



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111108124 B

(45) 授权公告日 2024.09.03

(21) 申请号 201880050094.X

斯蒂芬·贝尔斯

(22) 申请日 2018.07.26

A·奥尔-沙姆哈尼 J·格雷
M·格兰尼

(65) 同一申请的已公布的文献号

(74) 专利代理机构 隆天知识产权代理有限公司
72003

申请公布号 CN 111108124 A

专利代理人 付文川 吴小瑛

(43) 申请公布日 2020.05.05

(51) Int.CI.

(30) 优先权数据

C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

1712032.0 2017.07.26 GB

(56) 对比文件

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

CN 107172880 A, 2017.09.15

2020.02.03

Sarah L. Buchan等.Antibodies to

(86) PCT国际申请的申请数据

Costimulatory Receptor 4-1BB Enhance
Anti-tumor Immunity via T Regulatory Cell
Depletion and Promotion of CD8 T Cell
Effector Function.《Immunity》.2018,第49卷
(第49期),958-970.

PCT/EP2018/070359 2018.07.26

审查员 曲肖男

(87) PCT国际申请的公布数据

权利要求书2页 说明书51页
序列表72页 附图32页

W02019/020774 EN 2019.01.31

(73) 专利权人 生物发明国际公司

地址 瑞典隆德

专利权人 癌症研究科技有限公司

(72) 发明人 B·弗伦德修斯 L·玛藤松

M·塞姆里奇 英格丽德·泰格

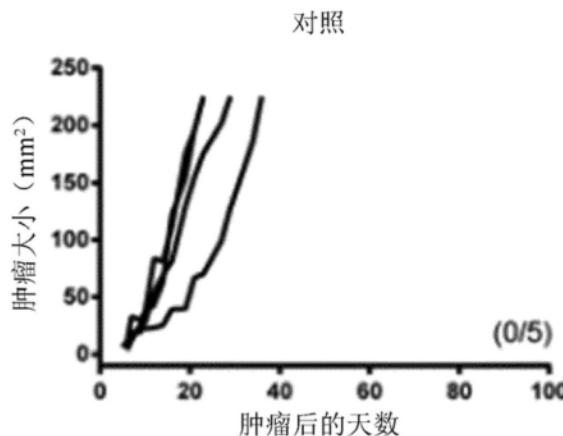
(54) 发明名称

新型抗体以及TREG消耗性抗体和免疫刺激性抗体的组合使用

(57) 摘要

描述了用于癌症治疗的首先Treg消耗性抗体分子(如Treg消耗性抗4-1BB抗体或Treg消耗性OX-40抗体)和然后免疫刺激性抗体分子(如免疫刺激性抗4-1BB抗体或免疫刺激性OX-40抗体)的依次施用,所述Treg消耗性抗体分子选自抗体分子,如特异性结合于属于肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)的靶标的抗体分子。还描述了可用于这种依次施用的新型抗4-1BB抗体和新型OX-40抗体。

CN 111108124 B



1. 一种Treg消耗性抗4-1BB抗体分子,其包含SEQ ID NO:153所示的VH-CDR1、SEQ ID NO:154所示的VH-CDR2、SEQ ID NO:155所示的VH-CDR3、SEQ ID NO:156所示的VL-CDR1、SEQ ID NO:157所示的VL-CDR2和SEQ ID NO:158所示的VL-CDR3。
2. 根据权利要求1所述的抗4-1BB抗体分子,其包含SEQ ID NO:159所示的可变重链和/或SEQ ID NO:160所示的可变轻链。
3. 根据权利要求1或2所述的抗4-1BB抗体分子,其选自由全长IgG抗体、Fab、Fv、scFv、Fab'和(Fab')₂组成的组。
4. 根据权利要求3所述的抗4-1BB抗体分子,其中所述全长IgG抗体选自由IgG1及其Fc经工程改造的变体组成的组。
5. 根据权利要求1或2的抗4-1BB抗体分子,其中所述抗4-1BB的抗体分子是人抗体或人源化抗体。
6. 根据权利要求1或2所述的抗4-1BB抗体分子,其为人IgG1抗体,其任选地可被工程化以改善与至少一种激活性Fc γ R的结合。
7. 一种分离的核酸,其编码权利要求1-6中任一项所述的抗4-1BB抗体分子。
8. 一种载体,其包含权利要求7所述的核酸。
9. 一种宿主细胞,其包含权利要求8所述的载体。
10. 一种药物组合物,其包含权利要求1-6中任一项所述的抗4-1BB抗体分子。
11. 根据权利要求10所述的药物组合物,其进一步包含免疫刺激性抗体分子。
12. 根据权利要求11所述的药物组合物,其中所述免疫刺激性抗体分子是CD8活性性和/或CD8增强性抗体分子,其包含特异性结合选自由以下组成的组的靶标的抗体:4-1BB、OX40、ICOS、GITR、CTLA-4、CD25、PD-1和PDL1。
13. 根据权利要求11所述的药物组合物,其中所述免疫刺激性抗体分子是人IgG2抗体或人IgG4抗体分子,所述人IgG2抗体或人IgG4抗体分子任选地被工程改造,从而使得与对激活性Fc γ 受体相比,所述人IgG2抗体或人IgG4抗体分子对人Fc γ RIIB具有增强的结合。
14. 根据权利要求13所述的药物组合物,其中所述免疫刺激性抗体分子是人IgG2b抗体分子,所述人IgG2b抗体分子任选地被工程改造,从而使得与对激活性Fc γ 受体相比,所述人IgG2b抗体分子对人Fc γ RIIB具有增强的结合。
15. 根据权利要求11所述的药物组合物,其中所述免疫刺激性抗体分子是抗PD-1或抗PDL1抗体分子。
16. 根据权利要求11所述的药物组合物,其中所述免疫刺激性抗体分子是抗4-1BB抗体分子。
17. 根据权利要求16所述的药物组合物,其中所述免疫刺激性抗体分子选自由以下抗体分子组成的组:包含分别如SEQ. ID. NO:1-6所示的VH-CDR1-3和VL-CDR1-3的抗体分子;包含分别如SEQ. ID. NO:9-14所示的VH-CDR1-3和VL-CDR1-3的抗体分子;包含分别如SEQ. ID. NO:17-22所示的VH-CDR1-3和VL-CDR1-3的抗体分子;包含分别如SEQ. ID. NO:25-30所示的VH-CDR1-3和VL-CDR1-3的抗体分子;包含分别如SEQ. ID. NO:33-38所示的VH-CDR1-3和VL-CDR1-3的抗体分子;包含分别如SEQ. ID. NO:41-46所示的VH-CDR1-3和VL-CDR1-3的抗体分子;包含分别如SEQ. ID. NO:49-54所示的VH-CDR1-3和VL-CDR1-3的抗体分子;包含分别如SEQ. ID. NO:57-62所示的VH-CDR1-3和VL-CDR1-3的抗体分子;包含分别如SEQ. ID. NO:65-

70所示的VH-CDR1-3和VL-CDR1-3的抗体分子;以及包含分别如SEQ.ID.NO:163-168所示的VH-CDR1-3和VL-CDR1-3的抗体分子。

18.根据权利要求17所述的药物组合物,其中免疫刺激性抗体分子选自由包含以下可变重链和可变轻链的抗体分子组成的组:SEQ.ID.NO:7和8;SEQ.ID.NO:15和16;SEQ.ID.NO:23和24;SEQ.ID.NO:31和32;SEQ.ID.NO:39和40;以及SEQ.ID.NO:47和48;SEQ.ID.NO:55和56;SEQ.ID.NO:63和64;SEQ.ID.NO:71和72;以及SEQ.ID.NO:169和170。

19.根据权利要求11所述的药物组合物,其中所述免疫刺激性抗体分子是人抗PD1单克隆抗体分子、人抗PDL1单克隆抗体分子或人抗CTLA-4单克隆抗体分子。

20.根据权利要求19所述的药物组合物,其中所述免疫刺激性抗体分子是选自由纳武单抗和派姆单抗组成的人抗PD1单克隆抗体分子、或抗PDL1抗体阿特珠单抗、或选自由伊匹单抗和曲美木单抗组成的人抗CTLA-4抗体。

21.根据权利要求1-6任一项的抗4-1BB抗体分子或根据权利要求10-20任一项的药物组合物在制备用于治疗肉瘤、淋巴瘤、鳞状细胞癌、胸腺瘤、神经母细胞瘤、卵巢癌、黑色素瘤或结肠癌的药物中的用途。

22.根据权利要求21所述的用途,其中所述Treg消耗性抗4-1BB抗体分子与免疫刺激性抗体分子一起依次施用,其中在施用所述免疫刺激性抗体分子之前施用所述Treg消耗性抗4-1BB抗体分子。

新型抗体以及TREG消耗性抗体和免疫刺激性抗体的组合使用

技术领域

[0001] 本发明涉及用于癌症治疗的首先Treg消耗性抗体分子和然后免疫刺激性抗体分子的依次施用。本发明还涉及用于此类治疗的新型抗体，包含新型抗4-1BB抗体和新型抗OX40抗体。

背景技术

[0002] 免疫调节性mAb的有前景的临床结果使人们重新相信免疫系统是控制癌症的关键。最近，人们对将这些mAb分类为检查点阻断剂(拮抗剂)或共刺激性分子激活剂(激动剂)产生了质疑，发现这两种类型的实例都可以通过活性Fc γ R的参与和抑制性调节性T细胞(Treg)的消耗来对抗肿瘤。与这些发现相反，抗CD40 mAb依赖于抑制性Fc γ R的交联来产生激动性免疫刺激。因此，尽管免疫调节性mAb为癌症免疫治疗提供了可观的前景，但各种mAb所采用的效应子机制及因而其最佳应用仍有待确定。

[0003] 当在难治性恶性肿瘤中进行试验时，如伊匹单抗(ipilimumab)(抗CTLA4)、抗PD-1/PD-L1和抗CD40等免疫调节性mAb已显示出阳性结果，尽管在少数患者中(1-4)。这些有前景的结果有助于重振人们的观念，即免疫系统可以是控制癌症的关键。生成这些mAb的目的是靶向T细胞或APC上的关键分子调节剂，并通过阻断抑制信号(检查点阻断剂)或传递共刺激信号(激动剂)来增强抗癌免疫力。最近，当发现所有均靶向T细胞的抗CTLA4、抗GITR和抗OX40的治疗活性涉及抑制性CD4+T调节性细胞的缺失时，这种二元分类就引起了质疑，所述缺失取决于活性Fc γ R的共同参与(5-7)。相反，靶向激动剂APC的抗CD40 mAb的活性需要抑制性Fc γ R的共同参与，以促进有效的mAb交联，这对于CD40信号传导和免疫刺激是必不可少的(8-10)。因此，尽管免疫调节性mAb为癌症免疫治疗提供了可观的前景，但所采用的机制以不明确的方式取决于mAb的Fab和Fc区，并且可能取决于所靶向的细胞类型。了解Treg消耗与直接免疫刺激的相对重要性对于免疫调节性mAb的开发和向患者的成功转化至关重要。

发明内容

[0004] 本发明基于证明抗4-1BB mAb可以在实体瘤中采用直接免疫刺激或Treg消耗的研究，其主要机制取决于抗体同种型和Fc γ R可用性。重要的是，消耗和免疫刺激似乎是竞争的机制，可能受到Fc γ R参与的限制。导致本发明的研究进一步表明，依次施用同种型不同的抗4-1BB mAb或同种型最佳的抗4-1BB mAb，然后施用抗PD-1mAb以最初删除Treg并然后刺激CD8 T细胞会导致应答增强，从而增强治疗效果并改善预后。此外，发明人设计了带有人IgG2铰链区‘B’的消耗性抗4-1BB mIgG2a(mIgG2a/h2B)以提供不依赖Fc γ R的激动作用，并证明所述单个mAb能够利用两种机制来增强治疗效果。

[0005] 然后，这一范围通过以下证明得到了扩大：除抗4-1BB mAb以外还可以用另外的抗体(被称为Treg消耗性抗体分子，如特异性结合于属于肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)的靶标的抗体分子，例如Treg消耗性抗4-1BB抗体或Treg消耗性抗OX40抗体)与免疫刺激性

抗体分子(如免疫刺激性抗4-1BB抗体、免疫刺激性抗OX40抗体或免疫激活性PD-1阻断抗体)的结合来实现Treg消耗和随后的免疫刺激,其中施用顺序对于实现期望效果是重要的。所述研究还导致了新型抗4-1BB抗体和新型抗OX40抗体的开发。

[0006] 因此,本发明涉及一种用于癌症治疗的Treg消耗性抗体分子,其中所述Treg消耗性抗体分子与免疫刺激性抗体分子一起依次施用,其中在施用所述免疫刺激性抗体分子之前施用所述Treg消耗性抗体分子。

[0007] 本发明进一步涉及一种治疗受试者癌症的方法,所述治疗包括施用Treg消耗性抗体分子,然后依次施用免疫刺激性抗体分子。

[0008] 本发明进一步涉及一种抗4-1BB抗体分子,其选自由包含选自以下的CDR中的一个或多个的抗体分子组成的组:SEQ.ID.NO:1-6、9-14、17-22、25-30、33-38、41-46、49-54、57-62、65-70、153-158和163-168。在本文中,“一个或多个”是指抗体分子包含所示序列中的1个、2个、3个、4个、5个或6个序列,即所示序列中1-6个序列。因此,所述抗4-1BB抗体分子可以包含选自SEQ.ID.NO:1-6的CDR中的1-6个;选自SEQ.ID.NO:9-14的CDR中的1-6个;选自SEQ.ID.NO:17-22的CDR中的1-6个;选自SEQ.ID.NO:25-30的CDR中的1-6个;选自SEQ.ID.NO:33-38的CDR中的1-6个;选自SEQ.ID.NO:41-46的CDR中的1-6个;选自SEQ.ID.NO:49-54的CDR中的1-6个;选自SEQ.ID.NO:57-62的CDR中的1-6个;选自SEQ.ID.NO:65-70的CDR中的1-6个;选自SEQ.ID.NO:153-158的CDR中的1-6个;或选自SEQ.ID.NO:163-168的CDR中的1-6个。

[0009] 本发明进一步涉及对上述抗4-1BB抗体分子进行编码的核苷酸。

[0010] 本发明进一步涉及一种抗OX40抗体分子,其选自由包含选自以下的CDR中的一个或多个的抗体分子组成的组:SEQ.ID.NO:73-78、81-86、89-94、97-102、105-110;SEQ.ID.NO:113-118;SEQ.ID.NO:121-126;SEQ.ID.NO:129-134;SEQ.ID.NO:137-142;SEQ.ID.NO:145-150;以及SEQ.ID.NO:171-176。再次地,在本文中,“一个或多个”是指抗体分子包含所示序列中的1个、2个、3个、4个、5个或6个序列,即所示序列中1-6个序列。因此,所述抗OX40抗体分子可以包含选自SEQ.ID.NO:73-78的CDR中的1-6个;选自SEQ.ID.NO:81-86的CDR中的1-6个;选自SEQ.ID.NO:89-94的CDR中的1-6个;选自SEQ.ID.NO:97-102的CDR中的1-6个;选自SEQ.ID.NO:105-110的CDR中的1-6个;选自SEQ.ID.NO:113-118的CDR中的1-6个;选自SEQ.ID.NO:121-126的CDR中的1-6个;选自SEQ.ID.NO:129-134的CDR中的1-6个;选自SEQ.ID.NO:137-142的CDR中的1-6个;选自SEQ.ID.NO:145-150的CDR中的1-6个;或选自SEQ.ID.NO:171-176的CDR中的1-6个。

[0011] 本发明进一步涉及包含上述核苷酸的载体。

[0012] 本发明进一步涉及包含上述核苷酸和/或上述载体的宿主细胞。

具体实施方式

[0013] 调节性T细胞、Treg细胞,Treg或 T_{reg} (以前被称为抑制性T细胞,有时也被称为抑制性调节性T细胞)是能够抑制正常和病理性免疫环境中的其它免疫细胞的T细胞亚群。

[0014] 通过Treg的消耗或Treg消耗,我们在本文中指的是通过细胞的物理清除来消耗、缺失或消除Treg。具体地,我们指的是肿瘤内Treg的消耗。

[0015] 效应T细胞是响应于刺激以抗原:MHC:TCR限制的方式激活、攻击或破坏抗原表达

性细胞的T细胞或T淋巴细胞。效应T细胞可以控制癌症并通过激活其它免疫细胞直接(细胞毒性T细胞)或间接(T辅助细胞)根除肿瘤细胞。

[0016] 抗体是免疫学和分子生物学领域的技术人员熟知的。通常,抗体包含两条重(H)链和两条轻(L)链。在本文中,我们有时将此全尺寸抗体分子称为全尺寸(full-size)或全长(full-length)抗体。抗体的重链包含一个可变结构域(VH)和三个恒定结构域(CH1、CH2和CH3),而抗体的分子轻链包含一个可变结构域(VL)和一个恒定结构域(CL)。可变结构域(有时统称为F_v区)与抗体的靶标或抗原结合。每个可变结构域包含三个环,所述环被称为互补决定区(CDR),其负责靶标结合。恒定结构域并不直接参与抗体与抗原的结合,而是表现出各种效应子功能。根据抗体或免疫球蛋白的重链恒定区的氨基酸序列,可以将所述抗体或免疫球蛋白分为不同类别。免疫球蛋白主要分为五类:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且在人类中,这些类别中几类被进一步划分为亚类(同种型),例如,IgG1、IgG2、IgG3和IgG4;IgA1和IgA2。抗体的另一部分为Fc结构域(也称为片段可结晶结构域),其包含每个抗体重链的恒定结构域中的两个恒定结构域。Fc结构域负责抗体与Fc受体之间的相互作用。

[0017] Fc受体是膜蛋白,其通常发现于免疫系统细胞的细胞表面上(即Fc受体发现于靶细胞膜—也被称为质膜或细胞质膜上)。Fc受体的作用是通过Fc结构域结合抗体,并将抗体内化到细胞中。在免疫系统中,这可能导致抗体介导的吞噬作用和抗体依赖性细胞介导的细胞毒性。

[0018] 如本文所使用的,术语抗体分子涵盖全长或全尺寸抗体以及全长抗体的功能性片段和此类抗体分子的衍生物。

[0019] 全尺寸抗体的功能性片段具有与相应的全尺寸抗体相同的抗原结合特性,并且包含与相应的全尺寸抗体相同的可变结构域(即VH和VL序列)和/或相同的CDR序列。功能性片段具有与相应的全尺寸抗体相同的抗原结合特性意味着所述功能性片段与全尺寸抗体结合于在靶标上的相同表位。这种功能性片段可以对应于全尺寸抗体的Fv部分。可替代地,这种片段可以是Fab,也被称为单价抗原结合片段F(ab)或二价抗原结合片段F(ab')₂,所述单价抗原结合片段不含Fc部分而所述二价抗原结合片段含有通过二硫键或F(ab')(即F(ab')₂的单价变体)连接在一起的两个抗原结合Fab部分。这种片段也可以是单链可变片段(scFv)。

[0020] 功能性片段并不总是含有相应的全尺寸抗体的所有六个CDR。应当理解的是,含有三个或更少CDR区(在一些情况下,甚至是单个CDR或其一部分)的分子能够保留衍生一个或多个CDR的抗体的抗原结合活性。例如,在Gao等人,1994,《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》,269:32389-93中,描述了完整的VL链(包含所有三个CDR)对其底物具有高亲和力。

[0021] 含有两个CDR区的分子描述于以下文献中:例如,Vaughan&Sollazzo 2001,《组合化学与高通量筛选(Combinatorial Chemistry&High Throughput Screening)》,4:417-430。在第418页(右栏—3我们的设计策略)中,描述了仅包含散布在框架区内的H1和H2 CDR高变区的微抗体。所述微抗体被描述为能够结合于靶标。Vaughan&Sollazzo引用了以下文献:Pessi等人,1993,《自然(Nature)》,362:367-9和Bianchi等人,1994,《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》,236:649-59,所述文献更详细地描述了H1和H2微抗体及其特性。在Qiu等人,2007,《自然生物技术(Nature Biotechnology)》,25:921-9中,证明了由两个连接的CDR组成的分子能够结合抗原。Quiocho 1993,《自然》,362:293-4提供了“微抗体”技术的总结。

Ladner 2007,《自然生物技术》,25:875-7指出,含有两个CDR的分子能够保留抗原结合活性。

[0022] 含有单个CDR区的抗体分子描述于以下文献中:例如,Laune等人,1997,《生物化学杂志(JBC)》,272:30937-44,其中证明了衍生自CDR的一系列六肽显示出抗原结合活性,并且注意到完整的单个CDR的合成肽显示出强结合活性。在Monnet等人,1999,《生物化学杂志》,274:3789-96中,表明了一定范围的12聚体肽和相关的框架区具有抗原结合活性,并且指出单独的CDR 3样肽能够结合抗原。在Heap等人,2005,《普通病毒学杂志(J.Gen.Viro.)》,86:1791-1800中,报道了“微抗体”(含有单个CDR的分子)能够结合抗原,并且表明来自抗HIV抗体的环状肽具有抗原结合活性和功能。在Nicaise等人,2004,《蛋白质科学(Protein Science)》,13:1882-91中,表明了单个CDR可以赋予抗原结合活性和对其溶菌酶抗原的亲和力。

[0023] 因此,具有五个、四个、三个或更少的CDR的抗体分子能够保留衍生所述CDR的全长抗体的抗原结合特性。

[0024] 抗体分子也可以是全长抗体的衍生物或这种抗体的片段。衍生物具有与相应的全尺寸抗体相同的抗原结合特性,因为所述衍生物与全尺寸抗体结合于在靶标上的相同表位。

[0025] 因此,通过本文所使用的术语“抗体分子”,我们包含了所有类型的抗体分子及其功能性片段及其衍生物,包含:单克隆抗体、多克隆抗体、合成抗体、重组产生的抗体、多特异性抗体、双特异性抗体、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单链抗体、单链Fv(scFv)、Fab片段、F(ab')₂片段、F(ab')片段、二硫键连接的Fvs(sdFv)、抗体重链、抗体轻链、抗体重链的同二聚体、抗体轻链的同二聚体、抗体重链的异二聚体、抗体轻链的异二聚体、此类同二聚体和异二聚体的抗原结合功能性片段。

[0026] 此外,如本文所使用的,术语“抗体分子”包含所有类型的抗体分子和功能性片段,包含:IgG、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgD和IgE。

[0027] 在一些实施方案中,抗体是人IgG1。技术人员了解,小鼠IgG2a和人IgG1与激活性Fc γ 受体有效地结合并且能够通过用例如ADCP和ADCC激活带有免疫细胞(例如巨噬细胞和NK细胞)的激活性Fc γ 受体来激活靶细胞的缺失。因此,尽管小鼠IgG2a是针对小鼠中的缺失的优选同种型,但是人IgG1是针对人中的缺失的优选同种型。相反地,已知TNFR超家族激动剂受体(例如4-1BB、ox40、TNFRII、CD40)的最佳共刺激取决于抑制性Fc γ RII的抗体参与。在小鼠中,已知优先结合抑制性Fc γ 受体(Fc γ RIIB)且仅与激活性Fc γ 受体弱结合的IgG1同种型是针对TNFR超家族靶向性mAb的共刺激活性的最佳选择。尽管在人中没有描述小鼠IgG1同种型的直接等价物,但可以对抗体进行工程改造,从而使得与激活性人Fc γ 受体相比,所述抗体对抑制性人Fc γ 受体表现出类似的结合增强。在被工程改造为表达人激活性Fc γ 受体和人抑制性Fc γ 受体的转基因小鼠中,这种经过工程改造的TNFR超家族靶向性抗体在体内的共刺激活性也得到了改善(49)。

[0028] 如上所述,抗体分子的不同类型和形式包含在本发明中,并且是免疫学领域技术人员已知的。众所周知,用于治疗目的的抗体经常被修饰抗体分子特性的另外的组分修饰。

[0029] 因此,我们包含了:本发明的抗体分子或根据本发明使用的抗体分子(例如,单克隆抗体分子和/或多克隆抗体分子和/或双特异性抗体分子)包含可检测部分和/或细胞毒

性部分。

[0030] 通过“可检测部分”，我们包含了一种或多种来自以下组成的组的物质：酶；放射性原子；荧光部分；化学发光部分；生物发光部分。可检测部分允许抗体分子在体外和/或体内和/或离体可见。

[0031] 通过“细胞毒性部分”，我们包含了放射性部分和/或酶，其中所述酶是胱天蛋白酶和/或毒素，其中所述毒素是细菌毒素或毒液；其中所述细胞毒性部分能够诱导细胞裂解。

[0032] 我们进一步包含了：抗体分子可以是分离的形式和/或纯化的形式，和/或可以是聚乙二醇化的。

[0033] 如上所述，抗体的CDR与抗体靶标结合。本文所述的每个CDR的氨基酸分配符合根据以下的定义：Kabat EA等人1991，“免疫学上感兴趣的蛋白质的序列 (Sequences of Proteins of Immunological Interest)”第五版，NIH出版号：91-3242，第xv-xvii页。

[0034] 如技术人员将了解的，还存在用于将氨基酸分配给每个CDR的其它方法。例如，国际免疫遗传学信息系统 (IMGT(R)) (<http://www.imgt.org/>)，以及Lefranc和Lefranc“免疫球蛋白概况 (Immunoglobulin FactsBook)”由学术出版社 (Academic Press) 出版，2001年)。

[0035] 在另外的实施方案中，本发明的抗体分子或根据本发明使用的抗体分子是能够与本文提供的特异性抗体竞争的抗体分子，例如，用于结合于特异性靶标的包含在例如SEQ ID NO:1-152中列出的氨基酸序列中的任何序列的抗体分子。

[0036] “能够竞争”是指竞争性抗体能够至少部分抑制或以其他方式干扰本文定义的抗体分子与特异性靶标的结合。

[0037] 例如，这种竞争性抗体分子可能能够将本文所述的抗体分子的结合抑制至少约10% (例如至少约20%、或至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约100%) 和/或将本文所述的抗体预防或减少与特异性靶标结合的能力抑制至少约10% (例如至少约20%、或至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约100%)。

[0038] 可以通过本领域技术人员所熟知的方法来确定竞争性结合，如酶联免疫吸附测定 (ELISA)。

[0039] 可以使用ELISA测定来评估表位修饰性或封闭性抗体。适合用于鉴定竞争性抗体的另外的方法描述于以下文献中：《抗体：实验室手册 (Antibodies: A Laboratory Manual)》，Harlow&Lane，所述文献通过引用并入本文(例如，参见第567页到第569页、第574到第576页、第583页和第590到第612页，1988，CSHL，纽约，ISBN 0-87969-314-2)。

[0040] 众所周知，抗体特异性结合确定的靶分子或抗原。也就是说，抗体优先且选择性地结合其靶标而不是非靶标分子。

[0041] 根据本发明的抗体的靶标或根据本发明使用的抗体的靶标在细胞表面上表达，即所述靶标是细胞表面抗原，其将包含抗体的表位(在本文中也被称为细胞表面表位)。细胞表面抗原和表位是免疫学或细胞生物学领域的技术人员容易理解的术语。

[0042] 通过“细胞表面抗原”，我们包含了：细胞表面抗原暴露于细胞膜的细胞外侧，但可能仅短暂暴露于细胞膜的细胞外侧。通过“短暂暴露”，我们包含了：细胞表面抗原可以被内

化到细胞中,或从细胞膜的细胞外侧释放到细胞外空间。可以通过裂解从细胞膜的细胞外侧释放细胞表面抗原,所述裂解可以由蛋白酶介导。

[0043] 我们还包含了:细胞表面抗原可能与细胞膜相连,但可能仅与细胞膜短暂相连。通过“短暂相连”,我们包含了:细胞表面抗原可以从细胞膜的细胞外侧释放到细胞外空间。可以通过裂解从细胞膜的细胞外侧释放细胞表面抗原,所述裂解可以由蛋白酶介导。

[0044] 我们进一步包含了:细胞表面抗原可以是肽、或多肽、或碳水化合物、或寡糖链或脂质;和/或存在于蛋白质、糖蛋白或脂蛋白上的表位。

[0045] 评估蛋白质结合的方法是生物化学和免疫学领域的技术人员已知的。本领域技术人员将理解,那些方法可用于评估抗体与靶标的结合和/或抗体的Fc结构域与Fc受体的结合;以及相对强度或特异性,或这些相互作用的抑制、预防或减少。可以用来评估蛋白质结合的方法的实例为,例如,免疫测定、BIAcore、蛋白质印迹、放射免疫测定(RIA)和酶联免疫吸附测定(ELISA)(有关抗体特异性的讨论参见《基础免疫学》第二版,雷文出版社(Raven Press),纽约;第332-336页(1989))。

[0046] 因此,通过“特异性结合的抗体分子”或“靶标特异性抗体分子”,我们包含了:抗体分子特异性结合靶标但不结合于非靶标,或与靶标相比更弱地结合于非靶标(如具有低亲和力)。

[0047] 我们还包含了以下意义:与非靶标相比,抗体与靶标特异性结合的强度高至少两倍、或高至少五倍、或高至少10倍、或高至少20倍、或高至少50倍、或高至少100倍、或高至少200倍、或高至少500倍、或高至少约1000倍。

[0048] 另外,我们包含了以下意义:如果抗体以至少约 $10^{-1}K_d$ (或至少约 $10^{-2}K_d$ 、或至少约 $10^{-3}K_d$ 、或至少约 $10^{-4}K_d$ 、或至少约 $10^{-5}K_d$ 、或至少约 $10^{-6}K_d$ 、或至少约 $10^{-7}K_d$ 、或至少约 $10^{-8}K_d$ 、或至少约 $10^{-9}K_d$ 、或至少约 $10^{-10}K_d$ 、或至少约 $10^{-11}K_d$ 、或至少约 $10^{-12}K_d$ 、或至少约 $10^{-13}K_d$ 、或至少约 $10^{-14}K_d$ 、或至少约 $10^{-15}K_d$)的 K_d 值与靶标结合,则抗体与靶标特异性结合。

[0049] 如本文所使用的,术语“Treg消耗性抗体”是指在施用于受试者(如人)时特异性结合于在Treg表面上表达的靶标的抗体,其中这种结合导致Treg的消耗。因此,选自与肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)的靶标特异性结合的抗体的Treg消耗性抗体是在施用于受试者(如人)时结合于在Treg表面上表达的属于肿瘤坏死因子受体超家族的靶标的抗体,并且其中这种结合导致Treg的消耗。在一些实施方案中,属于肿瘤坏死因子受体超家族的靶标是优先在肿瘤上或在肿瘤微环境中表达的靶标。

[0050] 在一些实施方案中,除了Treg消耗作用外,Treg消耗性抗体不具有任何免疫刺激作用。在一些实施方案中,除了Treg消耗作用外,Treg消耗性抗体还具有免疫刺激作用;在此类实施方案中,Treg消耗性抗体具有足够差的免疫刺激活性,以允许在依次施用第二个免疫刺激性抗体之后增强治疗活性。

[0051] 为了确定抗体是否为本发明意义上的Treg消耗性抗体,可以使用体外抗体依赖性细胞毒性(ADCC)测定或抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)测定。

[0052] 可以通过用钙黄绿素AM标记靶细胞,然后添加稀释浓度的Ab来完成ADCC测定。然后将靶细胞与人PBMC一起以50:1的E:T比率在37°C下共培养4小时。将板以400 3g离心5分钟以沉淀细胞,然后将上清液转移到白色的96孔板中。使用Varioskan(赛默飞世尔科技(Thermo Scientific))使用485nm的激发波长和530nm的发射波长测量钙黄绿素的释放。如

下计算最大释放百分比:最大释放% = (样品/处理过的triton)*100。

[0053] 可以通过在室温下用5mM CFSE标记靶细胞持续10分钟,然后在完全培养基中进行洗涤来完成ADCP测定。然后用稀释浓度的Ab对CFSE标记的靶标进行调理,然后将所述靶标与BMDM一起以1:5的E:T比率在37°C下在96孔板中共培养1小时。然后在室温下用抗F4/80-藻蓝蛋白标记BMDM持续15分钟,并用PBS洗涤两次。将板置于冰上,刮取孔以收集BMDM,并使用FACSCalibur (BD) 通过流式细胞仪评估吞噬作用,以确定F4/80+细胞群中F4/80+CFSE+细胞的百分比。

[0054] 为了确定抗体是否具有免疫刺激作用,可以使用体外激动作用测定。对于这种测定,可以使用以下通用方法。在37°C下在5% CO₂中在补充有10% 胎牛血清、谷氨酰胺(2mM)、丙酮酸(1mM)、青霉素和链霉素(100IU/mL)的RPMI 1640培养基(GibcoTM)中进行细胞培养。用2mM羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)标记新鲜的PBMC。然后,如Römer等人(51)所述,在24孔板中以1x10⁷细胞/mL的浓度培养PBMC持续48小时,然后进行mAb刺激测定。对于PBMC刺激,用含有0.01μg/mL OKT3抗体(内部)的PBS将圆底96孔板湿涂持续4小时,然后弃去多余的抗体,并用PBS洗涤板。将每孔1X10⁵ PBMC转移到板上,并用5μg/mL的测试mAb进行刺激。在刺激后的第4天或第5天,用抗CD8-APC(BioLegend)和抗CD4-PE(内部)标记细胞,并通过在FACSCalibur(BD生物科学公司(BD Biosciences)上进行CFSE稀释来评估增殖。

[0055] 并且为了确定Treg缺失性抗体和免疫刺激性抗体的依次治疗是否导致治疗活性改善,可以使用带有肿瘤并表达激活性和抑制性Fc γ受体的免疫能力强的动物的体内测定。对于这种测定,可以使用以下实施例中所述的一种,例如,如图1a和4c所示。

[0056] 如本文所使用的,术语“免疫刺激性抗体(immunostimulatory antibody或immunostimulating antibody)”是指在施用于受试者(如人)时特异性结合于存在于效应T细胞表面上的靶标的抗体。免疫刺激性抗体与靶标的结合可以直接通过激动作用(例如,针对TNF超家族激动剂受体的抗体,如抗4-1BB、OX40抗体)或间接通过抑制信号的阻断(例如通过抑制抗体对PD1/PDL1轴的阻断)通过刺激效应T细胞来导致对免疫应答的刺激。这种效应T细胞可以是CD8⁺细胞;在此类实施方案中,免疫刺激性抗体是CD8激活性和/或CD8增强性抗体。另外或可替代地,这种效应T细胞可以是CD4⁺细胞;在此类实施方案中,免疫刺激性抗体是CD4激活性和/或CD4增强性抗体。

[0057] 我们在本文中表明,以Fc:Fc γ R依赖性或非依赖性方式起作用的针对不同靶标的具有免疫刺激或共抑制性质的抗体可用于免疫刺激。免疫刺激性抗体可以是以Fc:Fc γ R依赖性方式激动在效应T细胞上表达的免疫刺激性受体(如4-1BB)的抗体,也可以是以Fc:Fc γ R非依赖性方式拮抗在效应T细胞上表达的免疫检查点受体(如PD-1)的抗体。

[0058] 为了确定抗体是否为本发明意义上的免疫刺激性抗体,可以使用显示出响应于mAb的T细胞增殖的体外测定法。上述测定可用于此目的。

[0059] 为了确定抗体是否缺乏Treg消耗作用或是否具有差的Treg消耗作用,可以使用体外吞噬作用测定法或体内消耗研究。实施例中描述的测定可用于此目的。例如,测试小鼠组在第0天接受肿瘤。当可触知肿瘤时(或在肿瘤模型的适当阶段),向小鼠静脉注射mAb,然后每隔一天施用另外3次腹腔注射(最终剂量为200μg,或按照mAb确定)。然后在最后一次mAb施用后1或2天杀死小鼠,并通过流式细胞仪分析脾脏和肿瘤的TIL含量,以及肿瘤和脾脏(对照组织)中CD4+群体内的Foxp3+细胞的频率。

