



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110167959 A

(43)申请公布日 2019.08.23

(21)申请号 201880003251.1

丹尼尔·纳戈雷卡萨斯

(22)申请日 2018.11.29

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理

(30)优先权数据

有限公司 11262

62/593,080 2017.11.30 US

代理人 刘小立 郑霞

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

(51)Int.Cl.

2019.02.19

C07K 14/705(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

G01N 33/53(2006.01)

PCT/IB2018/059449 2018.11.29

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/106592 EN 2019.06.06

(71)申请人 盖立复诊断解决方案公司

地址 美国加利福尼亚州

(72)发明人 乔迪·贝里 伊丽莎白·布思

乔伊·安东尼乔治

伊丽莎白·纳西门托

权利要求书4页 说明书26页

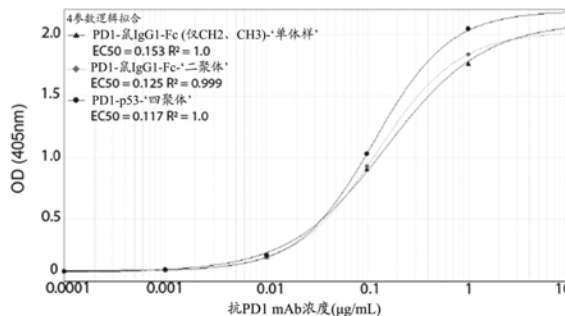
序列表26页 附图7页

(54)发明名称

用于监测对免疫检查点抑制剂PD1和PD-L1的抗体治疗的免疫测定和工程化蛋白

(57)摘要

本发明公开了融合蛋白,该融合蛋白包含PD1(程序性细胞死亡蛋白-1)蛋白的细胞外结构域和/或PD-L1(程序性细胞死亡-配体1蛋白(CD274或B7-H1))蛋白的细胞外结构域。细胞外结构域的部分以特定构型表达并被纯化为蛋白,并且用于监测针对这些蛋白的生物治疗性抗体的循环水平的免疫测定中。还描述了确定从患者获得的生物样品中的生物治疗性抗体的循环水平的量的方法,其中患者已经经历了至少一个剂量的免疫治疗剂。



1. 一种融合蛋白,所述融合蛋白包含程序性细胞死亡-1 (PD-1) 蛋白的细胞外结构域或其片段和寡聚化结构域,其中所述寡聚化结构域选自由鼠IgG1 Fc结构域、鼠IgG2A Fc结构域、GCN4三聚体结构域、网格蛋白三聚体结构域和p53四聚体结构域或其片段组成的组。

2. 根据权利要求1所述的融合蛋白,其中所述鼠IgG1 Fc结构域或所述鼠IgG2A Fc结构域包含铰链区。

3. 根据权利要求1或2中任一项所述的融合蛋白,其中所述PD-1蛋白的所述细胞外结构域或其片段经由一个或更多个肽接头与所述寡聚化结构域融合。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的融合蛋白,其中所述PD-1蛋白的所述细胞外结构域或其片段经由包含氨基酸,甘氨酸和丝氨酸的一个或更多个柔性接头或经由包含氨基酸,甘氨酸、脯氨酸和丝氨酸的一个或更多个柔性pro接头与所述寡聚化结构域融合。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的融合蛋白,其中所述PD-1蛋白的所述细胞外结构域或其片段经由一个或更多个肽接头与所述寡聚化结构域融合,所述一个或更多个肽接头包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5中列出的氨基酸序列。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的融合蛋白,所述融合蛋白还包含信号序列,其中所述信号序列融合在PD-1蛋白的所述细胞外结构域或所述其片段的N-末端处。

7. 根据权利要求6所述的融合蛋白,其中所述信号序列与SEQ ID NO:3中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的融合蛋白,其中PD-1的所述细胞外结构域的氨基酸序列选自由以下组成的组:

(i) 与由SEQ ID NO:1的残基21至残基170组成的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;

(ii) 与由SEQ ID NO:1的残基21至残基145组成的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;

(iii) 与由SEQ ID NO:1的残基33至残基170组成的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;

(iv) 与由SEQ ID NO:1的残基33至残基145组成的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;

(v) 与由SEQ ID NO:1的残基35至残基170组成的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;和

(vi) 与由SEQ ID NO:1的残基35至残基145组成的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的融合蛋白,其中PD-1的所述细胞外结构域的所述氨基酸序列包括与SEQ ID NO:12中列出的氨基酸序列具有至少70%同源性的序列。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的融合蛋白,其中所述寡聚化结构域的氨基酸序列选自由以下组成的组:

(i) 与SEQ ID NO:6中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;

(ii) 与SEQ ID NO:7中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;

(iii) 与SEQ ID NO:8中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;

(iv) 与SEQ ID NO:9中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;

- (v) 与SEQ ID NO:10中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;
- (vi) 与SEQ ID NO:11中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;和
- (vii) 与SEQ ID NO:28中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白的氨基酸序列选自自由以下组成的组:

- (i) 与SEQ ID NO:14中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;
- (ii) 与SEQ ID NO:15中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;
- (iii) 与SEQ ID NO:16中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;
- (iv) 与SEQ ID NO:17中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;
- (v) 与SEQ ID NO:18中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;
- (vi) 与SEQ ID NO:19中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;
- (vii) 与SEQ ID NO:20中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;和
- (viii) 与SEQ ID NO:29中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的融合蛋白,其中所述PD-1是重组PD-1。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的融合蛋白,其中PD-1是重组人PD-1。

14. 一种融合蛋白,所述融合蛋白包含程序性细胞死亡-配体1 (PD-L1) 蛋白的细胞外结构域或其片段和寡聚化结构域,其中所述寡聚化结构域选自自由鼠IgG1 Fc结构域、鼠IgG2A Fc结构域、GCN4三聚体结构域、网格蛋白三聚体结构域和p53四聚体结构域或其片段组成的组。

15. 根据权利要求14所述的融合蛋白,其中所述鼠IgG1 Fc结构域或所述鼠IgG2A Fc结构域包含铰链区。

16. 根据权利要求14或15中任一项所述的融合蛋白,其中所述PD-L1蛋白的所述细胞外结构域或其片段经由一个或更多个肽接头与所述寡聚化结构域融合。

17. 根据权利要求14至16中任一项所述的融合蛋白,其中所述PD-L1蛋白的所述细胞外结构域或其片段经由包含氨基酸,甘氨酸和丝氨酸的一个或更多个柔性接头或经由包含氨基酸,甘氨酸、脯氨酸和丝氨酸的一个或更多个柔性pro接头与所述寡聚化结构域融合。

18. 根据权利要求14至17中任一项所述的融合蛋白,其中所述PD-L1蛋白的所述细胞外结构域或其片段经由一个或更多个肽接头与所述寡聚化结构域融合,所述一个或更多个肽接头包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5中列出的氨基酸序列。

19. 根据权利要求14至18中任一项所述的融合蛋白,所述融合蛋白还包含信号序列,其中所述信号序列融合在PD-L1蛋白的所述细胞外结构域或所述其片段的N-末端处。

20. 根据权利要求19所述的融合蛋白,其中所述信号序列与SEQ ID NO:3中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性。

21. 根据权利要求14至20中任一项所述的融合蛋白,其中PD-L1的所述细胞外结构域的氨基酸序列选自自由以下组成的组:

- (i) 与由SEQ ID NO:2的残基18至残基239组成的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;

- (ii) 与由SEQ ID NO:2的残基18至残基238组成的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;

(iii) 与由SEQ ID NO:2的残基18至残基225组成的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;

(iv) 与由SEQ ID NO:2的残基18至残基134组成的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;

(v) 与由SEQ ID NO:2的残基18至残基127组成的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;

(vi) 与由SEQ ID NO:2的残基19至残基239组成的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;

(vii) 与由SEQ ID NO:2的残基19至残基238组成的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;

(viii) 与由SEQ ID NO:2的残基19至残基225组成的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;

(ix) 与由SEQ ID NO:2的残基19至残基134组成的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;

(x) 与由SEQ ID NO:2的残基19至残基127组成的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;

(xi) 与由SEQ ID NO:2的残基133至残基225组成的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;

(xii) 与由SEQ ID NO:2的残基133至残基238组成的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;和

(xiii) 与由SEQ ID NO:2的残基133至残基239组成的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列。

22. 根据权利要求14至21中任一项所述的融合蛋白,其中PD-L1的所述细胞外结构域的氨基酸序列包含与SEQ ID NO:13中列出的氨基酸序列具有至少70%同源性的序列。

23. 根据权利要求14至22中任一项所述的融合蛋白,其中所述寡聚化结构域的氨基酸序列选自由以下组成的组:

(i) 与SEQ ID NO:6中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;

(ii) 与SEQ ID NO:7中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;

(iii) 与SEQ ID NO:8中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;

(iv) 与SEQ ID NO:9中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;和

(v) 与SEQ ID NO:10中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;和

(vi) 与SEQ ID NO:11中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;和

(vii) 与SEQ ID NO:28中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列。

24. 根据权利要求14至23中任一项所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白的氨基酸序列选自由以下组成的组:

(i) 与SEQ ID NO:21中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;

(ii) 与SEQ ID NO:22中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;

(iii) 与SEQ ID NO:23中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;

(iv) 与SEQ ID NO:24中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;

- (v) 与SEQ ID NO:25中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;
- (vi) 与SEQ ID NO:26中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;
- (vii) 与SEQ ID NO:27中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列;和
- (viii) 与SEQ ID NO:30中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列。

25. 根据权利要求14至24中任一项所述的融合蛋白,其中所述PD-L1是重组PD-L1。

26. 根据权利要求14至25中任一项所述的融合蛋白,其中PD-L1是重组人PD-L1。

27. 一种确定生物治疗性抗体的循环水平的量的方法,所述生物治疗性抗体选自由纳武单抗、帕博利珠单抗和其他抗PD-1治疗剂组成的组,所述方法包括(i) 从经历所述抗体治疗的患者获得样品,和(ii) 使所述样品与根据权利要求1所述的融合蛋白接触。

28. 一种确定生物治疗性抗体的(游离)循环水平的量的方法,所述生物治疗性抗体选自由阿特朱单抗、avelumab和其他抗PD-L1治疗剂组成的组,所述方法包括(i) 从经历所述抗体治疗的患者获得样品,和(ii) 使所述样品与根据权利要求14所述的融合蛋白接触。

29. 根据权利要求1至26中任一项所述的融合蛋白,所述融合蛋白还包含多组氨酸亲和标签。

用于监测对免疫检查点抑制剂PD-1和PD-L1的抗体治疗的免疫测定和工程化蛋白

[0001] 描述

技术领域

[0002] 本申请涉及包含PD-1(程序性细胞死亡-1蛋白)的细胞外结构域的融合蛋白和/或包含PD-L1(程序性细胞死亡-配体1蛋白)(CD274或B7-H1)的细胞外结构域的融合蛋白。细胞外结构域的部分以特定构型表达,并被纯化为蛋白,并且用于监测针对这些蛋白的生物治疗性抗体的循环水平的免疫测定中。本文还描述了用于检测和监测从患者获得的生物样品中的治疗性抗体的方法,其中患者已经经历了至少一个剂量的免疫治疗剂。

[0003] 背景

[0004] 程序性细胞死亡1(PD-1)受体,是研究最多的免疫检查点靶标之一,在活化的免疫细胞类型的表面上表达,所述免疫细胞类型包括T细胞、B细胞、自然杀伤(NK)细胞/自然杀伤T(NKT)细胞和其他细胞¹。市场上有靶向PD-1和PD-L1的多种治疗性单克隆抗体(mAb),并且FDA和EMA审查了超过十二种传统的且双特异性的mAb。

[0005] PD-1是T-细胞活性的负调节物,并且PD-1与在肿瘤表面的其配体之一PD-L1的相互作用产生检查点阻断,降低活化的T细胞产生有效的免疫应答的能力。PD-L1在肿瘤细胞表面上的高水平表达通过抑制T细胞功能,包括细胞毒性活性,而允许逃脱抗肿瘤应答。靶向PD-1或PD-L1的治疗性抗体将阻断配体-受体相互作用,并且恢复针对肿瘤微环境的免疫功能。这些mAb的使用已经在许多癌症类型中产生了激动人心的临床应答,并且这些mAb中越来越多mAb现在已经进入临床开发中。

[0006] 由于靶向癌细胞活化的免疫检查点阻断物的新颖性,用于施用这些mAb的最佳剂量和时间表以及确定这些参数所必需的工具还没有完全开发出来。虽然目前的抗PD-1mAb治疗方案已经显示出有希望的结果,但将有必要定义更准确和个性化的给药方案,以增加功效和降低成本。对于相同的抗体方案,稳态抗体水平可以变化高达10倍,并且甚至当使用次佳治疗给药方案时更是如此²⁻⁴。这些研究可以优化治疗,同时降低成本负担和不良事件发生率。FDA和EU正在审查大量免疫调节性mAb,许多基于快速通道(fast track),进一步强调对测量PD-1和PD-L1靶向性mAb的循环水平的测试的需要。正在开发的免疫测定将提供对治疗方案的有效指导,特别地考虑到(1)在疾病迹象内和跨疾病迹象的稳态mAb水平方面观察到的总体变化²⁻⁴,和(2)处于这些疗法的患者中观察到的变化的进展状态1,3,5。

[0007]

[0008] 测量抗PD-1和抗PD-L1水平不仅在确定对于不同肿瘤或分子病理学的最佳给药方面具有潜在的重要性,而且对于衡量循环水平是否可以解释或预测已知在缓解后发生的不良事件具有潜在的重要性。因为目前不存在监测程序并且需要更多数据来评价和确定给药方案,并避免不必要的免疫毒性和成本,因此存在未被满足的需求。

[0009] 纳武单抗(Nivolumab)是一种人源化IgG4抗PD-1mAb。纳武单抗作为检查点抑制剂起作用,阻断将阻止活化的T细胞攻击癌症的负调节物,从而允许免疫系统清除癌症。它是

在Medarex发现的,由Medarex and Ono Pharmaceutical开发,并且被Bristol-Myers Squibb (其在2009年收购Medarex) 和Ono带入市场。

[0010] 纳武单抗(**Opdivo®**)是一种用于治疗癌症的生物治疗性mAb,并且在2014年首次被日本官方批准⁶且在2014年也被FDA批准⁷。它被用作不能手术的或转移性皮肤黑色素瘤的第一线治疗。如果癌症在BRAF中具有或不具有突变,则区别地与纳武单抗与伊匹单抗(ipilimumab) (针对CTLA-4,细胞毒性T-淋巴细胞相关蛋白-4的mAb) 组合使用。它被认为用于作用于鳞状非小细胞肺癌(NSCLC)⁸的第二线治疗且用作用于肾细胞癌⁹的第二线治疗,并且在2016年5月被批准用于顽固性经典霍奇金淋巴瘤⁹。它被测试用于许多其他的癌症,并且可能将具有极大地扩展的用途。

[0011] Merck生产了类似的mAb治疗性帕博利珠单抗(pembrolizumab) (Keytruda),也是针对PD-1的IgG4类mAb,其也在2014年被批准。从2017年起,帕博利珠单抗在某些情况下用于经由静脉内输注治疗不能手术的或转移性黑色素瘤、转移性NSCLC,作为用于头颈鳞状细胞癌、难治性经典霍奇金淋巴瘤的第二线治疗。对于NSCLC,如果癌症过表达PD-L1并且癌症在EGFR或ALK中不具有突变,则帕博利珠单抗是第一线治疗;PD-L1的评估必须通过经验证的和批准的伴随诊断剂来进行。此外,帕博利珠单抗是由FDA批准的基于生物标志物(PD-1)存在的而不是被靶向的组织的第一种药物¹⁰。许多其他抗PD-1和抗PD-L1生物治疗性抗体现在在临床上使用并且包括替代形式,例如双特异性抗体、DART (罕见肿瘤中的双重抗CTLA-4&抗PD-1阻断物) 和BiTes (双特异性T细胞衔接物)。

[0012] 相反,PD-L1的上调允许癌症逃避宿主免疫系统,并且PD-L1的高肿瘤表达与肿瘤侵袭性增加和死亡风险增加4.5倍相关¹¹。除了已经被批准用于治疗的PD-L1抑制剂之外,许多PD-L1作为免疫肿瘤学疗法正在开发中并且在包括Atezolizumab和Avelumab的临床试验中显示出有希望的结果。

[0013] 这些药物增加了T细胞的功效,T细胞能够更具侵袭性地攻击和杀死癌细胞。对于纳武单抗,在一些情况下存在严重的副作用,包括肺、结肠、肝、肾脏和甲状腺的免疫相关炎症;以及对皮肤、中枢神经系统、心脏和消化系统的影响¹²。对于帕博利珠单抗,患者已经发展了导致炎症的严重的输注相关反应和不良作用,包括肺部炎症(一些是致命的) 和内分泌器官的炎症(脑垂体、甲状腺(在不同患者中引起甲状腺功能减退和甲状腺功能亢进两者) 和引起1型糖尿病和糖尿病酮症酸中毒的胰腺炎),导致一些患者进行终身激素治疗(例如胰岛素治疗或甲状腺激素)。患者也已经发展了由mAb药物引起的结肠、肝和肾脏炎症¹³。对于这两种药物报道了许多其他的症状和不适。

[0014] 显示出这些副作用的患者被停掉了mAb药物,然后如果/当副作用消退时,再重新使用该药物。如果监测患者中的水平,则能够滴定或大大地降低所使用的剂量是可能的。然而,目前不存在可用于测试循环mAb药物水平的监测测定,并且用于这些测试的抗原不是合格的(qualified)。

[0015] 概述

[0016] 本申请提供了与程序性细胞死亡1 (PD-1) 蛋白和程序性细胞死亡-配体 (PD-L1) 蛋白相关的融合蛋白。融合蛋白可以是重组蛋白,所述重组蛋白包含对天然蛋白的修饰和/或包含具有不同性质的另一结构域的融合蛋白,以改进在诊断测定中的功能。

[0017] 本文描述的一个方面提供了包含与一个寡聚化结构域融合的PD-1蛋白的重组蛋

白。本文描述的另一个方面提供了包含与更多个寡聚化结构域融合的PD-1蛋白的融合蛋白。本文描述的另一个方面提供了包含与一个寡聚化结构域融合的PD-L1蛋白的重组蛋白。本文描述的另一个方面提供了包含与更多个寡聚化结构域融合的PD-L1蛋白的融合蛋白。本文描述的又另一个方面提供了包含与寡聚化结构域融合的PD-1蛋白和PD-L1蛋白的融合蛋白。在一些实施方案中,融合蛋白是重组蛋白。

