42-45中任一项所述的scFv、实施方式46所述的双特异性分子、实施方式47所述的免疫缀合物或实施方式73所述的药物组合物,其用作药物。

[0543] 实施方式99提供了实施方式1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、实施方式39-41中任一项所述的犬抗体、或实施方式42-45中任一项所述的scFv、实施方式46所述的双特异性分子、实施方式47所述的免疫缀合物、或实施方式73所述的药物组合物,其用于治疗癌症、败血症或败血性休克、或慢性感染(例如,病毒感染)的药物。

[0544] 实施方式100提供了实施方式1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、实施方式39-41中任一项所述的犬抗体、或实施方式42-45中任一项所述的scFv、实施方式46所述的双特异性分子、实施方式47所述的免疫缀合物、或实施方式73所述的药物组合物用于

制造药物的用途。

[0545] 实施方式101提供了实施方式1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、实施方式39-41中任一项所述的犬抗体、或实施方式42-45中任一项所述的scFv、实施方式46所述的双特异性分子、实施方式47所述的免疫缀合物、或实施方式73所述的药物组合物用于制造用于治疗癌症、败血症或败血性休克、或慢性感染(例如,病毒感染)的药物的用途。

[0546] 实施方式102提供了一种产生实施方式1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、实施方式39-41中任一项所述的犬抗体或实施方式42-45中任一项所述的scFv的方法,所述方法包括培养实施方式68-72中任一项所述的宿主细胞。

[0547] 实施方式103提供了实施方式102所述的方法,进一步包括在足以允许实施方式1-38中任一项所述的抗体或其抗原结合片段、实施方式39-41中任一项所述的犬抗体或实施方式42-45中任一项所述的scFv的表达和分泌的条件下,在细胞培养基中温育实施方式68-72中任一项所述的宿主细胞。

[0548] 其他实施方式

[0549] 本文对变量的任何定义中要素列表的叙述包括该变量作为任何单一要素或所列要素的组合(或子组合)的定义。本文中实施方式的叙述包括作为任何单一实施方式或与其他实施方式或其部分组合的实施方式。

[0550] 本文引用的每篇专利、专利申请和出版物的公开内容均通过引用整体并入本文。虽然已参考具体实施方式公开了本公开内容,但是显而易见,本领域的其他技术人员可以在不背离本公开内容的真实精神和范围的情况下设想本公开内容的其他实施方式和变型。所附权利要求旨在解释为包括所有这种实施方式和等同变型。