- [0060] 在一些实施方案中,Treg消耗性抗体是人抗体。
- [0061] 在一些实施方案中,Treg消耗性抗体是人源化抗体。
- [0062] 在一些实施方案中,免疫刺激性抗体是人抗体。
- [0063] 在一些实施方案中,免疫刺激性抗体是人源化抗体。
- [0064] 如上所述,由于可以通过修饰抗体的其它部分来调节消耗/免疫刺激作用,因此根据本发明以组合形式使用的Treg消耗性抗体和免疫刺激性抗体可以均包含相同的CDR。
- [0065] 例如,可以通过使用人IgG1抗体形式的抗体来获得Treg消耗性抗体;因此,在一些实施方案中,Treg消耗性抗体是人IgG1抗体。也可以通过使用表现出与一个或几个激活性Fc受体的结合改善和/或经工程改造以改善与一个或几个激活性Fc受体的结合的人IgG1抗体形式的抗体来获得Treg消耗性抗体;因此,在一些实施方案中,Treg消耗性抗体是Fc经工程改造的人IgG1抗体。也可以通过使用鼠IgG2a抗体或人源化的鼠IgG2a抗体来获得Treg消耗性抗体,并且相应地,在一些实施方案中,Treg消耗性抗体是人源化的鼠IgG2a抗体。
- [0066] 此外,可以通过使用人IgG2抗体(如人IgG2b抗体)形式的抗体或人IgG4抗体形式的抗体来获得免疫刺激性抗体。因此,在一些实施方案中,免疫刺激性抗体是人IgG2抗体。在一些实施方案中,免疫刺激性抗体是人IgG2b抗体。在一些实施方案中,免疫刺激性抗体是人IgG4抗体。也可以通过使用鼠IgG1抗体或人源化的鼠IgG1抗体来获得免疫刺激性抗体,并且在一些实施方案中,免疫刺激性抗体是人源化的鼠IgG1抗体。
- [0067] 在一些实施方案中,免疫刺激性抗体是与激活性Fc γ 受体相比,对抑制性Fc γ 受体表现出增强的结合的抗体。在一些实施方案中,免疫刺激性抗体是与激活性Fc γ 受体相比,对人Fc γ RIIB表现出增强的结合的抗体。
- [0068] 在一些实施方案中,对免疫刺激性抗体进行工程改造,从而使得与激活性Fc γ 受体相比,所述免疫刺激性抗体对抑制性Fc γ 受体具有增强的结合。在一些实施方案中,对免疫刺激性抗体进行工程改造,从而使得与激活性Fc γ 受体相比,所述免疫刺激性抗体对人Fc γ RIIB具有增强的结合。
- [0069] 本发明的Treg消耗性抗体或根据本发明使用的Treg消耗性抗体所结合的靶标可以选自由属于TNFRS的靶标组成的组。属于TNFRS的靶标可以选自由4-1BB、OX40和TNFR2组成的组。
- [0070] 可替代地,本发明的Treg消耗性抗体或根据本发明使用的Treg消耗性抗体所结合的靶标可以选自由ICOS、GITR、CTLA-4、CD25和神经纤毛蛋白-1组成的组。在一些实施方案中,靶标不是CD25。
- [0071] 本发明的免疫刺激性抗体或根据本发明使用的免疫刺激性抗体所结合的靶标可以选自由4-1BB和OX40组成的组。
- [0072] 可替代地,本发明的免疫刺激性抗体或根据本发明使用的Treg消耗性抗体所结合的靶标可以选自由ICOS、GITR、CTLA-4、TNFR2、CD25和PD-1组成的组。在一些实施方案中,靶标不是CD25。
- [0073] 在本发明的一些实施方案中,至少一个靶标是4-1BB,其也被表示为CD137和肿瘤坏死因子受体超家族成员9(TNFRSF9)。4-1BB在CD4+和CD8+T细胞激活后在Treg上表达,并且其连接是针对小鼠抗病毒和B细胞淋巴瘤的最佳保护性CD8 T细胞应答所必需的(11、12)。抗4-1BB特异性抗体在体外增强抗原刺激的T细胞的增殖和存活,与抗CD40相似,抗4-

1BB mAb在很大程度上依赖于CD8 T细胞的临床前癌症模型中促进抗肿瘤免疫力(12、13)。4-1BB是定义Treg谱系的转录因子Foxp3的下游靶标,其在静止的Treg细胞上表达并在Treg激活时上调(14、15),因此抗4-1BB可能可以通过Treg细胞的消耗发挥部分作用。抗4-1BB抗体是消耗性抗体还是刺激性抗体可能取决于其Fc γ R的用法,并且在导致本发明的工作中,发明人进行了体外和体内实验以探索肿瘤环境中治疗性抗4-1BB mAb的最佳同种型。

[0074] 我们发现,尽管与具有相同特异性的mIgG2a版本相比,mIgG1同种型mAb表现出优异的激动活性和对CD8+T细胞的直接免疫刺激作用,但在已建立的实体瘤环境中,mIgG2a mAb提供了最佳的治疗活性。我们发现,mIgG2a mAb的效力归因于肿瘤内Treg消耗。然而,当消耗被阻止时,在缺乏激活性Fc γ R的小鼠中,mIgG2a的治疗潜力得以保留。在这些条件下,通过结合抑制性Fc γ RIIB将mIgG2a转化为激动剂。除此之外,我们确定消耗和激动作用是竞争性机制,同时参与这两种机制会导致功效降低。可以通过依次施用Treg消耗性同种型和免疫刺激性同种型或通过对Fc进行工程改造以产生双重活性的抗4-1BB mAb(具有最佳的Fc γ R消耗能力以及Fc γ R非依赖性激动作用)来克服这种钝化。总之,这些结果表明,具有相同靶标特异性的免疫调节性mAb可以利用不同的机制来介导治疗,并且其最佳使用取决于肿瘤微环境中的同种型、局部Fc γ R组库、免疫抑制细胞和效应细胞的丰度和功能及其对靶标的相对和绝对表达。重要的是,我们的研究结果进一步表明,可以通过互补但相互竞争的作用机制暂时施用免疫调节性mAb来优化结果,并且进一步可以通过mAb工程化产生能够利用多种机制的单一药剂以提高治疗效果。这些结果对现有和正在开发的免疫调节性mAb的施用以及下一代免疫调节性抗体的设计具有影响。

[0075] 在一些实施方案中,Treg消耗性抗体分子是选自下表1所示的组的抗4-1BB抗体分子。

[0076] 在一些实施方案中,Treg消耗性抗体分子是选自由包含CDR中的1-6个的抗体分子组成的组的抗4-1BB抗体分子,所述CDR来自选自以下的每个组:SEQ ID No:1-6;SEQ ID.No:9-14;SEQ ID.No:17-22;SEQ ID.No:25-30;SEQ ID.No:33-38;SEQ ID.No:41-46;SEQ ID.No:49-54;SEQ ID.No:57-62;SEQ ID.No:65-70;SEQ ID.No:153-158和SEQ ID.No:163-168。

[0077] 在一些实施方案中,Treg消耗性抗体分子是选自由包含选自以下的6个CDR的抗体分子组成的组的抗4-1BB抗体分子:SEQ ID.No:1-6;SEQ ID.No:9-14;SEQ ID.No:17-22;SEQ ID.No:25-30;SEQ ID.No:33-38;SEQ ID.No:41-46;SEQ ID.No:49-54;SEQ ID.No:57-62;SEQ ID.No:65-70;SEQ ID.No:153-158和SEQ ID.No:163-168。

[0078] 在一些实施方案中,Treg消耗性抗体分子是选自由包含VH的抗体分子组成的组的抗4-1BB抗体分子,所述VH选自由以下组成的组:SEQ ID.No:7、15、23、31、39、47、55、63、71、159、161和169。

[0079] 在一些实施方案中,Treg消耗性抗体分子是选自由包含VL的抗体分子组成的组的抗4-1BB抗体分子,所述VL选自由以下组成的组:SEQ ID.No:8、16、24、32、40、48、56、64、72、160、162和170。

[0080] 在一些实施方案中,Treg消耗性抗体分子是选自由包含VH和VL的抗体分子组成的组的抗4-1BB抗体分子,所述VH和VL选自由以下组成的组:SEQ ID.No:7-8、15-16、23-24、31-32、39-40、47-48、55-56、63-64、71-72、159-160、161-162和169-170。

[0081] 在一些实施方案中,免疫刺激性抗体分子是选自下表1所示的组的抗4-1BB抗体分子。

[0082] 在一些实施方案中,免疫刺激性抗体分子是选自由包含CDR中的1-6个的抗体分子组成的组的抗4-1BB抗体分子,所述CDR来自以下每个组:SEQ ID.No:1-6;SEQ ID.No:9-14;SEQ ID.No:17-22;SEQ ID.No:25-30;SEQ ID.No:33-38;SEQ ID.No:41-46;SEQ ID.No:49-54;SEQ ID.No:57-62;SEQ ID.No:65-70;SEQ ID.No:153-158和SEQ ID.No:163-168。

[0083] 在一些实施方案中,免疫刺激性抗体分子是选自由包含选自以下的6个CDR的抗体分子组成的组的抗4-1BB抗体分子:SEQ ID.No:1-6;SEQ ID.No:9-14;SEQ ID.No:17-22;SEQ ID.No:25-30;SEQ ID.No:33-38;SEQ ID.No:41-46;SEQ ID.No:49-54;SEQ ID.No:57-62;SEQ ID.No:65-70、153-158和SEQ ID.No:163-168。

[0084] 在一些实施方案中,免疫刺激性抗体分子是选自由包含VH的抗体分子组成的组的抗4-1BB抗体分子,所述VH选自由以下组成的组:SEQ ID.No:7、15、23、31、39、47、55、63、71、159、161和169。

[0085] 在一些实施方案中,免疫刺激性抗体分子是选自由包含VL的抗体分子组成的组的抗4-1BB抗体分子,所述VL选自由以下组成的组:SEQ ID.No:8、16、24、32、40、48、56、64、72、160、162和170。

[0086] 在一些实施方案中,免疫刺激性抗体分子是选自由包含VH和VL的抗体分子组成的组的抗4-1BB抗体,所述VH和VL选自由以下组成的组:SEQ ID.No:7-8、15-16、23-24、31-32、39-40、47-48、55-56、63-64、71-72、159-160、161-162和169-170。

[0087] 表1:4-1BB抗体

抗体	序列	SEQ.ID.NO:
[0088]	VH-CDR1	FSSNEMSWVRQAPG
	VH-CDR2	SGSIGYADSVKGR
	VH-CDR3	ARDRMVRGVSNWFDP
	VL-CDR1	CTGSSSNIGAGYDVN
	VL-CDR2	GNFNRPS
	VL-CDR3	CQSYDSRLSGSV
	VH	EVQLLESGGGLVQPQGGSLRLSCAASGFTFSSNEM SWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDR MVRGVSNWFDPWGQQGTLTVSS
2-D01	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDV NWYQQLPGTAPKLLIYGNFNRPSGVPDRFGSKS GTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSRLSGSVFG GGTKLTVLG
	VH-CDR1	FTFGDYAVAWFRQAPG
	VH-CDR2	ITDYADPVKGR
	VH-CDR3	ARNYGGYYYYGMDV
	VL-CDR1	CTGSSSNIGAGYDVH
	VL-CDR2	GTAPKLLIYGTNNRPS

[0089]		VL-CDR3	CAAWDGSLSGRV	14
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFGDYAV AWFRQAPGKGLEWVSIVSGSGTITDYADPVKGKF TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNYG GYYYYGMDVWGQGTLTVSS	15
		VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDV HWYQQLPGTAPKLLIYGTNNRPSGVPDFSGSKS GTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDGSLSGRVFG GGTKLTVLG	16
	5-A09	VH-CDR1	FSSNYMSWVRQAPG	17
		VH-CDR2	SSISSGSSYIYYADSVKGR	18
		VH-CDR3	AKEPPAYREGIDY	19
		VL-CDR1	CSGSSSNIANNYVS	20
		VL-CDR2	DNTNRPS	21
		VL-CDR3	CASWDDSLSGPV	22
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSNYM SWVRQAPGKGLEWVSSISSGSSYIYYADSVKGRF TISIDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEPPA YREGIDYWGQGTLTVSS	23
		VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIANNYVS WYQQLPGTAPKLLIYDNTNRPSGVPDFSGSKSG TSASLAISGLRSEDEADYYCASWDDSLSGPVFGG GTKLTVLG	24
[0089]	6-A01	VH-CDR1	FSSYSMNWVRQAPG	25
		VH-CDR2	AVISYDGSNKYYADSMKGR	26
		VH-CDR3	ARDSYLGWCAGSCTGIDY	27
		VL-CDR1	CSGSSSNIGNNAVN	28
		VL-CDR2	YDDLPS	29
		VL-CDR3	CAAWDDSLSGWV	30
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSM NWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSMKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDS YLGWCAGSCTGIDYWGQGTLTVSS	31
	6-A11	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGNNAVN WYQQLPGTAPKLLIYDDLLPSGVPDFSGSKSG TSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGWVFG GGTKLTVLG	32
		VH-CDR1	FSNYVLTWVRQSPG	33
		VH-CDR2	SGSGYNTYHADSVKGR	34

	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGSNVY WYQQLPGTAPKLLIYGDNRRPSGVPDFSGSKSG TSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGWVFG GGTKLTVLG	40	
[0090]	6-F05	VH-CDR1	RLSCAASGFTFSDYYMSWVRQAPG	41
		VH-CDR2	ANIKQDGSEKYYGDSATGR	42
		VH-CDR3	AKEERIGTYYY	43
		VL-CDR1	CSGSSFNIGSNVY	44
		VL-CDR2	KNNQRPS	45
		VL-CDR3	CAAWDDSLNGQV	46
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYM SWVRQAPGKGLEWVANIKQDGSEKYYGDSATG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKEE RIGTYYYWGQQGTLTVSS	47
		VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSFNIGSNVY WYQQLPGTAPKLLIYKNNQRPSGVPDFSGSKSG TSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLNGQVFG GGTKLTVLG	48
	6-H05	VH-CDR1	FSDYYMTWIRQAPG	49
		VH-CDR2	SSISSSSSYIYYADSVKGR	50
		VH-CDR3	ASTQTPYGSGNYPIYYYYGMDV	51
		VL-CDR1	CSGSRNSNRSNSVS	52
		VL-CDR2	GNSNRPS	53
		VL-CDR3	CGTWDDRLNRPV	54
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYM TWIRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYYADSVKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCASTQTPY GSGNYPIYYYYGMDVVGQQGTLTVSS	55
		VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSRNSNRSNSVS WYQQLPGTAPKLLIYGNNSNRPSSGVPDFSGSKSG TSASLAISGLRSEDEADYYCGTWDDRLNRPVFG GGTKLTVLG	56
	7-B08	VH-CDR1	FSSYWMSWVRQTPG	57
		VH-CDR2	SAINAAGDFQSYADSVRGR	58
		VH-CDR3	ARGDGNYFDI	59
		VL-CDR1	CSGSSSNIGSNVY	60
		VL-CDR2	GNSNRPS	61
		VL-CDR3	CQSYDSSLGLV	62
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYW MSWVRQTPGKGLEWVSAINAAGDFQSYADSVR GRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCAR GDGNYFDIWGQQGTLTVSS	63
		VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGSNVY WYQQLPGTAPKLLIYGNNSNRPSSGVPDFSGSKSG TSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLGLVFGG GGTKLTVLG	64
	6-A06	VH-CDR1	FSRYEMNWVRQAPG	65
		VH-CDR2	SGINWNGGSTGYADSVKGR	66
		VH-CDR3	ARHRNPDPPLDAFDI	67

[0091]	VL-CDR1	CTGSSSNIGAGYDVH	68
	VL-CDR2	SNNQRPS	69
	VL-CDR3	CASYTSISTVL	70
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYEM NWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARH RNPDPPLDAFDIWGQQGTLTVSS	71
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDV HWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDFSGSKS GTSASLAISGLRSEDEADYYCASYTSISTVLFGGG TKLTVLG	72
	5-B02	VH-CDR1 FSSYAMHWVRQAPG	153
	VH-CDR2 AVISYDGSNKKYYADSVKGR	154	
	VH-CDR3 TRPLKDDPDAFDI	155	
	VL-CDR1 CSGSSSNIGSYAVN	156	
	VL-CDR2 RNNQRPS	157	
[0092]	VL-CDR3 CFSYAGGNTWV	158	
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT <u>FSSYAM</u> <u>NWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKKYYADSVKGR</u> <u>RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTRPL</u> <u>KDDPDAFDIWGQQGTLTVSS</u>	159
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTIS <u>CSGSSSNIGSYAVN</u> WYQQLPGTAPKLLIY <u>RNNQRPSGVPDFSGSKSG</u> TSASLAISGLRSEDEADYY <u>CFSYAGGNTWVFGGG</u> TKLTVLG	160
	2-C08	VH-CDR1 FSSYEMNWVRQAPG	163
	VH-CDR2 SAISGSAGSTYYADSVKGR	164	
	VH-CDR3 ATYPKEKTLHGGRYPYYGLDL	165	
	VL-CDR1 CSGSSSNIGSNTVN	166	
	VL-CDR2 DNNKRPL	167	
	VL-CDR3 CATWDDSLSGPV	168	
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYEM NWVRQAPGKGLEWVSGINWNGGSTGYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARH RNPDPPLDAFDIWGQQGTLTVSS	169
[0093]	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDV HWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDFSGSKS GTSASLAISGLRSEDEADYYCASYTSISTVLFGGG TKLTVLG	170
	SAP3-6	VH MKCSWVMFFLMAVVTGVNSEVQLQQSGAELVK PGASVJKLSCTAGFNKDSYMYWVKQRPEQGLE WIGRIYPANGDTKYDPKFQGKATITADTSSNTAYL QLSSLASEDTAVYYCTRGYGSNFFDYWGQGTTL TVSS	161
	VL METDTLLLWVLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVS LGQRTTISCRASESVDSYGNFSFMHWYQQKPGQP PKLLIYRASNLESGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVE ADDVATYYCQQSNEDPFTFGGGTKLEIK	162	

[0092] 在一些实施方案中,Treg消耗性抗体分子是选自下表2所示的组的抗OX40抗体分子。

[0093] 在一些实施方案中,Treg消耗性抗体分子是选自由包含CDR中的1-6个的抗体分子组成的组的抗OX40抗体分子,所述CDR来自选自以下的每个组:SEQ ID.No:73-78;SEQ ID.No:81-86;SEQ ID.No:89-94;SEQ ID.No:97-102;SEQ ID.No:105-110;SEQ ID.No:113-118;SEQ ID.No:121-126;SEQ ID.No:129-134;SEQ ID.No:137-142;SEQ ID.No:145-150和

SEQ ID.No:171-176。

[0094] 在一些实施方案中,Treg消耗性抗体分子是选自由包含6个CDR的抗体分子组成的组的抗OX40抗体分子,所述6个CDR来自选自以下的每个组:SEQ ID.No:73-78;SEQ ID.No:81-86;SEQ ID.No:89-94;SEQ ID.No:97-102;SEQ ID.No:105-110;SEQ ID.No:113-118;SEQ ID.No:121-126;SEQ ID.No:129-134;SEQ ID.No:137-142;SEQ ID.No:145-150和SEQ ID.No:171-176。

[0095] 在一些实施方案中,Treg消耗性抗体分子是选自包含VH的组的抗OX40抗体分子,所述VH选自由以下组成的组:SEQ ID.No:79、87、95、103、111、119、127、135、143、151和177。

[0096] 在一些实施方案中,Treg消耗性抗体分子是选自由包含VL的抗体分子组成的组的抗OX40抗体分子,所述VL选自由以下组成的组:SEQ ID.No:80、88、96、104、112、120、128、136、144、152和178。

[0097] 在一些实施方案中,Treg消耗性抗体分子是选自由包含VH和VL的抗体分子组成的组的抗OX40抗体分子,所述VH和VL选自由以下组成的组:SEQ ID.No:79-80、87-88、95-96、103-104、111-112、119-120、127-128、135-136、143-144、151-152和177-178。

[0098] 在一些实施方案中,免疫刺激性抗体分子是选自下表2所示的组的抗OX40抗体分子。

[0099] 在一些实施方案中,免疫刺激性抗体分子是选自由包含CDR中的1-6个的抗体分子组成的组的抗OX40抗体分子,所述CDR来自选自以下的每个组:SEQ ID.No:73-78;SEQ ID.No:81-86;SEQ ID.No:89-94;SEQ ID.No:97-102;SEQ ID.No:105-110;SEQ ID.No:113-118;SEQ ID.No:121-126;SEQ ID.No:129-134;SEQ ID.No:137-142;SEQ ID.No:145-150和SEQ ID.No:171-176。

[0100] 在一些实施方案中,免疫刺激性抗体分子是选自由包含选自以下的6个CDR的抗体分子组成的组的抗OX40抗体分子:SEQ ID.No:73-78;SEQ ID.No:81-86;SEQ ID.No:89-94;SEQ ID.No:97-102;SEQ ID.No:105-110;SEQ ID.No:113-118;SEQ ID.No:121-126;SEQ ID.No:129-134;SEQ ID.No:137-142、145-150和SEQ ID.No:171-176。

[0101] 在一些实施方案中,免疫刺激性抗体分子是选自由包含VH的抗体分子组成的组的抗OX40抗体分子,所述VH选自由以下组成的组:SEQ ID.No:79、87、95、103、111、119、127、135、143、151和177。

[0102] 在一些实施方案中,免疫刺激性抗体分子是选自由包含VL的抗体分子组成的组的抗OX40抗体分子,所述VL选自由以下组成的组:SEQ ID.No:80、88、96、104、112、120、128、136、144、152和178。

[0103] 在一些实施方案中,免疫刺激性抗体分子是选自由包含VH和VL的抗体分子组成的组的抗OX40抗体分子,所述VH和VL选自由以下组成的组:SEQ ID.No:79-80、87-88、95-96、103-104、111-112、119-120、127-128、135-136、143-144、151-152和177-178。

[0104] 表2:OX40抗体

	抗体		SEQ.ID.NO:
[0105]	1-D08	VH-CDR1	FSSYAMSWVRQAPG
		VH-CDR2	SGINGYGDTPKDADSVKGR
		VH-CDR3	ATLYCGGGGCCYPDS

[0106]

[0106]	VH-CDR1	CTGSRNSNIGAGYDVH	76
	VH-CDR2	DYDEQPS	77
	VH-CDR3	CAAWDDDSLNGVV	78
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSGINGYGDTPKDADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATLY CGGGGCYPDSWGQGTLTVSS	79
	VL	QSVLQTQPPSASGTPGQRVTISCTGSRSNIGAGYDV HWYQQLPGTAPKLLIYDYDEQPSGVPDFSGSKS GTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDDSLNGVVF GGGTKLTVLG	80
	2-A02	VH-CDR1 FSGYWMTWVRQAPG	81
	VH-CDR2 SSISSSSYIYYADSVKGR	82	
	VH-CDR3 TSSNPFYGMDV	83	
	VL-CDR1 CSGSSSNIGNNYVS	84	
	VL-CDR2 YDDLPS	85	
	VL-CDR3 CAAWDDDSLNGGV	86	
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSGYW MTWVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYYADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCTSSNP FYGMDVWGQGTLTVSS	87
	VL	QSVLQTQPPSASGTPGQRVTISCSSSNIGNNYVS WYQQLPGTAPKLLIYDDLLPSGVPDFSGSKSG TSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDDSLNGGVFG GGTKLTVLG	88
	2-D07	VH-CDR1 FSDYYMSWVRQAPG	89
	VH-CDR2 SSITGTAGLTYNADSVKGR	90	
	VH-CDR3 ARMDWGYGNFDY	91	
	VL-CDR1 CSGSSSNIGSYTVN	92	
	VL-CDR2 GNNNRPS	93	
	VL-CDR3 CATWDDDSLGPV	94	
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYMM SWVRQAPGKGLEWVSSITGTAGLTYNADSVKGR FTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARMD WGYGNFDYWGQGTLTVSS	95
	VL	QSVLQTQPPSASGTPGQRVTISCSSSNIGSYTVN WYQQLPGTAPKLLIYGNNRPSGVPDFSGSKSG TSASLAISGLRSEDEADYYCATWDDDSLGPVFGG GTKLTVLG	96
	2-F02	VH-CDR1 FSDYEMNWVRQAPG	97
	VH-CDR2 AVISYDGSNKYYADSVKGR	98	
	VH-CDR3 AANSPFDP	99	
	VL-CDR1 CTGSSSNIGNAGYDVH	100	
	VL-CDR2 NDNVRPS	101	
	VL-CDR3 CAAWDANLSGWV	102	
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYEM NWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAANS PFDPWGQGTLTVSS	103

	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDV HWYQQLPGTAPKLLIYNDNVRPSGVPDFSGSKS GTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDANLSGWVF GGGTKLTVLG	104
[0107]	2-F10	VH-CDR1 FSSYEMNWVRQAPG VH-CDR2 AVISYDGSNKYYADSVKGR VH-CDR3 AANSPFDP VL-CDR1 CTGSSSNIGAGYDVH VL-CDR2 SNNQRPS VL-CDR3 CAAWDDSLSGWV	105 106 107 108 109 110
	VH EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYEM NWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCAAN SPFDPWGQGTLTVSS	111	
	VL QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDV HWYQQLPGTAPKLFYISNNQRPSGVPDFSGSKS GTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDSLSGWVF GGGTKLTVLG	112	
	5-D11	VH-CDR1 FDNHWMWSWVRQAPG VH-CDR2 SSISSSSSYIYYADSVKGR VH-CDR3 AREDWSDL VL-CDR1 CSGSSSNIGNNAVN VL-CDR2 GNSNRPS VL-CDR3 CQTFDVSQNAWV	113 114 115 116 117 118
		VH EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFDNHW MSWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGR STISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAMYYCARED WSFDLWGQGTLTVSS	119
		VL QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGNNAVN WYQQLPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDFSGSKSG TSASLAISGLRSEDEADYYCQTFDVSQNAWVFG GGTKLTVLG	120
		VH-CDR1 FSNSDMNWVRQAPG VH-CDR2 SAISNSGDGTYYADSVKGR VH-CDR3 REKTWGAAFDI VL-CDR1 CTGSSSNIGAGYDVH VL-CDR2 SQNLRPS VL-CDR3 CQSYDSSLGGSV	121 122 123 124 125 126
		VH EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNSDM NWVRQAPGKGLEWVAISNSGDGTYYADSVKG RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREK TWGAAFDIWGQGTLTVSS	127
		VL QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDV HWYQQLPGTAPKLLIYSQNLRPSGVPDFSGSKS GTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLGGSVFG GGTKLTVLG	128
	6-F03	VH-CDR1 FSDYTMNWVRQAPG VH-CDR2 SAISGGGSTYYPDSVKGR VH-CDR3 ARGGGYWPFDP	129 130 131

[0108]	VH-CDR1	CSGSSSTIGNNAIN	132	
	VH-CDR2	RDNQRPS	133	
	VH-CDR3	CQSYDSSLRVVV	134	
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYTM NWVRQAPGKGLEWVAISGSGSTYYPDSVKGR FTISRDNNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGG GYWPFDPWGQQGTLTVSS	135	
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSTIGNNAIN WYQQLPGTAPKLLIYRDNQRPSGVPDFSGSKSG TSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSLRVVVFGG GTKLTVLG	136	
	6-F04	VH-CDR1	FSSYAMSWVRQAPG	137
		VH-CDR2	SSISSSSYIYYADSVKGR	138
		VH-CDR3	VRGTSLDAFDI	139
		VL-CDR1	CSGSSSNIGNTYVS	140
		VL-CDR2	YDDLPS	141
		VL-CDR3	CAAWDDDSLGVV	142
	7-A07	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYYADSVKGRF TISRDNNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRGTS DAFDIWGQQGTLTVSS	143
		VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCGSSSNIGNTYVS WYQQLPGTAPKLLIYDDLLPSGVPDFSGSKSG TSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDDSLGVVFG GGTKLTVLG	144
		VH-CDR1	FSDYYMSWIRQAPG	145
		VH-CDR2	SSISSSSYISYADSMKGR	146
	1-G06	VH-CDR3	ATSEAAAADYFDY	147
		VL-CDR1	CTGSSSNIGAGYDVH	148
		VL-CDR2	DNNKRPS	149
		VL-CDR3	CAAWDDDSLNGPV	150
		VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSYDYM SWIRQAPGKGLEWVSSISSSSYISYADSMKGRFT ISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCATSEAAA ADYFDYWGQQGTLTVSS	151
		VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGSSSNIGAGYDV HWYQQLPGTAPKLLIYDNNKRPSGVPDFSGSKS GTSASLAISGLRSEDEADYYCAAWDDDSLNGPVF GGTKLTVLG	152
		VH-CDR1	SSYAMSWVRQAPG	171
		VH-CDR2	AHTNEDGSDKKYVDSVKGR	172
		VH-CDR3	ARDGSGYSSGWYFDY	173
		VL-CDR1	CTGTTSNLGAGYDVH	174
[0109]	VL-CDR2	SNNQRPSGVPDFRS	175	
	VL-CDR3	CQSYDSSL SALV	176	
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAM SWVRQAPGKGLEWVAHTNEDGSDKKYVDSVKG RFTISRDNNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDG SGYSSGWYFDYWGQQGTLTVSS	177	
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRVTISCTGTTNLGAGYD VHWYQQLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDFSGSK SGTSASLAISGLRSEDEADYYCQSYDSSL SALVFG GGTKLTVLG	178	

[0110] 在一些实施方案中,免疫刺激性抗体是抗PD1抗体,优选为人抗PD1抗体。抗PD1抗体可以选自由纳武单抗(nivolumab)和派姆单抗(pembrolizumab)组成的组。

[0111] 在一些实施方案中,免疫刺激性抗体是抗PD1抗体,优选为人抗PD1抗体。抗PD1抗体可以选自由纳武单抗(nivolumab)和派姆单抗(pembrolizumab)组成的组。

[0112] 在一些实施方案中,免疫刺激性抗体是抗PDL1抗体,优选为人抗PDL1抗体。抗PDL1抗体可以是阿特珠单抗(atezolizumab)。

[0113] 在一些实施方案中,免疫刺激性抗体是抗CTLA-4抗体,优选为人抗CTLA-4抗体。抗CTLA-4抗体可以选自由伊匹单抗(ipilimumab)和曲美木单抗(tremelimumab)组成的组。

[0114] 在施用免疫刺激性抗体之前,将Treg消耗性抗体施用给受试者,如人。这意味着首先将Treg消耗性抗体施用于肿瘤,从而达到Treg消耗作用。一旦显示出Treg消耗作用,就施用免疫刺激性抗体。可以通过暂时分离两种抗体来实现这种依次施用。可替代地,或结合第一选项,依次施用也可以通过以下实现:两种抗体的空间分离;以某种方式(如肿瘤内)施用Treg消耗性抗体使其在免疫刺激性抗体之前到达肿瘤,所述免疫刺激性抗体稍后以某种方式(如全身性)施用,从而使其在Treg消耗性抗体之后到达肿瘤。

[0115] 医学领域的技术人员将了解,可以用不同的添加剂来修改药物,以例如改变药物被人体吸收的速率;并且可以以不同的形式修改药物,以例如允许特定的身体施用途径。

[0116] 因此,我们包含了:本发明的组合物和/或抗体和/或药剂和/或药物可以与赋形剂和/或药学上可接受的载剂和/或药学上可接受的稀释剂和/或佐剂组合。

[0117] 我们还包含,本发明的组合物和/或抗体和/或药剂和/或药物可以适合于肠胃外施用,本发明的组合物和/或抗体和/或药剂和/或药物包含:水性和/或非水性无菌注射溶液,其可以含有抗氧化剂和/或缓冲剂和/或抑菌剂和/或使调配物与预期接受者的血液等渗的溶质;和/或水性和/或非水性无菌悬浮液,其可以包含悬浮剂和/或增稠剂。本发明的组合物和/或抗体和/或药剂和/或药物可以存在于单位剂量或多剂量容器(例如密封的安瓿瓶和小瓶)中,并且可以储存在仅需要在使用之前添加无菌液体载剂(例如注射用水)的冷冻干燥(冻干)条件下。

[0118] 可以由前述种类的无菌粉末和/或颗粒和/或片剂制备临时注射溶液和悬浮液。

[0119] 对于人类患者的肠胃外施用而言,单次或分次施用的Treg消耗性抗体和/或免疫刺激性抗体的每日剂量水平通常为1mg/kg患者体重到20mg/kg,或者在一些情况下甚至高达100mg/kg。在特殊情况下,例如结合长期施用时,可以使用较低的剂量。在任何情况下,医生将确定最适合于任何个体患者的实际剂量,并且所述实际剂量将随着特定患者的年龄、体重和反应而变化。上述剂量是一般情况的示例。当然,在个别情况下,应使用更高或更低的剂量范围,并且这些剂量范围处于本发明的范围内。

[0120] 通常,本发明的组合物和/或药物将含有浓度介于约2mg/ml到150mg/ml之间或介于约2mg/ml到200mg/ml之间的Treg消耗性抗体和/或免疫刺激性抗体。在优选的实施方案中,本发明的药物和/或组合物将含有浓度为10mg/ml的Treg消耗性抗体和/或免疫刺激性抗体。

[0121] 通常,在人类中,口服或肠胃外施用本发明的组合物和/或抗体和/或药剂和/或药物是最方便的优选途径。对于兽医学用途,根据正常兽医学实践将本发明的组合物和/或抗体和/或药剂和/或药物作为适当可接受的调配物施用,并且兽医将确定最适合于特定动物的给药方案和施用途径。因此,本发明提供了一种药学调配物,其包含一定量的可有效治疗各种病症的本发明的抗体和/或药剂(如上所述和下文进一步描述的)。优选地,所述组合物

和/或抗体和/或药剂和/或药物适于通过选自包括以下的组的途径进行递送:静脉内;肌肉内;皮下。

[0122] 本发明还包含包含本发明的多肽结合部分的药学上可接受的酸加成盐或碱加成盐的组合物和/或抗体和/或药剂和/或药物。用于制备可用于本发明的上述碱化合物的药学上可接受的酸加成盐的酸是形成无毒酸加成盐的酸,即含有药学上可接受的阴离子的盐,如盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硝酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸性磷酸盐、乙酸盐、乳酸盐、柠檬酸盐、酸性柠檬酸盐、酒石酸盐、酒石酸氢盐、琥珀酸盐、马来酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐、蔗糖酸盐、苯甲酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐和双羟萘酸盐[即1,1'-亚甲基-双-(2-羟基-3萘甲酸酯)]盐,等等。也可以使用药学上可接受的碱加成盐来产生根据本发明所述的药剂的药学上可接受的盐形式。可用作试剂以制备本发明药剂的药学上可接受的碱盐的化学碱是与此类化合物形成无毒碱盐的化学碱,所述碱盐本质上是酸性的。此类无毒碱盐包含但不限于:衍生自此类药学上可接受的阳离子的碱盐,如碱金属阳离子(例如钾和钠)和碱土金属阳离子(例如钙和镁)的碱盐;铵或水溶性胺加成盐,如N-甲基葡萄糖胺-(葡甲胺);以及低级链烷醇铵和药学上可接受的有机胺的其它碱盐,等等。可以将本发明的药剂和/或多肽结合部分冻干以用于储存,并在使用前在合适的载剂中重构。可以使用任何合适的冻干方法(例如喷雾干燥、饼干干燥)和/或重构技术。本领域技术人员将理解,冻干和重构可能导致不同程度的抗体活性损失(例如,对于常规免疫球蛋白,IgM抗体往往比IgG抗体具有更大的活性损失),并且可能必须向上调整使用水平以进行补偿。在一个实施方案中,当重新水化时,冻干的(冷冻干燥的)多肽结合部分损失其活性(冻干前)的不超过约20%、或不超过约25%、或不超过约30%、或不超过约35%、或不超过约40%、或不超过约45%、或不超过约50%。

[0123] Treg消耗性抗体分子和免疫刺激性抗体分子的组合可以用于癌症治疗,其中在向受试者施用免疫刺激性抗体分子之前向所述受试者施用Treg消耗性抗体分子。

[0124] 我们包含,受试者可以是哺乳动物或非哺乳动物。优选地,哺乳动物受试者是人类或非哺乳动物,如马、牛、羊、猪、骆驼、狗或猫。最优选地,哺乳动物受试者是人类。

[0125] 通过“表现”,我们包含了:受试者表现出癌症症状和/或癌症诊断标志物、和/或所述癌症症状和/或癌症诊断标志物可以被测量和/或评估和/或量化。

[0126] 对于医学领域的技术人员而言,容易理解的是:癌症症状和癌症诊断标志物将是什么以及如何测量和/或评估和/或量化癌症症状的严重程度是否降低或增加、或癌症诊断标志物是否减少或增加;以及如何使用这些癌症症状和/或癌症诊断标志物来形成癌症的预后。