[0018] PD-1蛋白和/或PD-L1蛋白可以来自多个物种或来自单个物种。在一个方面中,PD-1蛋白和/或PD-L1蛋白是人PD-1蛋白和/或人PD-L1蛋白。在另一个方面中,融合蛋白包含PD-1蛋白和/或PD-L1蛋白的细胞外结构域或其片段。在一个实施方案中,融合蛋白包含PD-1的细胞外结构域的免疫球蛋白样结构域。在另一个实施方案中,融合蛋白包含PD-L1的细胞外结构域的免疫球蛋白样结构域。

[0019] PD-1和/或PD-L1细胞外结构域或其片段可以包含多种修饰的蛋白或肽。修饰可以是对野生型PD-1和/或PD-L1中的至少一个氨基酸的取代、缺失或添加,只要它不改变PD-1和PD-L1的功能。这样的多种蛋白或肽可以与野生型蛋白具有70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同源性。

[0020] 本文描述的融合蛋白包含PD-1蛋白或PD-L1蛋白的细胞外结构域或其片段以及寡聚化结构域。

[0021] 在一些方面中,本文描述的融合蛋白包含PD-1蛋白的细胞外结构域或其片段和寡聚化结构域,其中寡聚化结构域选自由鼠IgG1Fc结构域、鼠IgG2A Fc结构域、GCN4三聚体结构域、网格蛋白三聚体结构域和p53四聚体结构域或其片段组成的组。

[0022] 在其他方面中,本文描述的融合蛋白包含PD-L1蛋白的细胞外结构域或其片段、和寡聚化结构域,其中寡聚化结构域选自由鼠IgG1Fc结构域、鼠IgG2A Fc结构域、GCN4三聚体结构域、网格蛋白三聚体结构域和p53四聚体结构域或其片段组成的组。

[0023] 本文描述的寡聚化结构域可以包括选自由以下组成的组的结构域:网格蛋白结构域、GCN4三聚化结构域、p53四聚化结构域和五聚化结构域。在一些方面中,寡聚化结构域可以包括Fc结构域、Fc结构域的片段和Fc结构域的变体。在一个实施方案中,PD-1蛋白和/或PD-L1蛋白与所述Fc结构域或其片段的C-末端融合。在另一个实施方案中,PD-1蛋白和/或PD-L1蛋白与所述Fc结构域或其片段的N-末端融合。在一个实施方案中,Fc结构域可以是人或小鼠免疫球蛋白的Fc结构域。在另一个实施方案中,寡聚化结构域可以包含小鼠IgG1或小鼠IgG2A的Fc片段或其片段。

[0024] 在一些方面中,本文描述的融合蛋白的寡聚化结构域是鼠IgG1Fc结构域或鼠IgG2A Fc结构域。在一些方面中,鼠IgG1Fc结构域或鼠IgG2A Fc结构域包括铰链区。

[0025] 如本文描述的包含PD-1蛋白的细胞外结构域或其片段和寡聚化结构域的融合蛋白可以包含包括铰链区的鼠IgG1Fc结构域或鼠IgG2A Fc结构域。

[0026] 如本文描述的包含PD-L1蛋白的细胞外结构域或其片段和寡聚化结构域的融合蛋白可以包含包括铰链区的鼠IgG1Fc结构域或鼠IgG2A Fc结构域。

[0027] 本文描述的融合蛋白可以是更高等级结构例如蛋白质或多聚体复合物的部分。这可以通过有意设计具有多聚化结构域的蛋白,或固有地经由重组蛋白的意想不到的性质。在一些方面中,PD-1蛋白和/或PD-L1蛋白或其片段经由一个或更多个肽接头与寡聚化结构域融合。在一些方面中,PD-1蛋白的细胞外结构域或其片段经由一个或更多个肽接头与寡

聚化结构域融合。在一些方面中,PD-L1蛋白的细胞外结构域或其片段经由一个或多个肽接头与寡聚化结构域融合。在一些方面中,PD-1蛋白和/或PD-L1蛋白经由一个或多个肽接头与Fc结构域或其片段融合。在一些方面中,在本文描述的融合蛋白中,PD-1蛋白的细胞外结构域或其片段经由包含氨基酸,甘氨酸和丝氨酸的一个或多个柔性接头或经由包含氨基酸,甘氨酸、脯氨酸和丝氨酸的一个或多个柔性pro接头(pro linker)与寡聚化结构域融合。在一些方面中,所述一个或多个肽接头包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5中列出的氨基酸序列。在一些方面中,在本文描述的融合蛋白中,PD-L1蛋白的细胞外结构域或其片段经由包含氨基酸,甘氨酸和丝氨酸的一个或多个柔性接头或经由包含氨基酸,甘氨酸、脯氨酸和丝氨酸的一个或多个柔性pro接头与寡聚化结构域融合。在一些方面中,所述一个或多个肽接头包含SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5中列出的氨基酸序列。

[0028] 在一些实施方案中,融合蛋白可以包含SEQ ID NO:14-27或SEQ ID NO:29-30中列出的氨基酸序列。

[0029] 本发明的其他方面包括还包含信号序列的如本文描述的融合蛋白,其中信号序列融合在PD-1蛋白的细胞外结构域或其片段的N-末端处。本发明的其他方面包括还包含信号序列的如本文描述的融合蛋白,其中信号序列融合在PD-L1蛋白的细胞外结构域或其片段的N-末端处。

[0030] 在一些方面中,信号序列包括SEQ ID NO:3中列出的氨基酸序列。在其他方面中,信号序列的氨基酸序列与SEQ ID NO:3中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性。

[0031] 在本发明的一些方面中,本文描述的融合蛋白包含PD-1的细胞外结构域,PD-1的细胞外结构域的氨基酸序列与由SEQ ID NO:1的残基21至残基170、残基21至残基145、残基33至残基170、残基33至残基145、残基35至残基170或残基35至残基145组成的氨基酸序列共有至少70%同源性。在一些方面中,融合蛋白包含PD-1的细胞外结构域,PD-1的细胞外结构域的氨基酸序列与由SEQ ID NO:1的残基21至残基170组成的氨基酸序列共有至少70%同源性。在一些方面中,融合蛋白包含PD-1的细胞外结构域,PD-1的细胞外结构域的氨基酸序列由SEQ ID NO:1的残基21至残基170组成。

[0032] 在本发明的其他方面中,本文描述的融合蛋白包含PD-L1的细胞外结构域,PD-L1的细胞外结构域的氨基酸序列与由SEQ ID NO:2的残基18至残基239、残基18至残基238、残基18至残基225、残基18至残基134、残基18至残基127、残基19至残基239、残基19至残基238、残基19至残基225、残基19至残基134、残基19至残基127、残基133至残基225、残基133至残基238或残基133至残基239组成的氨基酸序列共有至少70%同源性。在一些方面中,融合蛋白包含PD-L1的细胞外结构域,PD-L1的细胞外结构域的氨基酸序列与由SEQ ID NO:2的残基18至残基239组成的氨基酸序列共有至少70%同源性。在一些方面中,融合蛋白包含PD-L1的细胞外结构域,PD-L1的细胞外结构域的氨基酸序列由SEQ ID NO:2的残基18至残基239组成。

[0033] 在又一个方面中,如本文描述的融合蛋白包含PD-1的细胞外结构域,PD-1的细胞外结构域的氨基酸序列包含与SEQ ID NO:12中列出的氨基酸序列具有至少70%同源性的序列。

[0034] 在又一个方面中,如本文描述的融合蛋白包含PD-L1的细胞外结构域,PD-L1的细胞外结构域的氨基酸序列包含与SEQ ID NO:22中列出的氨基酸序列具有至少70%同源

性的序列。

[0035] 根据本发明的融合蛋白可以包含PD-1的细胞外结构域或其片段和寡聚化结构域，寡聚化结构域的氨基酸序列选自由SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:28组成的组。

[0036] 根据本发明的融合蛋白可以包含PD-L1的细胞外结构域或其片段和寡聚化结构域，寡聚化结构域的氨基酸序列选自由SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:28组成的组。

[0037] 在一些方面中，本文描述的融合蛋白的氨基酸序列选自由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和SEQ ID NO:29组成的组。在一些方面中，本文描述的融合蛋白的氨基酸序列选自由与以下中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列组成的组：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或SEQ ID NO:29。

[0038] 在一些方面中，本文描述的融合蛋白的氨基酸序列选自由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和SEQ ID NO:30组成的组。在一些方面中，本文描述的融合蛋白的氨基酸序列选自由与以下中列出的氨基酸序列共有至少70%同源性的氨基酸序列组成的组：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或SEQ ID NO:30。

[0039] 本发明的一些方面涉及如本文描述的融合蛋白，其中PD-1是重组PD-1。本发明的又其他方面涉及如本文描述的融合蛋白，其中PD-1是重组人PD-1。

[0040] 本发明的一些方面涉及如本文描述的融合蛋白，其中PD-L1是重组PD-L1。本发明的又其他方面涉及如本文描述的融合蛋白，其中PD-L1是重组人PD-L1。

[0041] 本文描述的一个方面提供了编码重组融合蛋白的核酸、包含该核酸的载体和包含该载体的宿主细胞。在一个实施方案中，载体编码连接到信号肽序列的核酸分子。

[0042] 本文描述的另一个方面提供了制备包含PD-1蛋白和/或PD-L1蛋白的细胞外结构域的融合蛋白的方法，所述方法包括：(a) 用编码融合蛋白的核酸分子转染宿主细胞，其中该核酸分子包含编码信号肽的核苷酸序列，所述核苷酸序列i) 在PD-1肽和/或PD-L1肽的所述细胞外结构域的N-末端与连接至编码PD-1肽和/或PD-L1肽的细胞外结构域的核苷酸序列的编码人或小鼠IgG的Fc结构域的核苷酸序列融合，或ii) 在人或小鼠或其他哺乳动物IgG的Fc结构域的N-末端与连接至编码所述Fc结构域的核苷酸序列的编码PD-1肽和/或PD-L1肽的核苷酸序列融合，和(b) 通过在宿主细胞中表达(a)的核酸分子来制备融合蛋白。在一个实施方案中，细胞外结构域经由接头与Fc结构域融合。接头可以是SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:5。本文描述的另一个方面提供了制备包含PD-1蛋白和/或PD-L1蛋白的细胞外结构域的融合蛋白的方法，所述方法包括：(a) 用编码如本文描述的融合蛋白的核酸分子转染宿主细胞，和(b) 通过在宿主细胞中表达(a)的核酸分子来制备融合蛋白。

[0043] 对于融合蛋白的重组产生，各种各样的表达载体可以基于常见的分子克隆方案来构建。载体组分通常包括但不限于以下中的一种或更多种：用于表达蛋白的分泌的信号序列、一种或更多种标志物基因，包括用于在真核细胞中筛选稳定细胞系的选择标志物基因、

复制起点、增强子元件、启动子、转录终止序列、poly A信号、隔离物 (insulator) 等。

[0044] 本文还提供了包含融合蛋白的组合物,所述融合蛋白包含PD-1和/或PD-L1或其片段和寡聚化结构域。本文还提供了制备包含如本文描述的融合蛋白的组合物的方法,所述融合蛋白包含PD-1和/或PD-L1或其片段和寡聚化结构域。还提供了包含融合蛋白或组合物的试剂盒。

[0045] 此外,本文提供了使用融合蛋白作为抗原的抗体生物监测的方法。本文描述的融合蛋白可以用作用于治疗性抗体生物监测的抗原。抗体包括抗PD-1 (例如纳武单抗和帕博利珠单抗) 和/或抗PD-L1抗体 (阿特朱单抗 (Atezolizumab) 和Avelumab)。

[0046] 本文描述的一个方面提供了用于对由PD-1和/或PD-L1介导的疾病进行诊断、监测或分期的方法,所述方法包括使来自已经经历至少一个剂量的免疫治疗剂的患者样品与本文公开的融合蛋白接触。

[0047] 本文描述的一个方面提供了用于确定治疗性抗PD-1和/或PD-L1抗体的功效的方法,所述方法包括使来自已经经历至少一个剂量的免疫治疗剂的患者样品与本文公开的融合蛋白接触。

[0048] 本文描述的另一个方面包括向患者提供免疫疗法的方法,所述方法包括向患者施用治疗性抗体和检测抗PD-1和/或抗PD-L1治疗性抗体的存在。设想了这些方法可以用于监测基于抗体的疗法的功效。

[0049] 本文描述的另一个方面包括用于通过测量抗PD-1和/或抗PD-L1治疗性抗体来检测和/或监测由PD-1和/或PD-L1介导的疾病的方法。在一些方面中,方法包括使来自患者的样品与本文描述的融合蛋白接触。在一些方面中,患者已经经历了用治疗性抗体的免疫疗法的一个疗程。

[0050] 在一些方面中,本发明涉及确定生物治疗性抗体的循环水平的量的方法,所述生物治疗性抗体选自由纳武单抗、帕博利珠单抗和其他抗PD-1治疗剂组成的组,所述方法包括 (i) 从经历所述抗体治疗的患者获得样品,和 (ii) 使所述样品与本文描述的融合蛋白接触。

[0051] 在一些方面中,本发明涉及确定生物治疗性抗体的 (游离) 循环水平的量的方法,所述生物治疗性抗体选自由阿特朱单抗、avelumab和其他抗PD-L1治疗剂组成的组,所述方法包括 (i) 从经历所述抗体治疗的患者获得样品,和 (ii) 使所述样品与本文描述的融合蛋白接触。

[0052] 当在权利要求和/或说明书中与术语“包含”结合使用时,词语“一个 (a)”或“一个 (an)”的使用可以意指“一个 (one)”,但它也符合“一个或更多个”、“至少一个”和“一个或多个”的含义。

[0053] 前面已经相当宽泛地概述了本文公开的实施方案的特征和技术优点,以便可以更好地理解下面的详细描述。下文将描述形成权利要求的主题的另外的特征和优点。本领域技术人员应当理解,所公开的概念和具体实施方案可以容易地用作用于实现本文公开的各种实施方案的相同目的而修改或设计其他结构的基础。本领域技术人员还应当认识到,这样的等同构造不偏离如所附权利要求中阐述的本发明的精神和范围。根据当结合附图考虑时的以下描述,将更好地理解被认为是本文公开的各种实施方案的特性的新颖特征 (对于其结构和操作方法两者) 以及另外的目的和优点。然而,应明确地理解,每个附图仅是为了

例示和描述的目的而提供,而并不意图作为对所公开的实施方案的限制性的定义。

[0054] 附图简述

[0055] 图1-呈现在表达并用还原性4%-20%Tris-甘氨酸TGX凝胶纯化后的多种融合蛋白的SDS-PAGE色谱图。

[0056] 图2-呈现在表达并用非还原性4%-20%Tris-甘氨酸TGX凝胶纯化后的多种融合蛋白的SDS-PAGE色谱图。

[0057] 图3A-示出了连续稀释系列(稀释液从0.5 μ g/ml至0.04 μ g/ml)中的重组PD-1融合蛋白针对抗PD-1抗体的特异反应性。

[0058] 图3B-示出了如上文提及的系列稀释液中的重组PD-L1融合蛋白针对抗PD-L1抗体的特异反应性。该图还示出了PD-L1-Fc单体和PD-L1-p53四聚体的反应性的比较。

[0059] 图4A-示出了多种PD-1融合蛋白用于定量人血浆中抗PD-1抗体(帕博利珠单抗)的比较。

[0060] 图4B-示出了多种PD-1融合蛋白用于定量人血浆中的抗PD-1抗体(帕博利珠单抗)的信号截止噪声比(signal to cut off noise)。

[0061] 图5-示出了多种PD-L1融合蛋白针对抗PD-L1抗体的特异反应性。

[0062] 序列简述

[0063] SEQ ID NO:1是PD-1的氨基酸序列(UniProt:Q15116)。

[0064] SEQ ID NO:2是PD-L1的氨基酸序列(UniProt:Q9NZQ7)。

[0065] SEQ ID NO:3是人IL2信号肽的氨基酸序列。

[0066] SEQ ID NO:4是柔性Gly-Ser接头的氨基酸序列。

[0067] SEQ ID NO:5是柔性Gly-Pro-Ser接头(柔性Pro接头)的氨基酸序列。

[0068] SEQ ID NO:6是仅包含CH2结构域和CH3结构域的鼠IgG1的氨基酸序列。

[0069] SEQ ID NO:7是包含Fc区域的鼠IgG1的氨基酸序列。

[0070] SEQ ID NO:8是包含Fc区域的鼠IgG2A的氨基酸序列。

[0071] SEQ ID NO:9是GCN4三聚体结构域的氨基酸序列。

[0072] SEQ ID NO:10是网格蛋白三聚体结构域的氨基酸序列。

[0073] SEQ ID NO:11是p53四聚体结构域的氨基酸序列。

[0074] SEQ ID NO:12是PD-1片段的氨基酸序列。

[0075] SEQ ID NO:13是PD-L1片段的氨基酸序列。

[0076] SEQ ID NO:14是根据本发明的一个实施方案的PD-1融合蛋白(HuIL2SS-PD-1(GGGGS)2-鼠IgG1(仅CH2、CH3)362AA柔性接头)的氨基酸序列。

[0077] SEQ ID NO:15是根据本发明的另一个实施方案的PD-1融合蛋白(HuIL2SS-PD-1(GGGPS)2-鼠IgG1(仅CH2、CH3)362AA柔性Pro接头)的氨基酸序列。

[0078] SEQ ID NO:16是根据本发明的又一个实施方案的PD-1融合蛋白(HuIL2SS-PD-1-鼠IgG1Fc 365AA无铰链)的氨基酸序列。

[0079] SEQ ID NO:17是根据本发明的又一个实施方案的PD-1融合蛋白(HuIL2SS-PD-1-鼠IgG2A Fc 370AA无铰链)的氨基酸序列。

[0080] SEQ ID NO:18是根据本发明的又一个实施方案的PD-1融合蛋白(HuIL2SS-PD-1-GCN4三聚体结构域)的氨基酸序列。

[0081] SEQ ID NO:19是根据本发明的又一个实施方案的PD-1融合蛋白(HuIL2SS-PD-1-网格蛋白三聚体结构域)的氨基酸序列。

[0082] SEQ ID NO:20是根据本发明的又一个实施方案的PD-1融合蛋白(HuIL2SS-PD-1-p53四聚体结构域)的氨基酸序列。

[0083] SEQ ID NO:21是根据本发明的一个实施方案的PD-L1融合蛋白(HuIL2SS-PD-L1(GGGGS)2-鼠IgG1(仅CH2、CH3)361AA柔性接头)的氨基酸序列。

[0084] SEQ ID NO:22是根据本发明的另一个实施方案的PD-L1融合蛋白(HuIL2SS-PD-L1(GGGPS)2-鼠IgG1(仅CH2、CH3)361AA柔性Pro接头)的氨基酸序列。

[0085] SEQ ID NO:23是根据本发明的又一个实施方案的PD-L1融合蛋白(HuIL2SS-PD-L1-鼠IgG1Fc 364AA无铰链)的氨基酸序列。