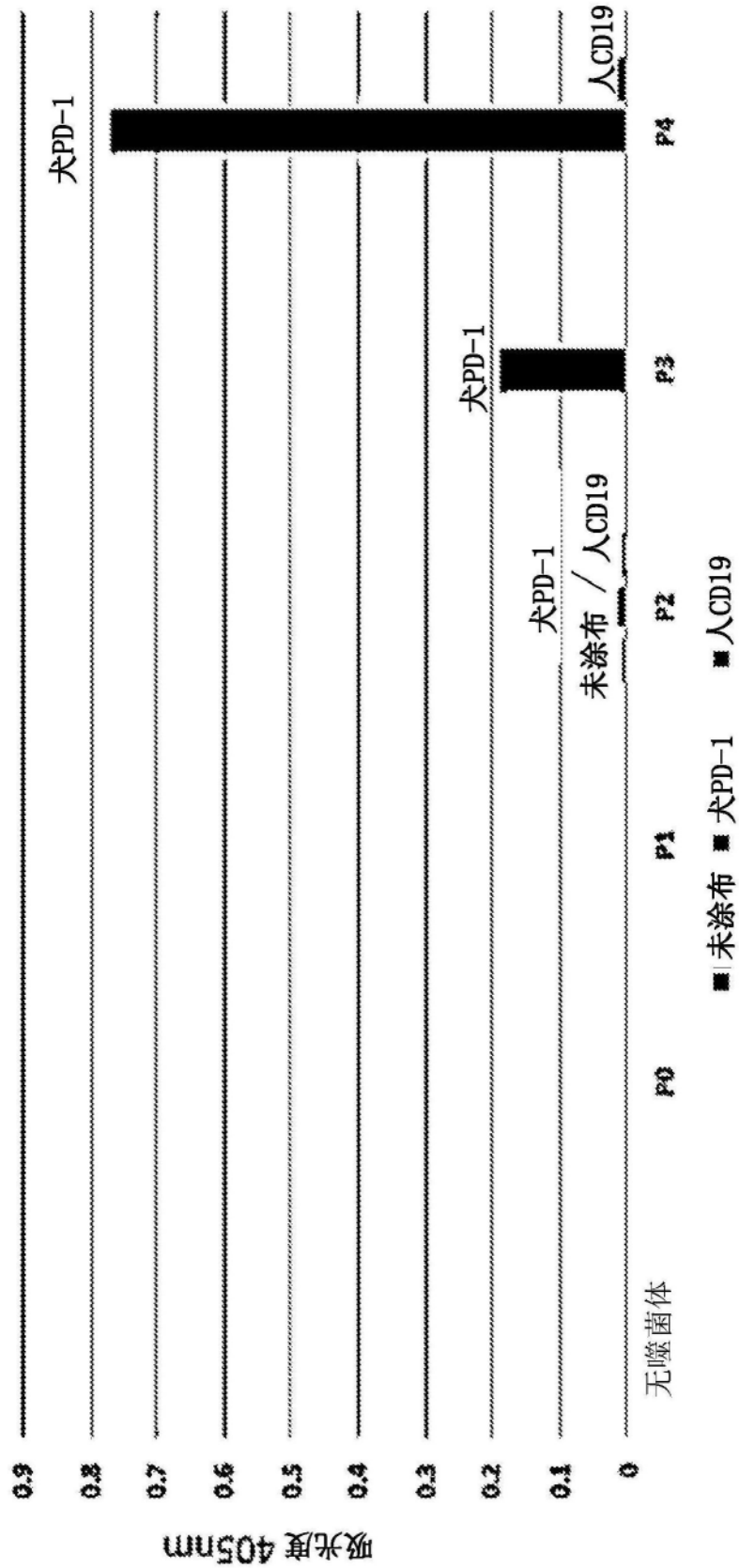


图1

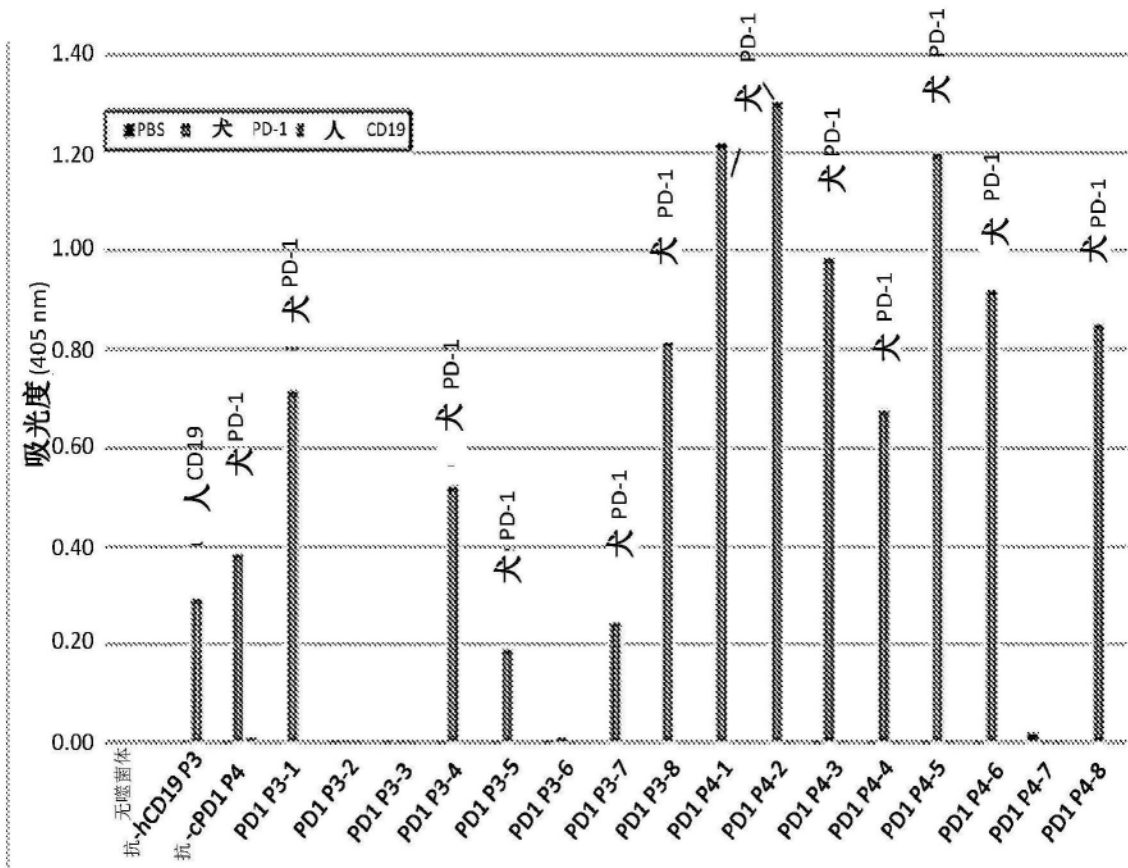


图2A

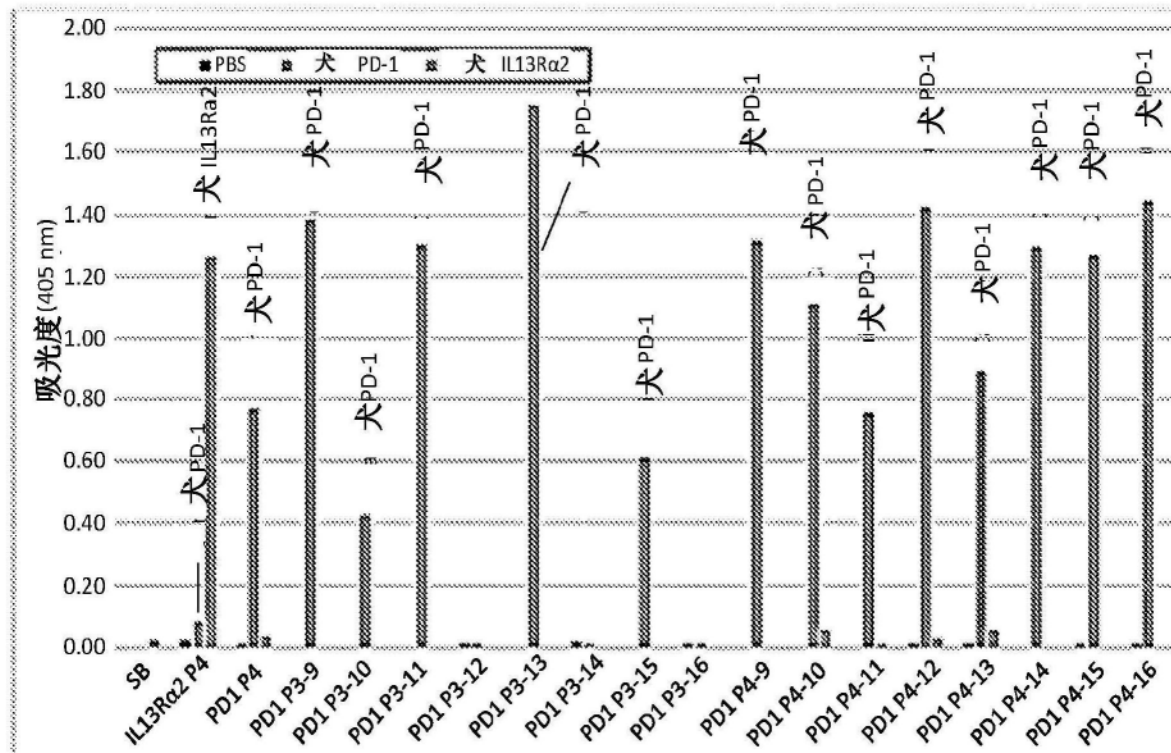


