



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111423511 B

(45) 授权公告日 2024.02.23

(21) 申请号 201911115452.3

(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所

11517

(22) 申请日 2014.05.31

专利代理人 赵昊 顾云峰

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 111423511 A

(51) Int.CI.

C07K 16/28 (2006.01)

(43) 申请公布日 2020.07.17

A61K 39/395 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 35/00 (2006.01)

61/829,941 2013.05.31 US

A61P 35/02 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61P 29/00 (2006.01)

201480042315.0 2014.05.31

A61P 37/02 (2006.01)

(73) 专利权人 索伦托药业有限公司

(56) 对比文件

CN 101248089 A, 2008.08.20

地址 美国加利福尼亚州

CN 1902229 A, 2007.01.24

(72) 发明人 周贺钱 芭芭拉·A·斯旺森

CN 101213297 A, 2008.07.02

约翰·迪克森·葛雷

CN 101578296 A, 2009.11.11

贡纳·F·考夫曼

审查员 徐乐

埃德维吉·格罗斯

权利要求书2页 说明书35页

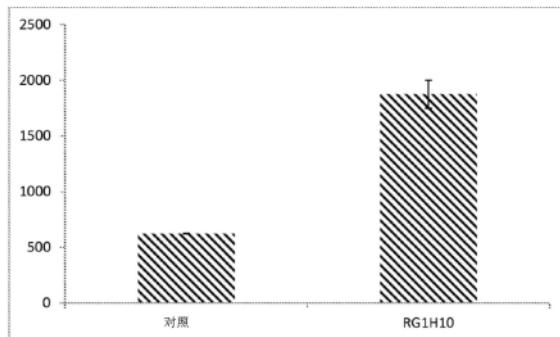
序列表24页 附图8页

(54) 发明名称

与PD-1结合的抗原结合蛋白

(57) 摘要

本申请公开了涉及或源自抗PD-1抗体的组合物和方法。更具体而言，本申请公开了与PD-1结合的全人抗体、与PD-1结合的片段和所述抗体的衍生物，以及含有所述片段并与PD-1结合的多肽。进一步地，本申请公开了编码所属抗体、抗体片段和衍生物及多肽的核酸、包含所述多核苷酸的细胞、制备所述抗体、抗体片段和衍生物及多肽的方法，以及使用所述抗体、抗体片段和衍生物及多肽的方法，包括治疗或诊断患有PD-1相关疾病或病症的患者，包括各种炎性疾病和各种癌症。



1. 一种与PD-1表位结合且结合亲和力至少为 $10^{-6}$ M的IgG类全人抗体,所述抗体包括:  
重链可变域,其包括SEQ ID NO.21的氨基酸序列;和  
轻链可变域,其包括SEQ ID NO.22的氨基酸序列。
2. 一种抗PD-1全人抗体Fab片段,包括:  
重链可变域,其包括SEQ ID NO.21的氨基酸序列;和  
轻链可变域,其包括SEQ ID NO.22的氨基酸序列。
3. 一种抗PD-1单链人抗体,其包括由肽接头连接的重链可变域和轻链可变域,其中,所述重链可变域包括SEQ ID NO.21的氨基酸序列;且所述轻链可变域包括SEQ ID NO.22的氨基酸序列。
4. 一种用于治疗癌症、炎性疾病或自身免疫性疾病的药物,包括有效剂量的权利要求1所述的抗体、有效剂量的权利要求2所述的抗体Fab片段,或有效剂量的权利要求3所述的单链人抗体。
5. 抗PD-1多肽在制备用于治疗癌症或治疗炎性疾病或治疗自身免疫性疾病的药物上的用途,所述抗PD-1多肽选自与PD-1表位结合且结合亲和性至少为 $10^{-6}$ M的IgG类全人抗体、全人抗体Fab片段、单链人抗体、及其组合,所述全人抗体、全人抗体Fab片段具有来自重链的可变域和来自轻链的可变域,所述单链人抗体具有来自重链的可变域和来自轻链的可变域以及连接重链可变域和轻链可变域的肽接头,  
其中所述全人抗体具有包括SEQ ID NO.21的氨基酸序列的重链可变域,并且具有包括SEQ ID NO.22的氨基酸序列的轻链可变域;
- 其中所述全人抗体Fab片段具有包括SEQ ID NO.21的氨基酸序列的重链可变域,并且具有包括SEQ ID NO.22的氨基酸序列的轻链可变域;并且
- 其中所述单链人抗体具有包括SEQ ID NO.21的氨基酸序列的重链可变域,并且具有包括SEQ ID NO.22的氨基酸序列的轻链可变域。
6. 根据权利要求4所述的药物,其特征在于,所述癌症选自卵巢癌,乳腺癌,肺癌,骨髓瘤,单核细胞白血病,B细胞衍生白血病,T细胞衍生白血病,皮肤癌,头颈癌,胰腺癌,膀胱癌,脑癌,结肠直肠癌,甲状腺癌,前列腺癌,肾癌,胃癌,睾丸癌,和肥大细胞衍生肿瘤。
7. 根据权利要求4所述的药物,其特征在于,所述自身免疫性疾病或炎性疾病选自肠道粘膜炎症,与结肠炎相关的消耗性疾病,多发性硬化症,全身性红斑狼疮,类风湿关节炎,骨关节炎,牛皮癣,和克罗恩病。
8. 根据权利要求4所述的药物,其特征在于,所述自身免疫性疾病或炎性疾病为炎症性肠病。
9. 一种分离的抗PD-1抗体或其抗原结合片段,包括:  
重链可变域,其包括如SEQ ID NO.21所示的重链可变域氨基酸序列所述的三个互补决定区(CDRs);和  
轻链可变域,其包括如SEQ ID NO.22所示的轻链可变域氨基酸序列所述的三个CDRs,且其中,  
根据Kabat编号系统,重链CDR1为SYGIS,重链CDR2为WISAYNGNTNYAQKLQG,重链CDR3为GLYGDEDY,轻链CDR1为SGGISNIGSNAVN,轻链CDR2为YNDLLPS,轻链CDR3为AAWDDNLSAYV。
10. 根据权利要求9所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结

合片段的结合亲和力为至少 $1\times10^{-6}$  M。

11. 根据权利要求9或10所述的抗体或其抗原结合片段,其特征在于,所述抗体或其抗原结合片段为IgG。

12. 一种药物组合物,其包括权利要求9、权利要求10或权利要求11所述的抗体或其抗原结合片段,和药学可接受载体。

13. 一种用于治疗癌症、炎性疾病或自身免疫性疾病的药物,包括有效剂量的权利要求9、权利要求10或权利要求11所述的抗体或其抗原结合片段。

14. 根据权利要求13所述的药物,其特征在于,所述癌症选自卵巢癌,乳腺癌,肺癌,骨髓瘤,单核细胞白血病,B细胞衍生白血病,T细胞衍生白血病,皮肤癌,头颈癌,胰腺癌,膀胱癌,脑癌,结肠直肠癌,甲状腺癌,前列腺癌,肾癌,胃癌,睾丸癌,和肥大细胞衍生肿瘤。

15. 根据权利要求13所述的药物,其特征在于,所述自身免疫性疾病或炎性疾病选自肠道粘膜炎症,与结肠炎相关的消耗性疾病,多发性硬化症,全身性红斑狼疮,类风湿关节炎,骨关节炎,牛皮癣,和克罗恩病。

16. 根据权利要求13所述的药物,其特征在于,所述自身免疫性疾病或炎性疾病为炎症性肠病。

17. 一种药物组合物,其包括权利要求1所述的抗体、权利要求2所述的抗体Fab片段、或权利要求3所述的单链人抗体,和药学可接受载体。

## 与PD-1结合的抗原结合蛋白

### 技术领域

[0001] 本发明提供了涉及或源自抗PD-1抗体的组合物及方法。更具体地来说,本发明提供了与PD-1结合的人抗体、能够结合PD-1的所述抗体片段及衍生物、包含所述片段的PD-1结合性多肽。进一步而言,本发明提供了编码所述抗体、抗体片段和衍生物及多肽的核酸,包含所述多肽的细胞,用于制备所述抗体、抗体的片段和衍生物及多肽的方法,以及使用所述抗体、所述抗体片段及其衍生物和多肽的方法,包括治疗或诊断患有PD-1相关疾病或症状的对象,包括各种炎性疾病和各种癌症。

### 背景技术

[0002] 程序性细胞死亡蛋白(PD-1)是一种具有268个氨基酸的第I型膜蛋白,是T细胞调节子PD-1的扩展CD28/CTLA-4家族的成员(The EMBO Journal (1992), vol.11, issue 11, p.3887-3895)。人PD-1cDNA由如EMBL/GenBank Acc.No.NM\_005018所示的碱基序列组成,小鼠PD-1cDNA由如Acc.No.NM\_008798所示的碱基序列组成,且在胸腺细胞从CD4-CD8-细胞分化为CD4+CD8+细胞时,观察到其表达(International Immunology (1996), vol.18, issue 5, p.773-780., J.Exper. Med. (2000), vol.191, issue 5, p.891-898.)。据报道,在骨髓细胞中观察到PD-1的外周表达,包括由抗原受体刺激活化的T细胞或B淋巴细胞或活化的巨噬细胞(International Immunology (1996), vol.18, issue 5, p.765-772.)。

[0003] PD-1是受体CD28家族的成员,该家族包括CD28,CTLA-4,ICOS,PD-1和BTLA。该家族的初始成员CD28的最初发现是在添加单克隆抗体后的T细胞增殖放大功能作用(Hutloff et al. (1999) Nature 397:263-266; Hansen et al. (1980) Immunogenics 10:247-260)。PD-1的两个细胞表面糖蛋白配体已得到鉴定,即PD-1和PD-2,其被证实与PD-1结合后能够下调T细胞活化和细胞因子分泌(Freeman et al. (2000) J.Exper. Med. 192:1027-34; Latchman et al. (2001) Nat. Immunol. 2:261-8; Carter et al. (2002) Eur. J. Immunol. 32: 634-43; Ohigashi et al. (2005) Clin. Cancer Res. 11:2947-53)。PD-1(B7-H1)和PD-L2(B7-DC)均为与PD-1结合的B7同系物。PD-1在细胞表面的表达还被证实可以通过IFN- $\gamma$ 刺激来上调。

### 发明内容

[0004] 本发明提供一种与ErbB3PD-1表位结合且结合亲和性至少为 $10^{-6}$ M的IgG类全人抗体,其重链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少95%相同:SEQ ID NO.1,SEQ ID NO.3,SEQ ID NO.5,SEQ ID NO.7,SEQ ID NO.9,SEQ ID NO.11,SEQ ID NO.13,SEQ ID NO.15,SEQ ID NO.17,SEQ ID NO.19,SEQ ID NO.21,SEQ ID NO.23,SEQ ID NO.25,SEQ ID NO.27,SEQ ID NO.29,SEQ ID NO.31,SEQ ID NO.33,SEQ ID NO.35,SEQ ID NO.37,SEQ ID NO.38,SEQ ID NO.39,SEQ ID NO.40,SEQ ID NO.41,SEQ ID NO.42,SEQ ID NO.43,SEQ ID NO.44,及其组合;其轻链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少95%相同:SEQ ID NO.2,SEQ ID NO.4,SEQ ID NO.6,SEQ ID NO.8,SEQ ID NO.10,SEQ ID NO.12,SEQ ID

NO.14,SEQ ID NO.16,SEQ ID NO.18,SEQ ID NO.20,SEQ ID NO.22,SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.26,SEQ ID NO.28,SEQ ID NO.30,SEQ ID NO.32,SEQ ID NO.34,SEQ ID NO.36,及其组合。优选地,该全人抗体具有重链和轻链,其中该抗体的重链/轻链可变域序列选自下列序列:SEQ ID NO.1/SEQ ID NO.2(本文称为GA1),SEQ ID NO.3/SEQ ID NO.4(本文称为GA2),SEQ ID NO.5/SEQ ID NO.6(本文称为GB1),SEQ ID NO.7/SEQ ID NO.8(本文称为GB6),SEQ ID NO.9/SEQ ID NO.10(本文称为GH1),SEQ ID NO.11/SEQ ID NO.12(本文称为A2),SEQ ID NO.13/SEQ ID NO.14(本文称为C7),SEQ ID NO.15/SEQ ID NO.16(本文称为H7),SEQ ID NO.17/SEQ ID NO.18(本文称为SH-A4),SEQ ID NO.19/SEQ ID NO.20(本文称为SH-A9),SEQ ID NO.21/SEQ ID NO.22(本文称为RG1B3),SEQ ID NO.23/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10),SEQ ID NO.25/SEQ ID NO.26(本文称为RG1H11),SEQ ID NO.27/SEQ ID NO.28(本文称为RG2H7),SEQ ID NO.29/SEQ ID NO.30(本文称为RG2H10),SEQ ID NO.31/SEQ ID NO.32(本文称为RG3E12),SEQ ID NO.33/SEQ ID NO.34(本文称为RG4A6),SEQ ID NO.35/SEQ ID NO.36(本文称为RG5D9),SEQ ID NO.37/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10-H2A-22-15),SEQ ID NO.38/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10-H2A-27-25),SEQ ID NO.39/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10-3C),SEQ ID NO.40/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10-16C),SEQ ID NO.41/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10-17C),SEQ ID NO.42/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10-19C),SEQ ID NO.43/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10-21C),SEQ ID NO.44/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10-23C2),及其组合。

[0005] 本发明提供一个Fab全人抗体片段,其具有来自重链的可变域和来自轻链的可变域,其中,重链可变域序列与选自下列的氨基酸序列及至少95%相同:SEQ ID NO.1,SEQ ID NO.3,SEQ ID NO.5,SEQ ID NO.7,SEQ ID NO.9,SEQ ID NO.11,SEQ ID NO.13,SEQ ID NO.15,SEQ ID NO.17,SEQ ID NO.19,SEQ ID NO.21,SEQ ID NO.23,SEQ ID NO.25,SEQ ID NO.27,SEQ ID NO.29,SEQ ID NO.31,SEQ ID NO.33,SEQ ID NO.35,SEQ ID NO.37,SEQ ID NO.38,SEQ ID NO.39,SEQ ID NO.40,SEQ ID NO.41,SEQ ID NO.42,SEQ ID NO.43,SEQ ID NO.44,及其组合;且其轻链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少95%相同:SEQ ID NO.2,SEQ ID NO.4,SEQ ID NO.6,SEQ ID NO.8,SEQ ID NO.10,SEQ ID NO.12,SEQ ID NO.14,SEQ ID NO.16,SEQ ID NO.18,SEQ ID NO.20,SEQ ID NO.22,SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.26,SEQ ID NO.28,SEQ ID NO.30,SEQ ID NO.32,SEQ ID NO.34,SEQ ID NO.36,及其组合;优选地,该全人抗体Fab片段具有重链可变域和轻链可变域,其中该抗体的重链/轻链可变域序列选自下列序列:SEQ ID NO.1/SEQ ID NO.2,SEQ ID NO.3/SEQ ID NO.4,SEQ ID NO.5/SEQ ID NO.6,SEQ ID NO.7/SEQ ID NO.8,SEQ ID NO.9/SEQ ID NO.10,SEQ ID NO.11/SEQ ID NO.12,SEQ ID NO.13/SEQ ID NO.14,SEQ ID NO.15/SEQ ID NO.16,SEQ ID NO.17/SEQ ID NO.18,SEQ ID NO.19/SEQ ID NO.20,SEQ ID NO.21/SEQ ID NO.22,SEQ ID NO.23/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.25/SEQ ID NO.26,SEQ ID NO.27/SEQ ID NO.28,SEQ ID NO.29/SEQ ID NO.30,SEQ ID NO.31/SEQ ID NO.32,SEQ ID NO.33/SEQ ID NO.34,SEQ ID NO.35/SEQ ID NO.36,SEQ ID NO.37/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.38/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.39/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.41/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.42/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.43/SEQ ID NO.24,及其组合。

[0006] 本发明提供一个单链人抗体,其具有来自重链的可变域、来自轻链的可变域、连接

重链和轻链可变域的连接肽,其中,重链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少95%相同:SEQ ID NO.1,SEQ ID NO.3,SEQ ID NO.5,SEQ ID NO.7,SEQ ID NO.9,SEQ ID NO.11,SEQ ID NO.13,SEQ ID NO.15,SEQ ID NO.17,SEQ ID NO.19,SEQ ID NO.21,SEQ ID NO.23,SEQ ID NO.25,SEQ ID NO.27,SEQ ID NO.29,SEQ ID NO.31,SEQ ID NO.33,SEQ ID NO.35,SEQ ID NO.37,SEQ ID NO.38,SEQ ID NO.39,SEQ ID NO.40,SEQ ID NO.41,SEQ ID NO.42,SEQ ID NO.43,SEQ ID NO.44,及其组合;其轻链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少95%相同:SEQ ID NO.2,SEQ ID NO.4,SEQ ID NO.6,SEQ ID NO.8,SEQ ID NO.10,SEQ ID NO.12,SEQ ID NO.14,SEQ ID NO.16,SEQ ID NO.18,SEQ ID NO.20,SEQ ID NO.22,SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.26,SEQ ID NO.28,SEQ ID NO.30,SEQ ID NO.32,SEQ ID NO.34,SEQ ID NO.36,及其组合。优选地,该全人单链抗体具有重链可变域和轻链可变域,其中该抗单链全人抗体的重链/轻链可变域序列选自下列序列:SEQ ID NO.1/SEQ ID NO.2,SEQ ID NO.3/SEQ ID NO.4,SEQ ID NO.5/SEQ ID NO.6,SEQ ID NO.7/SEQ ID NO.8,SEQ ID NO.9/SEQ ID NO.10,SEQ ID NO.11/SEQ ID NO.12,SEQ ID NO.13/SEQ ID NO.14,SEQ ID NO.15/SEQ ID NO.16,SEQ ID NO.17/SEQ ID NO.18,SEQ ID NO.19/SEQ ID NO.20,SEQ ID NO.21/SEQ ID NO.22,SEQ ID NO.23/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.25/SEQ ID NO.26,SEQ ID NO.27/SEQ ID NO.28,SEQ ID NO.29/SEQ ID NO.30,SEQ ID NO.31/SEQ ID NO.32,SEQ ID NO.33/SEQ ID NO.34,SEQ ID NO.35/SEQ ID NO.36,SEQ ID NO.37/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.38/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.39/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.41/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.43/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.44/SEQ ID NO.24,及其组合。

[0007] 本发明进一步提供一种治疗广谱哺乳动物癌症或广谱炎性疾病和自免疫疾病的方法,包括以抗PD-1多肽的有效剂量给药,其中所述抗PD-1多肽选自:一种与PD-1表位结合且结合亲和性为至少 $10^{-6}$ M的IgG类全人抗体、具有重链可变域和轻链可变域的Fab全人抗体片段、具有来自重链的可变域和来自轻链的可变域以及连接所述轻链和重链可变域的连接肽的单链人抗体,及其组合;

[0008] 其中,所述全人抗体的重链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少95%相同:SEQ ID NO.1,SEQ ID NO.3,SEQ ID NO.5,SEQ ID NO.7,SEQ ID NO.9,SEQ ID NO.11,SEQ ID NO.13,SEQ ID NO.15,SEQ ID NO.17,SEQ ID NO.19,SEQ ID NO.21,SEQ ID NO.23,SEQ ID NO.25,SEQ ID NO.27,SEQ ID NO.29,SEQ ID NO.31,SEQ ID NO.33,SEQ ID NO.35,SEQ ID NO.37,SEQ ID NO.38,SEQ ID NO.39,SEQ ID NO.40,SEQ ID NO.41,SEQ ID NO.42,SEQ ID NO.43,SEQ ID NO.44,及其组合;且其轻链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少95%相同:SEQ ID NO.2,SEQ ID NO.4,SEQ ID NO.6,SEQ ID NO.8,SEQ ID NO.10,SEQ ID NO.12,SEQ ID NO.14,SEQ ID NO.16,SEQ ID NO.18,SEQ ID NO.20,SEQ ID NO.22,SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.26,SEQ ID NO.28,SEQ ID NO.30,SEQ ID NO.32,SEQ ID NO.34,SEQ ID NO.36,及其组合;

[0009] 其中,所述全人抗体Fab片段的重链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少95%相同:SEQ ID NO.1,SEQ ID NO.3,SEQ ID NO.5,SEQ ID NO.7,SEQ ID NO.9,SEQ ID NO.11,SEQ ID NO.13,SEQ ID NO.15,SEQ ID NO.17,SEQ ID NO.19,SEQ ID NO.21,SEQ ID NO.23,SEQ ID NO.25,SEQ ID NO.27,SEQ ID NO.29,SEQ ID NO.31,SEQ ID NO.33,SEQ ID NO.35,SEQ ID NO.37,SEQ ID NO.38,SEQ ID NO.39,SEQ ID NO.40,SEQ ID NO.41,SEQ ID

NO.42,SEQ ID NO.43,SEQ ID NO.44,及其组合;且其轻链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少95%相同:SEQ ID NO.2,SEQ ID NO.4,SEQ ID NO.6,SEQ ID NO.8,SEQ ID NO.10,SEQ ID NO.12,SEQ ID NO.14,SEQ ID NO.16,SEQ ID NO.18,SEQ ID NO.20,SEQ ID NO.22,SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.26,SEQ ID NO.28,SEQ ID NO.30,SEQ ID NO.32,SEQ ID NO.34,SEQ ID NO.36,及其组合;以及

[0010] 其中,所述单链人抗体的重链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少95%相同:SEQ ID NO.1,SEQ ID NO.3,SEQ ID NO.5,SEQ ID NO.7,SEQ ID NO.9,SEQ ID NO.11,SEQ ID NO.13,SEQ ID NO.15,SEQ ID NO.17,SEQ ID NO.19,SEQ ID NO.21,SEQ ID NO.23,SEQ ID NO.25,SEQ ID NO.27,SEQ ID NO.29,SEQ ID NO.31,SEQ ID NO.33,SEQ ID NO.35,SEQ ID NO.37,SEQ ID NO.38,SEQ ID NO.39,SEQ ID NO.40,SEQ ID NO.41,SEQ ID NO.42,SEQ ID NO.43,SEQ ID NO.44,及其组合;且其轻链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少95%相同:SEQ ID NO.2,SEQ ID NO.4,SEQ ID NO.6,SEQ ID NO.8,SEQ ID NO.10,SEQ ID NO.12,SEQ ID NO.14,SEQ ID NO.16,SEQ ID NO.18,SEQ ID NO.20,SEQ ID NO.22,SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.26,SEQ ID NO.28,SEQ ID NO.30,SEQ ID NO.32,SEQ ID NO.34,SEQ ID NO.36,及其组合。

[0011] 优选地,所述全人抗体具有重链和轻链,其中所述抗体的重链/轻链可变域序列选自以下序列:SEQ ID NO.1/SEQ ID NO.2(本文称为GA1),SEQ ID NO.3/SEQ ID NO.4(本文称为GA2),SEQ ID NO.5/SEQ ID NO.6(本文称为GB1),SEQ ID NO.7/SEQ ID NO.8(本文称为GB6),SEQ ID NO.9/SEQ ID NO.10(本文称为GH1),SEQ ID NO.11/SEQ ID NO.12(本文称为A2),SEQ ID NO.13/SEQ ID NO.14(本文称为C7),SEQ ID NO.15/SEQ ID NO.16(本文称为H7),SEQ ID NO.17/SEQ ID NO.18(本文称为SH-A4),SEQ ID NO.19/SEQ ID NO.20(本文称为SH-A9),SEQ ID NO.21/SEQ ID NO.22(本文称为RG1B3),SEQ ID NO.23/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10),SEQ ID NO.25/SEQ ID NO.26(本文称为RG1H11),SEQ ID NO.27/SEQ ID NO.28(本文称为RG2H7),SEQ ID NO.29/SEQ ID NO.30(本文称为RG2H10),SEQ ID NO.31/SEQ ID NO.32(本文称为RG3E12),SEQ ID NO.33/SEQ ID NO.34(本文称为RG4A6),SEQ ID NO.35/SEQ ID NO.36(本文称为RG5D9),SEQ ID NO.37/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10-H2A-22-15),SEQ ID NO.38/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10-H2A-27-25),SEQ ID NO.39/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10-3C),SEQ ID NO.40/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10-16C),SEQ ID NO.41/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10-17C),SEQ ID NO.42/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10-19C),SEQ ID NO.43/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10-21C),SEQ ID NO.44/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10-23C2),及其组合。优选地,所述全人抗体Fab片段具有重链和轻链,其中所述抗体的重链/轻链可变域序列选自以下序列:SEQ ID NO.1/SEQ ID NO.2(本文称为GA1),SEQ ID NO.3/SEQ ID NO.4(本文称为GA2),SEQ ID NO.5/SEQ ID NO.6(本文称为GB1),SEQ ID NO.7/SEQ ID NO.8(本文称为GB6),SEQ ID NO.9/SEQ ID NO.10(本文称为GH1),SEQ ID NO.11/SEQ ID NO.12(本文称为A2),SEQ ID NO.13/SEQ ID NO.14(本文称为C7),SEQ ID NO.15/SEQ ID NO.16(本文称为H7),SEQ ID NO.17/SEQ ID NO.18(本文称为SH-A4),SEQ ID NO.19/SEQ ID NO.20(本文称为SH-A9),SEQ ID NO.21/SEQ ID NO.22(本文称为RG1B3),SEQ ID NO.23/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10),SEQ ID NO.25/SEQ ID NO.26(本文称为RG1H11),SEQ ID NO.27/SEQ ID NO.28(本文称为RG2H7),

SEQ ID NO.29/SEQ ID NO.30(本文称为RG2H10),SEQ ID NO.31/SEQ ID NO.32(本文称为RG3E12),SEQ ID NO.33/SEQ ID NO.34(本文称为RG4A6),SEQ ID NO.35/SEQ ID NO.36(本文称为RG5D9),SEQ ID NO.37/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10-H2A-22-15),SEQ ID NO.38/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10-H2A-27-25),SEQ ID NO.39/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10-3C),SEQ ID NO.40/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10-16C),SEQ ID NO.41/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10-17C),SEQ ID NO.42/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10-19C),SEQ ID NO.43/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10-21C),SEQ ID NO.44/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10-23C2),及其组合。优选地,所述全人单链抗体具有重链可变域和轻链可变域,其中所述单链全人抗体的重链/轻链可变域序列选自下列序列:SEQ ID NO.1/SEQ ID NO.2,SEQ ID NO.3/SEQ ID NO.4,SEQ ID NO.5/SEQ ID NO.6,SEQ ID NO.7/SEQ ID NO.8,SEQ ID NO.9/SEQ ID NO.10,SEQ ID NO.11/SEQ ID NO.12,SEQ ID NO.13/SEQ ID NO.14,SEQ ID NO.15/SEQ ID NO.16,SEQ ID NO.17/SEQ ID NO.18,SEQ ID NO.19/SEQ ID NO.20,SEQ ID NO.21/SEQ ID NO.22,SEQ ID NO.23/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.25/SEQ ID NO.26,SEQ ID NO.27/SEQ ID NO.28,SEQ ID NO.29/SEQ ID NO.30,SEQ ID NO.31/SEQ ID NO.32,SEQ ID NO.33/SEQ ID NO.34,SEQ ID NO.35/SEQ ID NO.36,SEQ ID NO.37/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.38/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.39/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.40/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.41/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.42/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.43/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.44/SEQ ID NO.24及其组合。