[0086] SEQ ID NO:24是根据本发明的又一个实施方案的PD-L1融合蛋白(HuIL2SS-PD-L1-鼠IgG2A Fc 370AA无铰链)的氨基酸序列。

[0087] SEQ ID NO:25是根据本发明的又一个实施方案的PD-L1融合蛋白(HuIL2SS-PD-L1-GCN4三聚体结构域)的氨基酸序列。

[0088] SEQ ID NO:26是根据本发明的又一个实施方案的PD-L1融合蛋白(HuIL2SS-PD-L1-网格蛋白三聚体结构域)的氨基酸序列。

[0089] SEQ ID NO:27是根据本发明的又一个实施方案的PD-L1融合蛋白(HuIL2SS-PD-L1-p53四聚体结构域)的氨基酸序列。

[0090] SEQ ID NO:28是仅包含CH2结构域和CH3结构域的鼠IgG2A的氨基酸序列。

[0091] SEQ ID NO:29是根据本发明的一个实施方案的PD-1融合蛋白(HuIL2SS-PD-1(GGGGS)2-p53-Histag)的氨基酸序列。

[0092] SEQ ID NO:30是根据本发明的一个实施方案的PD-L1融合蛋白(HuIL2SS-PD-L1(GGGGS)2-p53-Histag)的氨基酸序列。

[0093] SEQ ID NO:31是根据本发明的一个实施方案的多组氨酸标签的氨基酸序列。

[0094] 详细描述

[0095] 以下描述仅意图说明本公开内容的多种实施方案。如此,所讨论的具体修改并非意图是限制性的。对本领域的技术人员将明显的是,可以进行各种等同、改变和修改,而不偏离本文呈现的主题的精神或范围,并且应理解,这样的等同实施方案被包括在本文中。

[0096] 除非内容另有明确规定,否则如在本说明书和所附权利要求中使用的,单数形式“一(a)”、“一(an)”和“该(the)”包括复数指代物。

[0097] 贯穿本说明书,除非上下文另有要求,词语“包含(comprise)”或变形例如“包含(comprises)”或“包含(comprising)”将被理解为暗示包含被述及的元件或整数或元件或整数的组,但不排除任何其他元件或整数或元件或整数的组。

[0098] 除非另有明确地陈述,否则本说明书中的每一个实施方案加以必要的细节修改适用于每一个其他实施方案。

[0099] 除非另有指示,否则以下术语应理解为具有以下含义:

[0100] 如本文使用的,术语“重组”指的是生物分子,例如基因或蛋白,其(1)已被从其天然存在的环境中取出,(2)不与在自然界中发现该基因的多核苷酸的全部或部分缔合,(3)可操作地连接至在自然界中不与其连接的多核苷酸,或(4)在自然界中不存在。术语“重

组”可以用于提及克隆的DNA分离物、化学合成的多核苷酸类似物或由异源系统生物合成的多核苷酸类似物、以及由这样的核酸编码的蛋白质和/或mRNA。

[0101] 如本文使用的,术语“核酸”指的是包含DNA或RNA的任何材料。核酸可以合成制备或由活细胞制备。

[0102] 如本文使用的,术语“多核苷酸”指的是核苷酸的聚合物链。该术语包括DNA分子(例如cDNA或基因组DNA或合成DNA)和RNA分子(例如mRNA或合成RNA)、以及包含非天然核苷酸类似物、非天然核苷间键或两者的DNA或RNA的类似物。核酸可以呈任何拓扑构象。例如,核酸可以是单链的、双链的、三链的、四联体的、部分双链的、分枝的、发夹状的、环状的或呈锁式构象。

[0103] 如本文使用的,术语“蛋白质”指的是由一条或更多条氨基酸残基链组成的大生物分子或大分子。许多蛋白质是催化生物化学反应的酶,并且对代谢至关重要。蛋白质还具有结构或机械功能,例如肌肉中的肌动蛋白和肌球蛋白以及细胞骨架中的蛋白质形成了维持细胞形状的支架系统。其他蛋白质在细胞信号传导、免疫应答、细胞粘附和细胞周期方面是重要的。然而,蛋白质可以是完全人工的或重组的,即在生物系统中不天然存在。

[0104] 如本文使用的,术语“多肽”指的是天然存在的蛋白质和非天然存在的蛋白质两者、及其片段、突变体、衍生物和类似物。多肽可以是单体或多聚体。多肽可以包含许多不同的结构域,每个结构域具有一种或更多种不同的活性。多肽可以是如本文描述的融合蛋白。

[0105] 如本文使用的,术语“融合蛋白”指的是包含在天然存在的蛋白质中不共存的两种或更多种氨基酸序列的蛋白质。融合蛋白可以包含来自相同生物体或来自不同生物体的两种或更多种氨基酸序列。融合蛋白的两种或更多种氨基酸序列通常是符合读框的,它们之间无终止密码子,并且通常从mRNA被翻译为融合蛋白的部分。

[0106] 如本文使用的,术语“抗原”指的是特异性结合各自抗体的生物分子。来自不同库的抗体借助于其可变区相互作用(CDR环)(为锁和钥匙之间的配合的类似物)结合特定的抗原结构。

[0107] 术语“变体”当在多核苷酸序列的上下文中使用时,可以涵盖与野生型基因相关的多核苷酸序列。该定义还可以包括例如“等位基因”、“剪接”、“物种”或“多态”变体。剪接变体可以与参考分子具有显著的同源性,但是由于mRNA加工期间外显子的选择性剪接,通常将具有更大或更小数目的多核苷酸。相应的多肽可以具有另外的功能结构域或缺少结构域。物种变体是从一种物种到另一种物种变化的多核苷酸序列。在本发明中特别有用的是野生型靶基因产物的变体。变体可以由核酸序列中的至少一个突变产生,并且可以导致改变的mRNA或导致其结构或功能可以被改变或可以不被改变的多肽。任何给定的天然基因或重组基因可以没有、具有一个或多个等位基因形式。产生变体的常见突变改变通常归因于核苷酸的天然缺失、添加或取代。这些类型的改变中的每一种可以单独发生,或在给定的序列中与其他改变组合发生一次或更多次。

[0108] 如本文使用的,术语“抗体”或“免疫球蛋白”具有相同的含义,并且将在本发明中同等地使用。如本文使用的术语“抗体”指的是免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分,即包含免疫特异性结合抗原的抗原结合位点的分子。如此,术语抗体不仅涵盖整个抗体分子,而且还涵盖抗体片段或衍生物。抗体片段包括但不限于Fc、Fv、Fab、F(ab')₂、Fab'、dsFv、scFv、sc(Fv)₂和双抗体。

[0109] 在天然抗体中,两条重链通过二硫键彼此连接,并且每条重链通过二硫键与轻链连接。存在两种类型的轻链,lambda (λ) 和kappa (κ)。存在决定抗体分子的功能活性的五种主要的重链类别(或同种型):IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。每条链包含不同的序列结构域。轻链包括两个结构域,可变结构域(VL)和恒定结构域(CL)。重链包括四个结构域,一个可变结构域(VH)和三个恒定结构域(CH1、CH2和CH3,共同地被称为CH)。轻链(VL)和重链(VH)两者的可变区决定了对抗原的结合识别和特异性。轻链恒定区结构(CL)和重链(CH)恒定区结构域赋予重要的生物学性质,例如抗体链缔合、分泌、跨胎盘移动、补体结合以及与Fc受体(FcR)的结合。Fv片段是免疫球蛋白的Fab片段的N-末端部分,并且由一条轻链和一条重链的可变部分组成。抗体的特异性在于抗体结合位点(combining site)和抗原决定簇之间的结构互补性。抗体结合位点由主要来自高变区或互补决定区(CDR)的残基组成。偶尔,来自非高变区或框架区(FR)的残基影响整体结构域结构,并且从而影响结合位点。互补决定区或CDR指的是共同定义天然免疫球蛋白结合位点的天然Fv区域的结合亲和力和特异性的氨基酸序列。免疫球蛋白的轻链和重链各自具有三个CDR,分别被命名为L-CDR1、L-CDR2、L-CDR3和H-CDR1、H-CDR2、H-CDR3。因此,抗原结合位点包括六个CDR,包括来自重链V区域和轻链V区域中的每一个的CDR集合。框架区(FR)指的是插入在CDR之间的氨基酸序列。

[0110] 许多被批准的治疗性抗体已经使用G1m17.1:Km3重链和轻链恒定区同种异型(Jeffris和Lefranc 2009)。其他人使用可选择的G1m3:Km3同种异型。同种异型在治疗性抗体的排斥中的作用在mAb疗法开始时并不明显,因为并不像现在这样知道同种异型性中的差异是普遍的。治疗性mAb的同种异型和清除之间存在明显的联系。这是由于与FcRn新生Fc受体的相互作用差异,FcRn新生Fc受体的功能是将一些mAb封存在细胞区室中,以再循环回到血流中,而不是被快速清除(Ternant等人2016)。同种异型性方面的这些差异和对细胞免疫刺激的影响如今被更多地知晓(Webster等人2016)。虽然不太可能产生免疫原性,但它们对半衰期具有明显的影响。因此,测量循环治疗性抗体的量的测试可以揭示药物水平和对剂量增加的潜在需求。可选择地,一些患者可能需要较少的药物来维持有效水平,特别是如果T细胞表面上的抗PD-1的水平维持高水平的话。如果与特定试剂结合使用或在免疫测定领域的专业人员熟悉的竞争性测定中使用,则这些抗原可以用于测量被任何类型的抗体(IgG1、IgG4、DART、BiTes等)的结合。

[0111] 使用多种免疫检查点抑制剂mAb和其他药物的下一代组合疗法也需要监测水平的有效手段。这些类型的组合治疗不仅是更有效的,而且变得普遍(Dempke等人2017)。在这些情况下,本文描述的测定对于测量抗PD-1或抗PD-L1组分也将是重要的。

[0112] 如本文使用的,“定点诱变”指的是在DNA分子中的确定位点处创建突变的过程。确定的位点指的是基于相互作用的亲和力选择的位点。用于诱变的DNA分子通常是被称为质粒的环状分子。通常,定点诱变要求野生型基因序列是已知的。该技术也被称为“位点特异性诱变”或“寡核苷酸定向诱变”。因此,“定点突变”意指通过定点诱变技术在DNA分子中的确定位点处创建的突变。在一个实施方案中,使用定点诱变产生的突变体DNA序列与野生型序列具有超过40%、超过45%、超过50%、超过55%、超过60%、超过65%、超过70%、超过75%、超过80%、超过85%、超过90%、超过95%或超过98%的同源性。可选择地,突变体DNA可以使用任何已知的诱变程序(例如辐射、亚硝基胍等)在体内产生。DNA构建体序列可以是野生型、突变的或修饰的。此外,序列可以是同源的或异源的。

[0113] 术语“野生型序列”或“野生型基因”在本文中可互换地使用来指天然的或天然存在于宿主细胞中的序列。在一些实施方案中,野生型序列指的是为蛋白质工程化项目的起点的感兴趣的序列。野生型序列可以编码同源蛋白或异源蛋白。同源蛋白是宿主细胞无需干预就将产生的蛋白。异源蛋白是如果没有干预则宿主细胞不产生的蛋白。

[0114] 术语“修饰的序列”和“修饰的基因”在本文中可互换地使用来指包括天然存在的核酸序列的缺失、插入或中断的序列。在一些优选的实施方案中,修饰的序列的表达产物是截短蛋白(例如,如果修饰是序列的缺失或中断)。在一些特别优选的实施方案中,截短蛋白保留生物活性。在可选择的实施方案中,修饰的序列的表达产物是加长的蛋白(例如,包括插入到核酸序列的修饰)。在一些实施方案中,插入导致截短蛋白(例如,当插入导致终止密码子的形成时)。因此,插入可以导致作为表达产物的截短蛋白或加长的蛋白。

[0115] 如本文使用的,术语“突变序列”和“突变基因”可互换地使用,并且指的是具有存在于宿主细胞的野生型序列中的至少一个密码子的改变的序列。突变序列的表达产物是相对于野生型具有改变的氨基酸序列的蛋白。表达产物可以具有改变的功能能力(例如,增强的结合亲和力)。

[0116] 如本文使用的,术语“接头”指的是包含1-30个氨基酸,优选地3-6个氨基酸的多肽。接头的氨基酸可以选自由以下组成的组:亮氨酸(Leu,L)、异亮氨酸(Ile,I)、丙氨酸(Ala,A)、甘氨酸(Gly,G)、缬氨酸(Val,V)、脯氨酸(Pro,P)、赖氨酸(Lys,K)、精氨酸(Arg,R)、丝氨酸(Ser,S)、天冬酰胺(Asn,N)、和谷氨酰胺(Gln,Q)、色氨酸(Trp,W)、甲硫氨酸(Met,M)、天冬氨酸(Asp,D)、半胱氨酸(Cys,C)、谷氨酸(Glu,E)、组氨酸(His,H)、苯丙氨酸(Phe,F)、苏氨酸(Thr,T)和酪氨酸(Tyr,Y)。

[0117] “诊断(Diagnostic)”或“诊断(diagnosed)”意指鉴定病理学状况或易患疾病的患者的存在或性质。诊断方法在其灵敏度和特异性方面不同。诊断测定的“灵敏度”是测试为阳性的患病个体的百分比(“真阳性”的百分比)。未通过测定检测出的患病个体为“假阴性”。未患病并且在测定中测试为阴性的受试者被称为“真阴性”。诊断测定的“特异性”为1减去假阳性率,其中“假阳性”率被定义为无疾病、测试为阳性的那些受试者的比例。尽管特定的诊断方法可能不提供状况的确定性诊断,但是如果该方法提供了有助于诊断的阳性指示,它就合格了。

[0118] 术语“患者”或“个体”在本文中可互换地使用,并且指的是待治疗的哺乳动物受试者,人类患者为优选的。在一些情况下,本发明的方法可用于实验动物、兽医学应用和疾病的动物模型的开发,所述动物模型包括但不限于啮齿动物,包括小鼠、大鼠和仓鼠;和灵长类动物。

[0119] 如本文使用的,术语“样品”指的是从受试者或患者获得的任何生物材料。在一个方面中,样品可以包括血液、腹膜液、CSF、唾液或尿液。在其他方面中,样品可以包括全血、血浆、血清、从血液样品富集的B细胞、和培养的细胞(例如,来自受试者的B细胞)。样品还可以包括活检物或组织样品,包括神经组织。在仍其他方面中,样品可以包括整个细胞和/或细胞的裂解物。

[0120] 如本文使用的,术语“治疗(treating)”或“治疗(treatment)”意指逆转、减轻、抑制这样的术语适用的紊乱或状况或这样的紊乱或状况的一种或更多种症状的进展、或防止这样的术语适用的紊乱或状况或这样的紊乱或状况的一种或更多种症状。“治疗有效量”意

图用于赋予受试者治疗益处所必需的活性剂的最小量。例如,对于哺乳动物的“治疗有效量”是这样的量,其改善与屈服于紊乱相关的病理症状、疾病进展或生理状况,诱导或以其他方式引起与屈服于紊乱相关的病理症状、疾病进展或生理状况的改善或对屈服于紊乱的抵抗。

[0121] 如本文使用的,术语“预防”指的是防止疾病或状况在尚未被诊断为患有该疾病或状况的受试者中发生。

[0122] 如本文使用的,术语“癌症”、“过度增殖”和“赘生物”指的是具有自主生长能力的细胞,即以快速增殖细胞生长为特征的异常状态或状况。过度增殖和赘生性疾病状态可以被分类为病理性的,即表征或构成疾病状态,或可以被分类为非病理性的,即偏离正常状态但与疾病状态不相关。该术语意在包括所有类型的癌性生长或致癌过程、转移组织或恶性转化的细胞、组织或器官,而与组织病理学类型或侵袭阶段无关。术语“癌症”或“赘生物”包括各种器官系统的恶性肿瘤,例如影响肺、乳腺、甲状腺、淋巴、胃肠和生殖泌尿道的恶性肿瘤,以及腺癌,其包括恶性肿瘤,例如大多数结肠癌、肾细胞癌、前列腺癌和/或睾丸肿瘤、非小细胞肺癌、小肠癌和食管癌。

[0123] 本文描述的一个方面利用治疗性抗体对由PD-1和/或PD-L1介导的疾病进行诊断、监测或分期并监测治疗功效。更具体地,公开了检测和监测治疗性抗体的方法,其中患者已经经历了免疫疗法的至少一个疗程。各种癌症或慢性感染可以根据本文公开的方法来监测、分期或诊断。

[0124] 癌症的实例包括但不限于血液恶性肿瘤,例如B-细胞淋巴赘生物、T-细胞淋巴赘生物、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、B-NHL、T-NHL、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、小淋巴细胞淋巴瘤(SLL)、套细胞淋巴瘤(MCL)、NK-细胞淋巴赘生物和髓细胞谱系赘生物。非血液学癌症的实例包括但不限于结肠癌、乳腺癌、肺癌、脑癌、前列腺癌、头颈癌、胰腺癌、膀胱癌、结肠直肠癌、骨癌、宫颈癌、肝癌、口腔癌、食管癌、甲状腺癌、肾癌、胃癌、睾丸癌和皮肤癌。

[0125] 慢性感染的实例包括但不限于病毒感染、细菌感染、寄生虫感染或真菌感染,例如慢性肝炎、肺部感染、下呼吸道感染、支气管炎、流感、肺炎和性传播疾病。病毒感染的实例包括但不限于肝炎(HAV、HBV、HCV)、单纯疱疹(HSV)、带状疱疹、HPV、流感(Flu)、AIDS和AIDS相关综合征、鸡痘(chickenpox)(水痘(varicella))、普通感冒、巨细胞病毒(CMV)感染、天花(smallpox)(痘疮(variola))、科罗拉多蜱传热、登革热、埃博拉出血热、口蹄疫、拉沙热、麻疹、马尔堡出血热、传染性单核细胞增多症、腮腺炎、诺如病毒、脊髓灰质炎、渐进性多灶性脑白质病(PML)、狂犬病、风疹、SARS、病毒性脑炎、病毒性胃肠炎、病毒性脑膜炎、病毒性肺炎、西尼罗河疾病和黄热病。细菌感染的实例包括但不限于肺炎、细菌性脑膜炎、霍乱、白喉、结核病、炭疽、肉毒中毒、布鲁氏菌病、弯杆菌病、斑疹伤寒症、淋病、李斯特菌病、莱姆氏病、风湿热、百日咳(pertussis)(顿咳(Whooping Cough))、鼠疫、沙门氏菌病、猩红热、志贺氏菌病、梅毒、破伤风、沙眼、兔热病、伤寒症和尿路感染。寄生虫感染的实例包括但不限于疟疾、利什曼病、锥虫病、查加斯病、隐孢子虫病、肝片吸虫病、丝虫病、阿米巴感染、贾第虫病、蛲虫感染、血吸虫病、绦虫病、弓形体病、旋毛虫病和锥虫病。真菌感染的实例包括但不限于念珠菌病、曲霉病、球孢子菌病、隐球菌病、组织胞浆菌病和足癣。