[0127] 癌症治疗通常作为疗程来进行,也就是说,在一段时间内施用治疗剂。疗程的时间长短取决于许多因素,这些因素可以包含所施用的治疗剂的类型、所治疗的癌症的类型、所治疗的癌症的严重程度以及受试者的年龄和健康状况,以及其他原因。

[0128] 通过“在治疗期间”,我们包含了:受试者当前正在接受疗程、和/或正在接受治疗剂、和/或正在接受治疗剂疗程。

[0129] 在一些实施方案中,根据本发明的待治疗的癌症是实体瘤。

[0130] 在一些实施方案中,癌症选自由肉瘤、癌和淋巴瘤组成的组。

[0131] 在一些实施方案中,癌症选自由鳞状细胞癌(SCC)、胸腺瘤、神经母细胞瘤或卵巢

癌组成的组。

[0132] 上述癌症中的每一种都是众所周知的，并且症状和癌症诊断标志物以及用于治疗所述癌症的治疗剂也得到了很好的描述。因此，用于治疗上述癌症类型的症状、癌症诊断标志物和治疗剂是医学领域的技术人员已知的。

[0133] 对大量癌症的诊断、预后和进展的临床定义取决于某些被称为分期的分类。那些分期系统用于核对大量不同的癌症诊断标志物和癌症症状，以提供关于癌症的诊断和/或预后和/或进展的摘要。肿瘤学领域的技术人员将了解如何使用分期系统评估癌症的诊断和/或预后和/或进展，以及应该使用哪些癌症诊断标志物和癌症症状来进行评估。

[0134] 通过“癌症分期”，我们包含了：Rai分期，其包含0期、I期、II期、III期和IV期；和/或Binet分期，其包含A期、B期和C期；和/或安娜堡(Ann Arbor)分期，其包含I期、II期、III期和IV期。

[0135] 已知的是，癌症可以引起细胞形态异常。这些异常通常可以重复地发生在某些癌症中，这意味着检查这些形态变化（也被称为组织学检查）可用于癌症的诊断或预后。用于使样品可视化以检查细胞形态并制备用于可视化的样品的技术在本领域中是众所周知的；例如，光学显微镜或共聚焦显微镜。

[0136] 通过“组织学检查”，我们包含了：存在小型成熟淋巴细胞；和/或存在具有狭窄细胞质边界的小型成熟淋巴细胞；存在具有缺乏可辨别的核仁的致密核的小型成熟淋巴细胞；和/或存在具有狭窄细胞质边界且具有缺乏可辨别的核仁的致密核的小型成熟淋巴细胞；和/或存在非典型细胞和/或裂解的细胞和/或原代淋巴细胞。

[0137] 众所周知，癌症是细胞DNA突变的结果，所述突变可能导致细胞避免细胞死亡或不受控制地增殖。因此，检查这些突变（也被称为细胞遗传学检查）可能是评估癌症诊断和/或预后的有用工具。这方面的一个实例是删除染色体位点13q14.1，这是慢性淋巴细胞性白血病的特征。检查细胞突变的技术在本领域中是众所周知的；例如，荧光原位杂交(FISH)。

[0138] 通过“细胞遗传学检查”，我们包含检查细胞中的DNA，并且具体地说，染色体。细胞遗传学检查可以用于鉴定DNA的变化，所述变化可能与难治性癌症和/或复发性癌症的存在有关。此类变化可能包含：13号染色体长臂中的缺失；和/或染色体位点13q14.1的缺失；和/或12号染色体的三体性；和/或12号染色体长臂中的缺失；和/或11号染色体长臂中的缺失；和/或11q的缺失；和/或6号染色体长臂中的缺失；和/或6q的缺失；和/或17号染色体短臂中的缺失；和/或17p缺失；和/或t(11:14)易位；和/或(q13:q32)易位；和/或抗原基因受体重排；和/或BCL2重排；和/或BCL6重排；和/或t(14:18)易位；和/或t(11:14)易位；和/或(q13:q32)易位；和/或(3:v)易位；和/或(8:14)易位；和/或(8:v)易位；和/或t(11:14)和(q13:q32)易位。

[0139] 已知的是，患有癌症的受试者表现出某些身体症状，这通常是由于癌症对身体的负担所致。这些症状通常在同一癌症中再次发生，因此可以作为疾病的诊断和/或预后和/或进展的特征。医学领域的技术人员将理解哪些身体症状与哪些癌症相关，以及评估那些身体症状如何与疾病的诊断和/或预后和/或进展相互关联。通过“身体症状”，我们包含肝肿大和/或脾肿大。

附图说明

[0140] 在下文的实施例中,参考以下附图:

[0141] 图1.抗4-1BB mIgG2a mAb(而非mIgG1)在多种癌症模型中均具有生存益处。图1A:在第0天,通过皮下注射 5×10^5 CT26对BALB/c小鼠组进行刺激。当可触知肿瘤时,向小鼠静脉内注射抗4-1BB(L0B12.0)mIgG1、mIgG2a或PBS对照,然后每隔一天施用另外3次腹腔注射(最终剂量为200 μ g)。图1B:通过皮下注射 2×10^6 NXS2对A/J小鼠组进行刺激,当可触知肿瘤时,腹腔注射200 μ g抗4-1BB mAb或同种型对照mAb。3天后施用200 μ g第二剂。在这两个实验模型中,均监测肿瘤的生长,并在平均肿瘤面积超过 225mm^2 时将小鼠淘汰。如图所示,数据表示为肿瘤激发后的天数的肿瘤面积(mm^2) ;每条线代表单个小鼠。右侧图示出了到人道终点的存活百分比。数据表示至少2个独立实验的实施例,其中n=每组5只小鼠。

[0142] 图2.抗4-1BB mIgG1在体外和体内均发挥激动剂活性。

[0143] 图2A:如图所示,将被分类为去除GFP+细胞(-T_{reg})或未去除GFP+细胞(+T_{reg})的Foxp3-GFP小鼠的脾细胞与0.1 μ g/ml抗CD3和指示浓度的抗4-1BB(L0B12.0)mIgG1或mIgG2a一起孵育。在72小时培养的最后16小时期间测量[³H]-胸昔的掺入。图2B:将C57BL/6小鼠的脾细胞与0.1 μ g/ml抗CD3和指示浓度的抗4-1BB mIgG1、mIgG2a或两者的1:1混合物一起孵育,然后评估[³H]-胸昔的掺入。图2A和图2B中的数据示出了三联孔每分钟的平均值(+/-SEM)计数。图2C:在第0天,向小鼠组腹腔注射5mg OVA和200 μ g抗4-1BB mIgG1或mIgG2a。通过流式细胞仪量化外周血中的SIINFEKL特异性T细胞应答,并将其表示为总CD8+细胞的%。数据来自三个单独的实验,并示出了响应的时间过程(平均值±SEM,每组6只小鼠)和响应的峰值(平均值和单个响应,每组9只小鼠,*p=0.023)。图2D:在第0天,通过皮下注射 2×10^6 NXS2对A/J小鼠组进行刺激,并且在第3天,腹腔注射200 μ g抗4-1BB mAb或同种型对照mAb以及对照(SIINFEKL;左图)或TH(FETFEAKI;右图)肽。在第6天施用第二剂mAb(200 μ g)。图2B和图2C中的数据表示至少2个实验的实施例,其中n=每组5只小鼠。

[0144] 图3.小鼠和人类肿瘤中的常驻Treg细胞优先表达4-1BB。图3A:示出了CT26肿瘤中的4-1BB表达性肿瘤内Foxp3+Treg的免疫荧光显微镜图像(左图)。比例尺=50 μ m。流式细胞直方图显示4-1BB在TIL和脾细胞的T细胞亚群上的表达(右图)。CD4+Foxp3+(顶部小图)、CD4+Foxp3-(中间小图)和CD8+T细胞(底部小图)上的4-1BB表达(黑线)与同种型对照(灰线)。从携带CT26肿瘤的小鼠中分离细胞。图3B:从手术患者处获得新鲜切除的卵巢肿瘤、腹水和血液样品,并与健康的PBMC进行比较。将肿瘤样品切碎并消化,然后用密度梯度分离。获得匹配的外周血,并通过离心法分离外周血单核细胞。通过流式细胞仪评估4-1BB在CD4+CD25+CD127-Treg细胞、CD4+非Treg细胞和CD8+效应T细胞上的表达。上图示出了具有同一患者的肿瘤组织(黑色实线)、血液(灰色虚线)和腹水(黑色虚线)中的4-1BB表达的代表性直方图。同种型对照以灰色实线描绘。下图示出了不同组织样品的T细胞亚群上的4-1BB表达。数据点表示个体患者/供体,健康PBMC的n=11,腹水的n=20,肿瘤的n=9,并且患者血液的n=5。图3C:从手术患者处获得新鲜切除的皮肤鳞状细胞癌(SCC)和正常皮肤的样品。将样品切碎并消化,然后用密度梯度分离。获得匹配的外周血,并通过离心法分离外周血单核细胞。对细胞进行4-1BB染色,并通过流式细胞仪检测染色。上图示出了代表性直方图,其具有示出为空心直方图的4-1BB染色;肿瘤组织(黑色实线)、血液(灰色虚线)、正常皮肤(黑色虚线)和同型对照(灰色实线)。下图示出了不同组织样品的T细胞亚群上的4-1BB表达。数

据点表示10位个体患者。

[0145] 图4. 实体瘤中抗4-1BB mAb治疗的主要机制取决于抗体同种型和Fc γ R的可用性。图4A: 在第0天, 通过皮下注射 5×10^4 个CT26细胞对3-4个WT、Fc γ RIIB K0或 γ 链K0 BALB/c 小鼠组进行刺激。当可触知肿瘤时, 向小鼠静脉内注射抗4-1BB mIgG1、mIgG2a或PBS对照, 然后每隔一天施用另外3次腹腔注射(最终剂量为 $200\mu\text{g}$)。在第13天处死小鼠, 并通过流式细胞仪分析脾脏和肿瘤。数据示出了肿瘤(左图)或匹配的脾脏(右图)中CD4+群体内的Foxp3+细胞的频率。数据表示两个独立实验。图4B: 如(A)所述处理小鼠, 列举CD8+、Ki67+T 细胞, 并以与对照相比的倍数变化进行绘制。图4C: 用 5×10^4 个CT26细胞对WT、 γ 链K0或Fc γ R无效小鼠(γ 链K0 x Fc γ RIIBK0)、 γ 链K0或Fc γ RIIBK0 BALB/c 小鼠组进行刺激, 并如(A)所述用抗4-1BB mAb进行处理。监测肿瘤的生长, 并在平均肿瘤面积超过 225mm^2 时将小鼠淘汰。如图所示, 数据表示为肿瘤激发后的天数的肿瘤面积(mm^2), 每条线代表单个小鼠。右侧图示出了到人道终点的存活百分比。数据表示至少2个实验的实施例, 其中n=每组5只小鼠。图4D: 将用抗4-1BB mIgG1、mIgG2a或对照mAb调理过的CFSE标记的靶鼠脾T细胞与野生型(实心条)或Fc γ RIIB K0(空心条)mBMDM共培养, 然后评估吞噬作用。(E)(左图)将用抗人4-1BB hIgG1 mAb克隆SAP3-6、BI5-B02(也表示为005-BI02)或对照调理过的CFSE标记的靶人T细胞与hMDM共培养, 然后评估ADCP。(右图)通过流式细胞仪测定的与4-1BB表达水平相对绘制的吞噬度水平。在所有情况下, 吞噬作用均被绘制为双阳性巨噬细胞的%。

[0146] 图5. 不同抗4-1BB的定期施用或与抗PD-1mAb的定期组合增强抗肿瘤活性。图5A: 在第0天, 通过皮下注射 5×10^4 个CT26对年龄和性别匹配的BALB/c 小鼠组进行刺激。当可触知肿瘤时, 向小鼠静脉内注射抗4-1BB (LOB12.0) mIgG1、mIgG2a、mIgG1和mIgG2a两者或PBS 对照, 然后每隔一天施用另外3次腹腔注射(最终剂量为 $200\mu\text{g}$)。对于定期施用, 静脉注射mIgG2a, 然后在4天后腹腔注射mIgG1。监测肿瘤的生长, 并在平均肿瘤面积超过 225mm^2 时将小鼠淘汰。如图所示, 数据表示为肿瘤激发后的天数的平均肿瘤面积(mm^2)。给出的数据来自两个独立的实验, 其中n=每组10只小鼠。图5B: 用CT26肿瘤刺激小鼠, 然后如图5A所示进行单一疗法或抗4-1BB mIgG1或mIgG2a和/或抗PD-1rIgG1(WT) 或其去糖基化形式的预定组合。对于组合, 当首先可触知肿瘤时, 静脉内施用抗4-1BB mAb, 然后在4天后腹腔注射抗PD-1。监测肿瘤的生长并如图5A所示绘制数据。数据表示至少2个独立实验的实施例, 其中n=每组4或5只小鼠。图6. 经Fc工程改造的抗4-1BB mIgG2a/h2B具有双重活性并提供增强的癌症治疗。图6A: 抗4-1BB (LOB12.0) mIgG2a、mIgG2a/h2和“偏斜的”mIgG2a/h2B的nrCE-SDS曲线。图6B: 如图所示, 将来自C57B1/6小鼠的脾细胞与 $0.01\mu\text{g}/\text{ml}$ 抗CD3和指示浓度的抗4-1BB mIgG1、mIgG2a或mIgG2a/h2B一起孵育。在72小时培养的最后16小时期间测量 $[^3\text{H}]$ -胸昔的掺入。图6C: 将用抗4-1BB mIgG2a、mIgG2a/h2B或对照mAb调理过的CFSE标记的靶鼠脾T细胞与野生型mBMDM共培养, 然后评估吞噬作用。吞噬作用均被绘制为双阳性巨噬细胞的%。图6D: 在第0天, 通过皮下注射 5×10^5 个EG7对年龄和性别匹配的C57B1/6小鼠组进行刺激。在第3天、第5天和第7天, 向小鼠腹腔注射 $200\mu\text{g}$ mAb或PBS对照, 如图所示。在第20天, 收获肿瘤, 并通过流式细胞仪列举TIL。n=每组4只小鼠。(E)如(D)所述设置小鼠并监测肿瘤的生长, 并在平均肿瘤面积超过 400mm^2 时将小鼠淘汰。数据表示至少2个独立实验的实施例, 其中n=每组5只小鼠。

[0147] 图7. 抗4-1BB mAb表征。图7A: 与小鼠Fc γ RI、IIB、III和IV结合的抗4-1BB(克隆

LOB12.0) mIgG1、mIgG2a和亲本rIgG2a的表面等离子体共振分析。使重组的可溶性Fc γ R蛋白(0、6、23、94、375、1500nM)通过以5000RU固定的4-1-BB mAb。示出了传感图。图7B:将使用对鼠4-1BB细胞外和跨膜区进行编码的构建体稳定转染的人细胞系与mIgG1、mIgG2a同种型的抗4-1BB或与亲本rIgG2a mAb一起在一定浓度范围内孵育,然后用PE标记的二抗进行染色。数据示出了每种浓度下的平均荧光强度,以最大值的百分比表示。图7C:将大鼠抗4-1BB与小鼠mIgG1或mIgG2a抗4-1BB mAb以指示的浓度进行混合,然后与鼠4-1BB转染的细胞系一起孵育。用抗大鼠二抗检测大鼠mAb结合,并且数据表示为相对于竞争性小鼠抗4-1BB浓度的大鼠抗4-1BB抗体的平均荧光强度。

[0148] 图8.抗4-1BB mIgG2a mAb的抗肿瘤功效依赖于CD8+T细胞。相对于在第0天通过皮下注射5x 10⁴个CT26细胞进行刺激,在第-1天、第1天和第4天用500 μ g CD8消耗性抗体对BALB/c小鼠组进行处理或不进行处理。在第6天静脉注射抗41BB mIgG2a mAb,并在第8天、第10天和第12天进行腹腔注射,最终总剂量为200 μ g。记录肿瘤大小,并在平均肿瘤直径达到15mm时将小鼠淘汰。数据示出了肿瘤激发后的所示天数的肿瘤面积(mm^2),其中每条线代表单个小鼠。(n=5/组)

[0149] 图9.响应于OVA和抗4-1BB mAb的OT-I细胞的初级体内扩增。图9A:向3只野生型或Fc γ RIIB-/-小鼠组静脉注射2×10⁵个OT-I细胞,然后24小时(第0天)后腹腔注射0.5mg OVA和200 μ g mIgG1或mIgG2a抗4-1BB。对照小鼠仅接受OVA。采集血液样品以测量在应答过程中循环的SIINFEKL四聚体+CD8+细胞,以总CD8+细胞的% (平均值±SEM) 表示。数据表示2个实验。图9B:在第0天向5只C57BL/6小鼠组皮内注射2.5x 10⁵个B16/BL6细胞,然后在第3天、第6天和第9天,在相反侧皮内注射1x 10⁶个经辐照的FVAX细胞。在注射FVAX的同时,向小鼠腹腔注射PBS、100 μ g抗CTLA-4(克隆9D9)或抗CTLA-4和300 μ g抗4-1BB抗体。示出了到人道终点的存活百分比。

[0150] 图10.抗PD-1mAb表征。图10A:与小鼠Fc γ RI、IIB、III和IV结合的抗PD-1(克隆EW1-9) rIgG1(黑色实线)和去糖基化的rIgG1(灰色实线)的表面等离子体共振分析。使PD-1mAb(500nM)通过捕获到具有抗组氨酸mAb(GE Healthcare)的CM5芯片上的重组的Fc γ R-his蛋白(1000RU)(R&D系统公司(R&D Systems))。示出了减去0nM曲线的传感图。图10B:分析表明抗PD-1mAb与PD-1结合并阻断PD-L1结合。使抗PD-1rIgG1(黑色实线)、去糖基化的rIgG1(灰色实线)或缓冲液(黑色虚线)通过捕获到具有抗组氨酸mAb的CM5芯片上的重组的PD-1-his(R&D系统公司)(2000RU)。在箭头指示的时间点,使重组的PD-L1-Fc(R&D系统公司)通过,以证明与PD-1结合并被抗PD-1阻断。

[0151] 图11.抗4-1BB mIgG2a/h2B Fc γ R结合。与小鼠Fc γ RI、IIB、III和IV结合的抗4-1BB(克隆LOB12.0)mIgG2a和mIgG2a/h2B的表面等离子体共振分析。使重组的可溶性Fc γ R蛋白(0、6、23、94、375、1500nM)通过以5000RU固定的4-1BB mAb。示出了传感图。

[0152] 图12示出了HDLM2细胞的结合滴定曲线。

[0153] 图13示出了配体阻断。

[0154] 图14示出了体外测定的结果,左侧为4-1BB+IVA CD4的ADCC,右侧为CD8 T细胞增值。

[0155] 图15示出了与体外激活的人CD4+细胞的结合。

[0156] 图16示出了cyon对激活的CD4+T细胞的交叉反应性。

- [0157] 图17示出了配体阻断。
- [0158] 图18示出了对T细胞的ADCC，并证明了几种mAb对OX40表达性CD4+T细胞诱导了明显的ADCC。图示出了5个实验的平均值。Campath用作阳性对照而Yervoy用作比较剂。
- [0159] 图19示出了体外增殖测定的结果。
- [0160] 图20示出了使用h OX40 KI/OT1转移模型对不同抗体的体内激动活性。
- [0161] 图21示出了一个表，其总结了本文所描述的抗体中的一些抗体的特性。
- [0162] 图22示出了来自人类不同区室的Treg细胞和效应细胞，并证明了肿瘤组织中和/或肿瘤组织附近的Treg与外周Treg相比具有明显不同的潜在靶标表达曲线。
- [0163] 图23示出了来自小鼠不同器官的Treg细胞上的受体表达。
- [0164] 图24示出了与小鼠中的其它细胞类型相比，Treg细胞上的受体表达。
- [0165] 实施例
- [0166] 现在将描述体现本发明的某些方面的具体的非限制性实施例。
- [0167] 关于依次施用的实施例
- [0168] 结果
- [0169] 抗4-1BB mAb的治疗活性由同种型决定
- [0170] 我们和其它人先前已经确定了靶向TNFR超家族成员的免疫刺激性mAb活性对抑制性Fc γ RIIB提供的交联的依赖性。为了确定此要求是否类似地适用于抗4-1BB，我们生成了rIgG2a抗4-1BB mAb的mIgG1和mIgG2a嵌合版本(内部生成的LOB12.0(16))，如先前针对其它mAb特异性所述(17-19)。对LOB12.0 mIgG1重链进行编码的核苷酸序列示于SEQ.ID.NO:179中，而相应的氨基酸序列示于SEQ ID NO:180中。对LOB12.0 mIgG2a重链进行编码的核苷酸序列示于SEQ.ID.NO:181中，而相应的氨基酸序列示于SEQ ID NO:182中。通过表面等离子体共振和流式细胞仪进行的分析表明，这些mAb具有预期的mFc γ R结合曲线，其中mIgG2a具有高的抑制性Fc γ R激活比率(A:I)，而mIgG1具有低的A:I(图7A, (19、20))；两种mAb均保留了等效的4-1BB特异性和结合(图7B和7C)。然后，我们使用CT26结肠癌(图1A)和NXS2神经母细胞瘤(图1B)评估了这些小鼠抗4-1BB mAb在三种不同的已建立的实体瘤模型中的治疗潜力。与我们使用抗CD40的研究(18、19、21)和已发表的使用靶向DR5的其它激动性抗TNFR超家族mAb的报道(22、23)形成鲜明对比，对于抗4-1BB，高A:I比的mIgG2a mAb具有可观的治疗益处(在所有模型中，长期存活率均为80%)，而低A:I比的mIgG1版本在很大程度上无效(0-20%存活率)。值得注意的是，尽管mIgG2a mAb在这些环境中具有保护作用，但其治疗效果仍取决于CD8+T细胞(图8)，并导致长期的生产性抗肿瘤免疫力，如通过肿瘤再激发实验所确定的。这些结果表明，mIgG2a抗4-1BB的保护作用是通过适应性抗肿瘤免疫应答介导的，但是与抗CD40 mAb相比，这种mAb利用以Fc γ RIIB非依赖性方式发生的分子机制。
- [0171] 小鼠IgG1同种型的抗4-1BB的免疫刺激活性最佳
- [0172] 鉴于在我们的肿瘤模型和先前研究中获得的结果表明CD8+T细胞在介导抗4-1BB mAb的作用中起关键作用，我们试图确定抗4-1BB mAb活性对体内和体外T细胞种群的同种型依赖性。使用体外T细胞共刺激测定法(图2A)，仅mIgG1表现出激动活性，而mIgG2a(与上文使用的抗体相同)无激动活性。这与其它已发表的结果(18、19)一致。在T细胞培养测定中，mIgG1的共刺激活性独立于Treg细胞，这表明这种抗4-1BB mAb通过靶向效应T细胞上的

4-1BB来介导其作用。最后,通过添加mIgG2a消除了mIgG1的共刺激活性,这表明两种mAb变体均以相似的亲和力结合并争相与效应T细胞上的4-1BB结合(图2B)。使用体内免疫模型验证了这些体外结果,在所述模型中,模型抗原OVA处于内源性环境(图2C)和OT1 T细胞转移环境(图8A)中。在这种情况下,mIgG1的优异的激动活性依赖于抑制性Fc γ RIIB(图2C、图9A),如先前针对抗CD40 mAb所示(18、19、24、25)。最后,在两个免疫模型(NXS2肽和B16-sF1t3L-Ig;分别为图2D和图9B)中,mIgG1和mIgG2a同种型抗体具有相同的治疗效果(图2D和图9B)。值得注意的是,在没有接种疫苗的情况下,mIgG1(而非IgG2a)的作用被消除,这证实了mIgG1(而非mIgG2a)的运转是通过依赖于免疫激活的机制进行的,并且可能依赖于Fc γ RIIB交联(图2D)。

[0173] 在小鼠肿瘤模型和人类癌症患者中,4-1BB在肿瘤内Treg细胞上表达已经确定抗4-1BB mIgG2a在治疗具有已建立的肿瘤的小鼠方面比mIgG1更具活性,但是在这些小鼠中,mIgG2a缺乏传递共刺激活性的能力,因此我们寻找可以解释其免疫调节作用的替代性机制。与静息效应T细胞相比,4-1BB mRNA和蛋白在Treg细胞中优先表达(14、26、27),在Treg细胞激活后其表达被进一步上调(27、28),并且最近已经显示所述表达在人类实体瘤的肿瘤内Treg中被上调(至少在转录水平上)(29、30)。因此,我们检查了具有高A:I Fc γ R结合曲线的抗4-1BB mIgG2a可以通过删除Treg细胞来增强抗肿瘤应答的可能性。我们首先确认了两种鼠类肿瘤模型CT26(图3A)和NXS2中Treg细胞上是否存在4-1BB,并且发现4-1BB在相当一部分肿瘤浸润性Treg上表达,而仅在一小部分效应T细胞上表达。此外,脾脏Treg细胞中只有一小部分表达4-1BB。为了证实这些观察结果在蛋白质水平上对人类可能是可翻译的,我们通过流式细胞仪确定了卵巢癌和鳞状细胞癌患者的肿瘤内Treg上是否存在4-1BB。从图3B和图3C中可以看出,在肿瘤的CD4+Foxp3+Treg细胞上发现4-1BB而在肿瘤的效应CD4+或CD8+T细胞上未发现4-1BB,并且4-1BB在从健康的PBMC、相配的血液、腹水或正常皮肤中分离的Treg上的表达水平较低。

[0174] Fc γ R在介导抗4-1BB mAb的抗肿瘤活性中的作用

[0175] 已经确定肿瘤内Treg表达4-1BB,因此我们使用CT26肿瘤模型来确定抗4-1BB mAb的潜在作用和相对消耗能力。我们的数据表明,在野生型小鼠中,mIgG2a mAb有效删除了肿瘤内Treg,而mIgG1变体无效(与上文使用的抗体相同(图4A))。这种消耗作用仅限于肿瘤并取决于共同 γ 链一激活性Fc γ R复合物的关键组分一的表达。此外,在Fc γ RIIB基因敲除小鼠中,mIgG1 mAb的消耗活性提高到与mIgG2a的消耗活性相似的水平,这表明这些mAb的消耗效率与其Fc γ R的A:I比密切相关,并且可以通过改变Fc γ R表达来控制消耗效力。接下来,我们试图确定在这些小鼠中是否能观察到肿瘤浸润性CD8 T细胞的激活,并且观察到尽管mIgG1 mAb在携带WT肿瘤的小鼠中缺乏功效,但如Ki-67阳性所监测到的,施用抗4-1BB mIgG1 mAb会导致CD8 T的细胞增殖明显增加(图4B)。虽然mIgG2a同种型也诱导了CD8激活的增加,但这明显小于mIgG1。这些数据可能证明了Treg在CT26肿瘤模型中的主导作用,并表明在不去除Treg抑制的情况下,在野生型小鼠中用mIgG1诱导CD8应答不足以诱导生产性抗肿瘤应答。

[0176] 由于抗4-1BB mIgG2a以依赖于激活性Fc γ R的表达的方式有效介导肿瘤内Treg细胞的消耗,因此我们认为缺少激活性Fc γ R会对这种mAb的治疗作用产生不利影响。然而,令人惊讶的是,在CT26肿瘤模型(图4C)中,在不存在激活性Fc γ R的情况下,抗4-1BB mIgG2a

仍保留了抗肿瘤活性,这表明Treg细胞消耗可能无法完全说明其治疗活性。与抗4-1BB mIgG2a功效的最小作用相反,在不存在激活性Fc γ R的情况下,抗4-1BB mIgG1促进抗肿瘤免疫的能力得到了实质性改善(CT26中为2/5)。鉴于针对mIgG1和mIgG2a mAb表现出的Fc γ R结合曲线(图7),这些发现表明,在不存在mAb与激活性Fc γ R竞争性结合的情况下,mIgG1和mIgG2a均能有效地结合Fc γ RIIB,从而允许mAb的最佳交联提供共刺激。在OVA模型(图2C)中,在FcRg K0动物中观察到的mIgG2a的T细胞激活进一步支持了这一观点。当在Fc γ RIIBK0小鼠中进行治疗时,与mIgG1在Fc γ RIIBK0小鼠中的增强的Treg消耗活性(图4A)一致,mIgG1同种型mAb表现出增强的且与mIgG2a等效的活性。这些结果与以下观察结果相结合:在不存在所有Fc γ R的情况下,两种mAb均未产生任何治疗活性(图4C),这证实了有效的非竞争性Fc γ R结合对于最佳体内活性的重要性。

[0177] 接下来,我们试图在体外使用小鼠和人类靶标以及效应子来正式证明抗4-1BB mAb的消耗能力。使用WT小鼠骨髓衍生的巨噬细胞和4-1BB表达性T细胞靶标,我们观察到mIgG2a诱导靶细胞的有效吞噬作用,而mIgG1 mAb无效(图4D)。与我们的体内消耗结果(图4B)和治疗应答(图4C)一致,当使用Fc γ RIIBK0巨噬细胞作为效应子时,观察到mIgG1介导的吞噬作用显著增加,与使用mIgG2a和WT效应子获得的水平一致。然后,我们使用人靶标和单核细胞衍生的巨噬细胞效应子在完整人系统中证实了我们的发现中的翻译潜力。在这个系统中,我们发现两个不同的huIgG1抗人4-1BB克隆(SAP3-6和005-B02)可以介导有效的吞噬清除作用(图4E)。最后,我们试图确认消耗的功效由4-1BB表达的水平而不是细胞类型本身决定。我们使用人(图4E)和小鼠(数据未示出)体外生成的具有不同4-1BB表达水平的巨噬细胞和靶细胞进行了此项操作,并发现4-1BB表达与靶细胞消耗效率之间存在直接关联。这支持了以下观点:在肿瘤微环境中,Treg上的高水平的4-1BB表达使其成为良好的靶标,而低表达性CD8细胞则可能幸免。

[0178] 定期施用Treg消耗性和免疫调节性mAb导致增强的抗癌治疗

[0179] 我们的结果表明,抗4-1BB mAb的同种型变体的治疗活性通过不同的机制发生,这表明组合使用可能会增强治疗效果。然而,由于Treg细胞(mIgG2a)的消耗和共刺激细胞(mIgG1)的传递都依赖于Fc γ R的参与,而且似乎是以竞争性方式进行的,因此我们推测依次施用相对于同时施用可能是最佳的。因此,我们比较了同时施用和依次施用抗4-1BB mIgG2a和mIgG1 mAb后的治疗效果。(与上文使用的抗体相同)如先前观察到的,mIgG2a(而不是mIgG1)变体作为单一药剂具有活性。与mIgG2a单一药剂治疗相比,同时施用mIgG2a和mIgG1抗4-1BB mAb导致治疗效果降低,如肿瘤大小增加(图5A)和无肿瘤小鼠数量减少(图5B)所指示的。与之形成鲜明对比的是,与单独用任一抗体变体进行的单一药剂治疗相比,先递送第一个mIgG2a以删除Treg细胞然后递送激动性mIgG1以提供共刺激,既可以改善肿瘤生长抑制作用又可以增加无肿瘤小鼠的数量(图5A和B)。这些发现表明,可以通过依次施用来优化Fc γ R依赖性免疫调节性mAb的治疗功效。重要的是,我们的发现还表明,Treg消耗可能具有广泛的用途,尤其是在以Fc γ R非竞争性方式使用时,改善抗4-1BB以外的免疫刺激性抗体。

[0180] 因此,接下来我们研究了将Treg消耗性抗4-1BB与经过临床验证的免疫激动剂抗PD1组合的治疗潜力。我们降低了mAb的剂量以获得次优的单一疗法,然后依次将同种型最佳抗4-1BB mIgG2a与Fc γ R无效结合的去糖基化(31)变体抗PD-1阻断抗体(图10A和10B)相

结合,从而模拟经临床验证的抗PD-1抗体纳武单抗和派姆单抗的Fc γ R结合缺乏/不良。与具有20-25%长期应答的单一疗法相比,这种组合产生了治疗的显著增加,从而导致80%的长期应答(图5C)。值得注意的是,mAb的次优同种型的组合不会导致任何应答增强,这表明对于最佳组合疗法而言,了解任何组合中每个组分的同种型和排程要求至关重要。

[0181] 被工程改造为具有双重活性的抗4-1BB mIgG2a/h2B提供增强的癌症治疗

[0182] 已经证明,与通过单独的任一机制相比,通过Treg消耗与免疫抑制的激动作用/释放的最佳组合可以实现更好的应答,因此我们试图证明可以通过对单个mAb进行工程改造来提供这些多种机制。鉴于我们的观察结果,即mAb介导的Treg消耗和免疫刺激性激动作用的Fc γ R要求不同且具有竞争性,我们试图利用我们先前的发现,即人IgG2铰链区能够提供具有Fc γ R非依赖性激动特性的抗TNFR超家族成员mAb(25)。在本文中,我们将人IgG2区克隆到如前所述的抗4-1BB的鼠mIgG2a恒定区中(25),然后将铰链偏斜成激动作用增强的‘B’形,从而制成抗4-1BB mIgG2a/h2B(图6A)。对LOB12.0 m κ 进行编码的核苷酸序列示于SEQ.ID.NO:183中,而相应的氨基酸序列示于SEQ.ID.NO:184中。对LOB12.0HuIgG hinge2.mIgG2aFc(mIgG2a/h2B)进行编码的核苷酸序列示于SEQ.ID.NO:185中,而相应的氨基酸序列示于SEQ.ID.NO:186中。对LOB12人 κ 进行编码的核苷酸序列示于SEQ.ID.NO:187中,而相应的氨基酸序列示于SEQ.ID.NO:188中。当对T细胞增殖进行体外测试时,尽管Fc γ R结合曲线(图11)未改变,但与mIgG2a亲本相比,mIgG2a/h2B具有显著增强的激动活性(图6B)。尽管具有这种增强的激动活性,但经过工程改造的mAb在使用BMDM和4-1BB表达性靶细胞的体外仍具有很强的吞噬潜力(图6C),这表明我们在不存在竞争性Fc γ R要求的情况下产生了既具有激动性潜力又具有消耗性潜力的试剂。最后,我们在EG7肿瘤模型中将这种mAb与亲本mIgG2a进行了比较,并且发现双重活性的mIgG2a/h2B具有与亲本mIgG2a相同的有效Treg消耗能力,但现在还具有明显的CD8刺激能力,从而导致CD8/Treg比率提高(图6D)。与治愈率为60%的标准mIgG2a相比,这种增强的双重活性的mAb还显示出更大的治疗潜力,即治愈100%的经处理的小鼠(图6E)。这些数据首次证明,可以对单个mAb进行工程改造以最佳地介导消耗和激动作用,并通过这种增强的双重活性提供更好的治疗。

[0183] 讨论

[0184] 已经在多种体外和体内模型中确定,抗TNFR超家族mAb需要有效的交联以诱导其激动作用,而对于大多数mAb而言,最好通过抑制性Fc γ R结合来提供这种交联(8、9、18、19、23、32、33)。尽管有这些发现,但仍不清楚这种激动性结合是否是在实体瘤环境中有助于这些mAb的治疗活性的主要作用机制。我们使用mIgG2a和mIgG1同种型抗4-1BB mAb研究了这个问题,它们分别具有高和低的激活性:抑制性Fc γ R比率,因此分别具有良好的消耗性潜力和激动性潜力(10)。

[0185] 通过在不同的野生型小鼠品系中使用两种不同的实体瘤模型,我们发现mIgG2a mAb产生了实质性的治疗效果,而mIgG1在很大程度上无效(图1A、图1B)。这些结果与这些mAb在CD8+T细胞上的激动活性形成鲜明对比,其中mIgG1更有效(图2A、图2B和图9A)。与以前的抗CD40 mAb出版物明显不同的是,抗4-1BB mIgG2a在体内并非没有T细胞激动活性,这表明4-1BB可能具有比CD40更低的信号传递交联阈值(18、19)。在这些不同的肿瘤模型中显示的mIgG2a依赖性治疗活性表明,治疗可能是由效应细胞依赖性消耗作用介导的。所用的肿瘤均不是4-1BB阳性,这意味着它不能像抗CD20 mAb那样作为直接的肿瘤靶向作用(34)。

