



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117586401 A

(43) 申请公布日 2024.02.23

(21) 申请号 202311368997.1	C12N 5/10 (2006.01)
(22) 申请日 2018.01.19	C12N 15/13 (2006.01)
(66) 本国优先权数据 201710046148.2 2017.01.20 CN	A61K 39/395 (2006.01)
(62) 分案原申请数据 201880007550.2 2018.01.19	A61K 35/17 (2015.01)
(71) 申请人 大有华夏生物医药集团有限公司 地址 100006 北京市东城区东长安街1号东 方广场W1座15层1509	A61P 37/02 (2006.01)
(72) 发明人 陈列平 罗利群	A61P 35/00 (2006.01)
(74) 专利代理机构 北京信诺创成知识产权代理 有限公司 11728 专利代理师 吕鹏云 陈悦军	A61P 35/02 (2006.01)
(51) Int. Cl. C07K 16/28 (2006.01)	A61P 31/04 (2006.01)
	A61P 31/10 (2006.01)
	A61P 31/12 (2006.01)
	A61P 33/00 (2006.01)

权利要求书3页 说明书36页
序列表(电子公布) 附图13页

(54) 发明名称
抗PD-1抗体及其用途

(57) 摘要

本申请提供抗PD-1抗体或其片段。在各种实例中,所述抗体或其片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含重链互补决定区HCDR1(SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:7或SEQ ID NO:13)、HCDR2(SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:8或SEQ ID NO:14)和HCDR3(SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:15),所述轻链可变区包含轻链互补决定区LCDR1(SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:16)、LCDR2(SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:17)和LCDR3(SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:18)。还提供了使用所述抗体或其片段来治疗和诊断诸如癌症、感染或免疫紊乱的疾病的方法。

1. 一种分离的抗体或其片段,所述分离的抗体或其片段对人程序性细胞死亡蛋白1 (PD-1) 具有特异性,其中所述抗体或其片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含重链互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述轻链可变区包含轻链互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中所述HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3选自由以下组成的组:

(a) HCDR1:GFTFSSYT (SEQ ID NO:1),HCDR2:ISHGGGDT (SEQ ID NO:2),HCDR3:ARHSGYERGYYYVMDY (SEQ ID NO:3),LCDR1:ESVDYYGFSF (SEQ ID NO:4),LCDR2:AAS (SEQ ID NO:5),LCDR3:QQSKEVPW (SEQ ID NO:6);

(b) HCDR1:GYTFTSYT (SEQ ID NO:7),HCDR2:INPTTGYT (SEQ ID NO:8),HCDR3:ARDDAYYSGY (SEQ ID NO:9),LCDR1:ENIYSNL (SEQ ID NO:10),LCDR2:AAK (SEQ ID NO:11),LCDR3:QHFWGTPWT (SEQ ID NO:12);和

(c) HCDR1:GFAFSSYD (SEQ ID NO:13),HCDR2:ITIGGGTT (SEQ ID NO:14),HCDR3:ARHRYDYFAMDN (SEQ ID NO:15),LCDR1:ENVNYGINF (SEQ ID NO:16),LCDR2:VSS (SEQ ID NO:17),LCDR3:QSKDVPW (SEQ ID NO:18)。

2. 权利要求1所述的抗体或其片段,进一步包括重链恒定区、轻链恒定区、Fc区或它们的组合。

3. 权利要求1所述的抗体或其片段,其中所述轻链恒定区是 κ 链或 λ 链恒定区。

4. 权利要求1所述的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段是IgG、IgM、IgA、IgE或IgD的同种型。

5. 权利要求4所述的抗体或其片段,其中所述同种型为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。

6. 权利要求1-5中任一项所述的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段是嵌合抗体、人源化抗体或全人源抗体。

7. 权利要求6所述的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段是人源化抗体。

8. 权利要求7所述的抗体或其片段,其包含重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37或SEQ ID NO:39具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

9. 权利要求8所述的抗体或其片段,其包含轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43或SEQ ID NO:45具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

10. 一种分离的抗体或片段,所述分离的抗体或片段对人程序性细胞死亡蛋白1 (PD-1) 具有特异性,其中所述抗体或其片段包含重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区包含重链互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述轻链可变区包含轻链互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中所述HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3选自由以下组成的组:

(a) HCDR1:GFTFSSYT (SEQ ID NO:1),HCDR2:ISHGGGDT (SEQ ID NO:2),HCDR3:ARHSGYERGYYYVMDY (SEQ ID NO:3),LCDR1:ESVDYYGFSF (SEQ ID NO:4),LCDR2:AAS (SEQ ID NO:5),LCDR3:QQSKEVPW (SEQ ID NO:6);

(b) HCDR1:GYTFTSYT (SEQ ID NO:7),HCDR2:INPTTGYT (SEQ ID NO:8),HCDR3:ARDDAYYSGY (SEQ ID NO:9),LCDR1:ENIYSNL (SEQ ID NO:10),LCDR2:AAK (SEQ ID NO:11),LCDR3:QHFWGTPWT (SEQ ID NO:12);

(c) HCDR1:GFAFSSYD (SEQ ID NO:13),HCDR2:ITIGGGTT (SEQ ID NO:14),HCDR3:

ARHRYDYFAMDN (SEQ ID NO:15), LCDR1:ENVNYGINF (SEQ ID NO:16), LCDR2:VSS (SEQ ID NO:17), LCDR3:QQSKDVPW (SEQ ID NO:18); 和

(d) 如 (a) - (c) 所示的 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3, 但其中至少一个包含一个、两个或三个氨基酸添加、缺失、保守氨基酸取代或其组合。

11. 权利要求 10 所述的分离的抗体或其片段, 其中所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 如 (a) - (c) 中任一项所示, 但其中之一包含保守氨基酸取代。

12. 权利要求 10 所述的分离的抗体或其片段, 其中所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 如 (a) - (c) 中任一项所示, 但其中两个的每个均包含保守氨基酸取代。

13. 权利要求 10 所述的分离的抗体或其片段, 其中所述 HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 如 (a) - (c) 中任一项所示, 但其中三个的每个均包含保守氨基酸取代。

14. 一种组合物, 其包含权利要求 1-13 中任一项所述的抗体或其片段和药学上可接受的载体。

15. 一种分离的细胞, 其包含一个或多个编码权利要求 1-13 中任一项所述的抗体或其片段的多核苷酸。

16. 权利要求 1-13 中任一项所述的抗体或其片段在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

17. 权利要求 16 所述的用途, 其中所述癌症选自由以下组成的组: 膀胱癌、肝癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、白血病、淋巴瘤、胰腺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、乳腺癌、尿道癌、头颈部癌、胃肠道癌、胃癌、食管癌、卵巢癌、肾癌、黑色素瘤、前列腺癌和甲状腺癌。

18. 一种治疗有需要的患者的癌症的方法, 包括向所述患者施用权利要求 1-13 中任一项所述的抗体或其片段。

19. 一种治疗有需要的患者中的癌症或感染的方法, 包括:

(a) 用权利要求 1-13 中任一项所述的抗体或其片段在体外处理细胞; 和

(b) 将经处理的细胞施用于所述患者。

20. 权利要求 19 所述的方法, 其中所述细胞是 T 细胞。

21. 权利要求 1-13 中任一项所述的抗体或其片段在制备用于治疗感染的药物中的用途。

22. 权利要求 21 所述的用途, 其中所述感染是病毒感染、细菌感染、真菌感染或寄生虫感染。

23. 权利要求 1-13 中任一项所述的抗体或其片段在制备用于治疗免疫紊乱的药物中的用途。

24. 权利要求 23 所述的用途, 其中所述免疫紊乱选自由以下组成的组: 感染、与感染相关的内毒素休克、关节炎、类风湿性关节炎、哮喘、COPD、盆腔炎性疾病、阿尔茨海默病、炎性肠病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、佩罗尼氏病、乳糜泻、胆囊疾病、藏毛病、腹膜炎、银屑病、血管炎、手术粘连、脑卒中、I 型糖尿病、莱姆病、关节炎、脑膜脑炎、自身免疫性葡萄膜炎、免疫介导的中枢和外周神经系统炎性疾病、多发性硬化、狼疮和格林-巴利综合征、特应性皮炎、自身免疫性肝炎、纤维性肺泡炎、格拉夫病、IgA 肾病、特发性血小板减少性紫癜、梅尼埃病、天疱疮、原发性胆汁性肝硬化、结节病、硬皮病、韦格纳肉芽肿、胰腺炎、创伤、移植物抗宿主病、移植排斥反应、缺血性疾病、心肌梗死、动脉粥样硬化、血管内凝血、骨吸收、骨质疏松、

骨关节炎、牙周炎、胃酸过少和与母胎耐受缺失有关的不育。

抗PD-1抗体及其用途

[0001] 本申请是申请日2018年1月19日、申请号201880007550.2、发明名称为“抗PD-1抗体及其用途”的发明专利申请的分案申请。

背景技术

[0002] 程序性细胞死亡1 (PD-1) 的cDNA于1992年从鼠T细胞杂交瘤和经历细胞凋亡的造血祖细胞系中分离出。基因切除 (genetic ablation) 研究显示,PD-1的缺陷在多种的小鼠品系中导致不同的自身免疫表型。具有转基因T细胞受体 (TCR) 的PD-1缺陷的同种异体T细胞对同种抗原 (alloantigen) 表现出增强的反应,表明T细胞上的PD-1在响应抗原中起到负调节作用。

[0003] 几项研究对与PD-1相互作用的分子的发现作出贡献。在1999年,B7同源物1 (B7-H1,也称为程序性死亡配体1 [PD-L1]),基于其与B7家族分子的同源性,利用分子克隆和人类表达序列标签数据库检索,独立于PD-1被鉴定出来,并显示B7-H1在体外作为人T细胞应答的抑制剂起作用。一年后,Freeman、Wood和Honjo的实验室表明,B7-H1 (以下称为PD-L1) 是PD-1的结合和功能性伴侣,这两项独立的研究线汇合。接下来,确定了PD-L1缺陷小鼠 (PD-L1 KO小鼠) 易于被诱导自身免疫性疾病,尽管这一小鼠品系并不自发地发展出这样的疾病。之后,阐明了PD-L1/PD-1相互作用在体内抑制T细胞应答中起着主导作用,特别是在肿瘤微环境中。

[0004] 初步研究显示,肿瘤相关的PD-L1促进了活化的T细胞的凋亡 (Dong H. 等, Tumor-associated B7-H1 promotes T-cell apoptosis: a potential mechanism of immune evasion. *Nature medicine*. 2002; 8 (8) : 793-800), 并且还刺激人外周血T细胞中的IL-10产生 (Dong H等, B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nature medicine*. 1999; 5 (12) : 1365-9) 以介导免疫抑制。目前已知PD-L1对免疫抑制的作用要复杂得多。除了T细胞凋亡和IL-10诱导外,PD-L1还可以通过多种机制引起T细胞功能障碍。在体外和体内,PD途径也显示出促进T细胞无能。

[0005] 最近,FDA批准了两种PD-1 mAb来治疗人类癌症,一种来自施贵宝 (OpDivo, 纳武单抗 (nivolumab), MDx1106, BMS-936558, ONO-4538), 另一种来自默克 (Keytruda, 派姆单抗 (pembrolizumab), lambrolizumab, MK-3475)。此外,PD-1或PD-L1的多种mAb正在数以百计的牵涉数以千计的患者的临床试验中积极开发。迄今为止,抗PD治疗通过诱导晚期和转移性肿瘤的消退 (regression) 和提高生存率而产生显著的临床益处。更重要的是,抗PD治疗可以具有持久的效果、可耐受的毒性,并显示适用于广谱的癌症类型,特别是实体肿瘤。这些临床发现进一步证实了PD通路阻断的原理,并将抗PD治疗置于与个性化或肿瘤类型特异性治疗不同的独特类别中。由于其与其他癌症治疗相比独特且不重叠的机制,人们正将抗PD治疗的方式与几乎所有的癌症治疗方法相结合,以试图进一步扩大治疗效力。除了与多种癌症免疫治疗方法 (如癌症疫苗、共刺激和共抑制抗体和过继性细胞治疗) 相结合外,还开始了各种临床试验以将抗PD治疗与化疗、放疗和靶向治疗相结合。

[0006] 抗PD治疗在人类癌症特别是实体肿瘤的免疫治疗中处于中心地位。这种疗法不同于以前的免疫治疗剂——其主要目的是增强全身免疫应答或产生对癌症的新免疫力；相反，抗PD治疗调节肿瘤部位的免疫应答，靶向肿瘤引起的免疫缺陷，并修复正在进行的免疫反应。虽然抗PD治疗用于治疗多种人类癌症的临床成功已经证实了这种方法，但我们仍在研究这一途径和相关的免疫应答，这将有助于发现和设计新的临床可应用的癌症免疫治疗方法。

发明内容

[0007] 本公开提供了抗PD-1抗体，其对PD-1蛋白呈现出出色的结合和抑制活性。测试的PD-1抗体中的一种甚至显示出比两个经监管批准的抗PD-1抗体产品更强的结合活性。

[0008] 因此，根据本公开的一个实施方案，提供了一种分离的抗体或其片段，所述分离的抗体或其片段对人类程序性细胞死亡蛋白1 (PD-1) 具有特异性，其中所述抗体或其片段包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含重链互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3，所述轻链可变区包含轻链互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3，其中所述HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3选自由以下组成的组：(a) HCDR1:GFTFSSYT (SEQ ID NO:1)，HCDR2:ISHGGGDT (SEQ ID NO:2)，HCDR3:ARHSGYERGYYYVMDY (SEQ ID NO:3)，LCDR1:ESVDYYGFSF (SEQ ID NO:4)，LCDR2:AAS (SEQ ID NO:5)，LCDR3:QQSKEVPW (SEQ ID NO:6)；(b) HCDR1:GYTFTSYT (SEQ ID NO:7)，HCDR2:INPTTGYT (SEQ ID NO:8)，HCDR3:ARDDAYSGY (SEQ ID NO:9)，LCDR1:ENIYSNL (SEQ ID NO:10)，LCDR2:AAK (SEQ ID NO:11)，LCDR3:QHFWGTPWT (SEQ ID NO:12)；和(c) HCDR1:GFAFSSYD (SEQ ID NO:13)，HCDR2:ITIGGGTT (SEQ ID NO:14)，HCDR3:ARHRYDYFAMDN (SEQ ID NO:15)，LCDR1:ENVNYGINF (SEQ ID NO:16)，LCDR2:VSS (SEQ ID NO:17)，LCDR3:QQSKDVPW (SEQ ID NO:18)。

[0009] 在一些实施方案中，本公开的抗体或片段还包括重链恒定区、轻链恒定区、Fc区或其组合。在一些实施方案中，轻链恒定区是 κ 链或 λ 链恒定区。

[0010] 在一些实施方案中，所述抗体或其片段可以是IgG、IgM、IgA、IgE或IgD的同种型。在一些实施方案中，所述同种型为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在一些实施方案中，所述抗体或其片段是嵌合抗体、人源化抗体或全人源抗体。

[0011] 在一些实施方案中，所述抗体或其片段包含重链可变区，所述重链可变区包含SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39的氨基酸序列，或与SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37或SEQ ID NO:39具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中，所述抗体或其片段包含轻链可变区，所述轻链可变区包含SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45的氨基酸序列，或与SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43或SEQ ID NO:45具有至少95%序列同一性的氨基酸序列。

[0012] 在另一个实施方案中，本公开提供了一种分离的抗体或其片段，所述分离的抗体或其片段对人类程序性细胞死亡蛋白1 (PD-1) 具有特异性，其中所述抗体或其片段包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含重链互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3，所述轻链可变区包含轻链互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3，其中所述HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3选自由以下组成的组：(a) HCDR1:GFTFSSYT (SEQ ID NO:1)，HCDR2:ISHGGGDT (SEQ ID NO:2)，HCDR3:ARHSGYERGYYYVMDY (SEQ ID NO:3)，LCDR1:ESVDYYGFSF

(SEQ ID NO:4),LCDR2:AAS(SEQ ID NO:5),LCDR3:QQSKEVPW(SEQ ID NO:6);(b)HCDR1:GYTFTSYT(SEQ ID NO:7),HCDR2:INPTTGYT(SEQ ID NO:8),HCDR3:ARDDAYSGY(SEQ ID NO:9),LCDR1:ENIYSNL(SEQ ID NO:10),LCDR2:AAK(SEQ ID NO:11),LCDR3:QHFHWGTPWT(SEQ ID NO:12);(c)HCDR1:GFAFSSYD(SEQ ID NO:13),HCDR2:ITIGGGTT(SEQ ID NO:14),HCDR3:ARHRYDYFAMDN(SEQ ID NO:15),LCDR1:ENVNYGINF(SEQ ID NO:16),LCDR2:VSS(SEQ ID NO:17),LCDR3:QQSKDVPW(SEQ ID NO:18);和(d)如(a)-(c)所示的HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3,但至少其中一个包含一个、两个或三个氨基酸添加、缺失、保守氨基酸取代或其组合。

[0013] 在一些实施方案中,所述HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3如(a)-(c)中的任一项所示,但其中之一包括保守氨基酸取代。在一些实施方案中,所述HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3如(a)-(c)中的任一项所示,但其中两个的每个均包含保守氨基酸取代。在一些实施方案中,所述HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3如(a)-(c)中的任一项所示,但其中三个的每个均包含保守氨基酸取代。

[0014] 在一个实施方案中还提供了包含本公开的抗体或其片段和药学上可接受的载体的组合物。在一个实施方案中,还提供了一种分离的细胞,其包含编码所述抗体或其片段的一个或多个多核苷酸。

[0015] 还提供了用途和方法。在一个实施方案中,提供了本公开的抗体或其片段在制备用于治疗癌症的药物中的用途。所述癌症可选自由以下组成的组:膀胱癌、肝癌、结肠癌、直肠癌、子宫内膜癌、白血病、淋巴瘤、胰腺癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、乳腺癌、尿道癌、头颈部癌、胃肠道癌、胃癌、食道癌、卵巢癌、肾癌、黑色素瘤、前列腺癌和甲状腺癌。还提供了治疗有需要的患者的癌症的方法,包括向所述患者施用本公开的抗体或其片段。

[0016] 在另一个实施方案中,本公开提供了治疗有需要的患者的癌症或感染的方法,包括(a)用本公开的抗体或其片段在体外处理细胞;和(b)将处理过的细胞施用于患者。在一些实施方案中,所述细胞是T细胞。

[0017] 在另一个实施方案中,提供了本公开的任何一种抗体或其片段在制备用于治疗感染的药物中的用途。在一些实施方案中,所述感染是病毒感染、细菌感染、真菌感染或寄生虫感染。

[0018] 在仍另一个实施方案中,提供了本公开的抗体或其片段在制备用于治疗免疫紊乱的药物中的用途。在一些实施方案中,所述免疫紊乱选自由以下组成的组:感染、与感染相关的内毒素休克、关节炎、类风湿性关节炎、哮喘、COPD、盆腔炎性疾病、阿尔茨海默病、炎症肠病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、佩罗尼氏病、乳糜泻、胆囊疾病、藏毛病(Pilonidal disease)、腹膜炎、银屑病、血管炎、手术粘连、脑卒中、I型糖尿病、莱姆病、关节炎、脑膜炎、自身免疫性葡萄膜炎、免疫介导的中枢和外周神经系统炎性疾病、多发性硬化、狼疮和格林-巴利综合征、特应性皮炎、自身免疫性肝炎、纤维性肺泡炎、格拉夫病、IgA肾病、特发性血小板减少性紫癜、梅尼埃病、天疱疮、原发性胆汁性肝硬化、结节病、硬皮病、韦格纳肉芽肿、胰腺炎、创伤、移植物抗宿主病、移植排斥反应、缺血性疾病、心肌梗死、动脉粥样硬化、血管内凝血、骨吸收、骨质疏松、骨关节炎、牙周炎、胃酸过少和与母胎耐受缺失有关的不育。

[0019] 附图简述

- [0020] 图1显示所有五个hPD-1 mAb同种型均可与hPD-1以高特异性结合。
- [0021] 图2显示抗hPD-1不与hB7-1、hPD-L1、hB7-H3、hB7-H4和hCD137结合。
- [0022] 图3显示hPD-1 mAb可与人和食蟹猴细胞PD-1蛋白二者结合,而未显示出与mPD-1的交叉结合。
- [0023] 图4显示hPD-1 mAb对hPD-1与hPD-L1的结合具有剂量依赖的阻断作用。
- [0024] 图5显示在竞争性结合环境中观察时hPD-1 mAb的消除(abrogating)和阻断作用。
- [0025] 图6显示确认RACE产物的凝胶电泳分析结果。
- [0026] 图7显示(A)重组DNA抗体结合PD-1的能力,以及(B)它们对PD-1与PD-L1结合能力的阻断作用。
- [0027] 图8显示九种人源化抗体呈现出与PD-1的各种结合亲和力,包括高于和低于亲本抗体的亲和力。
- [0028] 图9显示人源化抗体能够对PD-1与PD-L1的结合能力具有阻断作用。
- [0029] 图10显示人源化抗体能够对PD-1与PD-L2的结合能力具有阻断作用。
- [0030] 图11显示人源化mAb增强同种异体CD8+CTL细胞对癌细胞的体外细胞毒性。
- [0031] 图12显示MLR对抗hPD-1抗体的增殖反应。
- [0032] 图13显示MLR培养物上清液中的IL-2和IFN γ 表达特征。
- [0033] 图14显示PD-1 mAb抑制淋巴细胞上PD-L1的表达。
- [0034] 图15显示了人源化PD-1抗体的体内抗肿瘤活性。
- [0035] 图16示出了抗体结合亲和力和动力学的比较。
- [0036] 图17显示PD-1抗体在PD-1/PD-L1阻断方面的比较。
- [0037] 图18显示mAb在增强同种异体CD8+CTL细胞对癌细胞的体外细胞毒性方面的比较。
- [0038] 图19显示测试制品与hPD-1或mPD-1的结合(ELISA测定)。
- [0039] 图20显示使用流式细胞术,测试制品与表达hPD-1或cPD-1的CHOK1细胞的结合。
- [0040] 图21显示测试制品对hPD-L1(左)和hPD-L2(右)结合表达hPD-1的CHOK1细胞的阻断活性。
- [0041] 图22显示在人MLR测定中IL-2(左)和IFN- γ (右)的水平。
- [0042] 图23显示在工程化肿瘤和T细胞共培养测定中的IFN- γ 水平。
- [0043] 图24显示根据ELISA结果的表位结合(上图)和关于不同测试制品的表位重叠的示意图(下图)。
- [0044] 图25显示纳武单抗(上图)或TY101-04-T3-05抗体(下图)在低固定水平(60RU,左图)和高固定水平(960RU,右图)下与重组hPD-1的结合。

具体实施方式

[0045] 定义

[0046] 要注意的是,术语“一(a)”或“一个(种)(an)”实体指的是一个(种)或多个(种)该实体;例如,“一个(种)抗体”被理解为代表一个(种)或多个(种)抗体。因此,术语“一”(或“一个(种)”、“一个(种)或多个(种)”和“至少一个(种)”可以在本文中互换使用。

[0047] 如本文所使用的,术语“多肽”意在包括单数的“多肽”和复数的“多肽”,并指由酰胺键(也称为肽键)线性连接的单体(氨基酸)构成的分子。术语“多肽”指的是两个或多个氨

基酸的任何一个或多个链,而不涉及该产物的特定长度。因此,肽、二肽、三肽、寡肽、“蛋白质”、“氨基酸链”或用于指两个或更多个氨基酸的一个或多个链的任何其他术语都包括在“多肽”的定义中,并且术语“多肽”可以代替这些术语中的任何一个或与其互换使用。术语“多肽”还意指多肽的表达后修饰的产物,包括但不限于糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、已知保护/封闭基团的衍生化、蛋白水解裂解或由非天然存在的氨基酸修饰。多肽可来源于天然生物来源或由重组技术产生,但不必然从指定的核酸序列翻译。它可以以任何方式产生,包括通过化学合成。