图2B

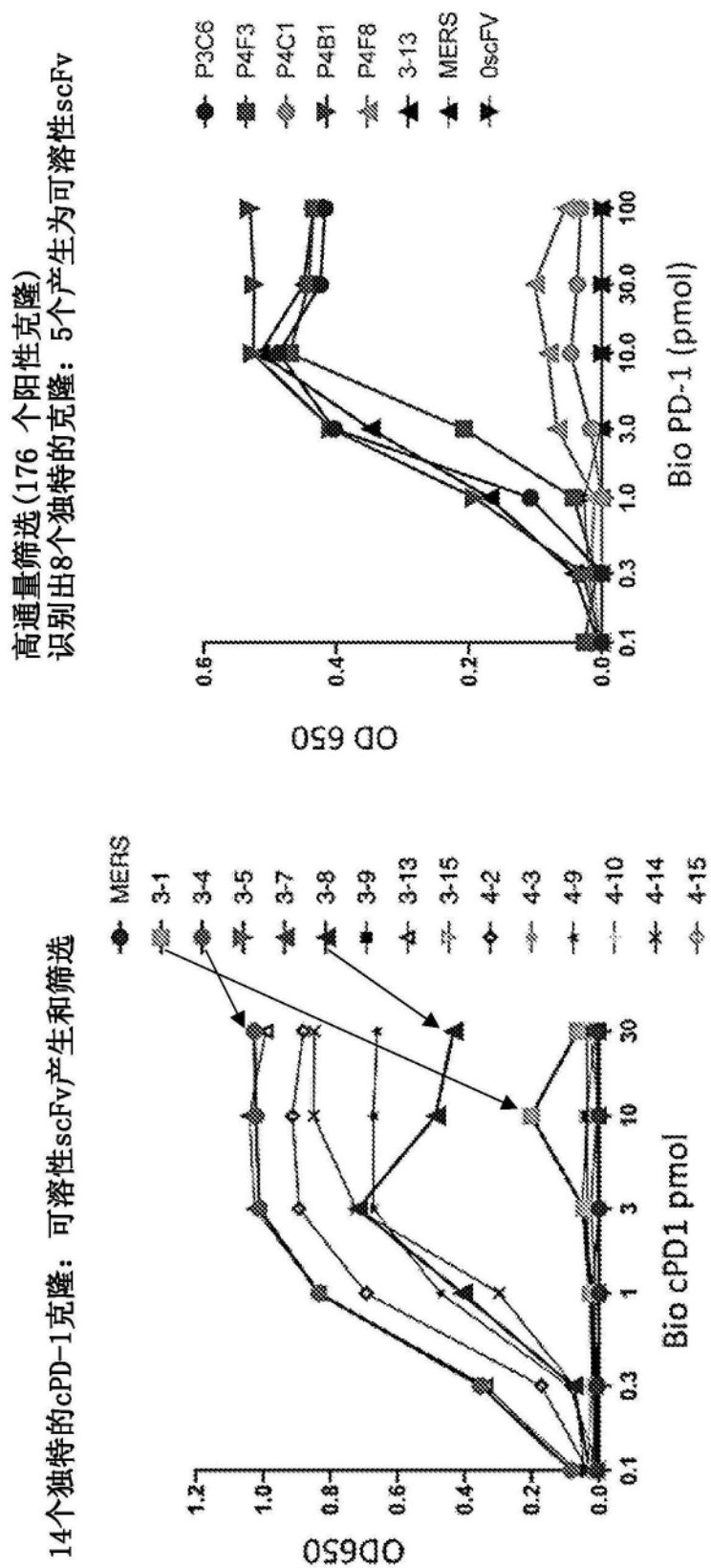


图3

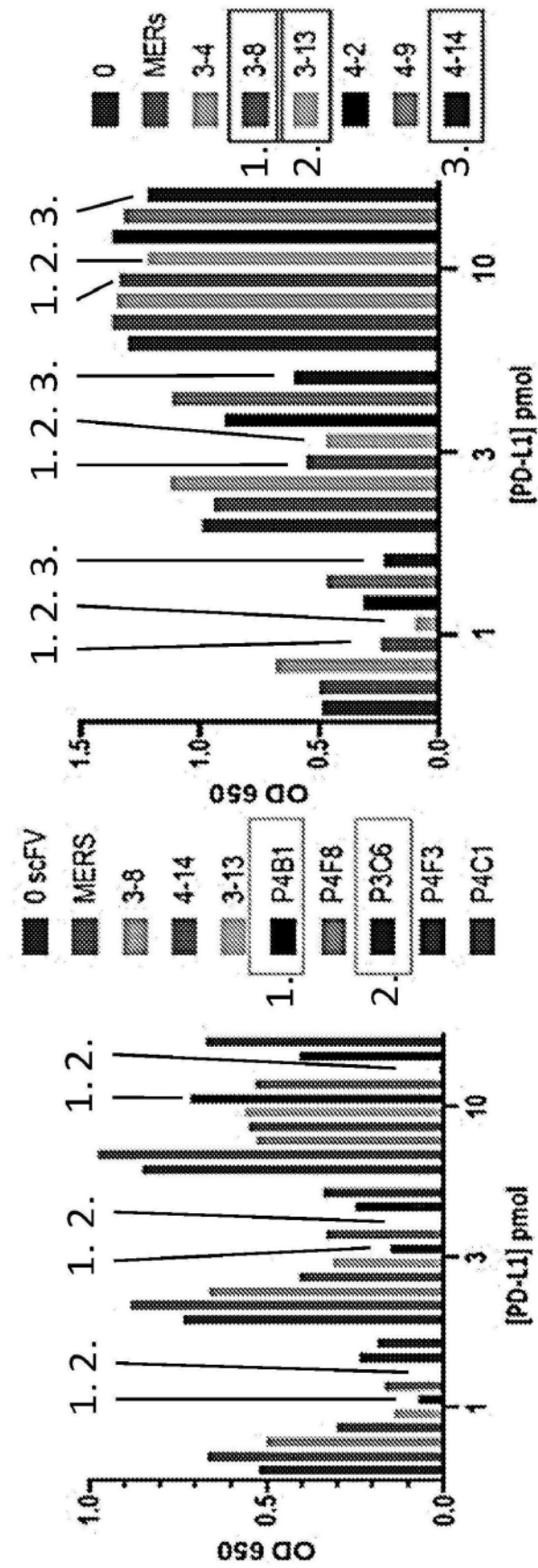


图4