[0186] 鉴于最近的发现,即靶向CTLA-4、OX40和GITR的mAb能够通过肿瘤内T_{reg}消耗来介导治疗(5-7),我们在这些模型中检查了4-1BB的表达,并且发现4-1BB在肿瘤内Treg细胞上特异性上调(图3A)。重要的是,针对这些发现在人类上的潜在翻译,我们发现4-1BB在患有卵巢癌和鳞状细胞癌的患者(分别为图3B和图3C)中均显示出肿瘤内Treg细胞上的表达受限,这支持了这种机械学方法在患者中的治疗潜力。此外,mIgG2a以依赖于激活性Fc γ R的方式消除了这一抑制群体,而mIgG1的作用很小(图4A)。与生产性消耗所需的高活性抑制性FcR结合的要求一致,当在Fc γ RIIBK0中进行这些实验时,小鼠mIgG1在体内(图4A)和体外(图4D)的消耗能力均变得与mIgG2a相当。

[0187] 尽管在这些模型中,Treg消耗是4-1BB Ab最有效的作用机制,但我们推测在不存在与激活性Fc γ R的竞争性结合的情况下,这些mAb可能通过其激动功能发挥治疗作用。我们使用CT26模型测试了这种潜力,并且发现在不存在激活性Fc γ R的情况下,mIgG1 mAb确实具有治疗性(图4C)。同样值得注意的是,与我们的观点一致,即4-1BB在体内的交联阈值相对较低,在不存在激活性Fc γ R的情况下,mIgG2a也保留了活性。当在Fc γ RIIBK0小鼠中进行治疗时,与mIgG1在Fc γ RIIBK0小鼠中的增强的Treg消耗活性(图4A和图4C)一致,mIgG1同种型mAb表现出增强的且与mIgG2a等效的活性。此外,在不存在Fc γ R的情况下,两种mAb均不能保护小鼠(图4C),这表明激动机制和消耗机制两者都依赖于Fc γ R。

[0188] 鉴于提供了适当的Fc γ R,抗4-1BB mAb可以使用两种独立的机制发挥治疗作用这一事实表明,如果依次施用mAb,则两种机制都可以发挥作用。事实上,当首先施用mIgG2a以删除Treg细胞,然后施用mIgG1以传递激动信号时便是如此(图5A和图5B)。重要的是,如果同时施用mAb,则几乎没有治疗效果。这些观察结果支持以下假设:不可能通过单一抗原的结合同时结合这两种Fc γ R依赖性机制,但如本文所示,这些mAb的时间性分离或潜在的空间(肿瘤内与全身)分离可能有助于它们的组合功效。

[0189] 为了进一步证明抗4-1BB mAb在患者中可能存在的同种型和排程要求,在临床结果表明可能需要组合方法的情况下,我们研究了不同的mAb与抗PD-1的组合。在这种环境下,我们发现抗4-1BB和抗PD-1两者的同种型最佳版本产生了显著的组合作用,从而导致治愈80%经处理的小鼠,这与单一疗法的20-25%治愈率和同种型次优组合形成鲜明对比。

[0190] 在临幊上,使用激动性抗体靶向4-1BB引起了很多关注。然而,我们的数据显示,肿瘤位点处的CD8+或CD4+T细胞中只有大约1%的细胞表达4-1BB。此外,最近的发现表明,浸润黑色素瘤患者的肿瘤位点的CD3+CD8+细胞中只有大约10%的细胞表达4-1BB,尽管这些细胞富含肿瘤反应性克隆(35)。因此,我们目前的发现,即抗4-1BB可用于消耗Treg从而释放免疫治疗性应答,表明这一策略可能对患者特别有吸引力。使用其它推定的Treg消耗性免疫治疗(例如抗OX40和抗CTLA-4)进行的临幊研究看起来很有希望(5,36,37),并且进一步证实了Treg消耗性抗4-1BB mAb在患者中的潜力。

[0191] 目前正在开发两种完全人源化的抗4-1BB mAb;百时美施贵宝(Bristol-Myers Squibb)生产的IgG4抗体urelumab(BMS-663513)和辉瑞(Pfizer)生产的完全人源化的IgG2 PF-05082566。迄今为止,已证明PF-05082566是安全的,其仅对患者造成1级毒性(38),而urelumab对15%的患者造成不良反应,包含肝酶、瘙痒和腹泻增加(39)。尽管它们的安全性有前景,但不能预测urelumab或PF-05082566会与Fc γ RIIB强烈结合,这使人们怀疑这两种抗体在患者中是否有效(40)。我们小组的最近数据表明,靶向4-1BB的人IgG2抗体可充当独

立于Fc γ R的超激动剂,并且PF-05082566仍可能以类似方式起作用(25)。本文提供的数据显示,与免疫激动剂变体抗4-1BB抗体相比,Treg缺失的疗效提高,与CD8效应细胞相比,肿瘤内的4-1BB在Treg上选择性表达,这些数据支持被选择用于Treg消耗的人治疗性抗4-1BB IgG1同种型抗体的开发(40)。最近证实,此类Treg缺失性抗体可以协同增强应答,并帮助克服对检查点阻断的抗性(50)。

[0192] 到目前为止,我们的发现支持以下观点:免疫调节性mAb可以利用多种作用机制进行治疗,并且我们考虑了是否可以对单个抗体进行工程改造以最佳地执行消耗和激动作用的可能性。鉴于我们的数据证明了这些机制在体外和体内存在竞争性Fc γ R要求,由于任何一个mAb一次只能结合单个Fc γ R,因此对mAb进行工程改造使其具有增强的激活性和抑制性Fc γ R结合似乎不太可能。鉴于这些潜在的局限性,我们生成了具有最佳消耗能力的mIgG2a mAb来整合被我们偏斜成激动作用最佳的‘B’形的hIgG2铰链区。我们假设这种mAb能够执行两种功能,并且发现在体外(图6B和C)和体内(图6D)都是如此,并且这导致在实体瘤模型中增强治疗(图6E)。这些结果对现有和正在开发的免疫调节性mAb的施用以及未来试剂的设计和开发及其使用策略具有直接影响。

[0193] 序列

[0194] SEQ ID NO:179—一对LOB12.0 mIgG1重链进行编码的核苷酸序列。

[0195] AAGCTTCAGGACCTCACCATGGAGATCTGGCTCAGCTGGTTTCCTGTCCCTTTCAAAAGGTGTC
CAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGTGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAAGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGC
CTCAGGATTCACTTCAGTAACTTGCATGCCCTGGCTGCCAGGCTCCAACGACGGGCTGGAGTGCGCAA
CCATTAGTTATGATGGTACTGACAGTTACTATCGAGACTCCGTGAAGGACCGATTCACTATCTCCAGAGATAATGCA
AAAAGCACCTATACTGCAAATGGACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCGCTTATTACTGTGTAAGACATGAGGA
TGTATACTACGGAATGGGGTACTTGATCACTGGGCCAAGGAGTACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCAAAACGACAC
CCCCATCTGCTATCCACTGGCCCTGGATCTGCTGCCAAACTAACCTGGTACCCCTGGGATGCCTGGTCAAG
GGCTATTCCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACTCTGGTCCCTGTCCAGCGGTGTGCACACCTCCCAGCTGT
CCTGCAGTCTGACCTCTACACTTGAGCAGCTCAGTGACTGTCCCCTCCAGCACCTGGCCAGCGAGACCGTCACCT
GCAACGTTGCCACCCGGCAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTTGTAAGCCTG
ATATGTACAGTCCCAGAAGTATCATCTGTCATCTTCCCCCAAAGCCAAAGGATGTGCTCACCATTACTGTGAC
TCCTAAGGTACGTGTGTTGAGACATCAGCAAGGATGATCCGAGGTCCAGTCAGCTGGTTGTAGATGATG
TGGAGGTGCACACAGCTCAGACGCAACCCGGGAGGAGCAGTTCAACAGCAGTCCCTGCTCAGTCAGTGAACCTCC
ATCATGCACCAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTCCCTGCCCATCGA
GAAAACCATCTCCAAAACCAAGGCAGACCGAAGGCTCCACAGGTGTACACCATTCCACCTCCCAAGGAGCAGATGG
CCAAGGATAAAAGTCAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTCCCTGAAGACATTACTGTGGAGTGGCAGTGGAAAT
GGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACACTCAGCCCACATGGACACAGATGGCTTACTTCGCTACAGCAAGCT
CAATGTGCAGAAGAGCAACTGGGAGGCAGGAAATACTTCACCTGCTCTGTGTTACATGAGGGCCTGCACAACCACC
ATACTGAGAAGAGCCTCTCCACTCTCCTGGTAAATGAGAATTG

[0196] SEQ ID NO:180—LOB12.0 mIgG1重链的氨基酸序列。带下划线的序列表示前导序列。

[0197] MEIWLSLVFLVLFIKGVQCEVQLVESGGLVQPGRSLKLSAASGFTFSNFGMAWVCQAPTTGLEWVAT
ISYDGTDSYYRDSVKDRFTISRDNAKSTLYLQMDSLRSEDTAAYYCVRHEDVYYGMGYFDHWGQGVLTVSSAKTTP

PSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVWNSSGLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSWPSETVTC
NVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTpkVTCVVVDISKDDPEVQFSWFVDDV
EVHTAQTPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAfpAPIEKTISKTKGRPkapQVYTIPPPKEQMA
KDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLNQKSWEAGNTFTCSVLHEGLHNHH
TEKSLSHSPGK

[0198] SEQ ID NO:181—对LOB12.0 mIgG2a重链进行编码的核苷酸序列。

[0199] AAGCTTCAGGACCTCACCATGGAGATCTGGCTCAGCTGGTTTCCTGTCCCTTCATAAAAGGTGT
CCAGTGTGAGGTGCAGCTGGTGAGTCTGGTGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAAGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCA
GCCTCAGGATTCACTTCAGTAACTTGGCATGGCCTGGTCTGCCAGGCTCCAACGACGGGCTGGAGTGGTCG
CAACCATTAGTTATGATGGTACTGACAGTTACTATCGAGACTCCGTGAAGGACCGATTCACTATCTCCAGAGATAA
TGCAAAAAGCACCTATACCTGCAAATGGACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCCGTTATTACTGTGTAAGACAT
GAGGATGTATACTACGGAATGGGTACTTGATCACTGGGCCAAGGAGTACTAGTCACAGTCTCCTCAGCCAAA
CGACAGCCCCATCGGTCTATCCACTGGCCCTGTGTGGAGATAACAACCTGGCTCCTCGGTGACTCTAGGATGCCT
GGTCAAGGGTTATTCCCTGAGCCAGTGACCTGACCTGGAACTCTGGATCCCTGTCCAGTGGTGTGCACACCTTC
CCAGCTGTCCTGCAGTCTGACCTCTACACCCCTCAGCAGCTCAGTGACTGTAACCTCGAGCACCTGGCCAGCCAGT
CCATCACCTGCAATGTGGCCCACCCGGCAAGCAGCACCAAGGTGGACAAGAAAATTGAGCCCAGAGGGCCCACAAT
CAAGCCCTGTCCTCCATGCAAATGCCAGCACCTAACCTCTGGGTGGACCATCCGTCTCATCTCCCTCaaag
atcaaggatgtactcatgatctccctgagccccatagtcacatgtgtggatgtgagcgaggatgaccag
atgtccagatcagctgggttgtaacaacgtggaagtaCaCacAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATtaCaA
CAGTACTCTCCGGTGGTCAGTGCCCTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAG
GTCAACAACAAAGACCTCCCAGGCCATCGAGAGAACCATCTCAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGG
TATATGTCTTGCCTCCACCAAGAAGAGATGACTAAGAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCAT
GCCTGAAGACATTACGTGGAGTGGACCAACAACGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAGTCCTG
GACTCTGATGGTTCTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACT
CCTGTTCACTGGTCCACGAGGTCTGCACAATCACCAACAGACTAACAGAGCttcTCCcggaCTCCggATGGTAAATGAGA
ATTC

[0200] SEQ ID NO:182—LOB12.0 mIgG2a重链的氨基酸序列。带下划线的序列表示前导序列。

[0201] MEIWSLVFLVLFIKGVQCEVQLVESGGLVQPGRSLKLSCAASGFTFSNFGMAWVCQAPTTGLEWVAT
ISYDGTDSYRDSVKDRFTISRDNAKSTLYLQMDSLRSDETAAYYCVRHEDVYYGMGYFDHWGQGVLTVSSAKTTA
PSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLWNSSGLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSWPQSITC
NVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISSP~~I~~VTCVVVDVSEDDPDVQIS
WFVNNEVHTAQTPHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSRAPQVYVLPP
PEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNVERNSYSCSVHE
GLHNHHTTKSFSRTPGK

[0202] SEQ ID NO:183—对LOB12.0 m κ 进行编码的核苷酸序列。

[0203] AAGCTTCAGGACCTCACCATGGCTGCACTACAACCTTAGGGCTGCTGCTGGCTCCAGCCAT
GAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCTCATTCCGTCTGCATCTGTGGAGACAGAGTCACCTCAACTGC
AAAGCAAGTCAGAATATTAACAAGTACTTAGACTGGTATCAGCAAAAGCTGGGTGAAGCTCCAAACTCCTGATGT

ATAATACAAACAGTTGCATACGGCAATCCCGTCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTTCTGATTTCACACTTAC
CATAAAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCCACATATTCTGCTTCAGCATAGCAGTGGGTGGACGTTGGTGG
GGCACCAAGCTGGAATTGAAACGTACGgatgctgcaccaactgttatccatcttcccaccatccagttagcagttaa
catctggaggcgctcagtcgtgtcattgaacaacttctacccaaagacatcaatgtcaagtggaaagattga
tggcagtgaacgacaaaatggcgctcgaacagttggactgatcaggacagcaaagacacgacaccacatgac
agcaccctcacgttaccaaggacgagtatgaacgacataacagctataccgtgaggccactcacaagacatcaa
cttcacccattgtcaagagctcaacaggaatgagtgttaggaattc

[0204] SEQ ID NO:184—LOB12.0 m_k的氨基酸序列。带下划线的序列表示前导序列。

[0205] MAALQLLGLLLWLPAMRCDIQM**TQSPSFLSASVGDRVTLNCKASQNINKYLDWYQQKLGEAPKLLMYN**
TNSLHTAIPSRFSGSGSDFTLTISSLQPEDVATYFCFQHSSGWTGGGTKLELKRTDAAPTVSIFPPSSEQLTSG
GASVVCFLNNFYPKDINVWKWIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTKEDEYERHNSYTCEATHKTSTSPI
VKSFNRNEC

[0206] SEQ ID NO:185—对LOB12.0 HuIgG hinge2.mIgG2aFc (mIgG2a/h2B) 进行编码的核苷酸。

[0207] AAGCTTCAGGACCTCACCATGGAGATCTGGCTCAGCTGGTTTCCTGTCCTTCAAAAAGGTGT
CCAGTGTGAGGTGCAGCTGGAGTCTGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAAGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCA
GCCTCAGGATTCACTTCAGTAACTTGGCATGGCCTGGCTGCCAGGCTCCAACGACGGGCTGGAGTGGTCG
CAACCATTAGTTATGATGGTACTGACAGTTACTATCGAGACTCCGTGAAGGACCGATTCACTATCCAGAGATAA
TGCAAAAAGCACCTATACCTGCAAATGGACAGTCTGAGGTCTGAGGACACGGCGCTTATTACTGTGTAAGACAT
GAGGATGTATACTACGGAATGGGTACTTTGATCACTGGGCCAAGGAGTACTAGTcaccgtctccctcagccctca
CCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCAGGAGCACCTCCGAGAGCACAGCGGCCCTGGCTGCCT
GGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGGAACTCAGGCGCTCTGACCAGCGCGTGCACACCTTC
CCAGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTACCCTCCAGCAACTCGGCACCC
AGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAAGacagtGAGCGCAAATGTTGTGT
CGAGTGCCACCGTGCCAGCACCTAACCTTGGGTGGACCATCCGTCTCATCTCCCTCcaaagatcaaggat
gtactcatgatctccctgagccccatagtcacatgttggtggatgtgagcgaggatgaccagatgtccaga
tcagctggtgtgaacaacgtgaaagtaCaCacAGCTCAGACACAAACCCATAGAGAGGATtaCaACAGTACTCT
CCGGGTGGTCAGTGCCTCCCCATCCAGCACCAGGACTGGATGAGTGGCAAGGAGTTCAAATGCAAGGTCAACAAAC
AAAGACCTCCCAGGCCATCGAGAGAACCATCTCAAACCCAAAGGGTCAGTAAGAGCTCCACAGGTATATGTCT
TGCCTCCACCAGAAGAAGAGATGACTAAGAACAGGTCACTCTGACCTGCATGGTCACAGACTTCATGCCTGAAGA
CATTTACGTGGAGTGGACCAACAACGGAAAACAGAGCTAAACTACAAGAACACTGAACCAAGTCCTGGACTCTGAT
GGTTCTTACTTCATGTACAGCAAGCTGAGAGTGGAAAAGAAGAACTGGGTGGAAAGAAATAGCTACTCCTGTCAG
TGGTCCACGAGGGTCTGCACAATACCAACACGACTAAGAGCttcTCCcggaCTCCggATGAAATGAGAATT

[0208] SEQ ID NO:186—LOB12.0 HuIgG hinge2.mIgG2aFc (mIgG2a/h2B) 的氨基酸序列。
带下划线的序列表示前导序列。

[0209] MEIWLSLVFLVLFIKGVQCEVQLVESGGGLVQPGRSLKLSCAASGFTFSNFGMAWVCQAPTTGLEWVAT
ISYDGTDSYYRDSVKDRFTISRDNAKSTLYLQMDSLRS~~E~~TAAYYCVRHEDVYYGMGYFDHWGQGVLT
PSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTSWNSGALTSGVHTFP~~A~~VHQVLSLSSVTPSSNFQTQTYT
CNVDHKPSNTKVDKTVERKCCVECP~~C~~PAPNLLGGPSVIFPPKIKDVLMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWFV

NNVEVHTAQQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISPKGSVRAPQVYVLPPPEE
EMTKKQVTLCMVTDFMPEDIYVEWTNNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNVERNSYSCSVVHEGLH
NHHTTKSFSRTPGK

[0210] SEQ ID NO:187—对LOB12人κ进行编码的核苷酸序列。

[0211] AAGCTTCAGGACCTCACCATGGCTGCACTACAACACTCTAGGGCTGCTGCTCTGGCTCCAGCCAT
GAGATGTGACATCCAGATGACCCAGTCTCCTCATTCTGTCTGCATCTGTGGGAGACAGAGTCACTCTCAACTGC
AAAGCAAGTCAGAATATTAACAAGTACTTAGTACTGGTATCAGCAAAGCTGGGTGAAGCTCCAAACTCCTGATGT
ATAATACAAACAGTTGCATACGGCAATCCCGTCAAGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGTTCTGATTCACACTTAC
CATAAGCAGCCTGCAGCCTGAAGATGTTGCCACATATTCTGCTTCAGCATAGCAGTGGGTGGACGTTGGTGA
GGCACCAAGCTGGAATTGAAACGTACggtgGTCACCCTGTCTTCATCTTCCCAGCCATCTGATGAGCAGTTGA
AATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGCTGCTGAATAACTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGA
TAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGC
AGCACCCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGA
GCTCGCCCGTCACAAAGAGCTCAACAGGGGAGAGTGTGAgattc

[0212] SEQ ID NO:188—LOB12人κ的氨基酸序列。带下划线的序列表示前导序列。

[0213] MAALQLLGLLLWLPAMRCDIQM**T**QSPSFLSASVGDRVTLNCASQNINKYLDWYQQKLGEAPKLLMYN
TNSLHTAIPSRFSGSGSDFTLT**I**SSLQPEDVATYFCFQHSSGWTGGGTKLELKRTVAAPS**V**FIFPPSDEQLKSG
TASVVCLLN~~N~~FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL**S**TLSKADYEHKVYACEVTHQGLSSPV
TKSFNRGEC

[0214] 方法

[0215] 动物和细胞。在当地设施饲养并培育小鼠。所使用的基因改变品系是OT1 TCR转基因C57BL/6小鼠(来自英国伦敦帝国学院的Matthias Merkenschlager博士)、Foxp3-GFP、γ链KO、Fc γ RIIBKO和Fc γ R无效(γ链KO x Fc γ RIIBKO)。通过与由聚合酶链反应(PCR)和/或流式细胞仪确认的基因型一起杂交来获得小鼠。先前已经描述了CT26结肠癌(16)、NXS2神经母细胞瘤(41)、B16 F1t3vax黑色素瘤(42)和EG7胸腺瘤(43)模型。

[0216] 免疫疗法。CT26—在第0天,通过皮下注射 5×10^4 个CT26对年龄和性别匹配的WT、γ链KO、Fc γ RIIBKO或Fc γ R无效(γ链KO x Fc γ RIIBKO)BALB/c小鼠组进行刺激。当可触知肿瘤时,向小鼠静脉内注射mAb或PBS对照,然后每隔一天施用另外3次腹腔注射(除非另外说明,否则最终剂量为200μg)。当CD8+T细胞被耗尽时,如前所述在第-1天、第+1天和第+4天通过腹腔注射施用0.5mg抗CD8(YTS169)(44),然后施用肿瘤和mAb。NXS2—在第0天,通过皮下注射 2×10^6 个NXS2细胞对年龄和性别匹配的A/J小鼠组进行刺激,并施用个别实验中指定的抗体/多肽疫苗。在PBS中腹腔注射所有抗体。在皮下注射之前,将PBS中的酪氨酸羟化酶(FETFEAKI)和对照(SIINFEKL或FEANGNLI)肽在等体积的不完全弗氏佐剂(IFA)中乳化。通过卡尺定期监测所有模型的肿瘤大小,并在截面积超过 225mm^2 时将小鼠剔除。EG7—在第0天,通过皮下注射 5×10^5 个EG7细胞对年龄和性别匹配的C57B1/6小鼠组进行刺激。在第3天、第5天和第7天,向小鼠腹腔注射200μg mAb或PBS对照,如图所示。使用Kaplan-Meier方法绘制到人道终点的存活期,并使用适用于Windows的GraphPad Prism 6.0(GraphPad软件公司,拉贺亚市,加利福尼亚州)通过对数秩检验分析显著性。

[0217] 抗体和试剂。如先前所述构建了抗41BB(克隆LOB12.0)mAb mIgG1、mIgG2a和

mIgG2a huIgG2铰链(mIgG2a/h2B)同种型(18、25;抗体如上所述)。内部产生抗CD8(YTS169)。在使用重组的小鼠PD-1(Leu25-Gln167)Fc融合蛋白(RnD Systems)进行韦斯大鼠(Wistar rat)免疫后,使用常规杂交瘤技术制备了抗小鼠PD-1(EW1-9)mAb rIgG1。将来自免疫大鼠或小鼠的脾脏与NS-1骨髓瘤细胞融合,并通过ELISA和流式细胞仪筛选平板。首先筛选mAb,将阳性孔中的细胞克隆两次,并在培养物中扩增以产生IgG。从杂交瘤或CHOK1细胞中产生抗体,并在蛋白A上纯化,通过电泳(贝克曼EP系统;贝克曼库尔特(Beckman Coulter),白金汉郡,英国)评估纯度,并且通过SEC HPLC消除聚集。如使用Endosafe-PTS便携式测试系统(查尔斯河实验室(Charles River Laboratories),拉尔布雷勒,法国)所测定的,所有制剂的内毒素含量均很低(<1ng内毒素/mg)。抗CTLA-4(9D9)购自Bio X Cell。通过用0.05U PNGaseF/ μ g抗体处理EW1-9,产生抗PD-1脱糖。N-糖苷酶F(PNGaseF)获自普洛麦格(Promega)(V483A)。将样品在37°C下放置过夜。通过EP或SPR分析证实了去糖基化。使用sephadexTM200通过大小排阻色谱法从酶中纯化抗体。肽(SIINFEKL、FETFEAKI和FEANGNLI)获自肽蛋白研究有限公司(Peptide Protein Research Ltd)。

[0218] 体外T细胞增殖。对来自Foxp3-GFP小鼠的脾脏进行分选以排除GFP+细胞(-Treg细胞;去除了99%的Treg细胞)或进行空分,并按照 1×10^5 个细胞/孔用0.1 μ g/ml抗CD3和指定的抗4-1BB mAb浓度范围进行平板接种。56小时后加入1 μ Ci/孔的[³H]-胸苷,再培养16小时后收获板。

[0219] 内源性OVA特异性免疫应答。如附图说明所述,在第0天用5mg OVA(西格玛(Sigma))和200 μ g mAb对小鼠进行免疫。随着时间推移监测外周血中内源性OVA特异性CD8+T细胞的扩增,并通过如前所述的流式细胞仪(18)进行分析。

[0220] 淋巴细胞分离。小鼠一切除用CT26或EG7刺激过的小鼠的肿瘤,并在37°C下用0.5Wu/ml释放酶DL(罗氏(Roche))和50 μ g/ml DNaseI(罗氏)消化20分钟。然后使细胞通过100 μ m细胞过滤器并直接用于测定,或使用40%和70%的percoll梯度分离出肿瘤浸润性淋巴细胞。人一将腹水评估为已分离的单细胞悬浮液。从在斯科讷大学医院(**Skånes University Hospital**)妇产科接受手术治疗的患者中获得卵巢肿瘤样品。将材料切成小块,并与DNase I(西格玛)和Liberase TM(罗氏诊断(Roche Diagnostics))一起在R10中于37°C下孵育20分钟。机械分离剩余的组织,并与细胞悬浮液一起通过70 μ m细胞过滤器。经南汉普郡B国家研究伦理服务委员会批准(参考编号07/H0504/187),从在南安普敦大学医院NHS信托基金皮肤科接受手术治疗的患者中获得新鲜切除的皮肤鳞状细胞癌(cSCC)和正常皮肤的样品。将样品切碎并在37°C下在RPMI培养基(Gibco)中用1mg/ml胶原酶IA(西格玛)和10 μ g/ml DNase I(西格玛)处理1.5小时,然后过滤通过70 μ m细胞过滤器(BD)并在Optiprep(Axis-Shield)密度梯度上离心(600x g,20分钟)。获得匹配的外周血样品,并通过在Lymphoprep(Axis-Shield)上以600x g离心30分钟来分离外周血单核细胞。

[0221] 流式细胞仪。小鼠-细胞表面染色:洗涤分离的淋巴细胞,在黑暗中与抗体一起在PBS+1%BSA(西格玛)中的冰上孵育30分钟,然后用PBS/1%BSA洗涤一次。染色后,使用红血球红细胞裂解缓冲液(AbD SeroTec)固定样品。将样品用PBS/1%BSA洗涤一次,然后在BD FACSCanto II或FACSCalibur上运行,并使用FCS Express分析数据。细胞内染色:表面染色后,将细胞固定并使用抗小鼠/大鼠Foxp3染色套装(BD生物科学公司)进行细胞内染色。抗体为抗CD4 eF450(GK1.5)、抗CD8-APC-eF780(53-6.7)、抗Foxp3 APC(FJK-16)、抗4-1-BB

(17-B5) (所有均来自eBioscience)、抗Ki67 APC(B56) (BD生物科学公司)或同种型对照。人类一在用相关抗体染色之前,将卵巢癌患者的细胞与10mg/ml K10VIG(百深(Baxalta))一起孵育10分钟。细胞活力:在4℃的PBS中,将细胞用可修复的eFluor780活/死染色剂(eBioscience)或水性活/死活力染色剂(英杰公司(Invitrogen))进行染色。细胞表面染色:将抗体与细胞在黑暗中于4℃下在PBS+1%BSA(西格玛)+10%FCS(Gibco)中孵育30分钟。用Foxp3染色缓冲液套装(eBioscience)进行细胞内染色。使用BD FACS Aria或BD FACSVerse通过流式细胞术分析细胞。使用了针对以下细胞标志物的荧光团偶联抗体:卵巢-CD4-BV510(RPA-T4)、CD25-BV421(M-A251)、抗CD127-FITC(HIL-7R-M21)、CD8-APC(RPA-T8)、41BB-PE(4B4-1)、小鼠IgG2a同种型、κ对照-PE(G155-178;均来自BD生物科学公司);SCC-CD3-APC-Cy7、CD4-FITC或PerCP Cy5.5、CD8-PE Cy7(均来自Biolegend)、4-1BB-PE和Foxp3-APC(均来自eBioscience)。

[0222] 抗体依赖性细胞吞噬作用。如先前所述,用小鼠巨噬细胞(17、45)或人巨噬细胞(18、46)进行ADCP测定。简而言之,从C57BL/6小鼠的股骨产生骨髓衍生的巨噬细胞(BMDM),并在含有20%L929上清液的完整RPMI中培养。可替代地,从PBMC产生人单核细胞衍生的巨噬细胞(hMDM),并在含有M-CSF的完整RPMI中培养(内部)。在用抗体调理之前对靶细胞进行CFSE染色(5μM),然后与巨噬细胞一起共培养约1小时。用CD16-APC或F4/80-APC对巨噬细胞进行染色,并通过流式细胞术评估样品中双阳性(CFSE/APC)巨噬细胞的百分比。

[0223] 统计分析。进行未配对学生t检验数据分析,或针对肿瘤治疗实验,使用Kaplan-Meier方法绘制到人道终点的存活期,并通过对数秩检验分析显著性。所有统计分析均使用适用于Windows的GraphPad Prism 6.0(GraphPad软件公司,拉贺亚市,加利福尼亚州)进行。当p<0.05时,接受显著性。

[0224] 表面等离子体共振。使用Biacore T100(通用电气医疗生命科学(GE Healthcare Life Sciences),白金汉郡,英国)测定了抗41BB mAb和可溶性Fc γ R相互作用的分析。根据制造商的说明,通过标准的胺偶联,将抗体或BSA作为对照以5000个共振单位[RU]固定到CM5传感器芯片(通用电气医疗生命科学,白金汉郡,英国)的流动池中。以30μl/分钟的流速将可溶性Fc γ R(R&D系统公司,阿宾登,英国)注射通过1500、375、94、23、6和0nM处的流动池进入HBS-EP+运行缓冲液(通用电气医疗生命科学,白金汉郡,英国)中。持续2分钟注射可溶性Fc受体,并持续5分钟监测解离。自动减去与对照流动池的背景结合。使用Biacore Bioevaluation软件(通用电气医疗生命科学,白金汉郡,英国)通过所示平衡库结合分析从数据中得出亲和常数。

[0225] 体外结合测定。将用无尾形式的鼠4-1BB(pTL)稳定转导的Karpas-299细胞(47)与所示浓度的抗4-1BB mAb一起在4℃下孵育20分钟,然后洗涤并用PE-标记的抗小鼠或PE标记的抗大鼠二抗(两个均来自Jackson实验室)进行染色。稳定表达空载体对照(数据未显示)的Karpas-299细胞未观察到染色。对于竞争性结合测定,将0.1μg/ml亲本大鼠抗4-1BB mAb与所示分级浓度的抗4-1BB的mIgG1或mIgG2a版本混合,然后与Karpas-299pTL细胞一起孵育。洗涤细胞并用APC偶联的和小鼠吸附的驴抗大鼠二抗进行染色;所述二抗既不结合于mIgG1也不结合于mIgG2a。使用BD FACS Canto II和FACS Diva软件执行流式细胞仪分析。

[0226] OVA特异性免疫应答。收获并洗涤来自OTI转基因小鼠的脾细胞。然后通过尾静脉注射将约 2×10^5 个OVA特异性CD8T细胞转移至受体小鼠中。如个别实验所述,第二天用OVA

(西格玛)对小鼠进行免疫。通过如前所述的流式细胞仪(18)分析外周血中的OTI扩增。示出了应答峰值处的结果(免疫后4-5天)。

[0227] 肿瘤刺激。B16-sFlt3L-Ig(FVAX) — 在第0天通过皮内注射 2.5×10^4 个B16/BL6细胞对C57BL/6小鼠组进行刺激。在第3天、第6天和第9天,在相反侧向小鼠皮内注射 1×10^6 个经辐照的FVAX细胞,并基于我们先前发布的协议(48),同样在第3天、第6天和第9天向小鼠腹腔注射所示PBS、100 μ g抗CTLA-4(克隆9D9)或抗CTLA-4和300 μ g抗4-1BB抗体。

[0228] 与特定性4-1BB抗体有关的实施例和特定性OX40抗体

[0229] 材料和方法

[0230] 动物和细胞

[0231] 根据内政部的指导方针,将小鼠饲养并保存在当地的设施中。十至十二周大的雌性BALB/c和C57 b16小鼠由Taconic(邦霍特,丹麦)提供,并维持在当地的动物设施中。为了用原发性肿瘤细胞进行异种移植研究,分别向6-8周大的雌性BALB/c和C57 b16小鼠移植了同系肿瘤细胞系CT26和TH03。

[0232] 临床样品

[0233] 斯科讷大学医院伦理委员会已获得了使用临床样品的伦理批准。根据赫尔辛基宣言提供了知情同意书。通过隆德斯科讷大学医院的妇产科和肿瘤科获得了样品。将腹水评估为已分离的单细胞悬浮液。将肿瘤材料切成小块,并与DNase I(西格玛奥德里奇(Sigma Aldrich))和Liberase TM(罗氏诊断(Roche Diagnostics))一起在R10中于37°C下孵育20分钟。机械破碎剩余的组织,并与细胞悬浮液一起通过70 μ m细胞过滤器。对从腹水和肿瘤分离的细胞进行染色。使用FACSVerse进行数据采集,并使用FlowJo分析数据。

[0234] 细胞培养

[0235] 在补充的RPMI(含有2mM谷氨酰胺、1mM丙酮酸、100IU/ml青霉素和链霉素和10% FBS(生命科学公司的GIBCO)的RPMI)中进行细胞培养。通过使用MACS CD4 T-细胞分离试剂盒(美天旎公司(Miltenyi Biotec),英国)进行阴性选择来纯化人外周CD4⁺T细胞。

[0236] 抗体和试剂

[0237] 使用了以下抗体和试剂:纯化的抗CD3(UCHT1;R&D系统公司);纯化的抗CD28(CD28.2;BioLegend);K10VIG(Baxalta,莱西恩,比利时);可修复活力染料eFluor780(eBioscience,圣地亚哥,加利福尼亚州)。Cell Trace CFSE(溶于DMSO)和碘化丙啶来自生命科学公司(卡尔斯巴德,加利福尼亚州)。

[0238] 使用以下试剂对人淋巴细胞进行染色:CD4-BV510(RPA-T4)、CD25-BV421(M-A251)、抗CD127-FITC(HIL-7R-M21)、OX40-PE(ACT35)、41BB-PE(4B4-1)、ICOS-PE(DX29)、GITR-PE(621)、PD-1-PE(MIH4)、CTLA-4-PE(BNI3)、CD4-APC(RPA-T4)、CD8-APC(RPA-T8)、小鼠IgG1、κ同种型对照-PE(MOPC-21)、m小鼠IgG2a同种型、κ对照-PE(G155-178)、小鼠IgG2b同种型、κ对照-PE(27-53;所有均来自BD生物科学公司);TNFRII-PE(FAB226P;R&D Systems)。

[0239] 使用以下试剂对小鼠淋巴细胞进行染色:CD4-BV510(RM4-5)、CD25-BV421(7D4)、CD8-Alexa 488(53-6.7;BD)、OX40、41BB、TNFRII、ICOS、GITR、PD-1、CTLA-4、FITC阴性对照(scFv,内部生成的BioInvent)。

[0240] 流式细胞仪

[0241] 根据标准程序执行流式细胞术。所有分析均排除了死细胞(经鉴定为碘化丙啶⁺或使用可修复活力染料eFluor780)和细胞聚集体。荧光偶联的mAb购自BD Bio-sciences、eBiosciences、BioLegend或内部制造。在FACSVerse(BD生物科学公司,富兰克林湖,新泽西州)上进行数据采集,并使用FlowJo软件(Tree Star,阿什兰,俄勒冈州)进行分析。对于基因表达分析,使用FACSAria(BD生物科学公司)分选细胞。用内部Alexa 647标记的去糖基化的抗His Tag抗体(AD1.1.10,R&D系统公司)检测内部产生的scFv的染色。根据制造商的说明,执行对T细胞的CFSE标记。