[0048] 本文所用的术语“分离的”对于细胞、核酸(如DNA或RNA)而言,是指分别与存在于所述大分子的天然来源中的其他DNA或RNA分开的分子。本文所用的术语“分离的”也指下述核酸或肽:当其通过重组DNA技术产生时,基本上不含细胞材料、病毒材料或培养基,或当其化学合成时,基本上不含化学前体或其他化学物质。此外,“分离的核酸”意在包括不作为片段天然存在的和不会见于天然状态的核酸片段。术语“分离的”在本文也用于指从其他细胞蛋白质或组织中分离出来的细胞或多肽。分离的多肽意在涵盖纯化的和重组的多肽二者。

[0049] 如本文所使用的,术语“重组的”当与多肽或多核苷酸有关时,意指不天然存在的多肽或多核苷酸的形式,它的非限制性实例可以通过组合通常不同存在的多核苷酸或多肽来构建。

[0050] “同源性”或“同一性”或“相似性”是指两个肽之间或两个核酸分子之间的序列相似性。同源性可以通过比较每个序列中的位置来确定,所述位置可以为了比较的目的而对齐。当比较序列中的位置被相同的碱基或氨基酸占据时,则这些分子在该位置上是同源的。序列之间的同源性程度是所述序列所共有的匹配或同源位置的数目的函数。“不相关的”或“非同源的”序列与本公开的序列中的一个共有小于40%的同一性,尽管优选小于25%的同一性。

[0051] 多核苷酸或多核苷酸区域(或多肽或多肽区域)与另一个序列具有特定百分比(例如,60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)的“序列同一性”意味着在两个序列的比较中,当对齐时该百分比的碱基(或氨基)是相同的。这种比对和同源性或序列同一性百分比可以使用本领域已知的软件程序来确定,例如在Ausubel等人编,(2007) *Current Protocols in Molecular Biology*中描述的那些。优选地,比对使用默认参数。一个比对程序是BLAST,使用默认参数。特别地,程序是BLASTN和BLASTP,使用以下默认参数:遗传密码=标准;过滤器=无;链=两条链;截断=60;预期=10;矩阵=BLOSUM62;说明=50个序列;挑选方式=高得分;数据库=非冗余,GenBank+EMBL+DDBJ+PDB+GenBank CDS翻译序列+SwissProtein+SPupdate+PIR。生物等效多核苷酸是具有上述指定的同源性百分比并编码具有相同或相似生物活性的多肽的那些多核苷酸。

[0052] 术语“等效核酸或多核苷酸”是指具有与所述核酸或其互补物的核苷酸序列具有一定程度的同源性或序列同一性的核苷酸序列的核酸。双链核酸的同源物旨在包括具有下述核苷酸序列的核酸,所述核苷酸序列与其或其互补物具有一定程度的同源性。在一个方面,核酸的同源物能够与核酸或其互补物杂交。同样,“等效多肽”是指与参考多肽的氨基酸序列具有一定程度的同源性或序列同一性的多肽。在一些方面,序列同一性为至少约70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%。在一些方面,与参考多肽或多核苷酸相比,等效多肽或多核苷酸具有一个、两个、三个、四个或五个添加、缺失、取代及其组合。在某些方面,

等效序列保留了参考序列的活性(例如表位结合)或结构(例如,盐桥)。

[0053] 杂交反应可在不同“严格”条件下进行。通常,在约40℃下在约10x SSC,或等价离子强度/温度的溶液中进行低严格杂交反应。中等严格杂交通常在约6x SSC在约50℃进行,高严格杂交反应通常在约1x SSC在约60℃进行。杂交反应也可以在本领域技术人员所熟知的“生理条件”下进行。生理条件的一个非限制性的例子是通常见于细胞中的温度、离子强度、pH和Mg²⁺的浓度。

[0054] 多核苷酸由如下四种核苷酸碱基的特定序列构成:腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶(T),在多核苷酸为RNA时尿嘧啶(U)替换胸腺嘧啶。因此,术语“多核苷酸序列”是多核苷酸分子的字母表示。该字母表示可以被输入到具有中央处理单元的计算机中的数据库中,并用于生物信息学应用,如功能基因组学和同源性搜索。术语“多态性”指的是基因或其一部分的一种以上形式的共存。有至少两种不同形式,即两种不同的核苷酸序列的基因的一部分,被称为“基因的多态性区域”。多态性区域可以是单核苷酸,其身份在不同的等位基因上不同。

[0055] 术语“多核苷酸”和“寡核苷酸”可互换使用,是指任何长度的核苷酸的聚合形式,其可为脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸或其类似物。多核苷酸可以具有任何三维结构,并且可以执行已知或未知的任何功能。以下是多核苷酸的非限制性实例:基因或基因片段(例如探针、引物、EST或SAGE标签)、外显子、内含子、信使RNA(mRNA)、转运RNA、核糖体RNA、核酶、cDNA、dsRNA、siRNA、miRNA、重组多核苷酸、分枝的多核苷酸、质粒、载体、任何序列的分离DNA、任何序列的分离RNA、核酸探针和引物。多核苷酸可以包括修饰的核苷酸,例如甲基化核苷酸和核苷酸类似物。如果存在,可以在组装多核苷酸之前或之后赋予对核苷酸结构的修饰。核苷酸序列可以被非核苷酸组分中断。多核苷酸可以在聚合后进一步修饰,例如通过与标记成分缀合。该术语也指双链和单链分子二者。除非另有规定或要求,本公开的任何多个核苷酸的实施方案既包括双链形式,也包括已知或预期形成双链形式的两种互补的单链形式中的任何一个。

[0056] 术语“编码”应用于多核苷酸是指,如果多核苷酸以其天然的状态或通过本领域技术人员熟知的方法操作时,其可以被转录和/或翻译以产生多肽和/或其片段的mRNA,则称所述多核苷酸“编码”多肽。反义链是这种核酸的互补物,编码序列可以由此推断。

[0057] 如本文所用,“抗体”或“抗原结合多肽”是指特异性识别和结合抗原的多肽或多肽复合物。抗体可以是完整的抗体及其任何抗原结合片段或单链。因此,术语“抗体”包括包含如下分子的任何蛋白质或肽,该分子包含免疫球蛋白分子中具有与抗原结合的生物活性的至少一部分。这样的实例包括但不限于重链或轻链或其配体结合部分的互补决定区(CDR)、重链或轻链可变区、重链或轻链恒定区、框架(FR)区或其任何部分,或结合蛋白的至少一部分。

[0058] 本文所用的术语“抗体片段”或“抗原结合片段”是抗体的一部分,如F(ab')₂、F(ab)₂、Fab'、Fab、Fv、scFv等。不管结构如何,抗体片段与完整抗体所识别的相同抗原结合。术语“抗体片段”包括适体、spiegelmer、双价抗体(diabodies)。术语“抗体片段”还包括像抗体一样通过与特异性抗原结合以形成复合物来发挥作用的任何合成的或基因工程化的蛋白。

[0059] “单链可变片段”或“scFv”是指免疫球蛋白的重链(V_H)和轻链(V_L)可变区的融合蛋

白。在一些方面,这些区域用10个至约25个氨基酸的短连接子肽连接。该连接子可以富含甘氨酸以助于柔性,以及丝氨酸或苏氨酸以助于溶解度,并且可以将 V_H 的N端连接到 V_L 的C端,或者反之亦然。尽管除去恒定区和引入连接子,该蛋白仍保留原免疫球蛋白的特异性。scFv分子在本领域中是已知的,并描述于例如美国专利5,892,019。

[0060] 术语抗体包括各种广泛类型的多肽,它们可以在生物化学上区别开来。本领域的技术人员会认识到重链被归类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,其中有一些亚类(如 $\gamma 1$ - $\gamma 4$)。正是这种链的性质决定了抗体的“类别”分别为IgG、IgM、IgA、IgG或IgE。免疫球蛋白亚类(同种型),例如IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgG₅等已充分表征,并且已知其赋予功能专一性。从本公开的角度来看,这些类别和同种型中的每一个的修饰形式很容易由本领域技术人员辨别,因此,它们也涵盖在本公开的范围内。所有的免疫球蛋白类型显然都在本公开的范围之内,下面的讨论将一般性地针对免疫球蛋白分子的IgG类。关于IgG,标准的免疫球蛋白分子包括分子量约为23,000道尔顿的两个相同的轻链多肽,和分子量为53,000~70,000的两个相同的重链多肽。这四个链通常由二硫键以“Y”构型连接,其中轻链从“Y”口开始并继续在整个可变区上包夹着重链。

[0061] 本公开的抗体、抗原结合多肽、其变体或衍生物包括但不限于多克隆抗体、单克隆抗体、多特异性抗体、人源抗体、人源化抗体、灵长类化抗体或嵌合抗体、单链抗体、表位结合片段,例如Fab、Fab'和F(ab')₂、Fd、Fv、单链Fv(scFv)、单链抗体、二硫键连接的Fv(sdFv)、包含VK或VH结构域的片段、由Fab表达文库产生的片段和抗独特型(抗Id)抗体(包括针对本文中公开的LIGHT抗体的抗Id抗体)。本公开的免疫球蛋白或抗体分子可以是免疫球蛋白分子的任何类型(例如IgG、IgE、IgM、IgD、IgA和IgY)、类别(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2)或亚类。

[0062] 轻链被归类为 κ 或 λ 。每个重链类别可以与 κ 或 λ 轻链结合。一般来说,轻链和重链是彼此共价键合的,且当免疫球蛋白由杂交瘤、B细胞或基因工程化的宿主细胞产生时,两个重链的“尾部”部分通过共价二硫键或非共价键键合。在重链中,氨基酸序列从Y构型的叉端的N端直到每个链的底部的C端。

[0063] 轻链和重链二者都分成多个结构和功能同源的区域。术语“恒定”和“可变”在功能上使用。在这方面,会认识到,轻链部分的可变结构域(VK)和重链部分的可变结构域(VH)确定抗原识别和特异性。相反,轻链的恒定结构域(CK)和重链的恒定结构域(CH1、CH2或CH3)赋予了重要的生物学特性,如分泌、经胎盘移动性、Fc受体结合、补体结合等。按照惯例,恒定区结构域的编号随着其远离抗体的抗原结合位点或氨基末端而增加。N端部分是可变区,而C端部分是恒定区;CH3和CK结构域实际上分别包含重链和轻链的羧基末端。

[0064] 如上所述,可变区允许抗体选择性地识别和特异性结合抗原上的表位。也就是说,抗体的VK结构域和VH结构域或互补决定区(CDR)的子集组合在一起形成定义三维抗原结合位点的可变区。该四级抗体结构形成存在于Y的每个臂的末端的抗原结合位点。更具体地,抗原结合位点由VH和VK链中的每个上的3个CDR(即CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3)定义。在一些情况,例如来源于驼类物种的某些免疫球蛋白分子或基于驼类免疫球蛋白的工程化免疫球蛋白中,完整的免疫球蛋白分子可以仅由重链组成,而没有轻链。参见,例如,Hamers-Casterman等人,Nature 363:446-448(1993)。

[0065] 在天然存在的抗体中,存在于每个抗原结合结构域的六个“互补决定区”或“CDR”

是短的、不连续的氨基酸序列,当抗体在水性环境中形成其三维构型时,这些序列特别地定位形成抗原结合结构域。抗原结合结构域中的其余氨基酸称为“框架”区,显示较少的分子间变异性。框架区大部分采取 β -片层构象,而CDR形成环,所述环连接 β -片层结构,并且在某些情况下形成 β -片层结构的一部分。因此,框架区域起到形成支架的作用,所述支架通过链间、非共价相互作用提供CDR在正确取向上的定位。由定位的CDR形成的抗原结合结构域限定了与免疫反应性抗原上的表位互补的表面。该互补表面促进抗体与其相应表位的非共价结合。对于任何给定的重链或轻链可变区,分别构成CDR和框架区的氨基酸可以由本领域的普通技术人员容易地识别出,因为它们已被精确定义(参见“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”Kabat,E.等,U.S.Department of Health and Human Services,(1983);和Chothia和Lesk,J.MoI.Biol.,196:901-917(1987)。

[0066] 在存在本领域中使用和/或接受的术语的两个或多个定义的情况下,本文中所使用的术语的定义意在包括所有这些含义,除非另有明确的相反声明。一个具体的例子是使用“互补决定区”(“CDR”)来描述在重链和轻链多肽二者的可变区内发现的非连续抗原结合位点。Kabat等人,U.S.Dept.of Health and Human Services,“Sequences of Proteins of Immunological Interest”(1983)和Chothia等人,J.MoI.Biol.196:901-917(1987)(其均通过引用将其全文并入本文)描述了这个特定的区域。根据Kabat和Chothia的CDR定义在相互比较时包括氨基酸残基的重叠或子集。然而,意图应用任一定义来指抗体或其变体的CDR均在本文定义和使用的术语的范围内。涵盖上述引用的参考文献中的每一个定义的CDR的适当氨基酸残基在下表中列出作为比较。涵盖特定CDR的确切残基数会根据CDR的序列和大小而变化。给出抗体的可变区氨基酸序列,本领域技术人员可以常规地确定哪些残基构成特定的CDR。

[0067]

	Kabat	Chothia
CDR-H1	31-35	26-32
CDR-H2	50-65	52-58
CDR-H3	95-102	95-102
CDR-L1	24-34	26-32
CDR-L2	50-56	50-52
CDR-L3	89-97	91-96

[0068] Kabat等人还定义了适用于任何抗体的可变结构域序列的编号系统。本领域的普通技术人员可以毫无疑问地将该“Kabat编号”系统分配给任何可变结构域序列,而不依赖于除序列本身之外的任何实验数据。如本文所使用的,“Kabat编号”指的是Kabat等人,U.S.Dept.of Health and Human Services,“Sequence of Proteins of Immunological Interest”(1983)提出的编号系统。

[0069] 除上表外,Kabat编号系统如下描述了CDR区域:CDR-H1起始于大约第31位氨基酸处(即,在第一半胱氨酸残基之后大约9个残基处),包括大约5-7个氨基酸,并在接下来的色氨酸残基处终止。CDR-H2起始于CDR-H1末端后的第十五個残基,包括约16-19个氨基酸,并在接下来的精氨酸或赖氨酸残基处终止。CDR-H3起始于CDR-H2末端后的大约第三十三个氨基酸残基处;包含3-25个氨基酸;并且在W-G-X-G序列处终止,其中X是任何氨基酸。CDR-L1起始于大约第24位残基(即,在半胱氨酸残基之后);包括大约10-17个残基;并且在接下来

的色氨酸残基处终止。CDR-L2起始于CDR-L1末端后的大约第十六个残基处,并且包含大约7个残基。CDR-L3起始于CDR-L2末端后的大约第三十个残基(即半胱氨酸残基之后);包括大约7-11个残基并在序列F或W-G-X-G处终止,其中X是任何氨基酸。

[0070] 本文公开的抗体可来自任何动物来源,包括鸟类和哺乳动物。优选地,抗体是人、鼠、驴、兔、山羊、豚鼠、骆驼、美洲驼、马或鸡抗体。在另一个实施方案中,可变区域可以是来源于软骨鱼类(例如,来自鲨鱼)。

[0071] 如本文所使用的,术语“重链恒定区”包括源自免疫球蛋白重链的氨基酸序列。含有重链恒定区的多肽包含CH1结构域、铰链(例如,上、中、和/或下铰链区)结构域、CH2结构域、CH3结构域或其变体或片段中的至少一个。例如,供在本公开中使用的抗原结合多肽可以包括包含CH1结构域的多肽链;包含CH1结构域、至少一部分铰链结构域和CH2结构域的多肽链;包含CH1结构域和CH3结构域的多肽链;包含CH1结构域、至少一部分铰链结构域和CH3结构域的多肽链,或包含CH1结构域、至少一部分铰链结构域、CH2结构域和CH3结构域的多肽链。在另一个实施方案中,本公开的多肽包括包含CH3结构域的多肽链。此外,供在本公开中使用的抗体可能缺乏CH2结构域的至少一部分(例如,CH2结构域的全部或部分)。如上所述,本领域的普通技术人员会理解,重链恒定区可以被修改,使得它们在氨基酸序列方面与天然存在的免疫球蛋白分子不同。

[0072] 本文所公开的抗体的重链恒定区可以源自不同的免疫球蛋白分子。例如,多肽的重链恒定区可以包含源自IgG1分子的CH1结构域和源自IgG₃分子的铰链区。在另一个实例中,重链恒定区可以包含部分来自IgG₁分子和部分来自IgG₃分子的铰链区。在另一个实例中,重链部分可以包括部分来自IgG₁分子和部分来自IgG₄分子的嵌合铰链。

[0073] 如本文所使用的,术语“轻链恒定区”包括从抗体轻链衍生的氨基酸序列。优选地,轻链恒定区域包括恒定κ结构域或恒定λ结构域中的至少一个。

[0074] “轻链-重链对”是指轻链和重链的集合,其可通过轻链的CL结构域和重链的CH1结构域之间的二硫键形成二聚体。

[0075] 如前所述,各种免疫球蛋白类的恒定区的亚基结构和三维构型是众所周知的。如本文所用,术语“VH结构域”包括免疫球蛋白重链的氨基末端可变结构域,术语“CH1结构域”包括免疫球蛋白重链的第一个(最靠近氨基末端的)恒定区结构域。CH1结构域与VH结构域相邻,位于免疫球蛋白重链分子的铰链区的氨基端。

[0076] 本文所使用的术语“CH2结构域”包括使用传统的编号方案例如从抗体的大约第244位残基延伸到第360位残基的重链分子的部分(第244至360位残基,Kabat编号系统,和第231-340位残基,EU编号系统;参见Kabat等人,U.S.Dept.of Health and Human Services,“Sequences of Proteins of Immunological Interest”(1983))。CH2结构域是独特的,因为它并不紧密地与另一个结构域配对。相反,两个N-连接的支持糖链被插入在完整的天然IgG分子的两个CH2结构域之间。据可靠记录,CH3结构域从CH2结构域延伸到IgG分子的C端,并包含大约108个残基。

[0077] 如本文所使用的,术语“铰链区”包括重链分子连接CH1结构域和CH2结构域的部分。该铰链区包含大约25个残基并且是柔性的,从而允许两个N端抗原结合区独立移动。铰链区可以细分为三个不同的结构域:上、中、下铰链结构域(Roux等人,J.Immunol 161:4043 (1998))。

[0078] 如本文所使用的术语“二硫键”包括两个硫原子之间形成的共价键。氨基酸半胱氨酸包括硫醇基团,其可以与第二个硫醇基团形成二硫键或桥。在大多数天然存在的IgG分子中,CH1和CK区域由二硫键连接,并且两个重链由使用Kabat编号系统239和242位对应的位置(第226位或第229位,EU编号系统)上的两个二硫键连接。

[0079] 如本文所用,术语“嵌合抗体”会被认为意指其中免疫反应区或位点是从第一物种获得或衍生的,而恒定区(可以根据本公开为完整的、部分的或修饰的)是从第二物种获得的任何抗体。在某些实施方案中,靶结合区或位点会来自非人类来源(例如小鼠或灵长类动物),而恒定区域是人的。

[0080] 如本文所使用的,“人源化百分比”是通过确定人源化结构域和种系结构域之间的框架氨基酸差异的数目(即,非CDR差异),从氨基酸总数中减去该数,然后将其除以氨基酸总数并乘以100来计算。

[0081] “特异性结合”或“对……具有特异性”通常意味着抗体通过其抗原结合域与表位结合,并且该结合需要在抗原结合结构域和表位之间一定的互补性。根据这个定义,抗体被称为“特异性结合”表位时,它通过其抗原结合域比它结合到随机的、无关的表位更容易结合到该表位。本文中使用的术语“特异性”来定性某一抗体与某一表位结合的相对亲和力。例如,抗体“A”可能被认为对给定表位具有比抗体“B”更高的特异性,或者抗体“A”可以被称为比相关表位“D”更高的特异性结合表位“C”。

[0082] 如本文所使用的,术语“治疗(treat)”或“治疗(treatment)”指的是治疗性处理和预防性或防止性措施二者,其目的是预防或减缓(减少)不希望的生理变化或病症,如癌症的进展。有益或期望的临床结果包括但不限于缓解症状、减少疾病程度、稳定病情(即不恶化)、延缓或减缓疾病进展、改善或减轻疾病状态、缓解(部分或全部),无论是可检测的还是不可检测的。“治疗”也意味着与未接受治疗时的预期生存期相比延长生存期。需要治疗的人包括那些已经患有病况或病症的患者,以及那些容易发生病况或病症的患者,或那些需要预防病况或病症的患者。

[0083] “受试者”或“个体”或“动物”或“患者”或“哺乳动物”指的是需要对其进行诊断、预后或治疗的任何受试者,尤其是哺乳动物受试者。哺乳动物受试者包括人类、家畜、牲畜、动物园动物、运动用动物或宠物动物,如狗、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、马、牛、母牛等。

[0084] 如本文所使用的,诸如“需要治疗的患者”或“需要治疗的受试者”这样的短语包括会受益于施用本公开的抗体或组合物例如用于检测,用于诊断和/或用于治疗的受试者,如哺乳类受试者。

[0085] 抗PD-1抗体

[0086] 本公开提供了对人类PD-1蛋白具有高亲和力的抗PD-1抗体。所测试的抗体呈现强力的结合和抑制活性,并可用于治疗和诊断用途。此外,测试的人源化抗体之一(TY101)呈现出比两个FDA批准的抗hPD-1抗体显著更高的结合亲和力。

[0087] 因此,本公开的一个实施方案提供了抗PD-1抗体或其片段,所述抗体或其片段可以特异性结合人程序性死亡1(PD-1)蛋白。

[0088] 根据本公开的一个实施方案,提供了一种抗体,该抗体包含重链和轻链可变区,所述重链和轻链可变区具有如表1中的CDR组之一的CDR区。

[0089] 表1:CDR区的序列

CDR 组	序列(SEQ ID NO:)
[0090] CDR 组 1	HCDR1: GFTFSSYT (1) HCDR2: ISHGGGDT (2) HCDR3: ARHSGYERGYYYVMDY (3) LCDR1: ESVDYYGFSF (4) LCDR2: AAS (5) LCDR3: QQSKEVPW (6)
CDR 组 2	HCDR1: GYTFTSYT (7)
[0091]	HCDR2: INPTTGYT (8) HCDR3: ARDDAYYSGY (9) LCDR1: ENIYSNL (10) LCDR2: AAK (11) LCDR3: QHFWGTPWT (12)
CDR 组 3	HCDR1: GFAFSSYD (13) HCDR2: ITIGGGTT (14) HCDR3: ARHRYDYFAMDN (15) LCDR1: ENVNYGINF (16) LCDR2: VSS (17) LCDR3: QQSKDVPW (18)

[0092] 例如,在一个实施方案中,提供了对人类程序性细胞死亡蛋白1 (PD-1) 具有特异性的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含重链可变区以及轻链可变区,所述重链可变区包含重链互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述轻链可变区包含轻链互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中所述HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3为HCDR1: GFTFSSYT (SEQ ID NO:1), HCDR2: ISHGGGDT (SEQ ID NO:2), HCDR3: ARHSGYERGYYYVMDY (SEQ ID NO:3), LCDR1: ESVDYYGFSF (SEQ ID NO:4), LCDR2: AAS (SEQ ID NO:5), LCDR3: QQSKEVPW (SEQ ID NO:6)。

[0093] 例如,在一个实施方案中,提供了对人类程序性细胞死亡蛋白1 (PD-1) 具有特异性的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含重链可变区以及轻链可变区,所述重链可变区包含重链互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述轻链可变区包含轻链互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3为HCDR1: GYTFTSYT (SEQ ID NO:7), HCDR2: INPTTGYT (SEQ ID NO:8), HCDR3: ARDDAYYSGY (SEQ ID NO:9), LCDR1: ENIYSNL (SEQ ID NO:10), LCDR2: AAK (SEQ ID NO:11), LCDR3: QHFWGTPWT (SEQ ID NO:12)。

[0094] 例如,在一个实施方案中,提供了对人类程序性细胞死亡蛋白1 (PD-1) 具有特异性的分离的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段包含重链可变区以及轻链可变区,所述重