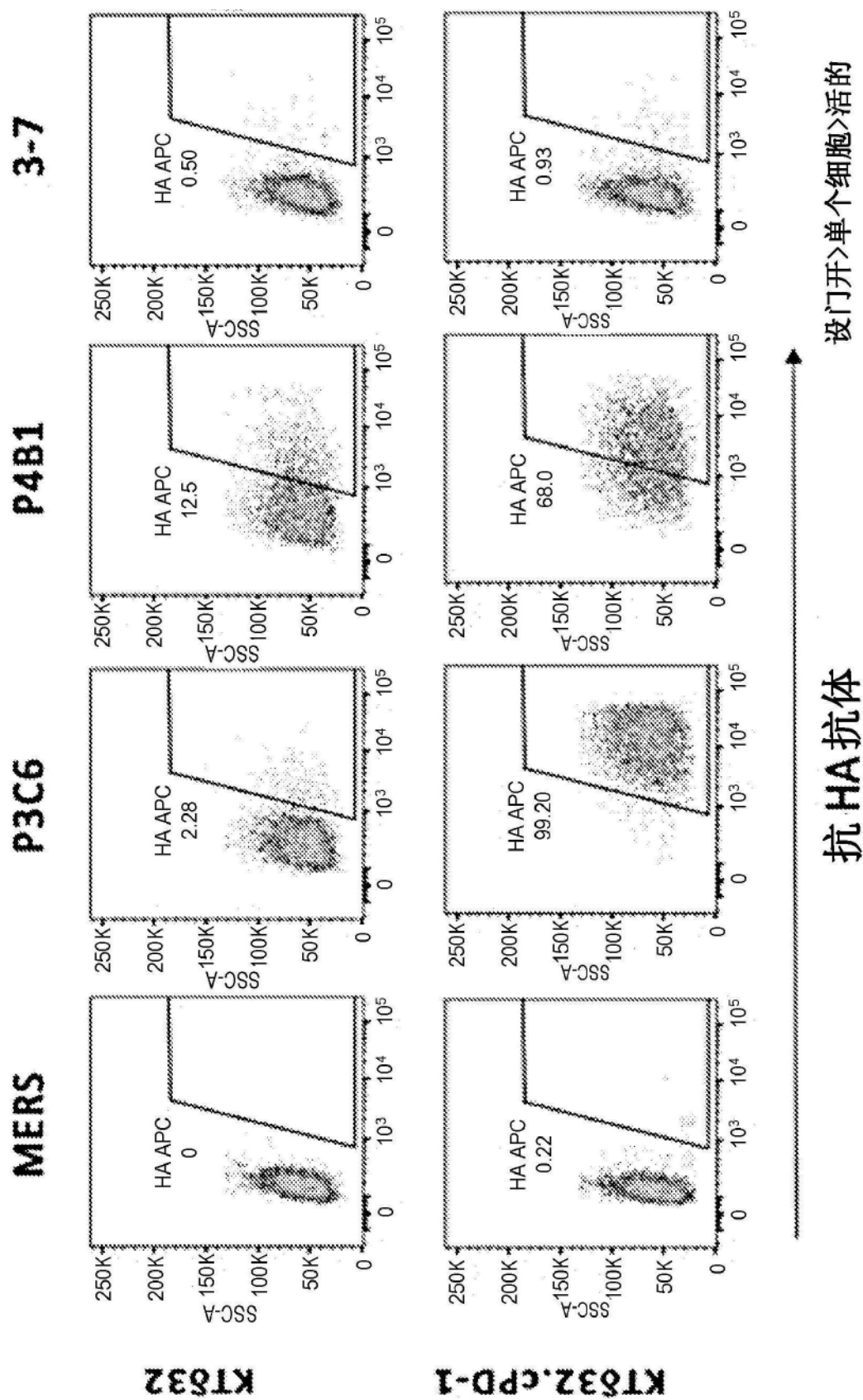


图5

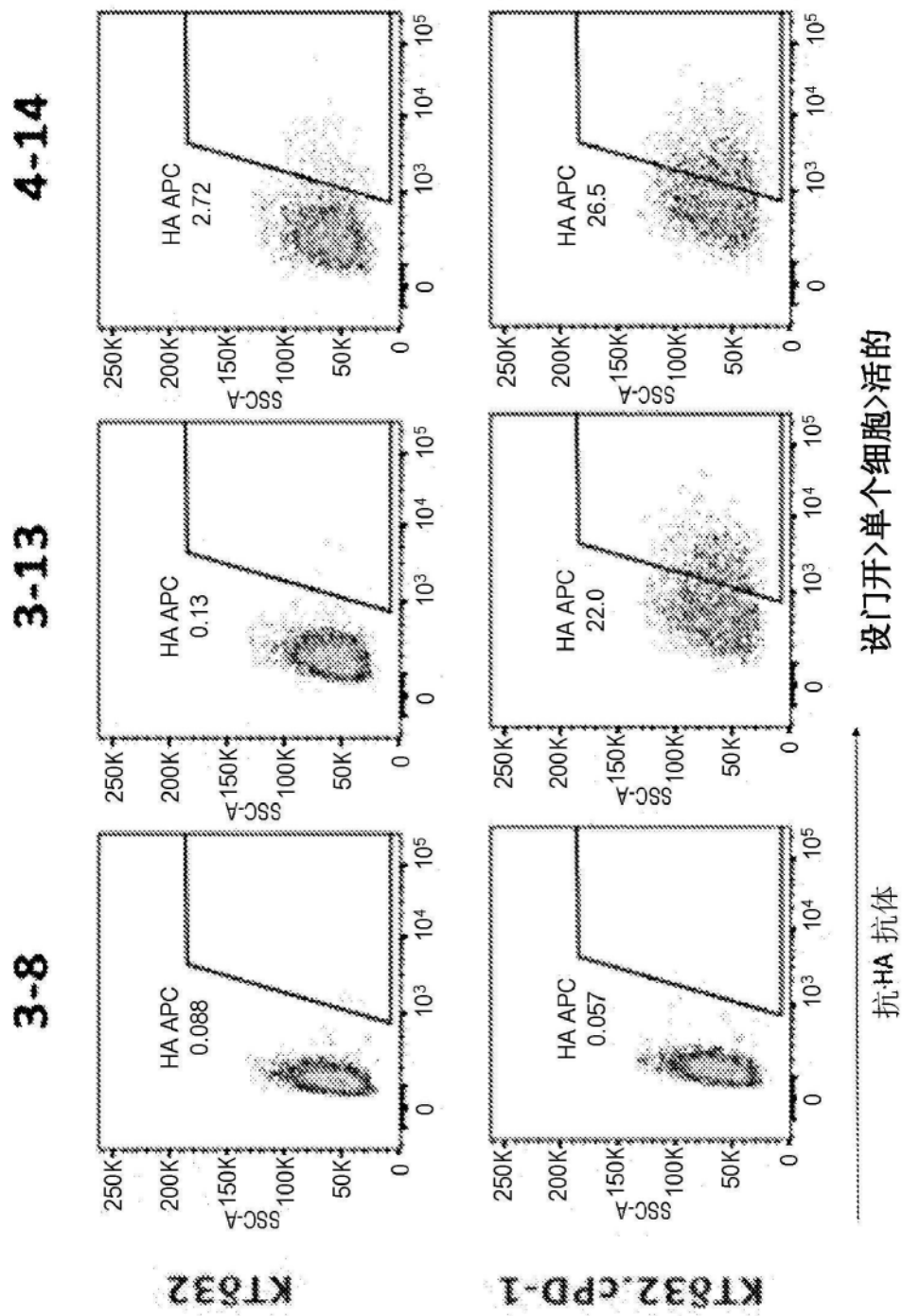


图5续

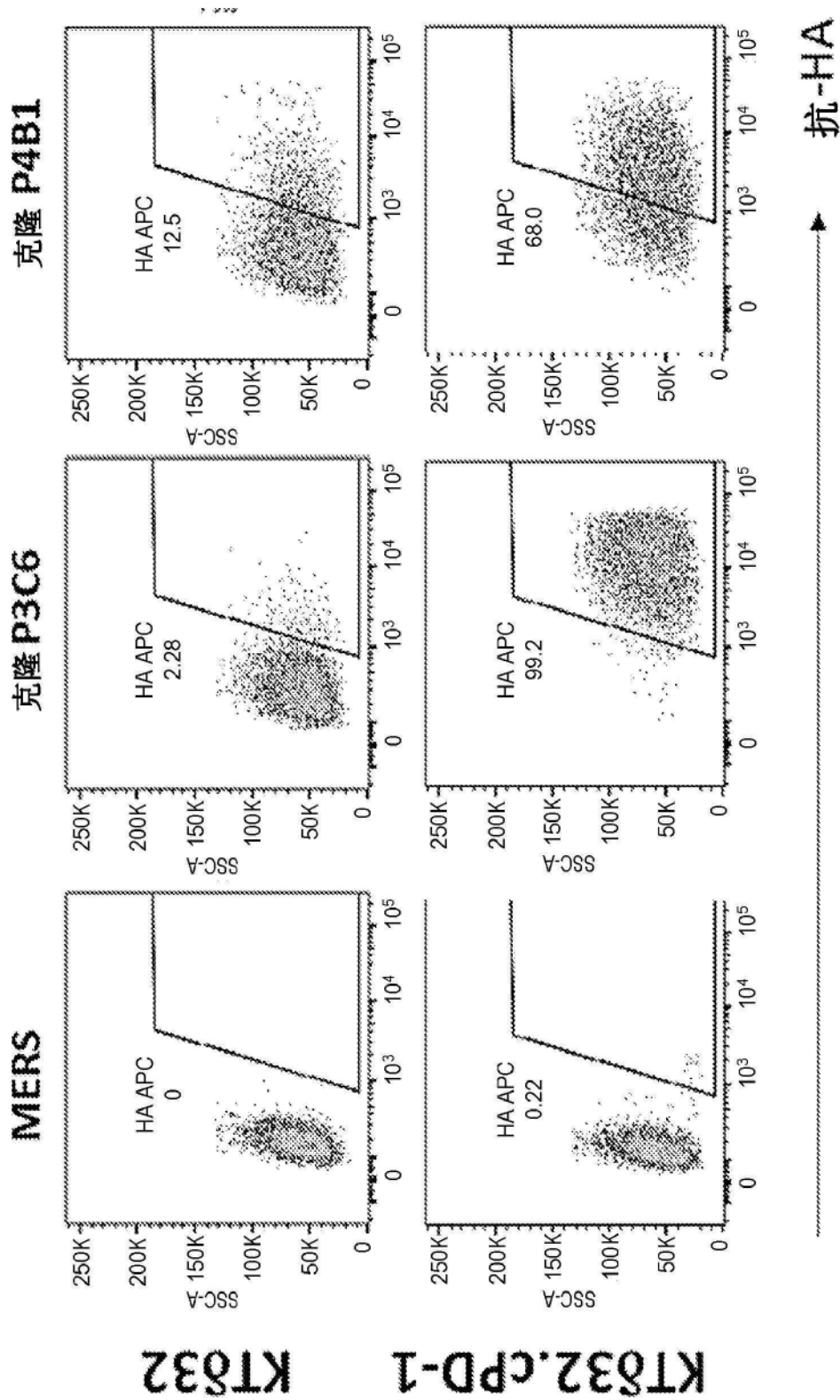


图6