[0242] 抗体依赖性细胞毒性(ADCC)

[0243] 以两种方式执行ADCC测定:a) 使用经稳定转染以表达CD16-158V等位基因的NK-92细胞系和GFP(购自加利福尼亚州圣地亚哥的Conkwest公司)24执行ADCC分析。使用CD4+T细胞分离试剂盒(美天旎公司)从健康供体的外周血中分离出CD4+靶T细胞。在37℃下用CD3/CD28免疫磁珠(赛默飞世尔生命科学公司)和50ng/ml rh IL-2(R&D系统公司)持续2天刺激细胞。将靶细胞与0.1-10μg/ml mAB一起在4℃下预孵育30分钟,然后与NK细胞混合。将细胞在含有10mM HEPES缓冲液、1mM丙酮酸钠和10% FBS低IgG的RPMI 1640+GlutaMAX培养基(英杰公司)中以2:1效应子:靶细胞比率孵育4小时。通过流式细胞仪确定裂解。简而言之,在孵育结束时,将细胞悬浮液用BV510偶联的抗CD4以及10nM SYTOX Red死细胞染色剂(英杰公司)或可修复活力染料eFluor780(eBioscience)在黑暗中于4℃下染色20分钟,然后使用FACSVerse(BD生物科学公司)分析细胞。b)

[0244] 用钙黄绿素AM标记靶细胞,然后添加稀释浓度的Ab。将靶细胞与人PBMC一起以50:1的E:T比率在37℃下共培养4小时。将板以400 3g离心5分钟以沉淀细胞,然后将上清液转移到白色的96孔板中。使用Varioskan(赛默飞世尔科技)使用485nm的激发波长和530nm的发射波长测量钙黄绿素的释放。如下计算最大释放百分比:最大释放%=(样品/处理过的triton)*100。

[0245] 抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)

[0246] 在室温下用5mM CFSE标记靶细胞持续10分钟,然后在完全培养基中进行洗涤。然后用稀释浓度的Ab对CFSE标记的靶标进行调理,然后将所述靶标与BMDM一起以1:5的E:T比率在37℃下在96孔板中共培养1小时。然后在室温下用抗F4/80-藻蓝蛋白标记BMDM持续15分钟,并用PBS洗涤两次。将板置于冰上,刮取孔以收集BMDM,并使用FACSCalibur(BD)通过流式细胞仪评估吞噬作用,以确定F4/80+细胞群中F4/80+CFSE+细胞的百分比。

[0247] T细胞增殖测定

[0248] 使用两种方案测试抗体的激动活性:a) 在室温下将抗体与F(ab')₂山羊抗人IgG(Fcg片段特异性)或F(ab')₂山羊抗小鼠IgG(Fcg片段特异性)以IgG:F(ab')₂=1.5:1的摩尔比交联1小时。对1x 10⁵个经MACS纯化的人CD4+T细胞进行CFSE标记,并在37℃下用板结合的抗CD3(0.5μg/ml)和4μg/ml可溶性交联IgG刺激3天,然后进行分析。b) 在37℃下在5%CO₂中在补充有10%胎牛血清、谷氨酰胺(2mM)、丙酮酸(1mM)、青霉素和链霉素(100IU/mL)的RPMI 1640培养基(GibcoTM)中进行细胞培养。用2mM羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)标记新鲜的PBMC。然后,如Römer等人(51)所述,在24孔板中以1x10⁷个细胞/mL的浓度培养PBMC持续48小时,然后进行mAb刺激测定。对于PBMC刺激,用含有0.01μg/mL OKT3抗体(内部)的PBS将圆底96孔板湿涂持续4小时,然后弃去多余的抗体,并用PBS洗涤板。将每孔1X10⁵个

PBMC转移到板上,并用5 μ g/mL的测试mAb(抗4-1BB、抗OX40 mAb)进行刺激。在刺激后的第4天或第5天,用抗CD8-APC(BioLegend)和抗CD4-PE(内部)标记细胞,并通过在FACSCalibur(BD生物科学公司)上进行CFSE稀释来评估增殖。

[0249] 配体阻断ELISA

[0250] 将人类受体(R&D系统公司的hox40;内部生产的h41BB)以1pmole/孔涂布在96孔板(Lumitrac 600LIA板,葛莱娜公司(Greiner))上。洗涤后,将mAb(10 μ g/ml-0.01 μ g/ml)结合1小时。加入5nM的配体(hox40-L、h41BB-L;R&D系统公司),并将板进一步孵育15分钟。洗涤后,先用生物素化抗体(抗hox40-L、抗h41BB-L;R&D系统公司)检测结合的配体,然后用链霉亲和素-HRP(Jackson ImmunoResearch)进行中间洗涤。将Super Signal ELISA Pico(赛默科技)用作底物,并使用Tecan Ultra Microplate读板器分析板。

[0251] 微阵列分析

[0252] 从携带肿瘤的小鼠(CT26和TH03)的淋巴结中分选出CD4+CD25+靶细胞和CD4+CD25-非靶细胞。从健康的C57/B16和Balb/c小鼠的脾脏中分选出CD3-非靶细胞。从健康的Balb/c小鼠的脾脏中分离出CD8+T细胞。根据制造商的说明,使用来自Macherey-Nagel(德国Dueren)的RNA分离Midi试剂盒制备所有样品中的RNA。在瑞典隆德大学(SCIBLU)的瑞典综合生物学中心,扩增了分离的RNA并准备将其与艾菲公司(Affymetrix)的小鼠基因2.0ST阵列杂交。根据标准方法在SCIBLU进行数据分析。

[0253] 图12-24中示出了上述测定的结果和所研究抗体的特征。

[0254] 实施方案

[0255] 下面给出了本发明的不同实施方案的逐项列出:

[0256] 1.一种用于癌症治疗的Treg消耗性抗体分子,其中所述Treg消耗性抗体分子与免疫刺激性抗体分子一起依次施用,其中在施用所述免疫刺激性抗体分子之前施用所述Treg消耗性抗体分子。

[0257] 2.根据实施方案1所述的供使用的Treg消耗性抗体,其中所述免疫刺激性抗体分子是CD8激活性和/或CD8增强性抗体分子。

[0258] 3.根据实施方案1或2所述的供使用的Treg消耗性抗体分子,其中所述癌症是实体瘤。

[0259] 4.根据实施方案3所述的供使用的Treg消耗性抗体分子,其中所述实体瘤选自由肉瘤、癌、淋巴瘤和卵巢癌组成的组。

[0260] 5.根据实施方案3所述的供使用的Treg消耗性抗体分子,其中所述实体瘤是鳞状细胞癌(SCC)、胸腺瘤、神经母细胞瘤或卵巢癌。

[0261] 6.根据实施方案1到5中任一项所述的供使用的Treg消耗性抗体分子,其中所述Treg消耗性抗体分子和/或所述免疫刺激性抗体分子选自由全尺寸抗体、Fab、Fv、scFv、Fab'和(Fab')₂组成的组。

[0262] 7.根据实施方案1到6中任一项所述的供使用的Treg消耗性抗体分子,其中所述Treg消耗性抗体分子和/或所述免疫刺激性抗体分子是人抗体或人源化抗体。

[0263] 8.根据实施方案1到7中任一项所述的供使用的Treg消耗性抗体分子,其中所述Treg消耗性抗体分子是人IgG1抗体。

[0264] 9.根据实施方案1到8中任一项所述的供使用的Treg消耗性抗体分子,其中所述

Treg消耗性抗体分子是经工程改造以改善与至少一个激活性Fc γ R的结合的人IgG1抗体分子。

[0265] 10.根据实施方案1到9中任一项所述的供使用的Treg消耗性抗体分子,其中所述Treg消耗性抗体分子选自特异性结合于属于肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)的靶标的抗体分子。

[0266] 11.根据实施方案10所述的供使用的Treg消耗性抗体分子,其中所述Treg消耗性抗体分子是特异性结合于选自由4-1BB、OX40和TNFR2组成的组的靶标的抗体分子。

[0267] 12.根据实施方案1到9中任一项所述的供使用的Treg消耗性抗体分子,其中所述Treg消耗性抗体分子是特异性结合于选自GITR、ICOS、CTLA-4和CD25的靶标的抗体分子。

[0268] 13.根据实施方案11所述的供使用的Treg消耗性抗体分子,其中所述Treg消耗性抗体分子是抗4-1BB单克隆抗体分子。

[0269] 14.根据实施方案13所述的供使用的Treg消耗性抗体,其中所述Treg消耗性抗体分子选自由包含以下的抗体分子组成的组:选自SEQ.ID.NO:1-6的CDR中的1-6个;选自SEQ.ID.NO:9-14的CDR中的1-6个;选自SEQ.ID.NO:17-22的CDR中的1-6个;选自SEQ.ID.NO:25-30的CDR中的1-6个;选自SEQ.ID.NO:33-38的CDR中的1-6个;选自SEQ.ID.NO:41-46的CDR中的1-6个;选自SEQ.ID.NO:49-54的CDR中的1-6个;选自SEQ.ID.NO:57-62的CDR中的1-6个;选自SEQ.ID.NO:65-70的CDR中的1-6个;选自SEQ.ID.NO:153-158的CDR中的1-6个;以及选自SEQ.ID.NO:163-168的CDR中的1-6个。

[0270] 15.根据实施方案14所述的供使用的Treg消耗性抗体,其中所述Treg消耗性抗体分子选自由包含以下的抗体分子组成的组:SEQ.ID.NO:1-6;SEQ.ID.NO:9-14;SEQ.ID.NO:17-22;SEQ.ID.NO:25-30;SEQ.ID.NO:33-38;SEQ.ID.NO:41-46;SEQ.ID.NO:49-54;SEQ.ID.NO:57-62;SEQ.ID.NO:65-70;SEQ.ID.NO:153-158;以及SEQ.ID.NO:163-168。

[0271] 16.根据实施方案14或15所述的供使用的Treg消耗性抗体,其中所述Treg消耗性抗体分子选自由包含可变重链的抗体分子组成的组,所述可变重链选自由以下组成的组:SEQ.ID.NO:7、15、23、31、39、47、55、63、71、159和169。

[0272] 17.根据实施方案14到16中任一项所述的供使用的Treg消耗性抗体,其中所述Treg消耗性抗体分子选自由包含可变轻链的抗体分子组成的组,所述可变轻链选自由以下组成的组:SEQ.ID.NO:8、16、24、32、40、48、56、64、72、160和170。

[0273] 18.根据实施方案14到17中任一项所述的供使用的Treg消耗性抗体,其中所述Treg消耗性抗体分子选自由包含以下的抗体分子组成的组:SEQ.ID.NO:7和8;SEQ.ID.NO:15和16;SEQ.ID.NO:23和24;SEQ.ID.NO:31和32;SEQ.ID.NO:39和40;以及SEQ.ID.NO:47和48;SEQ.ID.NO:55和56;SEQ.ID.NO:63和64;SEQ.ID.NO:71和72;SEQ.ID.NO:159和160;以及SEQ.ID.NO:169和170。

[0274] 19.根据实施方案11所述的供使用的Treg消耗性抗体分子,其中所述Treg消耗性抗体是人抗OX40单克隆抗体分子。

[0275] 20.根据实施方案19所述的供使用的Treg消耗性抗体,其中所述Treg消耗性抗体分子选自由包含选自以下的CDR中的一个或多个的抗体分子组成的组:SEQ.ID.NO:73-78、81-86、89-94、97-102、105-110、113-118、121-126、129-134、137-142、145-150和171-176。

[0276] 21.根据实施方案20所述的供使用的Treg消耗性抗体,其中所述Treg消耗性抗体

分子选自由包含以下的抗体分子组成的组:SEQ.ID.NO:SEQ.ID.NO:73-78;SEQ.ID.NO:81-86;SEQ.ID.NO:89-94;SEQ.ID.NO:97-102;SEQ.ID.NO:105-110;SEQ.ID.NO:113-118;SEQ.ID.NO:121-126;SEQ.ID.NO:129-134;SEQ.ID.NO:137-142;SEQ.ID.NO:145-150以及SEQ.ID.NO:177-178。

[0277] 22.根据实施方案20或21所述的供使用的Treg消耗性抗体,其中所述Treg消耗性抗体分子选自由包含可变重链的抗体分子组成的组,所述可变重链选自由以下组成的组:SEQ.ID.NO:79、87、95、103、111、119、127、135、143、151和177。

[0278] 23.根据实施方案20到22中任一项所述的供使用的Treg消耗性抗体,其中所述Treg消耗性抗体分子选自由包含可变轻链的抗体分子组成的组,所述可变轻链选自由以下组成的组:SEQ.ID.NO:80、88、96、104、112、120、128、136、144、152和178。

[0279] 24.根据实施方案20到23中任一项所述的供使用的Treg消耗性抗体,其中所述Treg消耗性抗体分子选自由包含以下的抗体分子组成的组:SEQ.ID.NO:79和80;SEQ.ID.NO:87和88;SEQ.ID.NO:95和96;SEQ.ID.NO:103和104;SEQ.ID.NO:111和112;SEQ.ID.NO:119和120;SEQ.ID.NO:127和128;SEQ.ID.NO:135和136;SEQ.ID.NO:143和144;SEQ.ID.NO:151和152;以及SEQ.ID.NO:177和178。

[0280] 25.根据实施方案1到9中任一项所述的供使用的Treg消耗性抗体分子,其中所述Treg消耗性抗体分子选自特异性结合于选自由ICOS、GITR、CTLA-4、CD25和神经纤毛蛋白-1组成的组的靶标的抗体分子。

[0281] 26.根据实施方案1到25中任一项所述的供使用的Treg消耗性抗体,其中所述免疫刺激性抗体分子是人IgG2抗体或人IgG4抗体分子。

[0282] 27.根据实施方案26所述的供使用的Treg消耗性抗体,其中所述免疫刺激性抗体分子是人IgG2b抗体分子。

[0283] 28.根据实施方案1到27中任一项所述的供使用的Treg消耗性抗体分子,其中所述免疫刺激性抗体分子被工程改造,从而使得与激活性Fc γ 受体相比,所述免疫刺激性抗体对人Fc γ RIIB具有增强的结合。

[0284] 29.根据实施方案1到28中任一项所述的供使用的Treg消耗性抗体分子,其中所述免疫刺激性抗体分子是特异性结合于选自由4-1BB、OX40、ICOS、GITR、CTLA-4、CD25、PD-1和PDL1组成的组的靶标的抗体。

[0285] 30.根据实施方案29所述的供使用的Treg消耗性抗体分子,其中所述免疫刺激性抗体分子是抗4-1BB抗体分子。

[0286] 31.根据实施方案30所述的供使用的Treg消耗性抗体分子,其中所述免疫刺激性抗体分子选自由包含选自以下的CDR中的一个或多个的抗体分子组成的组:SEQ.ID.NO:1-6、9-14、17-22、25-30、33-38、41-46、49-54、57-62、65-70、153-158和163-168。

[0287] 32.根据实施方案31所述的供使用的Treg消耗性抗体,其中所述免疫刺激性抗体分子选自由包含以下的抗体分子组成的组:SEQ.ID.NO:1-6;SEQ.ID.NO:9-14;SEQ.ID.NO:17-22;SEQ.ID.NO:25-30;SEQ.ID.NO:33-38;SEQ.ID.NO:41-46;SEQ.ID.NO:49-54;SEQ.ID.NO:57-62;SEQ.ID.NO:65-70;SEQ.ID.NO:153-158以及SEQ.ID.NO:163-168。

[0288] 33.根据实施方案31或32所述的供使用的Treg消耗性抗体,其中所述免疫刺激性抗体分子选自由包含可变重链的抗体分子组成的组,所述可变重链选自由以下组成的组:

SEQ.ID.NO:7、15、23、31、39、47、55、63、71、159和169。

[0289] 34.根据实施方案31到33中任一项所述的供使用的Treg消耗性抗体,其中所述免疫刺激性抗体分子选自由包含可变轻链的抗体分子组成的组,所述可变轻链选自由以下组成的组:SEQ.ID.NO:8、16、24、32、40、48、56、64、72、160和170。

[0290] 35.根据实施方案31到34中任一项所述的供使用的Treg消耗性抗体,其中免疫刺激性抗体分子选自由包含以下的抗体分子组成的组:SEQ.ID.NO:7和8;SEQ.ID.NO:15和16;SEQ.ID.NO:23和24;SEQ.ID.NO:31和32;SEQ.ID.NO:39和40;以及SEQ.ID.NO:47和48;SEQ.ID.NO:55和56;SEQ.ID.NO:63和64;SEQ.ID.NO:71和72;SEQ.ID.NO:159和160;以及SEQ.ID.NO:169和170。

[0291] 36.根据实施方案29所述的供使用的Treg消耗性抗体分子,其中所述免疫刺激性抗体分子是抗OX40抗体分子。

[0292] 37.根据实施方案36所述的供使用的Treg消耗性抗体分子,其中所述免疫刺激性抗体分子选自由包含选自以下的CDR中的一个或多个的抗体分子组成的组:SEQ.ID.NO:73-78、81-86、89-94、97-102、105-110、113-118、121-126、129-134、137-142、145-150和171-176。

[0293] 38.根据实施方案37所述的供使用的Treg消耗性抗体,其中所述免疫刺激性抗体分子选自由包含以下的抗体分子组成的组:SEQ.ID.NO:SEQ.ID.NO:73-78;SEQ.ID.NO:81-86;SEQ.ID.NO:89-94;SEQ.ID.NO:97-102;SEQ.ID.NO:105-110;SEQ.ID.NO:113-118;SEQ.ID.NO:121-126;SEQ.ID.NO:129-134;SEQ.ID.NO:137-142;SEQ.ID.NO:145-150;以及SEQ.ID.NO:171-176。

[0294] 39.根据实施方案37或38所述的供使用的Treg消耗性抗体,其中所述免疫刺激性抗体分子选自由包含可变重链的抗体分子组成的组,所述可变重链选自由以下组成的组:SEQ.ID.NO:79、87、95、103、111、119、127、135、143、151和177。

[0295] 40.根据实施方案37到39中任一项所述的供使用的Treg消耗性抗体,其中所述免疫刺激性抗体分子选自由包含可变轻链的抗体分子组成的组,所述可变轻链选自由以下组成的组:SEQ.ID.NO:80、88、96、104、112、120、128、136、144、152和178。

[0296] 41.根据实施方案37到40中任一项所述的供使用的Treg消耗性抗体,其中所述免疫刺激性抗体分子选自由包含以下的抗体分子组成的组:SEQ.ID.NO:79和80;SEQ.ID.NO:87和88;SEQ.ID.NO:95和96;SEQ.ID.NO:103和104;SEQ.ID.NO:111和112;SEQ.ID.NO:119和120;SEQ.ID.NO:127和128;SEQ.ID.NO:135和136;SEQ.ID.NO:143和144;SEQ.ID.NO:151和152;以及SEQ.ID.NO:177-178。

[0297] 42.根据实施方案29所述的供使用的Treg消耗性抗体分子,其中所述免疫刺激性抗体分子是人抗PD1单克隆抗体分子、人抗PDL1单克隆抗体分子或人抗CTLA-4单克隆抗体分子。

[0298] 43.根据实施方案42所述的供使用的Treg消耗性抗体分子,其中所述免疫刺激性抗体分子是选自由纳武单抗和派姆单抗组成的组的人抗PD1单克隆抗体分子、或抗PDL1抗体阿特珠单抗或选自由伊匹单抗和曲美木单抗组成的组的抗CTLA-4抗体。

[0299] 44.一种抗4-1BB抗体分子,其选自由包含选自以下的CDR中的一个或多个的抗体分子组成的组:SEQ.ID.NO:1-6、9-14、17-22、25-30、33-38、41-46、49-54、57-62、65-70、

153-158和163-168。

[0300] 45.根据实施方案44所述的抗4-1BB抗体分子,其选自由包含以下的抗体分子组成的组:SEQ.ID.NO:1-6;SEQ.ID.NO:9-14;SEQ.ID.NO:17-22;SEQ.ID.NO:25-30;SEQ.ID.NO:33-38;SEQ.ID.NO:41-46;SEQ.ID.NO:49-54;SEQ.ID.NO:57-62;SEQ.ID.NO:65-70;SEQ.ID.NO:153-158;以及SEQ.ID.NO:163-168。

[0301] 46.根据实施方案44或45所述的抗4-1BB抗体分子,其选自由包含可变重链的抗体分子组成的组,所述可变重链选自由以下组成的组:SEQ.ID.NO:7、15、23、31、39、47、55、63、71、159和169。

[0302] 47.根据实施方案44到46中任一项所述的抗4-1BB抗体分子,其选自由包含可变轻链的抗体分子组成的组,所述可变轻链选自由以下组成的组:SEQ.ID.NO:8、16、24、32、40、48、56、64、72、160和170。

[0303] 48.根据实施方案44到47中任一项所述的抗4-1BB抗体分子,其选自由包含以下的抗体分子组成的组:SEQ.ID.NO:7和8;SEQ.ID.NO:15和16;SEQ.ID.NO:23和24;SEQ.ID.NO:31和32;SEQ.ID.NO:39和40;SEQ.ID.NO:47和48;SEQ.ID.NO:55和56;SEQ.ID.NO:63和64;SEQ.ID.NO:71和72;SEQ.ID.NO:159和160;以及SEQ.ID.NO:169-170。

[0304] 49.根据实施方案44到48中任一项所述的抗4-1BB抗体分子,其选自由全长IgG抗体、Fab、Fv、scFv、Fab'和(Fab')₂组成的组。

[0305] 50.根据实施方案49所述的抗4-1BB抗体分子,其中所述全长IgG抗体选自由IgG1、IgG2、IgG4及其Fc经工程改造的变体组成的组。

[0306] 51.根据实施方案44到50中任一项所述的抗4-1BB抗体分子,其中所述Treg消耗性抗体分子和/或所述免疫刺激性抗体分子是人抗体或人源化抗体。

[0307] 52.一种抗OX40抗体分子,其选自由包含选自以下的CDR中的一个或多个的抗体分子组成的组:SEQ.ID.NO:73-78、81-86、89-94、97-102、105-110、113-118、121-126、129-134、137-142、145-150和171-176。

[0308] 53.根据实施方案52所述的抗OX40抗体分子,其选自由包含以下的抗体分子组成的组:SEQ.ID.NO:SEQ.ID.NO:73-78;SEQ.ID.NO:81-86;SEQ.ID.NO:89-94;SEQ.ID.NO:97-102;SEQ.ID.NO:105-110;SEQ.ID.NO:113-118;SEQ.ID.NO:121-126;SEQ.ID.NO:129-134;SEQ.ID.NO:137-142;SEQ.ID.NO:145-150;以及SEQ.ID.NO:171-176。

[0309] 54.根据实施方案52或53所述的抗OX40抗体分子,其选自由包含可变重链的抗体分子组成的组,所述可变重链选自由以下组成的组:SEQ.ID.NO:79、87、95、103、111、119、127、135、143、151和177。

[0310] 55.根据实施方案52到54中任一项所述的抗OX40抗体分子,其选自由包含可变轻链的抗体分子组成的组,所述可变轻链选自由以下组成的组:SEQ.ID.NO:80、88、96、104、112、120、128、136、144、152和178。

[0311] 56.根据实施方案52到55中任一项所述的抗OX40抗体分子,其选自由包含以下的抗体分子组成的组:SEQ.ID.NO:79和80;SEQ.ID.NO:87和88;SEQ.ID.NO:95和96;SEQ.ID.NO:103和104;SEQ.ID.NO:111和112;SEQ.ID.NO:119和120;SEQ.ID.NO:127和128;SEQ.ID.NO:135和136;SEQ.ID.NO:143和144;SEQ.ID.NO:151和152;以及SEQ.ID.NO:177和178。

- [0312] 57. 根据实施方案52到56中任一项所述的抗OX40抗体分子, 其中所述Treg消耗性抗体分子和/或所述免疫刺激性抗体分子选自由全长IgG抗体、Fab、Fv、scFv、Fab'和(Fab')₂组成的组。
- [0313] 58. 根据实施方案57所述的抗OX40抗体分子, 其中所述全长IgG抗体选自由IgG1、IgG2、IgG4及其Fc经工程改造的变体组成的组。
- [0314] 59. 根据实施方案52到58中任一项所述的抗OX40抗体分子, 其中所述Treg消耗性抗体分子和/或所述免疫刺激性抗体分子是人抗体或人源化抗体。
- [0315] 60. 一种分离的核酸, 其对根据实施方案44到59中任一项所述的抗体进行编码。
- [0316] 61. 一种载体, 其包含根据实施方案60所述的核酸。
- [0317] 62. 一种宿主细胞, 其包含根据实施方案61所述的载体。
- [0318] 63. 根据实施方案44到59中任一项所述的抗体, 其用于在医药中使用。
- [0319] 64. 一种药物组合物, 其包含根据实施方案44到59中任一项所述的抗体。
- [0320] 65. 根据实施方案63所述的抗体或根据实施方案64所述的药物组合物, 所述抗体或药物组合物用于癌症治疗。
- [0321] 66. 根据实施方案65所述的抗体或药物组合物, 其中所述癌症是实体瘤。
- [0322] 67. 根据实施方案66所述的抗体或药物组合物, 其中所述实体瘤选自由肉瘤、癌和淋巴瘤组成的组。
- [0323] 68. 根据实施方案67所述的抗体或药物组合物, 其中所述实体瘤是鳞状细胞癌(SCC)、胸腺瘤、神经母细胞瘤或卵巢癌。
- [0324] 69. 根据实施方案44到59中任一项所述的抗体或一种药物组合物, 所述药物组合物包含根据实施方案44到51中任一项所述的抗体和根据实施方案52到59中任一项所述的抗体。
- [0325] 70. 根据实施方案44到59中任一项所述的抗体或根据实施方案69所述的药物组合物, 其中所述药物组合物用于癌症治疗。
- [0326] 71. 根据实施方案44到59中任一项所述的抗体或根据实施方案70所述的药物组合物, 其中所述癌症是实体瘤。
- [0327] 72. 根据实施方案44到59中任一项所述的抗体或根据实施方案71所述的药物组合物, 其中所述实体瘤选自由肉瘤、癌和淋巴瘤组成的组。
- [0328] 73. 根据实施方案44到59中任一项所述的抗体或根据实施方案72所述的药物组合物, 其中所述实体瘤是鳞状细胞癌(SCC)、胸腺瘤、神经母细胞瘤或卵巢癌。
- [0329] 74. 根据实施方案44到59中任一项所述的抗体在制备用于癌症治疗的药物组合物中的用途。
- [0330] 75. 根据实施方案74所述的用途, 其中所述癌症是实体瘤。
- [0331] 76. 根据实施方案75所述的用途, 其中所述实体瘤选自由肉瘤、癌和淋巴瘤组成的组。
- [0332] 77. 根据实施方案76所述的用途, 其中所述实体瘤是鳞状细胞癌(SCC)、胸腺瘤、神经母细胞瘤或卵巢癌。
- [0333] 78. 一种用于治疗受试者的癌症的方法, 其中向所述受试者施用Treg消耗性抗体分子, 并且其中在施用所述Treg消耗性抗体分子之后依次施用免疫刺激性抗体分子。

[0334] 79. 根据实施方案78所述的方法,其中所述免疫刺激性抗体分子是CD8激活性和/或CD8增强性抗体分子。

[0335] 80. 根据实施方案78或79所述的方法,其中所述癌症是实体瘤。

[0336] 81. 根据实施方案80所述的方法,其中所述实体瘤选自由肉瘤、癌和淋巴瘤组成的组。

[0337] 82. 根据实施方案81所述的方法,其中所述实体瘤是鳞状细胞癌(SCC)、胸腺瘤、神经母细胞瘤或卵巢癌。

[0338] 83. 根据实施方案78到82中任一项所述的方法,其中所述Treg消耗性抗体分子和/或所述免疫刺激性抗体分子选自由全长IgG抗体、Fab、Fv、scFv、Fab'和(Fab')₂组成的组。

[0339] 84. 根据实施方案83所述的方法,其中所述全长IgG抗体选自由IgG1、IgG2、IgG4及其Fc经工程改造的变体组成的组。

[0340] 85. 根据实施方案78到84中任一项所述的方法,其中所述Treg消耗性抗体分子和/或所述免疫刺激性抗体分子是人抗体或人源化抗体。

[0341] 86. 根据实施方案78到85中任一项所述的方法,其中所述Treg消耗性抗体分子是人IgG1抗体。

[0342] 87. 根据实施方案78到86中任一项所述的方法,其中所述Treg消耗性抗体分子是经工程改造以改善与至少一个活性Fc γ R的结合的人IgG1抗体分子。

[0343] 88. 根据实施方案78到87中任一项所述的方法,其中所述Treg消耗性抗体分子选自特异性结合于属于肿瘤坏死因子受体超家族(TNFRSF)的靶标的抗体分子。

[0344] 89. 根据实施方案88所述的方法,其中所述Treg消耗性抗体分子是特异性结合于选自由4-1BB、OX40和TNFR2组成的组的靶标的抗体分子。

[0345] 90. 根据实施方案87所述的方法,其中所述Treg消耗性抗体分子是抗4-1BB单克隆抗体分子。

[0346] 91. 根据实施方案89所述的方法,其中所述Treg消耗性抗体分子选自由包含选自以下的CDR中的一个或多个的抗体分子组成的组:SEQ.ID.NO:1-6、9-14、17-22、25-30、33-38、41-46、49-54、57-62、65-70、153-158和163-168。

[0347] 92. 根据实施方案91所述的方法,其中所述Treg消耗性抗体分子选自由包含以下的抗体分子组成的组:SEQ.ID.NO:1-6;SEQ.ID.NO:9-14;SEQ.ID.NO:17-22;SEQ.ID.NO:25-30;SEQ.ID.NO:33-38;SEQ.ID.NO:41-46;SEQ.ID.NO:49-54;SEQ.ID.NO:57-62;SEQ.ID.NO:65-70;SEQ.ID.NO:153-158;以及SEQ.ID.NO:163-168。

[0348] 93. 根据实施方案91或92所述的方法,其中所述Treg消耗性抗体分子选自由包含可变重链的抗体分子组成的组,所述可变重链选自由以下组成的组:SEQ.ID.NO:7、15、23、31、39、47、55、63、71、159和169。

[0349] 94. 根据实施方案91到93中任一项所述的方法,其中所述Treg消耗性抗体分子选自由包含可变轻链的抗体分子组成的组,所述可变轻链选自由以下组成的组:SEQ.ID.NO:8、16、24、32、40、48、56、64、72、160和170。

[0350] 95. 根据实施方案91到94中任一项所述的方法,其中所述Treg消耗性抗体分子选自由包含以下的抗体分子组成的组:SEQ.ID.NO:7和8;SEQ.ID.NO:15和16;SEQ.ID.NO:23和24;SEQ.ID.NO:31和32;SEQ.ID.NO:39和40;以及SEQ.ID.NO:47和48;SEQ.ID.NO:55和56;

SEQ.ID.NO:63和64;SEQ.ID.NO:71和72;SEQ.ID.NO:159和160;以及SEQ.ID.NO:169-170。

[0351] 96.根据实施方案89所述的方法,其中所述Treg消耗性抗体分子是人抗OX40单克隆抗体分子。

[0352] 97.根据实施方案96所述的方法,其中所述Treg消耗性抗体分子选自由包含选自以下的CDR中的一个或多个的抗体分子组成的组:SEQ.ID.NO:73-78、81-86、89-94、97-102、105-110、113-118、121-126、129-134、137-142、145-150和171-176。

[0353] 98.根据实施方案97所述的方法,其中所述Treg消耗性抗体分子选自由包含以下的抗体分子组成的组:SEQ.ID.NO:SEQ.ID.NO:73-78;SEQ.ID.NO:81-86;SEQ.ID.NO:89-94;SEQ.ID.NO:97-102;SEQ.ID.NO:105-110;SEQ.ID.NO:113-118;SEQ.ID.NO:121-126;SEQ.ID.NO:129-134;SEQ.ID.NO:137-142;SEQ.ID.NO:145-150;以及SEQ.ID.NO:171-176。

[0354] 99.根据实施方案96到98中任一项所述的方法,其中所述Treg消耗性抗体分子选自由包含可变重链的抗体分子组成的组,所述可变重链选自由以下组成的组:SEQ.ID.NO:79、87、95、103、111、119、127、135、143、151和177。

[0355] 100.根据实施方案96到99中任一项所述的方法,其中所述Treg消耗性抗体分子选自由包含可变轻链的抗体分子组成的组,所述可变轻链选自由以下组成的组:SEQ.ID.NO:80、88、96、104、112、120、128、136、144、152和178。

[0356] 101.根据实施方案96到100中任一项所述的方法,其中所述Treg消耗性抗体分子选自由包含以下的抗体分子组成的组:SEQ.ID.NO:79和80;SEQ.ID.NO:87和88;SEQ.ID.NO:95和96;SEQ.ID.NO:103和104;SEQ.ID.NO:111和112;SEQ.ID.NO:119和120;SEQ.ID.NO:127和128;SEQ.ID.NO:135和136;SEQ.ID.NO:143和144;SEQ.ID.NO:151和152;以及SEQ.ID.NO:177和178。

[0357] 102.根据实施方案78到87中任一项所述的方法,其中所述Treg消耗性抗体分子选自特异性结合于选自由ICOS、GITR、CTLA-4、CD25和神经纤毛蛋白-1组成的组的靶标的抗体分子。

[0358] 103.根据实施方案78到102中任一项所述的方法,其中所述免疫刺激性抗体分子是人IgG2抗体或人IgG4抗体分子。

[0359] 104.根据实施方案103所述的方法,其中所述免疫刺激性抗体分子是人IgG2b抗体分子。

[0360] 105.根据实施方案78到104中任一项所述的方法,其中所述免疫刺激性抗体分子被工程改造,从而使得与激活性Fc γ 受体相比,所述免疫刺激性抗体对人Fc γ RIIB具有增强的结合。

[0361] 106.根据实施方案76到105中任一项所述的方法,其中所述免疫刺激性抗体分子是特异性结合于选自由4-1BB、OX40、ICOS、GITR、CTLA-4、CD25、PD-1和PDL1组成的组的靶标的抗体。

[0362] 107.根据实施方案106所述的方法,其中所述免疫刺激性抗体分子是抗4-1BB抗体分子。

[0363] 108.根据实施方案107所述的方法,其中所述免疫刺激性抗体分子选自由包含选自以下的CDR中的一个或多个的抗体分子组成的组:SEQ.ID.NO:1-6、9-14、17-22、25-30、33-38、41-46、49-54、57-62、65-70、153-158和163-168。

[0364] 109.根据实施方案108所述的方法,其中所述免疫刺激性抗体分子选自由包含以下的抗体分子组成的组:SEQ.ID.NO:1-6;SEQ.ID.NO:9-14;SEQ.ID.NO:17-22;SEQ.ID.NO:25-30;SEQ.ID.NO:33-38;SEQ.ID.NO:41-46;SEQ.ID.NO:49-54;SEQ.ID.NO:57-62;SEQ.ID.NO:65-70;SEQ.ID.NO:153-158;以及SEQ.ID.NO:163-168。

[0365] 110.根据实施方案107到109中任一项所述的方法,其中所述免疫刺激性抗体分子选自由包含可变重链的抗体分子组成的组,所述可变重链选自由以下组成的组:SEQ.ID.NO:7、15、23、31、39、47、55、63、71、159和169。

[0366] 111.根据实施方案107到110中任一项所述的方法,其中所述免疫刺激性抗体分子选自由包含可变轻链的抗体分子组成的组,所述可变轻链选自由以下组成的组:SEQ.ID.NO:8、16、24、32、40、48、56、64、72、160和170。

[0367] 112.根据实施方案107到111中任一项所述的方法,其中免疫刺激性抗体分子选自由包含以下的抗体分子组成的组:SEQ.ID.NO:7和8;SEQ.ID.NO:15和16;SEQ.ID.NO:23和24;SEQ.ID.NO:31和32;SEQ.ID.NO:39和40;或SEQ.ID.NO:47和48;SEQ.ID.NO:55和56;SEQ.ID.NO:63和64;SEQ.ID.NO:71和72;SEQ.ID.NO:159和160;以及SEQ.ID.NO:169和170。