[0126] 本文公开的方法可以用于确定治疗性抗PD-1和/或抗PD-L1抗体的剂量。具体地,方法包括测试来自已经经历了至少一个免疫疗法疗程的人的样品,以测量治疗性抗PD-1

和/或抗PD-L1抗体的水平,其中取决于抗体的水平,可以调整用该抗体的进一步的治疗。

[0127] 在另外的实施方案中,本文的公开内容涉及用于检测患者对治疗性抗体治疗的响应性的方法,其中治疗性抗体针对PD-1和/或PD-L1,所述方法包括在来自患者的样品中确定无活性TNF α 的存在或量,所述存在或量指示患者对所述治疗的低响应性或降低的响应性。在优选的实施方案中,方法还包括确定治疗性抗体和针对所述治疗性抗体的抗药物抗体的存在或量,以获得患者概况,其中患者概况指示对所述治疗的响应性。

[0128] PD-1和PD-L1

[0129] 本发明涉及包含PD-1 (程序性细胞死亡-1蛋白)的细胞外结构域和寡聚化结构域的融合蛋白,和/或包含PD-L1 (程序性细胞死亡-配体1蛋白)的细胞外结构域和寡聚化结构域的融合蛋白。

[0130] PD-1和PD-L1序列可以是天然人序列的变体。如本文使用的,术语“变体”指的是与参考实体显示出显著的结构同一性,但是与参考实体相比,在一个或多个化学部分的存在或水平上与参考实体在结构上不同的实体。在许多实施方案中,变体在功能上也与其参考实体不同。通常,特定实体是否被适当地认为参考实体的“变体”是基于其与参考实体的结构同一性的程度。如本领域技术人员将理解的,任何生物或化学参考实体均具有某些特征结构元件。根据定义,变体是共有一个或多个这样的特征结构元件的独特化学实体。多肽可以具有包含多于一个氨基酸的特征序列元件,所述多于一个氨基酸在线性或三维空间中相对于彼此具有指定位置和/或有助于特定的生物功能。例如,由于氨基酸序列的一个或多个差异和/或共价附接到多肽骨架的化学部分(例如碳水化合物、脂质等)的一个或多个差异,变体多肽可以与参考多肽不同。在一些实施方案中,变体多肽示出与参考多肽为至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或99%的总序列同一性。可选择地或另外地,在一些实施方案中,变体多肽不与参考多肽共有至少一个特征序列元件。在一些实施方案中,参考多肽具有一种或更多种生物活性。在一些实施方案中,变体多肽共有参考多肽的一种或更多种生物活性。在一些实施方案中,变体多肽缺少参考多肽的一种或更多种生物活性。在一些实施方案中,与参考多肽相比,变体多肽示出降低水平的一种或更多种生物活性。在许多实施方案中,如果感兴趣的多肽具有与亲本的氨基酸序列相同的氨基酸序列,但是在特定位置有少量序列改变,则感兴趣的多肽被认为是亲本或参考多肽的“变体”。通常,与亲本相比,变体中少于20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%的残基被取代。在一些实施方案中,与亲本相比,变体具有10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个被取代的残基。通常,变体具有非常少量(例如,少于5个、4个、3个、2个或1个)的被取代的功能性残基(即,参与特定生物活性的残基)。此外,与亲本相比,变体通常具有不超过5个、4个、3个、2个或1个添加或缺失,并且通常不具有添加或缺失。此外,任何添加或缺失通常少于约25个、约20个、约19个、约18个、约17个、约16个、约15个、约14个、约13个、约10个、约9个、约8个、约7个、约6个,并且通常少于约5个、约4个、约3个或约2个残基。在一些实施方案中,亲本或参考多肽是在自然界中发现的多肽。如本领域普通技术人员将理解的,感兴趣的特定多肽的多种变体通常可以在自然界中发现,特别地当感兴趣的多肽是致病原(infectious agent)多肽时。

[0131] 在本文描述的一个实施方案中,融合蛋白包含PD-1蛋白的预测的细胞外结构域(SEQ ID NO:1)或其片段。在一个方面中,PD-1蛋白的细胞外结构域包含SEQ ID NO:12或其

片段。在另一个方面中,PD-1的细胞外结构域可以与由SEQ ID NO:1的21位至170位的氨基酸组成的多肽序列具有约70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的同源性。

[0132] PD-1的细胞外结构域包含含有SEQ ID NO:1的残基1至残基171的多肽、含有SEQ ID NO:1的残基1至残基170的多肽、含有SEQ ID NO:1的残基1至残基145的多肽、含有SEQ ID NO:1的残基21至残基171的多肽、含有SEQ ID NO:1的残基21至残基170的多肽、含有SEQ ID NO:1的残基21至残基145的多肽、含有SEQ ID NO:1的残基33至残基171的多肽、含有SEQ ID NO:1的残基33至残基170的多肽、含有SEQ ID NO:1的残基33至残基145的多肽、含有SEQ ID NO:1的残基35至残基171的多肽、含有SEQ ID NO:1的残基35至残基170的多肽和含有SEQ ID NO:1的残基35至残基145的多肽。在一个实施方案中,PD-1的细胞外结构域可以与以下多肽具有约70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的同源性:含有SEQ ID NO:1的残基1至残基171的多肽、含有SEQ ID NO:1的残基1至残基170的多肽、含有SEQ ID NO:1的残基1至残基145的多肽、含有SEQ ID NO:1的残基21至残基171的多肽、含有SEQ ID NO:1的残基21至残基170的多肽、含有SEQ ID NO:1的残基21至残基145的多肽、含有SEQ ID NO:1的残基33至残基171的多肽、含有SEQ ID NO:1的残基33至残基170的多肽、含有SEQ ID NO:1的残基33至残基145的多肽、含有SEQ ID NO:1的残基35至残基171的多肽、含有SEQ ID NO:1的残基35至残基170的多肽和含有SEQ ID NO:1的残基35至残基145的多肽。在又一个实施方案中,PD-1的细胞外结构域包含SEQ ID NO:12中列出的氨基酸序列。在另一个实施方案中,PD-1的细胞外结构域可以与SEQ ID NO:12中列出的氨基酸序列具有约70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的同源性。

[0133] 在本文描述的另一个实施方案中,融合蛋白包含PD-L1蛋白的细胞外结构域(SEQ ID NO:2)或其片段。在另一个实施方案中,PD-L1蛋白的细胞外结构域包含SEQ ID NO:13或其片段。此外,PD-L1的细胞外结构域可以与由SEQ ID NO:2的19位至238位的氨基酸组成的多肽序列具有约70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的同源性。

[0134] PD-L1的细胞外结构域可以是含有SEQ ID NO:2的残基1至残基240的多肽、含有SEQ ID NO:2的残基1至残基239的多肽、含有SEQ ID NO:2的残基1至残基238的多肽、含有SEQ ID NO:2的残基19至残基240的多肽、含有SEQ ID NO:2的残基19至残基239的多肽、含有SEQ ID NO:2的残基19至残基238的多肽、含有SEQ ID NO:2的残基18至残基239的多肽、含有SEQ ID NO:2的残基18至残基238的多肽、含有SEQ ID NO:2的残基18至残基225的多肽、含有SEQ ID NO:2的残基18至残基134的多肽、含有SEQ ID NO:2的残基18至残基127的多肽、含有SEQ ID NO:2的残基19至残基239的多肽、含有SEQ ID NO:2的残基19至残基238的多肽、含有SEQ ID NO:2的残基19至残基225的多肽、含有SEQ ID NO:2的残基19至残基134的多肽、含有SEQ ID NO:2的残基19至残基127的多肽、含有SEQ ID NO:2的残基133至残基225的多肽、含有SEQ ID NO:2的残基133至残基238的多肽和含有SEQ ID NO:2的残基133至残基239的多肽。在一个实施方案中,PD-L1的细胞外结构域可以与以下多肽具有约70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的同源性:含有SEQ ID NO:2的残基1至残基240的多肽、含有SEQ ID NO:2的残基1至残基239的多

肽、含有SEQ ID NO:2的残基1至残基238的多肽、含有SEQ ID NO:2的残基19至残基240的多肽、含有SEQ ID NO:2的残基19至残基239的多肽、含有SEQ ID NO:2的残基19至残基238的多肽、含有SEQ ID NO:2的残基18至残基239的多肽、含有SEQ ID NO:2的残基18至残基238的多肽、含有SEQ ID NO:2的残基18至残基225的多肽、含有SEQ ID NO:2的残基18至残基134的多肽、含有SEQ ID NO:2的残基18至残基127的多肽、含有SEQ ID NO:2的残基19至残基239的多肽、含有SEQ ID NO:2的残基19至残基238的多肽、含有SEQ ID NO:2的残基19至残基225的多肽、含有SEQ ID NO:2的残基19至残基134的多肽、含有SEQ ID NO:2的残基19至残基127的多肽、含有SEQ ID NO:2的残基133至残基225的多肽、含有SEQ ID NO:2的残基133至残基238的多肽和含有SEQ ID NO:2的残基133至残基239的多肽。在又一个实施方案中,PD-L1的细胞外结构域包含SEQ ID NO:13中列出的氨基酸序列。在另一个实施方案中,PD-L1的细胞外结构域可以与SEQ ID NO:13中列出的氨基酸序列具有约70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的同源性。

[0135] 此外,某些残基可以通过定点诱变来修饰,以用于改进已知mAb和其靶之间的较高的亲和力相互作用。在一些实施方案中,与亲本相比,修饰构成10个、9个、8个、7个、6个、5个、4个、3个、2个或1个残基的取代。通常,利用定点诱变的修饰具有非常少量(例如,少于5个、4个、3个、2个或1个)的被取代的功能残基(即,参与结合亲和力的残基)。此外,与亲本相比,利用定点诱变的修饰通常具有不超过5个、4个、3个、2个或1个添加或缺失,并且通常不具有添加或缺失。此外,任何添加、缺失或取代通常少于约50个残基、约45个残基、约40个残基、约35个残基、约30个残基、约25个残基、约20个残基、约19个残基、约18个残基、约17个残基、约16个残基、约15个残基、约14个残基、约13个残基、约12个残基、约11个残基、约10个残基、约9个残基、约8个残基、约7个残基、约6个残基,并且通常少于约5个残基、约4个残基、约3个残基或约2个残基。在一些实施方案中,亲本或参考多肽是在自然界中发现的多肽。

[0136] 在一个实施方案中,PD-1内对与抗PD-1抗体的相互作用关键的一个或更多个氨基酸残基被修饰,以用于改进抗体和其靶之间的较高的亲和性相互作用。在一些实施方案中,PD-1内被修饰的一个或更多个氨基酸残基参与氢键合。在另一个实施方案中,PD-1内被修饰的一个或更多个氨基酸残基参与形成盐桥。在又一个实施方案中,PD-1内被修饰的一个或更多个氨基酸残基参与水介导的相互作用。在又一个实施方案中,PD-1内被修饰的一个或更多个氨基酸残基参与范德华相互作用。

[0137] 在一个实施方案中,PD-1内对与帕博利珠单抗mAb的相互作用关键的一个或更多个氨基酸残基被修饰。在相关的实施方案中,PD-1内被修饰的一个或更多个氨基酸残基可以选自由以下组成的组:PD-1N66、PD-1T76、PD-1K78、PD-1S87、PD-1K131、PD-1F63、PD-1E84、PD-1S87、PD-1G90和PD-1A132。在另一个相关的实施方案中,PD-1内被修饰的氨基酸残基是PD-1D85。在又一个实施方案中,相关的实施方案中,PD-1内被修饰的一个或更多个氨基酸残基可以选自由PD-1K78、PD-1S87和PD-1D85组成的组。在又一个实施方案中,相关的实施方案中,PD-1内被修饰的一个或更多个氨基酸残基可以选自由以下组成的组:PD-1V64、PD-1Y68、PD-1Q75、PD-1D77、PD-1A81、PD-1F82、PD-1P83、PD-1R86、PD-1Q88、PD-1P89、PD-1G90、PD-1I126、PD-1L128、PD-1A129和PD-1I134。在又一个实施方案中,相关的实施方案中,PD-1内被修饰的一个或更多个氨基酸残基可以选自由以下组成的组:PD-1N66、PD-1T76、PD-1K78、PD-1S87、PD-1K131、PD-1F63、PD-1E84、PD-1S87、PD-1G90、PD-1A132、PD-1D85、PD-1K78、PD-1S87和PD-1D85、PD-1V64、PD-

₁Y68、_{PD-1}Q75、_{PD-1}D77、_{PD-1}A81、_{PD-1}F82、_{PD-1}P83、_{PD-1}R86、_{PD-1}Q88、_{PD-1}P89、_{PD-1}G90、_{PD-1}I126、_{PD-1}L128、_{PD-1}A129和_{PD-1}I134。

[0138] 在一个实施方案中，_{PD-1}内对与纳武单抗mAb的相互作用关键的一个或更多个氨基酸残基被修饰。在相关的实施方案中，_{PD-1}内被修饰的一个或更多个氨基酸残基可以选自以下组成的组：_{PD-1}P28、_{PD-1}L128、_{PD-1}A129、_{PD-1}P130、_{PD-1}A132、_{PD-1}D29、_{PD-1}R30、_{PD-1}S60和_{PD-1}K131。在另一个相关的实施方案中，_{PD-1}内被修饰的一个或更多个氨基酸残基可以选自以下组成的组：_{PD-1}S27、_{PD-1}P28、_{PD-1}P31、_{PD-1}E61、_{PD-1}A129、_{PD-1}P130、_{PD-1}K131、_{PD-1}A132和_{PD-1}Q133。

[0139] 在一个实施方案中，_{PD-1}内被修饰的一个或更多个氨基酸残基参与纳武单抗或帕博利珠单抗和_{PD-1}之间的氢键合或范德华相互作用。在具体的实施方案中，_{PD-1}内被修饰的一个或更多个氨基酸残基可以选自以下组成的组：_{PD-1}L128、_{PD-1}A129、_{PD-1}A130、_{PD-1}K131和_{PD-1}A132。

[0140] 在一个实施方案中，帕博利珠单抗mAb内对与_{PD-1}的相互作用关键的一个或更多个氨基酸残基被修饰。在一些实施方案中，帕博利珠单抗mAb内被修饰的一个或更多个氨基酸残基包括重链CDR1 (HCDR1) 中的残基。在一些实施方案中，帕博利珠单抗mAb HCDR1内被修饰的一个或更多个氨基酸残基可以选自以下组成的组：_重T30、_重Y33和_重Y35。在一些实施方案中，帕博利珠单抗mAb内被修饰的一个或更多个氨基酸残基包括重链CDR2 (HCDR2) 中的残基。在一些实施方案中，帕博利珠单抗mAb HCDR2内被修饰的一个或更多个氨基酸残基可以选自以下组成的组：_重N52、_重S54、_重N55、_重G57、_重T58和_重N59。在一些实施方案中，帕博利珠单抗mAb内被修饰的一个或更多个氨基酸残基包括重链CDR3 (HCDR3) 中的残基。在一些实施方案中，帕博利珠单抗mAb HCDR3内被修饰的一个或更多个氨基酸残基可以选自以下组成的组：_重R99、_重Y101、_重R102、_重F103、_重D104、_重M105和_重D108。在一些实施方案中，帕博利珠单抗mAb内被修饰的一个或更多个氨基酸残基包括轻链CDR1 (LCDR1) 中的残基。在一些实施方案中，帕博利珠单抗mAb LCDR1内被修饰的一个或更多个氨基酸残基可以选自以下组成的组：_轻T31、_轻S32、_轻Y34和_轻Y36。在一些实施方案中，帕博利珠单抗mAb内被修饰的一个或更多个氨基酸残基包括轻链CDR2 (LCDR2) 中的残基。在一些实施方案中，帕博利珠单抗mAb LCDR2内被修饰的一个或更多个氨基酸残基可以选自以下组成的组：_轻Y53、_轻L54、_轻Y57和_轻E59。在一些实施方案中，帕博利珠单抗mAb内被修饰的一个或更多个氨基酸残基包括轻链CDR3 (LCDR3) 中的残基。在一些实施方案中，帕博利珠单抗mAb LCDR3内被修饰的一个或更多个氨基酸残基可以选自以下组成的组：_轻S95、_轻R96、_轻D97、_轻L98和_轻L100。

[0141] 在一个实施方案中，纳武单抗mAb中对与_{PD-1}的相互作用关键的一个或更多个氨基酸残基被修饰。在一些实施方案中，纳武单抗mAb内被修饰的一个或更多个氨基酸残基包括重链CDR1 (HCDR1) 中的残基。在一些实施方案中，纳武单抗mAb HCDR1内被修饰的一个或更多个氨基酸残基可以选自以下组成的组：_重G26、_重I27、_重N31和_重G33。在一些实施方案中，纳武单抗mAb内被修饰的一个或更多个氨基酸残基包括重链CDR2 (HCDR2) 中的残基。在一些实施方案中，纳武单抗mAb HCDR2内被修饰的一个或更多个氨基酸残基可以选自以下组成的组：_重V50、_重W52和_重Y53。在一些实施方案中，纳武单抗mAb内被修饰的一个或更多个氨基酸残基包括重链CDR3 (HCDR3) 中的残基。在一些实施方案中，纳武单抗mAb HCDR3内被修饰的一个或更多个氨基酸残基可以选自以下组成的组：_重N99、_重D100、_重D101和_重Y102。在一些

实施方案中,纳武单抗mAb内被修饰的一个或多个氨基酸残基包括轻链CDR1 (LCDR1) 中的残基。在一些实施方案中,纳武单抗mAb内被修饰的一个或多个氨基酸残基包括轻链CDR2 (LCDR2) 中的残基。在一些实施方案中,纳武单抗mAb LCDR2内被修饰的一个或多个氨基酸残基可以选自由以下组成的组:轻L46、轻A55和轻T56。在一些实施方案中,纳武单抗mAb内被修饰的一个或多个氨基酸残基包括轻链CDR3 (LCDR3) 中的残基。在一些实施方案中,帕博利珠单抗mAb LCDR3内被修饰的氨基酸残基是轻S91。

[0142] 在另一个实施方案中,PD-L1内对与抗PD-L1抗体的相互作用关键的一个或多个氨基酸残基被修饰,以用于改进抗体和其靶之间的较高的亲和性相互作用。在一些实施方案中,PD-L1内被修饰的一个或多个氨基酸残基参与氢键合。在另一个实施方案中,PD-L1内被修饰的一个或多个氨基酸残基参与形成盐桥。在又一个实施方案中,PD-L1内被修饰的一个或多个氨基酸残基参与水介导的相互作用。在又一个实施方案中,PD-L1内被修饰的一个或多个氨基酸残基参与范德华相互作用。