[0012] 优选地,待治疗的哺乳动物癌症的广谱的癌症选自卵巢癌,结肠癌,乳腺癌,肺癌,淋巴瘤,成神经细胞衍生的CNS肿瘤,单核细胞白血病,B细胞衍生白血病,T细胞衍生白血病,B细胞衍生淋巴瘤,T细胞衍生淋巴瘤,肥大细胞衍生肿瘤,及其组合。优选地,所述自身免疫性疾病或炎性疾病选自肠道粘膜炎症,与结肠炎相关的消耗症,多发性硬化症,全身性红斑狼疮,病毒感染,类风湿关节炎,骨关节炎,牛皮癣,克罗恩病和炎症性肠病。

## 附图说明

[0013] 图1所示为,使用混合淋巴细胞反应(MLR)来评估抗体RG1H10(SEQ ID NO.23/SEQ ID NO.24)通过抗PD-1对淋巴细胞效应细胞的淋巴细胞活性的作用。在存在或不存在抗PD-1人单克隆抗体的情形下,测量T细胞活化。

[0014] 图2所示为,使用混合淋巴细胞反应(MLR)来评估抗体RG1H10对淋巴细胞效应细胞的淋巴细胞活性的作用。在存在或不存在抗PD-1人单克隆抗体的情形下,测量IL-2分泌。纵坐标为IFN  $\gamma$ ,单位为pg/ml。

[0015] 图3所示为,使用混合淋巴细胞反应(MLR)来评估通过所列举的抗PD-1抗体RG1H10阻断PD-L1/PD-1通路对淋巴细胞效应细胞的作用。在存在或不存在抗PD-1人单克隆抗体的情形下,测IFN  $\gamma$ 分泌。纵坐标为IL-2,单位为pg/ml。

[0016] 图4所示为抗PD-1抗体与CHO-PD-1细胞的剂量依赖性结合。

[0017] 图5所示为重组PD-1与重组PD-L1的结合如何被抗PD-1抗体所抑制。

[0018] 图6所示为,抗PD-1抗体RG1H10与重组PD-1蛋白如何特异结合。

[0019] 图7所示为,使用混合淋巴细胞反应(MLR)来评估抗体RG1H10(SEQ ID NO.23/SEQ ID NO.24)作为IgG1或IgG4(S228P)通过抗PD-1对淋巴效应细胞的淋巴细胞活性的作用。在

存在或不存在抗PD-1人单克隆抗体的情形下,将T细胞活化测量为白细胞介素-2(IL-2)受体(CD25)的表达增量。

[0020] 图8所示为,使用混合淋巴细胞反应(MLR)来评估抗体RG1H10作为IgG1或IgG4(S228P)对淋巴细胞活性的作用。在存在或不存在抗PD-1人单克隆抗体的情形下,测量(IL-2)的分泌。

[0021] 图9所示为,使用混合淋巴细胞反应(MLR)来评估通过所列举的抗体RG1H10(SEQ ID NO.23/SEQ ID NO.24)作为IgG1或IgG4(S228P)阻断PD-L1/PD-1通路对淋巴效应细胞上的作用。在存在或不存在抗PD-1人单克隆抗体的情形下,将T细胞活化测量为白细胞介素-2(IL-2)受体(CD25)的表达增量。

[0022] 图10所示为本申请所公开的人或鼠抗PD-1抗体之间的交叉反应性的存在或不存在。

### 具体实施方式

[0023] 本发明提供一种与PD-1表位结合且结合亲和性 $10^{-6}$ M或以下的IgG类全人抗体,其重链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少95%相同:SEQ ID NO.1,SEQ ID NO.3,SEQ ID NO.5,SEQ ID NO.7,SEQ ID NO.9,SEQ ID NO.11,SEQ ID NO.13,SEQ ID NO.15,SEQ ID NO.17,SEQ ID NO.19,SEQ ID NO.21,SEQ ID NO.23,SEQ ID NO.25,SEQ ID NO.27,SEQ ID NO.29,SEQ ID NO.31,SEQ ID NO.33,SEQ ID NO.35,SEQ ID NO.37,SEQ ID NO.38,SEQ ID NO.39,SEQ ID NO.40,SEQ ID NO.41,SEQ ID NO.42,SEQ ID NO.43,SEQ ID NO.44,及其组合;其轻链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少95%相同:SEQ ID NO.2,SEQ ID NO.4,SEQ ID NO.6,SEQ ID NO.8,SEQ ID NO.10,SEQ ID NO.12,SEQ ID NO.14,SEQ ID NO.16,SEQ ID NO.18,SEQ ID NO.20,SEQ ID NO.22,SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.26,SEQ ID NO.28,SEQ ID NO.30,SEQ ID NO.32,SEQ ID NO.34,SEQ ID NO.36,及其组合。优选地,该全人抗体具有重链和轻链,其中该抗体的重链/轻链可变域序列选自下列序列:SEQ ID NO.1/SEQ ID NO.2(本文称为GA1),SEQ ID NO.3/SEQ ID NO.4(本文称为GA2),SEQ ID NO.5/SEQ ID NO.6(本文称为GB1),SEQ ID NO.7/SEQ ID NO.8(本文称为GB6),SEQ ID NO.9/SEQ ID NO.10(本文称为GH1),SEQ ID NO.11/SEQ ID NO.12(本文称为A2),SEQ ID NO.13/SEQ ID NO.14(本文称为C7),SEQ ID NO.15/SEQ ID NO.16(本文称为H7),SEQ ID NO.17/SEQ ID NO.18(本文称为SH-A4),SEQ ID NO.19/SEQ ID NO.20(本文称为SH-A9),SEQ ID NO.21/SEQ ID NO.22(本文称为RG1B3),SEQ ID NO.23/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10),SEQ ID NO.25/SEQ ID NO.26(本文称为RG1H11),SEQ ID NO.27/SEQ ID NO.28(本文称为RG2H7),SEQ ID NO.29/SEQ ID NO.30(本文称为RG2H10),SEQ ID NO.31/SEQ ID NO.32(本文称为RG3E12),SEQ ID NO.33/SEQ ID NO.34(本文称为RG4A6),SEQ ID NO.35/SEQ ID NO.36(本文称为RG5D9),SEQ ID NO.37/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10-H2A-22-15),SEQ ID NO.38/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10-H2A-27-25),SEQ ID NO.39/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10-3C),SEQ ID NO.40/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10-16C),SEQ ID NO.41/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10-17C),SEQ ID NO.42/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10-19C),SEQ ID NO.43/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10-21C),SEQ ID NO.44/SEQ ID NO.24(本文称为RG1H10-23C2),及其组合。

[0024] 本发明提供一个Fab全人抗体片段,其具有来自重链的可变域和来自轻链的可变域,其中,重链可变域序列与选自下列的氨基酸序列及至少95%相同:SEQ ID NO.1,SEQ ID NO.3,SEQ ID NO.5,SEQ ID NO.7,SEQ ID NO.9,SEQ ID NO.11,SEQ ID NO.13,SEQ ID NO.15,SEQ ID NO.17,SEQ ID NO.19,SEQ ID NO.21,SEQ ID NO.23,SEQ ID NO.25,SEQ ID NO.27,SEQ ID NO.29,SEQ ID NO.31,SEQ ID NO.33,SEQ ID NO.35,SEQ ID NO.37,SEQ ID NO.38,SEQ ID NO.39,SEQ ID NO.40,SEQ ID NO.41,SEQ ID NO.42,SEQ ID NO.43,SEQ ID NO.44,及其组合;且其轻链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少95%相同:SEQ ID NO.2,SEQ ID NO.4,SEQ ID NO.6,SEQ ID NO.8,SEQ ID NO.10,SEQ ID NO.12,SEQ ID NO.14,SEQ ID NO.16,SEQ ID NO.18,SEQ ID NO.20,SEQ ID NO.22,SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.26,SEQ ID NO.28,SEQ ID NO.30,SEQ ID NO.32,SEQ ID NO.34,SEQ ID NO.36,及其组合;优选地,该全人抗体Fab片段具有重链可变域和轻链可变域,其中该抗体的重链/轻链可变域序列选自下列序列:SEQ ID NO.1/SEQ ID NO.2,SEQ ID NO.3/SEQ ID NO.4,SEQ ID NO.5/SEQ ID NO.6,SEQ ID NO.7/SEQ ID NO.8,SEQ ID NO.9/SEQ ID NO.10,SEQ ID NO.11/SEQ ID NO.12,SEQ ID NO.13/SEQ ID NO.14,SEQ ID NO.15/SEQ ID NO.16,SEQ ID NO.17/SEQ ID NO.18,SEQ ID NO.19/SEQ ID NO.20,SEQ ID NO.21/SEQ ID NO.22,SEQ ID NO.23/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.25/SEQ ID NO.26,SEQ ID NO.27/SEQ ID NO.28,SEQ ID NO.29/SEQ ID NO.30,SEQ ID NO.31/SEQ ID NO.32,SEQ ID NO.33/SEQ ID NO.34,SEQ ID NO.35/SEQ ID NO.36,SEQ ID NO.37/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.38/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.39/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.41/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.42/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.43/SEQ ID NO.24,及其组合。

[0025] 本发明提供一个单链人抗体,其具有来自重链的可变域、来自轻链的可变域、连接重链和轻链可变域的连接肽,其中,重链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少95%相同:SEQ ID NO.1,SEQ ID NO.3,SEQ ID NO.5,SEQ ID NO.7,SEQ ID NO.9,SEQ ID NO.11,SEQ ID NO.13,SEQ ID NO.15,SEQ ID NO.17,SEQ ID NO.19,SEQ ID NO.21,SEQ ID NO.23,SEQ ID NO.25,SEQ ID NO.27,SEQ ID NO.29,SEQ ID NO.31,SEQ ID NO.33,SEQ ID NO.35,SEQ ID NO.37,SEQ ID NO.38,SEQ ID NO.39,SEQ ID NO.40,SEQ ID NO.41,SEQ ID NO.42,SEQ ID NO.43,SEQ ID NO.44,及其组合;其轻链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少95%相同:SEQ ID NO.2,SEQ ID NO.4,SEQ ID NO.6,SEQ ID NO.8,SEQ ID NO.10,SEQ ID NO.12,SEQ ID NO.14,SEQ ID NO.16,SEQ ID NO.18,SEQ ID NO.20,SEQ ID NO.22,SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.26,SEQ ID NO.28,SEQ ID NO.30,SEQ ID NO.32,SEQ ID NO.34,SEQ ID NO.36,及其组合。优选地,该全人单链抗体具有重链可变域和轻链可变域,其中该抗单链全人抗体的重链/轻链可变域序列选自下列序列:SEQ ID NO.1/SEQ ID NO.2,SEQ ID NO.3/SEQ ID NO.4,SEQ ID NO.5/SEQ ID NO.6,SEQ ID NO.7/SEQ ID NO.8,SEQ ID NO.9/SEQ ID NO.10,SEQ ID NO.11/SEQ ID NO.12,SEQ ID NO.13/SEQ ID NO.14,SEQ ID NO.15/SEQ ID NO.16,SEQ ID NO.17/SEQ ID NO.18,SEQ ID NO.19/SEQ ID NO.20,SEQ ID NO.21/SEQ ID NO.22,SEQ ID NO.23/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.25/SEQ ID NO.26,SEQ ID NO.27/SEQ ID NO.28,SEQ ID NO.29/SEQ ID NO.30,SEQ ID NO.31/SEQ ID NO.32,SEQ ID NO.33/SEQ ID NO.34,SEQ ID NO.35/SEQ ID NO.36,SEQ ID NO.37/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.38/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.39/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.41/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.42/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.43/SEQ ID NO.24,及其组合。

NO.24,SEQ ID NO.43/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.44/SEQ ID NO.24,及其组合。

[0026] 本发明进一步提供一种治疗广谱哺乳动物癌症或炎性疾病或自免疫疾病的方法,包括以抗PD-1多肽的有效剂量给药,其中所述抗PD-1多肽选自:一种与PD-1表位结合且结合亲和性为至少 $10^{-6}$ M的IgG类全人抗体、具有重链可变域和轻链可变域的Fab全人抗体片段、具有来自重链的可变域和来自轻链的可变域以及连接所述轻链和重链可变域的连接肽的单链人抗体,及其组合;

[0027] 其中,所述全人抗体的重链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少95%相同:SEQ ID NO.1,SEQ ID NO.3,SEQ ID NO.5,SEQ ID NO.7,SEQ ID NO.9,SEQ ID NO.11,SEQ ID NO.13,SEQ ID NO.15,SEQ ID NO.17,SEQ ID NO.19,SEQ ID NO.21,SEQ ID NO.23,SEQ ID NO.25,SEQ ID NO.27,SEQ ID NO.29,SEQ ID NO.31,SEQ ID NO.33,SEQ ID NO.35,SEQ ID NO.37,SEQ ID NO.38,SEQ ID NO.39,SEQ ID NO.40,SEQ ID NO.41,SEQ ID NO.42,SEQ ID NO.43,SEQ ID NO.44,及其组合;且其轻链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少95%相同:SEQ ID NO.2,SEQ ID NO.4,SEQ ID NO.6,SEQ ID NO.8,SEQ ID NO.10,SEQ ID NO.12,SEQ ID NO.14,SEQ ID NO.16,SEQ ID NO.18,SEQ ID NO.20,SEQ ID NO.22,SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.26,SEQ ID NO.28,SEQ ID NO.30,SEQ ID NO.32,SEQ ID NO.34,SEQ ID NO.36,及其组合;

[0028] 其中,所述全人抗体Fab片段的重链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少95%相同:SEQ ID NO.1,SEQ ID NO.3,SEQ ID NO.5,SEQ ID NO.7,SEQ ID NO.9,SEQ ID NO.11,SEQ ID NO.13,SEQ ID NO.15,SEQ ID NO.17,SEQ ID NO.19,SEQ ID NO.21,SEQ ID NO.23,SEQ ID NO.25,SEQ ID NO.27,SEQ ID NO.29,SEQ ID NO.31,SEQ ID NO.33,SEQ ID NO.35,SEQ ID NO.37,SEQ ID NO.38,SEQ ID NO.39,SEQ ID NO.40,SEQ ID NO.41,SEQ ID NO.42,SEQ ID NO.43,SEQ ID NO.44,及其组合;且其轻链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少95%相同:SEQ ID NO.2,SEQ ID NO.4,SEQ ID NO.6,SEQ ID NO.8,SEQ ID NO.10,SEQ ID NO.12,SEQ ID NO.14,SEQ ID NO.16,SEQ ID NO.18,SEQ ID NO.20,SEQ ID NO.22,SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.26,SEQ ID NO.28,SEQ ID NO.30,SEQ ID NO.32,SEQ ID NO.34,SEQ ID NO.36,及其组合;以及

[0029] 其中,所述单链人抗体的重链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少95%相同:SEQ ID NO.1,SEQ ID NO.3,SEQ ID NO.5,SEQ ID NO.7,SEQ ID NO.9,SEQ ID NO.11,SEQ ID NO.13,SEQ ID NO.15,SEQ ID NO.17,SEQ ID NO.19,SEQ ID NO.21,SEQ ID NO.23,SEQ ID NO.25,SEQ ID NO.27,SEQ ID NO.29,SEQ ID NO.31,SEQ ID NO.33,SEQ ID NO.35,SEQ ID NO.37,SEQ ID NO.38,SEQ ID NO.39,SEQ ID NO.40,SEQ ID NO.41,SEQ ID NO.42,SEQ ID NO.43,SEQ ID NO.44,及其组合;且其轻链可变域序列与选自下列的氨基酸序列至少95%相同:SEQ ID NO.2,SEQ ID NO.4,SEQ ID NO.6,SEQ ID NO.8,SEQ ID NO.10,SEQ ID NO.12,SEQ ID NO.14,SEQ ID NO.16,SEQ ID NO.18,SEQ ID NO.20,SEQ ID NO.22,SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.26,SEQ ID NO.28,SEQ ID NO.30,SEQ ID NO.32,SEQ ID NO.34,SEQ ID NO.36,及其组合。

[0030] 优选地,所述全人抗体具有重链和轻链,其中所述抗体的重链/轻链可变域序列选自以下序列:SEQ ID NO.1/SEQ ID NO.2,SEQ ID NO.3/SEQ ID NO.4,SEQ ID NO.5/SEQ ID NO.6,SEQ ID NO.7/SEQ ID NO.8,SEQ ID NO.9/SEQ ID NO.10,SEQ ID NO.11/SEQ ID

NO.12,SEQ ID NO.13/SEQ ID NO.14,SEQ ID NO.15/SEQ ID NO.16,SEQ ID NO.17/SEQ ID NO.18,SEQ ID NO.19/SEQ ID NO.20,SEQ ID NO.21/SEQ ID NO.22,SEQ ID NO.23/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.25/SEQ ID NO.26,SEQ ID NO.27/SEQ ID NO.28,SEQ ID NO.29/SEQ ID NO.30,SEQ ID NO.31/SEQ ID NO.32,SEQ ID NO.33/SEQ ID NO.34,SEQ ID NO.35/SEQ ID NO.36,SEQ ID NO.37/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.38/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.39/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.40/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.41/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.42/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.43/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.44/SEQ ID NO.24,及其组合。优选地,所述全人抗体Fab片段具有重链和轻链,其中所述抗体的重链/轻链可变域序列选自以下序列:SEQ ID NO.1/SEQ ID NO.2,SEQ ID NO.3/SEQ ID NO.4,SEQ ID NO.5/SEQ ID NO.6,SEQ ID NO.7/SEQ ID NO.8,SEQ ID NO.9/SEQ ID NO.10,SEQ ID NO.11/SEQ ID NO.12,SEQ ID NO.13/SEQ ID NO.14,SEQ ID NO.15/SEQ ID NO.16,SEQ ID NO.17/SEQ ID NO.18,SEQ ID NO.19/SEQ ID NO.20,SEQ ID NO.21/SEQ ID NO.22,SEQ ID NO.23/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.25/SEQ ID NO.26,SEQ ID NO.27/SEQ ID NO.28,SEQ ID NO.29/SEQ ID NO.30,SEQ ID NO.31/SEQ ID NO.32,SEQ ID NO.33/SEQ ID NO.34,SEQ ID NO.35/SEQ ID NO.36,SEQ ID NO.37/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.38/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.39/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.40/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.41/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.42/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.43/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.44/SEQ ID NO.24,及其组合。优选地,所述全人单链抗体具有重链可变域和轻链可变域,其中所述单链全人抗体的重链/轻链可变域序列选自下列序列:SEQ ID NO.1/SEQ ID NO.2,SEQ ID NO.3/SEQ ID NO.4,SEQ ID NO.5/SEQ ID NO.6,SEQ ID NO.7/SEQ ID NO.8,SEQ ID NO.9/SEQ ID NO.10,SEQ ID NO.11/SEQ ID NO.12,SEQ ID NO.13/SEQ ID NO.14,SEQ ID NO.15/SEQ ID NO.16,SEQ ID NO.17/SEQ ID NO.18,SEQ ID NO.19/SEQ ID NO.20,SEQ ID NO.21/SEQ ID NO.22,SEQ ID NO.23/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.25/SEQ ID NO.26,SEQ ID NO.27/SEQ ID NO.28,SEQ ID NO.29/SEQ ID NO.30,SEQ ID NO.31/SEQ ID NO.32,SEQ ID NO.33/SEQ ID NO.34,SEQ ID NO.35/SEQ ID NO.36,SEQ ID NO.37/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.38/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.39/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.40/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.41/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.42/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.43/SEQ ID NO.24,SEQ ID NO.44/SEQ ID NO.24及其组合。

[0031] 优选地,待治疗的哺乳动物癌症的广谱的癌症卵巢癌,结肠癌,乳腺癌,肺癌,淋巴瘤,成神经细胞衍生的CNS肿瘤,单核细胞白血病,B细胞衍生白血病,T细胞衍生白血病,B细胞衍生淋巴瘤,T细胞衍生淋巴瘤,肥大细胞衍生肿瘤,及其组合。优选地,所述自身免疫性疾病或炎性疾病选自肠道粘膜炎症,与结肠炎相关的消耗症,多发性硬化症,全身性红斑狼疮,病毒感染,类风湿关节炎,骨关节炎,牛皮癣,克罗恩病和炎症性肠病。

[0032] “抗原结合蛋白”是包括以下部分的蛋白:与抗原结合的部分;以及可选地,允许抗原结合部分采取促进抗原结合蛋白与蛋白的结合的构型的支架或骨架部分。抗原结合蛋白的例子包括抗体、抗体片段(例如,抗体的抗原结合部分)、抗体衍生物和抗体类似物。该抗原结合蛋白可以包括,例如,具有接枝的CDRs或CDRs衍生物的替代蛋白支架或人工支架。所述支架包括但不限于,包含引入了突变(例如用于稳定该抗原结合蛋白的三维结构的突变)的抗体衍生支架,以及包括例如生物可相容聚合物的全合成支架。例如参见:Korndorfer

et al., 2003, Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, Volume 53, Issue 1: 121-129; Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20: 639-654。此外,可以使用多肽抗体模拟物("PAMs"),以及基于以纤维蛋白连接素成分为支架的抗体模拟物的支架。

[0033] 抗原结合蛋白可以具有,例如,天然存在的免疫球蛋白的结构。“免疫球蛋白”是四聚物分子。在天然存在的球蛋白中,每个四聚物由2对相同的多肽链组成,每对中有一条“轻”链(约25kDa)和一条“重”链(约50-70kDa)。每条链的氨基末端部分包括约100-110或以上氨基酸的可变区,主要负责抗原识别。每条链的羧基末端部分具有恒定区,主要负责效应子功能。人轻链归类为 $\kappa$ (kappa)或 $\lambda$ (lambda)轻链;重链归类为 $\mu$ (mu)、 $\Delta$ (delta)、 $\gamma$ (gamma)、 $\alpha$ (alpha)或 $\epsilon$ (epsilon),分别令抗体的种型定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。在轻链和重链中,可变区和恒定区由约12个或以上氨基酸的“J”区连接,其中重链还包括一个含约10个或以上氨基酸的“D”区。一般请参见Fundamental Immunology Ch. 7 (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (在此为通用目的以引用方式全文引入)。每对轻/重链的可变域组成了抗体结合位点,因此一个完整的免疫球蛋白具有2个结合位点。

[0034] 天然存在的免疫球蛋白链具有的相同通用结构为相对保守骨架区(FR)连接3个高变区(也称为互补决定区或CDRs)。从N-端到C-端,轻链和重链均包含以下域:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。每个域中的氨基酸分配与Kabat et al.在Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5<sup>th</sup> Ed., US Dept. of Health and Human Services, PHS, NIH, NIH Publication no. 91-3242, 1991中所述一致。其他的免疫球蛋白链氨基酸编号系统包括IMGT.RTM. (国际免疫遗传学信息系统 (International ImMunoGeneTics information system); Lefranc et al., Dev. Comp. Immunol. 29: 185-203; 2005) 和AHo (Honegger and Pluckthun, J. Mol. Biol. 309 (3): 657-670; 2001)。

[0035] 抗体可以从含多样化抗原特异性免疫球蛋白的血清或血浆等来源制得。如果此类抗体进行亲和纯化,则能够针对特定抗原特异性进行富集强化。所述抗体富集制剂通常由低于约10%的针对特定抗原具有特定结合活性的抗体组成。将这些制剂经过几轮亲和纯化,能够增加针对抗原具有特定结合活性的抗体的比例。以此方式制备的抗体通常称为“单特异性”。单特异性抗体制剂可以由约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%或99.9%的针对特定抗原具有特定结合活性的抗体组成。

[0036] “抗体”指的是完整免疫球蛋白或其能与完整抗体为特异结合而竞争的抗原结合部分,除非另有说明。抗原结合部分可以由重组DNA技术或完整抗体的酶切或化学裂解法制备。抗原结合部分包括但不限于:Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv、域抗体(dAbs),以及互补决定区(CDR)片段、单链抗体(scFv)、嵌合抗体、二聚体、三聚体、四聚体和至少包含足以令特定抗原与多肽结合的免疫球蛋白部分的多肽。

[0037] Fab片段是具有V<sub>L</sub>、V<sub>H</sub>、C<sub>L</sub>和C<sub>H1</sub>域的单价片段;F(ab')<sub>2</sub>片段是具有2个Fab片段的二价片段,其Fab片段在铰链区处由二硫键连接;Fv片段具有抗体单臂的V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>域;dAb片段具有V<sub>H</sub>域、V<sub>L</sub>域或具有V<sub>H</sub>域或V<sub>L</sub>域的抗原结合片段(美国专利6846634、6696245;美国专利申请2002/02512;2004/0202995;2004/0038291;2004/0009507;20 03/0039958;以及Ward et al., Nature 341:544-546, 1989)。

[0038] 单链抗体(scFv)是一种抗体,其中V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>域由连接子(例如,氨基酸残基合成序列)连接以形成连续蛋白链,且该连接子的长度足以允许该蛋白链自身折叠并形成单价抗原结

合位点(例如参见Bird et al., 1988, *Science* 242:423-26 and Huston et al., 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-83)。二聚体是含有两条多肽链的二价抗体,其中每条多肽链包括由连接子连接的V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>域,且该连接子长度短,不允许同一条链上的两个域之间配对,由此每个域能够与另一条多肽链上的互补域配对(例如参见Holliger et al., 1993, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-48, and Poljak et al., 1994, *Structure* 2:1121-23)。若二聚体的2条多肽链相同,则其配对所得的二聚体将具有2个相同的抗原决定位点。具有不同序列的多肽链可用于形成具有2个不同抗原结合位点的二聚体。类似地,三聚体和四聚体分别是含有3个或4个多肽链并分别形成3个或4个抗原结合位点(可以相同或不同)的抗体。

[0039] 可以使用Kabat et al. *supra*; Lefranc et al., *supra* 和/或 Honegger and Pluckthun, *supra* 所描述的体系, 来识别特定抗体的互补决定区 (CDRs) 和骨架区 (FR)。一个分子中可以共价或非共价地包含一个或多个CDRs, 来使其成为抗原结合蛋白。抗原结合蛋白可以并入作为较大多肽链的一部分的CDR(s), 可以将该CDR(s) 共价连接另一个多肽链, 或可以非共价地连接该CDR(s)。所述CDRs允许该抗原结合蛋白与所需的特定抗原进行特异结合。

[0040] 抗原结合蛋白可以具有一个或多个结合位点。若有超过一个结合位点, 这些结合位点可以相同或不同。例如, 天然存在的人免疫球蛋白典型地具有2个相同结合位点, 而“双特异”或“双官能团”抗体则具有2个不同结合位点。

[0041] 术语“人抗体”包括具有源于人免疫球蛋白序列的一个或多个可变域和恒定域的所有抗体。在一个实施例中,所有的可变域和恒定域均源自人免疫球蛋白序列(全人抗体)。这些抗体可以从多种途径制备,下文对此进行了举例,包括通过与小鼠的目标抗原的免疫反应,其中小鼠经过基因改造以表达源自人重链和/或轻链编码基因的抗体。

[0042] 人源化抗体的序列不同于源自非人物种的抗体序列,其差别在于一个或多个氨基酸的取代、删除和/或添加,由此令该人源化抗体在对人类对象给药时,引起免疫反应的可能性低于非人物种抗体,和/或引起的免疫反应严重性降低。在一个实施例中,非人物种抗体的重链和/或轻链的骨架和恒定区中的某些氨基酸突变,以产生人源化抗体。在另一个实施例中,人抗体的恒定区融合至非人物种的可变域。在另一个实施例中,非人抗体的一个或多个CDR序列中的一个或多个氨基酸残基改变,以降低该非人抗体向人类对象给药时的可能的免疫原性,其中改变的氨基酸残基要么对于该抗体与其抗原的免疫特异结合来说并不重要,或该氨基酸序列的改变是保守变化,由此该人源化抗体与抗原的结合并不显著差于该非人抗体与抗原的结合。如何制备人源化抗体的示例可以参见美国专利6054297; 5886152和5877293。