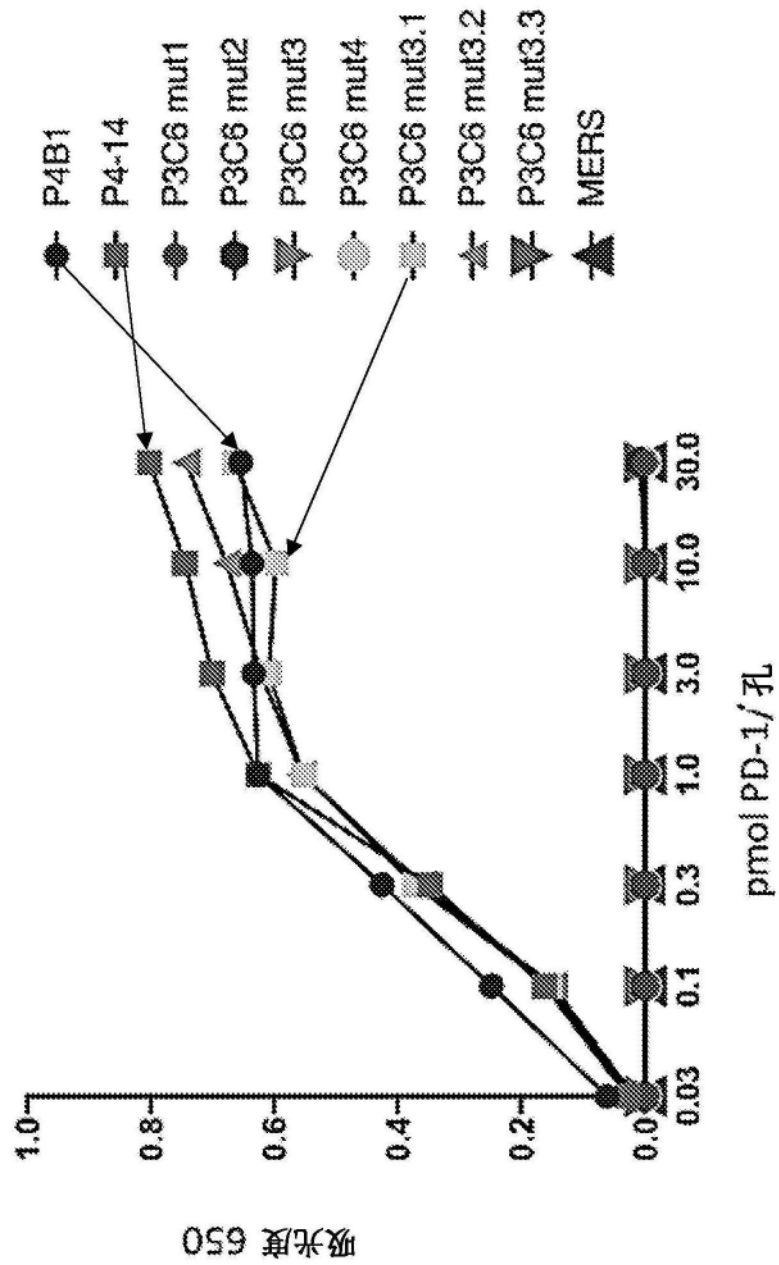


图7

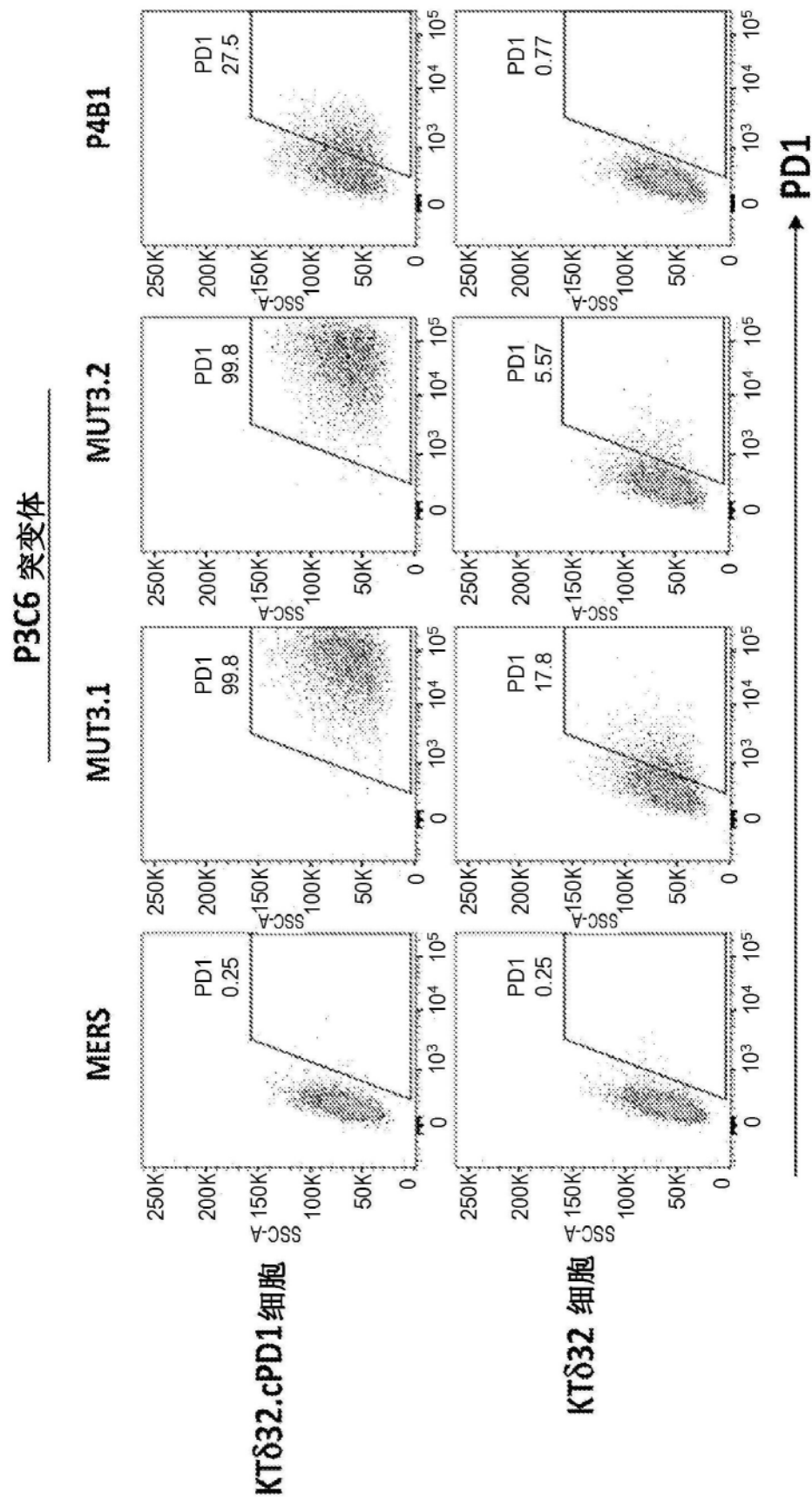


图8

新的PD-1 P3C6克隆：来自转染的IgG产量						
可变重链框架突变体分析						
TF #31						
靶标	同种型	IgG 类别	突变体	ug/ul	总产量ug	产量 / 平板 ug
P3C6	K γ	IgG4 HA	mut1	0.04	6	6
P3C6	K γ	IgG4 HA	mut2	0.03	4.3	4.3