[0143] 寡聚化结构域

[0144] 本发明公开了包含PD-1 (程序性细胞死亡-1蛋白) 的细胞外结构域或PD-L1 (程序性细胞死亡-配体1蛋白) 的细胞外结构域和寡聚化结构域的融合蛋白。本文描述的寡聚化结构域可以包括选自由以下组成的组的结构域:Fc结构域、网格蛋白三聚化结构域、GCN4三聚化结构域、p53四聚化结构域和五聚化结构域或甚至创建新型蛋白质的无铰链的单体Fc结构域。在一些实施方案中,寡聚化结构域缺少寡聚化区域,并且融合蛋白是单体。在一些实施方案中,寡聚化结构域是无铰链的单体Fc结构域,并且融合蛋白是单体。寡聚化结构域可以包含病毒样颗粒作为用于暴露抗原或抗体可变结构域的结构。虽然这些寡聚化结构域是本领域专家已知的,但是它们还未被用于创建用于诊断的新型蛋白。

[0145] 在一些方面中,寡聚化结构域可以包含选自由Fc结构域、Fc结构域的片段和Fc结构域的变体组成的组的氨基酸序列。在一个实施方案中,本文描述的融合蛋白可以是更高等级结构例如蛋白质或多聚体复合物的部分。在一些实施方案中,PD-1蛋白和/或PD-L1蛋白经由一个或多个肽接头与Fc结构域或其片段融合。在一个实施方案中,PD-1蛋白和/或PD-L1蛋白与所述Fc结构域或其片段的C-末端融合。在另一个实施方案中,PD-1蛋白和/或PD-L1蛋白与所述Fc结构域或其片段的N-末端融合。

[0146] 在一些实施方案中,寡聚化结构域包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:28。

[0147] 在一个实施方案中,寡聚化结构域选自由以下组成的组:SEQ ID NO:9中列出的氨基酸序列(GCN4三聚体结构域)、SEQ ID NO:10中列出的氨基酸序列(网格蛋白三聚体结构域)和SEQ ID NO:11中列出的氨基酸序列(p53四聚体结构域)。在一些实施方案中,Fc结构域可以与SEQ ID NO:9中列出的氨基酸序列(GCN4三聚体结构域)具有约70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的同源性。在一些实施方案中,Fc结构域可以与SEQ ID NO:10中列出的氨基酸序列(网格蛋白三聚体结构域)具有约70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的同源性。在一些实施方案中,Fc结构域可以与SEQ ID NO:11中列出的氨基酸序列(p53四聚体结构域)具有约70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、

97%、98%、99%或更大的同源性。

[0148] 在一个实施方案中,Fc结构域包括免疫球蛋白CH2结构域或免疫球蛋白CH3结构域。在另一个实施方案中,Fc结构域包括免疫球蛋白CH2和CH3结构域。在一些实施方案中,Fc结构域选自由以下组成的组: IgG1 CH2和CH3结构域、IgG4 CH2和CH3结构域、IgG1 CH2和IgG4 CH3结构域以及IgG4 CH2和IgG1 CH3结构域。在一些实施方案中,Fc结构域可以是小鼠或人的结构域。在一些实施方案中,Fc结构域可以是小鼠IgG1或IgG2A的结构域。在其他实施方案中,Fc结构域包括IgG铰链结构域。

[0149] 在一个实施方案中,Fc结构域选自由以下组成的组: SEQ ID NO:6中列出的氨基酸序列(鼠IgG1,CH2和CH3)、SEQ ID NO:7中列出的氨基酸序列(鼠IgG1Fc)、SEQ ID NO:8中列出的氨基酸序列(鼠IgG2A Fc)和SEQ ID NO:28中列出的氨基酸序列(鼠IgG2A,CH2和CH3)。在一些实施方案中,Fc结构域可以与SEQ ID NO:6中列出的氨基酸序列具有约70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的同源性。在一些实施方案中,Fc结构域可以与SEQ ID NO:7中列出的氨基酸序列具有约70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的同源性。在一些实施方案中,Fc结构域可以与SEQ ID NO:8中列出的氨基酸序列具有约70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的同源性。在一些实施方案中,Fc结构域可以与SEQ ID NO:28中列出的氨基酸序列具有约70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的同源性。

[0150] 如本文使用的,术语Ig“铰链”区指的是包含与天然存在的Ig铰链区域序列的一部分共有序列同一性或相似性的氨基酸序列的多肽,该天然存在的Ig铰链区域序列包括半胱氨酸残基,在此处的二硫键连接免疫球蛋白的两条重链。本文描述的铰链区接头与天然存在的免疫球蛋白铰链区氨基酸序列的序列相似性可以在从至少50%至约75%-80%的范围内,并且通常大于约90%。

[0151] 在一些实施方案中,本申请的融合蛋白的鼠IgG1 Fc结构域包括铰链。在一些实施方案中,本申请的融合蛋白的鼠IgG1 Fc结构域缺少铰链。鼠IgG1 Fc结构域的示例性氨基酸序列是SEQ ID NO:6(无铰链)和SEQ ID NO:7(带铰链)。

[0152] 在一些实施方案中,本申请的融合蛋白的鼠IgG2A Fc结构域包括铰链。在一些实施方案中,本申请的融合蛋白的鼠IgG2A Fc结构域缺少铰链。鼠IgG2A Fc结构域的示例性氨基酸序列是SEQ ID NO:28(无铰链)和SEQ ID NO:8(带铰链)。

[0153] 接头

[0154] 在一些实施方案中,PD-1蛋白和/或PD-L1蛋白经由一个或更多个肽接头与寡聚化结构域或其片段融合。在一个实施方案中,PD-1蛋白和/或PD-L1蛋白经由一个或更多个肽接头与所述寡聚化结构域或其片段的C-末端融合。在另一个实施方案中,PD-1蛋白和/或PD-L1蛋白经由一个或更多个肽接头与所述寡聚化结构域或其片段的N-末端融合。

[0155] 在一些实施方案中,肽接头可以由通常包括至少一个甘氨酸和至少一个丝氨酸的连续氨基酸的序列组成。肽接头还可以由通常包括至少一个甘氨酸、至少一个脯氨酸和至少一个丝氨酸的连续氨基酸的序列组成。示例性柔性接头和柔性pro接头包括SEQ ID NO:4(GGGs)或SEQ ID NO:5(GGGPS)中列出的氨基酸序列,但是肽接头的精确氨基酸序列没有特别限制。在一些实施方案中,PD-1蛋白和/或PD-L1蛋白经由两个或更多个不同的肽接头与

寡聚化结构域或其片段融合。在一些实施方案中,PD-1蛋白和/或PD-L1蛋白经由两个或更多个相同的肽接头与寡聚化结构域或其片段融合。

[0156] 如本文描述的肽接头通常不存在于自然界中,但是一些天然存在的氨基酸序列可以用作合适的接头或可以用于设计合适的接头。接头可以包含约1个至30个氨基酸,例如约2个至25个、约3个至20个、约4个至16个、或约1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个或20个氨基酸。

[0157] 信号肽序列

[0158] 本文公开的融合蛋白通常包含有利于蛋白质跨越表达载体的细胞膜移位的信号肽序列(或“信号序列”),所述表达载体例如哺乳动物细胞,尤其是人类细胞。然而,例如,如果本文公开的融合蛋白通常包含有利于多肽跨越表达载体的细胞膜移位的信号肽序列,则多肽可以缺少信号肽序列,所述表达载体例如哺乳动物细胞,尤其是人类细胞。然而,融合蛋白可以缺少信号肽序列。合成产生的多肽可以类似地缺少信号肽序列。

[0159] 信号肽序列通常被包含在融合蛋白的N-末端。信号肽序列优选地足以在真核细胞(例如哺乳动物细胞,诸如人类细胞)中翻译蛋白后将蛋白移位到真核细胞的细胞膜表面的外部,但是融合蛋白的其他序列基序也可以帮助移位。

[0160] 示例性信号肽序列具有SEQ ID NO:3(MYRMQLLSICIALSLALVTNS)中列出的氨基酸序列,其是人类白细胞介素-2信号肽序列。该充分表征的序列能够将蛋白移位到人类细胞和其他哺乳动物细胞之外。

[0161] 亲和标签

[0162] 融合蛋白可以任选地包括亲和标签。亲和标签可用于纯化,并且它们还可以用于利用融合蛋白的测定中。示例性亲和标签包括多组氨酸、几丁质结合蛋白、麦芽糖结合蛋白、Strep-标签、谷胱甘肽-S-转移酶、FLAG-标签、V5-标签、Myc-标签、HA-标签、NE-标签、AviTag、钙调蛋白-标签、聚谷氨酸、S-标签、SBP-标签、Softag 1、Softag 3、TC标签、VSV-标签、Xpress标签、Isopeptag、SpyTag、SnoopTag、生物素羧基载体蛋白、绿色荧光蛋白-标签、HaloTag、Nus-标签和硫氧还蛋白-标签,但是亲和标签的选择没有特别限制。然而,例如,如果亲和标签在使用后被去除或如果使用不需要亲和标签的策略纯化融合蛋白,则融合蛋白可以缺少亲和标签。示例性亲和标签是多组氨酸,其通常包括包含七个连续组氨酸的氨基酸序列(SEQ ID NO:31)。另一种示例性亲和标签是包含4个和10个之间的连续组氨酸的多组氨酸标签。

[0163] 融合蛋白

[0164] 在本文描述的实施方案中特征化的融合蛋白可以包含PD-1(程序性细胞死亡-1蛋白)的细胞外结构域或PD-L1(程序性细胞死亡-配体1蛋白)的细胞外结构域和寡聚化结构域,其中寡聚化结构域选自由鼠IgG1Fc结构域、鼠IgG2A Fc结构域、GCN4三聚体结构域、网格蛋白三聚体结构域和p53四聚体结构域或其片段组成的组。

[0165] 本文公开的种类的融合蛋白可以具有以下中列出的氨基酸序列: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:29或SEQ ID NO:30。融合蛋白可以具有与以下中列出的氨基酸序列具有至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、

96%、97%、98%、99%或99.5%序列同一性的氨基酸序列: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:29或SEQ ID NO:30。

[0166] 核酸、克隆细胞和表达细胞

[0167] 本文描述的实施方案还包括包含编码本文描述的融合蛋白的核苷酸序列的核酸。核酸可以是DNA或RNA。包含编码本文描述的融合蛋白的核苷酸序列的DNA通常包含可操作地连接至核苷酸序列的启动子。启动子优选地能够驱动感兴趣的表达细胞中核苷酸序列的组成型或诱导型表达。核酸的精确核苷酸序列没有特别限制,只要核苷酸序列编码本文描述的融合蛋白。密码子可以被选择为,例如匹配感兴趣的表达细胞(例如,哺乳动物细胞诸如人类细胞)的密码子偏倚和/或为了克隆期间方便。DNA可以是质粒,例如,质粒可以包含复制起点(例如,用于质粒在原核细胞中的复制)。

[0168] 本发明的多个方面还涉及包含核酸的细胞,所述核酸包含编码如本文描述的融合蛋白的核苷酸序列。细胞可以是表达细胞或克隆细胞。核酸通常在大肠杆菌中克隆,但是可以使用其他克隆细胞。如果细胞是表达细胞,则核酸任选地是染色体的核酸,即其中核苷酸序列被整合到染色体中,但是核酸也可以存在于表达细胞中,例如作为染色体外DNA。

[0169] 本发明的多个方面包括包含核酸的细胞,所述核酸包含编码如本文描述的融合蛋白的序列。细胞通常是表达细胞。表达细胞的性质没有特别限制。哺乳动物表达细胞可以允许融合蛋白或寡聚融合蛋白的有利折叠、翻译后修饰和/或分泌,但是其他真核细胞或原核细胞可以用作表达细胞。示例性表达细胞包括CHO、BHK、NS0、Sp2/0、COS、C127、HEK、HT-1080、PER.C6、HeLa和Jurkat细胞。

[0170] 本文的本发明的另一个方面提供了制备包含PD-1(程序性细胞死亡-1蛋白)的细胞外结构域和/或PD-L1(程序性细胞死亡-配体1蛋白)的细胞外结构域和寡聚化结构域的融合蛋白的方法,所述方法包括以下步骤:

[0171] a) 用编码根据本发明的融合蛋白的核酸分子转染宿主细胞,

[0172] b) 通过在宿主细胞中表达(a)的核酸分子来制备融合蛋白。

[0173] 免疫测定和试剂

[0174] 免疫测定通常用于测量细胞表面抗原或测量样品中的抗体。通常,使用流式细胞术的免疫荧光是精选的免疫测定。然而,可以使用其他免疫测定,例如酶联免疫吸附测定(ELISA)。该技术是基于抗原-抗体相互作用的特殊性质,通过简单的相分离来产生用于检测生物分子的强有力的测定。

[0175] 用于ELISA的方法和仪器比用于免疫荧光的方法和仪器简单。此外,ELISA和免疫荧光测定是完全不同的测定。ELISA测定测量血浆/血清中的蛋白(抗原)或抗体,这反映整个身体。相反,表面免疫荧光测定专门测量个体细胞表面上的抗原,并且不提供关于体内细胞数量的信息。因此,开发ELISA测定以提供整个身体的测量存在优势。

[0176] 一种熟知的且高特异性的ELISA是夹心ELISA。在该测定中,抗体与固相或支持物结合,然后使固相或支持物与所测试的样品接触,以通过形成二元固相抗体:抗原复合物从样品提取抗原。在合适的孵育时间段后,洗涤固体支持物以去除流体样品的残留物,并且然后与含有已知量的标记的抗体的溶液接触。

[0177] 本发明的一些实施方案涉及用于测定包含抗PD-1和/或抗PD-L1抗体的组合物的免疫测定。其他实施方案涉及用于测定包含PD-1和/或PD-L1抗原的组合物的免疫测定。

[0178] 根据本发明的示例性免疫测定是例如ELISA测定(酶联免疫吸附测定),其使用比色、荧光或化学发光检测。根据本发明的其他示例性免疫测定是技术人员熟知的,例如使用斜率校正的ELISA、RIA(放射免疫测定)、竞争性EIA(竞争性酶免疫测定)、DAS-ELISA(双抗体夹心-ELISA)、桥式-ELISA、基于使用蛋白质或抗体微阵列(包括基于液珠的阵列,如基于Luminex技术的阵列)的技术、基于离散微粒的技术、通常用于快速测试和医疗点应用的使用目视(通过眼睛)判断或使用读取器如智能手机或便携式读取器或台式读取器的基于胶体金或其他可见的微粒或荧光颗粒的沉淀的测定,如基于免疫色谱的横向流测试或纵向流测试、亲和色谱技术、均相迁移率变动测定(HMSA)、配体结合测定、凝集素结合测定、生物传感器等。

[0179] 已知的是,循环抗PD-1抗体具有与其他IgG4抗体相似的半衰期(Farolfi等人2016)。此外,PD-1抗体包被循环T细胞,并有效地将自身从循环中去除(不再在血浆中自由循环)。这导致人类中循环抗PD-1(纳武单抗)水平的相对快速下降。循环水平、T-细胞停留水平和结果之间的关系是不清楚的,并且因此可以阐明这一点的测定是有价值的。然而,已知的是,抗PD-1(纳武单抗)在循环T细胞上保持停留持续延长的时间段,取决于0.3mg/kg至10mg/kg的初始剂量,占据水平为60%-80%(Brahmer等人2010)。在该功能中,抗PD-1充当PD-1的拮抗剂,防止配体与肿瘤上的PD-L1结合并随后关闭免疫应答。将剂量、T细胞占据率和可测量的循环抗PD-1或抗PD-L1与结果相关联将是重要的。因此,本公开内容的一个目的是提供用于检测和/或监测抗PD-1和/或抗PD-L1抗体的方法。

[0180] 具体地,抗PD-1和/或抗PD-L1治疗性抗体、抗体:抗原复合物和/或针对PD-1和/或PD-L1的抗体可以通过使用改进的夹心ELISA技术或本领域技术人员已知的其他免疫测定技术来检测或监测。

[0181] 在特定的实施方案中,类似于在本发明的实施例中示出的,抗PD-1或抗PD-L1生物药物的浓度通过ELISA来测量。

[0182] 本文描述的融合蛋白还可以用于防止或竞争抗体与T细胞的表面上或肿瘤细胞上的相同的抗原的结合。

[0183] 在一个方面中,抗PD-1和/或抗PD-L1治疗性抗体在已经经历用治疗性抗体的至少一个剂量的免疫疗法的患者中测量。治疗性抗体可以包括但不限于抗PD-1或抗PD-L1治疗性抗体。抗体:抗原复合物通过ELISA技术或其他免疫测定来测量,并且提供了治疗性抗体的循环水平的确定。然后对该结果和治疗方案的变化解释由熟悉临床征象和症状的肿瘤学家确定,以确定抗体免疫疗法的功效。在一些患者中,抗体治疗剂比其他治疗剂被更快地清除,特别是如果患者具有不同的同种异型(恒定区多态性)的话。

[0184] 本发明的一个方面包括向患者提供免疫疗法的方法,所述方法包括向患者施用治疗性抗体和使用本文描述的融合蛋白检测抗PD-1和/或抗PD-L1治疗性抗体的存在。设想,这些方法可以用于监测基于抗体的疗法的功效。在一个实施方案中,如果功效缓慢出现并且没有消除症状,则医生可能希望增加剂量。我们在本文中描述的这些工具将允许灵敏地检测治疗性抗体的循环水平的预期变化。

[0185] 在另外的实施方案中,本发明提供了用于通过测量抗PD-1和/或抗PD-L1治疗性抗

体来检测和/或监测由PD-1和/或PD-L1介导的疾病的方法。所述用于检测和/或监测由PD-1和/或PD-L1介导的疾病的方法包括使来自患者的样品与本文描述的融合蛋白接触。在另外的实施方案中,用于检测和/或监测由PD-1和/或PD-L1介导的疾病的方法对已经经历用治疗性抗体的免疫疗法的疗程的患者进行。

[0186] 本发明的一些方面涉及确定生物治疗性抗体的循环水平的量的方法,所述生物治疗性抗体选自由纳武单抗、帕博利珠单抗和其他抗PD-1治疗剂组成的组。在一些实施方案中,确定生物治疗性抗体的循环水平的量的方法包括(i)从经历抗体治疗的患者获得样品,和(ii)使样品与根据本发明的融合蛋白接触的步骤。

[0187] 本发明的其他方面涉及确定生物治疗性抗体的(游离)循环水平的量的方法,所述生物治疗性抗体选自由阿特朱单抗、Avelumab和其他抗PD-L1治疗剂组成的组,所述方法包括(i)从经历抗体治疗的患者获得样品,和(ii)使样品与根据本发明的融合蛋白接触。