[0043] 术语“嵌合抗体”指的是含有来自一个抗体的一个或多个区和来自一个或其他抗体的一个或多个区的抗体。在一个实施例中,一个或多个CDRs源自人抗PD-1抗体。在另一个实施例中,所有CDRs都源自人抗PD-1抗体。在另一个实施例中,源自多个人抗PD-1抗体的CDRs混合搭配在嵌合抗体中。例如,嵌合抗体可以包括来自第一个人抗PD-1抗体的轻链的CDR1、来自第二个人抗PD-1抗体的轻链的CDR2和CDR3,以及来自第三个抗PD-1抗体的重链的CDRs。其他组合也是可能的。

[0044] 此外,骨架区可以来自相同的抗PD-1抗体之一,一个或多个不同抗体(例如人抗

体),或来自人源化抗体。在一个嵌合抗体的实施例中,其重链和/或轻链的局部等同于、同源于或来源于:特定物种的抗体,或类属于特定抗体类型或亚类的抗体;且所述链的剩余部分等同于、同源于或来源于:另一个特定物种的抗体,或类属于另一个特定抗体类型或亚类的抗体。还包括所述抗体具有所需生物活性的片段(即,能够特异性结合PD-1的能力)。

[0045] “中和抗体”或“抑制抗体”是当过量抗PD-1抗体令活化量降低至少约20% (使用如本文实施例中所述的化验) 时,对PD-1的蛋白水解活化进行抑制的抗体。在各实施例中,抗原结合蛋白将PD-1的蛋白水解活化量降低至少30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、97%、99%和99.9%。

[0046] 本领域技术人员根据本说明书的教导并使用本领域熟知的技术,能够容易地制备抗体片段或类似物。片段或类似物的氨基末端和羧基末端优选为靠近功能域的边界。可以通过将核苷酸和/或氨基酸序列数据与公共或私人序列数据库,来识别结构域和功能域。可以使用计算机化的比较方法来识别存在于已知结构和/或功能的其他蛋白中的序列基序或预期蛋白构造域。用于识别折叠为已知三维结构的蛋白质序列的方法是已知的,参见Bowie et al., 1991, *Science* 253:164。

[0047] “CDR接枝抗体”是含有来自特定物种或种型抗体的一个或多个CDRs和来自相同或不同物种或种型的另一抗体的骨架的抗体。

[0048] “多特异抗体”是识别一种或多种抗原上的多个表位的抗体。此类型抗体的一个子类为“双特异抗体”,其识别相同或不同抗体上的两个不同表位。

[0049] 若抗原结合蛋白在结合抗原(例如人PD-1)时的解离常数为1nM或以下,则称其与抗原“特异结合”。

[0050] “抗原结合域”、“抗原结合区”或“抗原结合位点”是指抗原结合蛋白上含有与抗原相互作用的氨基酸残基(或其他化学部分)并有利于该抗原结合蛋白对该抗原的特异性和亲和性的部分。对于与其抗原特异结合的抗体而言,这包括其至少一个CDR域的至少一部分。

[0051] “表位”是分子上连接抗原结合蛋白(例如,抗体)的部分。表位可以包括该分子的非邻近部分(例如,在多肽中,在多肽一级序列中并不相邻但在该多肽的三级和四级结构中相互足够靠近以被抗原结合蛋白结合的氨基酸残基)。

[0052] 两个多核苷酸或两个多肽序列的“相同百分比”是用GAP电脑程序(GCG Wisconsin Package, version 10.3(Accelrys, San Diego, Calif.)中的一部分)以其默认参数来比较序列而确定的。

[0053] 术语“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸”在全文中可交换地使用,其包括DNA分子(例如cDNA或基因组DNA)、RNA基因组(例如mRNA)、以核苷酸类似物生成的DNA或RNA类似物(例如,肽核酸和非天然存在核苷酸类似物)及其杂合体。核酸分子可以是单链或双链的。在一个实施例中,本发明的核酸分子包括编码抗体或其片段、衍生物、突变蛋白或变体的连续开放阅读框。

[0054] 若两条单链多核苷酸的序列能够反向平行对齐,使得一条多核苷酸中的每个核苷酸都与另一条多核苷酸上的互补核苷酸相对,而不存在间隙,且各序列的5'端或3'端也没有不配对的核苷酸,则称这两条多核苷酸互为“互补链”。若两条多核苷酸可在中等严格条件下相互杂交,则称其“互补”。因此,一条多核苷酸可以在并非对方互补链的情况下与另一

条多核苷酸互补。

[0055] “载体”是一种可用于将另一条与之连接的核酸引入细胞的核酸。一种载体类型是“质粒”，即可供额外核酸片段连接的线形或环形双链DNA分子。另一种载体类型是病毒载体（例如复制缺陷反转录病毒、腺病毒和腺相关病毒），其中额外DNA片段可引入病毒基因组中。某些载体被引入宿主细胞后能够进行自主复制（例如，含有细菌复制起点的细菌载体和附加体哺乳类载体）。其他载体（例如，非附加体哺乳类载体）当引入宿主细胞时，整合入宿主细胞的基因组，由此随着宿主基因组进行复制。“表达载体”是一种能够进行指定多核苷酸表达的载体类型。

[0056] 当核苷酸序列所连接的调控序列影响该核苷酸序列的表达（例如表达水平、时机或位点）时，则称该核苷酸序列“可操作地”连接到该调控序列。“调控序列”是能够影响与之可操作地连接的核酸的表达（例如表达水平、时机或位点）的核酸。例如，调控序列可以直接对其所调控的核酸起作用，或通过一个或多个其他分子（例如与该调控序列和/或核酸结合的多肽）来起作用。调控序列的例子包括启动子、增强子和其他表达控制元件（例如，多腺苷酸化信号）。调控序列的更多示例记述在例如Goeddel, 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. 和Baron et al., 1995, Nucleic Acids Res. 23:3605-06. 中。

[0057] “宿主细胞”是可用于表达核酸（例如本发明的核酸）的细胞。宿主细胞可以是原核细胞，例如E.coli；或真核细胞，例如真核单细胞（如酵母菌或其他真菌）、植物细胞（例如，烟草或番茄植物细胞）、动物细胞（如人细胞、猴细胞、仓鼠细胞、小鼠细胞、大鼠细胞或昆虫细胞）或杂种细胞。宿主细胞的例子包括猴肾细胞COS-7系（ATCC CRL 1651）（参见Gluzman et al., 1981, Cell 23:175）、L细胞、C127细胞、3T3细胞（ATCC CCL 163）、中国仓鼠卵巢（CHO）细胞或其衍生物（例如Veggie CHO）和在无血清培养基上生长的相关细胞系（参见Rasmussen et al., 1998, Cytotechnology 28:31），或CHO的DX-B11品系（缺少DHFR）（参见Urlaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-20）、HeLa细胞、BHK（ATCC CRL 10）细胞系、源于非洲绿猴肾细胞系CV1的CV1/EBNA细胞系（ATCC CCL 70）（参见McMahan et al., 1991, EMBO J. 10:2821）、人胚肾细胞（例如293、293EBNA或MSR 293）、人表皮A431细胞、人Colo205细胞、其他转化灵长类细胞系、正常二倍体细胞、源于初生组织和初生外植体的体外培养所得的细胞系、HL-60、U937、HaK或Jurkat细胞。典型地，宿主细胞是能够以编码多肽且能够在该宿主细胞中表达的核酸转化或转染得到的培养细胞。术语“重组宿主细胞”可用于表示已经用需表达的核酸来转化或转染的宿主细胞。宿主细胞还可以是指包含该核酸，但在调控序列被引入该宿主细胞并与该核酸可操作连接以前，并不以所需表达水平来表达该核酸的细胞。应当理解，术语“宿主细胞”并不单指特定的对象细胞，而是也指所述细胞的后代或潜在后代。因为由于例如突变或环境影响的存在，后代中可能发生某些修饰，使得这些后代事实上与其亲代细胞并不等同，但其仍应属于本文中的“宿主细胞”术语所涵盖的范围。

[0058] 优选地，待治疗的哺乳动物癌症选自卵巢癌、结肠癌、乳腺癌或肝癌细胞系、骨髓瘤、成神经细胞性CNS肿瘤、单核细胞性白血病、B细胞性白血病、T细胞性白血病、B细胞性淋巴瘤、T细胞性淋巴瘤、肥大细胞性肿瘤，及其组合。

[0059] 可以使用本领域中已知的任何标准方法来制备本发明中的多肽。在一个实施例

中,使用重组DNA方法,通过将编码该多肽的核酸序列(例如cDNA)插入重组表达载体中,并在促进表达的条件下表达该DNA序列,从而制备所述多肽。

[0060] 编码此述多种多肽中任意一种的核酸均可以化学合成。可以选择密码子使用来促进细胞中的表达。苏搜狐密码子使用取决于所选用的细胞类型。针对E.coli和其他细菌,以及哺乳动物细胞、植物细胞、酵母菌细胞和昆虫细胞,开发了特定的密码子使用模式。例如参见Mayfield et al., Proc.Natl.Acad.Sci.USA.2003 100 (2) :438-42; Sinclair et al. Protein Expr.Purif.2002 (1) :96-105; Connell N D.Curr.Opin.Biotechnol.2001 12 (5) :446-9; Makrides et al. Microbiol.Rev.1996 60 (3) :512-38; 和Sharp et al. Yeast.1991 7 (7) :657-78。

[0061] 核酸操作的通用技术记载于例如Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Vols.1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2ed., 1989, 或 F.Ausubel et al., Current Protocols in Molecular Biology (Green Publishing and Wiley-Interscience: New York, 1987) 及其定期更新中,在此以引用方式并入。编码所述多肽的DNA可操作地连接在来自哺乳动物、病毒或昆虫基因的适宜转录元件或转录调控元件上。所述调控元件包括转录增强子、可选的用于控制转录的操作子序列、编码合适mRNA核糖体结合位点的序列、控制转录和翻译终止的序列。另外,还加入了在宿主中的复制能力(通常由复制起点赋予)和促进接合子识别的选择基因。

[0062] 所述重组DNA还可以包括可用于纯化该蛋白的任何类型蛋白标记序列。蛋白标记的示例包括但不限于组蛋白标记、FLAG标记、原癌基因标记、HA标记或GST标记。适用于细菌、真菌、酵母菌和哺乳动物细胞宿主的克隆和表达载体可以参见Cloning Vectors: A Laboratory Manual, (Elsevier, N.Y., 1985)。

[0063] 采取适用于宿主细胞的方法将该表达结构引入宿主细胞。本领域已知有各种用于将核酸引入宿主细胞的方法,包括但不限于:电穿孔;以氯化钙、氯化铷、磷酸钙、DEAE-葡聚糖(DEAE-dextran)或其他物质进行的转染;微弹轰击法(microprojectile bombardment);脂质转染;以及,感染(其中载体充当感染原)。适当的宿主细胞包括原核细胞、酵母菌、哺乳类细胞或细菌细胞。

[0064] 适当的细菌包括革兰氏阴性或革兰氏阳性生物,例如,E.coli或Bacillus spp.酵母菌,优选为Saccharomyces菌种(例如S.cerevisiae),也可以用于多肽制备。各种哺乳类或昆虫细胞培养体系也可用于表达重组蛋白。用于在昆虫细胞中制备外源蛋白的Baculovirus体系可参见综述:Luckow and Summers, (Bio/Technology, 6:47, 1988)。适当的哺乳类宿主细胞系的例子包括内皮细胞、COS-7猴肾细胞、CV-1、L细胞、C127、3T3、中国仓鼠卵巢(CHO)、人胚肾细胞、HeLa、293、293T和BHK细胞系。通过培养适当的宿主/载体体系来表达重组蛋白,以制备纯化多肽。在许多应用中,本文公开的众多肽的小尺寸使得在E.coli中表达成为优选表达方法。然后,从培养基或细胞提取物中纯化该蛋白。

[0065] 本文所公开的蛋白还可以使用细胞翻译体系来制备。为此,必须对编码该多肽的核酸进行修饰,以允许体外转录以产生mRNA并允许该mRNA在所用的特定无细胞体系(真核(例如哺乳类或酵母菌)无细胞翻译体系或原核(例如细菌)无细胞翻译体系)中进行无细胞翻译。

[0066] PD-1结合性多肽还可以通过化学合成来制备(例如,通过如Solid Phase Peptide

Synthesis, 2nd ed., 1984, The Pierce Chemical Co., Rockford, Ill. 中所述的方法)。还可以通过化学合成来产生对蛋白的修饰。

[0067] 本发明中的所述多肽可以通过蛋白化学领域众所周知的蛋白分离/纯化方法进行纯化。非限制性的例子包括:提取、重结晶、盐析(例如,硫酸铵或硫酸钠)、离心、渗析、超滤、吸附层析、离子交换层析、疏水层析、正相层析、反相层析、凝胶过滤、凝胶渗透层析、亲和层析、电泳、逆流分布或其任意组合。纯化后,多肽可以交换入不同缓冲液,和/或以本领域所知各种方法中的任一种(包括但不限于过滤和渗析)浓缩。

[0068] 纯化多肽优选为具有至少85%纯度,更优选的纯度为至少95%,最优选纯度为至少98%。无论该纯度的确切数值是多少,该多肽的纯度足以用作医药产品。

[0069] 多肽的翻译后修饰

[0070] 在一些实施例中,本发明的结合性多肽还可以包括翻译后修饰。示范性翻译后蛋白修饰包括磷酸化、乙酰化、甲基化、在一些实施例中,本发明的结合性多肽还可以包括翻译后修饰。示范性翻译后蛋白修饰包括磷酸化、乙酰化、甲基化、ADP-核糖基化、泛素化、糖基化、羰基化、类泛素化、生物素酰化或添加多肽侧链或疏水基。由此一来,修饰后的可溶性多肽可能含有非氨基酸成分,例如脂类、多糖或单糖、磷酸。糖基化的一种优选形式为唾液酸化,其将一个或多个唾液酸部分链接至所属多肽。唾液酸部分提高蛋白的可溶性及血清半排出期,同时还降低其可能的免疫原性。参见Raju et al. Biochemistry. 2001 31; 40 (30): 8868-76。可以测试所述非氨基酸元素对多肽的功能的影响在对抗PD-L1或PD-1功能中的作用,例如,其对血管生成或肿瘤生长的抑制作用。

[0071] 在一个特定实施例中,所述所述可溶性多肽的修饰形式包括将所述可溶性多肽链接至非蛋白质高分子。在一个特定实施例中,所述高分子为聚乙二醇(PEG)、聚丙醇或聚氧化烯烃,如美国专利4640835;4496689;4301144;4670417;4791192或4179337所述。修饰多肽的示例包括聚乙二醇化VK-B8。

[0072] PEG是可溶于水的聚合物,其市面有售,或可以根据本领域所熟知的方法(Sandler and Karo, Polymer Synthesis, Academic Press, New York, Vol. 3, pages 138-161)通过乙二醇的开环聚合反应制备而成。术语“PEG”用于广泛涵盖任何聚乙二醇分子,无论其大小或PEG末端的修饰为何,且可以用以下公式代表: $X-\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$ (1),其中n=20-2300且X为H或末端修饰(例如C<sub>1-4</sub>烷基)。在一个实施例中,本发明的PEG的一个末端以羟基或甲氧基结尾,即X为H或CH<sub>3</sub>(“甲氧基PEG”)。PEG还可以进一步包括:结合反应所必需的化学基团;源于该分子的化学合成的化学基团;或作为该分子的部分的最佳距离的间隔子的化学基团。此外,所述PEG可以由一个或多个连接在一起的PEG侧链组成。具有多个PEG链的PEGs称为多臂或分支PEGs。分支PEGs可以通过例如向各种多元醇(包括甘油、季戊四醇、山梨醇)添加聚氧化乙烯来制备。例如,可以从季戊四醇和环氧乙烷制备4臂分支PEG。分支PEG参见例如EP-A0473084和美国专利5932462所述。PEGs的一种形式包括两个通过赖氨酸的主要氨基链接的PEG侧链(PEG2) (Monfardini et al., Bioconjugate Chem. 6 (1995) 62-69)。

[0073] 虽然PEG是众所周知的,但据我们所知,这是首次展示聚乙二醇化<sup>10F</sup>n3多肽可以聚乙二醇化并保持配体结合活性。在一个优选实施例中,所述聚乙二醇化<sup>10F</sup>n3多肽由定点聚乙二醇化反应来制备,尤其是通过将PEG联结至N端或C端的半胱氨酸部分。相应地,本发明提供了具有改进的药代动力学性质的靶结合聚乙二醇化<sup>10F</sup>n3多肽,所述多肽包括:具有约

80至约150个氨基酸的<sup>10F</sup>n3结构域,其中所述<sup>10F</sup>n3结构域的环中的至少一个参与靶结合;和共价结合的PEG部分,其中所述<sup>10F</sup>n3多肽以小于100nM的K<sub>D</sub>与靶标结合,其在哺乳动物中的清除率小于30mL/hr/kg。该PEG部分可以通过定点聚乙二醇化与<sup>10F</sup>n3多肽链接,例如通过链接到Cys残基,其中该Cys残基可以位于该<sup>10F</sup>n3多肽的N端或位于N端和最N端的β或β状链之间或位于<sup>10F</sup>n3多肽的C端或位于C端和最C端的β或β状链指尖。Cys残基还可以位于其他位置,尤其是任何不参与靶结合的环。PEG部分还可以通过其他化学方法链接,包括与胺类链接。

[0074] PEG与多肽或蛋白的连接,一般涉及PEG的活化和活化后PEG中间体与靶蛋白/多肽的直接偶联,或与连接体偶联,从而将其活化并与靶蛋白/多肽偶联(参见Abuchowski et al., J.Biol.Chem., 252, 3571(1977) 和 J.Biol.Chem., 252, 3582(1977), Zalipsky, et al., and Harris et.al., in: Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications; (J.M.Harris ed.) Plenum Press: New York, 1992; Chap. 21 and 22)。注意,含有PEG分子的结合性多肽也称为缀合蛋白质,而缺乏PEG分子连接的蛋白则可称为未缀合。

[0075] 可以选择各种分子量形式的PEG(例如,约1000道尔顿(Da) - 100000Da (n=20 ~ 2300))来连接至PD-1结合性多肽。PEG中得重复单元数“n”是根据以道尔顿为单位的分子量的近似值。优选地,一个活化的连接子上的PEG的总分子量适合于医药用途。因此,在一个实施例中,所述PEG分子的分子量不超过100000Da。例如,若3个PEG分子连接在连接子上,而每个PEG分子具有相同的分子量(12000Da,每个n约为270),那么连接子上的PEG总分子量为约36000Da(总n为约820)。连接在连接子上的PEG分子量也可以不同,例如,在连接子上的3个PEG分子中,其中可以有2个各5000Da(每个n为约110)和1个12000Da(n为约270)的PEG分子。

[0076] 本发明的一个具体实施例中,PD-1结合性多肽共价连接在通式--CO--(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>--(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>--OR的一个聚(乙二醇)基团上,其中所述聚(乙二醇)基团的--CO(即羰基)与所述结合性多肽的一个氨基形成酰胺键;R为低烷基;x为2或3;m为约450-约950;且n和m的选择使得所述结合物减去结合性多肽的分子量为约10-40kDa。在一个实施例中,结合性多肽的赖氨酸的6-氨基为可用(自由)氨基。

[0077] 上述结合物可以更具体地由通式(II)表示:P--NHCO--(CH<sub>2</sub>)<sub>x</sub>--(OCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>)<sub>m</sub>--OR(II),其中P为如本文所述的结合性多肽的基团(即:不含能够与通式(II)所示羰基形成酰胺的一个或多个氨基);且其中R为低级烷基;x为2或3;m为约450至约950,且其选择在于使得缀合物分子量减去结合性多肽分子量的差值为约10-40Da。本文中所称的“m”的指定范围具有定向含义。在任何情况下,“m”的确切范围由PEG基团的分子量决定。

[0078] 本领域技术人员可以选择适当分子量的PEG,例如,根据聚乙二醇化结合性多肽的医疗用途、所需剂量、循环时间、抗蛋白水解性、免疫原性和其他考量来选择。关于PEG及其在增强蛋白性质方面的用途的讨论,参见Katre, Advanced Drug Delivery Reviews 10: 91-114(1993)。

[0079] 在一个实施例中,可以活化PEG分子来与结合多肽上的氨基酸基团反应,例如赖氨酸(Bencham et al., Anal.Biochem., 131, 25 (1983); Veronese et al., Appl.Biochem., 11, 141 (1985).; Zalipsky et al., Polymeric Drugs and Drug Delivery Systems, adrs 9-110ACS Symposium Series 469 (1999); Zalipsky et al., Europ.Polym.J., 19, 1177-

1183 (1983); Delgado et al., *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 12, 119-128 (1990)。

[0080] 在一个特定实施例中, 使用PEG的碳酸酯来形成该聚乙二醇化结合性多肽缀合物。可以用N,N'-二琥珀酰亚胺碳酸酯(N,N'-disuccinimidylcarbonate, DSC)与PEG反应以形成活性混合PEG-琥珀酰亚胺碳酸酯, 随后可用该产物与连接肽的亲核基团或结合多肽的氨基反应(参见美国专利5281698和5932462)。在一种相似反应类型中, 可以用1,1'-(二苯并三唑)碳酸酯(1,1'-(dibenzotriazolyl) carbonate)和二-(2-吡啶)碳酸酯(di-(2-pyridyl) carbonate)分别与PEG反应以形成PEG-苯并三唑和PEG-吡啶混合碳酸酯(美国专利5382657)。

[0081] 可以根据本领域中的现有方法来进行<sup>10</sup>F-n3多肽的聚乙二醇化, 例如通过令结合性多肽与亲电子活性PEGs(供应商Shearwater Corp., USA, [www.shearwatercorp.com](http://www.shearwatercorp.com))反应。本发明的优选PEG试剂为例如N-羟基琥珀酰亚胺丙酸酯(PEG-SPA)、丁酸酯(PEG-SBA)、PEG-琥珀酰亚胺丙酸酯或带支链的N-羟基琥珀酰亚胺(例如mPEG2-NHS)(Monfardini et al., *Bioconjugate Chem.* 6 (1995) 62-69)。此类方法可用于在结合性多肽赖氨酸的 $\epsilon$ -氨基处或结合性多肽的N端氨基处进行聚乙二醇化。

[0082] 在又一个实施例中, PEG分子可以连接在结合性多肽的巯基上(Sartore et al., *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 27, 45 (1991); Morpurgo et al., *Biocon. Chem.*, 7, 363-368 (1996); Goodson et al., *Bio/Technology* (1990) 8, 343; 美国专利5766897)。美国专利6610281和5766897描述了可连接至巯基的示例反应性PEG种类。

[0083] 在一些实施例中, PEG分子缀合在结合性多肽的半胱氨酸残基上, 这些半胱氨酸残基是该结合性多肽上的原生残基;而在其他一些实施例中, 一个或多个半胱氨酸残基被设计引入该结合性多肽。可以向结合性多肽编码序列引入突变, 来产生半胱氨酸残基。这可以通过例如令一个或多个氨基酸残基突变成为半胱氨酸残基来达成。用于突变为半胱氨酸残基的优选氨基酸包括丝氨酸、苏氨酸、丙氨酸和其他亲水残基。优选地, 用于突变为半胱氨酸的残基是暴露在表面的残基。用于根据基本序列或蛋白来预测残基的表面可接触性的算法在本领域中是众所周知的。可选地, 若已经解出了结合性多肽的设计和演化的基础骨架的晶体结构, 则可以对比结合性多肽的氨基酸残基来预测表面残基(参见Himanen et al., *Nature*. (2001) 20-27; 414 (6866) : 933-8), 由此识别表面暴露的残基。在一个实施例中, 半胱氨酸残基被引入结合性多肽的N端和/或C端或其附近, 或引入环区中。

[0084] 在一些实施例中, 该聚乙二醇化结合性多肽包括共价连接在N端氨基酸的 $\alpha$ -氨基上的PEG分子。定点N端还原性氨基化如Pepinsky et al., (2001) *JPET*, 297, 1059, and U.S. Patent 5,824,784所述。PEG-醛在采用其他可用亲核氨基的蛋白的还原胺化反应中的用途, 如美国专利4002531、Wieder et al., (1979) *J. Biol. Chem.* 254, 12579和Chamow et al., (1994) *Bioconjugate Chem.* 5, 133所述。

[0085] 在另一个实施例中, 聚乙二醇化的结合性多肽包括一个或多个PEG分子, 所述PEG分子与连接子共价连接, 而连接子则与该结合性多肽N端氨基酸残基的 $\alpha$ 氨基相连接。所述途径公布于美国专利公开2002/0044921和WO094/01451中。

[0086] 在一个实施例中, 结合性多肽的C端聚乙二醇化。在一个特定实施例中, 通过引入C端叠氮氨酸, 随后通过斯陶丁格(Staudinger)反应连接甲基-PEG-三芳基磷化合物, 来在

蛋白质C端实现聚二乙醇化。Cazalis et al., Bioconjug. Chem. 2004; 15 (5) : 1005-1009中叙述了该C端链接方法。

[0087] 还可以根据WO 94/01451中所述的一般方法来制备单聚二乙醇化的结合性多肽。WO 94/01451描述了一种用于制备带有修饰后的末端氨基酸 $\alpha$ -碳反应基团的重组多肽的方法。该方法的步骤包括生成该重组多肽，并以一个或多个生物性添加于N端 $\alpha$ -氨基和C端 $\alpha$ -羧基的保护基团来对其进行保护。该多肽可随后与化学保护剂反应，以选择性地保护反应侧链基团，从而防止侧链基团被修饰。然后，以该生物保护基团的特异性剪切试剂来对该多肽进行剪切，以形成无保护的末端氨基酸 $\alpha$ -碳反应基团。以化学修试剂来修饰该无保护的末端氨基酸 $\alpha$ -碳反应基团。然后，对该侧链保护-末端修饰的单拷贝多肽的侧链基团解保护，以形成末端修饰的重组单拷贝多肽。该方法的步骤数量和顺序可以改变，以在该多肽的N端和/或C端氨基酸进行选择性修饰。

[0088] 缀合反应中，结合性多肽与活化PEG的比值可以约为1:0.5至1:50，约1:1至1:30，或约1:5至1:15。本发明中，可使用各种水性缓冲液来催化PEG至结合性多肽的共价加成。在一个实施例中，所用缓冲液的pH为约7.0至9.0。在另一个实施例中，pH在略微碱性的范围内，例如从约7.5至8.5。可以使用pKa接近中性pH的缓冲液，例如磷酸缓冲液。

[0089] 可以使用本领域的常规分离和纯化技术来纯化聚乙二醇化结合性多肽，例如尺寸排阻（例如凝胶过滤）和离子交换层析法。也可以使用SDS-PAGE来分离产物。可以被分离出来的产物包括单体、二聚、三聚、多聚和未聚乙二醇化结合性多肽，以及自由PEG。单PEG缀合物的百分比控制，可以通过在洗脱峰附近汇聚更广馏分来增加该组合物中的单PEG百分比。单PEG缀合物百分比在约90%，代表着产量和活性的良好平衡。可能期望的组合物中例如至少93%或至少96%的缀合物为单PEG种类。在本发明的另一个实施例中，该单PEG缀合物百分比为90%-96%。

[0090] 在一个实施例中，本发明的该聚乙二醇化结合性多肽包括1个、2个或更多的PEG部分。在一个实施例中，该PEG部分连接在该蛋白表面的氨基酸残基上和/或远离该蛋白接触目标配体的表面。在一个实施例中，该聚乙二醇化结合性多肽中的PEG合并或总分子量为约3000-60000Da，可选为约10000-36000Da。在一个实施例中，聚乙二醇化结合性多肽中的PEG基本为线形直链PEG。