[0368] 113.根据实施方案106所述的方法,其中所述免疫刺激性抗体分子是抗OX40抗体分子。

[0369] 114.根据实施方案113所述的方法,其中所述免疫刺激性抗体分子选自由包含选自以下的CDR中的一个或多个的抗体分子组成的组:SEQ.ID.NO:73-78、81-86、89-94、97-102、105-110、113-118、121-126、129-134、137-142、145-150和171-176。

[0370] 115.根据实施方案114所述的方法,其中所述免疫刺激性抗体分子选自由包含以下的抗体分子组成的组:SEQ.ID.NO:SEQ.ID.NO:73-78;SEQ.ID.NO:81-86;SEQ.ID.NO:89-94;SEQ.ID.NO:97-102;SEQ.ID.NO:105-110;SEQ.ID.NO:113-118;SEQ.ID.NO:121-126;SEQ.ID.NO:129-134;SEQ.ID.NO:137-142;SEQ.ID.NO:145-150;以及SEQ.ID.NO:171-176。

[0371] 116.根据实施方案113到115中任一项所述的方法,其中所述免疫刺激性抗体分子选自由包含可变重链的抗体分子组成的组,所述可变重链选自由以下组成的组:SEQ.ID.NO:79、87、95、103、111、119、127、135、143、151和177。

[0372] 117.根据实施方案113到116中任一项所述的方法,其中所述免疫刺激性抗体分子选自由包含可变轻链的抗体分子组成的组,所述可变轻链选自由以下组成的组:SEQ.ID.NO:80、88、96、104、112、120、128、136、144、152和178。

[0373] 118.根据实施方案113到117中任一项所述的方法,其中所述免疫刺激性抗体分子选自由包含以下的抗体分子组成的组:SEQ.ID.NO:79和80;SEQ.ID.NO:87和88;SEQ.ID.NO:95和96;SEQ.ID.NO:103和104;SEQ.ID.NO:111和112;SEQ.ID.NO:119和120;SEQ.ID.NO:127和128;SEQ.ID.NO:135和136;SEQ.ID.NO:143和144;SEQ.ID.NO:151和152;以及SEQ.ID.NO:177和178。

[0374] 119.根据实施方案106所述的方法,其中所述免疫刺激性抗体分子是人抗PD1单克隆抗体分子、人抗PDL1单克隆抗体分子或人抗CTLA-4单克隆抗体分子。

[0375] 120.根据实施方案119所述的方法,其中所述免疫刺激性抗体分子是选自由纳武单抗和派姆单抗组成的组的人抗PD1单克隆抗体分子、或抗PDL1抗体阿特珠单抗或选自由伊匹单抗和曲美木单抗组成的组的抗CTLA-4抗体。

[0376] 121.一种如本文在说明书、实施例和/或附图中所述的用途、方法、抗体、核酸、载体、宿主细胞或药物组合物。

[0377] 参考文献

[0378] 在以上文本中,参考了下列出版物,其内容通过引用并入本文。

[0379] 1.Hodi,F.S.,O'Day,S.J.,McDermott,D.F.,Weber,R.W.,Sosman,J.A.,Haanen,J.B.,Gonzalez,R.,Robert,C.,Schadendorf,D.,Hassel,J.C.等人2010.《伊匹单抗在转移性黑色素瘤患者中的存活率改善(Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma)》《新英格兰医学杂志(N Engl J Med)》363:711-723。

[0380] 2.Topalian,S.L.,Hodi,F.S.,Brahmer,J.R.,Gettinger,S.N.,Smith,D.C.,McDermott,D.F.,Powderly,J.D.,Carvajal,R.D.,Sosman,J.A.,Atkins,M.B.等人2012.《抗PD-1抗体在癌症中的安全性、活性和免疫相关性(Safety,activity, and immune correlates of anti-PD-1 antibody in cancer)》《新英格兰医学杂志》366:2443-2454。

[0381] 3.Brahmer,J.R.,Tykodi,S.S.,Chow,L.Q.,Hwu,W.J.,Topalian,S.L.,Hwu,P.,Drake,C.G.,Camacho,L.H.,Kauh,J.,Odunsi,K.等人2012.《抗PD-L1抗体在晚期癌症患者中的安全性和活性(Safety and activity of anti-PD-L1 antibody in patients with advanced cancer)》《新英格兰医学杂志》366:2455-2465。

[0382] 4.Beatty,G.L.,Chiorean,E.G.,Fishman,M.P.,Saboury,B.,Teitelbaum,U.R.,Sun,W.,Huhn,R.D.,Song,W.,Li,D.,Sharp,L.L.等人2011.《CD40激动剂改变肿瘤基质并在小鼠和人类中显示出抗胰腺癌的功效(CD40agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans)》《科学(Science)》331:1612-1616。

[0383] 5.Simpson,T.R.,Li,F.,Montalvo-Ortiz,W.,Sepulveda,M.A.,Bergerhoff,K.,Arce,F.,Roddie,C.,Henry,J.Y.,Yagita,H.,Wolchok,J.D.等人2013.《肿瘤浸润调节性T细胞的Fc依赖性消耗共同定义了抗CTLA-4治疗黑素瘤的功效(Fc-dependent depletion of tumor-infiltrating regulatory T cells co-defines the efficacy of anti-CTLA-4therapy against melanoma)》《实验医学杂志(J Exp Med)》210:1695-1710。

[0384] 6.Bulliard,Y.,Jolicoeur,R.,Windman,M.,Rue,S.M.,Ettenberg,S.,Knee,D.A.,Wilson,N.S.,Dranoff,G.和Brogdon,J.L.2013.《激活性Fc γ 受体有助于免疫调节性受体靶向性抗体的抗肿瘤活性(Activating Fc gamma receptors contribute to the antitumor activities of immunoregulatory receptor-targeting antibodies)》《实验医学杂志》210:1685-1693。

[0385] 7.Marabelle,A.,Kohrt,H.,Sagiv-Barfi,I.,Ajami,B.,Axtell,R.C.,Zhou,G.,Rajapaksa,R.,Green,M.R.,Torchia,J.,Brody,J.等人2013.《在单个位点消耗肿瘤特异性Treg可消除已扩散的肿瘤(Depleting tumor-specific Tregs at a single site eradicates disseminated tumors)》《临床研究杂志(J Clin Invest)》123:2447-2463。

[0386] 8.White,A.L.,Chan,H.T.,French,R.R.,Beers,S.A.,Cragg,M.S.,Johnson,P.W.和Glennie,M.J.2013.《Fc γ RIotaIotaB控制激动性抗TNFR mAb的效力(FcgammaRIotaIotaB controls the potency of agonistic anti-TNFR mAbs)》《癌症免疫学与免疫疗法(Cancer Immunol Immunother)》62:941-948。

- [0387] 9.Li,F.和Ravetch,J.V.2013.《激动性抗TNFR抗体的抗肿瘤活性需要体内不同的Fc γ RIIB共参与(Antitumor activities of agonistic anti-TNFR antibodies require differential Fc gamma RIIB coengagement in vivo)》《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci U S A)》110:19501-19506。
- [0388] 10.White,A.L.,Beers,S.A.和Cragg,M.S.2014.《Fc γ RIIB是激动性抗体功效的关键决定因素(Fc gamma RIIB as a key determinant of agonistic antibody efficacy)》《微生物学和免疫学的最新课题(Curr Top Microbiol Immunol)》382:355-372。
- [0389] 11.Middendorp,S.,Xiao,Y.,Song,J.Y.,Peperzak,V.,Krijger,P.H.,Jacobs,H.和Borst,J.2009.《缺乏CD137配体的小鼠易患衍生自生发中心的B细胞淋巴瘤(Mice deficient for CD137 ligand are predisposed to develop germinal center-derived B-cell lymphoma)》《血液学(Blood)》114:2280-2289。
- [0390] 12.Snell,L.M.,Lin,G.H.,McPherson,A.J.,Moraes,T.J.和Watts,T.H.2011.《GITR和4-1BB在病毒感染和癌症免疫治疗中的T细胞内在作用(T-cell intrinsic effects of GITR and 4-1BB during viral infection and cancer immunotherapy)》《免疫学评论(Immunol Rev)》244:197-217。
- [0391] 13.Melero,I.,Hirschhorn-Cymerman,D.,Morales-Kastresana,A.,Sanmamed,M.F.和Wolchok,J.D.2013.《共同刺激T细胞和NK细胞的TNFR分子的激动剂抗体(Agonist antibodies to TNFR molecules that costimulate T and NK cells)》《临床癌症研究(Clin Cancer Res)》19:1044-1053。
- [0392] 14.McHugh,R.S.,Whitters,M.J.,Piccirillo,C.A.,Young,D.A.,Shevach,E.M.,Collins,M.和Byrne,M.C.2002.《CD4(+)CD25(+)免疫调节性T细胞:基因表达分析揭示了糖皮质激素诱导的TNF受体的功能性作用(CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor)》《免疫学(Immunity)》16:311-323。
- [0393] 15.Marson,A.,Kretschmer,K.,Frampton,G.M.,Jacobsen,E.S.,Polansky,J.K.,MacIsaac,K.D.,Levine,S.S.,Fraenkel,E.,von Boehmer,H.和Young,R.A.2007.《T细胞刺激过程中Foxp3的占用和关键靶基因的调控(Foxp3 occupancy and regulation of key target genes during T-cell stimulation)》《自然(Nature)》445:931-935。
- [0394] 16.Taraban,V.Y.,Rowley,T.F.,O'Brien,L.,Chan,H.T.,Haswell,L.E.,Green,M.H.,Tutt,A.L.,Glennie,M.J.和Al-Shamkhani,A.2002.《TNF受体超家族成员CD134(OX40)和CD137(4-1BB)的表达和共刺激作用及其在产生抗肿瘤免疫应答中的作用(Expression and costimulatory effects of the TNF receptor superfamily members CD134 (OX40) and CD137 (4-1BB), and their role in the generation of anti-tumor immune responses)》《欧洲免疫学杂志(Eur J Immunol)》32:3617-3627。
- [0395] 17.Beers,S.A.,Chan,C.H.,James,S.,French,R.R.,Attfield,K.E.,Brennan,C.M.,Ahuja,A.,Shlomchik,M.J.,Cragg,M.S.和Glennie,M.J.2008.《在不考虑补体激活的情况下,II型(托西莫单抗)抗CD20单克隆抗体在B细胞消耗中胜过I型(利妥昔单抗类)试剂(Type II (tositumomab) anti-CD20 monoclonal antibody out performs type I

(rituximab-like) reagents in B-cell depletion regardless of complement activation)》《血液学》112:4170-4177。

[0396] 18.White,A.L.,Chan,H.T.,Roghanian,A.,French,R.R.,Mockridge,C.I.,Tutt,A.L.,Dixon,S.V.,Ajona,D.,Verbeek,J.S.,Al-Shamkhani,A.等人2011.《与Fc γ RIIB的相互作用对于抗CD40单克隆抗体的激动活性至关重要(Interaction with FcgammaRIIB is critical for the agonistic activity of anti-CD40 monoclonal antibody)》《免疫学杂志(J Immunol)》187:1754-1763。

[0397] 19.White,A.L.,Dou,L.,Chan,H.T.,Field,V.L.,Mockridge,C.I.,Moss,K.,Williams,E.L.,Booth,S.G.,French,R.R.,Potter,E.A.等人2014.《可以通过抗体多聚化来克服CD40激动剂在淋巴瘤治疗中对Fc γ 受体的依赖性(Fcgamma receptor dependency of agonistic CD40 antibody in lymphoma therapy can be overcome through antibody multimerization)》《免疫学杂志》193:1828-1835。

[0398] 20.Nimmerjahn,F.和Ravetch,J.V.2005.《通过选择性Fc受体结合的不同免疫球蛋白g亚类活性(Divergent immunoglobulin g subclass activity through selective Fc receptor binding)》《科学》310:1510-1512。

[0399] 21.Wilson,N.S.,Yang,B.,Yang,A.,Loeser,S.,Marsters,S.,Lawrence,D.,Li,Y.,Pitti,R.,Totpal,K.,Yee,S.等人2011.《Fc γ 受体依赖性机制在癌细胞中驱动抗体介导的靶受体信号转导(An Fcgamma receptor-dependent mechanism drives antibody-mediated target-receptor signaling in cancer cells)》《癌细胞(Cancer Cell)》19:101-113。

[0400] 22.Haynes,N.M.,Hawkins,E.D.,Li,M.,McLaughlin,N.M.,Hammerling,G.J.,Schwendener,R.,Winoto,A.,Wensky,A.,Yagita,H.,Takeda,K.等人2010.《CD11c+树突状细胞和B细胞有助于抗DR5抗体治疗已确立的肿瘤的肿瘤活性(CD11c+dendritic cells and B cells contribute to the tumoricidal activity of anti-DR5 antibody therapy in established tumors)》《免疫学杂志》185:532-541。

[0401] 23.Li,F.和Ravetch,J.V.2012.《死亡受体抗体的凋亡和抗肿瘤活性需要抑制性Fc γ 受体的参与(Apoptotic and antitumor activity of death receptor antibodies require inhibitory Fcgamma receptor engagement)》《美国国家科学院院刊》109:10966-10971。

[0402] 24.Mimoto,F.,Katada,H.,Kadono,S.,Igawa,T.,Kuramochi,T.,Muraoka,M.,Wada,Y.,Haraya,K.,Miyazaki,T.和Hattori,K.2013.《相对于Fc γ RIIa(R131)和Fc γ RIIa(H131)具有选择性增强的Fc γ RIIb结合的经工程改造的抗体Fc变体(Engineered antibody Fc variant with selectively enhanced FcgammaRIIb binding over both FcgammaRIIa(R131)and FcgammaRIIa(H131))》《蛋白质工程设计与选择(Protein Eng Des Sel)》26:589-598。

[0403] 25.White,A.L.,Chan,H.T.,French,R.R.,Willoughby,J.,Mockridge,C.I.,Roghanian,A.,Penfold,C.A.,Booth,S.G.,Dodhy,A.,Polak,M.E.等人2015.《人免疫球蛋白g2铰链的构型赋予免疫刺激性抗癌抗体超激动特性(Conformation of the human immunoglobulin g2 hinge imparts superagonistic properties to

immunostimulatory anticancer antibodies)》《癌细胞》27:138-148。

[0404] 26.Gavin,M.A.,Clarke,S.R.,Negrou,E.,Gallegos,A.和Rudensky,A.2002.《体内CD4 (+) CD25 (+) 抑制性T细胞的稳态和失能(Homeostasis and anergy of CD4 (+) CD25 (+) suppressor T cells in vivo)》《自然免疫学(Nat Immunol)》3:33-41。

[0405] 27.Elpek,K.G.,Yolcu,E.S.,Franke,D.D.,Lacelle,C.,Schabowsky,R.H.和Shirwan,H.2007.《基于IL-2和4-1BB信号之间的协同作用的CD4+CD25+FoxP3+T调节性细胞的离体扩增(Ex vivo expansion of CD4+CD25+FoxP3+T regulatory cells based on synergy between IL-2 and 4-1BB signaling)》《免疫学杂志》179:7295-7304。

[0406] 28.Zheng,G.,Wang,B.和Chen,A.2004.《4-1BB共刺激增强CD4+CD25+调节性T细胞的增殖(The 4-1BB costimulation augments the proliferation of CD4+CD25+ regulatory T cells)》《免疫学杂志》173:2428-2434。

[0407] 29.Plitas,G.,Konopacki,C.,Wu,K.,Bos,P.D.,Morrow,M.,Putintseva,E.V.,Chudakov,D.M.和Rudensky,A.Y.2016.《调节性T细胞在人类乳腺癌中表现出不同的特征(Regulatory T Cells Exhibit Distinct Features in Human Breast Cancer)》《免疫学》45:1122-1134。

[0408] 30.De Simone,M.,Arrigoni,A.,Rossetti,G.,Gruarin,P.,Ranzani,V.,Politano,C.,Bonnal,R.J.,Provasi,E.,Sarnicola,M.L.,Panzeri,I.等人2016.《人类组织淋巴细胞的转录谱揭示了肿瘤浸润性T调节性细胞的独特性(Transcriptional Landscape of Human Tissue Lymphocytes Unveils Uniqueness of Tumor-Infiltrating T Regulatory Cells)》《免疫学》45:1135-1147。

[0409] 31.Tipton,T.R.,Mockridge,C.I.,French,R.R.,Tutt,A.L.,Cragg,M.S.和Beers,S.A.2015.《抗小鼠Fc γ RIV抗体9E9还在体内阻断Fc γ RIII (Anti-mouse Fc gamma RIV antibody 9E9 also blocks Fc gamma RIII in vivo)》《血液学》126:2643-2645。

[0410] 32.Li,F.和Ravetch,J.V.2011.《抑制性Fc γ 受体的参与驱动佐剂和激动性CD40抗体的抗肿瘤活性(Inhibitory Fc gamma receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40 antibodies)》《科学》333:1030-1034。

[0411] 33.Li,F.和Ravetch,J.V.2012.《Fc γ RIIB与激动性抗TNFR抗体共结合的一般要求(A general requirement for Fc gamma RIIB co-engagement of agonistic anti-TNFR antibodies)》《细胞周期(Cell Cycle)》11:3343-3344。

[0412] 34.Minard-Colin,V.,Xiu,Y.,Poe,J.C.,Horikawa,M.,Magro,C.M.,Hamaguchi,Y.,Haas,K.M.和Tedder,T.F.2008.《小鼠CD20免疫治疗期间的淋巴瘤消耗由巨噬细胞Fc γ RI、Fc γ RIII和Fc γ RIV介导(Lymphoma depletion during CD20 immunotherapy in mice is mediated by macrophage Fc gamma RI, Fc gamma RIII, and Fc gamma RIV)》《血液学》112:1205-1213。

[0413] 35.Gros,A.,Robbins,P.F.,Yao,X.,Li,Y.F.,Turcotte,S.,Tran,E.,Wunderlich,J.R.,Mixon,A.,Farid,S.,Dudley,M.E.等人2014.《PD-1识别患者特异性CD8 (+) 肿瘤反应性浸润性人类肿瘤组库(PD-1 identifies the patient-specific CD8 (+) tumor-reactive repertoire infiltrating human tumors)》《临床研究杂志》124:2246-

2259。

[0414] 36.Curti,B.D.,Kovacsics-Bankowski,M.,Morris,N.,Walker,E.,Chisholm,L.,Floyd,K.,Walker,J.,Gonzalez,I.,Meeuwsen,T.,Fox,B.A.等人2013.《OX40是晚期癌症患者中的有效免疫刺激性靶标(OX40 is a potent immune-stimulating target in late-stage cancer patients)》《Cancer Res(癌症研究)》73:7189-7198。

[0415] 37.Sharma,P.,Wagner,K.,Wolchok,J.D.和Allison,J.P.2011.《具有生存益处的新型癌症免疫疗法药剂:近期成功与下一步(Novel cancer immunotherapy agents with survival benefit:recent successes and next steps)》《癌症自然评论(Nat Rev Cancer)》11:805-812。

[0416] 38.Segal,N.H.,Gopal,A.K.,Bhatia,S.,Kohrt,H.,Levy,R.,Pishvaian,M.J.,Houot,R.,Bartlett,N.,Nghiem,N.,Kronenberg,S.A.等人2014.《PF-05082566(抗4-1BB)在晚期癌症患者中的第1阶段研究(A phase 1 study of PF-05082566(anti-4-1BB) in patients with advanced cancer)》《临床肿瘤学杂志(J Clin Oncol)》32:补充;摘要3007。

[0417] 39.Molckovsky,A.和Siu,L.L.2008.《首创人类中的靶向药剂的第一阶段结果:2008年美国临床肿瘤学会会议的集锦(First-in-class,first-in-human phase I results of targeted agents:highlights of the 2008American society of clinical oncology meeting)》《血液学与肿瘤学杂志(J Hematol Oncol)》1:20。

[0418] 40.Furness,A.J.,Vargas,F.A.,Peggs,K.S.和Quezada,S.A.2014.《肿瘤微环境和Fc受体对免疫调节性抗体活性的影响(Impact of tumour microenvironment and Fc receptors on the activity of immunomodulatory antibodies)》《免疫学趋势(Trends Immunol)》35:290-298。

[0419] 41.Lode,H.N.,Xiang,R.,Varki,N.M.,Dolman,C.S.,Gillies,S.D.和Reisfeld,R.A.1997.《用于转移至骨髓的自发性神经母细胞瘤的靶向白介素2疗法(Targeted interleukin-2 therapy for spontaneous neuroblastoma metastases to bone marrow)》《美国国立癌症研究所杂志(J Natl Cancer Inst)》89:1586-1594。

[0420] 42.Curran,M.A.和Allison,J.P.2009.《表达flt3配体的肿瘤疫苗与ctla-4阻断协同作用以排斥预植入的肿瘤(Tumor vaccines expressing flt3 ligand synergize with ctla-4 blockade to reject preimplanted tumors)》《Cancer Res》69:7747-7755。

[0421] 43.Moore MW,Carbone FR和Bevan MJ.《将可溶性蛋白引入抗原加工和呈递的I类途径(Introduction of soluble protein into the class I pathway of antigen processing and presentation)》《细胞学(Cell.)》1988;54(6):777-85。

[0422] 44.French,R.R.,Chan,H.T.,Tutt,A.L.和Glennie,M.J.1999.《CD40抗体引起细胞毒性T细胞应答,从而消除淋巴瘤并绕过T细胞辅助(CD40 antibody evokes a cytotoxic T-cell response that eradicates lymphoma and bypasses T-cell help)》《自然医学(Nat Med)》5:548-553。

[0423] 45.Beers,S.A.,French,R.R.,Chan,H.T.,Lim,S.H.,Jarrett,T.C.,Vidal,R.M.,Wijayaweera,S.S.,Dixon,S.V.,Kim,H.,Cox,K.L.等人2010.《抗原调节限制抗CD20抗体的功效:对抗体选择的影响(Antigenic modulation limits the efficacy of anti-CD20

antibodies: implications for antibody selection)》《血液学》115:5191-5201。

[0424] 46.Lim,S.H., Vaughan,A.T., Ashton-Key,M., Williams,E.L., Dixon,S.V., Chan, H.T., Beers,S.A., French,R.R., Cox,K.L., Davies,A.J.等人2011.《靶B细胞上的Fc γ 受体 IIb促进利妥昔单抗内化并降低临床疗效 (Fc gamma receptor IIb on target B cells promotes rituximab internalization and reduces clinical efficacy)》《血液学》118:2530-2540。

[0425] 47.Buchan,S.L.和Al-Shamkhani,A.2012.《人类CD30细胞内结构域中的不同基序差异性激活规范和替代性转录因子NF- κ B信号传导 (Distinct motifs in the intracellular domain of human CD30 differentially activate canonical and alternative transcription factor NF-kappaB signaling)》《公共科学图书馆期刊 (PLoS One)》7:e45244。

[0426] 48.Curran,M.A., Kim,M., Montalvo,W., Al-Shamkhani,A.和Allison,J.P.2011.《结合CTLA-4阻断和4-1BB激活可通过增加T细胞浸润、增殖和细胞因子产生来增强肿瘤排斥反应 (Combination CTLA-4 blockade and 4-1BB activation enhances tumor rejection by increasing T-cell infiltration, proliferation, and cytokine production)》《公共科学图书馆期刊》6:e19499。

[0427] 49.Dahan R,Barnhart BC,Li F,Yamniuk AP,Korman AJ,Ravetch JV.《拮抗人类抗CD40单克隆抗体的治疗活性需要选择性Fc γ R的参与 (Therapeutic Activity of Agonistic, Human Anti-CD40 Monoclonal Antibodies Requires Selective Fc γ R Engagement)》《癌细胞 (Cancer Cell)》2016年6月13日;29 (6):820-31.doi:10.1016/j.ccr.2016.05.001.Epub 2016年6月2日。PMID:27265505。

[0428] 50.Arce Vargas F,Furness AJS,Solomon I,Joshi K,Mekkaoui L,Lesko MH, Miranda Rota E,Dahan R,Georgiou A,Sledzinska A,Ben Aissa A,Franz D,Werner Sunderland M,Wong YNS,Henry JY,O'Brien T,Nicol D,Challacombe B,Beers SA; Melanoma TRACERx Consortium;Renal TRACERx Consortium;Lung TRACERx Consortium, Turajlic S,Gore M,Larkin J,Swanton C,Chester KA,Pule M,Ravetch JV,Marafioti T,Peggs KS,Quezada SA.《经Fc优化的抗CD25消耗肿瘤浸润性调节性T细胞,并与PD-1阻断协同作用以根除已建立的肿瘤 (Fc-Optimized Anti-CD25 Depletes Tumor-Infiltrating Regulatory T Cells and Synergizes with PD-1 Blockade to Eradicate Established Tumors)》《免疫 (Immunity)》2017年4月18日;46 (4):577-586.doi:10.1016/j.jimmuni.2017.03.013.Epub 2017年4月11日。PMID:28410988

[0429] 51.Römer PS1,Berr S,Avota E,Na SY,Battaglia M,ten Berge I,Einsele H,Hünig T;《在高细胞密度下对PBMC进行预培养会增加T细胞应答的敏感性,从而揭示了CD28超激动剂TGN1412释放的细胞因子 (Pretreatment of PBMCs at high cell density increases sensitivity of T-cell responses, revealing cytokine release by CD28 superagonist TGN1412)》《血液学》2011年12月22日;118 (26):6772-82.doi:10.1182/blood-2010-12-319780.Epub 2011Sep 19.

序列表

<110> 生物发明国际公司 (BioInvent International AB)
癌症研究科技有限公司 (Cancer Research Technology Limited)

<120> 新型抗体以及TREG消耗性抗体和免疫刺激性抗体的组合使用

<130> BI82

<150> GB1712032.0

<151> 2017-07-26

<160> 188

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

Phe Ser Ser Asn Glu Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
1 5 10

[0001] <210> 2

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2

Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
1 5 10

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 3

Ala Arg Asp Arg Met Val Arg Gly Val Ser Asn Trp Phe Asp Pro
1 5 10 15

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 4

Cys Thr Gly Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val Asn

1

5

10

15

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 5

Gly Asn Phe Asn Arg Pro Ser
 1 5

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 6

Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Arg Leu Ser Gly Ser Val
 1 5 10

<210> 7

<211> 122

<212> PRT

[0002] <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 7

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Asn
 20 25 30

Glu Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Trp Asn Ser Gly Ser Ile Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Arg Met Val Arg Gly Val Ser Asn Trp Phe Asp Pro Trp

100

105

110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 8
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 8

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
 20 25 30

Tyr Asp Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Phe Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

[0003]

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Arg
 85 90 95

Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 9
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 9

Phe Thr Phe Gly Asp Tyr Ala Val Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly
 1 5 10 15

<210> 10
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 10

Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Pro Val Lys Gly Arg
1 5 10

<210> 11

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 11

Ala Arg Asn Tyr Gly Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 12

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 12

Cys Thr Gly Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
1 5 10 15

[0004]

<210> 13

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 13

Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Thr Asn Asn Arg Pro Ser
1 5 10 15

<210> 14

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 14

Cys Ala Ala Trp Asp Gly Ser Leu Ser Gly Arg Val
1 5 10

<210> 15

<211> 121

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 15

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Gly Asp Tyr
 20 25 30

Ala Val Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ile Val Ser Gly Ser Gly Thr Ile Thr Asp Tyr Ala Asp Pro Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asn Tyr Gly Gly Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly
 100 105 110

[0005] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 16
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 16

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
 20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Thr Asn Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu

65

70

75

80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Gly Ser
 85 90 95

Leu Ser Gly Arg Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 17

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 17

Phe Ser Ser Asn Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 1 5 10

<210> 18

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 18

[0006]

Ser Ser Ile Ser Ser Gly Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly Arg

<210> 19

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 19

Ala Lys Glu Pro Pro Ala Tyr Arg Glu Gly Ile Asp Tyr
 1 5 10

<210> 20

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 20

Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Ala Asn Asn Tyr Val Ser
 1 5 10

<210> 21
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 21

Asp Asn Thr Asn Arg Pro Ser
 1 5

<210> 22
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 22

Cys Ala Ser Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Pro Val
 1 5 10

<210> 23
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

[0007] <400> 23

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Asn
 20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Gly Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ile Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Lys Glu Pro Pro Ala Tyr Arg Glu Gly Ile Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 24
<211> 111
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 24

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Ala Asn Asn
20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Asp Asn Thr Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

[0008] Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Pro Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 25
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 25

Phe Ser Ser Tyr Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
1 5 10

<210> 26
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 26

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Met
1 5 10 15

Lys Gly Arg

<210> 27

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 27

Ala Arg Asp Ser Tyr Leu Gly Trp Cys Pro Ala Gly Ser Cys Thr Gly
1 5 10 15

Ile Asp Tyr

<210> 28

<211> 14

[0009] <212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 28

Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Ala Val Asn
1 5 10

<210> 29

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 29

Tyr Asp Asp Leu Leu Pro Ser
1 5

<210> 30

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 30

Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Trp Val
1 5 10

<210> 31
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 31

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Met
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

[0010] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Ser Tyr Leu Gly Trp Cys Pro Ala Gly Ser Cys Thr Gly
 100 105 110

Ile Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120 125

<210> 32
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 32

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30

Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Tyr Asp Asp Leu Leu Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 33

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 33

Phe Ser Asn Tyr Val Leu Thr Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly
1 5 10

[0011] <210> 34

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 34

Ser Gly Ser Gly Tyr Asn Thr Tyr His Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg
1 5 10 15

<210> 35

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 35

Ala Arg Ala Ala Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Ala Asp Ala Phe Asp Ile
1 5 10 15

<210> 36

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 36

Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Tyr Val Tyr
 1 5 10

<210> 37
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 37

Gly Asp Asn Arg Arg Pro Ser
 1 5

<210> 38
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 38

Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Trp Val
 1 5 10

[0012] <210> 39
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 39

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Tyr
 20 25 30

Val Leu Thr Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Tyr Asn Thr Tyr His Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Ala Ala Tyr Asp Ser Ser Gly Tyr Ala Asp Ala Phe Asp Ile
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 40
<211> 111
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 40

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

[0013] Ile Tyr Gly Asp Asn Arg Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Asn Gly Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 41
<211> 24
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 41

Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Tyr Met
1 5 10 15

Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
20

<210> 42
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 42

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Ala
 1 5 10 15

Thr Gly Arg

<210> 43
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 43

Ala Lys Glu Glu Arg Ile Gly Thr Tyr Tyr Tyr
 1 5 10

[0014] <210> 44
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 44

Cys Ser Gly Ser Ser Phe Asn Ile Gly Ser Asn Tyr Val Tyr
 1 5 10

<210> 45
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 45

Lys Asn Asn Gln Arg Pro Ser
 1 5

<210> 46
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 46

Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Gln Val
1 5 10

<210> 47
<211> 118
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 47

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Asn Ile Lys Gln Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Gly Asp Ser Ala
50 55 60

[0015] Thr Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Glu Glu Arg Ile Gly Thr Tyr Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 48
<211> 111
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 48

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Phe Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Lys Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

Asn Gly Gln Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 49

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 49

[0016] Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Thr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly
 1 5 10

<210> 50

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 50

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly Arg

<210> 51

<211> 22

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 51

Ala Ser Thr Gln Thr Pro Tyr Gly Ser Gly Asn Tyr Pro Ile Tyr Tyr
 1 5 10 15

Tyr Tyr Gly Met Asp Val
20

<210> 52
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 52

Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Arg Ser Asn Ser Val Ser
1 5 10

<210> 53
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 53

Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser
1 5

[0017] <210> 54
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 54

Cys Gly Thr Trp Asp Asp Arg Leu Asn Arg Pro Val
1 5 10

<210> 55
<211> 129
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 55

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Thr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Ser Thr Gln Thr Pro Tyr Gly Ser Gly Asn Tyr Pro Ile Tyr Tyr
100 105 110

Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser
115 120 125

Ser

<210> 56

<211> 111

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

[0018]

<400> 56

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Arg Ser Asn
20 25 30

Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Asp Arg Leu
85 90 95

Asn Arg Pro Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 57
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 57

Phe Ser Ser Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly
 1 5 10

<210> 58
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 58

Ser Ala Ile Asn Ala Ala Gly Asp Phe Gln Ser Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Arg Gly Arg

[0019] <210> 59
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 59

Ala Arg Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Phe Asp Ile
 1 5 10

<210> 60
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 60

Cys Ser Gly Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Tyr Val Tyr
 1 5 10

<210> 61
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 61

Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 62
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 62

Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Leu Val
1 5 10

<210> 63
<211> 118
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 63

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

[0020]

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Asn Ala Ala Gly Asp Phe Gln Ser Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Gly Asp Gly Tyr Asn Tyr Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 64
<211> 111
<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 64

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

Tyr Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu
85 90 95

[0021]

Ser Gly Leu Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 65

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 65

Phe Ser Arg Tyr Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
1 5 10

<210> 66

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 66

Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly Arg

<210> 67
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 67

Ala Arg His Arg Asn Pro Asp Pro Leu Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5 10

<210> 68
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 68

Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
 1 5 10 15

<210> 69
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

[0022] <400> 69

Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser
 1 5

<210> 70
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 70

Cys Ala Ser Tyr Thr Ser Ile Ser Thr Val Leu
 1 5 10

<210> 71
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 71

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr

20

25

30

Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg His Arg Asn Pro Asp Pro Leu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

[0023] <210> 72
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)
 <400> 72

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
 20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Leu Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Thr Ser Ile
 85 90 95

Ser Thr Val Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 73
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 73

Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
1 5 10

<210> 74
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 74

Ser Gly Ile Asn Gly Tyr Gly Asp Thr Pro Lys Asp Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly Arg

[0024]

<210> 75
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 75

Ala Thr Leu Tyr Cys Gly Gly Gly Cys Tyr Pro Asp Ser
1 5 10

<210> 76
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 76

Cys Thr Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
1 5 10 15

<210> 77
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 77

Asp Tyr Asp Glu Gln Pro Ser
1 5

<210> 78
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 78

Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Val Val
1 5 10

<210> 79
<211> 121
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 79

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

[0025]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Asn Gly Tyr Gly Asp Thr Pro Lys Asp Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Thr Leu Tyr Cys Gly Gly Gly Cys Tyr Pro Asp Ser Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 80
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 80

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Arg Ser Asn Ile Gly Ala Gly
 20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Leu Ile Tyr Asp Tyr Asp Glu Gln Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

[0026] Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser
 85 90 95

Leu Asn Gly Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 81
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 81

Phe Ser Gly Tyr Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 1 5 10

<210> 82
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 82

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly Arg

<210> 83
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 83

Thr Ser Ser Asn Pro Phe Tyr Gly Met Asp Val
 1 5 10

<210> 84
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 84

Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser
 1 5 10

[0027] <210> 85
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 85

Tyr Asp Asp Leu Leu Pro Ser
 1 5

<210> 86
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 86

Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Gly Val
 1 5 10

<210> 87
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 87

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
 20 25 30

Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Ser Ser Asn Pro Phe Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

[0028]

<210> 88
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 88

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
 20 25 30

Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Tyr Asp Asp Leu Leu Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Asn Gly Gly Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 89
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 89

Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
1 5 10

<210> 90
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 90

Ser Ser Ile Thr Gly Thr Ala Gly Leu Thr Tyr Asn Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

[0029]

Lys Gly Arg

<210> 91
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 91

Ala Arg Met Asp Trp Gly Tyr Gly Asn Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 92
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 92

Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Tyr Thr Val Asn
1 5 10

<210> 93

<211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 93

Gly Asn Asn Asn Arg Pro Ser
 1 5

<210> 94
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 94

Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Pro Val
 1 5 10

<210> 95
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 95

[0030] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Thr Gly Thr Ala Gly Leu Thr Tyr Asn Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Met Asp Trp Gly Tyr Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 96
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 96

Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln
1				5				10				15			

Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Ser	Gly	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Ser	Tyr
				20				25				30		

Thr	Val	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Leu	Pro	Gly	Thr	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu
					35			40				45			

Ile	Tyr	Gly	Asn	Asn	Asn	Arg	Pro	Ser	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser
			50			55					60				

Gly	Ser	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Ala	Ser	Leu	Ala	Ile	Ser	Gly	Leu	Arg
65				70					75				80		

[0031]

Ser	Glu	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Thr	Trp	Asp	Asp	Ser	Leu
			85					90				95			

Ser	Gly	Pro	Val	Phe	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	
			100				105				110			

<210> 97
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 97

Phe	Ser	Asp	Tyr	Glu	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	
1				5				10						

<210> 98
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 98

Ala	Val	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Ser	Asn	Lys	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