链可变区包含重链互补决定区HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述轻链可变区包含轻链互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中HCDR1、HCDR2、HCDR3、LCDR1、LCDR2和LCDR3为HCDR1:GFAFSSYD (SEQ ID NO:13),HCDR2:ITIGGGTT (SEQ ID NO:14),HCDR3:ARHRYDYFAMDN (SEQ ID NO:15),LCDR1:ENVDNYGINF (SEQ ID NO:16),LCDR2:VSS (SEQ ID NO:17),LCDR3:QQSKDVPW (SEQ ID NO:18)。

[0095] 如实验实施例表明,含有这些CDR区的抗体,无论是小鼠、人源化还是嵌合抗体,都具有强力的PD-1结合和抑制活性。进一步的计算机建模表明,CDR内的某些残基可以被修饰以保留或改善抗体的性质。在一些实施方案中,本公开的抗PD-1抗体包括具有一个、两个或三个进一步的修饰的表1中列出的VH和VL CDR。这种修饰可以是氨基酸的添加、缺失或取代。

[0096] 在一些实施方案中,修饰是在每个CDR不超过一个热点位置的取代。在一些实施方案中,修饰是在一个、两个或三个这样的热点位置的取代。在一个实施方案中,修饰是在热点位置中的一个处的取代。在一些实施方案中,这样的取代是保守取代。

[0097] “保守氨基酸取代”是氨基酸残基被替换为具有类似侧链的氨基酸残基的氨基酸取代。在本领域中已经定义了具有类似侧链的氨基酸残基的家族,包括碱性侧链(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸)、酸性侧链(例如天冬氨酸、谷氨酸)、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)、非极性侧链(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸、色氨酸)、 β -支化侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和芳香侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,免疫球蛋白多肽中的非必需氨基酸残基优选替换为来自相同侧链家族的另一氨基酸残基。在另一个实施方案中,可以将氨基酸串用侧链家族成员的顺序和/或组成不同的结构相似的串替换。

[0098] 保守氨基酸取代的非限制性实例在下表中提供,其中相似性得分为0或更高表示两个氨基酸之间的保守取代。

[0099] 氨基酸类似性矩阵

[0100]

	C	G	P	S	A	T	D	E	N	Q	H	K	R	V	M	I	L	F	Y	W
W	-8	-7	-6	-2	-6	-5	-7	-7	-4	-5	-3	-3	2	-6	-4	-5	-2	0	0	17
Y	0	-5	-5	-3	-3	-3	-4	-4	-2	-4	0	-4	-5	-2	-2	-1	-1	7	10	
F	-4	-5	-5	-3	-4	-3	-6	-5	-4	-5	-2	-5	-4	-1	0	1	2	9		
L	-6	-4	-3	-3	-2	-2	-4	-3	-3	-2	-2	-3	-3	2	4	2	6			
I	-2	-3	-2	-1	-1	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4	2	5				
M	-5	-3	-2	-2	-1	-1	-3	-2	0	-1	-2	0	0	2	6					
V	-2	-1	-1	-1	0	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4						
R	-4	-3	0	0	-2	-1	-1	-1	0	1	2	3	6							
K	-5	-2	-1	0	-1	0	0	0	1	1	0	5								
H	-3	-2	0	-1	-1	-1	1	1	2	3	6									
Q	-5	-1	0	-1	0	-1	2	2	1	4										
N	-4	0	-1	1	0	0	2	1	2											
E	-5	0	-1	0	0	0	3	4												
D	-5	1	-1	0	0	0	4													
T	-2	0	0	1	1	3														
A	-2	1	1	1	2															
S	0	1	1	1																
P	-3	-1	6																	
G	-3	5																		
C	12																			

[0101] 保守氨基酸取代

	原氨基酸	取代为
[0102]	丙氨酸	D-Ala, Gly, Aib, β -Ala, L-Cys, D-Cys
	精氨酸	D-Arg, Lys, D-Lys, Orn D-Orn
	天冬酰胺	D-Asn, Asp, D-Asp, Glu, D-GluGln, D-Gln
	天冬氨酸	D-Asp, D-Asn, Asn, Glu, D-Glu, Gln, D-Gln
[0103]	半胱氨酸	D-Cys, S-Me-Cys, Met, D-Met, Thr, D-Thr, L-Ser, D-Ser
	谷氨酰胺	D-Gln, Asn, D-Asn, Glu, D-Glu, Asp, D-Asp
	谷氨酸	D-Glu, D-Asp, Asp, Asn, D-Asn, Gln, D-Gln
	甘氨酸	Ala, D-Ala, Pro, D-Pro, Aib, β -Ala
	异亮氨酸	D-Ile, Val, D-Val, Leu, D-Leu, Met, D-Met
	亮氨酸	Val, D-Val, Met, D-Met, D-Ile, D-Leu, Ile
	赖氨酸	D-Lys, Arg, D-Arg, Orn, D-Orn
	甲硫氨酸	D-Met, S-Me-Cys, Ile, D-Ile, Leu, D-Leu, Val, D-Val
	苯丙氨酸	D-Phe, Tyr, D-Tyr, His, D-His, Trp, D-Trp
	脯氨酸	D-Pro
	丝氨酸	D-Ser, Thr, D-Thr, 别-Thr, L-Cys, D-Cys
	苏氨酸	D-Thr, Ser, D-Ser, 别-Thr, Met, D-Met, Val, D-Val
	酪氨酸	D-Tyr, Phe, D-Phe, His, D-His, Trp, D-Trp
	缬氨酸	D-Val, Leu, D-Leu, Ile, D-Ile, Met, D-Met

[0104] VH的非限制性实例在SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:39中提供。SEQ ID NO:27是鼠VH。SEQ ID NO:31是嵌合抗体的VH,而SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:39是人源化的。

[0105] VL的非限制性实例在SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:45中提供。SEQ ID NO:29是鼠VL。SEQ ID NO:33是嵌合抗体的VL,而SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:45是人源化的。

[0106] 在一些实施方案中,本公开的抗PD-1抗体包括SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:37或SEQ ID NO:39中的VH,SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:41、SEQ ID NO:43或SEQ ID NO:45的VL,或它们各自的生物等效物。VH或VL的生物等效物是包含指定氨基酸,同时总体具有80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性的序列。例如,SEQ ID NO:27的生物等效物可以是与SEQ ID NO:27总体具有80%、85%、90%、95%、98%或99%序列同一性,但保留CDR的VH。

[0107] 本领域的普通技术人员也将理解到,本文所公开的抗体可以被修饰,使得它们在氨基酸序列方面与它们所衍生自的天然存在的结合多肽不同。例如,源自指定蛋白质的多肽或氨基酸序列可以是相似的,例如,与起始序列具有一定的同一性百分比,例如,它可以

与起始序列60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%相同。

[0108] 在某些实施方案中,抗体包括通常不与抗体相关联的氨基酸序列或一个或多个部分。下面更详细地描述示例性修饰。例如,本公开的抗体可以包含柔性连接子序列,或者可以被修饰以添加功能部分(例如,PEG、药物、毒素或标签)。

[0109] 本公开的抗体、其变体或衍生物包括被修饰,即通过将任何类型的分子共价附接到抗体,使得共价附接不阻止抗体与表位结合的衍生物。例如,而非意在限制,抗体可以被修饰,例如通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、磷酸化、酰胺化、已知保护/封闭基团的衍生化、蛋白水解裂解、与细胞配体或其他蛋白质的连接等修饰。许多化学修饰中的任何一种均可以通过已知的技术进行,包括但不限于特定的化学裂解、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等。此外,抗体可以含有一种或多种非典型氨基酸。

[0110] 在一些实施方案中,抗体可以与治疗剂、前药、肽、蛋白质、酶、病毒、脂质、生物反应调节剂、药物制剂或PEG缀合。

[0111] 抗体可与治疗剂缀合或融合,所述治疗剂可包括可检测的标记物,如放射性标记物、免疫调节剂、激素、酶、寡核苷酸、光活性治疗或诊断剂、细胞毒剂,其可能是药物或毒素、超声增强剂、非放射性标记物、其组合和本领域已知的其他此类试剂。

[0112] 抗体可通过将其偶联到化学发光化合物而被可检测地标记。然后通过检测在化学反应过程中出现的发光的存在来确定带化学发光标签的抗原结合多肽的存在。特别有用的化学发光标记化合物的实例是鲁米诺、异鲁米诺(isoluminol)、theromatic吡啶酯(theromatic acridinium ester)、咪唑、吡啶盐和草酸酯。

[0113] 抗体也可利用荧光发射金属如¹⁵²Eu或其它镧系元素可检测地标记。这些金属可以用金属螯合基团如二乙烯三胺五乙酸(DTPA)或乙烯二胺四乙酸(EDTA)附接到抗体上。用于将各种部分与抗体缀合的技术是众所周知的,参见,例如,Arnon等人,“Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”,*Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*,Reisfeld等人编,第243-56页(Alan R.Liss,Inc.(1985);Hellstrom等人,“Antibodies For Drug Delivery”,*Controlled Drug Delivery*(第2版),Robinson等人编,Marcel Dekker,Inc.,第623-53页(1987);Thorpe,“Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review”,*Monoclonal Antibodies'84:Biological And Clinical Applications*,Pinchera等人编,第475-506页(1985);“Analysis,Results,And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”,*Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*,Baldwin等人编,学术出版社(Academic Press)第303-16页(1985),和Thorpe等人,“The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”,*Immunol.Rev.*(52:119-58(1982))。

[0114] 双功能性分子

[0115] PD-1是一种免疫检查点分子,也是一种肿瘤抗原。作为肿瘤抗原靶向分子,对PD-1具特异性的抗体或抗原结合片段可与对免疫细胞具特异性的第二抗原结合片段结合以产生双特异性抗体。

[0116] 在某些实施方案中,所述免疫细胞选自以下组成的组:T细胞、B细胞、单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞、吞噬细胞、自然杀伤细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性粒细

胞和肥大细胞。可被靶向的免疫细胞上的分子包括,例如CD3、CD16、CD19、CD28和CD64。其他实例包括PD-1、CTLA-4、LAG-3(也称为CD233)、CD28、CD122、4-1BB(也称为CD137)、TIM3、OX-40或OX40L、CD40或CD40L、LIGHT、ICOS/ICOSL、GITR/GITRL、TIGIT、CD27、VISTA、B7H3、B7H4、HEVM或BTLA(也称为CD272)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)和CD47。双特异性的具体实例包括,但不限于,PD-L1/PD-1、PD-1/LAG3、PD-1/TIGIT和PD-1/CD47。

[0117] 作为免疫检查点抑制剂,对PD-1具特异性的抗体或抗原结合片段可与对肿瘤抗原具特异性的第二抗原结合片段结合,以产生双特异性抗体。“肿瘤抗原”是一种在肿瘤细胞中产生的抗原物质,即其在宿主体内触发免疫应答。肿瘤抗原在鉴定肿瘤细胞中是有用的,并且是用于癌症治疗的潜在候选物。体内的正常蛋白质不是抗原性的。然而,某些蛋白质在肿瘤发生过程中产生或过表达,因此对身体来说似乎是“外源的”。这可能包括与免疫系统隔离良好的正常蛋白质,通常以极少量产生的蛋白质,通常只在某些发育阶段产生的蛋白质,或者由于突变而结构被修饰的蛋白质。

[0118] 本领域已知丰富的肿瘤抗原,通过筛选可以容易地识别新的肿瘤抗原。肿瘤抗原的非限制性实例包括EGFR、Her2、EpCAM、CD20、CD30、CD33、CD47、CD52、CD133、CD73、CEA、gpA33、粘蛋白、TAG-72、CIX、PSMA、叶酸结合蛋白、GD2、GD3、GM2、VEGF、VEGFR、整联蛋白、 $\alpha\beta$ 3、 $\alpha5\beta1$ 、ERBB2、ERBB3、MET、IGF1R、EPHA3、TRAILR1、TRAILR2、RANKL、FAP和韧粘素(Tenascin)。

[0119] 在某些方面,单价单元对于与相应的非肿瘤细胞相比在肿瘤细胞上过表达的蛋白质具有特异性。本文中所用的“相应的非肿瘤细胞”是指与肿瘤细胞起源为相同的细胞类型的非肿瘤细胞。值得注意的是,这种蛋白质不一定与肿瘤抗原不同。非限制性的例子包括癌胚抗原(CEA),其在大多数结肠癌、直肠癌、乳腺癌、肺癌、胰腺癌和胃肠道癌中过表达;调蛋白(herregulin)受体(HER-2、neu或c-erbB-2),其在乳腺癌、卵巢癌、结肠癌、肺癌、前列腺癌和宫颈癌中常被过表达;表皮生长因子受体(EGFR),其在一系列实体肿瘤中高表达,包括乳腺癌、头颈部癌、非小细胞肺癌和前列腺癌;唾液酸糖蛋白受体;转铁蛋白受体;丝氨酸蛋白酶抑制剂(serpin)酶复合体受体,其在肝细胞上表达;成纤维细胞生长因子受体(FGFR),其在胰腺导管腺癌细胞中过表达;血管内皮生长因子受体(VEGFR),用于抗血管生成基因治疗;叶酸受体,其选择性地90%的非黏液性卵巢癌中过表达;细胞表面糖萼(glycocalyx);碳水化合物受体;和聚合免疫球蛋白受体,其可用于基因递送到呼吸道上皮细胞,并为治疗肺部疾病,如囊性纤维化的有吸引力的手段。在这方面的双特异性的非限制性实例包括PD-1/EGFR、PD-1/Her2、PD-1/CD33、PD-1/CD133、PD-1/CEA和PD-1/VEGF。

[0120] 还提供了双特异性抗体的不同形式。在一些实施方案中,每个抗PD-1片段和第二片段各自独立地选自Fab片段、单链可变片段(scFv)或单结构域抗体。在一些实施方案中,双特异性抗体还包括Fc片段。

[0121] 还提供了不仅包括抗体或抗原结合片段的双功能性分子。作为肿瘤抗原靶向分子,对PD-1具特异性的抗体或抗原结合片段(如本文中所描述的那些)可以任选地通过肽连接子与免疫细胞因子或配体组合。连接的免疫细胞因子或配体包括但不限于IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、GM-CSF、TNF- α 、CD40L、OX40L、CD27L、CD30L、4-1BBL、LIGHT和GITRL。这样的双功能性分子可以组合免疫检查点阻断效应与肿瘤部位的局部免疫调节。

[0122] 编码抗体的多核苷酸和制备抗体的方法

[0123] 本公开还提供编码本公开的抗体、其变体或衍生物的分离的多核苷酸或核酸分子(例如,SEQ ID NO:22、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44和46)。本公开的多核苷酸可以在同一多核苷酸分子上或分开的多核苷酸分子上编码抗原结合多肽、其变体或衍生物的整个重链和轻链可变区。另外,本公开的多核苷酸可以在同一多核苷酸分子上或分开的多核苷酸分子上编码抗原结合多肽、其变体或衍生物的重链和轻链可变区的部分。

[0124] 制备抗体的方法在本领域中是众所周知的,并在本文中进行了描述。在某些实施方案中,本公开的抗原结合多肽的可变区和恒定区都是完全人源的。完全人源抗体可以使用本领域所描述的技术和本文所述的技术来制备。例如,针对特定抗原的完全人源抗体可以通过下述方法制备:将抗原给予已被修饰以响应于抗原攻击而产生此类抗体,但是其内源基因座已经被去能(disable)的转基因动物。可用于制备此类抗体的示例性技术在美国专利6,150,584;6,458,592;6,420,140中描述,它们通过全文引用并入本文。

[0125] 在某些实施方案中,所制备的抗体不会在待治疗的动物例如人中引发有害的免疫应答。在一个实施方案中,本公开的抗原结合多肽、其变体或衍生物使用本领域公认的技术来修饰以降低其免疫原性。例如,抗体可经人源化、灵长类化、去免疫(deimmunized)或可制备嵌合抗体。这些类型的抗体来源于非人源抗体,通常是鼠类或灵长类动物抗体,其保留或基本保留亲本抗体的抗原结合特性,但在人类中的免疫原性较低。这可以通过各种方法来实现,包括(a)将整个非人可变结构域移植到人源恒定区以产生嵌合抗体;(b)将一个或多个非人源互补决定区(CDR)的至少一部分移植到人源框架和恒定区中,其中保留或不保留关键框架残基;或(c)移植整个非人源的可变区结构域,但通过表面残基替换用人源样区段使其“隐形”。这样的方法公开于Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 57:6851-6855(1984);Morrison等人,Adv.Immunol.44:65-92(1988);Verhoeyen等人,Science239:1534-1536(1988);Padlan,Molec.Immun.25:489-498(1991);Padlan,Molec.Immun.31:169-217(1994),和美国专利号5,585,089、5,693,761、5,693,762和6,190,370,其均通过全文引用并入本文。

[0126] 去免疫也可用于降低抗体的免疫原性。如本文所使用的,术语“去免疫”包括改变抗体以修饰T细胞表位(参见,例如,国际申请公布号:W0/9852976A1和W0/0034317A2)。例如,分析来自起始抗体的可变重链和可变轻链序列,并构建来自每个V区的人T细胞表位“图”,其示出与互补决定区(CDR)相关联的表位和序列内的其他关键残基的位置。分析来自T细胞表位图中的个体T细胞表位,以鉴定具有低的改变最终抗体活性的风险的可选氨基酸取代。设计一系列可选可变重链序列和可变轻链序列,其包括氨基酸取代的组合,并且这些序列随后被并入一系列结合多肽中。通常,生成12至24个变体抗体,并测试其结合和/或功能。然后将包含修饰的可变区和人恒定区的完整的重链和轻链基因克隆到表达载体中,并将所得的质粒引入细胞系中以产生完整的抗体。然后在适当的生化和生物测定中比较抗体,并鉴定最佳变体。

[0127] 本公开的抗原结合多肽的结合特异性可通过体外试验,如免疫沉淀法、放射免疫分析法(RIA)或酶联免疫吸附测定法(ELISA)来确定。

[0128] 或者,可采用描述的用于生产单链单元的技术(美国专利第4,694,778号;Bird,Science242:423-442(1988);Huston等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 55:5879-5883

(1988);以及Ward等人,Nature 334:544-554(1989))来产生本公开的单链单元。单链单元通过经由氨基酸桥连接Fv区的重链和轻链片段形成,从而产生单链融合肽。还可以使用在大肠杆菌(E.coli)中组装功能性Fv片段的技术(Skerra等人,Science 242:1038-1041(1988))。

[0129] 可用于产生单链Fv(scFv)和抗体的技术的实例,包括在美国专利第4,946,778和5,258,498号,Huston等人,Methods in Enzymology 203:46-88(1991);Shu等人,Proc.Natl.Sci.USA 90:1995-1999(1993);和Skerra等人,Science 240:1038-1040(1988)中所描述的那些技术。对于一些应用,包括抗体在人体中的体内应用和体外检测试验,优选使用嵌合、人源化或人源抗体。嵌合抗体是一种分子,其中抗体的不同部分来源于不同的动物物种,例如具有源自鼠单克隆抗体的可变区和人免疫球蛋白恒定区的抗体。产生嵌合抗体的方法在本领域中是已知的。参见,例如Morrison,Science 229:1202(1985);Oi等人,BioTechniques 4:214(1986);Gillies等人,J.Immunol.Methods 125:191-202(1989);美国专利第5,807,715号;4,816,567号和4,816,397号,其通过全文引用引入本文。

[0130] 人源化抗体是从非人类物种抗体衍生的抗体分子,其与期望的抗原结合,具有来自非人类物种的一个或多个互补决定区(CDR)和来自人免疫球蛋白分子的框架区。通常,人类框架区中的框架残基会被来自CDR供体抗体的相应残基取代,以改变(优选地改善)抗原结合。这些框架取代通过本领域公知的方法来鉴定,例如,通过对CDR和框架残基的相互作用的建模来鉴定对抗原结合重要的框架残基,和通过进行序列比较以鉴定特定位置上的异常框架残基。(参见例如,Queen等,美国专利第5,585,089号;Riechmann等,Nature332:323(1988),其通过全文引用并入本文)。抗体可以使用本领域已知的多种技术进行人源化,包括例如CDR移植(EP 239400;PCT公开号W0 91/09967;美国专利第5,225,539、5,530,101和5,585,089号),饰面(veneering)或重新表面化(resurfacing)(EP 592,106;EP 519,596;Padlan,Molecular Immunology 28(4/5):489-498(1991);Studnicka等,Protein Engineering 7(6):805-814(1994);Roguska等,Proc.Natl.Sci.USA 91:969-973(1994))和链重排(美国专利第5,565,332号,其通过全文引用并入本文)。

[0131] 完全人源抗体对于人类患者的治疗是特别理想的。人源抗体可以通过本领域已知的多种方法来制备,包括噬菌体展示方法,其使用源自人免疫球蛋白序列的抗体文库。也参见,美国专利第4,444,887和4,716,111号;以及PCT公开W0 98/46645、W0 98/50433、W0 98/24893、W0 98/16654、W0 96/34096、W0 96/33735和W0 91/10741号;其每一个均通过全文引用并入本文。

[0132] 人源抗体也可使用转基因小鼠产生,这些转基因小鼠不能表达功能性内源性免疫球蛋白,但能表达人免疫球蛋白基因。例如,人类重链和轻链免疫球蛋白基因复合物可以随机或通过同源重组引入到小鼠胚胎干细胞中。或者,除了人类重链和轻链基因外,人的可变区、恒定区和多样性区可以被引入到小鼠胚胎干细胞中。小鼠重链和轻链免疫球蛋白基因可单独地致使非功能化或与通过同源重组引入人免疫球蛋白基因座同时地致使非功能化。特别地,JH区的纯合性缺失阻止内源性抗体的产生。将修饰的胚胎干细胞扩增并微注射到囊胚中以产生嵌合小鼠。然后饲养嵌合小鼠以产生表达人源抗体的纯合后代。将转基因小鼠用选定的抗原(例如期望的目标多肽的全部或一部分)以正常方式免疫。可以使用常规杂交瘤技术从经免疫的转基因小鼠获得针对抗原的单克隆抗体。转基因小鼠所携带的人免疫

球蛋白转基因在B细胞分化过程中重新排列,随后进行类别转换和体细胞突变。因此,使用这种技术,可以产生治疗上有用的IgG、IgA、IgM和IgE抗体。对于这种产生人源抗体的技术的综述,参见Lonberg和Huszar *Int. Rev. Immunol.* 73:65-93(1995)。对于这种用于产生人源抗体和人单克隆抗体的技术和产生这类抗体的规程的详细讨论,参见,例如PCT公开W0 98/24893;W0 96/34096;W0 96/33735;美国专利第5,413,923;5,625,126;5,633,425;5,569,825;5,661,016;5,545,806;5,814,318;和5,939,598号,其通过全文引用并入本文。此外,可联络诸如Abgenix, Inc. (Freemont, Calif.) 和GenPharm (San Jose, Calif.) 这样的公司使用与上述相似的技术提供针对选定抗原的人源抗体。

[0133] 还可使用被称为“导向选择(guided selection)”的技术产生识别所选择表位的完全人源抗体。在该方法中,选定的非人单克隆抗体,例如小鼠抗体,用于指导识别相同表位的完全人源抗体的选择。(Jespers等, *Bio/Technology* 72:899-903(1988)。亦参见美国专利第5,565,332号,其通过全文引用并入本文。)

[0134] 在另一个实施方案中,编码所需单克隆抗体的DNA可以容易地使用常规程序分离和测序(例如,通过使用能够特异性结合编码鼠抗体重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。分离的和亚克隆的杂交瘤细胞用作这种DNA的优选来源。一旦分离,DNA可以被置入表达载体中,然后将其转染到原核或真核宿主细胞中,例如大肠杆菌细胞、猿类COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或否则不产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞。更具体而言,分离的DNA(可以如本文所述是合成的)可以用于克隆供制备抗体的恒定和可变区序列,如1995年1月25日提交的Newman等,美国专利第5,658,570号所描述的,其通过引用并入本文。基本上,这需要从所选择的细胞中提取RNA,转化为cDNA,并通过使用Ig特异性引物的PCR扩增。用于此目的的合适的引物也在美国专利5,658,570号中描述。如下面将更详细地讨论的,表达所需抗体的转化细胞可以以相对较大的数量生长,以提供免疫球蛋白的临床和商业供应。