[0091] 在本发明的一个实施例中，PEG化的结合多肽中的PEG并不是通过羟胺化（例如，450M羟胺（pH6.5），室温下8-16小时）从PEG化的氨基酸残基上水解下来的，因此是稳定的。在一个实施例中，组合物中超过80%是稳定的单PEG结合多肽，更优选为至少90%且最优选为至少95%。

[0092] 在另一个实施例中，本发明的PEG化的结合多肽优选为保持未修饰蛋白的至少25%，50%，60%，70%，80%，85%，90%，95%或100%相关生物活性。在一个实施例中，生物活性指的是其与PD-1结合的能力，其根据KD,  $k_{on}$ 或 $k_{off}$ 来评估。在一个特定实施例中，所述PEG化结合多肽蛋白相对于未PEG化结合多肽，表现出与PD-1结合的提高。

[0093] 相对于未修饰结合性多肽的清除率，PEG修饰的多肽的血清清除率可以降低约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或甚至90%。该PEG修饰的多肽的半排出期（ $t_{1/2}$ ）也可能相对于未修饰蛋白得到改善。相对于未修饰结合性多肽的半排出期，该PEG修饰的多肽的半排出期可以被改善至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、

100%、125%、150%、175%、200%、250%、300%、400%或500%，或甚至1000%。在一些实施例中，该蛋白半排出期是体外测定的，例如在盐水缓冲溶液或血清中。在其他实施例中，该蛋白半排出期是体内半排出期，例如该蛋白在血清或其他动物体液中的半排出期。

**[0094] 治疗剂型和给药模式**

**[0095]** 本发明中的特点之一在于，提供了用于治疗对抑制PD-1生物活性有应答的病症或预防其前置症状。优选的实施例中，所述病症的特征在于炎性或细胞过度增殖。给药的剂量取决于特定多肽类型及治疗中的特定症状，但能够被本领域技术人员容易地确定。一般来说，监管机构要求用作药物的蛋白试剂的制型能够使得致热源达到可接受的低水平。由此一来，药物制型通常会与其他制型非常不同，因为其几乎没有致热源，或至少仅含有由适当监管机构(例如，FDA)所确定的可接受致热源水平。

**[0096]** 本发明的治疗组合物可以与药学可接受稀释剂、载体或赋形剂以单位剂型一同给药。给药的非限定性示例可以是非肠道的(例如静脉注射，皮下注射)、口服或外用的。此外，可以使用任何基因治疗技术(使用编码本发明多肽的核酸)，例如裸DNA递送、重组基因和载体、基于细胞的递送，包括间接体内操作患者细胞等。

**[0097]** 该组合物可以用丸剂、片剂、胶囊、液体或持续释放片剂的形式用于口服给药；或以液体形式用于静脉注射、皮下注射或非肠道给药；以凝胶剂、洗剂、软膏剂、乳膏剂或聚合物形式进行外用给药。

**[0098]** 本领域中熟知的制型方法可以参见例如"Remington: The Science and Practice of Pharmacy" (20th ed., ed. A.R. Gennaro A.R., 2000, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.)。外用给药的制型可以例如包括赋形剂、无菌水、盐水、聚亚烷基二醇如聚乙二醇、植物原料油或氢化菜。可以使用可生物相容、可生物降解的丙交酯聚合物，丙交酯/乙交酯共聚物或聚氧乙烯-聚氧丙烯共聚物来控制化合物的释放。可以使用nM颗粒剂型(如可生物降解的nM粒子、固体脂质nM粒、脂质体)来控制化合物的体内分布。其他潜在的有用非肠道递送体系包括乙烯-乙酸乙烯酯共聚物颗粒、渗透泵、可植入输注系统和脂质体。该化合物的制型浓度根据若干因素而改变，包括药物给药剂量和给药途径。

**[0099]** 可选地，所述多肽可以作为药学可接受的盐的形式给药，例如药物产业中常用的无毒酸加成盐或金属络合物。酸加成盐的例子包括有机酸，例如乙酸、乳酸、双羟萘酸、马来酸、柠檬酸、苹果酸、抗坏血酸、琥珀酸、苯甲酸、棕榈酸、辛二酸、水杨酸、酒石酸、甲磺酸、甲苯磺酸或三氟乙酸等；聚合酸如单宁酸、羧甲基纤维素等；以及，无机酸，如盐酸、氢溴酸、硫酸、磷酸等。金属络合物包括锌、铁等等。在一个实例中，所述多肽在乙酸钠的存在下配制，以增加热稳定性。

**[0100]** 口服制型包括：含活性成分和无毒药学可接受赋形剂混合物的片剂。所述赋形剂可以是，例如，惰性稀释剂或填料(例如蔗糖或山梨醇)、润滑剂、助流剂和抗粘剂(例如硬脂酸镁，硬脂酸锌，硬脂酸，二氧化硅，氢化植物油或滑石)。

**[0101]** 口服制型还可以提供为咀嚼片形式，或活性成分与惰性固体稀释剂混合的硬质明胶胶囊，或活性成分与水或油培养基混合的软质明胶胶囊。

**[0102]** 治疗有效剂量指的是对给药对象产生疗效的剂量。确切剂量取决于需治疗的病症，且可以由本领域技术人员使用已知技术来确定查明。一般来说，该多肽的给药为每天约0.01μg/kg至约50mg/kg，优选为每日0.01mg/kg至约30mg/kg，最优选为每日0.1mg/kg至约

20mg/kg。该多肽可以每天给药(例如每日一次、两次、三次或四次)或优选为较低频率给药(例如,每周、每两周、每三周、每月或每季度)。此外,本领域已知,可能需要根据年龄、体重、总体健康状况、性别、饮食、给药时间、药物相互作用和疾病严重程度来调节,且可以由本领域技术人员以常规试验方法来确定。

**[0103] 本发明抗体与肿瘤疫苗的药学制剂**

**[0104]** 本发明的抗PD-1抗体与治疗性疫苗的结合治疗产品或制剂,提供协同的肿瘤治疗效果。例如,本发明提供了所公开的抗PD-1抗体与“Neuvax”(分离自HER2/neu的源于E75的9mer合成肽)的结合,并与作为助剂的GM-CSF结合(如美国专利8222214所述,其公开以引用形式并入本文)。此外,本发明提供所公开的抗PD-1抗体与ALVAC-CEA疫苗(金丝雀痘病毒与癌胚抗原的结合)的结合。

**[0105] 用法示例**

**[0106]** 此述的PD-1结合性蛋白及其相关变体可用于多种治疗和诊断应用中,包括通过竞争或阻断与PD-1的结合来抑制PD-1的生物活性,以及向细胞递送细胞毒性或成像部分,优选为表达PD-1的细胞。所述分子的结构小而稳定,对于药物的生产,在某些要求迅速清除的应用中从身体迅速清除,以及制备适当的或以所具有所述性质的分子进行改进的新型递送体系,尤其具有价值。

**[0107]** 基于其作为PD-1生物活性抑制剂的效力,本发明的多肽能够有效对抗多种癌症以及癌症并发症,例如胸膜积液和腹水。优选地,本发明的所述PD-1结合多肽可用于治疗或预防增殖疾病或癌症和癌症转移扩散。优选地,本发明的所述抗PD-1抗体的适应症包括结肠直肠癌、头颈癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)和胰腺癌。癌症的非限制性例子包括膀胱癌、血液癌、骨癌、脑癌、乳腺癌、软骨癌、结肠癌、肾癌、肝癌、肺癌、淋巴结癌、神经组织癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、骨骼肌癌、皮肤癌、脊髓癌、脾癌、胃癌、睾丸癌、胸腺癌、甲状腺癌、气管癌、泌尿生殖道癌、输尿管癌、尿道癌、子宫癌或阴道癌。

**[0108]** 此外,可以使用本申请所公开的抗PD-1结合多肽治疗多种炎性病症。所述炎性疾病包括,例如,肠道粘膜炎症,与结肠炎相关的消耗症,多发性硬化症,全身性红斑狼疮,病毒感染,类风湿关节炎,骨关节炎,牛皮癣,克罗恩病和炎症性肠病。

**[0109]** PD-1结合多肽可单独给药或与一种或多种附加疗法共同给予,例如化疗、放疗、免疫疗法、手术治疗或其任意组合。如上所述,在其他治疗策略中,也可以使用长期疗法或辅助疗法。

**[0110]** 在某些实施例中,本发明所述抗PD-1抗体剂可单独使用或可以与针对增殖性紊乱(如肿瘤)的治疗或预防的其他常规抗癌治疗途径组合使用。例如,所述方法可用于癌症预防药,癌症术后复发和转移预防,以及作为其他常规癌症疗法的佐药。本发明认为,常规癌症疗法(例如化疗、放疗、光疗、免疫疗法和手术)的效力可以通过使用所述多肽治疗剂来增强。

**[0111]** 据发现,多种常规化合物都具有抗肿瘤活性。这些化合物被用作化疗中的治疗剂,以收缩实体瘤,预防转移瘤和预防进一步生长,或降低白血病或骨髓恶性瘤中的恶性细胞数量。虽然化疗对治疗多种恶性瘤有效,但许多抗肿瘤化合物会导致有害副作用。据发现,当结合两种或以上不同治疗时,治疗可能协同作用,允许降低每种治疗的剂量,由此降低每种化合物在较高剂量下产生的有害副作用。在其他实施例中,难于以一种疗法治疗的恶性

瘤可能会响应两种或以上不同疗法的组合疗法。

[0112] 当多肽治疗剂附随或前后相继地与其他常规抗肿瘤剂组合给药时,所述治疗剂可能提高抗肿瘤剂的疗效,或克服所述抗肿瘤剂的细胞抗性。这能够减少抗肿瘤剂的剂量,由此降低有害副作用,或恢复抗肿瘤药在抵抗细胞中的效力。

[0113] 可用于组合抗肿瘤疗法的药学化合物包括,例如:氨鲁米特、安吖啶、阿那曲唑、天冬酰胺酶、卡介苗、比卡鲁胺、博来霉素、布舍瑞林、白消安、喜树碱、卡培他滨、卡铂、卡莫司汀、苯丁酸氮芥、顺铂、克拉屈滨、氯膦酸盐、秋水仙碱、环磷酰胺、环丙孕酮、阿糖胞苷、达卡巴嗪、更生霉素、柔红霉素、己二烯雌酚、己烯雌酚、多西他赛、多柔比星、表柔比星、雌二醇、雌莫司汀、依托泊苷、依西美坦、非格司亭、氟达拉滨、氟氢可的松、氟尿嘧啶、氟甲睾酮、氟他胺、吉西他滨、染料木黄酮、戈舍瑞林、羟基脲、伊达比星、异环磷酰胺、伊马替尼、干扰素、伊立替康、依立替康、来曲唑、亚叶酸、亮丙瑞林、左旋咪唑、洛莫司汀、氮芥、甲羟孕酮、甲地孕酮、美法仑、巯嘌呤、美司钠、甲氨蝶呤、丝裂霉素、米托坦、米托蒽醌、尼鲁米特、诺考达唑、奥曲肽、奥沙利铂、紫杉醇、帕米膦酸、喷司他丁、普卡霉素、卟吩姆、丙卡巴肼、雷替曲塞、利妥昔单抗、链佐星、苏拉明、他莫昔芬、替莫唑胺、替尼泊苷、睾酮、硫鸟嘌呤、塞替派、二氯二茂钛、拓扑替康、曲妥珠单抗、维甲酸、长春碱、长春新碱、长春地辛和长春瑞滨。

[0114] 某些化疗抗肿瘤化合物可以通过其进入例如下列基团的作用机理进行分类:代谢拮抗剂/抗癌剂,例如嘧啶类似物(5-氟尿嘧啶、氟尿苷、卡培他滨、吉西他滨和阿糖胞苷)和嘌呤类似物、叶酸拮抗剂和相关抑制剂(巯嘌呤、硫鸟嘌呤、喷司他丁和2-氯脱氧腺苷(克拉屈滨));抗增殖/抗有丝分裂剂,包括天然产物如长春花生物碱(长春碱、长春新碱和长春瑞滨)、微管干扰物如紫杉烷(紫杉醇、多西他赛)、新长春碱、长春碱、诺考达唑、埃博霉素和诺维本,epidipodophyllotoxins(依托泊苷、替尼泊苷)、DNA损伤剂(放线菌素、安吖啶、蒽环类药物、博来霉素、白消安、喜树碱、卡铂、苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺、环磷酰胺、更生霉素、柔红霉素、多柔比星、表柔比星、六甲密胺奥利沙伯、异环磷酰胺、美法仑、merchlorehtamine、丝裂霉素、米托蒽醌、亚硝基脲、普卡霉素、丙卡巴肼、泰素、泰索帝、替尼泊苷、三亚乙基硫代磷酰胺和依托泊苷(VP16));抗生素如更生霉素(放线菌素D)、柔红霉素、多柔比星(阿霉素)、伊达比星、蒽环类、米托蒽醌、博来霉素、普卡霉素(光神霉素)和丝裂霉素;酶(L-天冬酰胺酶,其系统性地代谢L-天冬酰胺并剥夺无法自身合成天冬酰胺的细胞);抗血小板药物;抗增殖/抗有丝分裂烷化剂如氮芥类(氮芥、环磷酰胺和类似物、美法仑、苯丁酸氮芥)、乙烯亚胺和甲基三聚氰胺(六甲密胺和塞替派)、烷基磺酸盐-白消安、亚硝基脲(卡莫司汀(BNU)及类似物、链佐星)、trazenes-达卡巴嗪(DTIC);抗增殖/抗有丝分裂代谢拮抗剂,例如叶酸类似物(甲氨蝶呤);铂配位络合物(顺铂、卡铂)、丙卡巴肼、羟基脲、米托坦、氨鲁米特;激素、激素类似物(雌激素、他莫昔芬、戈舍瑞林、比卡鲁胺、尼鲁米特)和芳香化酶抑制剂(来曲唑、阿那曲唑);抗凝剂(肝素、合成肝素盐和其他凝血酶抑制剂);纤维蛋白溶解剂(例如组织纤维溶酶原活化剂、链激酶和尿激酶)、阿司匹林、双嘧达莫、噻氯匹定、氯吡格雷、阿昔单抗;抗迁移剂;抗分泌剂(breveldin);免疫抑制剂(环孢霉素、他克莫司(FK-506)、西罗莫司(雷帕霉素)、硫唑嘌呤、霉酚酸酯);抗血管生成化合物(TNP-470、染料木黄酮)和生长因子抑制剂(例如、VEGF抑制剂、成纤维细胞生长因子(FGF)抑制剂);血管紧张素受体阻断剂;一氧化氮供体;反义寡核苷酸;抗体(曲妥珠单抗);细胞周期抑制剂和分化诱导剂(维甲酸);mTOR抑制剂、拓扑异构酶抑制剂(多柔比星(阿霉素)、

安吖啶、喜树碱、柔红霉素、更生霉素、eniposide、表柔比星、依托泊苷、伊达比星和米托蒽醌、拓扑替康、伊立替康)、皮质类固醇(可的松、地塞米松、氢化可的松、甲基强的松龙、泼尼松、和泼尼松龙)；生长因子信号转导激酶抑制剂；线粒体功能障碍诱导物和半胱天冬酶活化剂；和染色质干扰物。

[0115] 根据组合疗法的性质，可以在施加其他疗法的同时和/或之后以该多肽治疗剂给药。该多肽治疗剂的给药可以是单剂或多剂。在一些实施例中，该多肽治疗剂的给药开始于常规疗法之前的至少数天；而在其他实施例中，给药开始于紧接着该传统疗法之前或在施予传统疗法的同时。

[0116] 在一些实施例中，PD-1结合多肽进一步附着了能够被检测的标记(例如，该标记可以是放射同位素、荧光化合物、酶或辅酶因子)。活性部分可以是放射性试剂，例如放射性重金属如铁螯合物，钆或锰的放射性螯合物，氧、氮、铁、碳或钆的正电子发射体，<sup>43</sup>K、<sup>52</sup>Fe、<sup>57</sup>Co、<sup>67</sup>Cu、<sup>67</sup>Ga、<sup>68</sup>Ga、<sup>123</sup>I、<sup>125</sup>I、<sup>131</sup>I、<sup>132</sup>I或<sup>99</sup>Tc。可以使用连接有该部分的结合剂来作为成像剂，并以哺乳类(例如人类)诊断目的的有效剂量来给药，然后检测该成像剂的定位和累积。可以用放射性闪烁摄影术、核磁共振成像、计算机断层扫描或正电子成像术来检测该成像剂的定位和累积。可以使用指向PD-1的PD-1结合多肽的免疫闪烁成像，来检测和/或诊断癌症和脉管系统。例如，任何针对PD-1的结合性多肽，以<sup>99</sup>锝、<sup>111</sup>铟或<sup>125</sup>碘标记后均可以有效地用于所述成像。对于本领域技术人员来说，显而易见，给药的放射性同位素量取决于该放射性同位素。本领域技术人员可以容易地根据用作活性部分的指定放射性核素的比活性和能量来计算成像剂的给药量。典型地，在给药中使用每剂0.1-100毫居成像剂，优选为1-10毫居，更常用的是给药2-5毫居。因此，本发明中可用作成像剂的组合物包含缀合的放射性部分和靶向部分，其含0.1-100毫居，在一些实施例中优选为1-10毫居，在一些实施例中优选为2-5毫居，在一些实施例中更优选为1-5毫居。

[0117] 该PD-1结合多肽还可用于想表达PD-1的细胞或组织递送额外的治疗试剂(包括但不限于药物化合物、化疗化合物和放疗化合物)。在一个实施例中，该PD-1结合性多肽与化疗试剂熔合，以将该化疗试剂靶向递送至表达PD-1的肿瘤细胞或组织。

[0118] 该PD-1结合多肽可用于各种应用中，包括研究、诊断和治疗应用。例如，其可用于分离和/或纯化受体或其部分，以及用于研究受体结构(例如构象)和功能。

[0119] 本发明还提供了一种检测哺乳类对某些病症的易感性的方法。举例而言，该方法可用于检测哺乳类对于进程基于细胞上的PD-1量和/或哺乳类体内的PD-1-阳性细胞的数量的病症的易感性。

[0120] 使用标准的单字母或三字母缩写来表示多肽序列。除非另有说明，否则每个多肽序列的氨基端在左侧，羧基端在右侧；每个单链核酸序列，以及每个双链核酸序列的顶链，其5'端在左侧，3'端在右侧。还可以通过说明特定多肽序列与参照序列的区别，来描述该序列。

[0121] 除非另有说明，否则以下术语应当按照下文的定义来理解：

[0122] 术语“PD-1抑制剂”和“PD-1拮抗剂”可交换使用，两者均指能可检测地抑制PD-1的至少一种功能的分子。相反地，“PD-1激动剂”是指能可检测地增强PD-1地至少一种功能的分子。由PD-1抑制剂引起的抑制无需是完全抑制，只要其能被化验检测到即可。可以使用PD-1功能的任何化验，本文提供了一些示例。能够被PD-1抑制剂所抑制或被PD-1激动剂所

增加的PD-1功能的例子包括:癌细胞生长或凋亡(程序性细胞死亡)等等。PD-1抑制剂和PD-1激动剂类型的例子包括但不限于:PD-1结合多肽(例如抗原结合蛋白(如:PD-1抑制抗原结合蛋白))、抗体、抗体片段和抗体衍生物。

[0123] 术语“肽”、“多肽”和“蛋白”均指包括2个或以上相互以肽键连接的氨基酸残基的分子。这些术语涵盖,例如,天然和人工蛋白、蛋白片段、蛋白序列的多肽类似物(例如突变蛋白、变体蛋白或融合蛋白),以及翻译后修饰蛋白,或共价或非共价修饰蛋白。肽、多肽或蛋白可以是单体或聚集体。

[0124] 多肽(例如,抗体)的“变体”包括:相对于其他多肽序列而插入、删除和/或取代了一个或多个氨基酸残基的氨基酸序列。已公开的变体包括,例如,融合蛋白。

[0125] 多肽的“衍生物”是经过化学修饰的多肽(例如,抗体),如通过连接另一个化学部分(例如,聚乙二醇,或白蛋白,如人血清白蛋白)、磷酸化和糖基化。除非另有说明,否则术语“抗体”除了指含有两条全长的重链和两条全长的轻链的抗体之外,还包括其衍生物、变体、片段及突变蛋白,其示例如下所述。

[0126] “抗原结合蛋白”是包括以下部分的蛋白:与抗原结合的部分;以及可选地,允许抗原结合部分采取促进抗原结合蛋白与蛋白的结合的构型的支架或骨架部分。抗原结合蛋白的例子包括抗体、抗体片段(例如,抗体的抗原结合部分)、抗体衍生物和抗体类似物。该抗原结合蛋白可以包括,例如,具有接枝的CDRs或CDRs衍生物的替代蛋白支架或人工支架。所述支架包括但不限于,包含引入了突变(例如用于稳定该抗原结合蛋白的三维结构的突变)的抗体衍生支架,以及包括例如生物可相容聚合物的全合成支架。此外,可以使用多肽抗体模拟物(“PAMs”),以及基于以纤维蛋白连接素成分为支架的抗体模拟物的支架。例如参见:Korndorfer et al., 2003, Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, Volume 53, Issue 1:121-129; Roque et al., 2004, Biotechnol. Prog. 20:639-654。此外,可以使用多肽抗体模拟物(“PAMs”),以及基于以纤维蛋白连接素成分为支架的抗体模拟物的支架。

[0127] 抗原结合蛋白可以具有,例如,天然存在的免疫球蛋白的结构。“免疫球蛋白”是四聚物分子。在天然存在的球蛋白中,每个四聚物由2对相同的多肽链组成,每对中有一条“轻”(约25kDa)链和一条“重”链(约50-70kDa)。每条链的氨基末端部分包括约100-110或以上氨基酸的可变区,主要负责抗原识别。每条链的羧基末端部分具有恒定区,主要负责效应子功能。人轻链归类为 $\kappa$ (kappa)或 $\lambda$ (lambda)轻链;重链归类为 $\mu$ (mu)、 $\Delta$ (delta)、 $\gamma$ (gamma)、 $\alpha$ (alpha)或 $\epsilon$ (epsilon),分别令抗体的种型定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。优选地,本申请公开的该抗PD-1抗体的特征在于其重链和轻链氨基酸序列中的可变域序列( $V_H$ 和 $V_L$ )。优选抗体为A6( $\kappa$ IgG抗体)。在轻链和重链中,可变域和恒定域由约12个或以上氨基酸的“J”区连接,其中重链还包括一个再含约10个或以上氨基酸的“D”区。参见Fundamental Immunology Ch. 7(Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989))。每对轻/重链的可变域组成了抗体结合位点,因此一个完整的免疫球蛋白具有2个结合位点。

[0128] 若抗原结合蛋白在结合抗原(例如人PD-1)时的解离常数为1毫微摩尔或以下,则称其与抗原“特异结合”。

[0129] “抗原结合域”、“抗原结合区”或“抗原结合位点”是指抗原结合蛋白上含有与抗原相互作用的氨基酸残基(或其他化学部分)并有利于该抗原结合蛋白对该抗原的特异性和亲和性的部分。对于与其抗原特异结合的抗体而言,这包括其至少一个CDR域的至少一部

分。

[0130] “表位”是分子上连接抗原结合蛋白(例如,抗体)的部分。表位可以包括该分子的非邻近部分(例如,在多肽中,在多肽一级序列中并不相邻但在该多肽的三级和四级结构中相互足够靠近以被抗原结合蛋白结合的氨基酸残基)。

[0131] 两个多核苷酸或两个多肽序列的“相同百分比”是用GAP电脑程序(GCG Wisconsin Package, version 10.3(Accelrys, San Diego, Calif.)中的一部分)以其默认参数来比较序列而确定的。

[0132] “宿主细胞”是可用于表达核酸的细胞。宿主细胞可以是原核细胞,例如E.coli;或真核细胞,例如真核单细胞(如酵母菌或其他真菌)、植物细胞(例如,烟草或番茄植物细胞)、动物细胞(如人细胞、猴细胞、仓鼠细胞、小鼠细胞、大鼠细胞或昆虫细胞)或杂种细胞。宿主细胞的例子包括猴肾细胞COS-7系(ATCC CRL 1651)(Gluzman et al., 1981, Cell 23: 175)、L细胞、C127细胞、3T3细胞(ATCC CCL 163)、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或其衍生物|(例如Veggie CHO)和在无血清培养基上生长的相关细胞系(Rasmussen et al., 1998, Cytotechnology 28:31),或CHO的DX-B11品系(缺少DHFR)(Urbaub et al., 1980, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216-20)、HeLa细胞、BHK(ATCC CRL 10)细胞系、源于非洲绿猴肾细胞系CV1的CV1/EBNA细胞系(ATCC CCL 70)(McMahan et al., 1991, EMBO J. 10: 2821)、人胚肾细胞(例如293、293EBNA或MSR 293)、人表皮A431细胞、人Colo205细胞、其他转化灵长类细胞系、正常二倍体细胞、源于初生组织和初生外植体的体外培养所得的细胞系、HL-60、U937、HaK或Jurkat细胞。典型地,宿主细胞是能够以编码多肽且能够在该宿主细胞中表达的核酸转化或转染得到的培养细胞。术语“重组宿主细胞”可用于表示已经用需表达的核酸来转化或转染的宿主细胞。宿主细胞还可以是指包含该核酸,但在调控序列被引入该宿主细胞并与该核酸可操作连接以前,并不以所需表达水平来表达该核酸的细胞。应当理解,术语“宿主细胞”并不单指特定的对象细胞,而是也指所述细胞的后代或潜在后代。因为由于例如突变或环境影响的存在,后代中可能发生某些修饰,使得这些后代事实上与其亲代细胞并不等同,但其仍应属于本文中的“宿主细胞”术语所涵盖的范围。

[0133] 抗原结合蛋白(例如抗体、抗体片段、抗体衍生物、抗体突变蛋白和抗体变体)是与PD-1(优选为人PD-1)结合的多肽。抗原结合蛋白包括抑制PD-1生物活性的抗原结合蛋白。

[0134] 术语“Fc多肽”包括源于抗体Fc区域的多肽的原生和突变形式。还包括含有促进二聚化的铰链区的所述多肽的截短形式。含有Fc部分的融合蛋白(及由此形成的寡聚物)提供的有益效果在于,易于通过蛋白质A或蛋白质G柱来以亲和层析法进行纯化。

[0135] 本发明的抗原结合蛋白的抗体结合片段可以用常规技术制备。所述片段的例子包括但不限于Fab和F(ab')<sub>2</sub>片段。

[0136] 本发明提供与PD-1结合的单克隆抗体。单克隆抗体可以使用本领域已知的任何方法来制备,例如从完成免疫接种程序的转基因动物中收获脾细胞并使其无限增殖化。所述脾细胞可以使用本领域任何技术来达成无限增殖化,例如将其与骨髓瘤细胞融合以形成杂交瘤。用于制备融合蛋白的杂交瘤技术的骨髓瘤细胞优选为不产生抗体、融合效率高,且缺乏某些酶从而无法在某些仅支持所需融合细胞(杂交瘤)生长的选择性培养基中生长的细胞。适用于小鼠融合的细胞系的例子包括Sp-20、P3-X63/Ag8、P3-X63-Ag8.653、NS1/1.Ag 4 1、Sp210-Ag14、F0、NS0/U、MPC-11、MPC11-X45-GTG 1.7和S194/5XX0 Bul;用于大鼠融合的

细胞系的例子包括R210.RCY3、Y3-Ag 1.2.3、IR983F和48210。可用于细胞融合的其他细胞系有U-266、GM1500-GRG2、LICR-LON-HMy2和UC729-6。