[0188] 一些实施方案涉及包含融合蛋白的组合物,所述融合蛋白包含PD-1和/或PD-L1或其片段和寡聚化结构域。本文还提供了制备包含融合蛋白的组合物的方法,所述融合蛋白包含如本文描述的PD-1和/或PD-L1或其片段和寡聚化结构域。还提供了包含融合蛋白或组合物的试剂盒。

[0189] 一些实施方案包括包含如本文描述的融合蛋白的免疫测定试剂,用于测定包含抗PD-1和/或抗PD-L1抗体的组合物。免疫测定试剂可以被结合至固体支持物。固体支持物可以是例如珠、膜、微量滴定板、多肽芯片或色谱柱的固相。

[0190] 多种实施方案还包括用于测定包含抗PD-1和/或抗PD-L1抗体的组合物的装置。装置可以是用于确定样品是否包含抗PD-1和/或抗PD-L1抗体的装置。除非另有定义,否则本文使用的所有技术术语和科学术语具有与由本发明所属技术领域的普通技术人员通常理解的相同的含义。下文描述了示例性方法和材料,但是类似于或等同于本文描述的方法和材料也可以使用并且对本领域技术人员将是明显的。本文提及的所有出版物和其他参考文献均通过引用以其整体并入。在冲突的情况下,将以本说明书,包括定义为准。材料、方法和实施例仅为说明性的,并且并不意图是限制性的。

[0191] 贯穿本说明书和权利要求,词语“包含(comprise)”或变型例如“包含(comprises)”或“包含(comprising)”将被理解为暗示包含所述及的整数或整数的组,但不排除任何其他整数或整数的组。

[0192] 通过参考以下实施例将更全面地理解本发明。然而,它们不应被解释为限制本发明的范围。本文提及的所有文献和专利引用均通过引用明确地并入。

实施例

[0193] 实施例1:检查点蛋白的表达和纯化

[0194] 编码人PD-1和PD-L1的各种融合蛋白的基因通过合成产生,被密码子优化以便于哺乳动物表达,并被克隆到pTT5载体或其他高表达哺乳动物载体中。进行质粒DNA的低内毒素放大制备以为哺乳动物瞬时表达做准备。

[0195] 利用标准转染方案将人胚胎肾(HEK)293来源的细胞的培养物用放大表达质粒瞬时转染并培养。在转染后4天-5天,通过离心收获细胞沉淀物,并通过蛋白印迹和SDS-PAGE验证细胞培养物上清液(CCS)中的蛋白表达。

[0196] 包含IgG1或IgG2a的融合蛋白通过蛋白A亲和色谱纯化,并且通过透析被配制、等分并储存在-80℃。包含p53多聚化结构域的蛋白具有C-末端组氨酸标签,并且通过固定的金属亲和色谱来纯化、交换缓冲液、等分并储存在-80℃。蛋白表达和四聚化的确认通过SDS-PAGE和CE-SDS (PD-1-p53-His) 来评估。

[0197] 图1和图2示出了分别在还原和非还原条件下运行的4%-20% tris-甘氨酸TGX™ SDS-PAGE凝胶。凝胶用InstantBlue™蛋白染色剂染色。每种凝胶的泳道从左至右被编号为1至10。第一个泳道包含分子量标志物,泳道2-5包含对应于SEQ ID NO:14至17的融合蛋白,并且泳道6至8包含对应于SEQ ID NO:21至23的融合蛋白,将它们克隆并且然后在真核细胞中表达。每种融合蛋白能够以可检测的水平表达。

[0198] 实施例2:PD-1和PD-L1重组蛋白的特异性

[0199] 2a. 针对抗PD-1和抗PD-L1抗体的特异反应性

[0200] 测试了若干重组PD-1和PD-L1蛋白以获得它们针对来自商业来源的抗PD-1和抗PD-L1抗体的特异反应性。重组形式的PD-L1和PD-1蛋白用直接标记的荧光抗体使用ELISA测定单独地测试。

[0201] 将ELISA板用PD-1或PD-L1融合蛋白包被,并用APC缀合的抗PD-1或抗PD-L1抗体使用荧光读取器检测。测试50nM等摩尔浓度的不同抗原和相同抗原的不同形式,以补偿这些蛋白的不同分子量。图3A示出了连续稀释系列(从0.5μg/ml至0.04μg/ml的稀释液)中的PD-1-p53 (PD1-(GGGPS)2-p53-HisTag, SEQ ID NO:29) 针对抗PD-1抗体的特异反应性。图3B示出了如上文提及的稀释系列中的PD-L1-p53蛋白 (PD-L1-(GGGPS)2-p53-HisTag, SEQ ID NO:30) 针对抗PD-L1抗体的特异反应性。图3B还示出了PD-L1Fc单体 (SEQ ID NO:22) 和PD-L1-p53四聚体 (SEQ ID NO:30) 的反应性的比较。

[0202] 2b. 用于定量人血浆中抗PD1抗体的PD-1融合蛋白的比较。

[0203] 测试重组蛋白PD1-(GGGPS)2-IgG1-Fc (仅CH2、CH3) (SEQ ID NO:14)、PD1-IgG1-Fc (SEQ ID NO:16) 和PD1-p53 (SEQ ID NO:29),以检测用于癌症治疗的抗PD1治疗性mAb以及确定人血浆中抗PD1mAb的药物浓度;在该实例中,使用帕博利珠单抗 (**Keytruda®**)。

[0204] 用在50nM浓度的稀释于PBS pH 7.4中的若干PD-1融合蛋白作为包被缓冲液过夜包被ELISA板。第二天,将板用1xELISA洗涤缓冲液 (BioRad, BUF031C) 洗涤5次。封闭步骤通过添加200μL根据制造商的说明制备的1:4BlockACE (BioRad, BUF029) 水溶液开始。在另一洗涤步骤之后将板在37℃孵育持续1小时。将每个帕博利珠单抗标准浓度的数百微升以及IgG1阴性对照稀释在测定缓冲液 (1:8BlockACE水溶液) 中,并添加到每个孔中。将板在37℃孵育持续1小时,并且然后如先前描述的用1xELISA洗涤缓冲液洗涤5次。在该步骤之后,将100μL的0.5μg/mL Fc特异性缀合有辣根过氧化物酶抗体的完整小鼠抗人IgG4 (Thermoscientific, 克隆HP6023目录号A-10654) 添加到每个孔中。将板在37℃孵育持续30分钟;在1xELISA洗涤缓冲液中洗涤5次,并且在15min、30min和60min测量光密度;随后添加ABTS底物 (Roche, 目录号11 684 302 001)。

[0205] 图4A示出了使用PD-1重组蛋白来确定人血浆中帕博利珠单抗的浓度。使用六种浓度 (10μg/mL、1μg/mL、0.1μg/mL、0.01μg/mL、0.001μg/mL和0.0001μg/mL) 的帕博利珠单抗标准物产生对于所产生的每种重组PD1蛋白的标准曲线。被测试的PD1蛋白以不同的寡聚状态,“单体样”、二聚体和四聚体存在。数据示出PD1-p53 (四聚体) 具有比PD1-Fc (二聚体) 和

PD1-Fc (CH₂、CH₃) (“单体”) 更高的亲合力和更低的EC₅₀值。此外,使用PD1-p53提供了范围从0.01μg/ml-10μg/ml的浓度的改进的S/CO (信号截止噪声比) (图4B)。在该测定中,截止值借助于三个阴性血浆样品的平均值加上针对这些样品获得的光密度的标准偏差的三倍来确定。

[0206] 2c. PD-L1重组蛋白的反应性

[0207] 测试不同的PD-L1融合蛋白针对特异性抗PD-L1抗体的反应性。用荧光标记的抗PD-L1mAb测试重组形式的PD-L1 (PD-L1-p53四聚体 (SEQ ID NO:30) 和PD-L1-Fc二聚体 (R&D systems))。简言之,将ELISA板 (黑色) 用20nM等摩尔浓度的不同PD-L1蛋白包被,并且直接使用APC缀合的抗PD-L1抗体使用荧光读取器来检测。图5示出了连续稀释系列 (从5μg/ml至0.001μg/ml的4倍稀释液) 中的PD-L1Fc二聚体 (R&D sys) 和PD-L1p53四聚体 (SEQ ID NO:30) 针对抗PD-L1抗体的反应性的比较,并描绘了信号截止噪声比浓度。PD-L1p53四聚体示出了比PD-L1-Fc二聚体更高的结合反应性。

[0208] 参考文献:

[0209] 1. Goodman, Patel & Kurzrock, PD-1-PD-L1 immune-checkpoint blockade in B-cell lymphomas, Nature Reviews Clinical Oncology, 14:203-220, 2017.

[0210] 2. Elassaiss-Schaap et al., Using Model-Based “Learn and Confirm” to Reveal the Pharmacokinetics-Pharmacodynamics Relationship of Pembrolizumab in the KEYNOTE-001 Trial CPT Pharmacometrics Syst. Pharmacol. (2017) 6, 21-28; doi: 10.1002/psp4.12132.

[0211] 3. Agrawal et al. Nivolumab dose selection: challenges, opportunities, and lessons learned for cancer immunotherapy. Journal for ImmunoTherapy of Cancer (2016) 4:72 DOI 10.1186/s40425-016-0177-2

[0212] 4. Gardiner et al., A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Assessment of BMS-936558, a Fully Human Monoclonal Antibody to Programmed Death-1 (PD-1), in Patients with Chronic Hepatitis C Virus Infection. PLoS ONE, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0063818> 2013.

[0213] 5. Zheng et al., Level of circulating PD-L1 expression in patients with advanced gastric cancer and its clinical implications. Chin Journal of Cancer Research, 26, 104-111, 2014.

[0214] 6. Ono Pharmaceutical Co. Ltd. (2014), Human Anti-human PD-1 Monoclonal Antibody “OPDIVO® Intravenous Infusion 20 mg/100 mg” Receives Manufacturing and Marketing Approval in Japan for the Treatment of Unresectable Melanoma [press release]. Retrieved from http://www.ono.co.jp/eng/news/pdf/sm_cn140704.pdf.

[0215] 7. Bristol-Meyers Squibb (2016), Opdivo® (nivolumab) Granted First Approval of a PD-1 Inhibitor in Hematology for the Treatment of Classical Hodgkin Lymphoma Patients Who Have Relapsed or Progressed After Auto-HSCT and Post-transplantation Brentuximab Vedotin by the FDA [press release]. Retrieved from <https://news.bms.com/press-release/cancer/opdivo-nivolumab-granted->

first-approval-pd-1-inhibitor-hematology-treatment-cla

[0216] 8.Federal Drug Administration(2014),FDA expands approved use of Opdivo to treat lung cancer,[press announcement].Retrieved from <https://www.fda.gov/NewsEvents/newsroom/PressAnnouncements/ucm436534.htm>

[0217] 9.Federal Drug Administration(2015),FDA approves Opdivo to treat advanced form of kidney cancer,[press announcement].Retrieved from <https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm473971.htm>

[0218] 10.Federal Drug Administration(2017),FDA grants accelerated approval to pembrolizumab for first tissue/site agnostic indication[press announcement].Retrieved from <https://www.fda.gov/Drugs/InformationOnDrugs/ApprovedDrugs/ucm560040.htm>

[0219] 11.Thompson RH,Gillett MD,Cheville JC,Lohse CM,Dong H,Webster WS,Krejci KG,Lobo JR,Sengupta S,Chen L,Zincke H,Blute ML,Strome SE,Leibovich BC,Kwon ED(2004).Costimulatory B7-H1 in renal cell carcinoma patients:Indicator of tumor aggressiveness and potential therapeutic target.PNAS USA.101(49):17174-9.doi:10.1073/pnas.0406351101

[0220] 12.Opdivo(package insert),Bristol-Meyers Squibb,New York,NY;2017.

[0221] 13.Pembrolizumab(package insert),Merck,Kelinworth,NJ;2017.

[0222] 14.Ybe JA,Fontaine SN,Stone T,Nix J,Lin X,and S Mishra.2013 Nuclear localization of clathrin involves a labile helix outside the trimerization domain.FEBS Lett.2013January 16;587(2):142-149.doi:10.1016/j.febslet.2012.11.005

[0223] 15.Yang X, Lee J, Mahony EM, Kwong PD, Wyatt R, and J Sodroski.2002.Highly Stable Trimers Formed by Human Immunodeficiency Virus Type 1 Envelope Glycoproteins Fused with the Trimeric Motif of T4 Bacteriophage Fibrin J Virology p.4634-4642 Vol.76,No.9

[0224] 16.Lee W,Harvey TS,Yin Y,Yau P,Litchfield D,and CH Arrowsmith.1994.Solution structure of the tetrameric minimum transforming domain of p53 Nature Structural Biology 1,877-890

[0225] 17.Lee JY, Lee HT, Shin W, Chae J, Kin SH, Lim H, Heo TW, Park KY, Lee YJ, Ruy SE, Lee JU, Heo YS. Structural Basis of checkpoint blockade by monoclonal antibodies in cancer immunotherapy. et al, Nat. Commun., 2016, 7:13354.

[0226] 18.Brahmer JR,Drake CG,Wollner I,Powderly JD,Picus J,Sharfman WH, Stankevich E,Pons A,Salay TM,McMiller TL,Gilson MM,Wang C,Selby M,Taube JM, Anders R,Chen L,Korman AJ,Pardoll DM,Lowy I,Topalian SL.Phase I study of single-agent anti-programmed death-1 (MDX-1106) in refractory solid tumors: safety,clinical activity,pharmacodynamics,and immunologic correlates.J Clin Oncol.2010 Jul 1;28(19):3167-75.

[0227] 19.Farolfi A,Schepisi G,Conteduca V,Burgio SL,Lolli C,De Giorgi

U.Pharmacokinetics,pharmacodynamics and clinical efficacy of nivolumab in the treatment of metastatic renal cell carcinoma.Expert Opin Drug Metab Toxicol.2016 Sep;12(9):1089-96.

[0228] 20.Jefferis R,Lefranc MP.Human immunoglobulin allotypes:possible implications for immunogenicity.MAbs.2009 Jul-Aug;1(4):332-8.

[0229] 21.Ternant D,Arnoult C,Pugnière M,Dhommée C,Drocourt D,Perouzel E,Passot C,Baroukh N,Mulleman D,Tiraby G,Watier H,Paintaud G,Gouilleux-Gruart V.IgG1Allotypes Influence the Pharmacokinetics of Therapeutic Monoclonal Antibodies through FcRn Binding.J Immunol.2016 Jan 15;196(2):607-13.

[0230] 22.Webster CI,Bryson CJ,Cloake EA,Jones TD,Austin MJ,Karle AC,Spindeldreher S,Lowe DC,Baker MP A comparison of the ability of the human IgG1 allotypes G1m3 and G1m1,17 to stimulate T-cell responses from allotype matched and mismatched donors.MAbs.2016;8(2):253-63.

[0231] 23.Dempke WCM,Fenchel K,Uciechowski P,Dale SP.Second-and third-generation drugs for immuno-oncology treatment-The more the better?Eur J Cancer.2017 Mar;74:55-72.

序列表

<110> 盖立复诊断解决方案公司

<120> 用于监测对免疫检查点抑制剂PD-1和PD-L1的抗体治疗的免疫测定和工程化蛋白

<130> 62593080

<150> US 62/593080

<151> 2017-11-30

<160> 31

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 288

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

```

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

```

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro
 195 200 205
 Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly
 210 215 220
 Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro
 225 230 235 240
 Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
 245 250 255
 Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
 260 265 270
 Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
 275 280 285
 <210> 2
 <211> 290
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 2
 Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu
 1 5 10 15
 Asn Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val Val Glu Tyr
 20 25 30
 Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu Lys Gln Leu
 35 40 45
 Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp Lys Asn Ile
 50 55 60
 Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln His Ser Ser
 65 70 75 80
 Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser Leu Gly Asn
 85 90 95
 Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala Gly Val Tyr
 100 105 110
 Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg Ile Thr Val
 115 120 125
 Lys Val Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val
 130 135 140
 Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr
 145 150 155 160
 Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser
 165 170 175

Gly Lys Thr Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn
 180 185 190
 Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr
 195 200 205
 Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu
 210 215 220
 Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His
 225 230 235 240
 Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr
 245 250 255
 Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys
 260 265 270
 Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu
 275 280 285
 Glu Thr
 290
 <210> 3
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 合成的
 <400> 3
 Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Val Thr Asn Ser
 20
 <210> 4
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 合成的
 <400> 4
 Gly Gly Gly Ser
 1
 <210> 5
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 合成的
 <400> 5
 Gly Gly Gly Pro Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 214
 <212> PRT
 <213> 合成的
 <400> 6
 Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
 1 5 10 15
 Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp
 20 25 30
 Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp
 35 40 45
 Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
 50 55 60
 Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp
 65 70 75 80
 Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro
 85 90 95
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala
 100 105 110
 Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp
 115 120 125
 Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile
 130 135 140
 Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn
 145 150 155 160
 Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys
 165 170 175
 Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys
 180 185 190
 Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu
 195 200 205
 Ser His Ser Pro Gly Ile
 210
 <210> 7
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> 合成的
 <400> 7
 Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu

1	5	10	15
Val Ser Ser	Val Phe Ile Phe	Pro Pro Lys Pro Lys	Asp Val Leu Thr
	20	25	30
Ile Thr Leu	Thr Pro Lys Val	Thr Cys Val Val Val	Asp Ile Ser Lys
	35	40	45
Asp Asp Pro	Glu Val Gln Phe	Ser Trp Phe Val	Asp Asp Val Glu Val
	50	55	60
His Thr Ala	Gln Thr Gln Pro	Arg Glu Glu Gln	Phe Asn Ser Thr Phe
65	70	75	80
Arg Ser Val	Ser Glu Leu Pro	Ile Met His Gln	Asp Trp Leu Asn Gly
	85	90	95
Lys Glu Phe	Lys Cys Arg Val	Asn Ser Ala Ala	Phe Pro Ala Pro Ile
	100	105	110
Glu Lys Thr	Ile Ser Lys Thr	Lys Gly Arg Pro	Lys Ala Pro Gln Val
	115	120	125
Tyr Thr Ile	Pro Pro Pro Lys	Glu Gln Met Ala	Lys Asp Lys Val Ser
130	135	140	
Leu Thr Cys	Met Ile Thr Asp	Phe Phe Pro Glu	Asp Ile Thr Val Glu
145	150	155	160
Trp Gln Trp	Asn Gly Gln Pro	Ala Glu Asn Tyr	Lys Asn Thr Gln Pro
	165	170	175
Ile Met Asp	Thr Asp Gly Ser	Tyr Phe Val Tyr	Ser Lys Leu Asn Val
	180	185	190
Gln Lys Ser	Asn Trp Glu Ala	Gly Asn Thr Phe	Thr Cys Ser Val Leu
	195	200	205
His Glu Gly	Leu His Asn His	His Thr Glu Lys	Ser Leu Ser His Ser
210	215	220	
Pro Gly Ile			
225			
<210> 8			
<211> 232			
<212> PRT			
<213> 合成的			
<400> 8			
Pro Arg Gly	Pro Thr Ile Lys	Pro Cys Pro Pro	Cys Lys Cys Pro Ala
1	5	10	15
Pro Asn Leu	Leu Gly Gly Pro	Ser Val Phe Ile	Phe Pro Pro Lys Ile
	20	25	30
Lys Asp Val	Leu Met Ile Ser	Leu Ser Pro Ile	Val Thr Cys Val Val