[0135] 此外,使用常规重组DNA技术,本公开的抗原结合多肽的一个或多个CDR可以插入框架区内,例如,插入人类框架区内以使非人源抗体人源化。框架区可以是天然存在的或共有的框架区,优选地是人类框架区(关于人类框架区的列表,参见,例如Chothia等, *J. Mol. Biol.* 278:457-479(1998))。优选地,由框架区和CDR的组合产生的多核苷酸编码特异性结合到期望的多肽(例如LIGHT)的至少一个表位的抗体。优选地,可以在框架区内进行一个或多个氨基酸取代,并且优选所述氨基酸取代提高抗体与其抗原的结合。另外,这些方法可用于使参与链内二硫键的一个或多个可变区半胱氨酸残基的氨基酸取代或缺失,以产生缺乏一个或多个链内二硫键的抗体分子。本公开涵盖多核苷酸的其他改变,其也属于本领域的技术范围内。

[0136] 此外,可使用开发用于产生“嵌合抗体”的技术(Morrison等, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*:851-855(1984); Neuberger等, *Nature* 372:604-608(1984); Takeda等, *Nature* 314:452-454(1985)),所述技术通过将来自小鼠抗体分子的具有适当的抗原特异性的基因以及来自人抗体分子的具有适当生物活性的基因拼接在一起。如本文所使用的,嵌合抗体是其中不同部分源自不同动物物种的分子,例如具有源自鼠单克隆抗体的可变区和人免疫球蛋白恒定区的那些分子。

[0137] 目前为止Newman, *Biotechnology* 10:1455-1460(1992)公开了另一种高效的供产生重组抗体的方法。具体而言,该技术导致产生包含猴可变结构域和人类恒定序列的灵长

类化抗体。该文献通过全文引用并入本文。此外,该技术也被描述在具有相同受让方 (commonly assigned) 的美国专利第5,658,570、5,693,780和5,756,096号,其每一个均通过引用并入本文。

[0138] 可选地,可以使用本领域技术人员熟知的技术选择和培养产生抗体的细胞系。这种技术描述于各种实验室手册和原始出版物。在这方面,如下文所述的适用于本公开的技术描述于Current Protocols in Immunology, Coligan等编, Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, John Wiley and Sons, New York (1991), 其包括增补在内通过全文引用并入本文。

[0139] 此外,可用于在编码本公开的抗体的核苷酸序列中引入突变的本领域技术人员已知的标准技术包括但不限于,导致氨基酸取代的定点诱变和PCR介导的诱变。优选地,变体(包括衍生物)相对于参照重链可变区、CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、轻链可变区、CDR-L1、CDR-L2或CDR-L3编码少于50个氨基酸取代、少于40个氨基酸取代、少于30个氨基酸取代、少于25个氨基酸取代、少于20个氨基酸取代、少于15个氨基酸取代、少于10个氨基酸取代、少于5个氨基酸取代、少于4个氨基酸取代、少于3个氨基酸取代或少于2个氨基酸取代。或者,可以随机地沿着编码序列的全部或部分引入突变,例如通过饱和诱变,并且可以对所产生的突变体就生物活性进行筛选,以鉴定保留活性的突变体。

[0140] 癌症治疗

[0141] 如本文所述,本公开的抗体、变体或衍生物可用于某些治疗和诊断方法。

[0142] 本公开进一步涉及基于抗体的治疗,其涉及将本公开的抗体施用至诸如动物、哺乳动物和人的患者,用于治疗本文中所述的一种或多种紊乱或病况。本公开的治疗化合物包括但不限于本公开的抗体(包括本文中所述的其变体和衍生物)和编码本公开的抗体的核酸或多核苷酸(包括本文中所述的其变体和衍生物)。

[0143] 本公开的抗体也可用于治疗或抑制癌症。PD-1可在肿瘤细胞中过表达。肿瘤来源的PD-1可与免疫细胞上的PD-L1结合,从而限制抗肿瘤T细胞免疫。用小分子抑制剂,或靶向PD-1的单克隆抗体在鼠肿瘤模型中的结果表明靶向PD-1治疗是有效控制肿瘤生长的重要可选和现实方法。如实验实施例所示,抗PD-1抗体激活了适应性免疫应答机制,这可以导致癌症患者的存活率提高。

[0144] 相应地,在一些实施方案中,提供了用于治疗有需要的患者的癌症的方法。在一个实施方案中,该方法涉及向患者施用有效量的本公开的抗体。在一些实施方案中,患者中的至少一种癌细胞(例如,基质细胞)表达、过表达或受诱导表达PD-1。例如,PD-1表达的诱导可以通过施用肿瘤疫苗或放射治疗来完成。

[0145] 表达PD-1蛋白的肿瘤包括膀胱癌、非小细胞肺癌、肾癌、乳腺癌、尿道癌、结直肠癌、头颈部癌、鳞状细胞癌、默克尔细胞癌、胃肠道癌、胃癌、食道癌、卵巢癌、肾癌和小细胞肺癌的那些肿瘤。因此,本申请公开的抗体可用于治疗任何一种或多种此类癌症。

[0146] 本公开还提供了细胞疗法,如嵌合抗原受体(CAR) T细胞疗法。可以使用合适的细胞,将其与本公开的抗PD-1抗体接触(或者将其工程化以表达本公开的抗PD-1抗体)。在这种接触或工程化后,细胞可以被引入需要治疗的癌症患者。癌症患者可患有本文中公开的任何类型的癌症。例如,所述细胞(例如,T细胞)可以是肿瘤浸润T淋巴细胞、CD4+T细胞、CD8+T细胞或它们的组合,但不限于此。

[0147] 在一些实施方案中,细胞是从癌症患者自身中分离出来的。在一些实施方案中,细胞由供体或细胞库提供。当细胞是从癌症患者分离出来时,不希望的免疫反应可以被最小化。

[0148] 可用本公开的抗体或其变体或衍生物治疗、预防、诊断和/或预后的与细胞存活率增加有关的其它疾病或病况,包括但不限于恶性肿瘤的进展和/或转移,和相关的病症如白血病(包括急性白血病(例如急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞性白血病(包括髓母细胞性白血病、早幼粒细胞性白血病、骨髓单核细胞性白血病、单核细胞性白血病和红白血病)和慢性白血病(例如慢性髓细胞性(粒细胞性)白血病)和慢性淋巴细胞白血病)、真性红细胞增多症、淋巴瘤(如霍奇金病和非霍奇金病)、多发性骨髓瘤、Waldenstrom巨球蛋白血症、重链病和实体瘤,包括但不限于肉瘤和癌,如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨原性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、甲状腺癌、子宫内膜癌、黑色素瘤、前列腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、Wilm氏瘤、宫颈癌、睾丸肿瘤、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突胶质细胞瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、神经母细胞瘤和视网膜母细胞瘤。

[0149] 感染和免疫紊乱的治疗

[0150] 如实验实施例所示,本公开的抗体可以激活免疫应答,从而可以用于治疗感染。

[0151] 感染是导致疾病的病原体(agents)侵入生物体的身体组织,所述病原体的增殖,和宿主组织对这些生物体和它们产生的毒素的反应。感染可由诸如病毒,类病毒,朊病毒,细菌,线虫如寄生蛔虫和蛲虫,节肢动物如蜱、螨、跳蚤和虱子,真菌如癣,和其他大寄生物(macroparasites)如绦虫和其他蠕虫的传染性病原体引起。在一个方面,传染性病原体是细菌,例如革兰氏阴性细菌。在一个方面,传染性病原体是病毒,如DNA病毒、RNA病毒和逆转录病毒。病毒的非限制性实例包括腺病毒、柯萨奇病毒(Coxsackievirus)、Epstein-Barr病毒、甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、单纯疱疹病毒-1型、单纯疱疹病毒-2型、巨细胞病毒、人类疱疹病毒-8型、HIV、流感病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒,人乳头状瘤病毒、副流感病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、呼吸道合胞病毒、风疹病毒、水痘带状疱疹病毒。

[0152] 在某些实施方案中,还提供了抗体或其片段用于治疗免疫紊乱的方法或用途。免疫紊乱的非限制性例子包括感染、感染相关的内毒素休克、关节炎、类风湿性关节炎、哮喘、COPD、盆腔炎性疾病、阿尔茨海默病、炎性肠病、克罗恩病、溃疡性结肠炎、佩罗尼氏病、乳糜泻、胆囊疾病、藏毛病、腹膜炎、银屑病、血管炎、手术粘连、脑卒中、I型糖尿病、莱姆病、关节炎、脑膜脑炎、自身免疫性葡萄膜炎、中枢神经系统和外周神经系统的免疫介导的炎性疾病、多发性硬化、狼疮和格林-巴利综合征、特应性皮炎、自身免疫性肝炎、纤维性肺泡炎、Grave病、IgA肾病、特发性血小板减少性紫癜、梅尼埃病、天疱疮、原发性胆汁性肝硬化、结节病、硬皮病、韦格纳肉芽肿病、胰腺炎、创伤、移植物抗宿主病、移植排斥反应、缺血性疾病、心肌梗死、动脉粥样硬化、血管内凝血、骨吸收、骨质疏松、骨关节炎、牙周炎、胃酸过少和与胎儿母体耐受性缺乏有关的不育。

[0153] 本公开的抗体还可用于通过靶向微生物和免疫细胞以实现消除微生物来治疗由微生物引起的传染病,或杀死微生物。在一个方面,微生物是包括RNA和DNA病毒的病毒、革兰氏阳性细菌、革兰氏阴性细菌、原生动物或真菌。

[0154] 任何特定患者的特定剂量和治疗方案会取决于多种因素,包括所使用的特定抗体、其变体或衍生物,患者的年龄、体重、总体健康状况、性别和饮食,以及给药时间、排泄率、药物组合,以及被治疗的特定疾病的严重程度。医疗护理人员对这些因素的判断是本领域的一般技术。所述量也会取决于待治疗的个体患者、给药途径、制剂的类型、所用的化合物的特性、疾病的严重程度以及所需的效果。所使用的量可以通过本领域公知的药理学和药代动力学原理来确定。

[0155] 抗体、变体的给药方法包括但不限于皮内、肌肉内、腹膜内、静脉内、皮下、鼻内、硬膜外和口服途径。抗原结合多肽或组合物可以通过任何方便的途径施用,例如通过输注或团注(bolus injection),通过上皮或粘膜皮肤衬里(例如口腔粘膜、直肠和肠粘膜等)吸收,并可以与其他生物活性剂一起施用。因此,含有本公开的抗原结合多肽的药物组合物可以经口、经直肠、肠胃外、脑池内、阴道内、腹膜内、局部(如通过粉末、软膏、滴剂或透皮贴剂)、含服或作为口腔或鼻腔喷雾施用。

[0156] 本文所使用的术语“肠胃外”是指包括静脉内、肌肉内、腹膜内、胸骨内、皮下和关节内注射和输注的施用方式。

[0157] 施用可以是全身性的或局部的。此外,可能希望通过任何合适的途径将本公开的抗体引入中枢神经系统,包括脑室内和鞘内注射;脑室内注射可通过例如附接到储库(reservoir)(例如Ommaya储库)的脑室导管辅助。也可以使用肺给药,例如,通过使用吸入器或雾化器和具有雾化剂的制剂。

[0158] 可能需要局部地将本公开的抗体多肽或组合物施用到需要治疗的区域;这可以通过例如,在外科手术期间局部输注、局部应用(例如,配合在手术后的伤口敷料),通过注射,通过导管的方法,通过栓剂的方法,或通过植入物的方法(所述植入物是多孔的、无孔的或凝胶状的材料,包括膜,例如硅橡胶(sialastic)膜或纤维)来实现,但不限于此。优选地,当施用本公开的蛋白质(包括抗体)时,必须注意使用不吸收该蛋白质的材料。

[0159] 在另一个实施方案中,抗体或组合物可以在囊泡中递送,特别是脂质体(见Langer,1990,Science 249:1527-1533;Treat等,in Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer,Lopez-Berestein和Fidler编,Liss,New York,第353-365页(1989);Lopez-Berestein,同上,第317-327页;一般信息亦见上文。)

[0160] 仍在另一个实施方案中,抗原结合多肽或组合物可以在受控释放系统中递送。在一个实施方案中,可以使用泵(见Sefton,1987,CRC Crit.Ref.Biomed.Eng.14:201;Buchwald等,1980,Surgery 88:507;Saudek等,1989,N.Engl.J.Med.321:574)。在另一个实施方案中,可以使用聚合物材料(参见Medical Applications of Controlled Release,Langer and Wise编,CRC出版,Boca Raton,Fla.(1974);Controlled Drug Bioavailability,Drug Product Design and Performance,Smolen和Ball编,Wiley,New York(1984);Ranger和Peppas,J.,1983,Macromol.Sci.Rev.Macromol.Chem.23:61;还参见Levy等,1985,Science 228:190;During等,1989,Ann.Neurol.25:351;Howard等,1989,J.Neurosurg.71:105)。还在另一个实施方案中,可将受控释放系统置于治疗目标(即脑)附

近,因此仅需要全身剂量的一小部分(参见,例如,Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, 同上,第2卷,第115-138页(1984))。其他受控释放系统在Langer的综述中(1990, *Science* 249:1527-1533)进行了讨论。

[0161] 在本公开的组合物中包含编码蛋白质的核酸或多核苷酸的具体实施方案中,所述核酸可以通过以下体内施用以促进其编码的蛋白的表达:将其构建为适当的核酸表达载体的一部分,并例如通过使用逆转录病毒载体(见美国专利第4,980,286号),或通过直接注射,或通过使用微粒轰击(例如,基因枪;生物枪(Biolistic), Dupont),或用脂质或细胞表面受体或转染剂包被,或通过将其与已知进入细胞核的同源盒样肽连接来施用(参见,例如 Joliot等,1991, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1864-1868)以使得其进入细胞。或者,核酸可以引入细胞内,并通过同源重组并入宿主细胞DNA中以供表达。

[0162] 通过标准的临床技术可以确定会在治疗、抑制和预防炎性、免疫或恶性疾病、紊乱或病况中有效的本公开的抗体的量。此外,可任选地使用体外试验帮助鉴定最佳剂量范围。在制剂中待使用的精确剂量也会取决于施用途径,以及疾病、紊乱或病况的严重程度,并应根据执业医师的判断和每个患者的情况决定。从由体外或动物模型试验系统中得到的剂量-反应曲线可以推断出有效剂量。

[0163] 作为一般性建议,施用给患者的本公开的抗原结合多肽的剂量通常是0.1毫克/千克至100毫克/千克患者体重,0.1毫克/千克至20毫克/千克患者体重,或1毫克/千克至10毫克/千克患者体重。通常,由于对外源多肽的免疫应答,人源抗体在人体内的半衰期比来自其他物种的抗体更长。因此,较低剂量的人源抗体和较不频繁的施用往往是可能的。此外,通过增强抗体的摄取和组织渗透(例如,进入大脑)(通过例如脂质化等修饰),可以减少本公开的抗体的施用剂量和频率。

[0164] 包括施用本公开的抗体、其变体或衍生物的治疗感染或恶性疾病、病况或紊乱的方法在用于人之前,通常在体外测试,然后在可接受的动物模型中体内测试所需的治疗或预防活性。合适的动物模型(包括转基因动物)是本领域普通技术人员所熟知的。例如,以证明本文中所述的抗原结合多肽的治疗效用的体外试验包括抗原结合多肽对细胞系或患者组织样本的作用。抗原结合多肽对细胞系和/或组织样本的作用可以利用本领域技术人员已知的技术来确定,例如本文中其它部分所公开的试验。根据本公开,指出了可用于确定是否施用特定抗原结合多肽的体外试验,包括体外培养细胞试验,在所述细胞培养试验中患者组织样本在培养物中生长,并暴露于化合物或以其他方式被施用化合物,并观察这种化合物对组织样本的作用。

[0165] 已知多种递送系统,可用于施用本公开的抗体或编码本公开的抗体的多核苷酸,例如包埋于脂质体、微粒、微胶囊,能够表达化合物的重组细胞,受体介导的胞吞作用(参见,例如Wu和Wu,1987, *J. Biol. Chem.* 262:4429-4432),将核酸构建为逆转录病毒或其他载体的一部分等。

[0166] 诊断方法

[0167] 在某些肿瘤样品中观察到PD-1的过表达,并且具有PD-1过表达细胞的患者可能对用本公开的抗PD-1抗体治疗作出反应。因此,本公开的抗体也可用于诊断和预后目的。

[0168] 可以从患者中获得优选包括细胞的样本,该患者可以是癌症患者或期望诊断的患者。细胞是肿瘤组织或肿瘤块、血液样本、尿样或来自患者的任何样本的细胞。在对样品进

行任选的预处理后,可以将样品在允许抗体与可能存在于样品中的PD-1蛋白相互作用的条件下与本公开的抗体一起孵育。可以利用如ELISA等方法,利用抗PD-1抗体检测样品中PD-1蛋白的存在。

[0169] 样品中PD-1蛋白的存在(任选地,用量或浓度)可用于癌症的诊断,作为该患者适合用抗体治疗的指示,或作为患者已经响应于(或尚未响应于)癌症治疗的指示。对于预后方法,可以在癌症治疗开始后,在某些阶段进行一次、两次或更多次检测以指示治疗的进展。

[0170] 组合物

[0171] 本公开还提供了药物组合物。这样的组合物包含有效量的抗体和可接受的载体。在一些实施方案中,组合物还包括第二抗癌剂(例如,免疫检查点抑制剂)。

[0172] 在特定实施方案中,术语“药学上可接受的”是指由联邦或州政府的管理机构批准或在美国药典或其他公认药典中列出的在动物中,尤其是在人类中使用的药物。此外,“药学上可接受的载体”通常会是无毒固体、半固体或液体填料、稀释剂、封装材料或任何类型的制剂助剂。

[0173] 术语“载体”是指与治疗剂一同施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或媒介物。这种药物载体可以是无菌液体,如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的油,如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当将药物组合物静脉内施用,水是优选的载体。盐水溶液和水性右旋糖和甘油溶液也可以用作液体载体,特别是用于可注射的溶液。适宜的赋形剂包括淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、大米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、甘油单硬脂酸酯、滑石粉、氯化钠、干燥的脱脂乳、甘油、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。如果需要,该组合物还可以含有少量润湿剂或乳化剂,或pH缓冲剂,如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐。还设想了抗菌剂如苄基醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂如乙二胺四乙酸;以及张度调节剂如氯化钠或右旋糖。这些组合物可以采取溶液、悬液、乳液、片剂、丸剂、胶囊、粉末、缓释制剂等的形式。该组合物可以用传统粘合剂和载体如甘油三酯配制成栓剂。口服制剂可包括标准载体,如药用级别的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等。E.W.Martin在Remington's Pharmaceutical Sciences(通过引用并入本文)中描述了合适的药物载体的实例。这样的组合物将包含治疗有效量的抗原结合多肽(优选纯化形式的抗原结合多肽)连同适当量的载体,以提供适合施用于患者的形式。制剂应适合施用方式。肠胃外制剂可以被封闭在安瓿、一次性注射器或由玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。

[0174] 在一个实施方案中,按照常规程序将该组合物配制成适于静脉内施用至人体的药物组合物。通常,用于静脉内施用的组合物是在无菌等张水性缓冲液中的溶液。必要时,组合物还可包括增溶剂和局部麻醉剂如利多卡因,以减轻注射部位的疼痛。通常,成分分开或以单位剂量形式混合在一起供应,例如在指示活性剂的数量密封容器(如安瓿或小袋)中作为干燥的冻干粉末或无水浓缩物。在该组合物通过输注进行施用,可使用含有无菌药用级水或盐水的输液瓶配给。在该组合物通过注射施用,可以提供灭菌注射用水或盐水的安瓿,使得成分可以在施用前混合。

[0175] 本公开的化合物可配制为中性或盐形式。药学上可接受的盐包括那些与阴离子(例如衍生自盐酸、磷酸、乙酸、草酸和酒石酸等的阴离子)形成的盐,以及那些与阳离子(例如由钠、钾、铵、钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺,2-乙基氨基乙醇、组氨酸、普鲁卡因等衍

生的阳离子)形成的盐。

[0176] 实施例

[0177] 实施例1:针对人PD-1的人单克隆抗体的生成

[0178] 全长人PD-1cDNA的克隆

[0179] 用MACS珠(MiltenyiBiotec)从人外周血淋巴细胞(PBMC)中分离出人T淋巴细胞。用RNeasy Mini试剂盒(QiAGEN)从人T细胞中提取总RNA,并通过逆转录PCR(SuperScript First-Strand Synthesis System, Invitrogen)获得cDNA。利用有义引物(5'-CTGTCTAGAATGCAGATCCCACAGGCGCC, SEQ ID NO:47)和反义引物(5'-GGATCCTCAGAGGGGCCAAGAGCAGT, SEQ ID NO:48)从人T细胞mRNA通过RT-PCR生成编码hPD-1的全长cDNA。序列经DNA测序和与NCBI数据库(NM-005018.2)进行比较来验证。

[0180] 建立hPD-1稳定表达细胞系:用Xba1和BamHI消化后,将hPD-1PCR片段克隆到PCDA3.1(-)载体(Invitrogen)中。然后利用lipofectamine 2000(Invitrogen)将pcDNA-hPD-1全长质粒转染至中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。稳定表达hPD-1的细胞系(CHO/hPD-1)通过G418选择并通过流式细胞术筛选。

[0181] 人PD-1 Ig融合蛋白的产生:藉由特异性引物通过PCR从全长pcDNA-hPD-1扩增包含hPD-1胞外域的hPD-1 mIg和hPD-1 hIg融合蛋白的cDNA。将用EcoRI和Bgl II消化的PCR片段融合到表达质粒pmIgG中的小鼠IgG2a重链或融合到表达质粒phIgG的人IgG1重链中的CH2-CH3结构域中(H Dong等Nat Med.1999;5:1365-1369)。培养物上清液中的蛋白质通过蛋白A琼脂糖凝胶柱(HiTrap Protein A HP, GE healthcare)纯化。纯化后的蛋白经SDA-PAGE电泳确认。

[0182] 单克隆抗体的生成:将8~10周龄的雌性Balb/c小鼠在多个部位用200 μ L的含100 μ g hPD-1mIg融合蛋白和完全弗氏佐剂(CFA)(Sigma Aldrich)的乳剂皮下(s.c.)免疫。3周后,用带有不完全弗氏佐剂(IFA)(Sigma Aldrich)的50-100 μ g蛋白皮下(s.c.)免疫小鼠,共三次。小鼠每次免疫2周后放血进行血清效价测定。当效价足够时,通过腹膜内(i.p.)注射用PBS中的60 μ g蛋白对小鼠进行免疫增强(boost)。通过将经免疫的小鼠的脾细胞和SP2/0-Ag14骨髓瘤细胞系(来自ATCC)融合,来获得杂交瘤。用二氧化碳处死经免疫增强的小鼠,并在无菌下收获脾脏。将整个脾解离成单细胞悬液,并用ACK缓冲液溶解红细胞。在50毫升锥形离心管中以1:1的比例混合SP2/0-Ag14骨髓瘤和脾细胞。离心后,上清液被丢弃,并用50%聚乙二醇(Roche)进行细胞融合。在HAT选择培养基中培养融合细胞8-10天,将杂交瘤培养物的上清液以高通量转染和筛选系统针对与hPD-1表达细胞的结合进行筛选(S Yao等.Immunity.2011;34(5):729-40),并通过流式细胞术分析来确认阳性克隆。使用限制稀释技术对阳性杂交瘤进行亚克隆至少5次,以实现纯的单克隆培养物。

[0183] 实施例2:PD-1单克隆抗体的表征

[0184] mAb的同种型:使用Mouse Immunoglobulin Isotyping Kit(BD Biosciences)鉴定mAb的同种型。所有五种PD-1 mAb均被鉴定为IgG1同种型和 κ 链。