[0137] 针对PD-1的抗原结合蛋白可用于例如检测PD-1多肽的存在的体外或体内化验。该抗原结合蛋白还可以用于在免疫亲和层析中纯化PD-1蛋白。阻断性抗原结合蛋白可用于本申请所公开的方法中。具有PD-1拮抗剂功能的所述抗原结合蛋白可用于治疗任何PD-1引起的病症，包括但不限于各种癌症。

[0138] 抗原结合蛋白可用于体外过程或体内给药以抑制PD-1诱导的生物活性。由此可以治疗由PD-1的蛋白水解活化所导致或加重(直接或间接)的病症，所述病症的例子如本文所述。在一个实施例中，本发明提供了一种治疗方法，包括以降低PD-1诱导的生物活性的有效剂量，用PD-1阻断性抗原结合蛋白对哺乳动物进行体内给药。

[0139] 抗原结合蛋白包括抑制PD-1生物活性(例如血管生成)的全人单克隆抗体。

[0140] 抗原结合蛋白可以由多种常规技术中的任一种来制备。例如，可以使用任何本领域已知技术，从天然表达所述蛋白的细胞中纯化而得(例如，从产生一种抗体的杂交瘤中纯化该抗体)，或在重组表达体系中制备。例如，参见：Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Kennet et al. (eds.), Plenum Press, New York (1980); and Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow and Land (eds.), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988)。

[0141] 本领域已知的任何表达体系均可用于制备本发明的重组多肽。一般来说，以含有编码一种所需多肽的DNA的重组表达载体来转化宿主细胞。可以使用的宿主细胞包括原核细胞、酵母菌或更高等的真核细胞。原核细胞包括革兰氏阳性菌或革兰氏阴性菌，例如E.coli或bacilli。更高等的真核生物包括昆虫细胞扩已建立的源于哺乳类的细胞系。使用的哺乳类宿主细胞系的例子包括猴肾细胞(ATCC CRL 1651) (Gluzman et al., 1981, Cell 23:175), L cells, 293 cells、C127细胞、3T3细胞(ATCC CCL 163)、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、HeLa细胞、BHK (ATCC CRL 10) 细胞系、源于非洲绿猴肾细胞系CV1的CV1/EBNA细胞系(ATCC CCL 70) (McMahan et al., 1991, EMBO J. 10:2821)。适用于细菌、真菌、酵母菌和哺乳类细胞宿主的克隆和表达载体如Pouwels et al. (Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, N.Y., 1985) 所述。

[0142] 转化后的细胞可以在促进多肽表达的条件下培养，且以常规蛋白纯化程序来回收多肽。一种所述纯化过程包括使用亲和层析法，例如，通过能与PD-1的全部或部分(例如胞外域)结合的基质。本申请的思路中使用的多肽包括基本不含内源性污染杂质的基本同质的重组哺乳类抗PD-1抗体多肽。

[0143] 可以使用多种已知技术中的任一种来制备抗原结合蛋白并筛选所需性质。某些技术涉及分离编码有兴趣的抗原结合蛋白(例如，抗PD-1抗体)的多肽链(或其部分)的核酸，并通过重组DNA技术操作该核酸。例如，该核酸可以融合到另一有兴趣的核酸，或通过添加、删除或取代一个或多个氨基酸残基来改变(例如，通过诱变或其他常规技术)。

[0144] 单链抗体可通过氨基酸桥接(短连接肽)来连接重链和轻链可变域(Fv区)片段，以形成单一多肽链。所述单链Fvs (scFvs) 通过在编码两个可变域多肽( $V_L$ 和 $V_H$ )的DNAs之间融合编码连接肽的DNA来制备。所得多肽可以自身折叠来形成抗原结合单体，或能够形成多聚体(例如二聚体、三聚体或四聚体)，取决于两个可变域之间的柔性连接子的长度(Kortt et

al., 1997, Prot. Eng. 10:423; Kortt et al., 2001, Biomol. Eng. 18:95-108)。通过连接不同的含V<sub>L</sub>和V<sub>H</sub>的多肽,可以形成与不同表位结合的多价scFvs (Kriangkum et al., 2001, Biomol. Eng. 18:31-40)。为制备单链抗体而开发的技术包括如美国专利4946778; Bird, 1988, Science 242:423; Huston et al., 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879; Ward et al., 1989, Nature 334:544, de Graaf et al., 2002, Methods Mol. Biol. 178:379-87所述的技术。

[0145] 用于从感兴趣的抗体获得不同子类或种型的抗体的方法是已知的,即子类转换 (subclass switching)。因此,例如可以从IgM抗体得到IgG抗体,反之亦然。此类技术允许制备既具有特定抗体(亲代抗体)的抗原结合性质,也具有不同于亲代抗体种型或子类的抗体的相关生物性质的新抗体。可以使用重组DNA技术。所述过程中可以使用编码特定抗体多肽的克隆DNA,例如编码所需种型抗体的恒定域的DNA (Lantto et al., 2002, Methods Mol. Biol. 178:303-16)。此外,若需要的是IgG4,还可能希望在铰链区中引入点突变 (CPSCP->CPPCP) (Bloom et al., 1997, Protein Science 6:407),以减缓重链间形成二硫键从而可能导致IgG4抗体异质性的趋势。

[0146] 在一些特定实施例中,本发明的抗原结合蛋白对PD-1的结合亲和性 (K<sub>a</sub>) 为至少10<sup>6</sup>。在另外一些实施例中,抗原结合蛋白的K<sub>a</sub>为至少10<sup>7</sup>、至少10<sup>8</sup>、至少10<sup>9</sup>、或至少10<sup>10</sup>。在另一个实施例中,该抗原结合蛋白的K<sub>a</sub>与本申请实施例中所述的抗体实质相同。

[0147] 在另一个实施例中,本发明提供了一种与PD-1的解离常数低的抗原结合蛋白。在一个实施例中,该抗原结合蛋白的K<sub>off</sub>为1X 10<sup>-4</sup>至<sup>-1</sup>或更低。在另一个实施例中,该K<sub>off</sub>为5X 10<sup>-5</sup>至<sup>-1</sup>或更低。在另一个实施例中,K<sub>off</sub>与本申请中所述的抗体实质相同。在另一个实施例中,抗原结合蛋白与PD-1结合的K<sub>a</sub>与本申请中所述的抗体实质相同。

[0148] 本发明的另一个方面中,提供抑制PD-1活性的抗原结合蛋白。在一个实施例中,该抗原结合蛋白的IC<sub>50</sub>为1000nM或以下。在另一个实施例中,该IC<sub>50</sub>为100nM或以下;在另一个实施例中,该IC<sub>50</sub>为10nM或以下。在另一个实施例中,该IC<sub>50</sub>与本申请实施例中所述的抗体实质相同。在另一个实施例中,该抗原结合蛋白抑制PD-1活性的IC<sub>50</sub>与本申请中所述的抗体实质相同。

[0149] 本发明的另一个方面中,提供与细胞表面表达的人PD-1结合的抗原结合蛋白,且当发生该结合时,抑制PD-1在该细胞中的信号活动,而不会对细胞表面的PD-1量造成显著减少。可以使用任何用于测定或估计细胞表面和/或细胞内部的PD-1量的方法。在其他实施例中,该抗原结合蛋白绑定至PD-1表达细胞,使得低于约75%、50%、40%、30%、20%、15%、10%、5%、1%或0.1%的细胞表面PD-1被内吞。

[0150] 本发明的另一个方面中,提供一种抗原结合蛋白,其体外或体内(例如,对人类对象给药时)的半排出期为至少1天。在一个实施例中,该抗原结合蛋白的半排出期为至少3天。在另一个实施例中,该抗原结合蛋白的半排出期为4天或以上。在另一个实施例中,该抗原结合蛋白的半排出期为8天或以上。在另一个实施例中,该抗原结合蛋白衍生化或改性,从而使其半排出期与未衍生化或未改性的抗原结合蛋白相比更为长久。在另一个实施例中,该抗原结合蛋白包括一个或多个点突变,以增加血清半排出期,例如W000/09560所述,在此以引用方式并入。

[0151] 本发明还提供了多特异性抗原结合蛋白,例如双特异抗原结合蛋白(例如通过两

个不同的抗原结合位点或区域,与PD-1的两个不同表位结合或与PD-1的表位和另一分子的表位结合的抗原结合蛋白)。此外,本申请公开的双特异抗原结合蛋白可以包括:来自所述的一种抗体的PD-1结合位点,以及来自所述的另一种抗体的另一PD-1结合区,其中涵盖本文引用其他出版物所描述的抗体。可选地,一种双特异性抗原结合蛋白可以包括一个来自所述的一种抗体的抗原结合位点,以及来自本领域所知的另一种PD-1抗体或以已知方法或所述方法制备的抗体的又一抗原结合位点。

[0152] 本领域中已知多种制备双特异性抗体的方法。所述方法包括使用杂交-杂交瘤(hybrid-hybridomas),如Milstein et al.,1983,Nature 305:537所述,以及抗体片段的化学连接(Brennan et al.,1985,Science 229:81;Glennie et al.,1987,J.Immunol.139:2367;美国专利6,010,902)。此外,双特异性抗体可以通过重组途径来制备,例如使用亮氨酸拉链部分(即,来自优选地形成异源二聚体的Fos和Jun蛋白;Kostelny et al.,1992,J.Immunol.148:1547)或其他锁匙互动域结构,如美国专利5582996所述。额外的可用技术包括如美国专利5959083和5807706中所述的技术。

[0153] 在又一个方面中,抗原结合蛋白包括抗体的衍生物。该衍生化抗体可以包括能够赋予该抗体所需性质的任何分子或物质,例如在一种特定用途中增加其半排出期。所述衍生化抗体可以包括例如可检测的(或标签)部分(例如:放射性、比色的、抗原性或酶活性分子)、可检测珠(例如磁性或电子致密性的(如金)珠)、或结合另一分子(例如生物素或链霉亲和素)的分子、治疗性或诊断性部分(例如,放射性、细胞毒性或药学活性部分)或能够增加该抗体对一种特定用途(例如向对象如人类对象给药,或其他体内或体外用途)的适用度的分子。可用于衍生抗体的分子的例子包括白蛋白(例如人血清白蛋白)和聚乙二醇(PEG)。连接白蛋白且聚乙二醇化的抗体衍生物可以使用本领域所熟知的技术来制备。在一个实施例中,该抗体与甲状腺素运载蛋白(TTR)或TTR变体缀合或以其他方式结合。该TTR或TTR变体可以用选自以下种类的化学物质进行化学改性:葡聚糖、聚(N-乙烯基吡咯烷)、聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯多元醇及聚乙烯醇。

[0154] 适应症

[0155] 本发明提供了用于治疗对象的方法,以治疗、预防、治愈、缓解或改善(“治疗”)疾病、失调、病症或病状(“症状”)。可治疗的病症中,包括特征为PD-1不适当表达或不适当活性的病症。在一些所述病症中,表达或活性水平过高,则治疗中包括PD-1拮抗剂给药,如此所述。所述失调或病症是癌症相关的。特别是,所述癌症包括但不限于,肺癌、卵巢癌和结肠癌及各种骨髓瘤。

[0156] 本发明的抗原结合蛋白可治疗或可预防的特定病症和疾病包括各种癌症。

[0157] 抗原结合蛋白的治疗方法和给药

[0158] 本文所提供的一些方法包括用PD-1结合性抗原结合蛋白向对象给药,从而降低PD-1引起的参与特定病症的生物反应。在特定实施例中,本发明的方法涉及令内源性PD-1与PD-1结合性抗原结合蛋白相接触,例如,通过向对象给药或通过间接体内(ex vivo)疗法。

[0159] 术语“治疗”涵盖缓解或预防失调的至少一种症状或其他方面,或减轻疾病严重程度等。抗原结合蛋白并非必须产生完全治愈或根除疾病的每一症状或表现,才能构成可行的治疗剂。如本领域所知,用作治疗剂的药物可以减轻指定疾病状态的严重程度,而并非必

须根除疾病的每一症状,即可被看作有用治疗剂。类似地,预防性的给药治疗无需非要完全有效地预防病症的发生,才能被看作是构成了可行的预防剂。只要降低疾病的影响(例如,降低症状数量或严重程度,或提高另一治疗的有效性,或产生另一有益效果),或降低对象体内疾病发生或恶化的可能性,就足够了。本发明的一个实施例指向一种方法,包括用PD-1拮抗剂向患者给药,其给药量和给药时间足以使得反映特定病症严重程度的指标持续得到超过基线的改善。

[0160] 根据相关领域中的认识,含有本发明的抗体及其片段的药物组合物以适用于其适应症的方式向对象给药。可以用任何适当的技术对药物组合物进行给药,包括但不限于,非肠道给药、外敷或吸入。若注射,则该药物组合物可以通过例如关节内、静脉内、肌肉内、病灶内、腹膜内或皮下途径的大剂量注射或持续输注来给药。局部给药,例如可在疾病或损伤的部位,作为经皮递送和从植入物持续释放。吸入递送,包括例如经鼻或经口吸入,使用喷雾器,吸入气雾剂形式的拮抗剂,等等。其他可选形式包括:眼药水;口服制剂,包括丸剂、糖浆剂、锭剂或口香糖;和外用制剂,如洗剂、凝胶剂、喷雾剂和软膏剂。

[0161] 本发明还涵盖了抗原结合蛋白在间接体内疗法中的用途。例如,可以令患者的血液或其他体液与PD-1结合性抗原结合蛋白进行体外接触。该抗原结合蛋白可以与适当的不溶性基质或固体支持材料结合。

[0162] 优选地,抗原结合蛋白的给药形式为一种包含一种或多种附加成分(例如生理学可接受的载体、赋形剂或稀释剂)的组合物。可选地,该组合物还包括一种或多种生理活性药剂,例如,第二种炎症或免疫抑制物质、抗血管生成物质、镇痛物质等等,本发明中提供了一些非限制性示例。在多种特定实施例中,该组合物中除PD-1结合性抗原结合蛋白外,还包括1、2、3、4、5或6种生理活性药剂。

[0163] 联合疗法

[0164] 本发明提供了一种用PD-1抑制性抗原结合蛋白和一种或多种其他疗法来治疗对象的方法。所述联合疗法通过例如攻击肿瘤中的多个位点或分子靶点,来获得协同效应或累加效应。可以使用的联合疗法的种类包括抑制或活化(酌情)单一疾病相关通路中的多个节点,靶细胞中的多个通路,或靶组织中的多个细胞类型。

[0165] 在又一个实施例中,一种联合治疗方法,包括向对象以此述的2、3、4、5、6或更多种PD-1激动剂或拮抗剂给药。在又一个实施例中,该方法包括给予对象两种或更多种共同抑制或活化(直接或间接)PD-1接到的信号传导的疗法。所述方法的例子包括使用两种或以上PD-1抑制性抗原结合蛋白的组合、PD-1抑制性抗原结合蛋白和一种或多种其他具有抗瘤性质的治疗部分(例如,细胞毒素剂和/或免疫调节剂)的组合,或PD-1抑制性抗原结合蛋白和一种或多种其他治疗(例如,手术或辐射)的组合。此外,可以将一种或多种抗PD-1抗体或抗体衍生物与一种或多种分子或其他治疗联用,其中所述其他分子和/或治疗并不直接连接或影响PD-1,但该组合可有效治疗或预防所治疗的病症。在一个实施例中,一种或多种分子和/或疗法治疗或预防由一种或多种所述其他分子或治疗在治疗期间引起的症状,例如恶心、疲乏、脱发、恶病质、失眠等。在每种使用分子和/或其他治疗的组合的情况下,各分子和/或其他治疗均可以在任意时间长度上,以任意顺序给药,例如同时给药、相继给药或交替给药,只要有效即可。在一个实施例中,治疗方法包括完成以第一分子或其他疗法进行的第一疗程之后,再开始第二疗程。治疗的第一疗程末尾和第二疗程初始之间的时长可以是

允许治疗全程有效的任意时长,例如数秒、数分钟、数小时、数天、数周、数月甚至数年。

[0166] 实施例1

[0167] 使用混合淋巴细胞反应 (MLR) 来评估抗PD-1抗体调节免疫反应的能力。利用此化验,测量了抗PD-1抗体 (RG1H10) 对细胞活化的影响以及对IL-2和干扰素  $\gamma$  的产生的影响。为了进行MLR,将来自一个供体的 $10^5$ 纯化人CD4+细胞和从另一供体制备的 $10^4$ 源自单核细胞的树突细胞共培养。为了制备树突细胞,将纯化的单核细胞与GM-CSF (1000单位/毫升) 和IL-4 (500U/ml) 共培养7天。除非另有说明,否则将 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ 的抗PD-1抗体或对照抗体加入到同种异体MLR培养物中。设置平行板来在第2或3天和在第5天收集上清液,以使用商购ELISA试剂盒 (Biologend公司) 来分别测量IL-2和IFN  $\gamma$ 。在第5天培养物中的剩余细胞中测定CD25表达,作为细胞活化的量度。

[0168] 细胞活化的实验结果示于图1中。所有的抗PD-1抗体中均存在细胞活化的提高。在图1中,数据表示为测试值相对于在没有任何抗体添加下得到的值的百分比。纵坐标值是% CD25+,其指的是细胞活化,表示为相对于培养基对照的百分比。以这种方式表示细胞活化的百分比的提高。从第3天的培养物中收集上清液,以测量IL-2 (图2) 或在第5天的培养物中收集上清液,以测量干扰素  $\gamma$  (图3)。在图2中,纵坐标的值为IFN  $\gamma$  pg/ml。在图3中,纵坐标是IL-2 pg/ml。通过加入所述抗PD-1抗体,两种细胞因子的生产均得到增强。

[0169] 实施例2

[0170] 本实施例展示了细胞结合的EC50测量和细胞结合特异性的体外数据。更具体地,本实施例展示了抗PD-1抗体 (如图4所示) 的细胞结合特异性及达到50%结合饱和度时的浓度 (EC 50)。在本实施例中,将抗PD-1抗体与商购治疗性抗PD-1抗体BMS 5C4进行比较。实验过程如下。CHO PD-1的细胞和CHO-PD-L1的细胞的获取,是通过以PD-1 cDNA ORF克隆 (Origene公司, RG210364) 和PD-L1 cDNA ORF克隆 (Origene公司, RG213071) 稳定转染CHO-K1细胞。经过2个星期的新霉素选择后,通过荧光激活细胞分选 (FACS) 进行克隆分离,并进一步扩增。从卵巢癌细胞 (ATCC CRL-1978) 建立ES-2细胞系,且不表达可检测水平的PD-1。为进行细胞结合实验,将50000CHO-PD-1细胞,CHO-PD-L1细胞,和ES-2细胞添加到96孔V形底板的孔中的 $100\mu\text{l}$  FACS缓冲液 (PBS+2% FBS) 中。在FACS缓冲液中对每个抗PD-1抗体进行12点的3倍稀释曲线作图,开始浓度为 $50\mu\text{g}/\text{ml}$  ( $3.33 \times 10^{-7}\text{M}$ )。将细胞离心沉淀后,用FACS缓冲液洗涤两次,然后悬于 $25\mu\text{l}$  一式三份的抗体溶液中。经过0.5小时培养后,用FACS缓冲液洗涤细胞一次,并再悬浮在 $50\mu\text{l}$  PE缀合的山羊抗-人IgG ( $\gamma$ -链特异性) 第二抗体 (Southern Biotech, 产品号#2040-09)。将细胞进一步培养0.5小时,然后用FACS缓冲液洗涤一次。将细胞再悬浮于 $25\mu\text{l}$  FACS缓冲液中,并使用Intellicyt HTFC流式细胞仪在FL2-H通道中测定中值荧光强度。在Graph Pad Prism中使用非线性回归拟合进行数据分析。

[0171] 所使用的抗体为所公开的GA2, RG1B3, RG1H10, 和RG2A7, RG2H10, SH-A4, RG4A6和RG6B5, 并与根据现有公开的抗体序列 (美国专利申请US 2009/0217401; 其公开内容通过引用并入本文) 在实验室中制备的现有公开抗体5C4 (Bristol-Myers-Squibb/Medarex公司) 进行比较。

[0172] 结果:如图4和表1中所示,抗PD-1抗体对CHO PD-1细胞的细胞结合EC 50测定为36皮摩尔 (pM) 至 $2802\text{pM}$ 之间。在图上的数据点表示抗体浓度依赖性的阳性标记细胞的中值荧光强度 (MFI) +/- 标准误差。没有观察到对不表达PD-1的细胞 (CHO-PD-L1的细胞和ES-2细

胞)的非特异性结合。

[0173] 表1

[0174]	<b>BMS 5C4</b>	<b>PD1 H7</b>	<b>PD1 GA2</b>	<b>PD1 RG1B3</b>	<b>PD1 RG1H10</b>	<b>PD1 RG2A7</b>	<b>PD1 RG2H10</b>	<b>PD1 SHA4</b>	<b>PD1 RG4A6</b>	<b>PD1 RG6B5</b>	
	<b>EC50 (pM)</b>	529.9	222.5	201.5	183.4	35.8	403.0	2802.0	114.8	778.9	240.1

[0175] 实施例3

[0176] 本实施例提供了抗PD-1抗体(图5)对重组PD-1与重组PD-L1的结合的抑制性的分析。简言之,在ELISA板上涂布PD-L1-His,以酪蛋白的PBS溶液阻断,然后加入抗PD-1抗体(scFv)和重组人PD-1蛋白质的预培养混合物。测定PD-1蛋白对PD-L1蛋白的剩余结合。

[0177] 所使用的抗体为所公开的GA1,GA2,GB1,GB6,GH1,A2,C7 H7,SH-A4,SH-A9,RG1B3, RG1H10和RG1H11,并与根据现有公开的抗体序列(美国专利申请US 2009/0217401;其公开内容通过引用并入本文)在实验室中制备的现有公开抗体5C4(Bristol-Myers-Squibb/Medarex公司)进行比较。

[0178] 结果:抗PD-1抗体具有阻断重组人PD-1和PD-L1蛋白之间的相互作用的能力。

[0179] 实施例4

[0180] 本实施例中使用BIAcore方法,提供了所鉴定的抗PD-1抗体RG1H10作为在抗体铰链区的残基228具有丝氨酸到脯氨酸的稳定突变(S228P)的免疫球蛋白 $\gamma$ 1(IgG1)和免疫球蛋白 $\gamma$ 4(IgG4)的亲和性比较。简而言之,在CM5芯片上涂布抗人Fc抗体,捕获抗PD1单抗,然后用连续稀释的重组人PD1(His-标记)的蛋白质进行分析。

[0181] 结果:人抗PD-1抗体RG1H10具有对于识别和结合人PD-1蛋白质的优良动力学性质,无论是作为IgG1或IgG4(S228P),如表2所示。

[0182] 表2

[0183]	mAb	ka 1/Ms)	kd (1/s)	Kd (M)	活化PBMC结合:EC <sub>50</sub> (M)
	RG1H10 (IgG1)	7.5E05	1E-03	1.3E-09	6.7E-10
	RG1H10 (IgG4 S228P)	8.8E05	1.4E-03	1.6E-09	4.7E-11

[0184] 实施例5

[0185] 本实施例展示了细胞结合的EC50体外测量数据。更具体地,本实施例展示了抗PD-1抗体RG1H10如IgG1的或IgG4(S228P)在细胞结合方面的结合特征,以及达到50%结合饱和度时的浓度(EC 50)。实验过程如下。将外周血单核细胞(PBMC)和已刺激的抗CD3(3ng/ml)加入到24孔板的孔中。培养三天后,收获细胞,并添加到96孔V形底板的孔中的100 $\mu$ l FACS缓冲液(PBS+2%FBS)中。在FACS缓冲液中对每个抗PD-1抗体进行12点的3倍稀释曲线作图,开始浓度为10 $\mu$ g/ml( $0.6 \times 10^{-7}$ M)。将细胞离心沉淀后,用FACS缓冲液洗涤两次,然后悬为25 $\mu$ l一式三份的抗体溶液中。经过0.5小时培养后,用FACS缓冲液洗涤细胞一次,并再悬浮在50 $\mu$ l PE缀合的山羊抗-人IgG( $\gamma$ -链特异性)第二抗体(Southern Biotech,产品号#2040-09)。将细胞进一步培养0.5小时,然后用FACS缓冲液洗涤一次。将细胞再悬浮于25 $\mu$ l FACS缓冲液中,并使用Intellicyt HTFC流式细胞仪在FL2-H通道中测定中值荧光强度。在Graph Pad Prism中使用非线性回归拟合进行数据分析。

[0186] 结果:如表3所示,抗PD-1抗体对活化的外周血单核细胞(PBMC)的细胞结合EC 50,测定为IgG4(S228P)同种型47皮摩尔(pM)和IgG1同种型670pM。

[0187] 表3

[0188]	mAb	活化PBMC结合:EC <sub>50</sub> (M)
	RG1H10 (IgG1)	6.7E-10
	RG1H10 (IgG4 S228P)	4.7E-11

[0189] 实施例6

[0190] 该实施例提供了RG1H10特异性结合重组PD-1而不与其它相关蛋白(图6)特异结合的能力分析。简言之,在ELISA板上涂布适当的重组蛋白,即人PD-1,猕猴PD-1,人类CTLA-4,人CD28和人ICOS,以酪蛋白的PBS溶液阻断,然后用所述抗PD-1抗体(RG1H10)培养。测定RG1H10的结合。

[0191] 结果:抗PD-1抗体RG1H10具有对PD-1(人或食蟹猴)的优秀特异性,但不能识别PD-1的相关蛋白质。

[0192] 实施例7

[0193] 使用混合淋巴细胞反应(MLR)来评估RG1H10抗体的两种同种型,即IgG1和IgG4(S228P)调节免疫反应的能力。利用此化验,测量了抗PD-1抗体(RG1H10)对细胞活化的影响以及对IL-2和干扰素 $\gamma$ 的产生的影响。为了进行MLR,将来自一个供体的 $10^5$ 纯化人CD4+细胞和从另一供体制备的 $10^4$ 源自单核细胞的树突细胞共培养。为了制备树突细胞,将纯化的单核细胞与GM-CSF(1000单位/毫升)和IL-4(500U/ml)共培养7天。除非另有说明,否则将10 $\mu$ g/ml的抗PD-1抗体或对照抗体加入到同种异体MLR培养物中。设置平行板来在第2或3天和在第5天收集上清液,以使用商购ELISA试剂盒(Biolegend公司)来分别测量IL-2和IFN $\gamma$ 。在第5天培养物中的剩余细胞中测定CD25表达,作为细胞活化的量度。

[0194] 细胞活化的实验结果示于图7,8,和9中。两个抗PD-1抗体同种型均提高了细胞活化(图7)。该数据表示为测试值相对于在没有任何抗体添加下得到的值的百分比。以这种方式表示细胞活化的百分比的提高。从第3天的培养物中收集上清液以测量IL-2(图8)或在第5天的培养物中收集上清液以测量干扰素 $\gamma$ (图9)。两种细胞因子的生产类似地因添加抗PD-1抗体而得到增强。

[0195] 实施例8

[0196] 所述重链序列是、通过亲和性成熟过程进一步优化。具体而言,抗体RG1H10(重链SEQ ID NO:23)亲和性成熟为如下文序列表表格中列出的12个附加的重链序列(SEQ ID NO:37-49)以及轻链SEQ ID NO:24。

[0197] 实施例9

[0198] 本实施例展示了使用如图5所示抗体进行的PD-1阻断实验。在ELISA板上涂布PD-L1-His,以酪蛋白的PBS溶液进行阻断,然后加入预培养的scFv和PD1/Fc混合物(12.5 $\mu$ L 10 $\mu$ g/ml PD1/Fc+12.5 $\mu$ l噬菌体汤)。培养1h后,用PBS洗涤3次。加入抗人Fc-HRP(1:200稀释于酪蛋白)。培养30分钟,用PBS洗涤3次。使用TMB作为底物并以2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>停止反应。在450nm处读取O.D.。除GA2和H7所有测试的抗体阻断PD-1受体。