1

5

10

15

Lys Gly Arg

<210> 99

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 99

Ala Ala Asn Ser Pro Phe Asp Pro
1 5

<210> 100

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 100

Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
1 5 10 15

[0032]

<210> 101

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 101

Asn Asp Asn Val Arg Pro Ser
1 5

<210> 102

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 102

Cys Ala Ala Trp Asp Ala Asn Leu Ser Gly Trp Val
1 5 10

<210> 103

<211> 115

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 103

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ala Asn Ser Pro Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

[0033] Val Ser Ser
 115

<210> 104
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 104

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
 20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Leu Ile Tyr Asn Asp Asn Val Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu

65

70

75

80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Ala Asn
 85 90 95

Leu Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 105

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 105

Phe Ser Ser Tyr Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 1 5 10

<210> 106

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 106

[0034]

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly Arg

<210> 107

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 107

Ala Ala Asn Ser Pro Phe Asp Pro
 1 5

<210> 108

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 108

Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
 1 5 10 15

<210> 109
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 109

Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser
 1 5

<210> 110
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 110

Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Trp Val
 1 5 10

<210> 111
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

[0035] <400> 111

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Ala Asn Ser Pro Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 112
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 112

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Phe Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

[0036] Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser
85 90 95

Leu Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 113
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 113

Phe Asp Asn His Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
1 5 10

<210> 114
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 114

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly Arg

<210> 115

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 115

Ala Arg Glu Asp Trp Ser Phe Asp Leu
1 5

<210> 116

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 116

[0037] Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Ala Val Asn
1 5 10

<210> 117

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 117

Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 118

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 118

Cys Gln Thr Phe Asp Val Ser Gln Asn Ala Trp Val
1 5 10

<210> 119

<211> 116

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 119

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asn His
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Ser Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

[0038] Ala Arg Glu Asp Trp Ser Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 120

<211> 111

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 120

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn
20 25 30

Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Thr Phe Asp Val Ser Gln
85 90 95

Asn Ala Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 121

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 121

Phe Ser Asn Ser Asp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
1 5 10

<210> 122

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

[0039]

<400> 122

Ser Ala Ile Ser Asn Ser Gly Asp Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly Arg

<210> 123

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 123

Arg Glu Lys Thr Trp Gly Ala Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 124

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 124

Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
 1 5 10 15

<210> 125

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 125

Ser Gln Asn Leu Arg Pro Ser
 1 5

<210> 126

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 126

Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Ser Val
 1 5 10

<210> 127

<211> 119

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 127

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ser
 20 25 30

Asp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Asn Ser Gly Asp Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Lys Thr Trp Gly Ala Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 128
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 128

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

[0041] Leu Ile Tyr Ser Gln Asn Leu Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
85 90 95

Leu Ser Gly Ser Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 129
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 129

Phe Ser Asp Tyr Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
1 5 10

<210> 130
<211> 19

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 130

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly Arg

<210> 131

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 131

Ala Arg Gly Gly Gly Tyr Trp Pro Phe Asp Pro
1 5 10

<210> 132

<211> 14

<212> PRT

[0042] <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 132

Cys Ser Gly Ser Ser Ser Thr Ile Gly Asn Asn Ala Ile Asn
1 5 10

<210> 133

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 133

Arg Asp Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 134

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 134

Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Arg Val Val Val
1 5 10

<210> 135
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 135

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
 20 25 30

Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

[0043] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Gly Gly Tyr Trp Pro Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 136
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 136

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Thr Ile Gly Asn Asn
 20 25 30

Ala Ile Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Arg Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu
 85 90 95

Arg Val Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 137

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 137

Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 1 5 10

[0044] <210> 138

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 138

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly Arg

<210> 139

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 139

Val Arg Gly Thr Ser Leu Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5 10

<210> 140

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 140

Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Thr Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 141

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 141

Tyr Asp Asp Leu Leu Pro Ser
1 5

<210> 142

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 142

[0045] Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Val Val
1 5 10

<210> 143

<211> 118

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 143

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Gly Thr Ser Leu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 144
<211> 111
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 144

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Thr
20 25 30

[0046] Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Tyr Asp Asp Leu Leu Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 145
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 145

Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly
1 5 10

<210> 146
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 146

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Ser Tyr Ala Asp Ser Met
 1 5 10 15

Lys Gly Arg

<210> 147
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 147

Ala Thr Ser Glu Ala Ala Ala Asp Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10

[0047] <210> 148
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 148

Cys Thr Gly Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
 1 5 10 15

<210> 149
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 149

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
 1 5

<210> 150
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 150

Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val

1	5	10														
<210> 151																
<211> 120																
<212> PRT																
<213> 智人 (Homo sapiens)																
<400> 151																
Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly	
1				5						10				15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr	
								20			25			30		
Tyr	Met	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	
								35			40			45		
Ser	Ser	Ile	Ser	Ser	Ser	Ser	Tyr	Ile	Ser	Tyr	Ala	Asp	Ser	Met		
								50			55			60		
Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	
[0048]								65			75			80		
Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	
								85			90			95		
Ala	Thr	Ser	Glu	Ala	Ala	Ala	Ala	Asp	Tyr	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	
								100			105			110		
Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser									
								115			120					
<210>	152															
<211>	112															
<212>	PRT															
<213>	智人 (Homo sapiens)															
<400>	152															
Gln	Ser	Val	Leu	Thr	Gln	Pro	Pro	Ser	Ala	Ser	Gly	Thr	Pro	Gly	Gln	
1				5						10			15			
Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Cys	Thr	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Ala	Gly	
								20			25			30		

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser
 85 90 95

Leu Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 153

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 153

[0049] Phe Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 1 5 10

<210> 154

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 154

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly Arg

<210> 155

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 155

Thr Arg Pro Leu Lys Asp Asp Pro Asp Ala Phe Asp Ile
 1 5 10

<210> 156
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 156

Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Tyr Ala Val Asn
 1 5 10

<210> 157
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 157

Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser
 1 5

<210> 158
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 158

[0050]

Cys Phe Ser Tyr Ala Gly Gly Asn Thr Trp Val
 1 5 10

<210> 159
 <211> 120
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 159

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

65

70

75

80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Arg Pro Leu Lys Asp Asp Pro Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
 100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 160
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 160

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Tyr
 [0051] 20 25 30

Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
 35 40 45

Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Phe Ser Tyr Ala Gly Gly Asn
 85 90 95

Thr Trp Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 161
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 161

Met Lys Cys Ser Trp Val Met Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
1 5 10 15

Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile
35 40 45

Lys Asp Ser Tyr Met Tyr Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Tyr Pro Ala Asn Gly Asp Thr Lys Tyr Asp
65 70 75 80

Pro Lys Phe Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
85 90 95

Thr Ala Tyr Leu Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Thr Ala Val
100 105 110

[0052] Tyr Tyr Cys Thr Arg Gly Tyr Gly Ser Asn Phe Phe Asp Tyr Trp Gly
115 120 125

Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 162
<211> 131
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 162

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Leu Gly Gln Arg Thr Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
35 40 45

Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
65 70 75 80

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Ile Lys
130

<210> 163

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 163

[0053] Phe Ser Ser Tyr Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
1 5 10

<210> 164

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 164

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Ala Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly Arg

<210> 165

<211> 21

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 165

Ala Thr Tyr Pro Lys Glu Lys Thr Leu His Gly Gly Arg Tyr Pro Tyr
1 5 10 15

Tyr Gly Leu Asp Leu
20

<210> 166
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 166

Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn
1 5 10

<210> 167
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 167

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Leu
1 5

[0054] <210> 168
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 168

Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Pro Val
1 5 10

<210> 169
<211> 121
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 169

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Ser Thr Gly Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Arg Asn Pro Asp Pro Leu Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 170

<211> 111

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 170

[0055] Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ser Tyr Thr Ser Ile
85 90 95

Ser Thr Val Leu Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 171

<211> 13
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 171

Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 1 5 10

<210> 172
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 172

Ala His Thr Asn Glu Asp Gly Ser Asp Lys Lys Tyr Val Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly Arg

[0056] <210> 173
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 173

Ala Arg Asp Gly Ser Gly Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Phe Asp Tyr
 1 5 10 15

<210> 174
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 174

Cys Thr Gly Thr Thr Ser Asn Leu Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
 1 5 10 15

<210> 175
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 175

Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 1 5 10

<210> 176
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 176

Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Ala Leu Val
 1 5 10

<210> 177
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 177

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 [0057] 35 40 45

Ala His Thr Asn Glu Asp Gly Ser Asp Lys Lys Tyr Val Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Gly Ser Gly Tyr Ser Ser Gly Trp Tyr Phe Asp Tyr Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 178
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 178

Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
 1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Thr Thr Ser Asn Leu Gly Ala Gly
 20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Leu Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
 50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
 65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser
 85 90 95

Leu Ser Ala Leu Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

[0058]

<210> 179

<211> 1422

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 嵌合序列；来自小家鼠和褐家鼠

<400> 179

aagcttcagg acctcaccat ggagatctgg ctcagcttgg tttccttgt cctttcata 60

aaaggtgtcc agtgtgaggt gcagctggtg gagtctggtg gaggcttagt gcagcctgga 120

aggtccctga aactctcctg tgccgcctca ggattcaactt tcagtaactt tggcatggcc 180

tgggtctgcc aggctccaac gacggggctg gagtgggtcg caaccattag ttatgtatgt 240

actgacagtt actatcgaga ctccgtgaag gaccgattca ctatctccag agataatgca 300

aaaagcaccc tatacctgca aatggacagt ctgaggtctg aggacacggc cgcttattac 360

tgtgtaagac atgaggatgt atactacgga atggggtaact ttgatcaactg gggccaagga 420

gtactagtcg cagtctccctc agccaaaacg acacccccc ctgtctatcc actggccct 480

ggatctgctg cccaaactaa ctccatggtg accctggat gcctggtaa gggctatttc 540

cctgagccag tgacagtgac ctggaactct gttccctgt ccagcggtgt gcacaccc 600

ccagctgtcc tgcagtcgta cctctacact ctgaggcagct cagtgactgt cccctccagc	660
acctggccca gcgagaccgt cacctgcaac gttgccacc cggccagcag caccaaggtg	720
gacaagaaaa ttgtgcccgag ggattgtggt tgtaagcctt gcatatgtac agtcccagaa	780
gtatcatctg tcttcatctt ccccccaaag cccaaggatg tgctcaccat tactctgact	840
cctaaggta cgtgttgtgt ggttagacatc agcaaggatg atcccgaggt ccagttcagc	900
tggttttagt atgatgtgga ggtgcacaca gctcagacgc aaccccgaaa ggagcagttc	960
aacagcactt tccgctcagt cagtgaactt cccatcatgc accaggactg gctcaatggc	1020
aaggagttca aatgcagggt caacagtgca gctttccctg ccccatcga gaaaaccatc	1080
tccaaaacca aaggcagacc gaaggctcca caggtgtaca ccattccacc tcccaaggag	1140
cagatggcca aggataaagt cagtctgacc tgcatgataa cagacttctt ccctgaagac	1200
attactgtgg agtggcagtg gaatggcag ccagcggaga actacaagaa cactcagccc	1260
atcatggaca cagatggcgc ttacttcgac tacagcaagc tcaatgtgca gaagagcaac	1320
tggaggcag gaaatacttt cacctgctct gtgttacatg agggcctgca caaccaccat	1380
actgagaaga gcctctccca ctctcctggt aaatgagaat tc	1422

[0059]

<210> 180
 <211> 465
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>
 <223> 嵌合序列；来自小家鼠和褐家鼠

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(19)
 <223> 残基1-19形成前导序列

<400> 180

Met Glu Ile Trp Leu Ser Leu Val Phe Leu Val Leu Phe Ile Lys Gly
 1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
 20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45

Ser Asn Phe Gly Met Ala Trp Val Cys Gln Ala Pro Thr Thr Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asp Ser Tyr Tyr Arg
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ala
100 105 110

Tyr Tyr Cys Val Arg His Glu Asp Val Tyr Tyr Gly Met Gly Tyr Phe
115 120 125

Asp His Trp Gly Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr
130 135 140

Thr Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr
145 150 155 160

[0060]

Asn Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His
180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser
195 200 205

Val Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn
210 215 220

Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro
225 230 235 240

Arg Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser
245 250 255

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr
260 265 270

Leu Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp
275 280 285

Pro Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr
290 295 300

Ala Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser
305 310 315 320

Val Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
325 330 335

Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys
340 345 350

Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr
355 360 365

Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr
370 375 380

[0061] Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln
385 390 395 400

Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met
405 410 415

Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Val Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys
420 425 430

Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu
435 440 445

Gly Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly
450 455 460

Lys
465

<210> 181
<211> 1440
<212> DNA
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 嵌合序列；来自小家鼠和褐家鼠

<400> 181

aagcttcagg acctcaccat ggagatctgg ctcagcttgg tttccttgt cctttcata	60
aaaggtgtcc agtgtgaggt gcagctggtg gagtctggtg gaggcttagt gcagcctgga	120
aggtccctga aactctcctg tgccgcctca ggattcactt tcagtaactt tggcatggcc	180
tgggtctgcc aggctccaac gacggggctg gagtgggtcg caaccattag ttatgatggt	240
actgacagtt actatcgaga ctccgtgaag gaccgattca ctatctccag agataatgca	300
aaaagcaccc tatacctgca aatggacagt ctgaggtctg aggacacggc cgcttattac	360
tgtgtaagac atgaggatgt atactacgga atgggtact ttgatcaactg gggccaagga	420
gtactagtca cagtctcctc agccaaaacg acagccccat cggcttatcc actggcccct	480
gtgtgtggag atacaactgg ctccctggtg actctaggat gcctggtaa gggttatttc	540
cctgagccag tgaccttgac ctggaactct ggatccctgt ccagtggtgt gcacacccctc	600
ccagctgtcc tgcagcttga cctctacacc ctcagcagct cagtgactgt aacctcgagc	660
acctggccca gccagtcac cacctgcaat gtggccacc cggcaagcag caccaaggtg	720
[0062] gacaagaaaa ttgagcccag agggccaca atcaaggccct gtccctccatg caaatgccc	780
gcacctaacc tcttgggtgg accatccgtc ttcatcttcc ctccaaagat caaggatgta	840
ctcatgatct ccctgagccc catagtcaca tgtgtggtg tggatgtgag cgaggatgac	900
ccagatgtcc agatcagctg gtttgtgaac aacgtggaag tacacacagc tcagacacaa	960
acccatagag aggattacaa cagtaactctc cgggtggtaa gtgcctccc catccagcac	1020
caggacttggaa tgagtggcaa ggagttcaaa tgcaaggta acaacaaaga cctccagcg	1080
cccatcgaga gaaccatctc aaaacccaaa gggtcagtaa gagtcacaca ggtatatgtc	1140
ttgcctccac cagaagaaga gatgactaag aaacaggtaa ctctgacactg catggtcaca	1200
gacttcatgc ctgaagacat ttacgtggag tggaccaaca acgggaaaac agagctaaac	1260
tacaagaaca ctgaaccagt cctggactct gatggttctt acttcatgta cagcaagctg	1320
agagtggaaa agaagaactg ggtggaaaga aatagctact cctgttcagt ggtccacgag	1380
ggtctgcaca atcaccacac gactaagagc ttctccggtaa ctccggtaa atgagaattc	1440

<210> 182

<211> 471

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 嵌合序列；来自小家鼠和褐家鼠

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(19)

<223> 残基1-19形成前导序列

<400> 182

Met	Glu	Ile	Trp	Leu	Ser	Leu	Val	Phe	Leu	Val	Leu	Phe	Ile	Lys	Gly
1				5					10				15		

Val	Gln	Cys	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln
				20				25					30		

Pro	Gly	Arg	Ser	Leu	Lys	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe
				35				40					45		

Ser	Asn	Phe	Gly	Met	Ala	Trp	Val	Cys	Gln	Ala	Pro	Thr	Thr	Gly	Leu
				50			55			60					

[0063]	Glu	Trp	Val	Ala	Thr	Ile	Ser	Tyr	Asp	Gly	Thr	Asp	Ser	Tyr	Tyr	Arg
	65				70				75					80		

Asp	Ser	Val	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Ser
				85					90				95		

Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asp	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Ala
				100				105					110		

Tyr	Tyr	Cys	Val	Arg	His	Glu	Asp	Val	Tyr	Tyr	Gly	Met	Gly	Tyr	Phe
				115				120				125			

Asp	His	Trp	Gly	Gln	Gly	Val	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr
				130			135			140					

Thr	Ala	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Val	Cys	Gly	Asp	Thr	Thr
				145			150			155				160	

Gly	Ser	Ser	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu
				165					170				175		

Pro	Val	Thr	Leu	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His

	180	185	190
Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser			
195	200	205	
Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn			
210	215	220	
Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro			
225	230	235	240
Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro			
245	250	255	
Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys			
260	265	270	
Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val			
275	280	285	
Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn			
[0064] 290	295	300	
Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr			
305	310	315	320
Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp			
325	330	335	
Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu			
340	345	350	
Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg			
355	360	365	
Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys			
370	375	380	
Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp			
385	390	395	400
Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys			
405	410	415	

Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser
 420 425 430

Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser
 435 440 445

Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser
 450 455 460

Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
 465 470

<210> 183
 <211> 723
 <212> DNA
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 183
 aagcttcagg acctcaccat ggctgcacta caactcttag ggctgctgt gctctggctc 60
 ccagccatga gatgtgacat ccagatgacc cagtctcctt cattcctgtc tgcatctgtg 120
 [0065] ggagacagag tcactctcaa ctgcaaagca agtcagaata ttaacaagta cttagactgg 180
 ttcaccaaa agctgggtga agctccaaa ctcctgtatgt ataatacaaa cagtttgcatt 240
 acggcaatcc cgtcaagggtt cagtggcagt ggatctgggtt ctgatttcac acttaccata 300
 agcagcctgc agcctgaaga ttttgcaca tatttctgct ttcagcatag cagtggtgg 360
 acgttcggtg gaggcaccaa gctggattt aaacgtacgg atgctgcacc aactgtatcc 420
 atcttcccac catccagtga gcagttaaca tctggaggtg cctcagtcgt gtgcttcttg 480
 aacaacttct accccaaaga catcaatgtc aagtggaa ttttatggcag tgaacgacaa 540
 aatggcggtcc tgaacagttt gactgatcag gacagcaaag acagcaccta cagcatgagc 600
 agcaccctca cggtgaccaa ggacgagttt gaacgacata acagctatac ctgtgaggcc 660
 acttcacaaga catcaacttc acccattgtc aagagctca acaggaatga gtgttaggaa 720
 ttc 723

<210> 184
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> 小家鼠 (Mus musculus)

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(19)

<223> 残基1-19形成前导序列

<400> 184

Met	Ala	Ala	Leu	Gln	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Leu	Leu	Trp	Leu	Pro	Ala
1				5				10					15		

Met	Arg	Cys	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Phe	Leu	Ser	Ala
				20				25					30		

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

Asn	Lys	Tyr	Leu	Asp	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Leu	Gly	Glu	Ala	Pro	Lys
					50			55			60				

Leu	Leu	Met	Tyr	Asn	Thr	Asn	Ser	Leu	His	Thr	Ala	Ile	Pro	Ser	Arg
					65			70			75		80		

Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser
[0066]					85				90			95			

Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Val	Ala	Thr	Tyr	Phe	Cys	Phe	Gln	His	Ser	Ser
					100			105			110				

Gly	Trp	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg	Thr	Asp
					115			120			125				

Ala	Ala	Pro	Thr	Val	Ser	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Gln	Leu	Thr
					130			135			140				

Ser	Gly	Gly	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Phe	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Lys
						145			150		155		160		

Asp	Ile	Asn	Val	Lys	Trp	Lys	Ile	Asp	Gly	Ser	Glu	Arg	Gln	Asn	Gly
						165			170			175			

Val	Leu	Asn	Ser	Trp	Thr	Asp	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser
						180			185			190			

Met	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Thr	Lys	Asp	Glu	Tyr	Glu	Arg	His	Asn
						195			200			205			

Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile Val
 210 215 220

Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
 225 230

<210> 185
 <211> 1431
 <212> DNA
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人IgG2区被克隆到鼠mIgG2a恒定区中，其中铰链被偏斜成激动作用增强的“B”形

<400> 185

aagcttcagg acctcaccat ggagatctgg ctcagcttgg ttttccttgt cctttcata 60

aaagggtgtcc agtgtgaggt gcagctggtg gagtctggtg gaggcttagt gcagcctgga 120

aggtccctga aactctcctg tgccgcctca ggattcaatt tcagtaactt tggcatggcc 180

tgggtctgcc aggctccaac gacggggctg gagtggtcg caaccattag ttatgtatgg 240

actgacagtt actatcgaga ctccgtgaag gaccgattca ctatctccag agataatgca 300

[0067] aaaagcaccc tatacctgca aatggacagt ctgaggatctg aggacacggc cgcttattac 360

tgtgtaagac atgaggatgt atactacgga atgggtact ttgatcactg gggccaagga 420

gtactagtca ccgtctcctc agectccacc aaggcccatt cggcttccc cctggcgccc 480

tgctccagga gcacccctcgaa gagcacagcg gccctgggt gcctggtaa ggactacttc 540

cccgAACCGG tgacgggtgc gtggaaactca ggccgtctga ccagccgggt gcacaccccttc 600

ccagctgtcc tacagtccctc aggactctac tccctcagca gcgtggtgac cgtccccctcc 660

agcaacttcg gcacccagac ctacacctgc aacgttagatc acaagccag caacaccaag 720

gtggacaaga cagttgagcg caaatgttgt gtgcagtgcc caccgtgcc agcacctaacc 780

ctcttgggtg gaccatccgt cttcatcttc cctccaaaga tcaaggatgt actcatgate 840

tccctgagcc ccatagtcac atgtgtggtg gtggatgtga gcgaggatga cccagatgtc 900

cagatcagct ggtttgtcaa caacgtggaa gtacacacag ctcagacaca aacccataga 960

gaggattaca acagttactt ccgggtggtc aatgcctcc ccatccagca ccaggactgg 1020

atgagttggca aggagttcaa atgcaagggtc aacaacaaag acctcccagc gcccatcgag 1080

agaaccatct caaaaacccaa agggtcagta agagctccac aggttatatgt ctgcctcca 1140

ccagaagaag agatgactaa gaaacaggc actctgacct gcatggtcac agacttcatg	1200
cctgaagaca tttacgtgga gtggaccaac aacggaaaaa cagagctaaa ctacaagaac	1260
actgaaccag tcctggactc tgatggttct tacttcatgt acagcaagct gagagtggaa	1320
aagaagaact gggtgaaag aaatagctac tcctgttcag tggcacga gggctgcac	1380
aatcaccaca cgactaagag cttcccgg actccggta aatgagaatt c	1431

<210> 186

<211> 468

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 人IgG2区被克隆到鼠mIgG2a恒定区中，其中铰链被偏斜成激动作用增强的“B”形

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(19)

<223> 残基1-19形成前导序列

<400> 186

[0068] Met Glu Ile Trp Leu Ser Leu Val Phe Leu Val Leu Phe Ile Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Arg Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Ser Asn Phe Gly Met Ala Trp Val Cys Gln Ala Pro Thr Thr Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Asp Ser Tyr Tyr Arg
65 70 75 80

Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asp Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ala
100 105 110

Tyr Tyr Cys Val Arg His Glu Asp Val Tyr Tyr Gly Met Gly Tyr Phe
115 120 125

Asp His Trp Gly Gln Gly Val Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
130 135 140

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser
145 150 155 160

Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu
165 170 175

Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His
180 185 190

Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser
195 200 205

Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys
210 215 220

Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu
225 230 235 240

[0069]

Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu
245 250 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu
260 265 270

Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
275 280 285

Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu
290 295 300

Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr
305 310 315 320

Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser
325 330 335

Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Ala Pro
340 345 350

Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln
 355 360 365

Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val
 370 375 380

Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val
 385 390 395 400

Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu
 405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg
 420 425 430

Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val
 435 440 445

Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg
 450 455 460

[0070]

Thr Pro Gly Lys
 465

<210> 187

<211> 723

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 187

aagcttcagg acctcaccat ggctgcacta caactcttag ggctgtgtct gctctggctc 60

ccagccatga gatgtgacat ccagatgacc cagtcctctt cattcctgtc tgcatacgat 120

ggagacagag tcactctcaa ctgcaaagca agtcagaata ttaacaagta cttagactgg 180

tatcagcaaa agctgggtga agctccaaa ctcctgtatgt ataatacaaa cagtttgcat 240

acggcaatcc cgtcaagggtt cagtggcagt ggatctgggtt ctgatttcac acttaccata 300

agcagcctgc agcctgaaga ttttgcaca tatttctgtt ttcagcatag cagttgggtgg 360

acgttcggtg gaggcaccaa gctggattt aaacgtacgg tggctgcacc atctgtttc 420

atcttcccgc catctgtatgt gcagttgaaa tctggactg cctctgttgt gtgcctgttg 480

aataacttct atcccaagaga gccaagatgt cagtggagg tggataaacgc cctccaatcg 540

ggtaactccc	aggagagtgt	cacagagcag	gacagcaagg	acagcaccta	cagcctcagc	600
agcaccctga	cgctgagcaa	agcagactac	gagaaacaca	aagtctacgc	ctgcgaagtc	660
acccatcagg	gcctgagctc	gcccgtcaca	aagagttca	acaggggaga	gtgttgagaa	720
ttc						723

<210> 188
 <211> 232
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<220>
 <221> MISC_FEATURE
 <222> (1)..(19)
 <223> 残基1-19形成前导序列

<400> 188

Met Ala Ala Leu Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Pro Ala
 1 5 10 15

Met Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala
 [0071] 20 25 30

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

Asn Lys Tyr Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Leu Gly Glu Ala Pro Lys
 50 55 60

Leu Leu Met Tyr Asn Thr Asn Ser Leu His Thr Ala Ile Pro Ser Arg
 65 70 75 80

Phe Ser Gly Ser Gly Ser Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 85 90 95

Leu Gln Pro Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys Phe Gln His Ser Ser
 100 105 110

Gly Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val
 115 120 125

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

Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg
145 150 155 160

Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn
165 170 175

Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser
180 185 190

[0072]

Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys
195 200 205

Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
210 215 220

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230

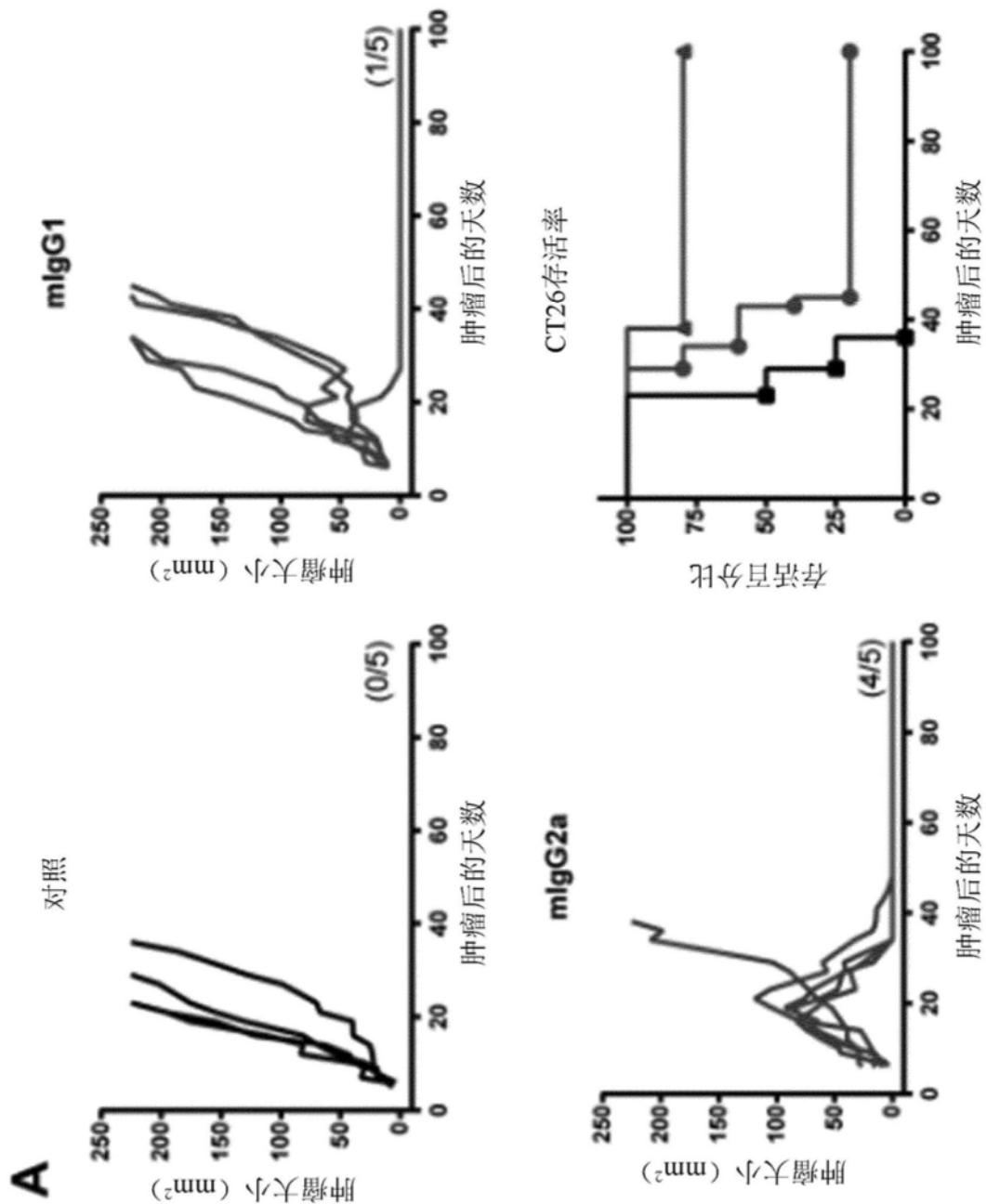


图1

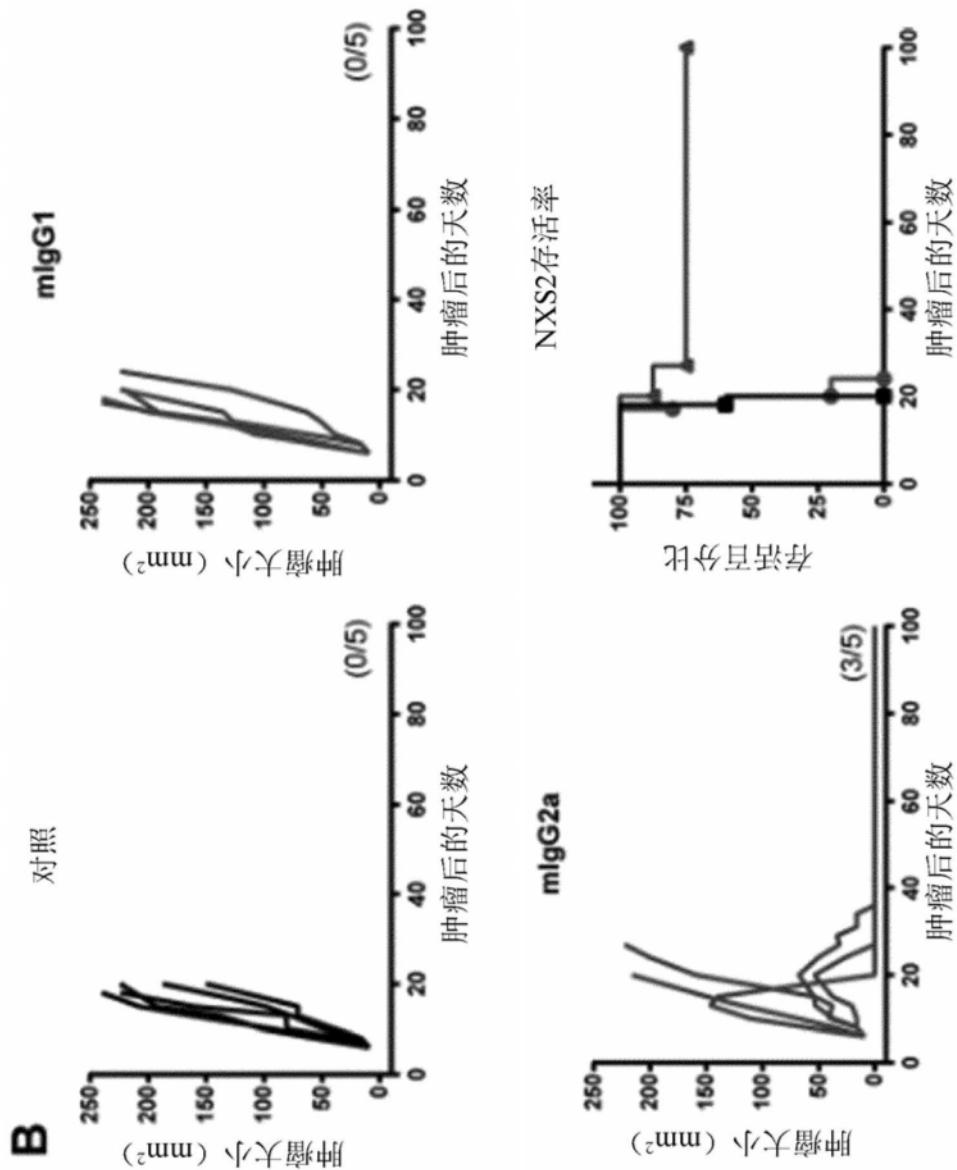


图1(续)