[0185] 抗hPD-1的结合特异性:使用在表面上表达hPD-1的CHO细胞(CHO/hPD-1),通过流式细胞术来确定PD-1 mAb的特异性。将CHO/hPD-1细胞在冰上与抗PD-1 mAb一起孵育。孵育后,将细胞洗涤并用抗mIgG-APC(eBiosciences)进一步孵育。流式细胞术分析使用FACSVerse(BD Biosciences)进行。数据显示,所有五个hPD-1 mAb高特异性结合hPD-1(图

1)。为了排除hPD-1 mAb与其它蛋白结合的可能性,通过流式细胞术分析将转染了hB7-1、hPD-L1、hB7-H3、hB7-H4、hCD137或其它蛋白分子的CHO细胞用抗hPD-1 mAb染色。这些细胞也分别用它们各自的阳性抗体染色作为阳性对照。数据表明,抗PD-1 mAb不结合这些测试的蛋白质(图2)。

[0186] 物种交叉反应性:为了评价抗hPD-1 mAb的物种特异性,用Ficoll (Sigma Aldrich) 从外周血分离出食蟹猴(来自Guangdong landau Biotechnology Company)的外周血单核细胞(PBMC)。将PBMC悬浮于含有10% FCS的RPMI 1640培养基中,并放入预涂1 μ g/ml的抗hCD3的24孔板中。细胞培养2天。细胞首先用抗hPD-1染色。洗涤后,细胞用抗mIgG-APC和CD3-FITC;CD8-PerCP染色以供流式细胞术分析。此外,使用小鼠PD-1转染的CHO细胞(CHO/mPD-1)通过流式细胞术测定mAb与小鼠PD-1的交叉反应性。

[0187] 数据表明,抗hPD-1 mAb可与人和食蟹猴T细胞二者上的PD-1蛋白结合,对小鼠PD-1未发现交叉结合(图3)。

[0188] 配体阻断:为了检查配体结合的阻断,将100ng的hPD1hIg融合蛋白与指定剂量的mAb(400ng/10 μ l、300ng/10 μ l、200ng/10 μ l、100ng/10 μ l、50ng/10 μ l)或对照Ig在4 $^{\circ}$ C下预孵育30分钟,然后用于染色CHO/hB7-H1细胞。洗涤细胞并用山羊抗hIgG-APC进一步染色。用流式细胞术检测阻断效果。

[0189] 数据表明,抗-hPD-1mAb 1和2(Ab1和Ab2)对配体阻断无影响。Ab3、Ab4和Ab5可以以剂量依赖的方式阻断hPD-1融合蛋白与hPD-L1的结合(图4)。

[0190] 竞争性结合试验:进行竞争性结合试验研究这些mAb是否识别hPD-1蛋白的相同或不同的结合位点。于4 $^{\circ}$ C下,分别用过量(10 μ g)的5种PD-1 mAb预孵育CHO/hPD-1细胞30分钟。洗涤后,在4 $^{\circ}$ C下用50ng不同生物素标记的mAb孵育细胞20分钟。使用流式细胞术分析测量mAb的结合作用。

[0191] 流式细胞术分析显示,Ab4和Ab5完全消除了彼此对hPD-1蛋白的结合,饱和剂量的Ab3对Ab4和Ab5的结合有部分阻断作用,而Ab1和Ab2对Ab4和Ab5与hPD-1的结合无阻断作用(图5)。因此,在PD-1上Ab4和Ab5的结合位点可能重叠。Ab1或Ab2和Ab4或Ab5通过不同的界面与PD-1结合,这也被配体阻断试验所证实。

[0192] 实施例3:产生抗PD-1抗体的杂交瘤的测序及抗体人源化

[0193] 产生抗PD-1抗体的杂交瘤的测序:收获 1×10^7 个杂交瘤细胞并用PBS洗涤。使用RAeasy Mini Kit (Qiagen) 从杂交瘤中提取信使RNA。利用SMARTer RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) 合成RACE-Ready第一链cDNA。在逆转录后,用准备好的cDNA为模板,用试剂盒提供的5'通用引物(UPM),和根据小鼠IgG1重链可变区和 κ 轻链基因序列设计的3'基因特异性引物(GSP1)进行5' RACE PCR反应。通过凝胶电泳分析确定RACE产物(图6)。PCR产物用Zero Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen) 克隆到T载体中。转化后,质粒通过测序分析验证。使用VBASE2 (<http://www.vBas2.org>) 对抗体基因片段进行分析。序列在(表2)中公开。

[0194] 表2:鼠抗体序列

[0195]

名称 (SEQ ID NO:)	序列 (下划线粗体示出了 CDR)
鼠 Ab2 VH (19)	SQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKAS <u>GYTF</u>TSYTMHWVKQRPGQGLEWIGY <u>INPTTGYTN</u> YNQKFKDKANPTTGYTNYNQKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC <u>CARDDAY</u> <u>YSGY</u>WGQGTTLTVSS
鼠 Ab2 VH (20)	TCCCAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGGCAAGACCTGGGGCCTCAGTGAAG ATGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTTACTAGTTACACGATGCACTGGGTAAAACAG AGGCCTGGACAGGGTCTGGAATGGATTGGATACATTAATCCTACTACTGGTTATACTAAT TACAATCAGAAGTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCC TACATGCAATTGAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAAGAGAT GATGCTTACTACTCGGGCTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA
鼠 Ab2 VK (21)	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRAS <u>ENIYSN</u> LAWYRQKQKSPQLLVY <u>AAK</u> NLADGVPS RFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDFGSYYC <u>QHF</u>WGTPWT FGGGTKLEIKR

鼠 Ab2 VK (22)	GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTATCTGTATCTGTGGGAGAACTGTCACC ATCACATGTCGAGCAAGTGAGAATATTTACAGTAATTTAGCATGGTATCGGCAGAAACAG GGAAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATGCTGCAAAAAACTTAGCAGATGGTGTGCCATCA AGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGCACACAGTATTCCTCAAGATCAACAGCCTGCAGTCT GAAGATTTTGGGAGTTATTACTGTCAACATTTTGGGGTACTCCGTGGACGTTCCGGTGA GGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG
鼠 Ab3 VH (23)	VQLVESGGGLVLPKPGGSLKLSCAAS <u>GF</u> <u>AFSSYD</u> MSWVRQTPEKRLVWVAY <u>ITIGGGTTY</u> YS DTVKRLVWVAYITIGGGTTYSDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKSSEDAMYYC <u>ARH</u> <u>RYDYFAMDN</u> WGHGTSVTVSS
鼠 Ab3 VH (24)	GAAGTGCAGCTGGTGGAGTCGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTC TCCTGTGCAGCCTCTGGATTGCTTTTCAGTAGCTATGACATGTCTTGGGTTCCGAGACT CCGGAGAAGAGGCTGGTGTGGGTGCGATACATTAATGTTGGTGGTGGCACCACCTACTAT TCAGACACTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATGCCAAGAACACCTGTAC CTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACAGCCATGTATTACTGTGCAAGACATAGG TACGATTACTTCGCTATGGACAACGGGGTTCATGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA
鼠 Ab3 VK (25)	DIVLTQSPASLAVSLEHRATISCSQASE <u>ENV</u> <u>DNYGIN</u> FMNWFQHKPAQPPQLLIY <u>VSS</u> NLGS GVPKAFSGSGSSTDFSLNIHPMEEDDTAMYFC <u>QOSKDV</u> PWTFSGGTKLEIKR
鼠 Ab3 VK (26)	GACATTGTGCTGACCCAATCTCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGAGCACAGGGCCACC ATCTCCTGCCAAGCCAGCGAAAATGTTGATAATTATGGCATTAAATTTATGAACTGGTTC CAACACAAACCAGCACAGCCACCCAACTCCTCATCTATGTTTCATCCAACCTAGGATCC GGGGTCCCTGCCAAGTTTAGTGGCAGTGGGTCTGGAACAGACTTCAGCCTCAACATCCAT CCTATGGAAGAAGATGATACTGCAATGTATTTCTGTGCAAGTAAGGACGTTCCGTGG ACGTTTCAGTGGAGGCACCAACTGGAAATCAAACGG
鼠 Ab4 VH (27)	EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS <u>GF</u> <u>TFSSY</u> TMSWIRQTPEKRLEWVAY <u>ISHGGDT</u> YY PDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKSSEDAMYYC <u>ARHSGYER</u> GYYY <u>VMDY</u> WGQGTSVT VSS
鼠 Ab4 VH (28)	GAAGTGAAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTC TCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTTCAGTAGCTATACCATGTCTTGGATTCCGAGACT CCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTGCGATACATTAGTCATGGTGGTGGTGACACCTACTAT CCAGACACTGTAAAGGGCCGATTACCATCTCCAGGGACAATGCCAAGAACACCTGTAC CTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGACATAGT GGTACGAGAGGGATATTACTATGTTATGGATTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACC GTCTCCTCA
鼠 Ab4 VK (29)	DIVLTQFPSTLAVSLGQRATISCRASE <u>ESVDYYGFSF</u> INWFQQKPGQPPLLIIY <u>AAS</u> NQGS GVPARFGSGSSTDFSLNIHPMEEDDTAMYFC <u>QOSKEV</u> PWTFGGGTKLEIK
鼠 Ab4 VK (30)	GACATTGTGCTGACCCAATTTCCAACCTTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCACC ATCTCCTGCAGAGCCAGCGAAAGTGTGATTACTATGGCTTTAGTTTTATAAACTGGTTC CAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTATGCTGCATCCAACAGGGATCC GGGGTCCCTGCCAGGTTTGGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAGCCTCAACATCCAT CCTATGGAGGAGGATGATACTGCAATGTATTTCTGTGCAAGTAAGGAGGTTCCGTGG ACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGG

[0196]

[0197] 重组抗体的蛋白表达和功能确定:为了确保重组抗体序列的正确性,将重组抗体重链和轻链的全长序列分别克隆到pcDNA3.1载体中,并瞬时转染HEK 293T细胞。用蛋白G琼脂糖凝胶柱(GE healthcare)纯化来自细胞培养物上清液的蛋白进行功能评价。

[0198] 流式细胞术分析数据表明,重组抗体可结合hPD-1蛋白,并能阻断hPD-1融合蛋白

与PD-L1蛋白的结合(图7,图A、B)

[0199] 抗人PD-1抗体的人源化:基于抗hPD-1杂交瘤的可变重链(VH)和可变轻链(VL)序列进行人源化。一般而言,首先构建包含小鼠亲本VH和VL序列以及人IgG4-S228P恒定区和人κ链的小鼠-人嵌合mAb。在鉴定嵌合抗体的特征后,设计三个VL和三个VL人源化序列,并用于制备九个人源化抗体。序列列表于(表3A和3B)。

[0200] 表3A:嵌合抗体(人IgG4-S228P骨架)

[0201]

名称 (SEQ ID NO:)	序列 (下划线粗体示出 CDR)
嵌合重链 (31)	EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAAS <u>GFTFSSY</u> TMSWIRQTPEKRLEWVAY <u>ISHGGGDTYY</u> PDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMSLKSEDTAMYYC <u>ARHSGYERGYYYVMDY</u> WGQTSVT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHFFPAVL QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDPEVQFNNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFN STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSQEE MTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRW QEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK
嵌合重链 (32)	CGAAGTGAAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTTTAGTGACGCTGGAGGGTCCCTGAAACT CTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCTATACCATGTCTTGGATTCGCCAGAC TCCAGAGAAGAGGCTGGAGTGGTTCGCATACATTAGTCATGGTGGTGGTGCACCTACTA TCCAGACACTGTAAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGGGACAATGCCAAGAACACCCTGTA CCTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTCTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGACATAG TGTTTACGAGAGGGGATATTACTATGTTATGGATTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCAC CGTCTCCTCAGCTAGCACCAAGGGCCCCAGCGTGTTCCTCTCGCTCCCTGCAGCCGGAG CACATCCGAGAGCACCGCTGCTCTGGGCTGTCTCGTGAAGGACTACTTCCCTGAACCCGT CACCGTCAGCTGGAATAGCGGCGCCCTGACATCCGGCGTCCACACATTCCTCCCTGTCT GCAGAGCAGCGCCTGTACAGCCTGAGCTCCGTGGTCCCGTGCCTAGCAGCAGCCTGGG AACAAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCATAAGCCCTCCAACACCAAGGTGGACAAGCG GGTGAATCCAAGTATGGACCCCCCTGTCTCCTTGCCTGCTCCTGAATTTCTCGGAGG CCCCTCCGTCTTCTGTTTCCCCCAAGCCCAAGGACACCCTGATGATCTCCCGGACACC CGAAGTCACCTGCGTCTGGTGGATGTGAGCCAGGAAGATCCCAGGTTGCACTTCAACTG GTACGTGGACGGAGTGGAGGTGCATAACGCCAAAACCAAGCCAGGGAAGAGCAGTTCAA CAGCACCTATCGGGTCTGTCCGTGCTCACCGTCTGCATCAGGATTGGCTCAACGGCAA GGAGTACAAGTGAAGGTGTCCAACAAGGGCCTGCCCTCCTCCATCGAGAAGACCATCTC CAAGGCTAAGGGCCAACCTCGGGAGCCCCAAGTGTATACCCTCCCTCCCAGCCAGGAGGA GATGACCAAGAATCAAGTGAACCTGACCTGCCCTCGTGAAGGGATTTTACCCTCCGACAT CGCTGTGGAATGGGAAAGCAATGGCCAACCTGAGAACAATAAAGACCACACCCCCGT GCTGGACTCCGATGGCTCCTTCTTCTGTACAGCAGGCTGACCGTGGACAAATCCCGGTG GCAAGAGGGAAACGTGTTGAGCTGCTCCGTGATGCACGAGGCTCTCCACAACCACTACAC CCAGAAGAGCCTCTCCCTGAGCCTCGGCAAGTAGTAA

<p>[0202]</p> <p>嵌合轻链 (33)</p>	<p>DIVLTQFPTS LAVSLGQRATISCRASEESVDYYGFSFINWFQQKPGQPPKLLIYAASNQGS GVPARFGGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKEVPWTFGGGTKLEIKRTVAAPSVF IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNIFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQQDSDKSTYSL TSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</p>
<p>[0202]</p> <p>嵌合轻链 (34)</p>	<p>AGACATTGTGCTGACCCAATTTCCAACCTCTTTGGCTGTGTCTCTAGGGCAGAGGGCCAC CATCTCCTGCAGAGCCAGCGAAAGTGTGATTACTATGGCTTTAGTTTTATAAACTGGTT CCAACAGAAACCAGGACAGCCACCCAACTCCTCATCTATGCTGCATCCAACCAGGGATC CGGGTCCCTGCCAGGTTTGGTGGCAGTGGGTCTGGGACAGACTTCAGCCTCAACATCCA TCCTATGGAGGAGGATGATACTGCAATGTATTTCTGTGAGCAAAGTAAGGAGGTTCCGTG GACGTTCCGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAGCGGACCGTGGCCGCCCCAGCGTGT CATCTTCCCTCCCAGCGACGAGCAGCTGAAGTCTGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCT GAACAACCTTCTACCCCGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAG CGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAACAGGACTCCAAGGACAGCACCTACAGCCT GACCAGCACCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCTGCGA GGTGACCCACCAGGGACTGTCTAGCCCCGTGACCAAGAGCTTCAACCGGGGCGAGTGCTA A</p>

[0203] 表3B:人源化重链和轻链可变区

名称 (SEQ ID NO:)	序列 (下划线粗体示出 CDR)
<p>VH 变体 a (35)</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPGKGLEWVSYISHGGDTYY ADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYERGYYYVMDYWGQGLVTVSSA</p>
<p>VH 变体 a (36)</p>	<p>CGAAGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACT GTCTTGTGCCGCTCCGGCTTACCTTCTCCAGCTACACCATGTCTGGGTGCGACAGGC TCCTGGCAAGGGCTGGAATGGGTGTCTTACATCTCTCACGGCGGAGGCGACACCTACTA CGCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAACTCCAAGAACACCCTGTA CCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCTCGGCACTC TGGCTACGAGCGGGGCTACTACTACGTGATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGAC CGTGTCTCTGCT</p>
<p>VH 变体 b (37)</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPGKGLEWVSYISHGGDTYY PDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYERGYYYVMDYWGQGLVTVSS</p>
<p>VH 变体 b (38)</p>	<p>CGAAGTGCAGCTGGTGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACT GTCTTGTGCCGCTCCGGCTTACCTTCTCCAGCTACACCATGTCTGGGTGCGACAGGC TCCTGGCAAGGGCTGGAATGGGTGTCTTACATCTCTCACGGCGGAGGCGACACCTACTA CCCCGACTCTGTGAAGGGCCGGTTACCATCTCCCGGACAACTCCAAGAACACCCTGTA CCTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTGCTCGGCACTC TGGCTACGAGCGGGGCTACTACTACGTGATGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTCGTGAC CGTGTCTCTGCT</p>
<p>VH 变体 c (39)</p>	<p>EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPGKGLEWVSYISHGGDTYY PDSVKGRFTISRDNKGGDTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHSGYERGYYYVMDYWGKGTTVTVSSA</p>

[0205]

VH 变体 c (40)	GAAGTGAAGCTGCTGGAATCTGGCGGCGGACTGGTGCAGCCTGGCGGATCTCTGAGACTG TCTTGTGCCGCCTCCGGCTTACCTTCTCCAGCTACACCATGTCTGGGTGCGACAGGCT CCTGGCAAGGGCCTGGAATGGGTGCTTACATCTCTCACGGCGGAGGCACACCTACTAC CCGACTCTGTGAAGGGCCGGTTCACCATCTCCCGGGACAACCTCCAAGAACACCCGTGTAC CTGCAGATGAACTCCCTGCGGGCCGAGGACACCGCCGTGTACTACTGTCTCGGCACTCT GGCTACGAGCGGGCTACTACTACGTGATGGACTACTGGGCAAGGGCACCACCGTGACC GTGTCATCTGCT
VK 变体 a (41)	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKSS <u>ESVDYYGFSF</u> LNWFQQKPGQPPELLIYA <u>AASNRES</u> GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC <u>QQSKEVPWT</u> FGQGTKLEIKR
VK 变体 a (42)	AGACATCGTGATGACCCAGTCCCCGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGACCAC CATCAACTGCAAGTCCCTCCGAGTCCGTGGACTACTACGGCTTCTCCTTCTGAACTGGTT CCAGCAGAAGCCCAGCCAGCCCCCTAAGCTGCTGATCTACGCCGCCTCCAACCGCGAGTC TGGCGTGCCCGATAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCAGACTTTACCCTGACCATCAG CTCCCTGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTCCAAGAGGTGCCCTG GACCTTCGGCCAGGGCACAAAGCTGGAAATCAAGCGG
VK 变体 b (43)	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCKAS <u>ESVDYYGFSF</u> LNWFQQKPGQPPELLIYA <u>AASNRES</u> GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYC <u>QQSKEVPWT</u> FGQGTKLEIKR
VK 变体 b (44)	AGACATCGTGATGACCCAGTCCCCGACTCCCTGGCTGTGTCTCTGGGCGAGAGACCAC CATCAACTGCAAGGCCCTCCGAGTCCGTGGACTACTACGGCTTCTCCTTCTGAACTGGTT CCAGCAGAAGCCCAGCCAGCCCCCTAAGCTGCTGATCTACGCCGCCTCCAACCGCGAGTC TGGCGTGCCCGATAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCAGACTTTACCCTGACCATCAG CTCCCTGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTACTGCCAGCAGTCCAAGAGGTGCCCTG GACCTTCGGCCAGGGCACAAAGCTGGAAATCAAGCGG
VK 变体 c (45)	DIQLTQSPDLSVSLGERATINCKAS <u>ESVDYYGFSF</u> LNWFQQKPGQPPELLIYA <u>AASNRSQ</u> GVPDRFSGSGSGTDFTLTISLQAEDVAVYYFC <u>QQSKEVPWT</u> FGQGTKLEIKR
VK 变体 c (46)	GACATCCAGCTGACCCAGTCCCCGACTCCCTGTCTGTGTCTCTGGGCGAGAGACCACC ATCAACTGCAAGGCCCTCCGAGTCCGTGGACTACTACGGCTTCTCCTTCTGAACTGGTTC CAGCAGAAGCCCAGCCAGCCCCCTAAGCTGCTGATCTACGCCGCCTCCAACCGCCAGTCT GGCGTGCCCGATAGATTCTCCGGCTCTGGCTCTGGCACCAGACTTTACCCTGACCATCAGC TCCCTGCAGGCCGAGGATGTGGCCGTGTACTTCTGCCAGCAGTCCAAGAGGTGCCCTGG ACCTTCGGCCAGGGCACAAAGCTGGAAATCAAGCGG

[0206] 实施例4:人源化抗体的特征及功能

[0207] 人源化抗体的结合活性:将CHO/hPD-1细胞与系列稀释的mAb一起孵育。用流式细胞术分析评估九种人源化抗体与PD-1蛋白的结合作用,并与嵌合亲本抗体进行比较。

[0208] 流式细胞术分析结果显示,一些突变体组合的结合活性高于亲本抗体,一些与亲本抗体相同或略低于亲本抗体(图8)。突变体组合列在下面的表4中。

[0209]

名称	VH 变体	VK 变体
变体 1	a	a

[0210]

变体 2	a	b
变体 3 (TY101)	a	c
变体 4	b	a
变体 5	b	b
变体 6	b	c
变体 7	c	a
变体 8	c	b
变体 9	c	c

[0211] 人源化抗体的阻断能力:测量了人源化抗体阻断hPD-1与hPD-L1结合的能力。在4℃下,用在10 μ L PBS中不同剂量的人源化抗体预孵育100ng的hPD1mIg 30分钟,然后将其用于对CHO/hB7-H1细胞进行染色。将细胞洗涤并用山羊抗mIgG-APC进一步染色。用流式细胞术评价阻断效果。使用类似的方法,测量人源化抗体阻断hPD-1与hPD-L2结合的能力。

[0212] 结果显示,所有人源化抗体均以剂量依赖的方式抑制hPD-1mIgG与CHO/hPD-L1细胞的结合。一些突变体组合比嵌合亲本抗体具有更高的阻断能力(图9)。结果还显示,hPD-1mIgG与CHO/hPD-L2细胞的结合也被阻断(图10)。

[0213] 人源化抗体的结合亲和力和动力学确定:用Biacore T100(GE Healthcare Life Sciences)评估人源化PD-1 mAb与hPD-1蛋白相互作用的结合亲和力和动力学。hPD-1mIg蛋白通过胺偶联固定在传感器芯片CM5上。滤过的人源化抗体用HBS-EP缓冲液PH7.4(GE Healthcare Life Sciences)稀释,随后注射在hPD-1mIg固定化的表面上。对每个样品测试九种不同浓度。详细的结合动力学参数(缔合速率, K_a ,解离速率, K_d ,以及亲和常数, KD)可以通过全动力学分析来确定。

[0214] 分析数据显示,在突变体组合与嵌合亲本抗体之间结合速率(K_a)无显著差异。在解离速率(K_d)上,三个突变体组合(3,6,9)接近嵌合亲本抗体。所有人源化抗体均有很强的亲和力,其KD值在低纳摩尔范围(10^{-10} M)。两个突变体组合(3,6)的KD值接近嵌合亲本抗体(9.89×10^{-11} M)(表4)。

[0215] 表4:人源化抗体的结合亲和力及动力学确定

[0216]

	k_a (1/Ms)	K_d (1/s)	KD (M)
亲本	2.88E+05	2.85E-05	9.89E-11
变体 1	2.10E+05	6.15E-05	2.93E-10
变体 2	2.10E+05	7.64E-05	3.63E-10
变体 3	2.42E+05	2.33E-05	9.63E-11
变体 4	1.19E+05	6.29E-05	3.38E-10
变体 5	2.11E+05	6.94E-05	3.29E-10
变体 6	2.48E+05	2.23E-05	8.98E-11
变体 7	2.18E+05	6.48E-05	2.91E-10