[0199] 实施例10

[0200] 本实施例展示了使用如图5所示抗体进行的PD-1阻断实验。在ELISA板上涂布PD-L1-His,以酪蛋白的PBS溶液进行阻断,然后加入预培养的scFv和PD1/Fc混合物(12.5 $\mu$ L 0.7 $\mu$ g/ml PD1/Fc+12.5 $\mu$ l噬菌体汤)。培养1h后,用PBS洗涤3次。加入抗人Fc-HRP(1:500稀

释于酪蛋白)。培养30分钟,用PBS洗涤3次。使用TMB作为底物并以2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>停止反应。在450nm处读取O.D.。

[0201] 实施例11

[0202] 本实施例中展示了人和鼠抗PD-1抗体之间的交叉反应性的存在或不存在,如图10中所示。在Ni-NTA板上加载50μl 1μg/ml人PD-L1/His或鼠标PD1/His(对照:PBS),培养1小时,用PBS洗涤3次。添加以酪蛋白稀释的IgG并培养30分钟。用PBS洗涤3次。加入山羊抗人Fc-HRP(1:300稀释于酪蛋白)。培养30分钟,用PBS洗涤3次。使用TMB作为底物并以2M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>停止反应。在450nm处读取O.D.。

[0203] 实施例12

[0204] 本实施例展示了抗体5C4和RG1H10之间的表位比较。将IgG5C4涂布在AR2G传感器上。以PBS为基线,在传感器上捕获PD1/His。然后传感器依次浸入有PBS和RG1H10的孔中。

[0205] 实施例12

[0206] 本实施例展示了本发明的抗PD-1抗体的亲和性比较。将大约1000RU的抗人Fc抗体固定在CM5传感器芯片上。在10μL/min的流速下对抗体(约10μg/ml)进行60秒捕获。以流动缓冲液(HBS-EP)进行PD1/His的连续稀释。所有测量均在30μL/min的流速下进行。用3M MgCl<sub>2</sub>进行60秒的表面再生。使用1:1(朗缪尔)结合模型来拟合数据。

[0207] 表4

[0208]	名称	ka (1/Ms)	kd (1/s)	Rmax (RU)	KA (1/M)	KD (M)	Chi2
	5C4	2.16E5	1.7E-3	102	1.27E8	7.87E-9	0.145
	RG1H10	1.3E6	1.04E-3	81.6	1.25E9	8.02E-10	1.52

[0209] 实施例13

[0210] 本实施例所展示的实验中,展示了RG1H10抗体(PD-1)与三种抗PD-1竞争性抗体相比的靶标(PD-1)特异性。使用体外ELISA测定法,用抗人IgG4重链或抗人λ轻链检测试剂,我们可以确认RG1H10特异性结合重组人和猕猴PD-1,但不特异结合小鼠PD-1。RG1H10结合人和猕猴的PD-1的EC50值分别为0.391nM和0.840nM,基本上等同于受试的三种对照抗体,包括竞争抗体1(人EC 500.419nM,猕猴EC 50 1.02nM),竞争抗体2(人EC 500.495nM,猕猴EC500.773nM)和竞争抗体3(人EC500.390nM,猕猴EC50 1.295nM)。此外,RG1H10不结合其它结构相关家族成员,包括人CTLA4,人CD28和人ICOS。这些结果表明,RG1H10表现出对PD-1的独特靶特异性。

[0211] 实施例14

[0212] 本实施例使用Biacore亲和性表征方法和基于细胞的结合性研究,展示了RG1H10抗体(PD-1)与三种抗PD-1竞争性抗体相比的靶标(PD-1)亲和性。为了进行Biacore亲和性测量,将抗PD-1抗体捕获到蛋白A固定化CM5传感芯片上,然后,令单体重组人PD-1流过芯片。在这些条件下,RG1H10表现出的亲和性(KD)为3.2nM,相对于竞争抗体1(7.0nM),竞争抗体2(3nM)和竞争抗体3(42nM)。这些研究表明,RG1H10呈现的靶亲和性与竞争分子1和2相当,且大约10倍高于竞争抗体3的亲和性。

[0213] 此外,我们使用稳定表达高水平人PD-1的人Jurkat T细胞系来测量RG1H10和三种对照抗体与在T细胞表面上表达的人PD-1的结合。通过流式细胞术,使用直接缀合荧光染料的抗重链或轻链抗体,检测第一抗体与Jurkat PD-1细胞的结合(使用各检测试剂获得了相

同的结合曲线)。在该测定中,结合到膜表达的PD-1的RG1H10的EC<sub>50</sub>值为25.76nM,相对于竞争抗体1(5.18nM),竞争抗体2(4.57nM)和竞争抗体3(8.83nM)。在进行这些研究时,我们还观察到各种抗PD1抗体与PD-1受体分子的最大结合数目的变化性,由此RG1H10达到的C<sub>max</sub>为1103平均荧光强度(MFI)单位,相当于在竞争抗体2中的观察值(C<sub>max</sub>为1110MFI),高于竞争抗体3的观察值(C<sub>max</sub>为789MFI),且几乎比竞争抗体1的观察值(C<sub>max</sub>为1906MFI)低2倍。总之,RG1H10与膜表达人PD-1的结合效力与所测试的所有对照抗体类似。

### 序列表

		重链可变域区	轻链可变域区
		QPVLQPASVGSPGQSITISCTGTSSDVG	
		QVQLQQSGPGLVRPSQTLQLSCDISGDSVSSNSA	GYNVSWYQQHPGKAPKLMYEVSKRP
		TWNWIRQSPSRGLEWLGRFTYRSKWYHDYALS	SGVPDRFSGSKSGNTASLTVSGLQAED
		VKSRTINPDTSKNQFLQLNNSVSPGDTAVYFCV	ADYYCSAWDDSLNADVFGGGTKLTVL
GA1		REDIDGRLDYWGQQGTLTVSS SEQ ID NO. 1	SEQ ID NO. 2
		QPVLQPSSASGTPGQRVTISCGSSSNI	
		QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYIFSDNGV	GTNTVNWYQQVPGTAPKLLIHGNDQR
		NWVRQAPGQGLEWMGWINTKIGNPTYAQGF	PSGVPDRFSGSKSDTSASLAITGLQSDDD
		TGRFVFSLDTSVSTTYLQISSLQAGDTAVYYCARE	ADYYCSAWDDSLNADVFGGGTKLTVL
GA2		HDYYYGMDVWGQQGTTVTVSS SEQ ID NO. 3	SEQ ID NO. 4
		MAEVQLESGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTS	QAVLTQPPSASATPGQRVTISCGSDSNI
		HYMHWRQAPGQGLEWMGVINPSGGSTS	GTNYVWYQQQFPGTAPQPLIYRDNQRP
		QKFAQGRVTMTRDTSTVYMDLSSLRSEDTAVY	SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEA
		YCARRSEAYYHGMDVWGQGTTVTVSS SEQ ID	TYFCSTWDDSLNGWVFGGGTKLTVL
[0214]	GB1	NO. 5	SEQ ID NO. 6
		QPVLQPSSASGTPGQRVTISCGSSSNI	
		EVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYIFSDNGV	GGYNVSWYQQHPGKAPKLMYEVSN
		NWVRQAPGQGLEWMGWINTKIGNPTYAQGF	RPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAED
		TGRFVFSLDTSISTTYLQISSLQAGDTAVYYCARE	EADYYCSSYSSSTLEVFGTGTKVTVL
GB6		HDYYYGMDVWGQQGTTVTVSS SEQ ID NO. 7	SEQ ID NO. 8
		QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCEATGFTFSRYW	SYELMQPPSVSGAPGQRVTISCTGSSSNI
		MHWVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYYADSVKG	GAAYDVHWYQQLPKGAPKLMFANSN
		RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD	RPSGVPDRFSGSKSGTSASLAITGLQAEQD
		TLEYGSGILENAMGYGMDVWGQGTTVTVSS	EADYYCQSYDISLRAYVFGTGTKLT
GH1		SEQ ID NO. 9	SEQ ID NO. 10
		SYELMQPPSVSGAPGQRVTISCGSSSNI	
		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLACAASGFSFSDYY	GTNTVNWYQHLPGTAPKLLIYSNNQRP
		MTWIRQAPGRGLEWIAYISDSGQTVHYADSVK	SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEA
		GRFTISRDNTKNSLFLQVNTLRAEDTAVYYCARE	DYYCATWDDSPNGWVFGGGTKLTVL
A2		DLLGYYLQSWGQQGTLTVSS SEQ ID NO. 11	SEQ ID NO. 12
		EVQLVESGGGVVQPGRLRLSCAASGFTFSSYW	QAVLTQPPSVAAAGPQRVTISCGSNSNI
		MSWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYVDSV	ADTYVSWYQQLPGTAPRLLIYDNDQRPS
		KGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCA	GIPDRFSGSKSGTSATLGITGLQTGDEAD
		REGEHDAFDIWGQQGTMVTVSS SEQ ID NO.	YYCGTWDDSSLSGVFGTGTKVTVL SEQ
C7		13	ID NO. 14

		QSVLTQPASVSGSPGQSVTISCTGSSDV GAYNFVSWYRQYPGKAPKLLIYEVNKR SDVPDRFSGSKFGNTASLTVGLQADDE ADYYCSSYAGSTDVFVGTGTVT SEQ ID NO. 16
H7		QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYIFSDNGV NWVRQAPGQGLEWMGWINTKIGNPTYAQGF TGRFVFSLTSVSTTYLQISSLQAGDTAVYYCARE HDYYYGMDVWGQGTTVTVSS SEQ ID NO. 15
SH-A4		QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYIFSDNGV NWVRQAPGQGLEWMGWINTKIGNPTYAQGF TGRFVFSLTSVSTTYLQISSLQAGDTAVYYCARE HDYYYGMDVWGQGTTVTVSS SEQ ID NO. 17
SH-A9		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYT MHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYS QKFQGRVTIRDTASTAYMELSSLRSEDTAVYY CAKVSAGTESWFDPWGQGTLTVSSSEQ ID NO. 19
RG1B3		QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYG ISWVRQAPGQGLEWMGWIISAYNGNTNYAQK LQGRVTMTTDSTSTAYMELRSLSDDTAVYYC ARGLYGDEDYWGQGTLTVSS SEQ ID NO. 21
[0215]		QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYIFSDNGV NWVRQAPGQGLEWMGWINTKIGNPTYAQGF TGRFVFSLTSISTTYLQISSLQAGDTAVYYCARE HDYYYGMDVWGQGTTVTVSS SEQ ID NO. 23
	RG1H10	QMQLVQSGAEVKKPGESLKISCKSGSGSYF IGWVRQMPGKGLEWMGIYPGSDTRYSPSFQ GQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCASG VTRKRYSSWPPFDYWGQGTLTVSS SEQ ID NO. 25
RG1H11		QVQLQQWGAGLLKSSETLSLSCAVYGGTFRDD HWSWIRQPPGKGLEWIGESHTGRTIYNPLRS RVTMSIDTSKNEFLSLRSLVTAADTATYFCARGN NYVWGNQEDFWGQGTLTVSS SEQ ID NO. 27
RG2H7		QVQLQQSGPGLVRPSQTLSSLCDISGDSVSSNSA TWNWIRQSPSRGLEWLGRTFYRSKWHYHDYALS VKSRTINPDTSKNQFSLQLNSVSPGDTAVYFCV REDIDGRLDYWGQGTLTVSS SEQ ID NO. 29
RG2H10		EVQLVESGGALVQPGGSLRLSCAVSGFTFSHY MDWVRQAPGKGLEWVARSRNKGNNSYTTEYAA SVRGRFTISRDDSNSLYLQMNSLKTEDTAVYYC VRGVVPALEGMDVWGQGTTVTVSSSEQ ID NO. 31
RG3E12		GGYNVSWYQHHPGKAPKLLIYEVNKR GSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYTNQRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEA DYYCAAWDESNGDVFGTGT CLQDHSPYTFGQGTVT LPVLTQPPSVEVPGQRT GSNAVNWYQHFPGKAPKLLIYNDLLPS GVSDRFSASKSGTSASLAISGLRSEDEAD YYCAAWDDNLSAYV QSALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDV GGYNVSWYQHHPGKAPKLLIYEVNKR PSGVPDRFSGSKSAITASLTISGLTEDEA DYYCSAWDDSLNADVFGGGT ID NO. 22
		GGYNVSWYQHHPGKAPKLLIYEVNKR PSGVPDRFSGSKSAITASLTISGLTEDEA DYYCSAWDDSLNADVFGGGT SEQ ID NO. 24
		DIQMTQSPSSLSASVGDRVTICRASQSI STYLNWYQQKPGKAPKVLITDASSLETG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDATYF CQQYDDLPPTFGQGTVT SEQ ID NO. 26
		QAGLTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSD VGGYNVSWYQQHHPGKAPKLLIYDV KRPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAE DEADYYCSSYTSSSTYVFGTGT SEQ ID NO. 28
		QAGLTQPRSVSGSPGQSVTISCTGTSSD GGYNVSWYQQHHPGKAPKLLIYDV RPSGVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQSD DDADYYCSAWDDSLNADVFGGGT L SEQ ID NO. 30
		QAGLTQPPSVSKGLRQTATLTCTGNSNNI GDQGAAWLQQHQGHPPRLLSYRNNN RPSGISERLSASRSGNIASLTITGLQPEDE ADYYCSAWDSSLVWVFGGGT SEQ ID NO. 32

		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYW MHWVRQAPGKGLEWVSSSSSYIYYADSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD TLEYGSGILENAMGYGMDVWGQGTTVTVSS	QAVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSN GSNTVNWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLQSEDEA DYYCAAWDDSLNGYVFGTGTKLTVL
RG4A6		SEQ ID NO. 33 EVQLLESGGGVVQTGRSLRLSCSDSGSTFRSQA MHWVRQTPGKGLEWLAVTSHDGSKTYYADSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRGEDTAVYYCA RGGRGYTYDHSFFDYWGQGTLTVSS	SEQ ID NO. 34 AIRMTQSPSTLSASVGDRVITCRASENI RNLLAWYQQKPGKAPPELLIHGASTLGTG VPSRFSGGSGTEFTLTSSLQPDFFATYY CQQYESYFNTFGQGTKVEIK SEQ ID NO. 36
RG5D9		SEQ ID NO. 35 QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYIFSDNGV NWVRQAPGQGLEWMGWINTKDGNNPTYAQG	QSLALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDV GGYNYVSWYQHHPGKAPKLMYEVSKR PSGVPDRFSGSKSAITASLTISGLLDEA
RG1H10-H2		FTGRFVFSLDTISSTTYLQISSLQAGDTAVYYCAR	DYYCSAWDDSLNADVFGGGTKVTVL
A-22-1S		EHDYYYGMDVWGQGTTVTVSSSEQ ID NO. 37 QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYIFSDNGV NWVRQAPGQGLEWMGWINTKDGNNPTYAQG	SEQ ID NO. 24 QSLALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDV GGYNYVSWYQHHPGKAPKLMYEVSKR PSGVPDRFSGSKSAITASLTISGLLDEA
[0216]	RG1H10-H2	FTGRFVFSLDTISSTTYLQISSLQAGDTAVYYCAR	DYYCSAWDDSLNADVFGGGTKVTVL
	A-27-2S	EHDYYYGMDVWGQGTTVTVSSSEQ ID NO. 38 QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYIFSDNGV VNWVRQAPGQGLEWMGWINTKDGNNPTYAQG	SEQ ID NO. 24 QSLALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDV GGYNYVSWYQHHPGKAPKLMYEVSKR PSGVPDRFSGSKSAITASLTISGLLDEA
	RG1H10-3C	GFTGRFVFSLDTISSTTYLQISSLQAGDTAVYYCA REHDYYYGMDVWGQGTTVTVSSSEQ ID NO. 39 QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYIFSDNGV VNWVRQAPGQGLEWMGWINTKDGNNPTYAQG	DYYCSAWDDSLNADVFGGGTKVTVL SEQ ID NO. 24 QSLALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDV GGYNYVSWYQHHPGKAPKLMYEVSKR PSGVPDRFSGSKSAITASLTISGLLDEA
	RG1H10-16C	GFTGRFVFSLDTISSTTYLQISSLQAGDTAVYYCA REHDYYYGMDVWGQGTTVTVSSSEQ ID NO. 40 QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYKFDNG VNWVRQAPGQGLEWMGWINTKDGNNPTYAQG	DYYCSAWDDSLNADVFGGGTKVTVL SEQ ID NO. 24 QSLALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDV GGYNYVSWYQHHPGKAPKLMYEVSKR PSGVPDRFSGSKSAITASLTISGLLDEA
	RG1H10-17C	GFTGRFVFSLDTISSTTYLQISSLQAGDTAVYYCA REHDYYYGMDVWGQGTTVTVSSSEQ ID NO. 41 QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYKFDNG VNWVRQAPGQGLEWMGWINTKDGNNPTYAQG	DYYCSAWDDSLNADVFGGGTKVTVL SEQ ID NO. 24 QSLALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDV GGYNYVSWYQHHPGKAPKLMYEVSKR PSGVPDRFSGSKSAITASLTISGLLDEA
	RG1H10-19C	GFTGRFVFSLDTISSTTYLQISSLQAGDTAVYYCA REHDYYYGMDVWGQGTTVTVSSSEQ ID NO. 42 QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYKFDNG VNWVRQAPGQGLEWMGWINTKDGNNPTYAQG	DYYCSAWDDSLNADVFGGGTKVTVL SEQ ID NO. 24 QSLALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDV GGYNYVSWYQHHPGKAPKLMYEVSKR PSGVPDRFSGSKSAITASLTISGLLDEA
	RG1H10-21C	GFTGRFVFSLDTISSTTYLQISSLQAGDTAVYYCA REHDYYYGMDVWGQGTTVTVSSSEQ ID NO. 43 QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYKFDNG VNWVRQAPGQGLEWMGWINTKDGNNPTYAQG	DYYCSAWDDSLNADVFGGGTKVTVL SEQ ID NO. 24 QSLALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDV GGYNYVSWYQHHPGKAPKLMYEVSKR PSGVPDRFSGSKSAITASLTISGLLDEA
	RG1H10-23C2	GFTGRFVFSLDTISSTTYLQISSLQAGDTAVYYCA REHDYYYGMDVWGQGTTVTVSSSEQ ID NO. 44 QVQLVQSGSELKKPGASVKISCKASGYKFDNG VNWVRQAPGQGLEWMGWINTKDGNNPTYAQG	DYYCSAWDDSLNADVFGGGTKVTVL SEQ ID NO. 24 QSLALTQPPSASGSPGQSVTISCTGTSSDV GGYNYVSWYQHHPGKAPKLMYEVSKR PSGVPDRFSGSKSAITASLTISGLLDEA
[0217]			

- [0001] 序列表  
[0002] <110> 索伦托治疗有限公司  
[0003] <120> 与PD-1结合的抗原结合蛋白  
[0004] <130> PD-1A  
[0005] <160> 44  
[0006] <170> PatentIn version 3.5  
[0007] <210> 1  
[0008] <211> 121  
[0009] <212> PRT  
[0010] <213> Homo sapians  
[0011] <400> 1  
[0012] Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln  
[0013] 1 5 10 15  
[0014] Thr Leu Ser Leu Ser Cys Asp Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn  
[0015] 20 25 30  
[0016] Ser Ala Thr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu  
[0017] 35 40 45  
[0018] Trp Leu Gly Arg Thr Phe Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr His Asp Tyr Ala  
[0019] 50 55 60  
[0020] Leu Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn  
[0021] 65 70 75 80  
[0022] Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Ser Pro Gly Asp Thr Ala Val  
[0023] 85 90 95  
[0024] Tyr Phe Cys Val Arg Glu Asp Ile Asp Gly Arg Leu Asp Tyr Trp Gly  
[0025] 100 105 110  
[0026] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
[0027] 115 120  
[0028] <210> 2  
[0029] <211> 111  
[0030] <212> PRT  
[0031] <213> Homo sapians  
[0032] <400> 2  
[0033] Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln  
[0034] 1 5 10 15  
[0035] Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr  
[0036] 20 25 30  
[0037] Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu  
[0038] 35 40 45

[0039] Met Ile Tyr Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe  
 [0040] 50 55 60  
 [0041] Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu  
 [0042] 65 70 75 80  
 [0043] Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ala Trp Asp Asp Ser  
 [0044] 85 90 95  
 [0045] Leu Asn Ala Asp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 [0046] 100 105 110  
 [0047] <210> 3  
 [0048] <211> 119  
 [0049] <212> PRT  
 [0050] <213> Homo sapians  
 [0051] <400> 3  
 [0052] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala  
 [0053] 1 5 10 15  
 [0054] Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ser Asp Asn  
 [0055] 20 25 30  
 [0056] Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 [0057] 35 40 45  
 [0058] Gly Trp Ile Asn Thr Lys Ile Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe  
 [0059] 50 55 60  
 [0060] Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Thr Tyr  
 [0061] 65 70 75 80  
 [0062] Leu Gln Ile Ser Ser Leu Gln Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0063] 85 90 95  
 [0064] Ala Arg Glu His Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly  
 [0065] 100 105 110  
 [0066] Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 [0067] 115  
 [0068] <210> 4  
 [0069] <211> 110  
 [0070] <212> PRT  
 [0071] <213> Homo sapians  
 [0072] <400> 4  
 [0073] Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln  
 [0074] 1 5 10 15  
 [0075] Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Thr Asn  
 [0076] 20 25 30  
 [0077] Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Val Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu

[0078]	35	40	45
[0079]	Ile His Gly Asn Asp Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser		
[0080]	50	55	60
[0081]	Gly Ser Lys Ser Asp Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln		
[0082]	65	70	75
[0083]	Ser Asp Asp Asp Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ala Trp Asp Asp Ser Leu		80
[0084]	85	90	95
[0085]	Asn Ala Asp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu		
[0086]	100	105	110
[0087]	<210> 5		
[0088]	<211> 122		
[0089]	<212> PRT		
[0090]	<213> Homo sapians		
[0091]	<400> 5		
[0092]	Met Ala Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro		
[0093]	1	5	10
[0094]	15		
[0095]	Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr		
[0096]	20	25	30
[0097]	Ser His Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu		
[0098]	35	40	45
[0099]	Trp Met Gly Val Ile Asn Pro Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Gln		
[0100]	50	55	60
[0101]	Lys Phe Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr		
[0102]	65	70	75
[0103]	80	85	90
[0104]	85	90	95
[0105]	Trp Cys Ala Arg Arg Ser Glu Ala Tyr Tyr His Gly Met Asp Val Trp		
[0106]	100	105	110
[0107]	Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
[0108]	115	120	
[0109]	<210> 6		
[0110]	<211> 110		
[0111]	<212> PRT		
[0112]	<213> Homo sapians		
[0113]	<400> 6		
[0114]	Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Ala Thr Pro Gly Gln		
[0115]	1	5	10
[0116]	15		
[0117]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asp Ser Asn Ile Gly Thr Asn		
[0118]	20	25	30

[0117] Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Gly Thr Ala Pro Gln Pro Leu  
 [0118] 35 40 45  
 [0119] Ile Tyr Arg Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser  
 [0120] 50 55 60  
 [0121] Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg  
 [0122] 65 70 75 80  
 [0123] Ser Glu Asp Glu Ala Thr Tyr Phe Cys Ser Thr Trp Asp Asp Ser Leu  
 [0124] 85 90 95  
 [0125] Asn Gly Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu  
 [0126] 100 105 110  
 [0127] <210> 7  
 [0128] <211> 119  
 [0129] <212> PRT  
 [0130] <213> Homo sapians  
 [0131] <400> 7  
 [0132] Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala  
 [0133] 1 5 10 15  
 [0134] Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ser Asp Asn  
 [0135] 20 25 30  
 [0136] Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
 [0137] 35 40 45  
 [0138] Gly Trp Ile Asn Thr Lys Ile Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe  
 [0139] 50 55 60  
 [0140] Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ile Ser Thr Thr Tyr  
 [0141] 65 70 75 80  
 [0142] Leu Gln Ile Ser Ser Leu Gln Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 [0143] 85 90 95  
 [0144] Ala Arg Glu His Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly  
 [0145] 100 105 110  
 [0146] Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 [0147] 115  
 [0148] <210> 8  
 [0149] <211> 111  
 [0150] <212> PRT  
 [0151] <213> Homo sapians  
 [0152] <400> 8  
 [0153] Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Arg Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln  
 [0154] 1 5 10 15  
 [0155] Ser Ile Thr Thr Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr

[0156]	20	25	30
[0157]	Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu		
[0158]	35	40	45
[0159]	Met Ile Tyr Glu Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe		
[0160]	50	55	60
[0161]	Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu		
[0162]	65	70	75
[0163]	Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser		
[0164]	85	90	95
[0165]	Ser Thr Leu Glu Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu		
[0166]	100	105	110
[0167]	<210> 9		
[0168]	<211> 131		
[0169]	<212> PRT		
[0170]	<213> Homo sapians		
[0171]	<400> 9		
[0172]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0173]	1	5	10
[0174]	15		
[0175]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Thr Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr		
[0176]	20	25	30
[0177]	Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[0178]	35	40	45
[0179]	Ser Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val		
[0180]	50	55	60
[0181]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr		
[0182]	65	70	75
[0183]	80		
[0184]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0185]	85	90	95
[0186]	Ala Arg Asp Thr Leu Glu Tyr Tyr Gly Ser Gly Ile Leu Glu Asn Ala		
[0187]	100	105	110
[0188]	105		
[0189]	Met Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr		
[0190]	115	120	125
[0191]	Val Ser Ser		
[0192]	130		
[0193]	<210> 10		
[0194]	<211> 110		
[0195]	<212> PRT		
[0196]	<213> Homo sapians		
[0197]	<400> 10		

[0195]	Tyr Glu Leu Met Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg			
[0196]	1	5	10	15
[0197]	Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Asn Ile Gly Ala Ala Tyr			
[0198]	20	25	30	
[0199]	Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Val			
[0200]	35	40	45	
[0201]	Met Phe Ala Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser			
[0202]	50	55	60	
[0203]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln			
[0204]	65	70	75	80
[0205]	Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ile Ser Leu			
[0206]	85	90	95	
[0207]	Arg Ala Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu			
[0208]	100	105	110	
[0209]	<210> 11			
[0210]	<211> 119			
[0211]	<212> PRT			
[0212]	<213> Homo sapians			
[0213]	<400> 11			
[0214]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Arg Pro Gly Gly			
[0215]	1	5	10	15
[0216]	Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Asp Tyr			
[0217]	20	25	30	
[0218]	Tyr Met Thr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile			
[0219]	35	40	45	
[0220]	Ala Tyr Ile Ser Asp Ser Gly Gln Thr Val His Tyr Ala Asp Ser Val			
[0221]	50	55	60	
[0222]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Asn Ser Leu Phe			
[0223]	65	70	75	80
[0224]	Leu Gln Val Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0225]	85	90	95	
[0226]	Ala Arg Glu Asp Leu Leu Gly Tyr Tyr Leu Gln Ser Trp Gly Gln Gly			
[0227]	100	105	110	
[0228]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[0229]	115			
[0230]	<210> 12			
[0231]	<211> 110			
[0232]	<212> PRT			
[0233]	<213> Homo sapians			