	85	90	95
Ala Pro Lys	Ala Gln Ile Lys Glu Ser	Leu Arg Ala Glu	Leu Arg Val
	100	105	110
Thr Glu Arg	Arg Ala Glu		
	115		
<210>	13		
<211>	117		
<212>	PRT		
<213>	智人 (Homo sapiens)		
<400>	13		
Ala Phe Thr	Val Thr Val Pro Lys Asp	Leu Tyr Val Val	Glu Tyr Gly
1	5	10	15
Ser Asn Met	Thr Ile Glu Cys Lys Phe	Pro Val Glu Lys	Gln Leu Asp
	20	25	30
Leu Ala Ala	Leu Ile Val Tyr Trp	Glu Met Glu Asp	Lys Asn Ile Ile
	35	40	45
Gln Phe Val	His Gly Glu Glu Asp	Leu Lys Val Gln	His Ser Ser Tyr
	50	55	60
Arg Gln Arg	Ala Arg Leu Leu Lys Asp	Gln Leu Ser Leu	Gly Asn Ala
65	70	75	80
Ala Leu Gln	Ile Thr Asp Val Lys	Leu Gln Asp Ala	Gly Val Tyr Arg
	85	90	95
Cys Met Ile	Ser Tyr Gly Gly Ala Asp	Tyr Lys Arg Ile	Thr Val Lys
	100	105	110
Val Asn Ala	Pro Tyr		
	115		
<210>	14		
<211>	362		
<212>	PRT		
<213>	合成的		
<400>	14		
Met Tyr Arg	Met Gln Leu Leu Ser Cys	Ile Ala Leu Ser	Leu Ala Leu
1	5	10	15
Val Thr Asn	Ser Asn Pro Pro Thr	Phe Ser Pro Ala	Leu Leu Val Val
	20	25	30
Thr Glu Gly	Asp Asn Ala Thr Phe	Thr Cys Ser Phe	Ser Asn Thr Ser
	35	40	45
Glu Ser Phe	Val Leu Asn Trp Tyr	Arg Met Ser Pro	Ser Asn Gln Thr
	50	55	60

<211> 362
 <212> PRT
 <213> 合成的
 <400> 15
 Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Val Thr Asn Ser Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val
 20 25 30
 Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser
 35 40 45
 Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr
 50 55 60
 Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp
 65 70 75 80
 Ser Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met
 85 90 95
 Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly
 100 105 110
 Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala
 115 120 125
 Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Gly Gly Gly Pro Ser Gly
 130 135 140
 Gly Gly Pro Ser Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
 145 150 155 160
 Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys
 165 170 175
 Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp
 180 185 190
 Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu
 195 200 205
 Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met
 210 215 220
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser
 225 230 235 240
 Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly
 245 250 255
 Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln
 260 265 270
 Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe

275	280	285
Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu		
290	295	300
Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe		
305	310	315
Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn		
	325	330
Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr		
	340	345
Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Ile		350
	355	360
<210> 16		
<211> 365		
<212> PRT		
<213> 合成的		
<400> 16		
Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu		
1	5	10
Val Thr Asn Ser Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val		
	20	25
Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser		
	35	40
Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr		
	50	55
Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp		
65	70	75
Ser Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met		
	85	90
Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly		
	100	105
Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala		
	115	120
Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Arg Asp Cys Gly		
	130	135
Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile		
145	150	155
Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys		
	165	170
Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln		

				85					90					95			
Ser	Val	Val	Arg	Ala	Arg	Arg	Asn	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Leu	Cys	Gly		
				100					105					110			
Ala	Ile	Ser	Leu	Ala	Pro	Lys	Ala	Gln	Ile	Lys	Glu	Ser	Leu	Arg	Ala		
				115					120					125			
Glu	Leu	Arg	Val	Thr	Glu	Arg	Arg	Ala	Glu	Pro	Arg	Gly	Pro	Thr	Ile		
				130					135					140			
Lys	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Lys	Cys	Pro	Ala	Pro	Asn	Leu	Leu	Gly	Gly		
				145					150					155			160
Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Ile	Lys	Asp	Val	Leu	Met	Ile		
				165					170					175			
Ser	Leu	Ser	Pro	Ile	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	Glu	Asp		
				180					185					190			
Asp	Pro	Asp	Val	Gln	Ile	Ser	Trp	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His		
				195					200					205			
Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg		
				210					215					220			
Val	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys		
				225					230					235			240
Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	Lys	Asp	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu		
				245					250					255			
Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly	Ser	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr		
				260					265					270			
Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Lys	Gln	Val	Thr	Leu		
				275					280					285			
Thr	Cys	Met	Val	Thr	Asp	Phe	Met	Pro	Glu	Asp	Ile	Tyr	Val	Glu	Trp		
				290					295					300			
Thr	Asn	Asn	Gly	Lys	Thr	Glu	Leu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Glu	Pro	Val		
				305					310					315			320
Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Met	Tyr	Ser	Lys	Leu	Arg	Val	Glu		
				325					330					335			
Lys	Lys	Asn	Trp	Val	Glu	Arg	Asn	Ser	Tyr	Ser	Cys	Ser	Val	Val	His		
				340					345					350			
Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His	Thr	Thr	Lys	Ser	Phe	Ser	Arg	Thr	Pro		
				355					360					365			
Gly	Lys																
				370													
<210>	18																
<211>	171																

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

	85	90	95
Leu Gly Asn Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala			
	100	105	110
Gly Val Tyr Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg			
	115	120	125
Ile Thr Val Lys Val Asn Ala Pro Tyr Gly Gly Gly Pro Ser Gly Gly			
	130	135	140
Gly Pro Ser Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys			
145	150	155	160
Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val			
	165	170	175
Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe			
	180	185	190
Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu			
	195	200	205
Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His			
	210	215	220
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala			
225	230	235	240
Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg			
	245	250	255
Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met			
	260	265	270
Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro			
	275	280	285
Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn			
	290	295	300
Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val			
305	310	315	320
Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr			
	325	330	335
Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Glu			
	340	345	350
Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Ile			
	355	360	

<210> 23

<211> 364

<212> PRT

<213> 合成的

<400> 23

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Val Thr Asn Ser Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val
 20 25 30
 Val Glu Tyr Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu
 35 40 45
 Lys Gln Leu Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp
 50 55 60
 Lys Asn Ile Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln
 65 70 75 80
 His Ser Ser Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser
 85 90 95
 Leu Gly Asn Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala
 100 105 110
 Gly Val Tyr Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg
 115 120 125
 Ile Thr Val Lys Val Asn Ala Pro Tyr Val Pro Arg Asp Cys Gly Cys
 130 135 140
 Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser Val Phe Ile Phe
 145 150 155 160
 Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu Thr Pro Lys Val
 165 170 175
 Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro Glu Val Gln Phe
 180 185 190
 Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Pro
 195 200 205
 Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val Ser Glu Leu Pro
 210 215 220
 Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe Lys Cys Arg Val
 225 230 235 240
 Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr
 245 250 255
 Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile Pro Pro Pro Lys
 260 265 270
 Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys Met Ile Thr Asp
 275 280 285
 Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp Asn Gly Gln Pro
 290 295 300

Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp Thr Asp Gly Ser
 305 310 315 320
 Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser Asn Trp Glu Ala
 325 330 335
 Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly Leu His Asn His
 340 345 350
 His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Ile
 355 360

<210> 24
 <211> 369
 <212> PRT
 <213> 合成的
 <400> 24

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

Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val
 210 215 220
 Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu
 225 230 235 240
 Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg
 245 250 255
 Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val
 260 265 270
 Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr
 275 280 285
 Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr
 290 295 300
 Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu
 305 310 315 320
 Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys
 325 330 335
 Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu
 340 345 350
 Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly
 355 360 365

Lys

<210> 25

<211> 170

<212> PRT

<213> 合成的

<400> 25

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Val Thr Asn Ser Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val
 20 25 30
 Val Glu Tyr Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu
 35 40 45
 Lys Gln Leu Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp
 50 55 60
 Lys Asn Ile Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln
 65 70 75 80
 His Ser Ser Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser
 85 90 95
 Leu Gly Asn Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala

195	200	205
Arg His Asn Ile Met Asp Phe	Ala Met Pro Tyr Phe	Ile Gln Val Met
210	215	220
Lys Glu Tyr Leu Thr Lys Val	His His His His His His	
225	230	235
<210> 27		
<211> 184		
<212> PRT		
<213> 合成的		
<400> 27		
Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu		
1	5	10
Val Thr Asn Ser Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val		
	20	25
Val Glu Tyr Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu		
	35	40
Lys Gln Leu Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp		
	50	55
Lys Asn Ile Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln		
65	70	75
His Ser Ser Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser		
	85	90
Leu Gly Asn Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala		
	100	105
Gly Val Tyr Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg		
	115	120
Ile Thr Val Lys Val Asn Ala Pro Tyr Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr		
	130	135
Phe Thr Leu Gln Ile Arg Gly Arg Glu Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu		
145	150	155
Leu Asn Glu Ala Leu Glu Leu Lys Asp Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro		
	165	170
Gly His His His His His His His		
	180	
<210> 28		
<211> 217		
<212> PRT		
<213> 合成的		
<400> 28		

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

<210> 29

<211> 195

<212> PRT

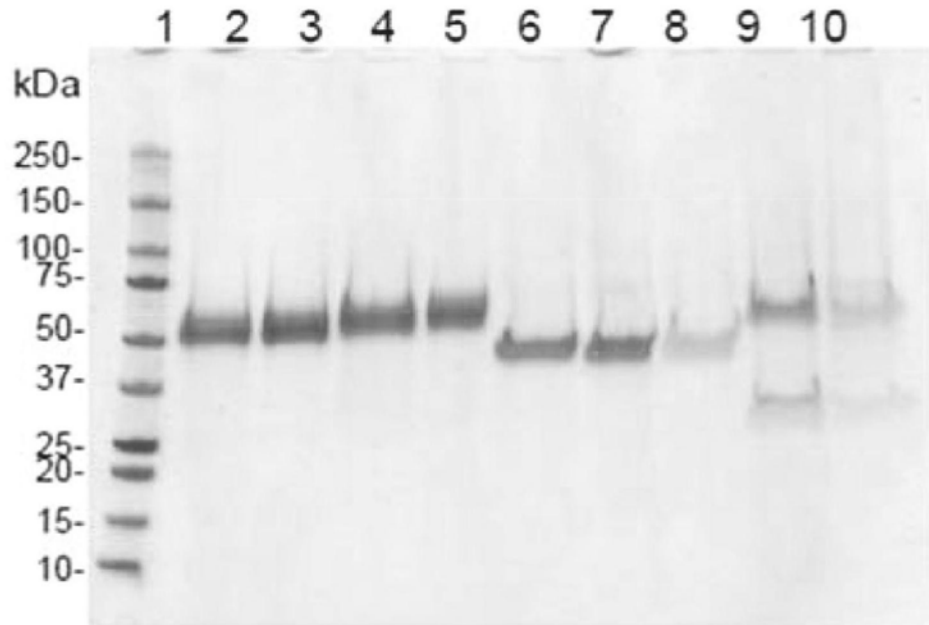
<213> 合成的

<400> 29

Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Val Thr Asn Ser Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val
 20 25 30
 Thr Glu Gly Asp Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser
 35 40 45

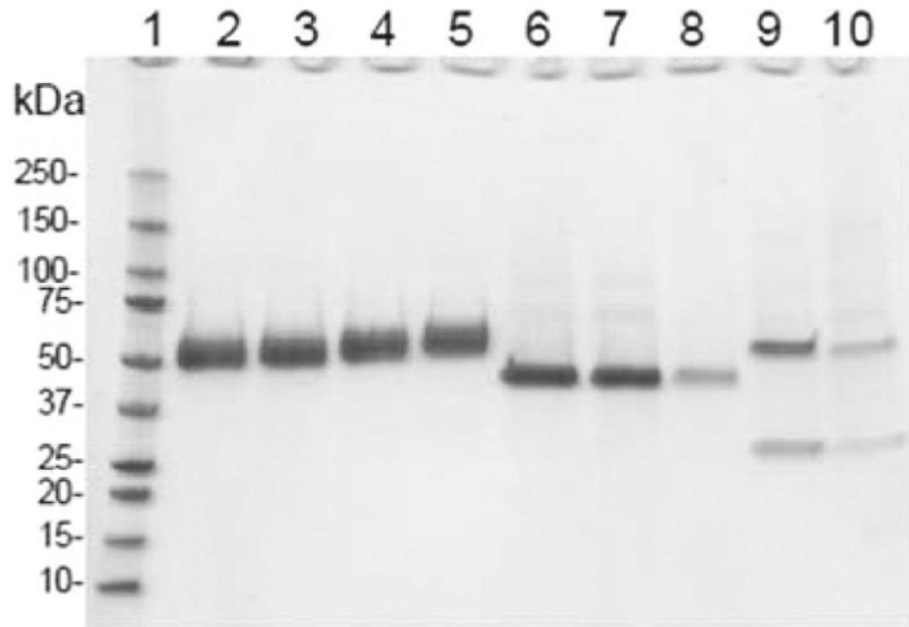
Glu Ser Phe Val Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr
 50 55 60
 Asp Lys Leu Ala Ala Phe Pro Glu Asp Arg Ser Gln Pro Gly Gln Asp
 65 70 75 80
 Ser Arg Phe Arg Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met
 85 90 95
 Ser Val Val Arg Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly
 100 105 110
 Ala Ile Ser Leu Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala
 115 120 125
 Glu Leu Arg Val Thr Glu Arg Arg Ala Glu Gly Gly Gly Pro Ser Gly
 130 135 140
 Gly Gly Pro Ser Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile
 145 150 155 160
 Arg Gly Arg Glu Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu
 165 170 175
 Glu Leu Lys Asp Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly His His His His
 180 185 190
 His His His
 195
 <210> 30
 <211> 194
 <212> PRT
 <213> 合成的
 <400> 30
 Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
 1 5 10 15
 Val Thr Asn Ser Ala Phe Thr Val Thr Val Pro Lys Asp Leu Tyr Val
 20 25 30
 Val Glu Tyr Gly Ser Asn Met Thr Ile Glu Cys Lys Phe Pro Val Glu
 35 40 45
 Lys Gln Leu Asp Leu Ala Ala Leu Ile Val Tyr Trp Glu Met Glu Asp
 50 55 60
 Lys Asn Ile Ile Gln Phe Val His Gly Glu Glu Asp Leu Lys Val Gln
 65 70 75 80
 His Ser Ser Tyr Arg Gln Arg Ala Arg Leu Leu Lys Asp Gln Leu Ser
 85 90 95
 Leu Gly Asn Ala Ala Leu Gln Ile Thr Asp Val Lys Leu Gln Asp Ala
 100 105 110

Gly Val Tyr Arg Cys Met Ile Ser Tyr Gly Gly Ala Asp Tyr Lys Arg
 115 120 125
 Ile Thr Val Lys Val Asn Ala Pro Tyr Gly Gly Gly Pro Ser Gly Gly
 130 135 140
 Gly Pro Ser Lys Pro Leu Asp Gly Glu Tyr Phe Thr Leu Gln Ile Arg
 145 150 155 160
 Gly Arg Glu Arg Phe Glu Met Phe Arg Glu Leu Asn Glu Ala Leu Glu
 165 170 175
 Leu Lys Asp Ala Gln Ala Gly Lys Glu Pro Gly His His His His His
 180 185 190
 His His
 <210> 31
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 合成的
 <400> 31
 His His His His His His His
 1 5



1. 分子量标准物, 10 μ L
2. 1. HuIL2SS-PD1(GGGGS)2-鼠IgG1 (仅CH2、CH3), 5 μ L
3. 2. HuIL2SS-PD1(GGGPS)2-鼠IgG1(仅CH2、CH3), 4.5 μ L
4. 3.>HuIL2SS-PD1-鼠IgG1 Fc, 6.3 μ L
5. 4.>HuIL2SS-PD1-鼠IgG2A Fc, 2.8 μ L
6. 5.>HuIL2SS-PDL1(GGGGS)2-鼠IgG1(仅CH2、CH3), 10 μ L
7. 6.>HuIL2SS-PDL1(GGGPS)2-鼠IgG1(仅CH2、CH3), 5 μ L
8. 7.>HuIL2SS-PDL1-鼠IgG1 Fc, 20 μ L
9. 8.>带有Synagis Fc HC/LC的HuIL2SS-纳武单抗, 20 μ L
10. 9.>带有Synagis Fc HC/LC的HuIL2SS-帕博利珠单抗, 20 μ L

图1



1. 分子量标准物, 10 μ L
2. 1. HuIL2SS-PD1(GGGGS)2-鼠IgG1 (仅CH2、CH3), 4 μ g
3. 2. HuIL2SS-PD1(GGGPS)2-鼠IgG1(仅CH2、CH3), 4 μ g
4. 3.>HuIL2SS-PD1-鼠IgG1 Fc, 4 μ g
5. 4.>HuIL2SS-PD1-鼠IgG2A Fc, 4 μ g
6. 5.>HuIL2SS-PDL1(GGGGS)2-鼠IgG1(仅CH2、CH3), 4 μ g
7. 6.>HuIL2SS-PDL1(GGGPS)2-鼠IgG1(仅CH2、CH3), 4 μ g
8. 7.>HuIL2SS-PDL1-鼠IgG1 Fc, 0.2 μ g
9. 8.>带有Synagis Fc HC/LC的HuIL2SS-纳武单抗, 1.6 μ g
10. 9.>带有Synagis Fc HC/LC的HuIL2SS-帕博利珠单抗, 0.4 μ g