图9A

新的PD-1克隆：来自转染的IgG产量						
可变重链框架突变体分析						
靶标	克隆	TF #34			总产量ug	产量/ 平板 ug
		同种型	IgG 类别	突变体		
PD-1	P3C6	kg	IgG4 HA	mut3.1	57	57
PD-1	P3C6	kg	IgG4 HA	mut3.2	58	58
PD-1	P3C6	kg	IgG4 HA	mut3.3	34.6	34.6
PD-1	P3C6	kg	IgG4 HA	mut4	36	36
PD-1	P3C6	kg	IgG4 HA	mut5	0	0

图9B

浅灰色直方图—MERS抗体
深灰色直方图—抗-PD1犬抗体

P3C6 突变体

P4B1

3.1

3.2

0hr

96hr

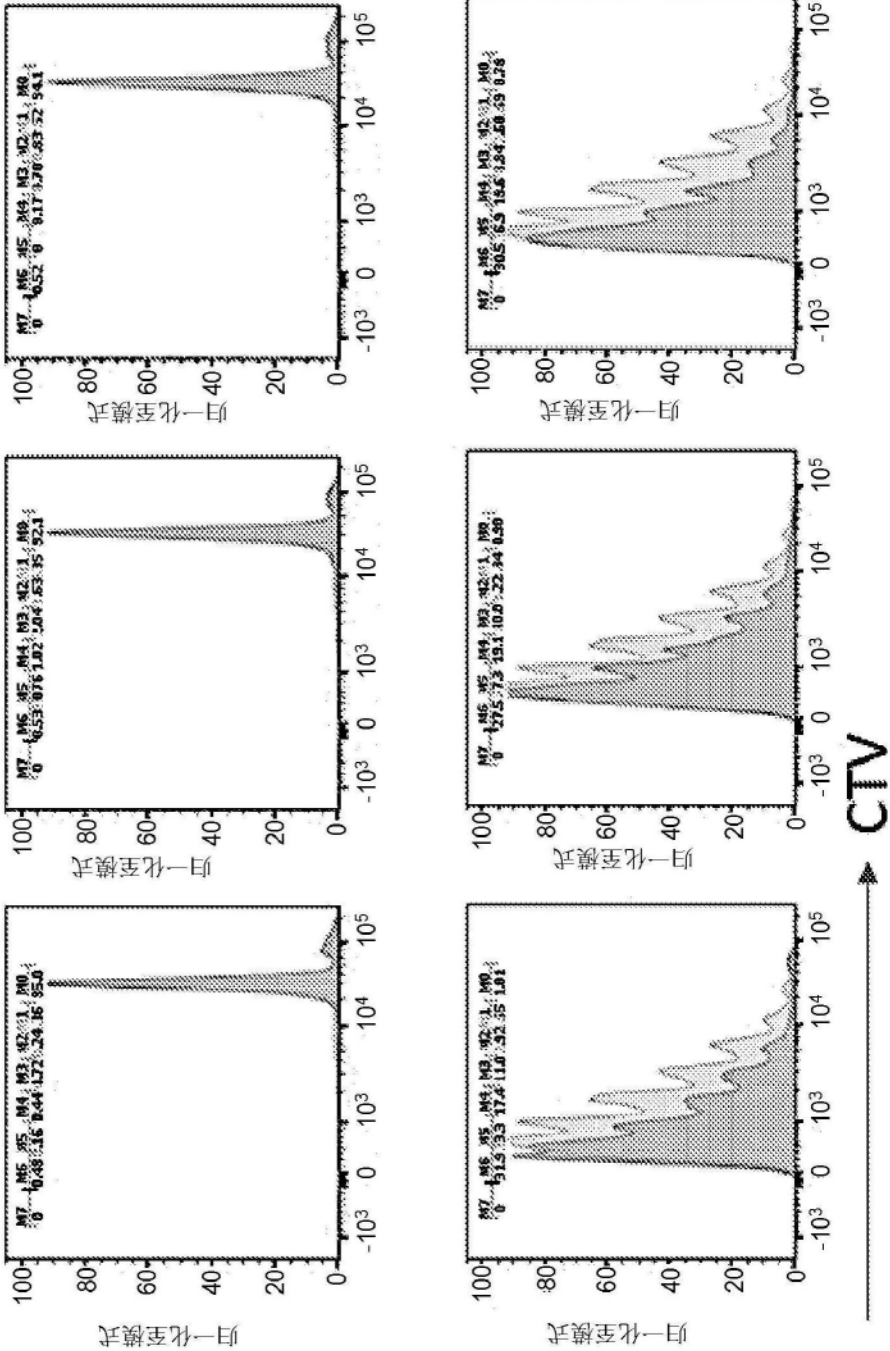


图10

NEMO	96hr					
	MERS		P4B1	3-1	3-2	
R.F.%		87		84	87	87
增殖能力		13		18	17	18
# 周期数		3.7		4.17	4.09	4.17
预测的倍数扩增		11		15	15	16