[0234]	<400> 12			
[0235]	Ser Tyr Glu Leu Met Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln			
[0236]	1	5	10	15
[0237]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Thr Asn			
[0238]	20	25	30	
[0239]	Thr Val Asn Trp Tyr Gln His Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu			
[0240]	35	40	45	
[0241]	Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser			
[0242]	50	55	60	
[0243]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln			
[0244]	65	70	75	80
[0245]	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Pro			
[0246]	85	90	95	
[0247]	Asn Gly Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu			
[0248]	100	105	110	
[0249]	<210> 13			
[0250]	<211> 118			
[0251]	<212> PRT			
[0252]	<213> Homo sapiens			
[0253]	<400> 13			
[0254]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg			
[0255]	1	5	10	15
[0256]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr			
[0257]	20	25	30	
[0258]	Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[0259]	35	40	45	
[0260]	Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Val Asp Ser Val			
[0261]	50	55	60	
[0262]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr			
[0263]	65	70	75	80
[0264]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0265]	85	90	95	
[0266]	Ala Arg Glu Gly Glu His Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr			
[0267]	100	105	110	
[0268]	Met Val Thr Val Ser Ser			
[0269]	115			
[0270]	<210> 14			
[0271]	<211> 109			
[0272]	<212> PRT			

[0273] <213> Homo sapians

[0274] <400> 14

[0275] Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln

[0276] 1 5 10 15

[0277] Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Asn Ser Asn Ile Ala Asp Thr

[0278] 20 25 30

[0279] Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Arg Leu Leu

[0280] 35 40 45

[0281] Ile Tyr Asp Asn Asp Gln Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

[0282] 50 55 60

[0283] Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln

[0284] 65 70 75 80

[0285] Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Ser Ser Leu

[0286] 85 90 95

[0287] Ser Gly Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu

[0288] 100 105

[0289] <210> 15

[0290] <211> 119

[0291] <212> PRT

[0292] <213> Homo sapians

[0293] <400> 15

[0294] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala

[0295] 1 5 10 15

[0296] Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ser Asp Asn

[0297] 20 25 30

[0298] Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

[0299] 35 40 45

[0300] Gly Trp Ile Asn Thr Lys Ile Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe

[0301] 50 55 60

[0302] Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Thr Tyr

[0303] 65 70 75 80

[0304] Leu Gln Ile Ser Ser Leu Gln Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0305] 85 90 95

[0306] Ala Arg Glu His Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly

[0307] 100 105 110

[0308] Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

[0309] 115

[0310] <210> 16

[0311] <211> 109

- [0312] <212> PRT
- [0313] <213> Homo sapians
- [0314] <400> 16
- [0315] Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln
- [0316] 1 5 10 15
- [0317] Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asp Val Gly Ala Tyr
- [0318] 20 25 30
- [0319] Asn Phe Val Ser Trp Tyr Arg Gln Tyr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
- [0320] 35 40 45
- [0321] Leu Ile Tyr Glu Val Asn Lys Arg Pro Ser Asp Val Pro Asp Arg Phe
- [0322] 50 55 60
- [0323] Ser Gly Ser Lys Phe Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Val Ser Gly Leu
- [0324] 65 70 75 80
- [0325] Gln Ala Asp Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Ala Gly Ser
- [0326] 85 90 95
- [0327] Thr Asp Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu
- [0328] 100 105
- [0329] <210> 17
- [0330] <211> 119
- [0331] <212> PRT
- [0332] <213> Homo sapians
- [0333] <400> 17
- [0334] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
- [0335] 1 5 10 15
- [0336] Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ser Asp Asn
- [0337] 20 25 30
- [0338] Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
- [0339] 35 40 45
- [0340] Gly Trp Ile Asn Thr Lys Ile Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe
- [0341] 50 55 60
- [0342] Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Thr Tyr
- [0343] 65 70 75 80
- [0344] Leu Gln Ile Ser Ser Leu Gln Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
- [0345] 85 90 95
- [0346] Ala Arg Glu His Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly
- [0347] 100 105 110
- [0348] Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
- [0349] 115
- [0350] <210> 18

[0351]	<211> 110															
[0352]	<212> PRT															
[0353]	<213> Homo sapians															
[0354]	<400> 18															
[0355]	Leu	Pro	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Val	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln
[0356]	1				5					10						15
[0357]	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Ser	Asn
[0358]					20				25						30	
[0359]	Thr	Val	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu
[0360]						35			40				45			
[0361]	Ile	Tyr	Thr	Asn	Asn	Gln	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
[0362]						50			55				60			
[0363]	Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser	Gly	Leu	Gln
[0364]		65				70				75					80	
[0365]	Ser	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Trp	Asp	Glu	Ser	Leu
[0366]						85				90					95	
[0367]	Asn	Gly	Asp	Val	Phe	Gly	Thr	Gly	Thr	Lys	Val	Thr	Val	Leu		
[0368]						100			105				110			
[0369]	<210> 19															
[0370]	<211> 120															
[0371]	<212> PRT															
[0372]	<213> Homo sapians															
[0373]	<400> 19															
[0374]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
[0375]	1				5				10						15	
[0376]	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Arg	Tyr
[0377]					20				25					30		
[0378]	Thr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Arg	Leu	Glu	Trp	Met
[0379]					35				40				45			
[0380]	Gly	Trp	Ile	Asn	Ala	Gly	Asn	Gly	Asn	Thr	Lys	Tyr	Ser	Gln	Lys	Phe
[0381]					50				55				60			
[0382]	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Ala	Ser	Thr	Ala	Tyr
[0383]		65				70				75					80	
[0384]	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0385]						85			90					95		
[0386]	Ala	Lys	Val	Ser	Ala	Gly	Thr	Glu	Ser	Trp	Phe	Asp	Pro	Trp	Gly	Gln
[0387]						100			105				110			
[0388]	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser								
[0389]				115			120									

[0390]	<210> 20			
[0391]	<211> 107			
[0392]	<212> PRT			
[0393]	<213> Homo sapians			
[0394]	<400> 20			
[0395]	Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly			
[0396]	1	5	10	15
[0397]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Thr Ser Gln Asn Ile Tyr Asn Tyr			
[0398]	20	25	30	
[0399]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile			
[0400]	35	40	45	
[0401]	Phe Val Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
[0402]	50	55	60	
[0403]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
[0404]	65	70	75	80
[0405]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Phe Cys Leu Gln Asp His Ser Tyr Pro Tyr			
[0406]	85	90	95	
[0407]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
[0408]	100	105		
[0409]	<210> 21			
[0410]	<211> 117			
[0411]	<212> PRT			
[0412]	<213> Homo sapians			
[0413]	<400> 21			
[0414]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala			
[0415]	1	5	10	15
[0416]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr			
[0417]	20	25	30	
[0418]	Gly Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
[0419]	35	40	45	
[0420]	Gly Trp Ile Ser Ala Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Leu			
[0421]	50	55	60	
[0422]	Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr			
[0423]	65	70	75	80
[0424]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0425]	85	90	95	
[0426]	Ala Arg Gly Leu Tyr Gly Asp Glu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu			
[0427]	100	105	110	
[0428]	Val Thr Val Ser Ser			

[0429]	115		
[0430]	<210>	22	
[0431]	<211>	110	
[0432]	<212>	PRT	
[0433]	<213>	Homo sapians	
[0434]	<400>	22	
[0435]	Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Glu Val Pro Gly Gln		
[0436]	1	5	10
[0437]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Gly Ile Ser Asn Ile Gly Ser Asn		15
[0438]	20	25	30
[0439]	Ala Val Asn Trp Tyr Gln His Phe Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu		
[0440]	35	40	45
[0441]	Ile Tyr Tyr Asn Asp Leu Leu Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser		
[0442]	50	55	60
[0443]	Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg		
[0444]	65	70	75
[0445]	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Asn Leu		80
[0446]	85	90	95
[0447]	Ser Ala Tyr Val Phe Ala Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu		
[0448]	100	105	110
[0449]	<210>	23	
[0450]	<211>	119	
[0451]	<212>	PRT	
[0452]	<213>	Homo sapians	
[0453]	<400>	23	
[0454]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala		
[0455]	1	5	10
[0456]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ser Asp Asn		15
[0457]	20	25	30
[0458]	Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
[0459]	35	40	45
[0460]	Gly Trp Ile Asn Thr Lys Ile Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe		
[0461]	50	55	60
[0462]	Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ile Ser Thr Thr Tyr		
[0463]	65	70	75
[0464]	Leu Gln Ile Ser Ser Leu Gln Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		80
[0465]	85	90	95
[0466]	Ala Arg Glu His Asp Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly		
[0467]	100	105	110

[0468] Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 [0469] 115  
 [0470] <210> 24  
 [0471] <211> 111  
 [0472] <212> PRT  
 [0473] <213> Homo sapians  
 [0474] <400> 24  
 [0475] Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Ser Pro Gly Gln  
 [0476] 1 5 10 15  
 [0477] Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr  
 [0478] 20 25 30  
 [0479] Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln His His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu  
 [0480] 35 40 45  
 [0481] Met Ile Tyr Glu Val Ser Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe  
 [0482] 50 55 60  
 [0483] Ser Gly Ser Lys Ser Ala Ile Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu  
 [0484] 65 70 75 80  
 [0485] Leu Thr Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ala Trp Asp Asp Ser  
 [0486] 85 90 95  
 [0487] Leu Asn Ala Asp Val Phe Gly Gly Thr Lys Val Thr Val Leu  
 [0488] 100 105 110  
 [0489] <210> 25  
 [0490] <211> 125  
 [0491] <212> PRT  
 [0492] <213> Homo sapians  
 [0493] <400> 25  
 [0494] Gln Met Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
 [0495] 1 5 10 15  
 [0496] Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
 [0497] 20 25 30  
 [0498] Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
 [0499] 35 40 45  
 [0500] Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe  
 [0501] 50 55 60  
 [0502] Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr  
 [0503] 65 70 75 80  
 [0504] Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
 [0505] 85 90 95  
 [0506] Ala Ser Gly Val Thr Arg Lys Arg Tyr Ser Ser Trp Pro Pro Phe

[0507]	100	105	110
[0508]	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0509]	115	120	125
[0510]	<210> 26		
[0511]	<211> 107		
[0512]	<212> PRT		
[0513]	<213> Homo sapians		
[0514]	<400> 26		
[0515]	Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[0516]	1 5 10 15		
[0517]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Thr Tyr		
[0518]	20 25 30		
[0519]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Val Leu Ile		
[0520]	35 40 45		
[0521]	Thr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		
[0522]	50 55 60		
[0523]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro		
[0524]	65 70 75 80		
[0525]	Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asp Asp Leu Pro Pro		
[0526]	85 90 95		
[0527]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
[0528]	100 105		
[0529]	<210> 27		
[0530]	<211> 120		
[0531]	<212> PRT		
[0532]	<213> Homo sapians		
[0533]	<400> 27		
[0534]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Ser Ser Glu		
[0535]	1 5 10 15		
[0536]	Thr Leu Ser Leu Ser Cys Ala Val Tyr Gly Gly Thr Phe Arg Asp Asp		
[0537]	20 25 30		
[0538]	His Trp Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile		
[0539]	35 40 45		
[0540]	Gly Glu Ser His His Thr Gly Arg Thr Ile Tyr Asn Pro Ser Leu Arg		
[0541]	50 55 60		
[0542]	Ser Arg Val Thr Met Ser Ile Asp Thr Ser Lys Asn Glu Phe Ser Leu		
[0543]	65 70 75 80		
[0544]	Ile Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Ala		
[0545]	85 90 95		

[0546]	Arg Gly Asn Asn Tyr Val Trp Gly Asn Gln Glu Asp Phe Trp Gly Gln			
[0547]		100	105	110
[0548]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser			
[0549]		115	120	
[0550]	<210> 28			
[0551]	<211> 110			
[0552]	<212> PRT			
[0553]	<213> Homo sapians			
[0554]	<400> 28			
[0555]	Gln Ala Gly Leu Thr Gln Pro Arg Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln			
[0556]	1	5	10	15
[0557]	Ser Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr			
[0558]		20	25	30
[0559]	Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu			
[0560]		35	40	45
[0561]	Met Ile Tyr Asp Val Thr Lys Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe			
[0562]		50	55	60
[0563]	Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Thr Ile Ser Gly Leu			
[0564]	65	70	75	80
[0565]	Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Thr Ser Ser			
[0566]		85	90	95
[0567]	Ser Thr Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Val Thr Val Leu			
[0568]		100	105	110
[0569]	<210> 29			
[0570]	<211> 121			
[0571]	<212> PRT			
[0572]	<213> Homo sapians			
[0573]	<400> 29			
[0574]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln			
[0575]	1	5	10	15
[0576]	Thr Leu Ser Leu Ser Cys Asp Ile Ser Gly Asp Ser Val Ser Ser Asn			
[0577]		20	25	30
[0578]	Ser Ala Thr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Ser Pro Ser Arg Gly Leu Glu			
[0579]		35	40	45
[0580]	Trp Leu Gly Arg Thr Phe Tyr Arg Ser Lys Trp Tyr His Asp Tyr Ala			
[0581]		50	55	60
[0582]	Leu Ser Val Lys Ser Arg Ile Thr Ile Asn Pro Asp Thr Ser Lys Asn			
[0583]		65	70	75
[0584]	Gln Phe Ser Leu Gln Leu Asn Ser Val Ser Pro Gly Asp Thr Ala Val			80

[0585]	85	90	95
[0586]	Tyr Phe Cys Val Arg Glu Asp Ile Asp Gly Arg Leu Asp Tyr Trp Gly		
[0587]	100	105	110
[0588]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[0589]	115	120	
[0590]	<210> 30		
[0591]	<211> 111		
[0592]	<212> PRT		
[0593]	<213> Homo sapians		
[0594]	<400> 30		
[0595]	Gln Pro Val Leu Thr Gln Pro Ala Ser Val Ser Gly Ser Pro Gly Gln		
[0596]	1 5 10 15		
[0597]	Ser Ile Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Ser Ser Asp Val Gly Gly Tyr		
[0598]	20 25 30		
[0599]	Asn Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln His Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu		
[0600]	35 40 45		
[0601]	Met Ile Tyr Asp Val Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Ser Asn Arg Phe		
[0602]	50 55 60		
[0603]	Ser Gly Ser Lys Ser Gly Asn Thr Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu		
[0604]	65 70 75 80		
[0605]	Gln Ser Asp Asp Asp Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ala Trp Asp Asp Ser		
[0606]	85 90 95		
[0607]	Leu Asn Ala Asp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu		
[0608]	100 105 110		
[0609]	<210> 31		
[0610]	<211> 123		
[0611]	<212> PRT		
[0612]	<213> Homo sapians		
[0613]	<400> 31		
[0614]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Ala Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[0615]	1 5 10 15		
[0616]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp His		
[0617]	20 25 30		
[0618]	Tyr Met Asp Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[0619]	35 40 45		
[0620]	Ala Arg Ser Arg Asn Lys Gly Asn Ser Tyr Thr Glu Tyr Ala Ala		
[0621]	50 55 60		
[0622]	Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Asn Ser		
[0623]	65 70 75 80		

[0624]	Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr			
[0625]		85	90	95
[0626]	Tyr Cys Val Arg Val Gly Val Val Pro Ala Leu Asp Gly Met Asp Val			
[0627]		100	105	110
[0628]	Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser			
[0629]		115	120	
[0630]	<210> 32			
[0631]	<211> 110			
[0632]	<212> PRT			
[0633]	<213> Homo sapians			
[0634]	<400> 32			
[0635]	Gln Ala Gly Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Lys Gly Leu Arg Gln			
[0636]	1	5	10	15
[0637]	Thr Ala Thr Leu Thr Cys Thr Gly Asn Ser Asn Asn Ile Gly Asp Gln			
[0638]		20	25	30
[0639]	Gly Ala Ala Trp Leu Gln Gln His Gln Gly His Pro Pro Arg Leu Leu			
[0640]		35	40	45
[0641]	Ser Tyr Arg Asn Asn Asn Arg Pro Ser Gly Ile Ser Glu Arg Leu Ser			
[0642]		50	55	60
[0643]	Ala Ser Arg Ser Gly Asn Ile Ala Ser Leu Thr Ile Thr Gly Leu Gln			
[0644]		65	70	75
[0645]	75	80		
[0646]	Pro Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ala Trp Asp Ser Ser Leu			
[0647]		85	90	95
[0648]	Ser Val Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu			
[0649]		100	105	110
[0649]	<210> 33			
[0650]	<211> 131			
[0651]	<212> PRT			
[0652]	<213> Homo sapians			
[0653]	<400> 33			
[0654]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
[0655]	1	5	10	15
[0656]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr			
[0657]		20	25	30
[0658]	Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[0659]		35	40	45
[0660]	Ser Ser Ile Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
[0661]		50	55	60
[0662]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr			

[0663]	65	70	75	80
[0664]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0665]		85	90	95
[0666]	Ala Arg Asp Thr Leu Glu Tyr Tyr Gly Ser Gly Ile Leu Glu Asn Ala			
[0667]		100	105	110
[0668]	Met Gly Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr			
[0669]		115	120	125
[0670]	Val Ser Ser			
[0671]		130		
[0672]	<210> 34			
[0673]	<211> 110			
[0674]	<212> PRT			
[0675]	<213> Homo sapians			
[0676]	<400> 34			
[0677]	Gln Ala Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln			
[0678]	1	5	10	15
[0679]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn			
[0680]		20	25	30
[0681]	Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu			
[0682]		35	40	45
[0683]	Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser			
[0684]		50	55	60
[0685]	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Gln			
[0686]	65	70	75	80
[0687]	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu			
[0688]		85	90	95
[0689]	Asn Gly Tyr Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu			
[0690]		100	105	110
[0691]	<210> 35			
[0692]	<211> 123			
[0693]	<212> PRT			
[0694]	<213> Homo sapians			
[0695]	<400> 35			
[0696]	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Val Val Gln Thr Gly Arg			
[0697]	1	5	10	15
[0698]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ser Asp Ser Gly Ser Thr Phe Arg Ser Gln			
[0699]		20	25	30
[0700]	Ala Met His Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu			
[0701]		35	40	45

[0702] Ala Val Thr Ser His Asp Gly Ser Lys Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
[0703] 50 55 60  
[0704] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
[0705] 65 70 75 80  
[0706] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Gly Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
[0707] 85 90 95  
[0708] Ala Arg Gly Gly Arg Gly Tyr Thr Tyr Asp His Ser Phe Phe Asp Tyr  
[0709] 100 105 110  
[0710] Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
[0711] 115 120  
[0712] <210> 36  
[0713] <211> 107  
[0714] <212> PRT  
[0715] <213> Homo sapians  
[0716] <400> 36  
[0717] Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
[0718] 1 5 10 15  
[0719] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Arg Asn Leu  
[0720] 20 25 30  
[0721] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Glu Leu Leu Ile  
[0722] 35 40 45  
[0723] His Gly Ala Ser Thr Leu Gly Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
[0724] 50 55 60  
[0725] Gly Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro  
[0726] 65 70 75 80  
[0727] Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Glu Ser Tyr Phe Asn  
[0728] 85 90 95  
[0729] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
[0730] 100 105  
[0731] <210> 37  
[0732] <211> 119  
[0733] <212> PRT  
[0734] <213> Homo sapians  
[0735] <400> 37  
[0736] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala  
[0737] 1 5 10 15  
[0738] Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ser Asp Asn  
[0739] 20 25 30  
[0740] Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

[0741]	35	40	45
[0742]	Gly Trp Ile Asn Thr Lys Asp Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe		
[0743]	50	55	60
[0744]	Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ile Ser Thr Thr Tyr		
[0745]	65	70	75
[0746]	Leu Gln Ile Ser Ser Leu Gln Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0747]	85	90	95
[0748]	Ala Arg Glu His Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly		
[0749]	100	105	110
[0750]	Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
[0751]	115		
[0752]	<210> 38		
[0753]	<211> 119		
[0754]	<212> PRT		
[0755]	<213> Homo sapians		
[0756]	<400> 38		
[0757]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala		
[0758]	1 5 10 15		
[0759]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ile Phe Ser Asp Asn		
[0760]	20 25 30		
[0761]	Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
[0762]	35 40 45		
[0763]	Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe		
[0764]	50 55 60		
[0765]	Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ile Ser Thr Thr Tyr		
[0766]	65 70 75 80		
[0767]	Leu Gln Ile Ser Ser Leu Gln Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0768]	85 90 95		
[0769]	Ala Arg Glu His Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly		
[0770]	100 105 110		
[0771]	Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
[0772]	115		
[0773]	<210> 39		
[0774]	<211> 119		
[0775]	<212> PRT		
[0776]	<213> Homo sapians		
[0777]	<400> 39		
[0778]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala		
[0779]	1 5 10 15		

[0780] Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asp Asn  
[0781] 20 25 30  
[0782] Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
[0783] 35 40 45  
[0784] Gly Trp Ile Asn Thr Lys Asp Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe  
[0785] 50 55 60  
[0786] Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ile Ser Thr Thr Tyr  
[0787] 65 70 75 80  
[0788] Leu Gln Ile Ser Ser Leu Gln Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
[0789] 85 90 95  
[0790] Ala Arg Glu His Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly  
[0791] 100 105 110  
[0792] Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
[0793] 115  
[0794] <210> 40  
[0795] <211> 118  
[0796] <212> PRT  
[0797] <213> Homo sapians  
[0798] <400> 40  
[0799] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala  
[0800] 1 5 10 15  
[0801] Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Asp Asn  
[0802] 20 25 30  
[0803] Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met  
[0804] 35 40 45  
[0805] Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe  
[0806] 50 55 60  
[0807] Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ile Ser Thr Thr Tyr  
[0808] 65 70 75 80  
[0809] Leu Gln Ile Ser Ser Leu Gln Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
[0810] 85 90 95  
[0811] Ala Arg Glu His Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly  
[0812] 100 105 110  
[0813] Thr Thr Val Thr Val Ser  
[0814] 115  
[0815] <210> 41  
[0816] <211> 119  
[0817] <212> PRT  
[0818] <213> Homo sapians

[0819]	<400> 41			
[0820]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala			
[0821]	1	5	10	15
[0822]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Ser Asp Asn			
[0823]	20	25	30	
[0824]	Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
[0825]	35	40	45	
[0826]	Gly Trp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe			
[0827]	50	55	60	
[0828]	Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ile Ser Thr Thr Tyr			
[0829]	65	70	75	80
[0830]	Leu Gln Ile Ser Ser Leu Gln Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0831]	85	90	95	
[0832]	Ala Arg Glu His Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly			
[0833]	100	105	110	
[0834]	Thr Thr Val Thr Val Ser Ser			
[0835]	115			
[0836]	<210> 42			
[0837]	<211> 119			
[0838]	<212> PRT			
[0839]	<213> Homo sapians			
[0840]	<400> 42			
[0841]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala			
[0842]	1	5	10	15
[0843]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Ser Asp Asn			
[0844]	20	25	30	
[0845]	Gly Val Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met			
[0846]	35	40	45	
[0847]	Gly Trp Ile Asn Thr Lys Thr Gly Asn Pro Thr Tyr Ala Gln Gly Phe			
[0848]	50	55	60	
[0849]	Thr Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Ile Ser Thr Thr Tyr			
[0850]	65	70	75	80
[0851]	Leu Gln Ile Ser Ser Leu Gln Ala Gly Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0852]	85	90	95	
[0853]	Ala Arg Glu His Asp Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly			
[0854]	100	105	110	
[0855]	Thr Thr Val Thr Val Ser Ser			
[0856]	115			
[0857]	<210> 43			

[0858]	<211> 119															
[0859]	<212> PRT															
[0860]	<213> Homo sapians															
[0861]	<400> 43															
[0862]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
[0863]	1				5					10						15
[0864]	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Ser	Asp	Asn
[0865]						20				25						30
[0866]	Gly	Val	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
[0867]						35				40						45
[0868]	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Lys	Ser	Gly	Asn	Pro	Thr	Tyr	Ala	Gln	Gly	Phe
[0869]						50				55						60
[0870]	Thr	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Thr	Tyr
[0871]						65				70						80
[0872]	Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Gly	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0873]						85				90						95
[0874]	Ala	Arg	Glu	His	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly
[0875]						100				105						110
[0876]	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
[0877]						115										
[0878]	<210> 44															
[0879]	<211> 119															
[0880]	<212> PRT															
[0881]	<213> Homo sapians															
[0882]	<400> 44															
[0883]	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
[0884]	1				5					10						15
[0885]	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Lys	Phe	Ser	Asp	Asn
[0886]						20				25						30
[0887]	Gly	Val	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
[0888]						35				40						45
[0889]	Gly	Trp	Ile	Asn	Thr	Lys	Asp	Gly	Asn	Pro	Thr	Tyr	Ala	Gln	Gly	Phe
[0890]						50				55						60
[0891]	Thr	Gly	Arg	Phe	Val	Phe	Ser	Leu	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Thr	Tyr
[0892]						65				70						80
[0893]	Leu	Gln	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Ala	Gly	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
[0894]						85				90						95
[0895]	Ala	Arg	Glu	His	Asp	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly
[0896]						100				105						110