[0217]	变体 8	2.22E+05	7.95E-05	3.58E-10
	变体 9	2.59E+05	3.20E-05	1.23E-10

[0218] 抗PD-1对同种异体CD8+CTL体外杀伤PD-L1阳性肿瘤细胞的增强作用:基于抗PD-1抗体的抗肿瘤机制,本实施例设计了体外模型以确定抗PD-1抗体对人同种异体CD8⁺细胞毒性淋巴细胞(同种异体CD8⁺CTL)杀伤肿瘤细胞的增强作用。首先,从人PMBC中分离出CD8⁺淋巴细胞,并与经辐照的、转染hB7-1的人黑色素瘤细胞(624Me1/B7-1)一起培养,以产生同种异体CD8⁺cyto CTL。然后在人源化抗体或对照Ig的存在下,将同种异体CD8⁺CTL在96孔板上与过夜培养的624Me1/hPD-L1肿瘤细胞共培养5天。将平板孔中的细胞用0.5%结晶紫染色,并将平板用ELISA读数器(ELISA reader)在540nm读板。基于肿瘤细胞的存活率计算杀伤活性。

$$[0219] \quad \text{细胞毒性\%} = \frac{100\% \text{活细胞对照孔的吸光度} - \text{测试孔的吸光度}}{100\% \text{活细胞对照孔的吸光度}} \times 100$$

[0220] 结果表明,某些突变体组合可增强同种异体CTL细胞体外杀伤肿瘤细胞的能力(图11)。

[0221] 选择最佳突变体组合组(变体3),将蛋白编码序列克隆到合适的表达载体中,并转移到CHO细胞中,以产生抗hPD-1抗体,其也称为TY101。

[0222] 实施例5:TY101在肿瘤免疫治疗中的特征

[0223] PBMC中细胞因子增强的混合淋巴细胞反应(MRL)。使用Ficoll-Hypaque通过密度梯度离心法分离来自健康个体的人外周血单核细胞(PBMC)。来自健康供体1的PBMC用40Gy剂量的X射线辐照作为刺激细胞。用人Pan T cell Isolation Kit(MiltenylBiotec)从健康供体2分离出T淋巴细胞作为应答细胞。将应答细胞和刺激细胞重悬在含有10%FCS的完全RPMI培养基中,并在系列稀释的TY101或hIgG对照存在下,将每孔 2.5×10^5 个应答细胞和 1.25×10^5 个刺激细胞(R/S=2)接种到96孔板中。将细胞在37°C下在含5% CO₂的加湿培养箱中培养5天。在第5天通过Cell Counting Kit-8(Dojindo Molecular Technologies, Inc)评估T细胞的增殖活性。为了检测细胞因子,在第3天和第5天收集培养物上清液。使用Human Th1/Th2/Th17 Cytometric Bead Array kit(CBA;BD Biosciences)进行细胞因子分析。

[0224] 结果显示,T细胞对TY101的增殖反应与对hIgG相似(图12)。有趣的是,与施用hIgG相比,在施用了TY101的MLR的培养物上清液中细胞因子IL-2和IFN γ 的产生显著增加(图13)。

[0225] 阻断PD-1在T淋巴细胞上的表达。PD-L1在肿瘤细胞上的表达可诱导肿瘤微环境中的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)上的PD-1表达,并触发PD-1依赖性免疫抑制。本实施例设计了一个体外模型,以确定TY101是否能在与hPD-L1转染的肿瘤细胞一起培养时抑制人淋巴细胞上的hPD-1表达。将从人PBMC分离的人T淋巴细胞与转染hPD-L1的人黑色素瘤(624/hPD-L1)细胞在10 μ g/ml的TY101或对照IgG的存在下培养4天。通过流式细胞术检测hPD-1在淋巴细胞上的表达。

[0226] 结果表明,与仅培养基和hIgG对照相比,添加TY101完全抑制了淋巴细胞上的PD-1表达(图14)。

[0227] 人源化PD-1抗体的体内抗肿瘤活性:研究了TY101的体内抗肿瘤作用。将8周龄雌性人PD-1敲入(knock-in)小鼠(购自Shanghai Model Organisms Center, Inc.),在第0天用hPD-L1转染的MC38肿瘤细胞(MC38/hPD-L1)在右体侧(right flank)皮下(s.c)移植(1×10^6 /小鼠)。在第6天、第9天和第13天,通过腹膜内(i.p.)注射施用TY101或对照Ig(10mg/kg)。监测肿瘤大小和生存情况。

[0228] 所有动物最初都有可检测的肿瘤(在第6天为4-5毫米)。然而,在用TY101治疗具有MC38/hPD-L1肿瘤的小鼠后,在100%的小鼠中发生了完全应答。用TY101处理的所有五只小鼠中的肿瘤在第25天完全消退。与之相对,五只对照IgG处理的小鼠中的两只发展出持续生长的肿瘤。在另三只用对照IgG处理的小鼠中,尽管肿瘤在第32天也消退,但在两个小鼠中肿瘤很快复发(图15)。结果表明,TY101可增强体内抗肿瘤效力。

[0229] 实施例6:TY101与市售的PD-1抗体功能的比较

[0230] 本实施例选择了两种目前已被批准用于癌症患者的临床治疗的抗hPD-1抗体,与TY101比较:Merck的Keytruda(派姆单抗)和Bristol-Myers Squibb的Opdivo(纳武单抗)。

[0231] 抗体结合亲和力和动力学:用Biacore T200仪器(GE Healthcare Life Sciences)分析TY101的亲合力和动力学,并与两种市售抗体进行比较。在传感器芯片CM5上以低浓度(33RU)固定hPD-1mIg蛋白,将抗体作为分析物(流动相)来检测相互作用。数据显示,三种抗体的结合速率 K_a 差异不显著。TY101略低于市售抗体。TY101的解离速率 K_d 比两个市售抗体慢至十分之一,且TY101的亲合力 KD 比市售抗体强至4-7倍。结果表明,TY101显示出更强的结合(图16)。

[0232] PD-1抗体在PD-1/PD-L1阻断方面的比较:用PD-1/PD-L1 Blockade Bioassays Kit(Promega)进行PD-1/PD-L1阻断生物测定。将 1×10^5 个细胞/孔的Jurkat-PD1细胞在不透明的96孔TC板中,在TY101、派姆单抗、纳武单抗或阴性对照hIgG4的系列稀释物(0~30 μ g/ml)的存在下用过夜培养的CHO-PD-L1细胞(培养开始于 5×10^4 个细胞/孔)刺激5h。在孵育5h后,通过在SpectraMAX L光度计上,用ONE-Glo底物(Promega)测量萤光素酶活性的相对光单位(RLU),来检测Jurkat-PD-1细胞活化。

[0233] 分析数据显示TY101和两种市售抗体可以阻断PD-1/PD-L1途径。TY101的阻断效应与帕姆单抗的阻断效应相似,而优于纳武单抗的阻断效应(图17)。

[0234] 肿瘤细胞生长的体外抑制作用的比较:如前所述,在不同的mAb和对照IgG的存在下,将同种异体 $CD8^+$ CTL细胞在96孔板上与过夜培养的624Me1/PD-L1肿瘤细胞共培养5天。将细胞用0.5%结晶紫染色,并将平板用ELISA读数器在540nm读板。基于肿瘤细胞的存活率计算杀伤活性。

[0235] 结果显示,所有三种抗PD-1MAb均能增强同种异体 $CD8^+$ CTL的肿瘤杀伤活性。TY101的增强作用高于两种市售抗体的增强作用(图18)。

[0236] 实施例7:开发TY101克隆及其活性

[0237] 将TY101序列克隆到专有(proprietary)表达载体中,并转染CHO细胞。采用ClonePix和/或限制稀释法建立单克隆细胞系。建立了多个克隆,并对3个这样的克隆(TY101-01-09、TY101-04-T3-05和TY101-4G1)产生的抗体进行表征。

[0238] 测试与hPD-1或mPD-1蛋白结合的抗体(ELISA)

[0239] 通过ELISA法检测抗体与hPD-1的结合及与mPD-1蛋白的交叉反应性。在用1 μ g/ml hPD-1或mPD-1预包被的ELISA板上加入系列稀释的测试抗体。然后加入HRP缀合的山羊抗人IgG或山羊抗小鼠IgG抗体,随后加入底物四甲基联苯胺(TMB),并在450nm波长下用SpectraMax Plus 384Microplate Reader(Molecular Device,LLC.,Sunnyvale,CA)定量。测试的TY101克隆TY101-01-09、TY101-04-T3-05和TY101-4G1显示与hPD-1蛋白具有良好的结合,EC50在0.01~0.15nM范围。抗体没有呈现出与mPD-1蛋白的结合(图19)。

[0240] 测试抗体与表达hPD-1和cPD-1的CHOK1细胞的结合(流式细胞术)

[0241] 通过流式细胞术,使用表达hPD-1或食蟹猴PD-1(cPD-1)的CHOK1细胞测试抗体与hPD-1的结合以及cPD-1的交叉反应性。将CHOK1-hPD-1、CHOK1-cPD-1和CHOK1空白细胞与系列稀释的试验制品一起孵育,随后与Alexa Fluor®488缀合的山羊抗人IgG(H+L)抗体一起孵育,并使用FACSCanto II(BD Biosciences, San Jose, CA)进行分析。测试的TY101克隆TY101-01-09、TY101-04-T3-05和TY101-4G1显示与CHOK1-hPD-1具有亚纳摩尔级的EC50以及与CHOK1-cPD-1细胞具有数纳摩尔EC50的良好结合(图20)。

[0242] 测试抗体对hPD-1/hPD-L1或hPD-1/hPD-L2结合的阻断活性(流式细胞术)

[0243] 进一步测试了这些抗体阻断hPD-1/hPD-L1以及hPD-1/hPD-L2结合的能力,这会是癌症患者治疗潜在有效性的关键。将CHOK1-hPD-1细胞同与生物素-hPD-L1或生物素-hPD-L2混合的系列稀释的试验制品一起孵育。然后将细胞与Alexa 488标记的链霉亲和素一起孵育,并使用FACSCanto II进行分析。抗hPD-1抗体TY101-01-09、TY101-04-T3-05和TY101-4G1阻断了hPD-L1与表达hPD-1的CHOK1细胞的结合,IC50在1.15~1.47nM。它们还阻断了hPD-L2与表达hPD-1的CHOK1细胞的结合,IC50在1.52-2.33nM(图21)。

[0244] 用人混合白细胞反应(MLR)试验测试抗体对T细胞的作用

[0245] 在用从2个供体分离的T细胞进行的人MLR试验中测试这些抗体对T细胞功能的影响。粘附的PBMC(主要是单核细胞,从供体1分离并在细胞培养皿中铺板以允许粘附)在100ng/ml重组人(rh)GM-CSF和50ng/ml rhIL-4的存在下培养5天,在3天后更换一半体积的培养基,在第6天添加1 μ g/ml LPS。在第7天,收获所得的细胞(主要是成熟的DC)并用丝裂霉素C处理。从供体2和3通过EasySep™Human T Cell Isolation Kit(阴性选择,STEMCELL技术)分离CD3⁺T细胞。将DC和T细胞在3种浓度(5 μ g/ml、0.5 μ g/ml、0.05 μ g/ml)的测试抗体的存在下共培养5天。3天后收获上清液,测定IL-2水平,并在5天后(100 μ L)测定IFN- γ 水平。抗hPD-1抗体TY101-01-09、TY101-04-T3-05和TY101-4G1,与同种型对照hIgG4相比,以剂量依赖性方式促进来自两个供体的细胞的IL-2和IFN- γ 的分泌(图22)。

[0246] 工程化肿瘤细胞-人T细胞共培养法测定以测试抗体对T细胞的作用

[0247] 利用从4个不同供体分离的T细胞,在工程化肿瘤细胞人-T细胞共培养试验中测试了这些抗体对T细胞功能的影响。通过EasySep™Human T Cell Isolation Kit从4个供体的PBMC中分离出CD3⁺T细胞。用丝裂霉素C处理工程化肿瘤细胞Hep3B-OSC-hPDL1(其为经工程化以稳定表达OS8(抗CD3单链可变片段(scFv))以及hPD-L1的Hep3B细胞(KCLB,目录号:88064)),并在3个浓度(5 μ g/ml、0.5 μ g/ml、0.05 μ g/ml)的测试抗体存在下与CD3⁺T细胞共培养3天,收获培养物上清液以测定IFN- γ 水平。当与同种型对照hIgG4相比时,抗hPD-1抗体TY101-01-09、TY101-04-T3-05和TY101-4G1以剂量依赖性方式促进来自所有4个供体的细胞分泌IFN- γ (图23)。

[0248] 实施例8:与FDA批准的抗hPD-1抗体相比, TY101克隆显示出更好的结合亲和力。

[0249] 用竞争性ELISA测试抗体表位重叠

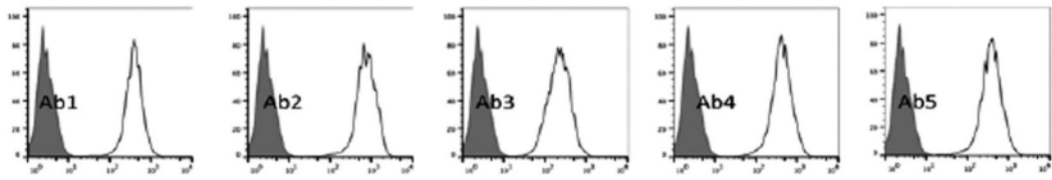
[0250] 在竞争性ELISA测定中测试这些抗体是否结合与FDA批准的抗hPD-1抗体纳武单抗或帕姆单抗相同的表位。将竞争性抗体和生物素-hPD-1的系列稀释物加入到预包被有1 μ g/ml测试抗体的ELISA板中。然后加入HRP缀合的链霉亲和素,随后加入底物TMB,并在450nm波长下用SpectraMax Plus 384Microplate Reader定量。抗-hPD-1抗体TY101-01-09、TY101-04-T3-05和TY101-4G1几乎完全阻断了彼此与hPD-1的结合,表明它们共有相似的表位。这三种抗体也几乎完全(93%至94%)阻断了纳武单抗和帕姆单抗与hPD-1的结合,而纳武单抗和帕姆单抗仅部分阻断了这些抗体与hPD-1的结合(对于纳武单抗为77%-78%,对于帕姆单抗为46%-49%)。这些数据表明, TY101-01-09、TY101-04-T3-05和TY101-4G1抗体结合不同于纳武单抗和帕姆单抗的表位的那些表位,它们对hPD-1的亲和力可能高于纳武单抗和帕姆单抗(图24)。

[0251] 通过SPR测定测试抗体与hPD-1的结合亲和力

[0252] 为了获得对hPD-1的结合亲和力的准确测量,用SPR法分析了抗体TY101-01-09、TY101-04-T3-05和TY101-4G1以及纳武单抗和帕姆单抗。将人PD-1ECD蛋白在CM5传感器芯片上固定不同的时间长度,以在流动池3中实现低的固定化水平(在60RU)并在流动池4中实现高的固定化水平(960RU)。将系列稀释的(0nM、1.5625nM、3.125nM、6.25nM、12.5nM、25和50nM)抗体注射到流动池中。缔合时间为180s,解离时间为600s(对于纳武单抗和帕姆单抗)或1500s(对于TY101-01-09、TY101-04-T3-05和TY101-4G1)。在参考(流动池1)和零浓度的信号从样品信号中减去之后,使用BiaCore T200评价软件版本1.0和1:1结合模型计算结合动力学以进行曲线拟合。对照人IgG4与hPD-1无结合。基于来自低固定化水平的hPD-1(~60RU;表3;图23)的数据,抗hPD-1抗体TY101-01-09、TY101-04-T3-05和TY101-4G1对人PD-1的缔合速率略低于纳武单抗和帕姆单抗(二分之一-四分之一)。这三种抗体与人PD-1的解离速率为纳武单抗和帕姆单抗的十二分之一至三十分之一,导致它们的亲和力比纳武单抗和帕姆单抗高至4-8倍(较低的 K_D 对应于更好的亲和力,反之亦然;表3)。还在高固定化水平的hPD-1下测试了抗hPD-1抗体TY101-01-09、TY101-04-T3-05和TY101-4G1与hPD-1的结合亲和力。抗体TY101-01-09、TY101-04-T3-05和TY101-4G1显示出非常缓慢的解离速率,甚至在1500秒的解离时间后仍只观察到最小限定的解离(图23)。数据表明, TY101-01-09、TY101-04-T3-05和TY101-4G1的结合亲和力优于纳武单抗和帕姆单抗,主要是由于缓慢的解离速率(图25)。

[0253] 本公开的范围不受所描述的具体实施方案的限制,所述具体实施方案旨在作为本公开的各个方面的单一说明,并且任何功能等同的组合物或方法都在本公开的范围。对于本领域技术人员来说显然的是,可以在本公开的方法和组合物中进行各种修改和变化,而不偏离本公开的精神或范围。因此,本公开旨在涵盖本公开的修改和变化,前提是它们在所附权利要求及其等同物的范围内。