图2

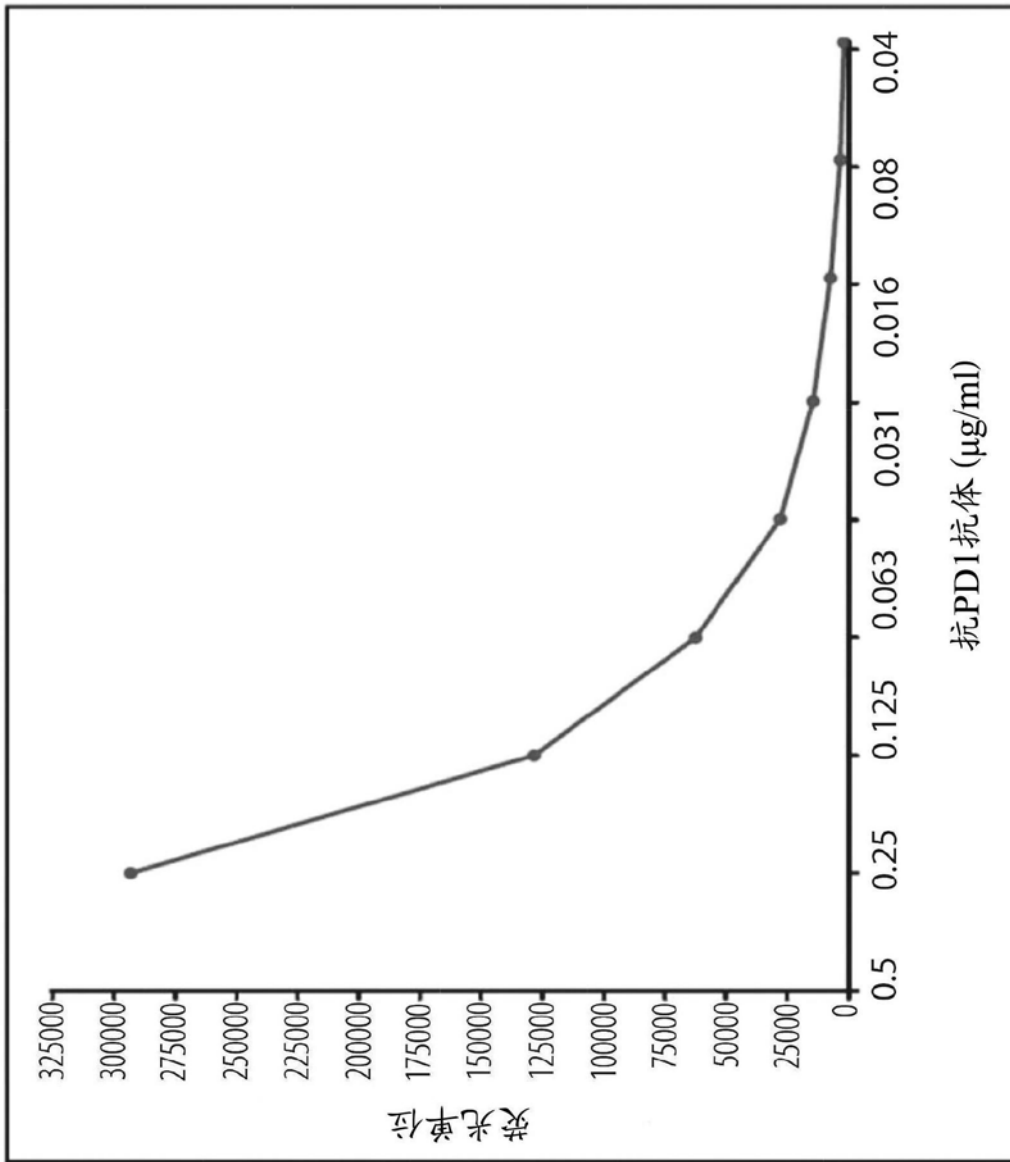


图3A

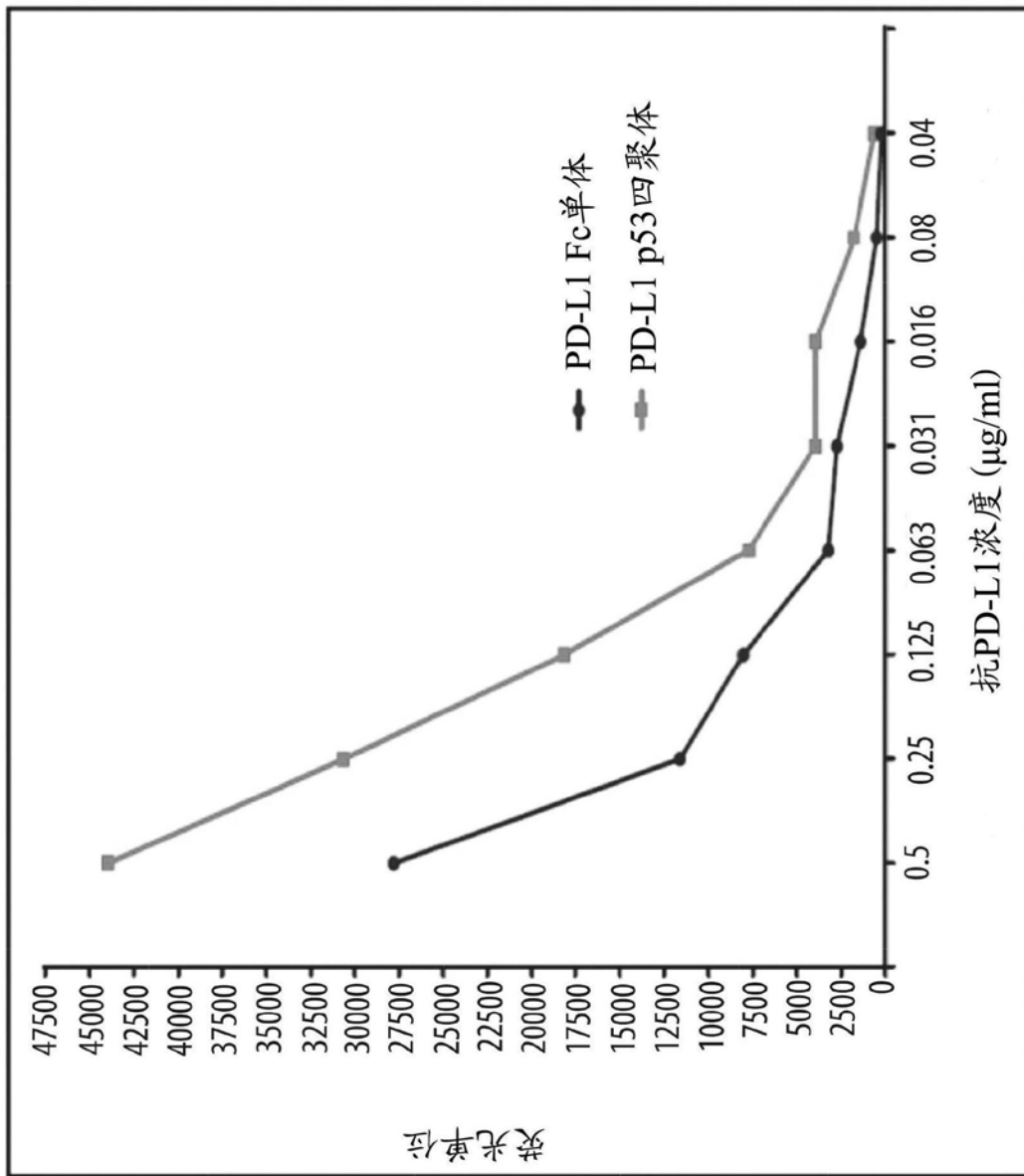


图3B

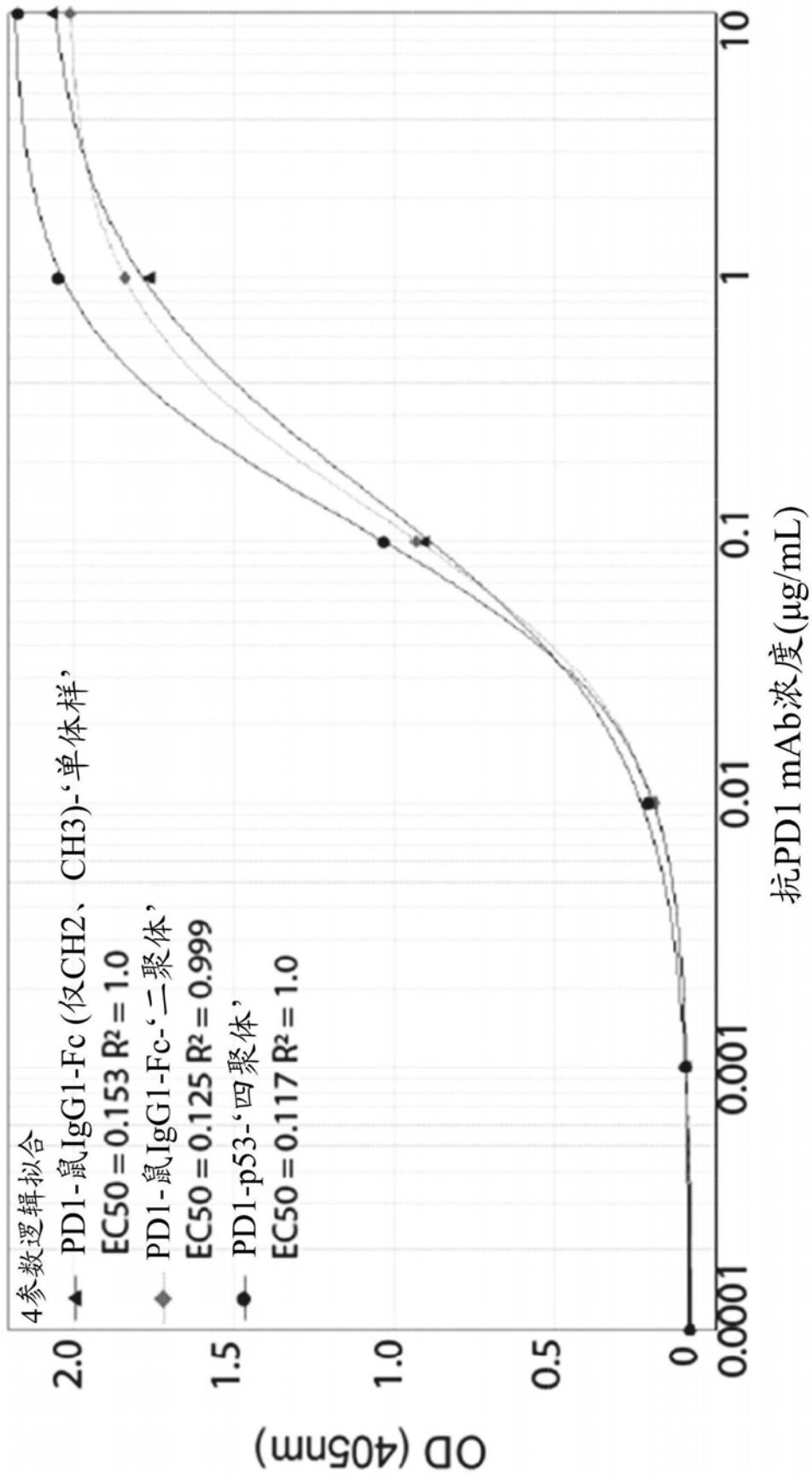


图4A

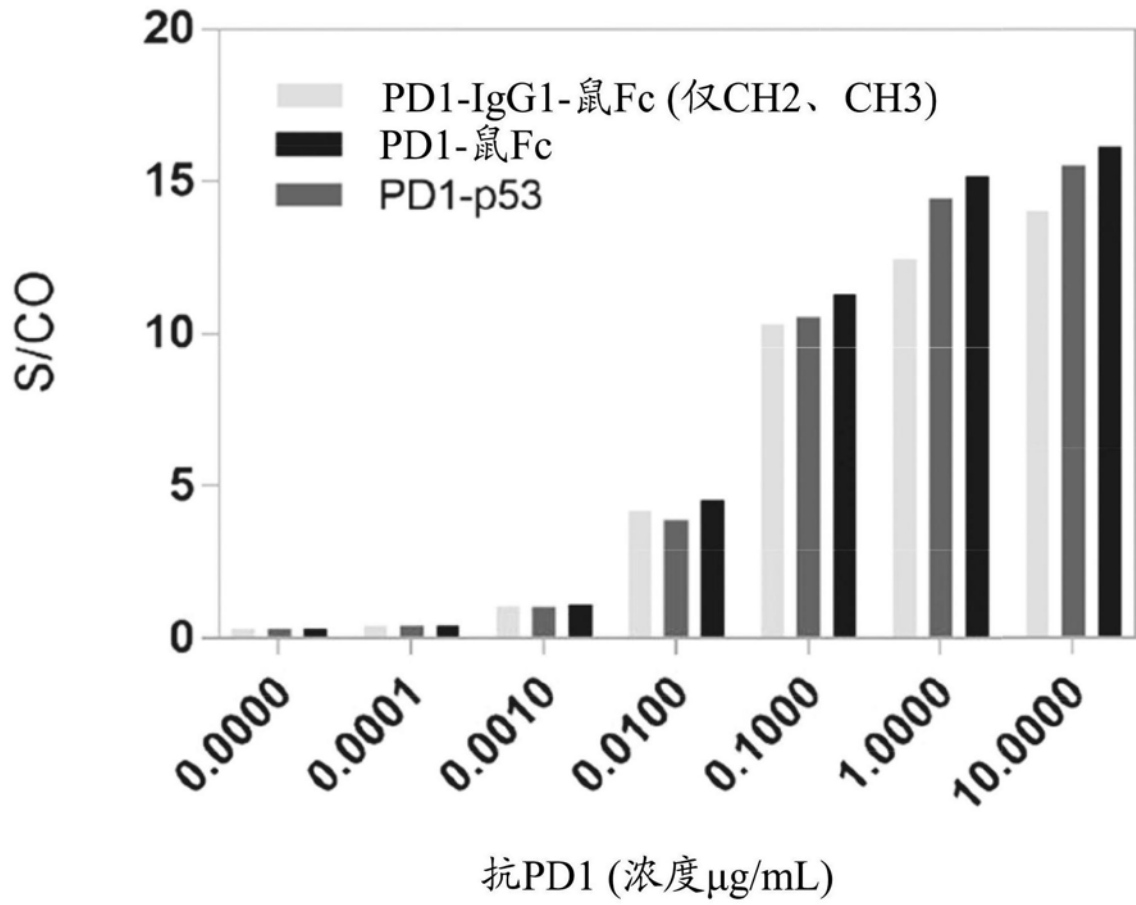


图4B

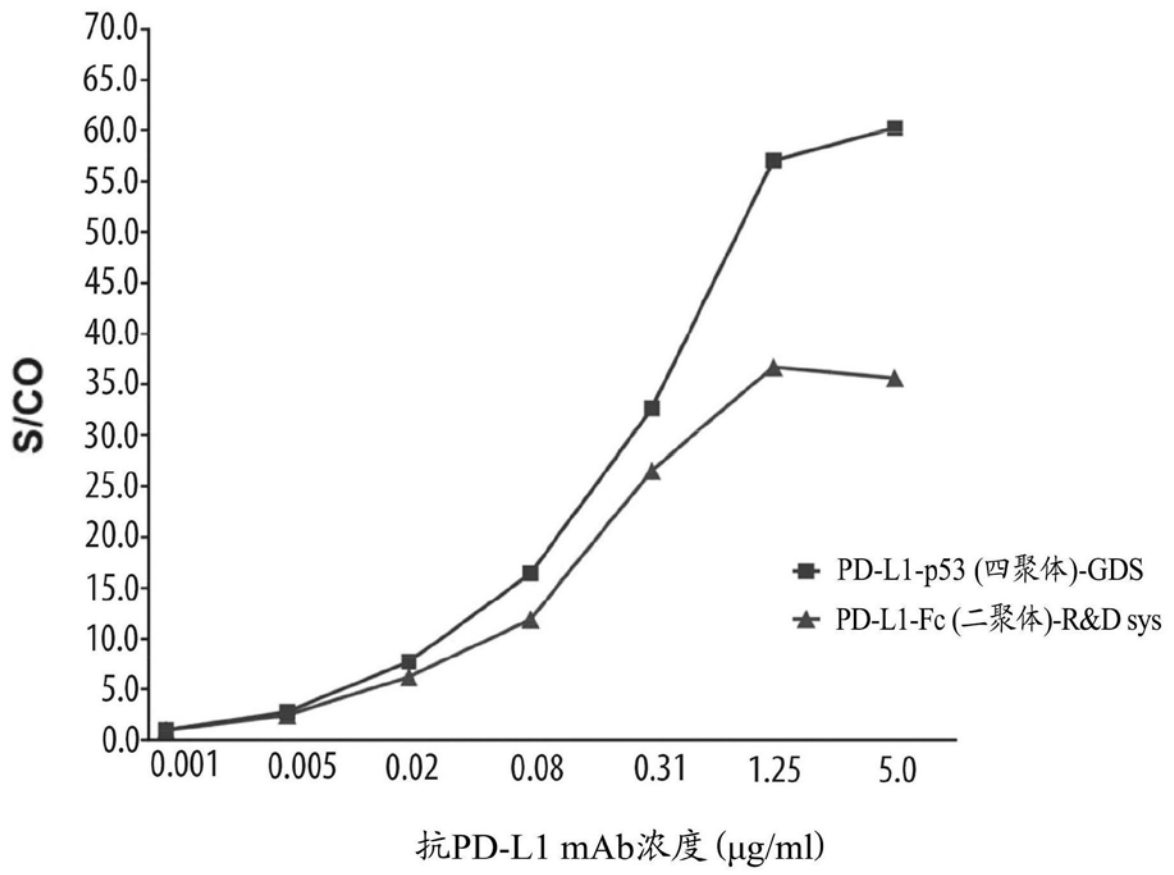


图5

专利名称(译)	用于监测对免疫检查点抑制剂PD1和PD-L1的抗体治疗的免疫测定和工程化蛋白		
公开(公告)号	CN110167959A	公开(公告)日	2019-08-23
申请号	CN201880003251.1	申请日	2018-11-29
[标]申请(专利权)人(译)	盖立复诊断解决方案公司		
申请(专利权)人(译)	盖立复诊断解决方案公司		
当前申请(专利权)人(译)	盖立复诊断解决方案公司		
[标]发明人	乔迪贝里		
发明人	乔迪·贝里 伊丽莎白·布思 乔伊·安东尼乔治 伊丽莎白·纳西门托 丹尼尔·纳戈雷卡斯		
IPC分类号	C07K14/705 G01N33/53		
CPC分类号	C07K14/70503 C07K14/70532 C07K14/70596 C07K2319/02 C07K2319/21 C07K2319/30 C07K2319/70 G01N33/6854		
代理人(译)	刘小立 郑霞		
优先权	62/593080 2017-11-30 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了融合蛋白，该融合蛋白包含PD1(程序性细胞死亡蛋白-1)蛋白的细胞外结构域和/或PD-L1(程序性细胞死亡-配体1蛋白(CD274或B7-H1))蛋白的细胞外结构域。细胞外结构域的部分以特定构型表达并被纯化为蛋白，并且用于监测针对这些蛋白的生物治疗性抗体的循环水平的免疫测定中。还描述了确定从患者获得的生物样品中的生物治疗性抗体的循环水平的量的方法，其中患者已经经历了至少一个剂量的免疫治疗剂。