图10续

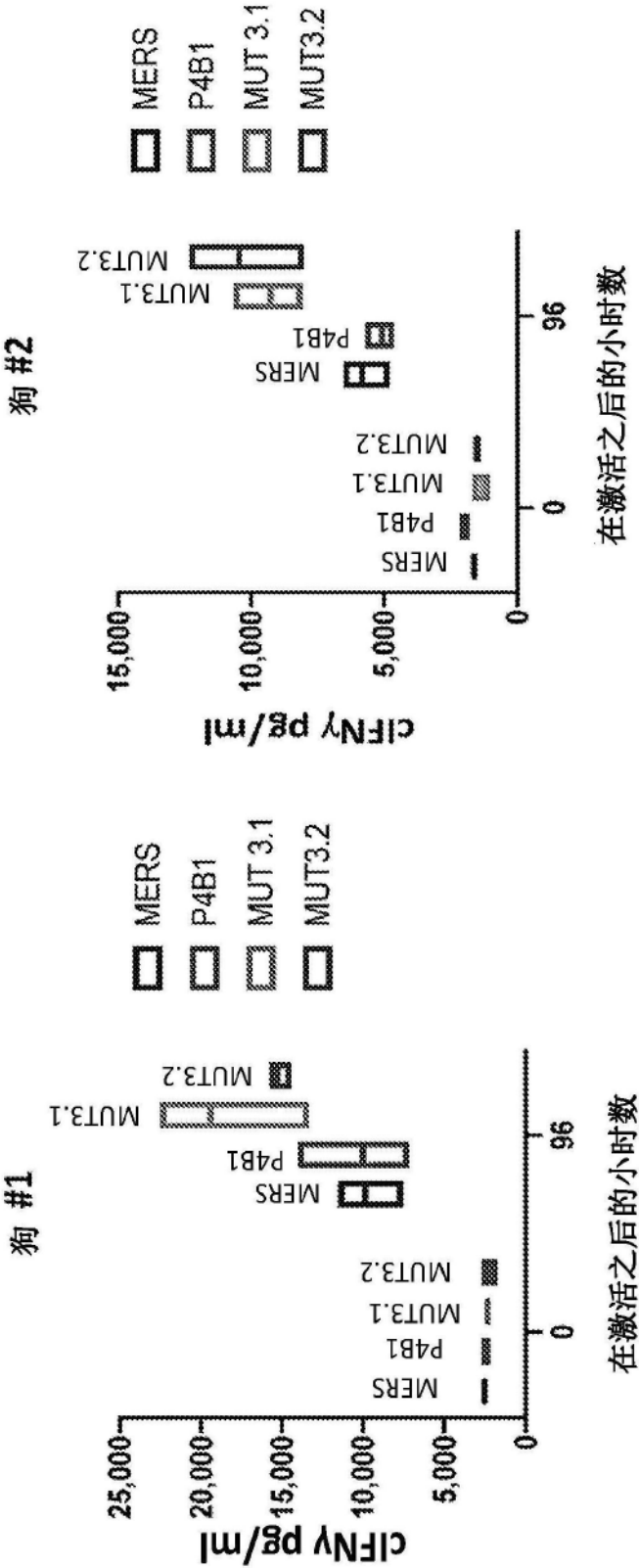


图11

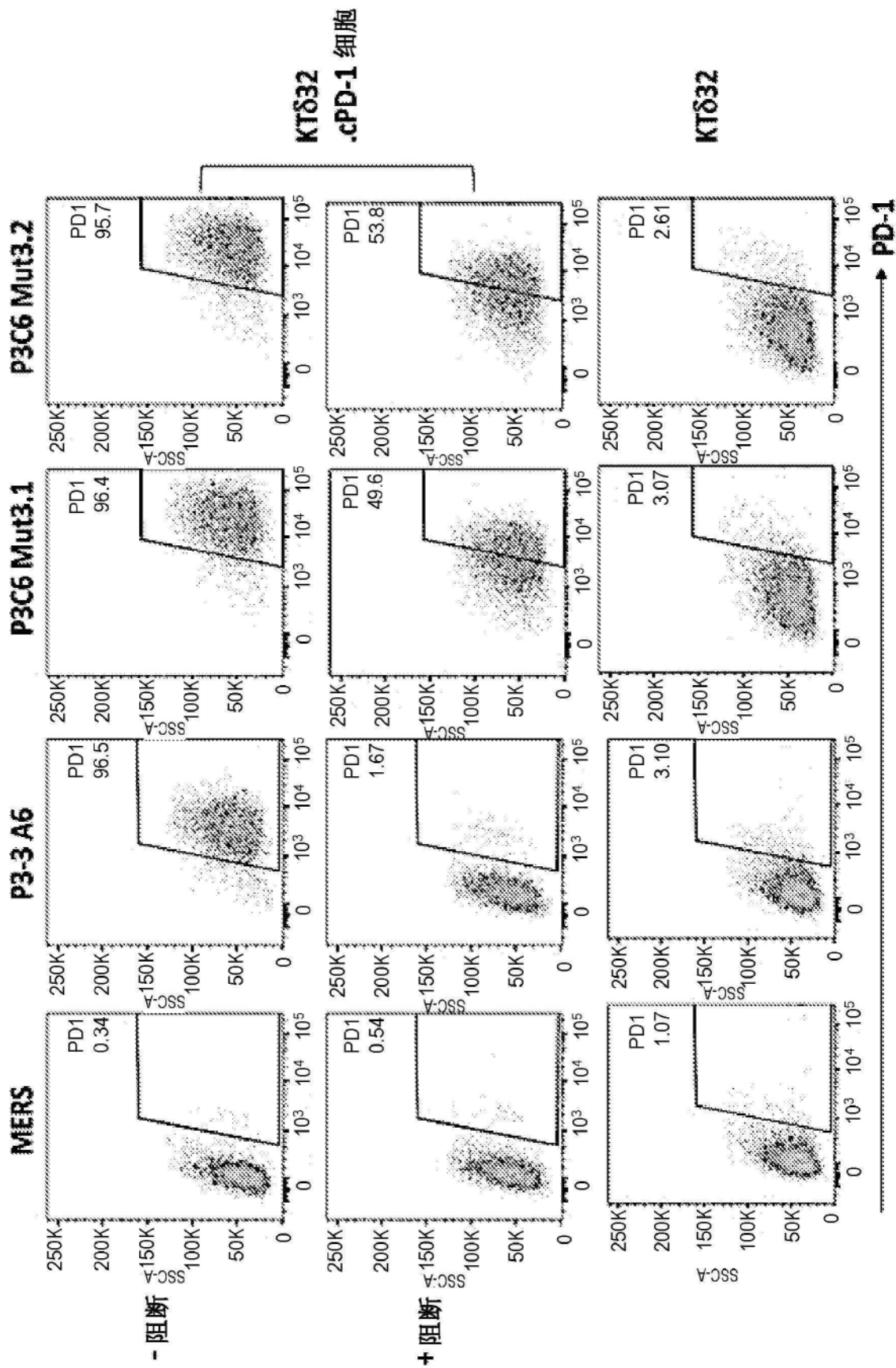


图12