[0897] Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

[0898] 115

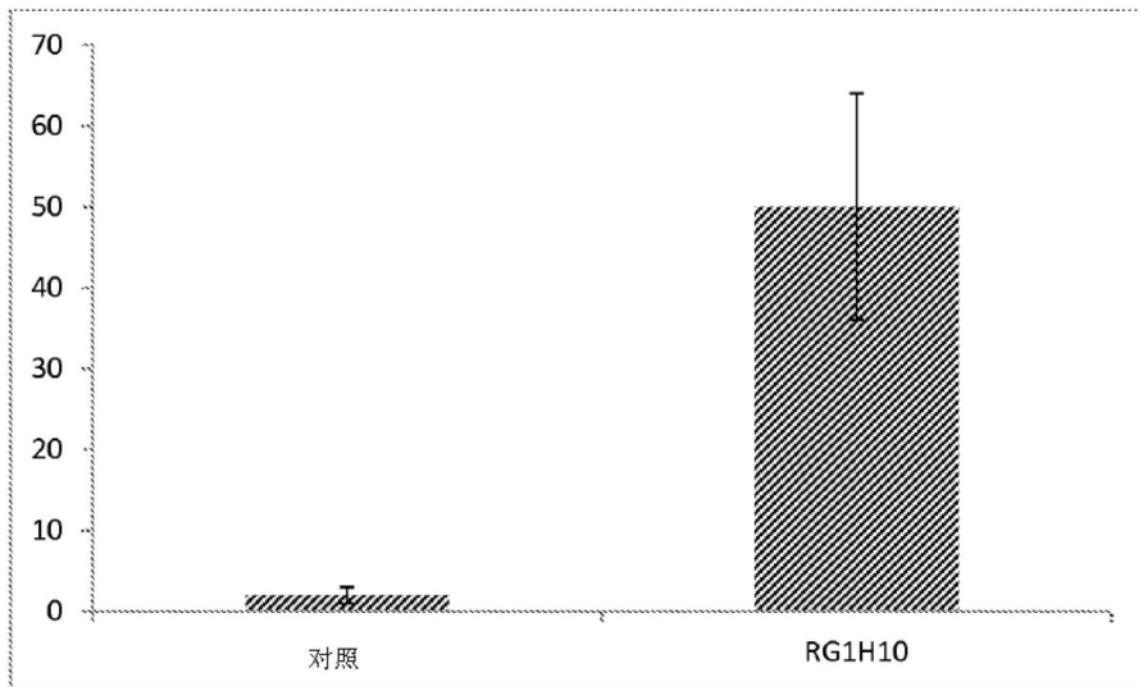


图1

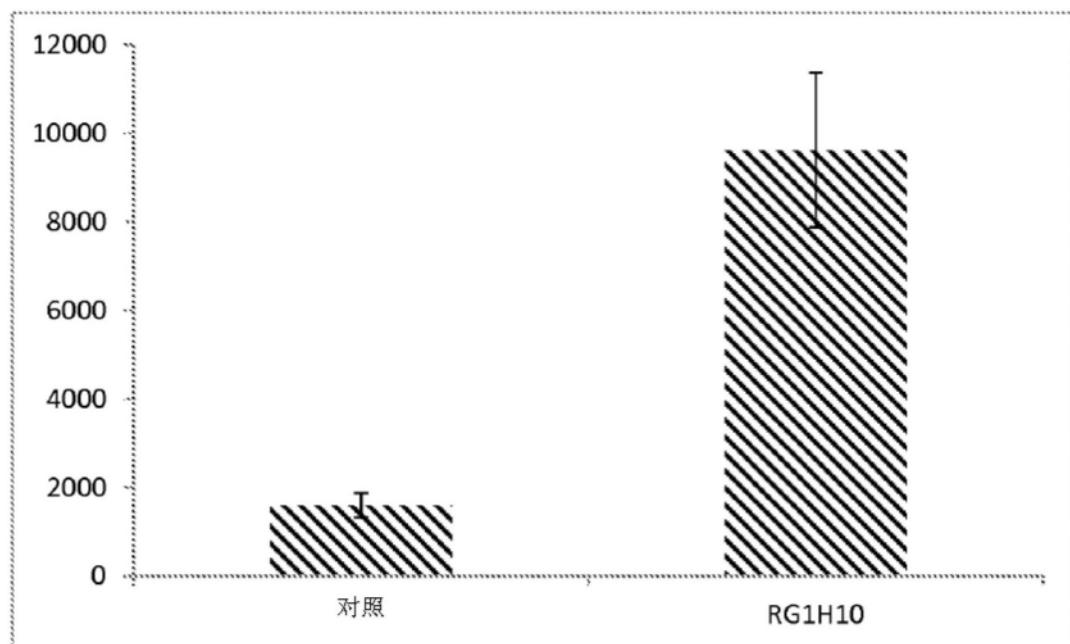


图2

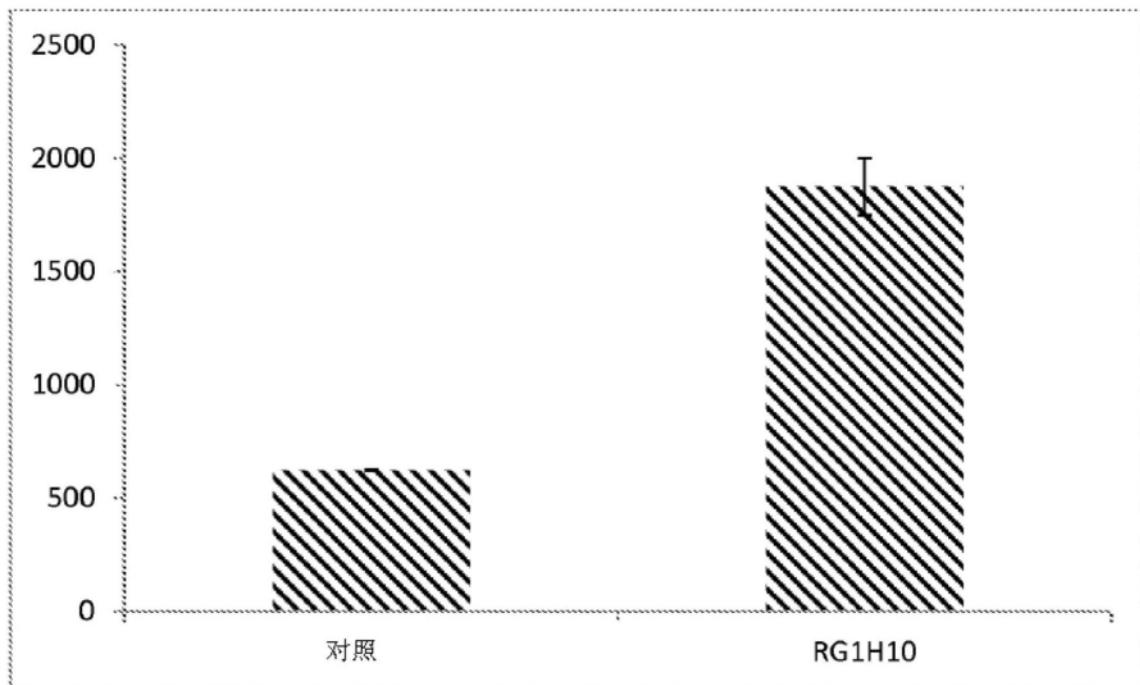


图3

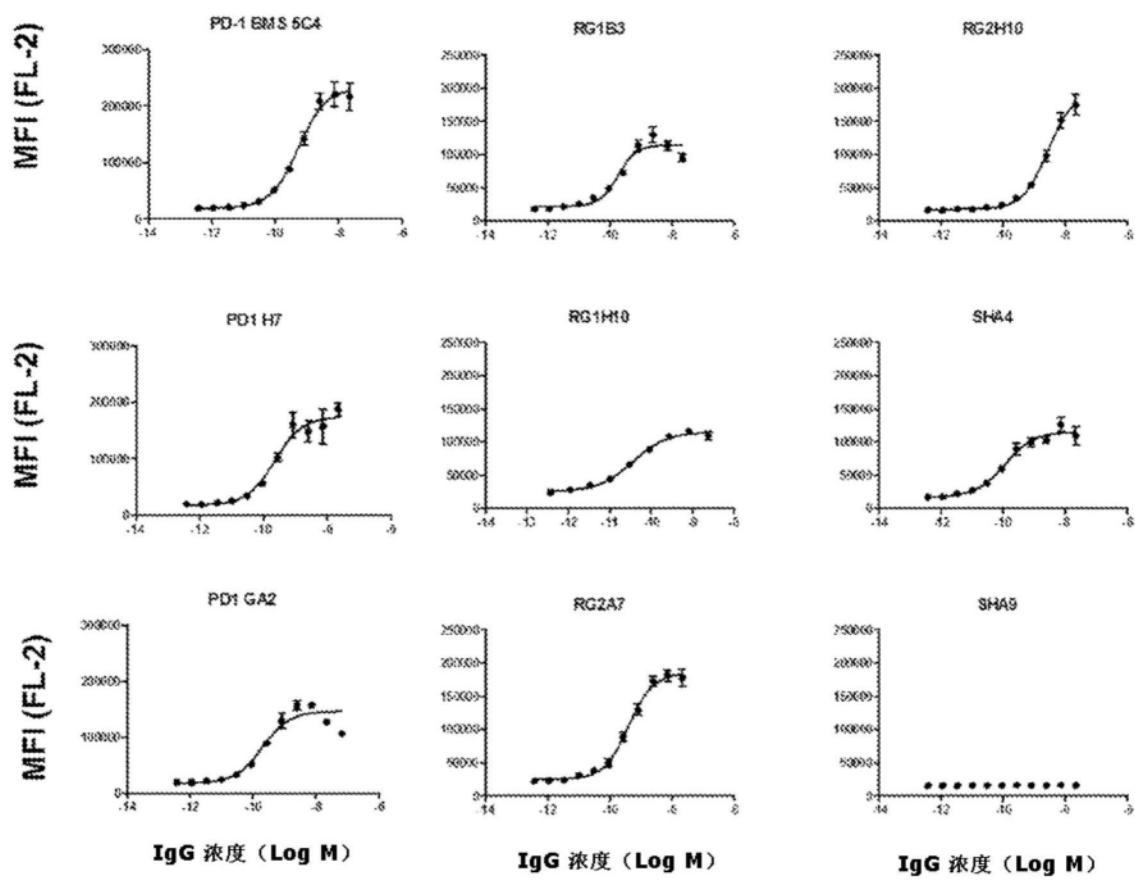


图4

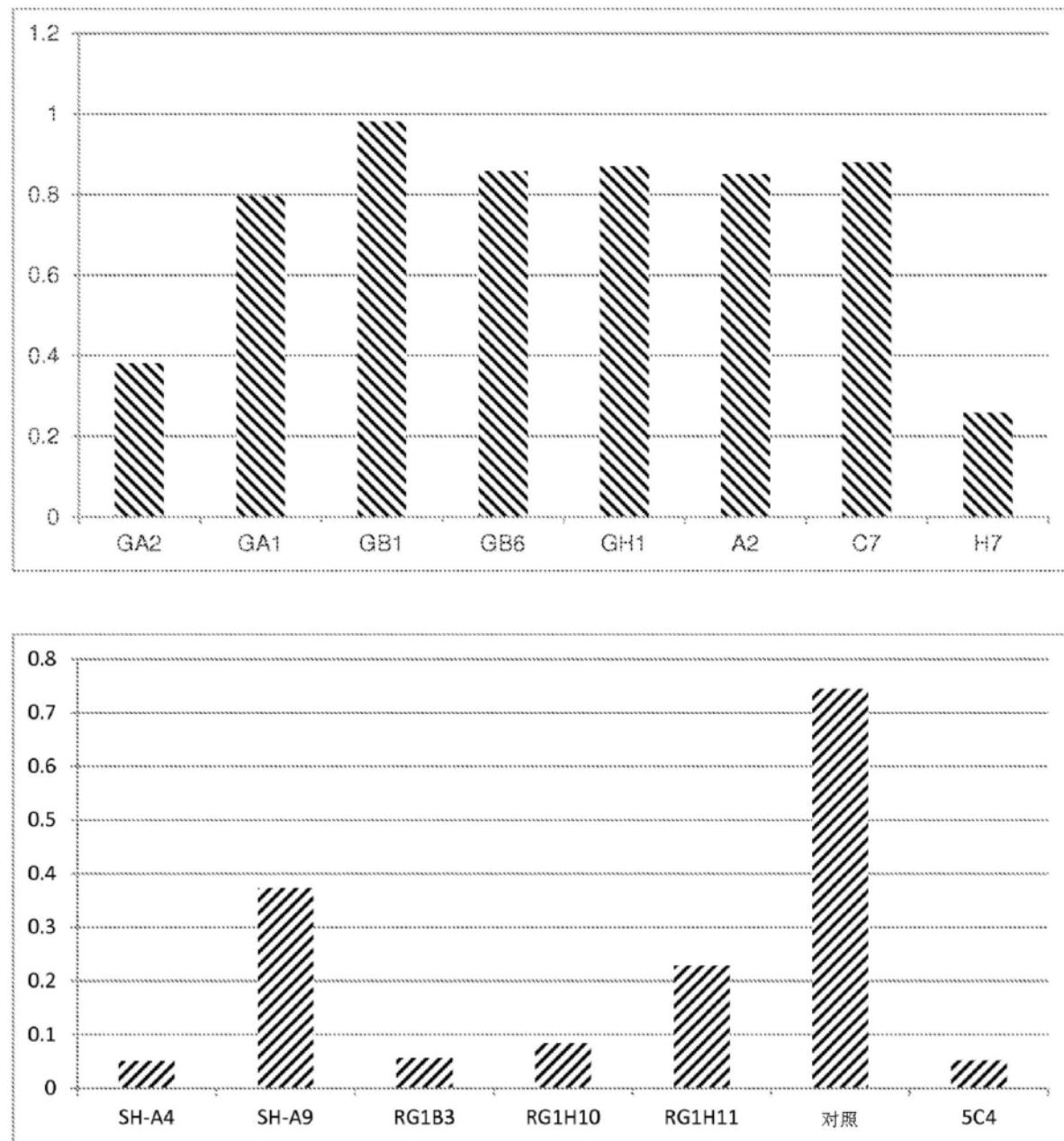


图5

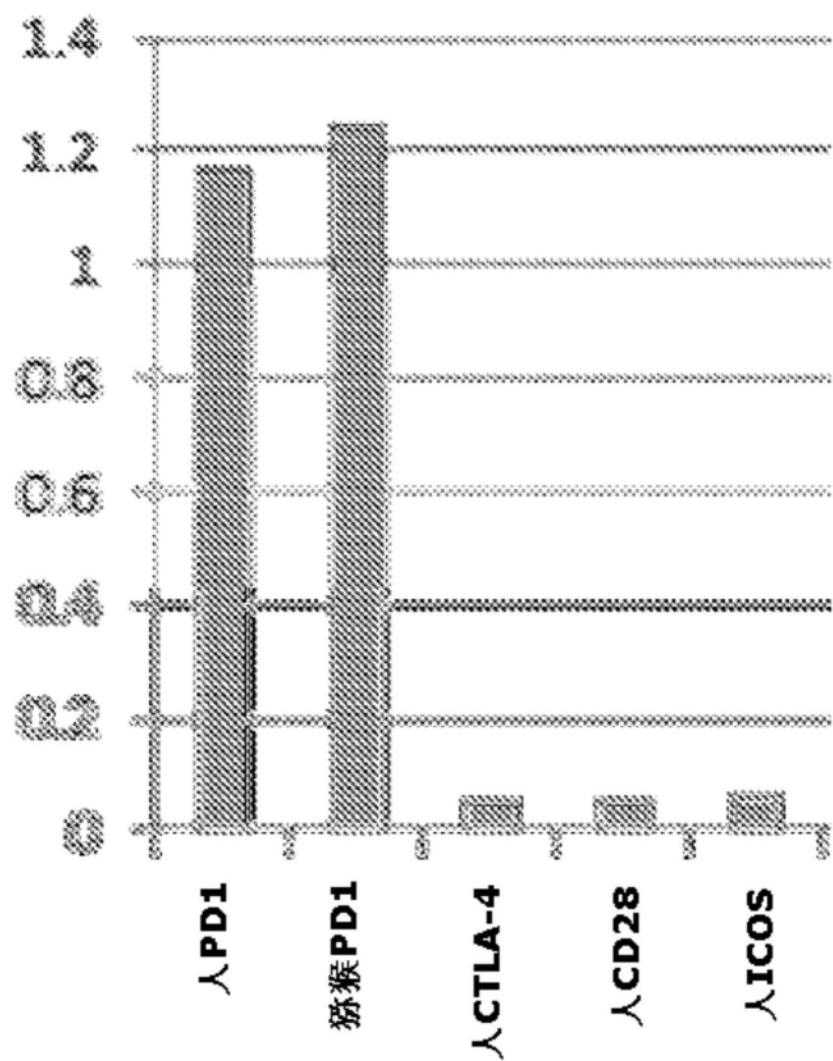


图6

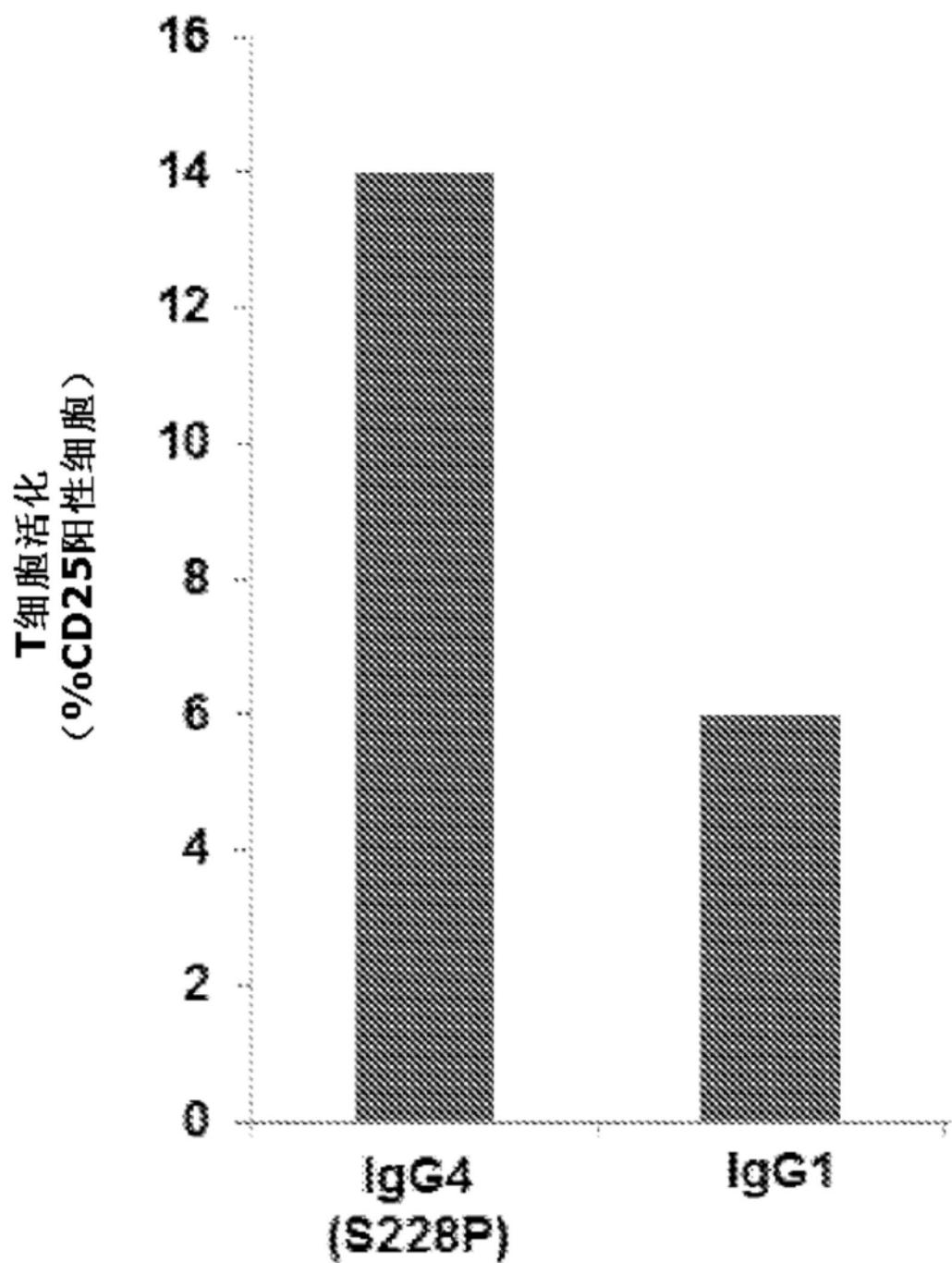


图7

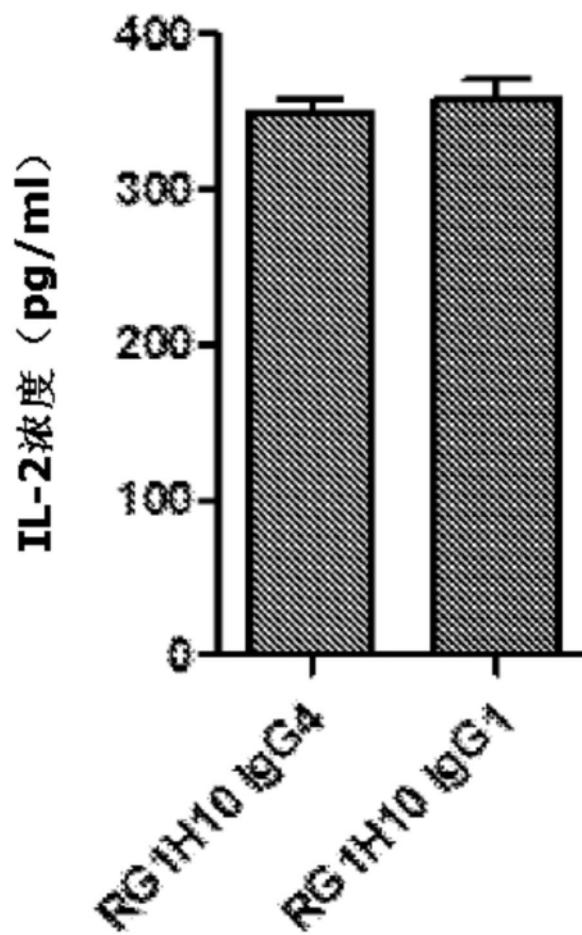


图8

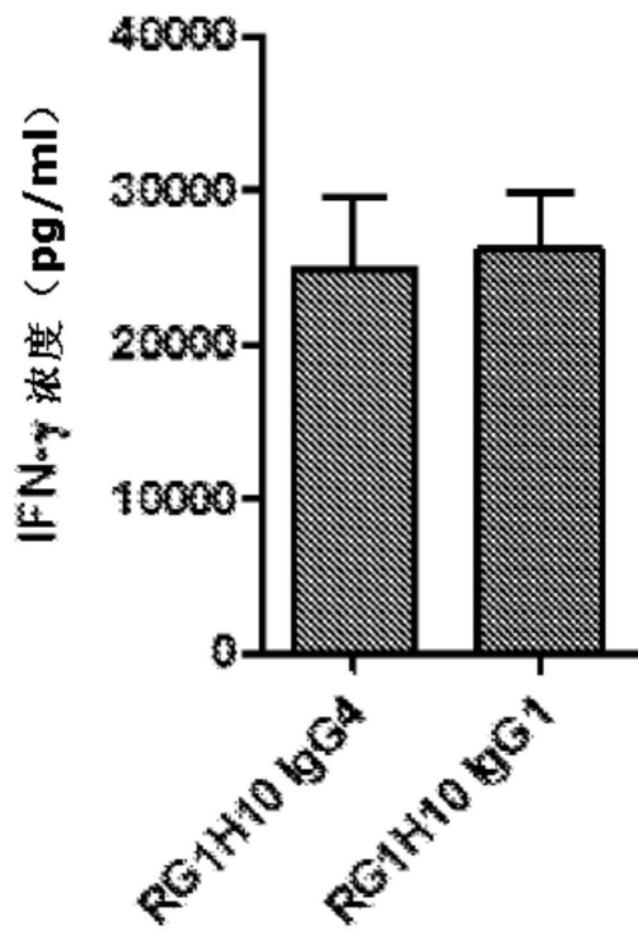
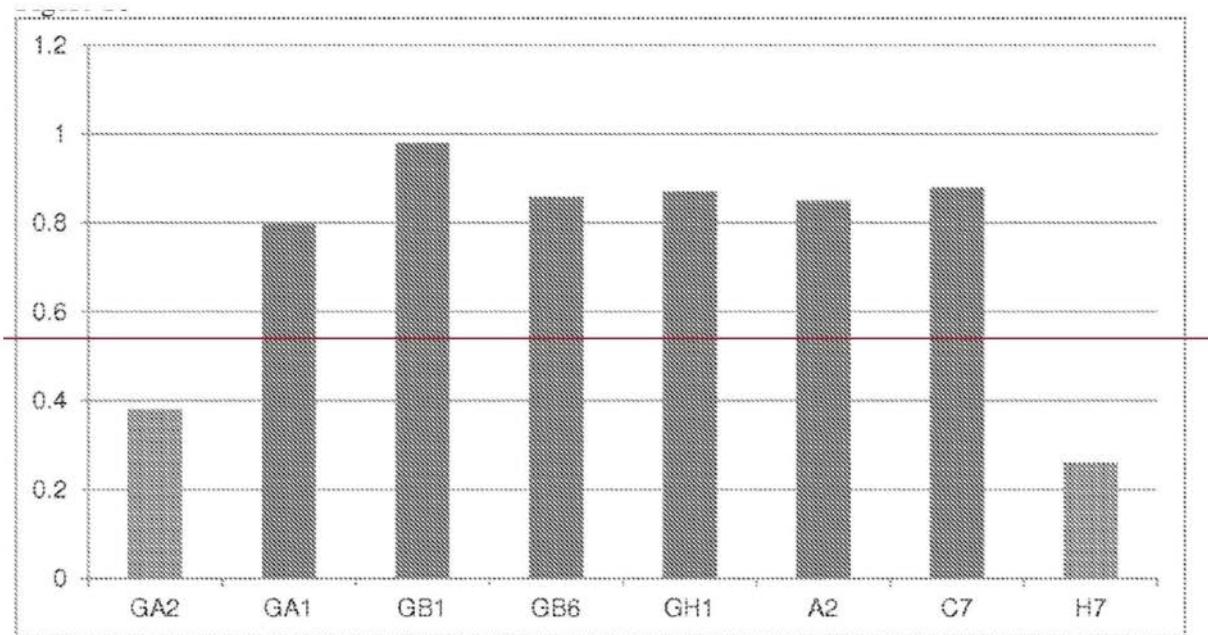


图9



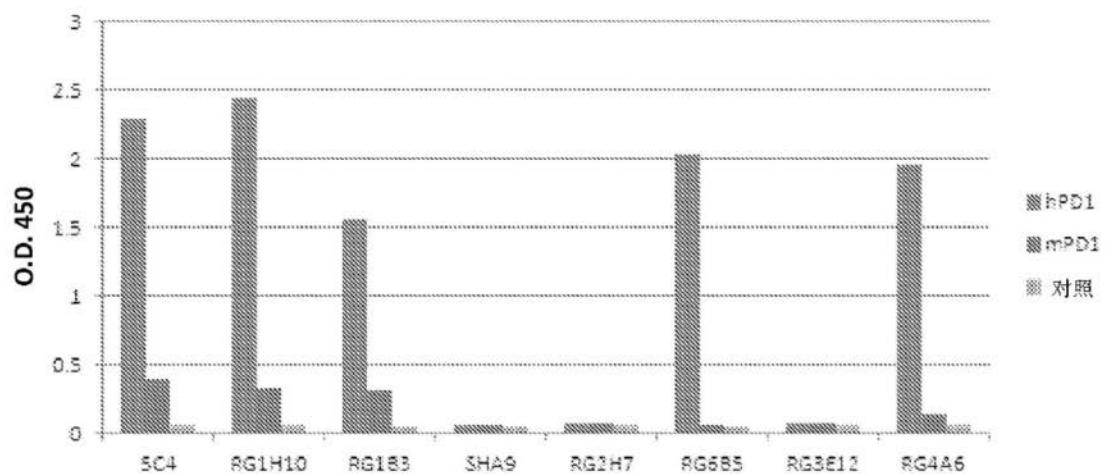
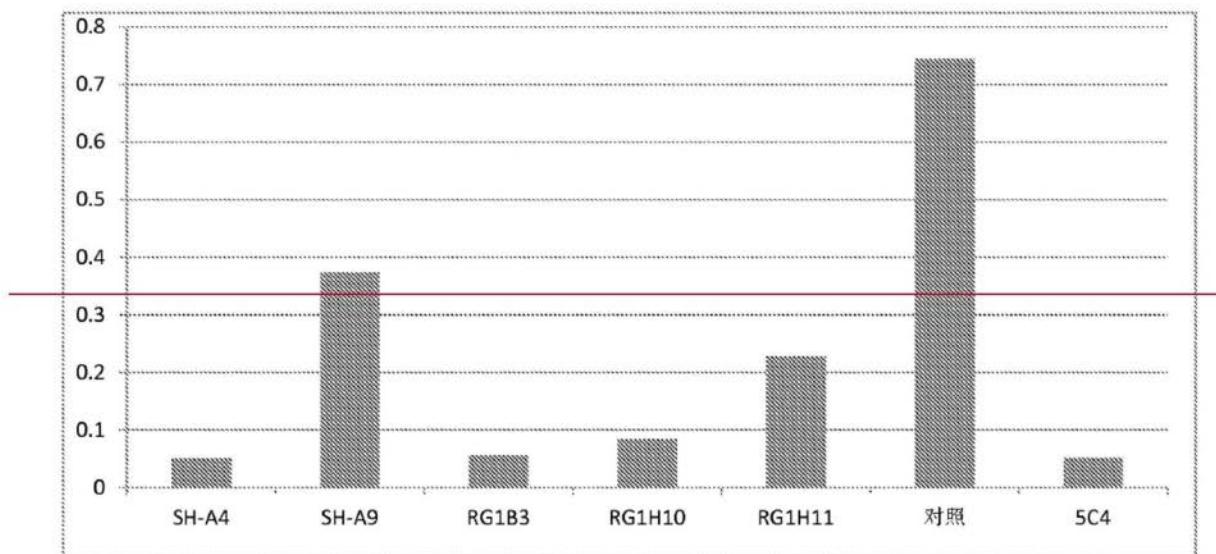


图10