[0254] 本说明书中提及的所有出版物和专利申请均通过引用并入本文,如同每一个单独的出版物或专利申请被具体地和单独地指明通过引用并入本文。



PD-1 →

图1

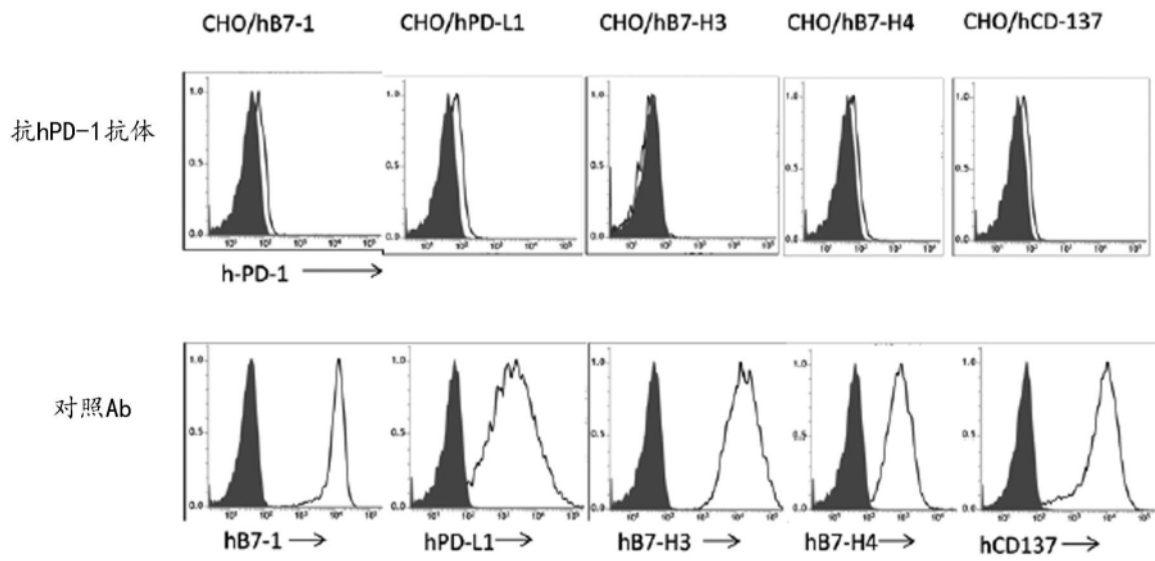


图2

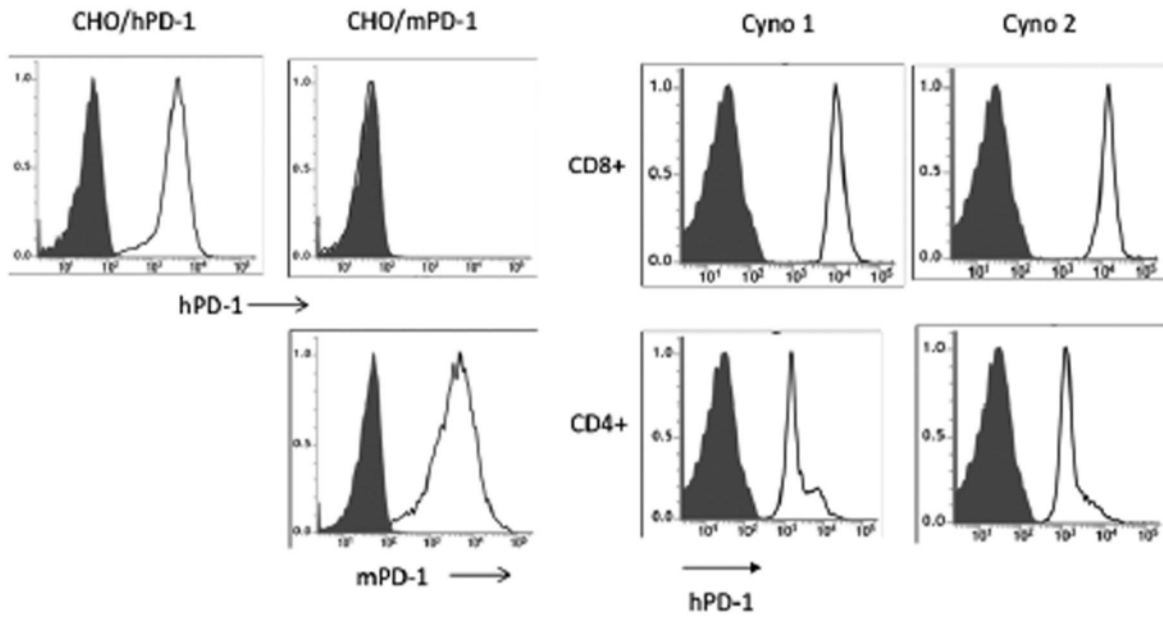


图3

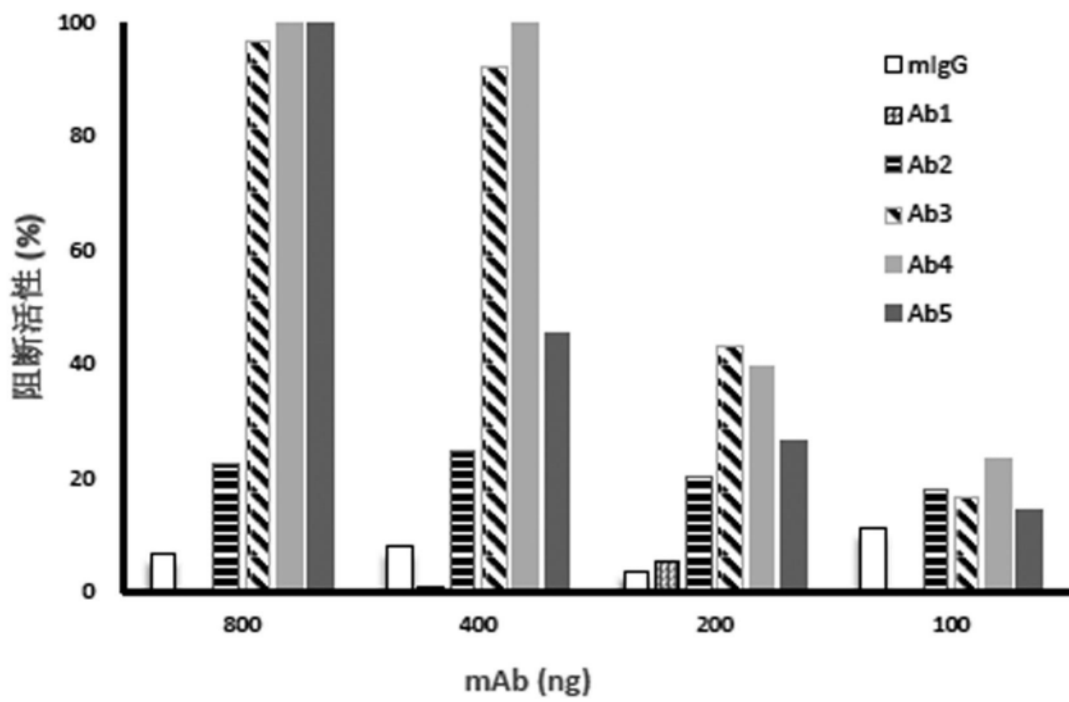


图4

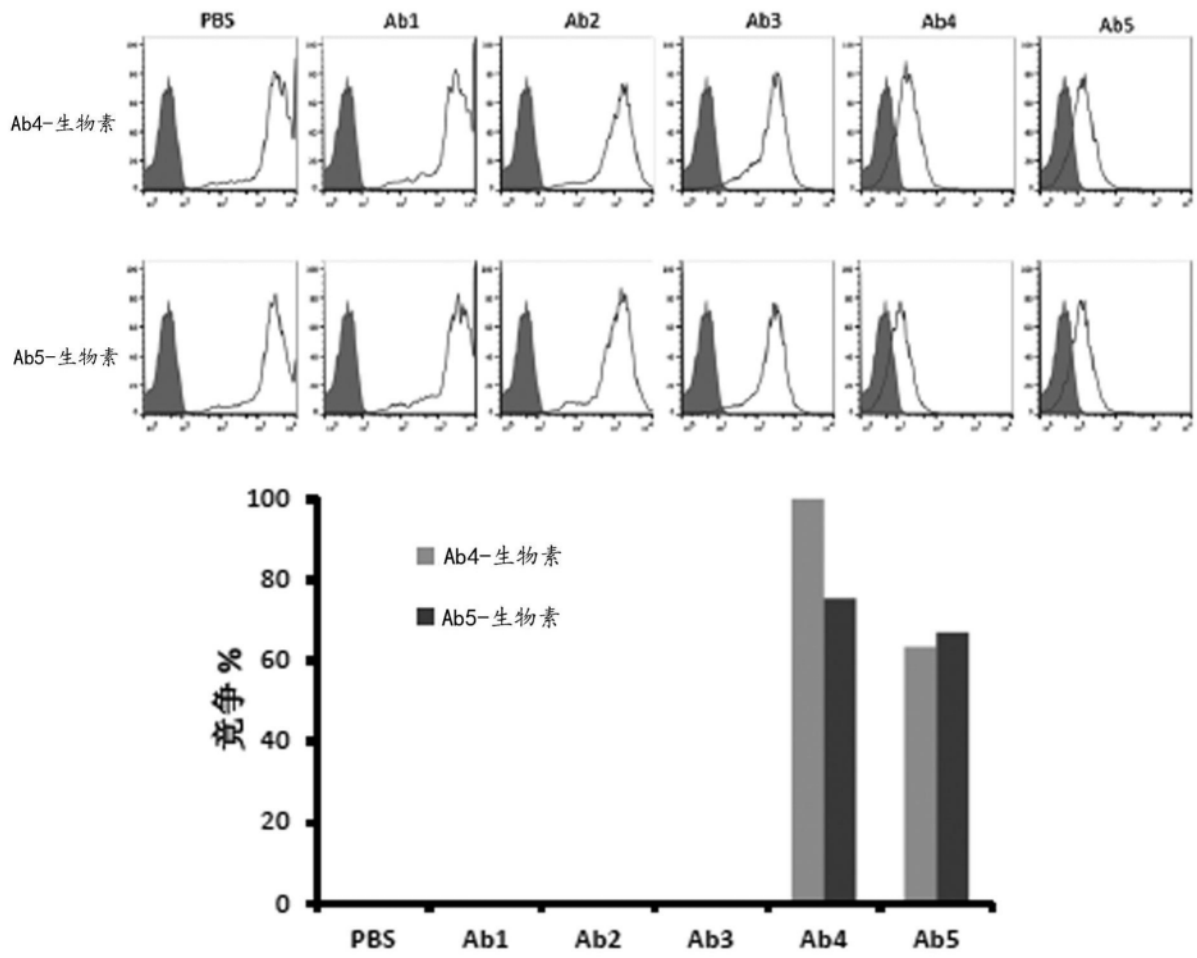


图5

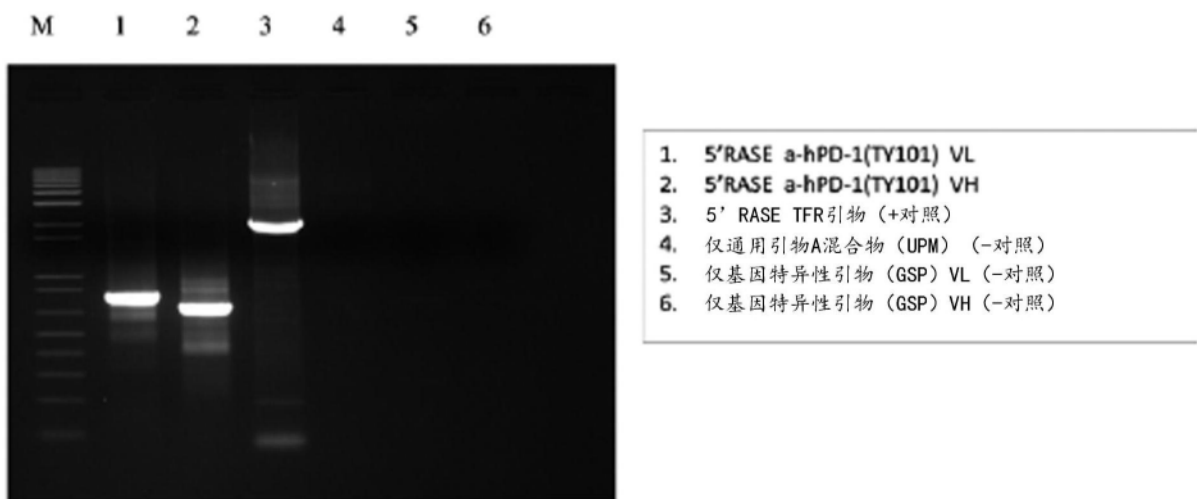
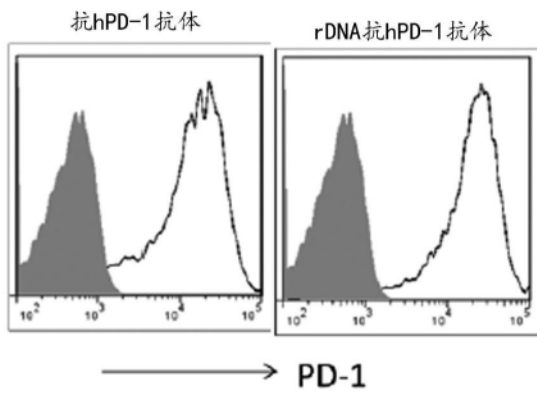


图6

A. rDNA抗体的结合活性



B. rDNA抗体的阻断能力

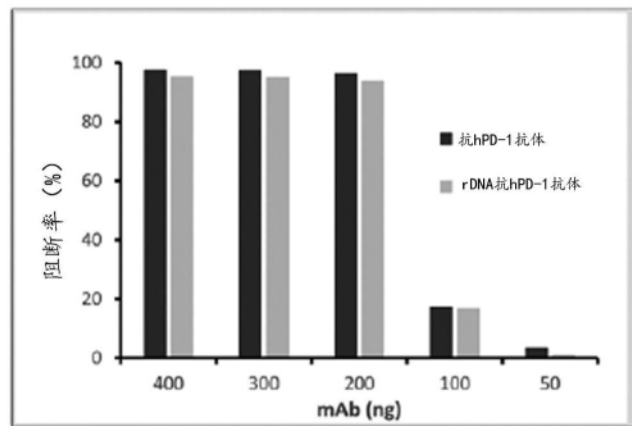


图7

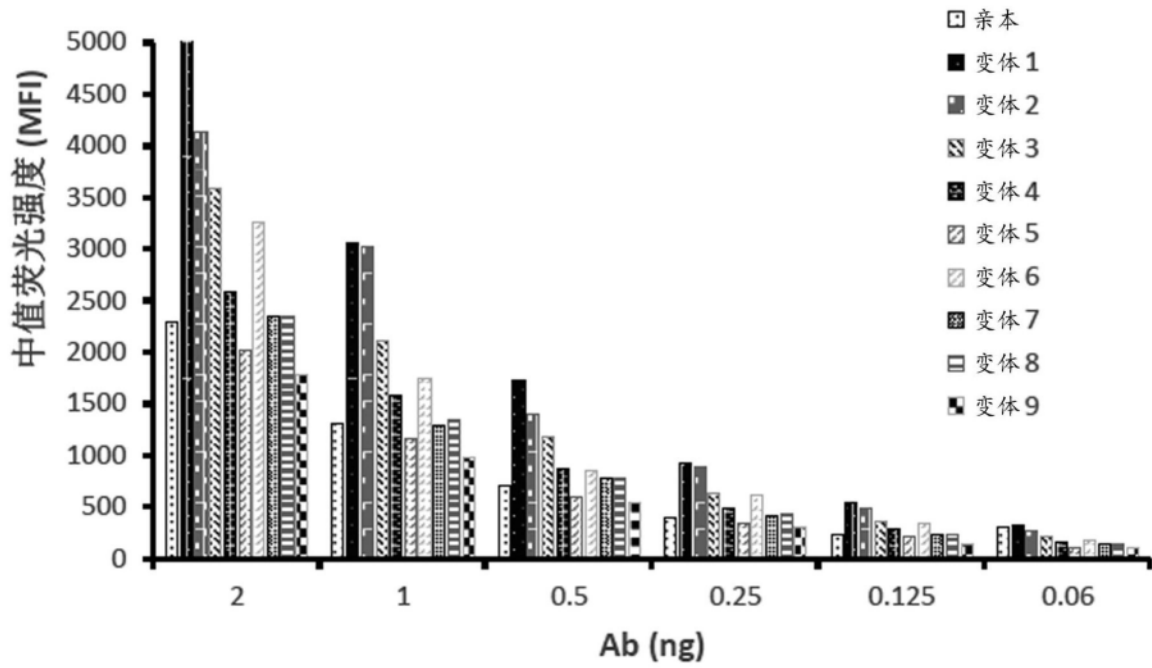


图8

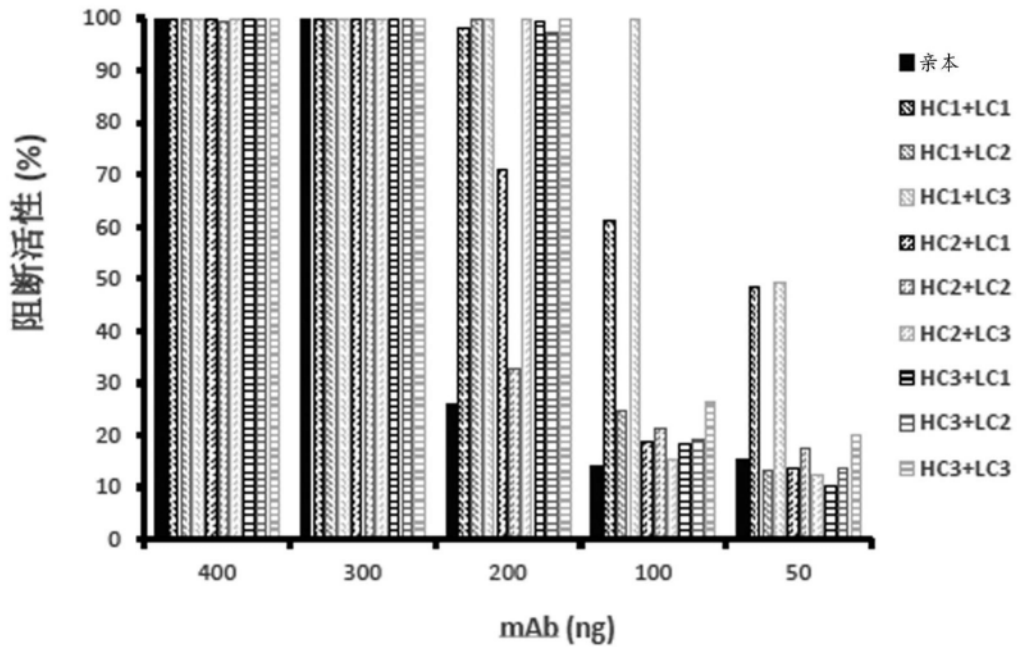


图9

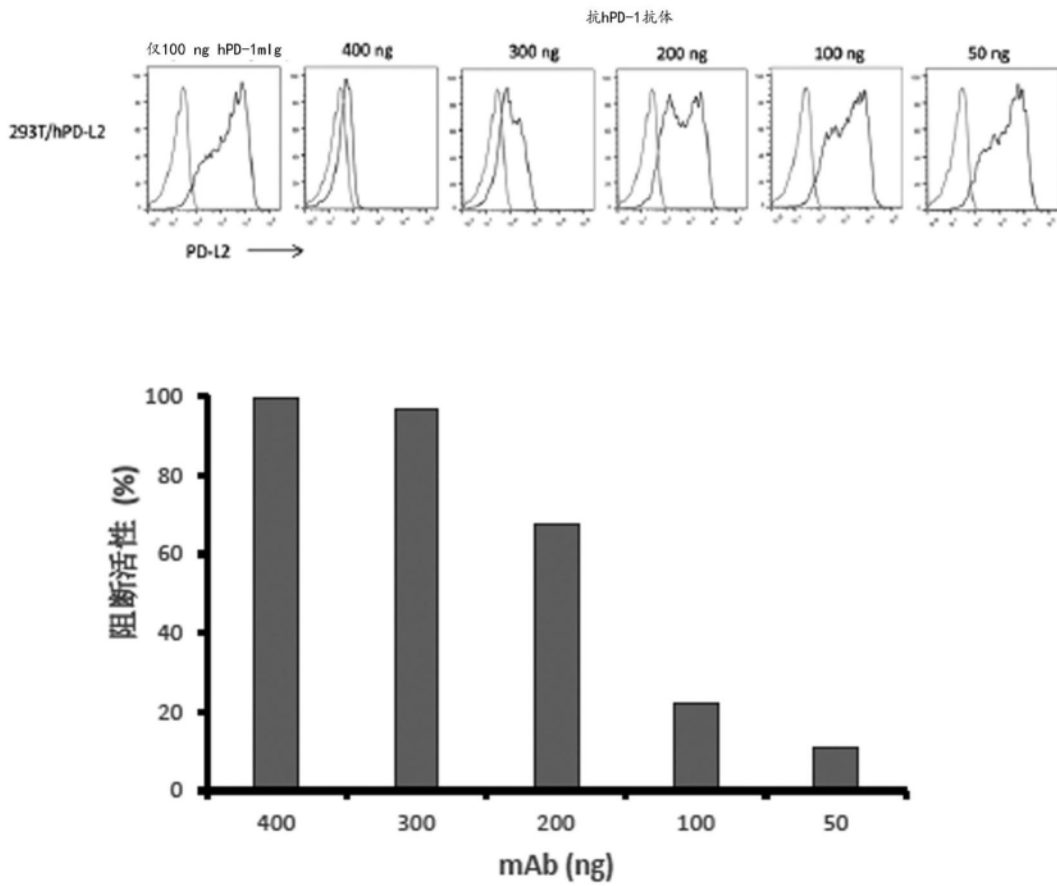


图10

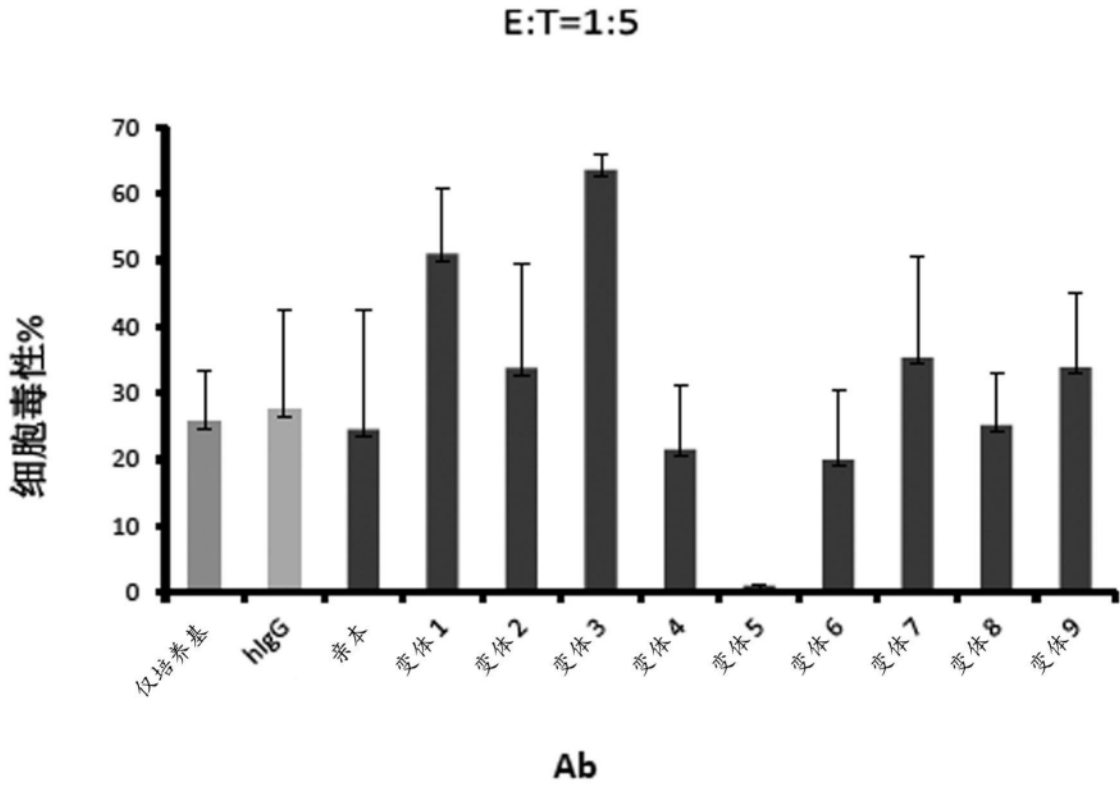


图11

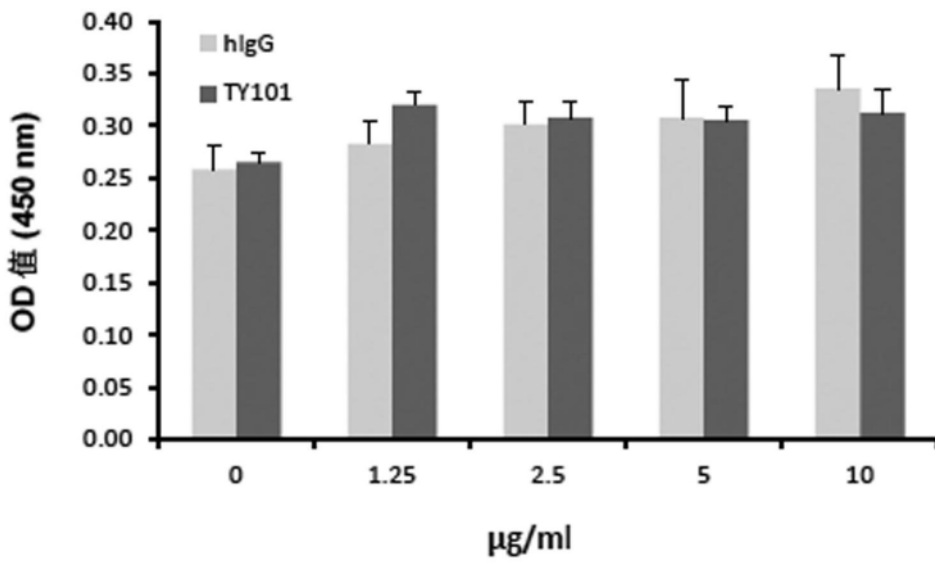


图12

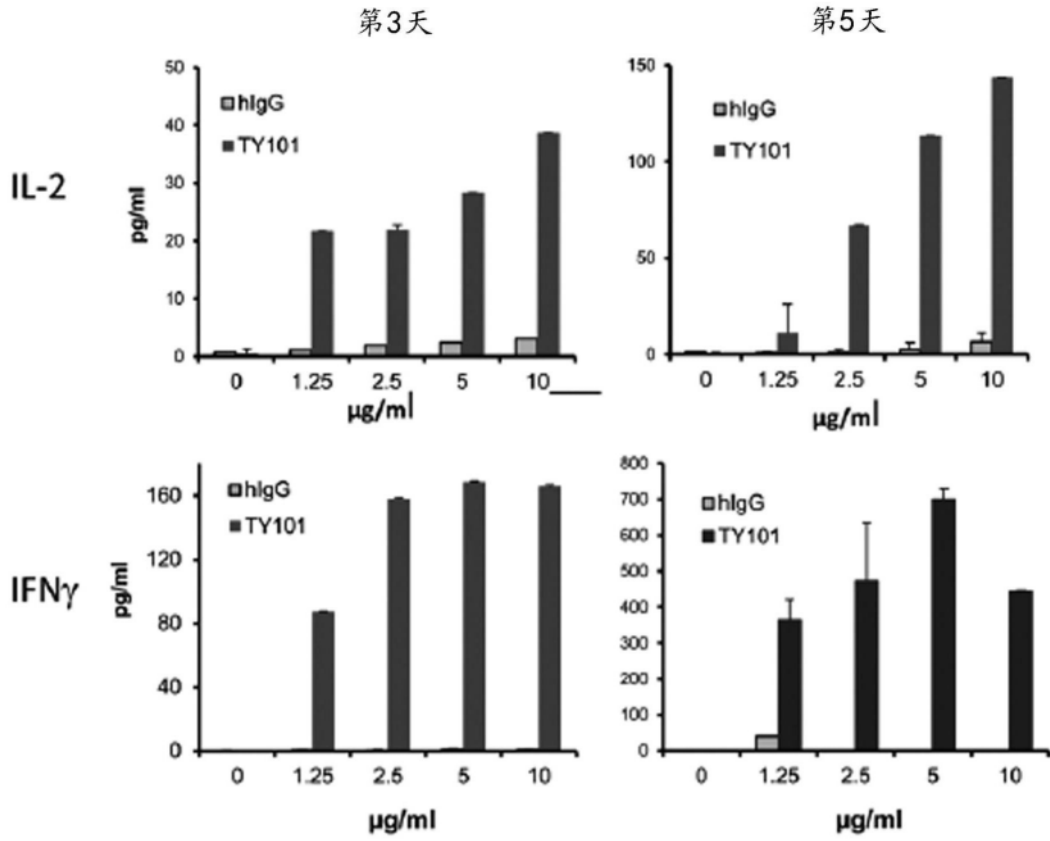


图13

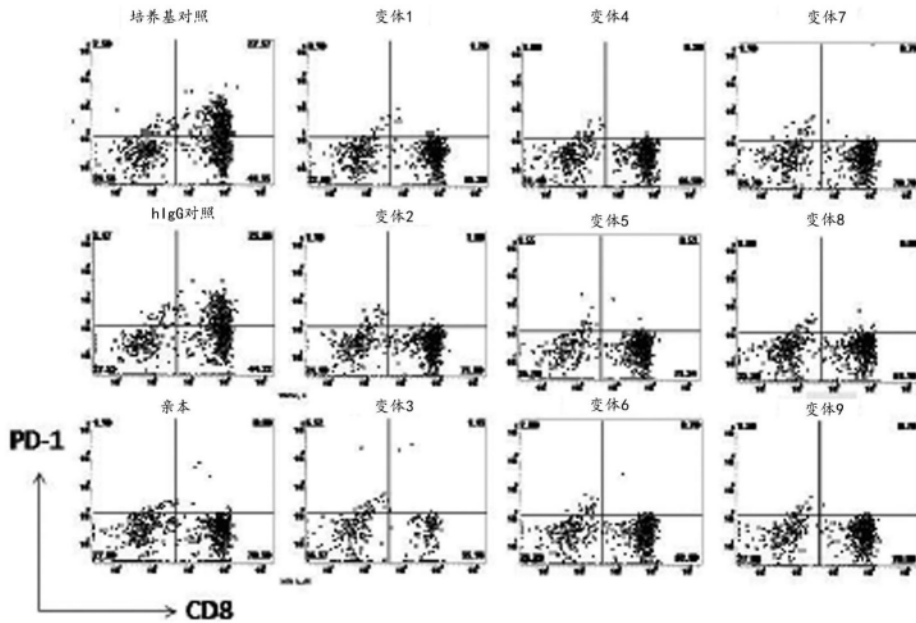


图14

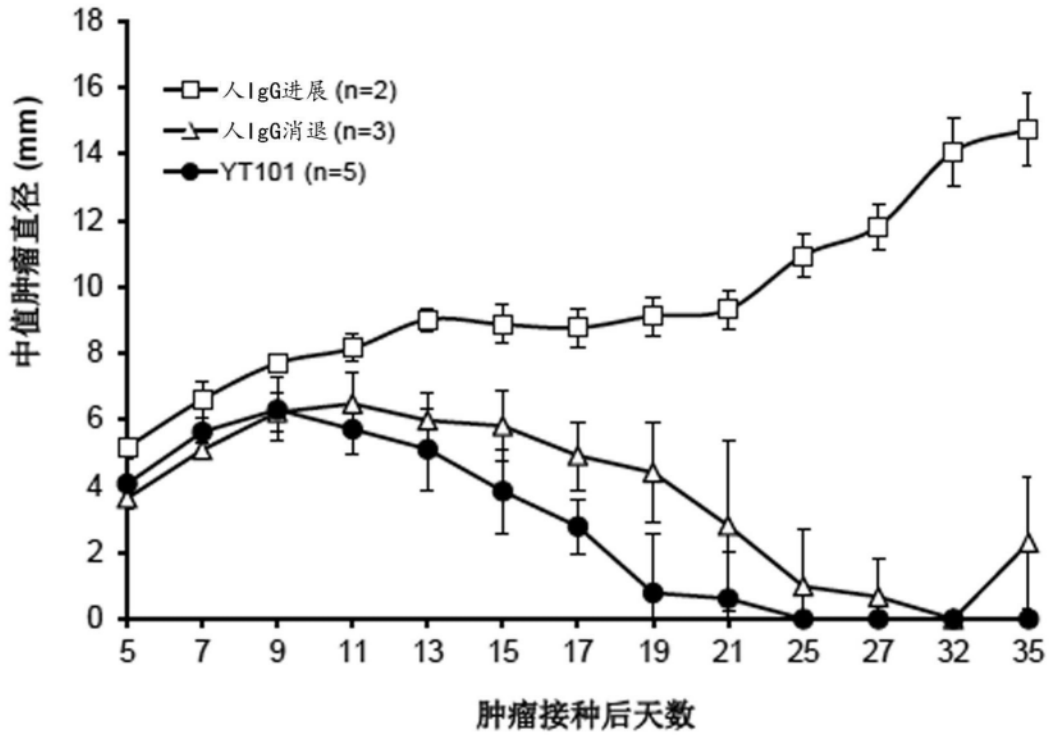


图15

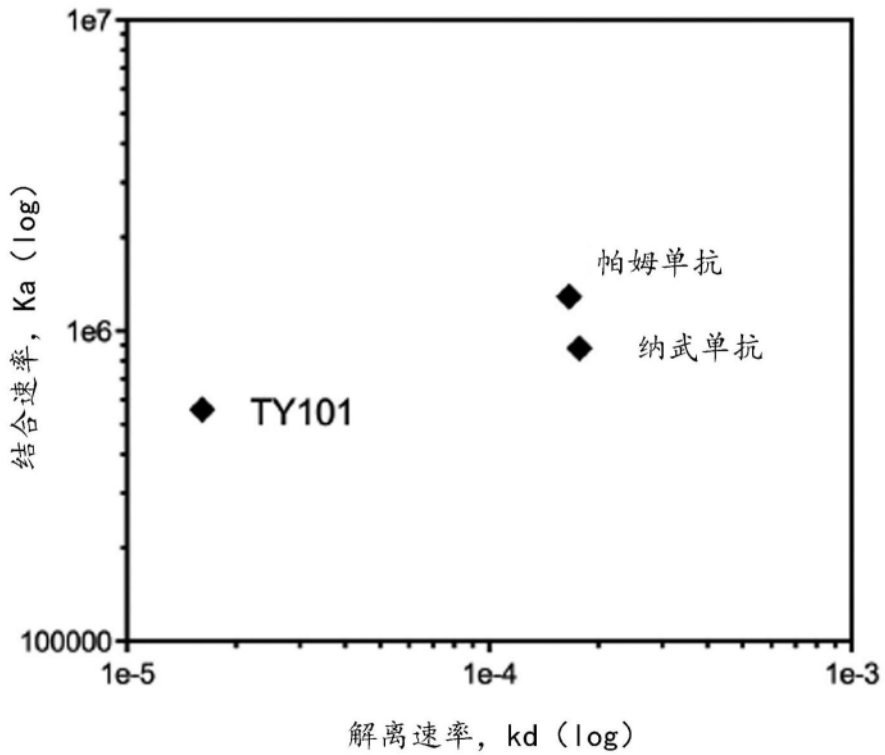


图16

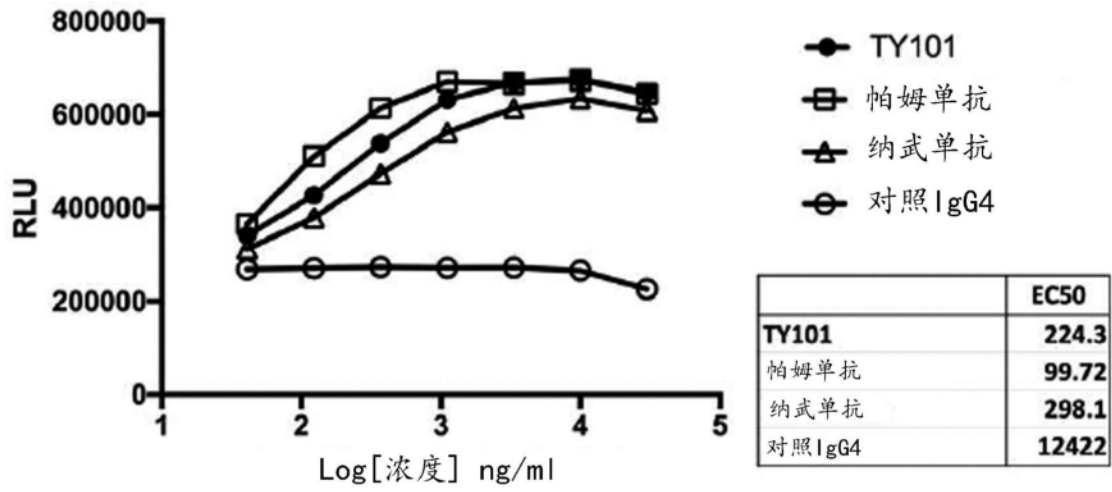


图17

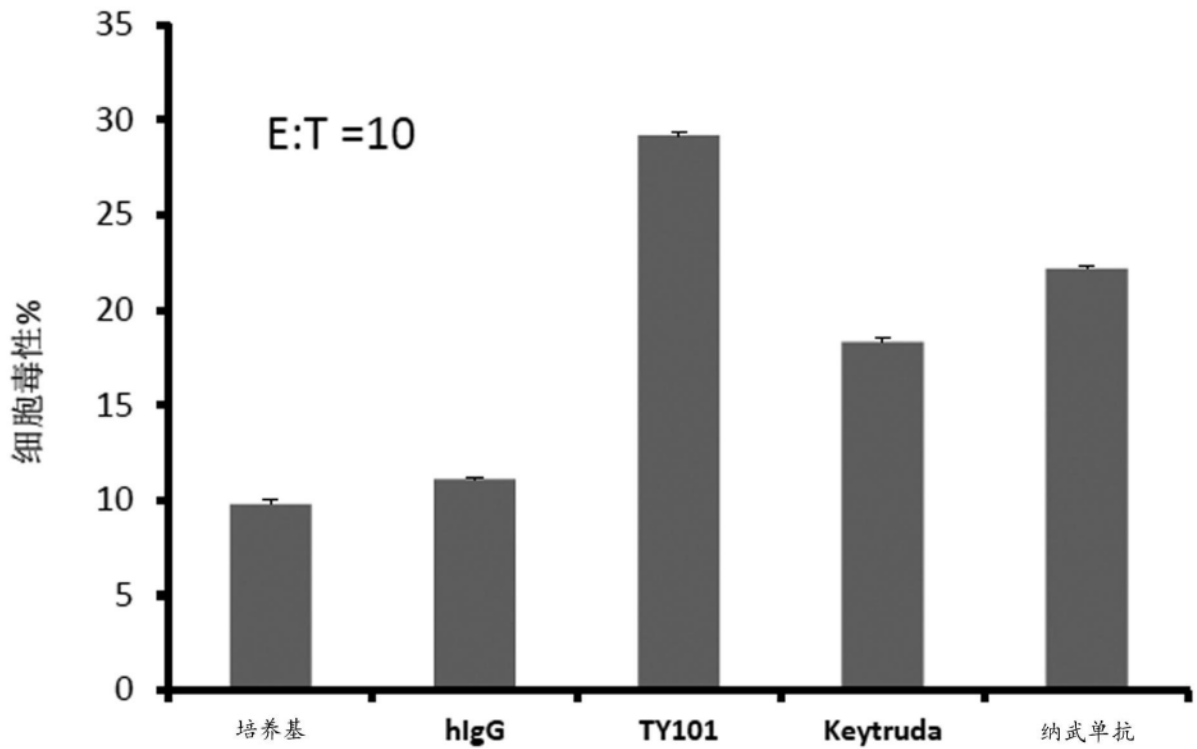


图18

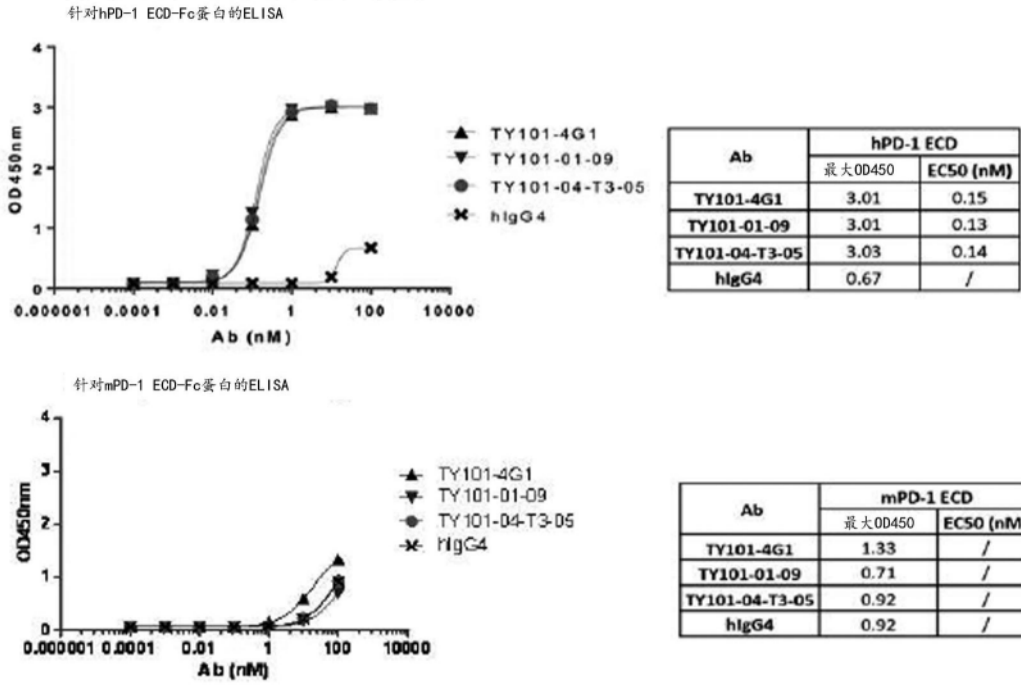


图19

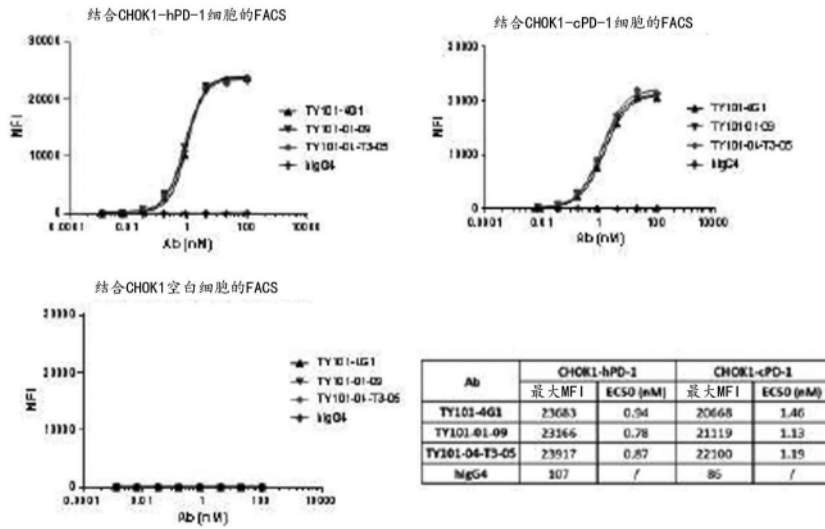


图20

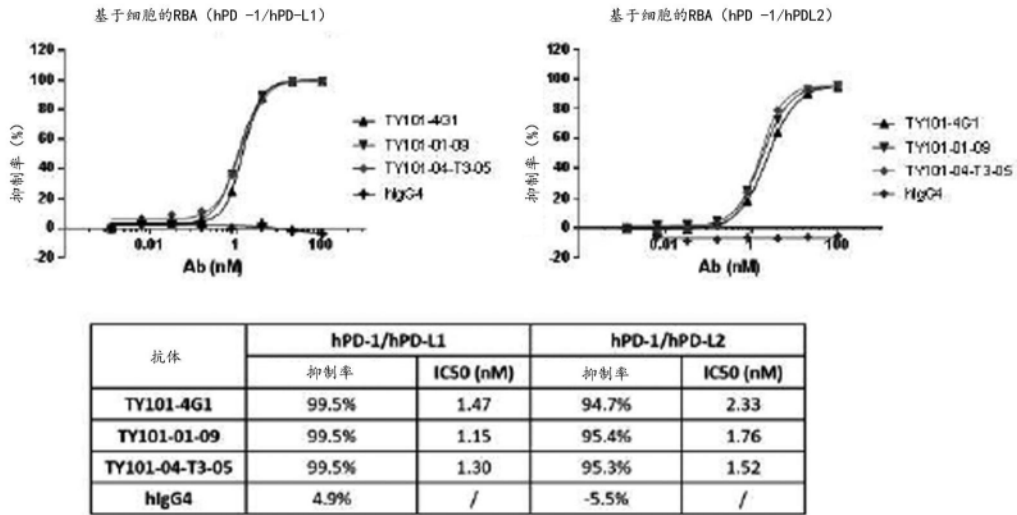


图21

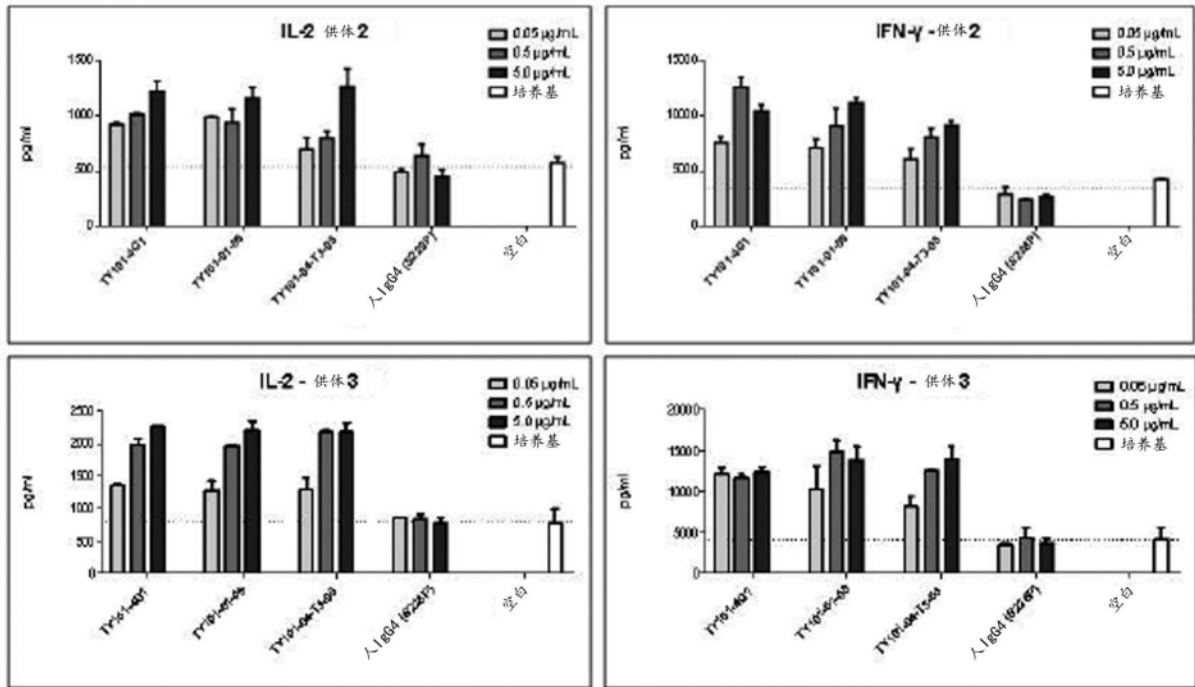


图22

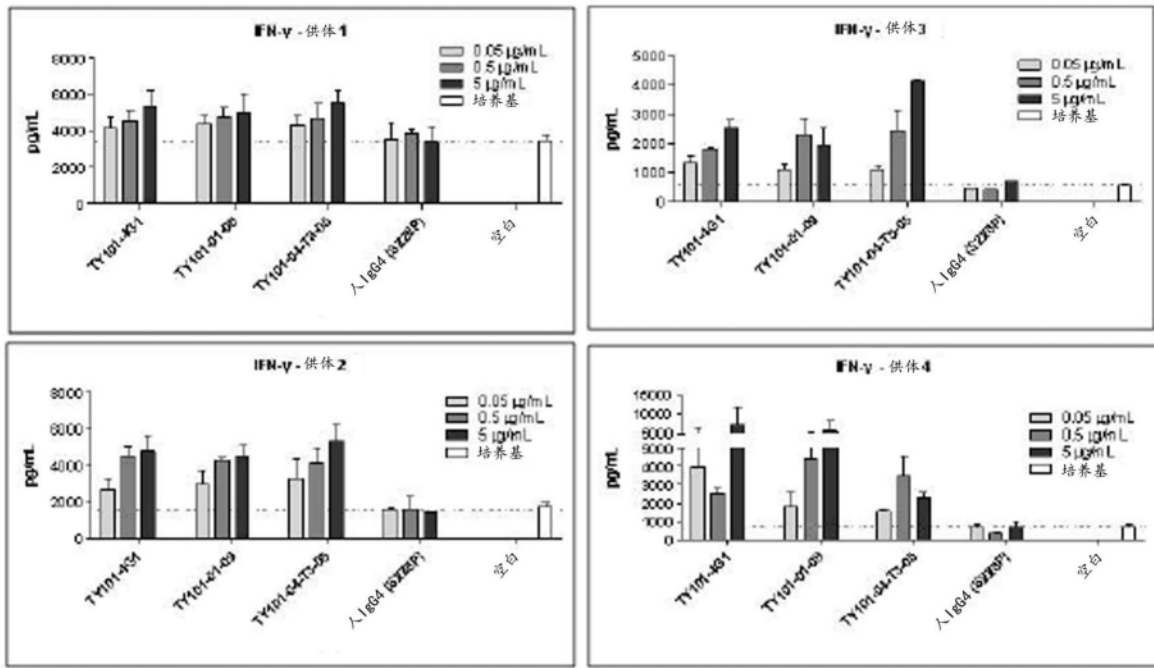


图23

抑制 (%)		竞争性Ab (15μg/ml)				
		TY101-01-09	TY101-04-T3-05	TY101-4G1	纳武单抗	帕姆单抗
包被Ab (1μg/ml)	TY101-01-09	94	94	94	78	49
	TY101-04-T3-05	94	95	94	78	46
	TY101-4G1	95	95	95	77	48
	纳武单抗	93	94	94	95	64
	帕姆单抗	93	94	94	78	94

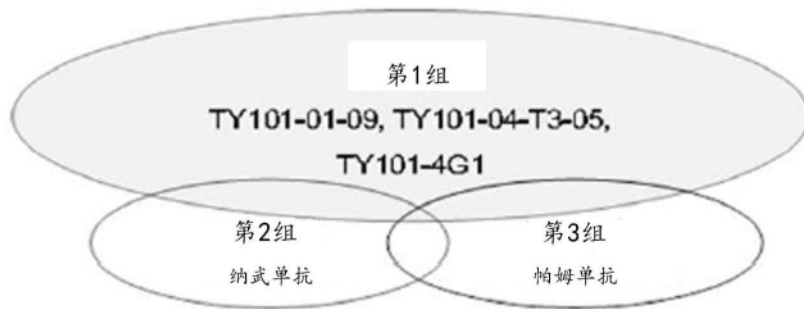


图24

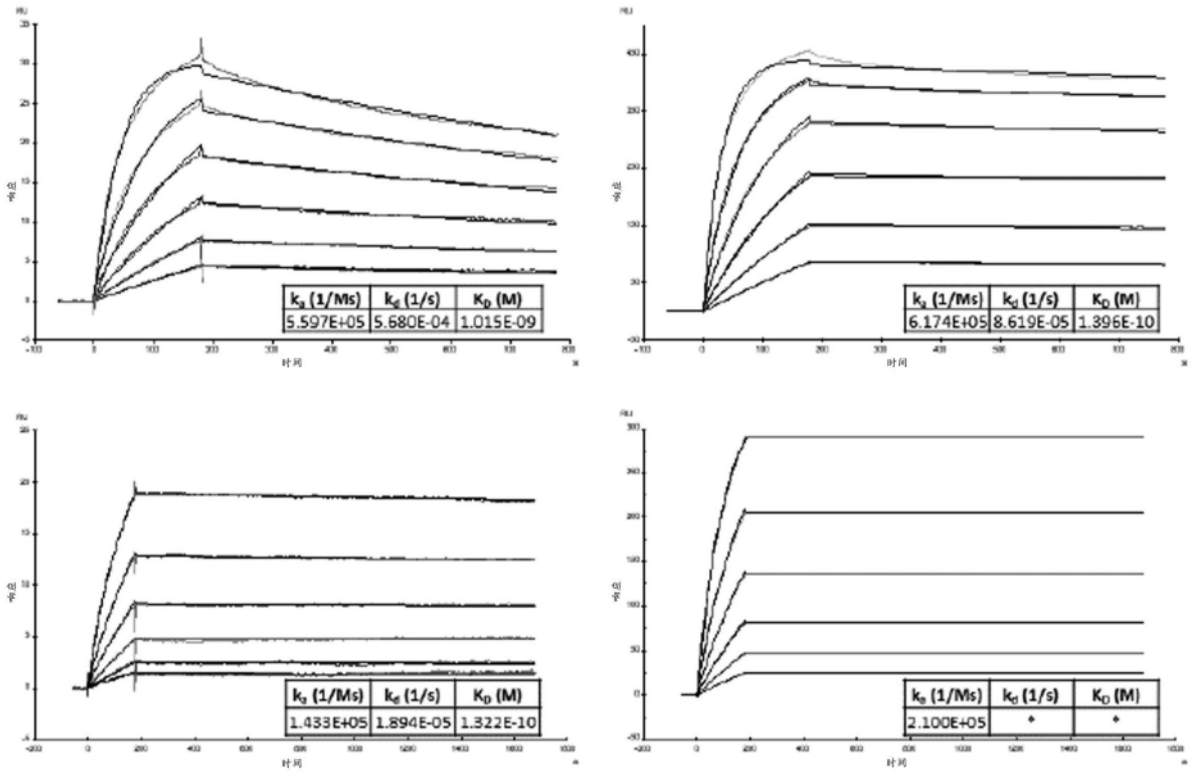


图25