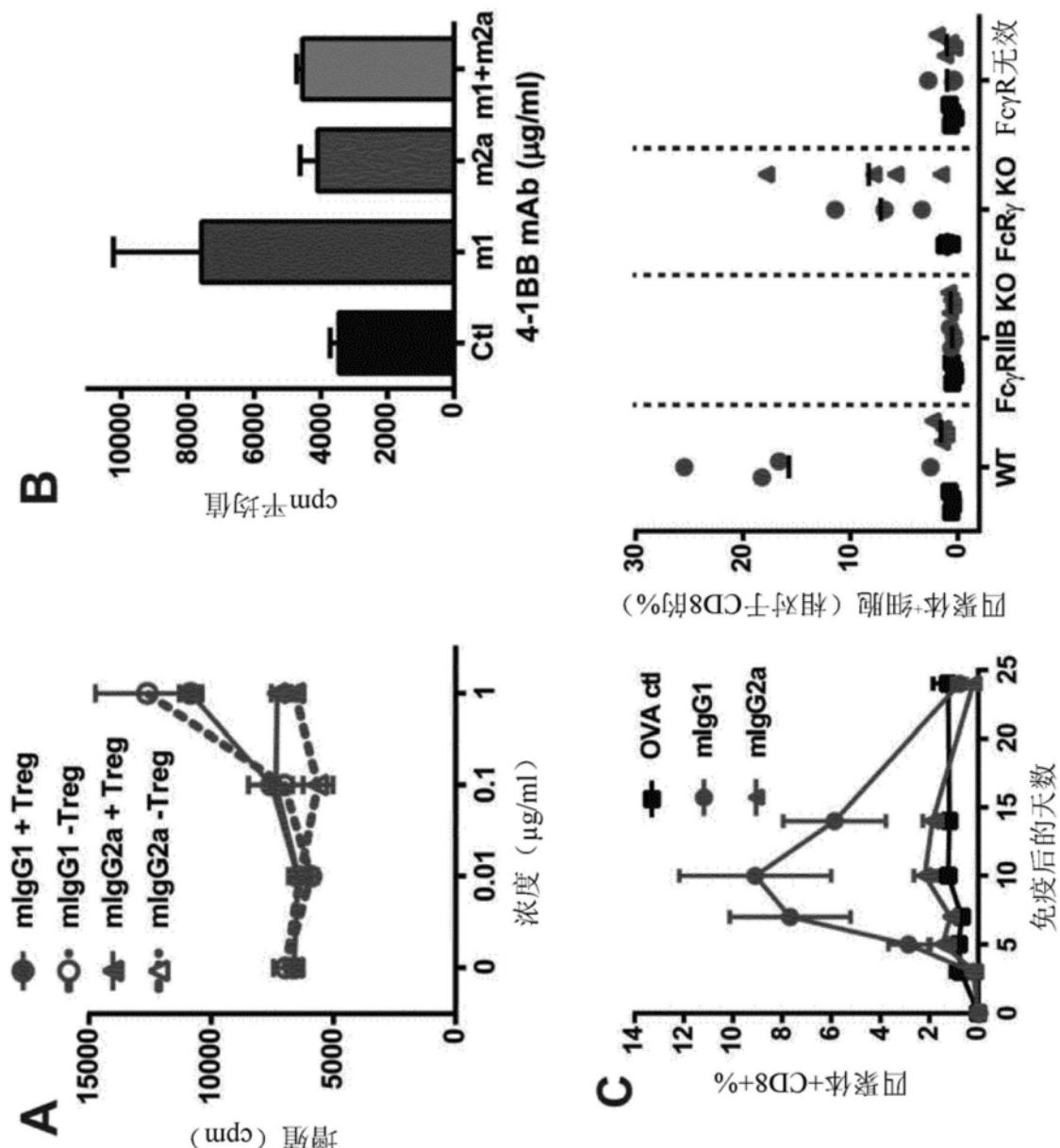


图2

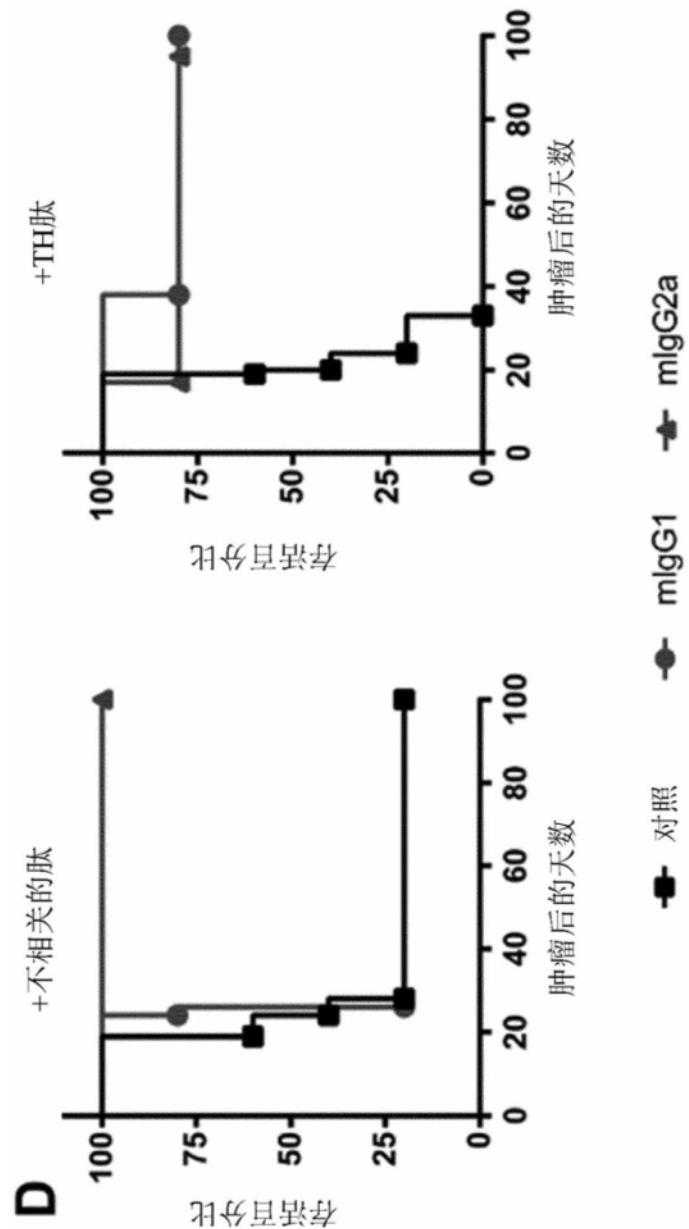


图2(续)

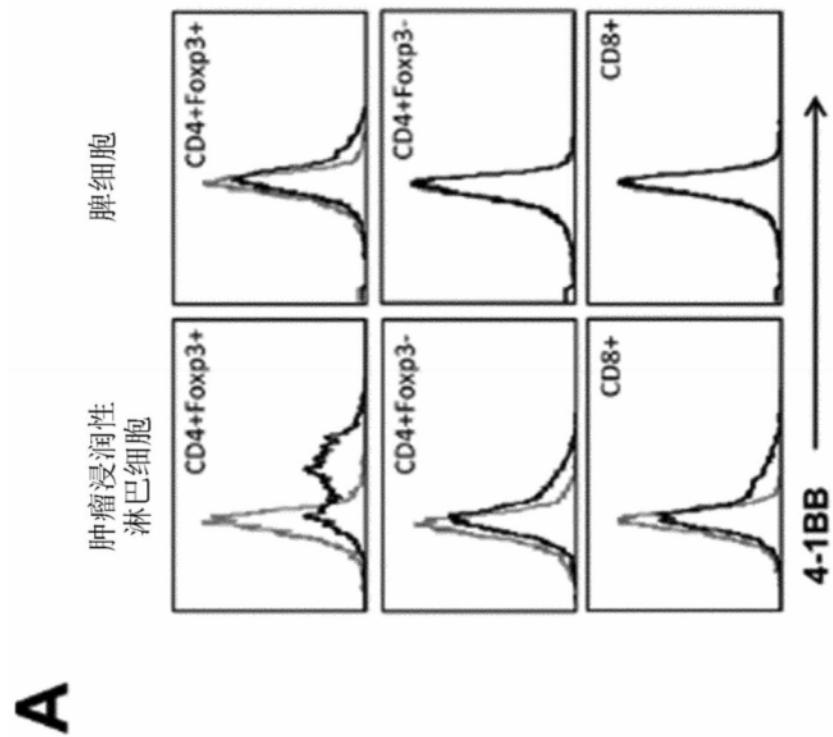
**A**

图3

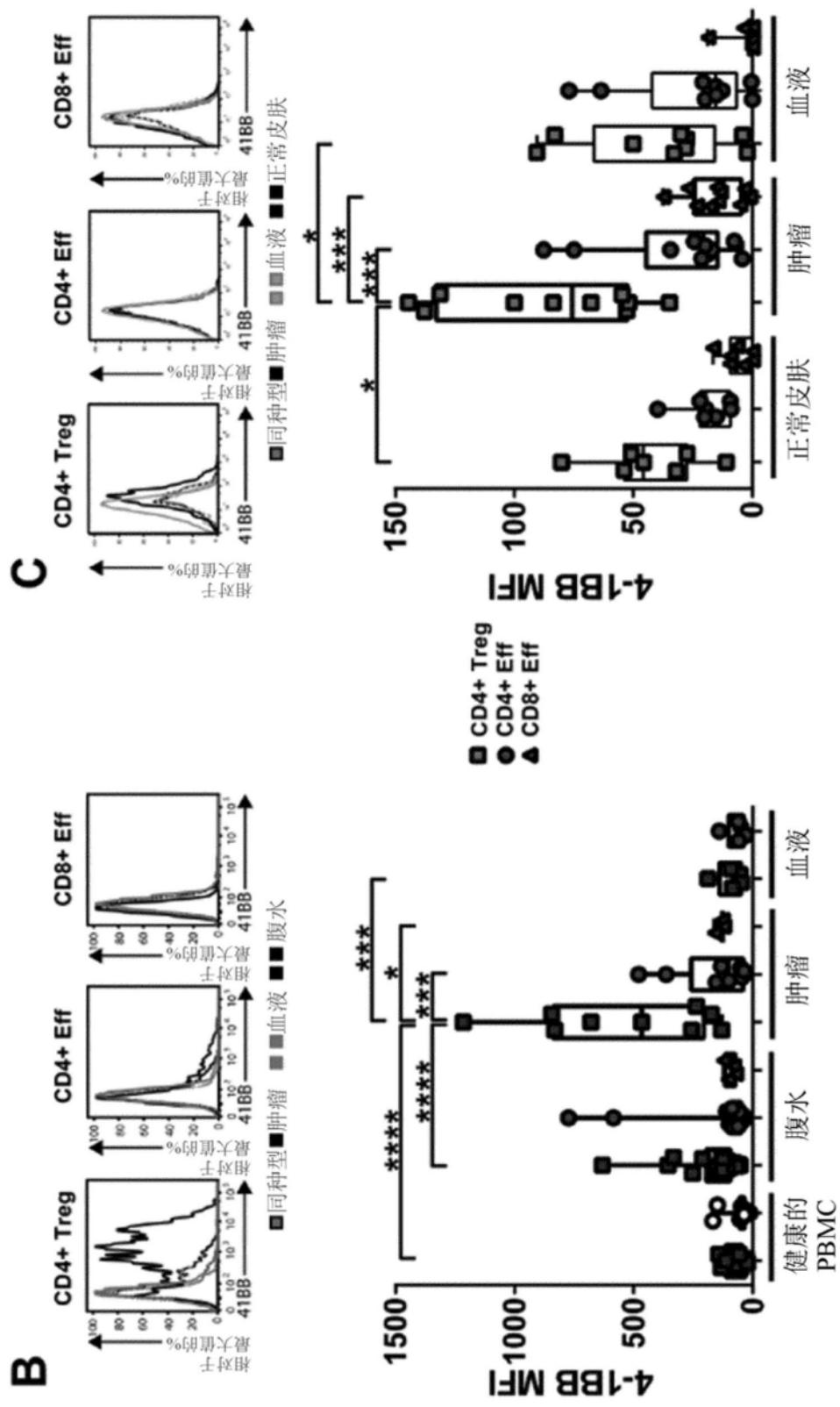


图3(续)

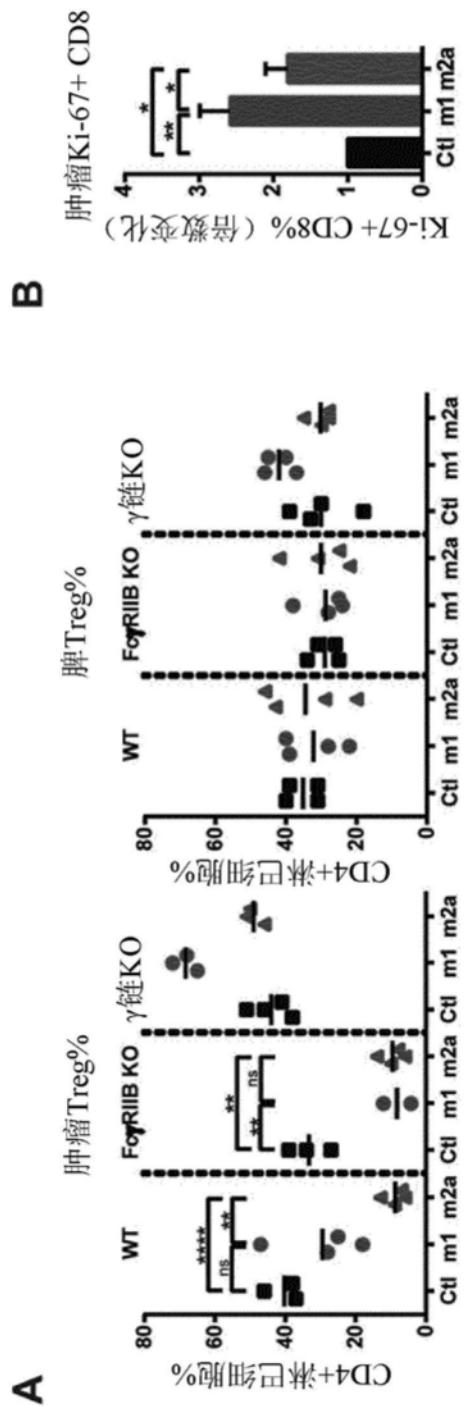


图4

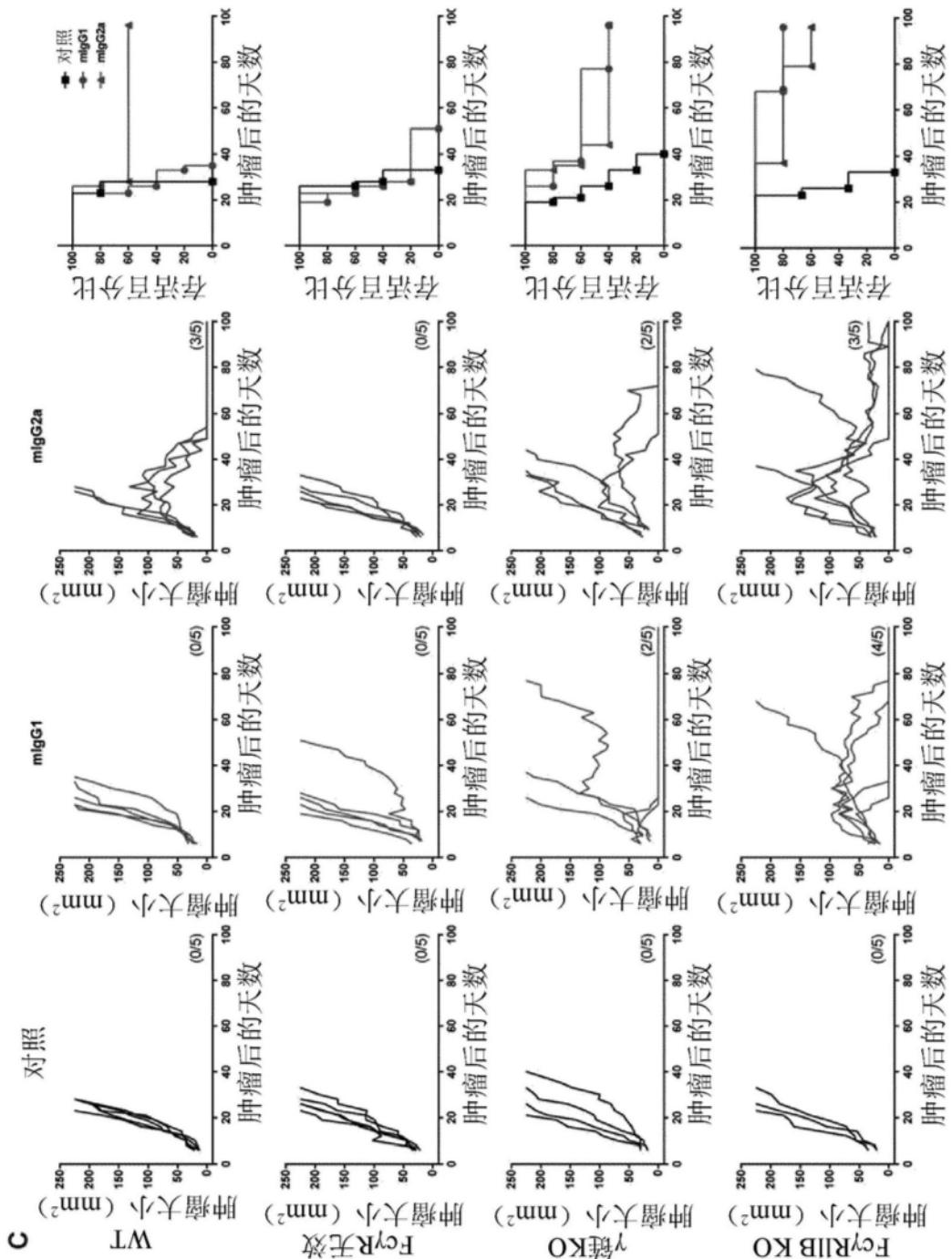


图4(续)

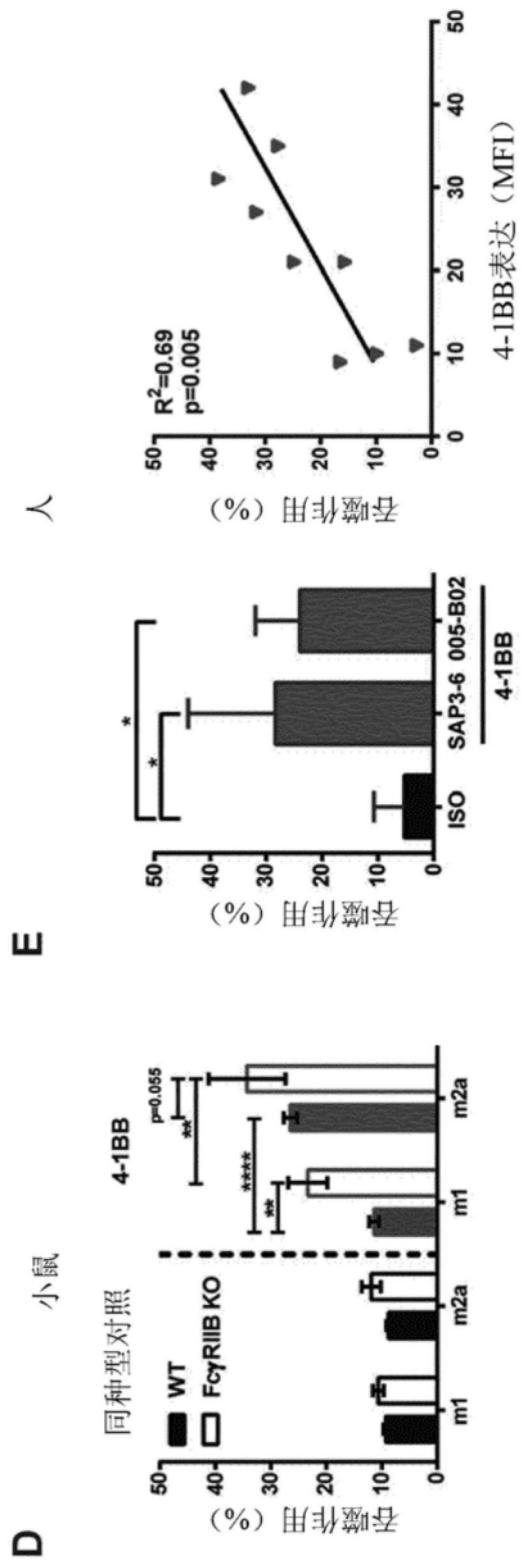


图4(续)

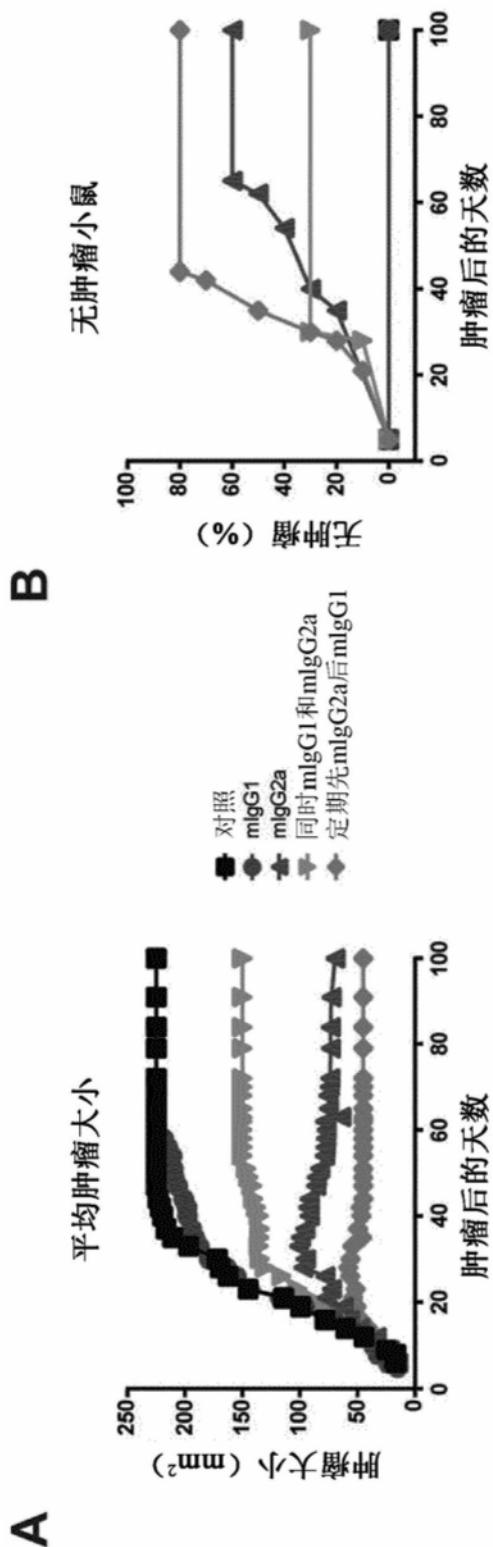


图5

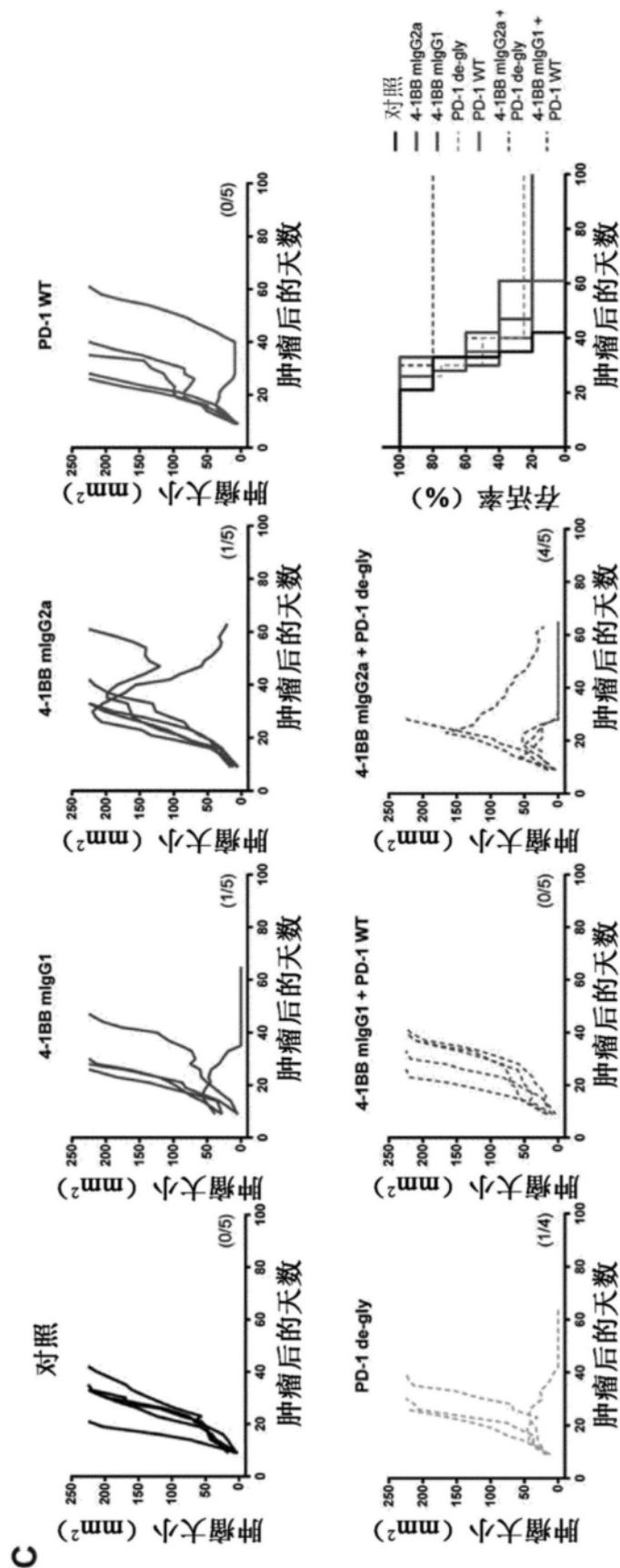


图5(续)

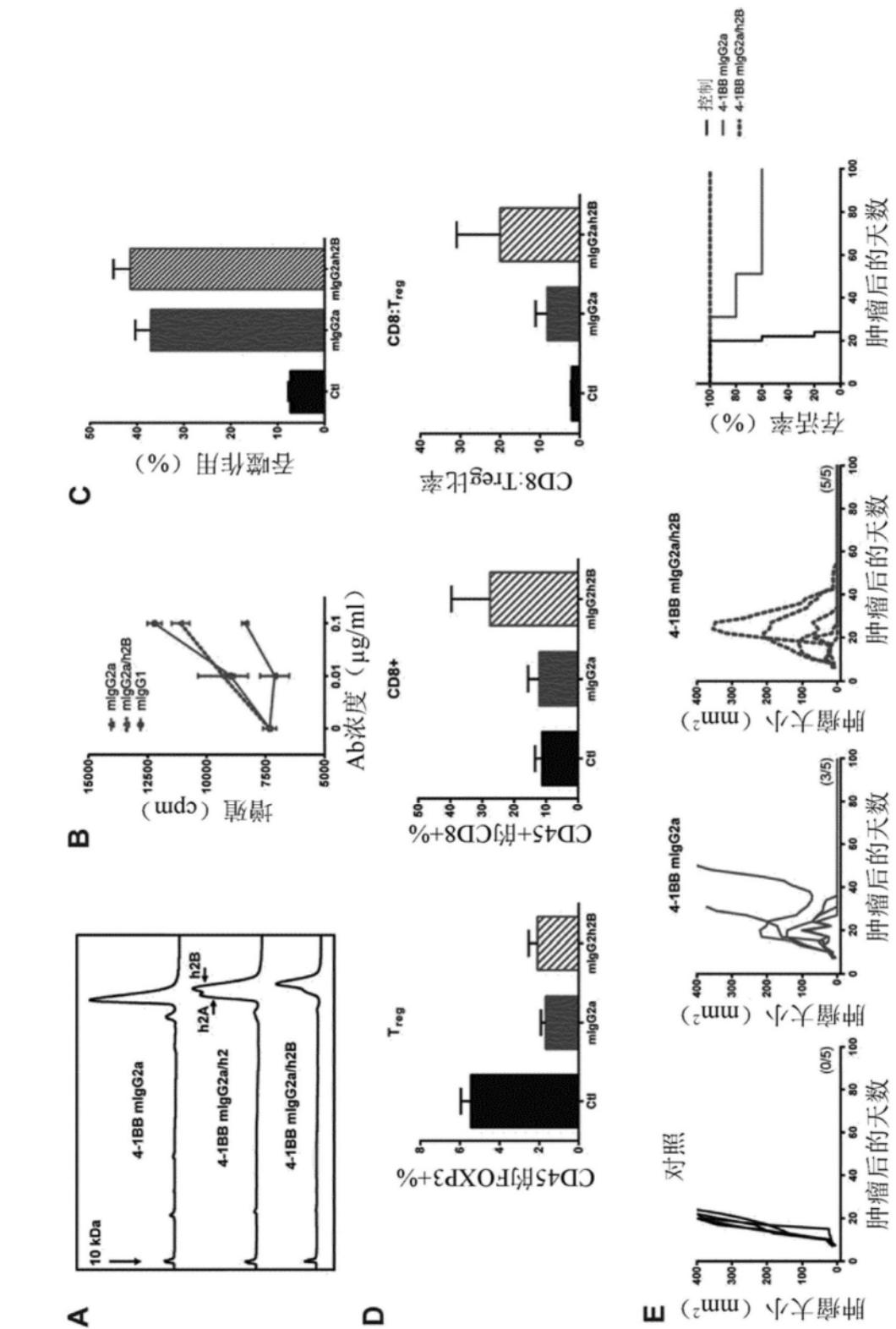


图6

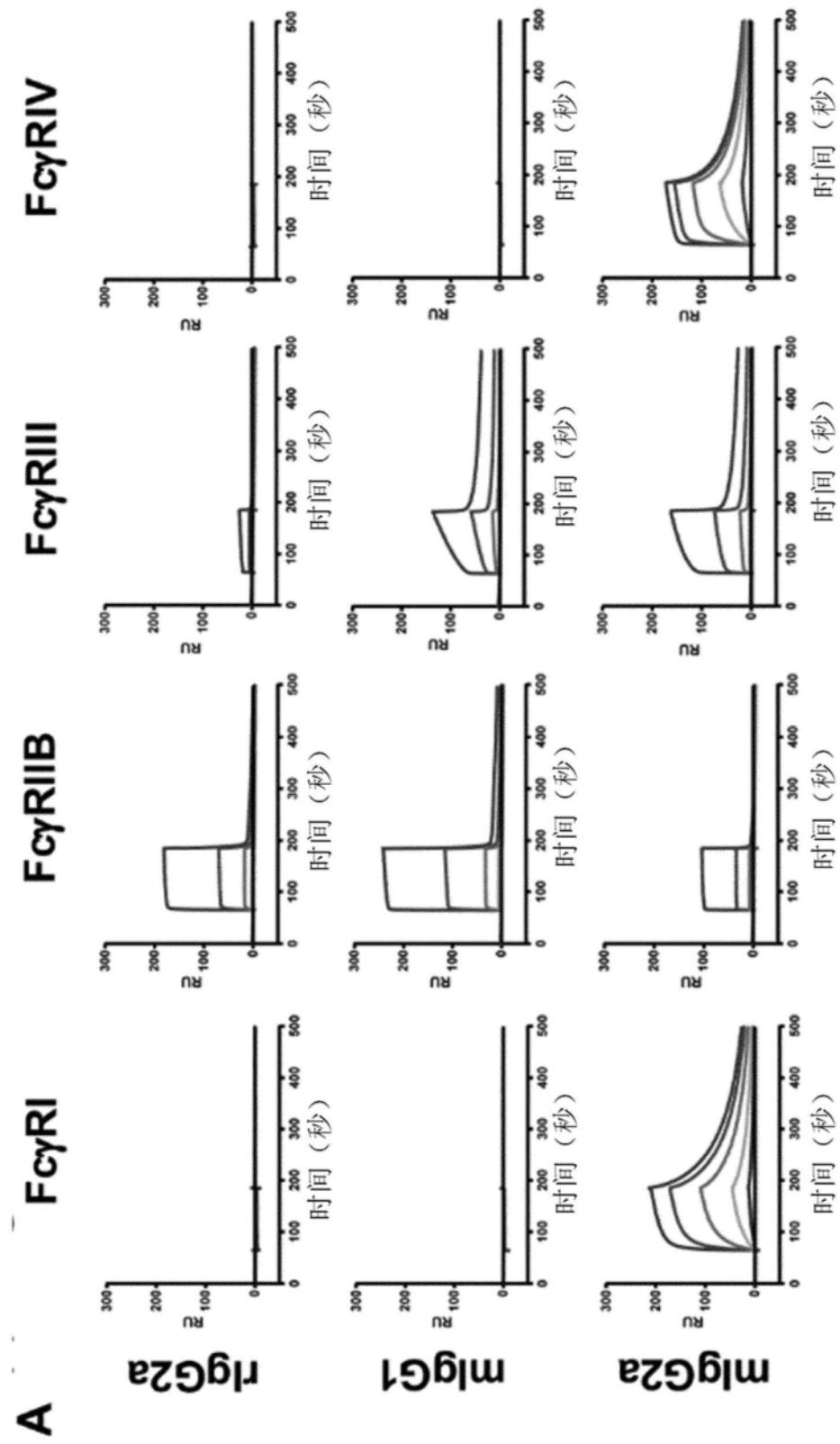
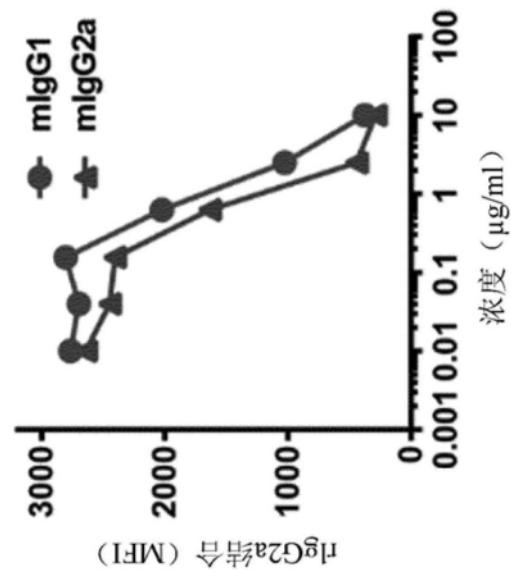
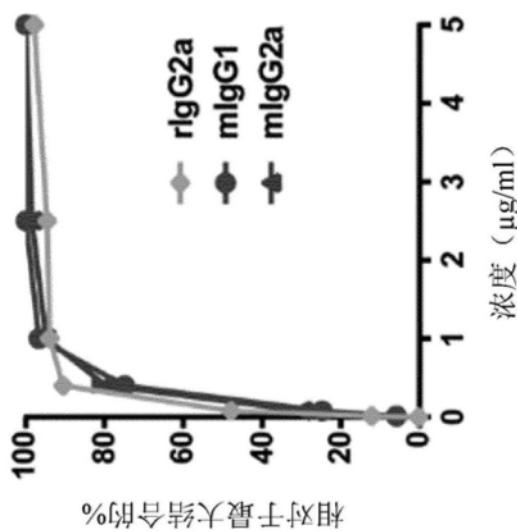


图7



C



B

图7(续)

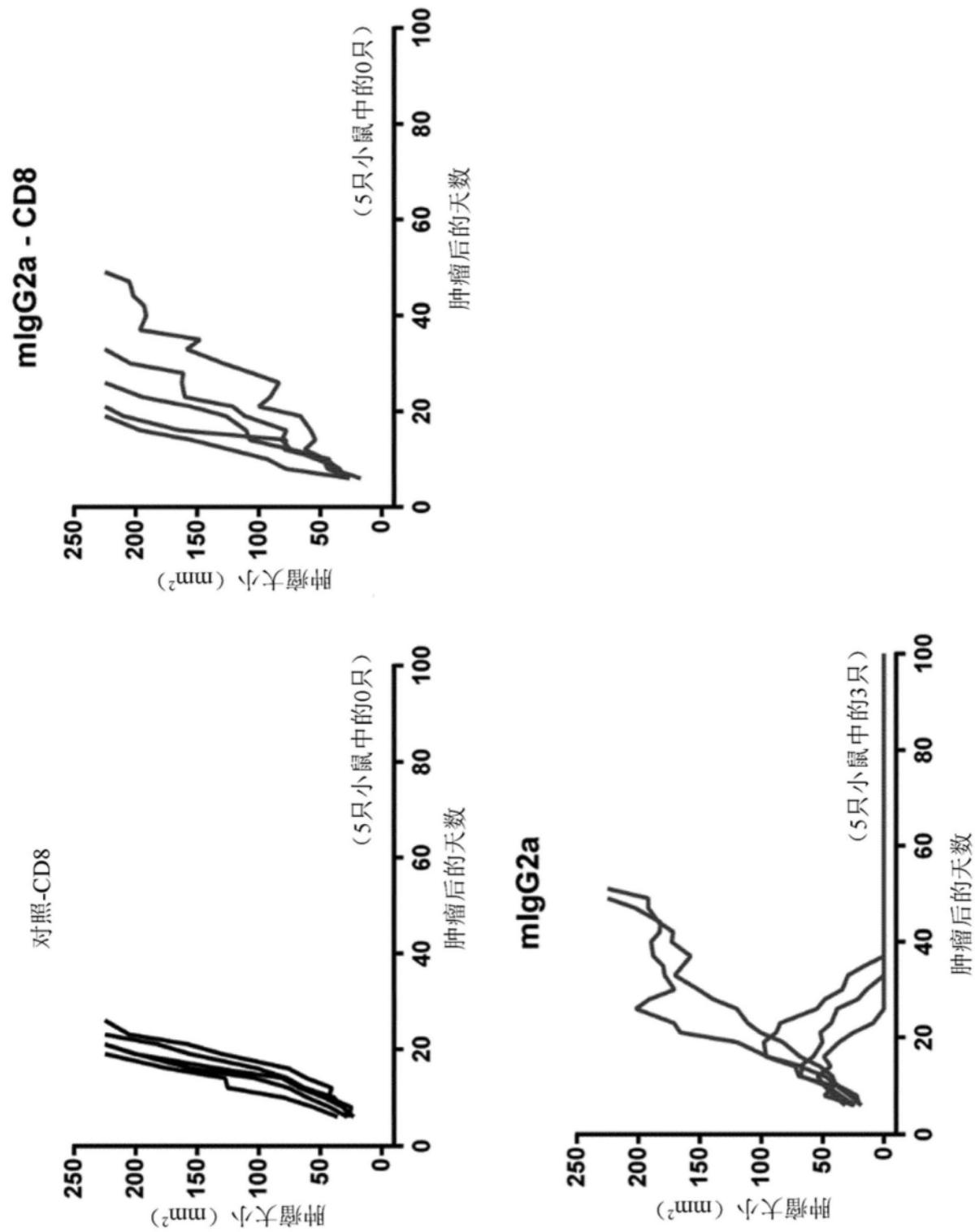


图8

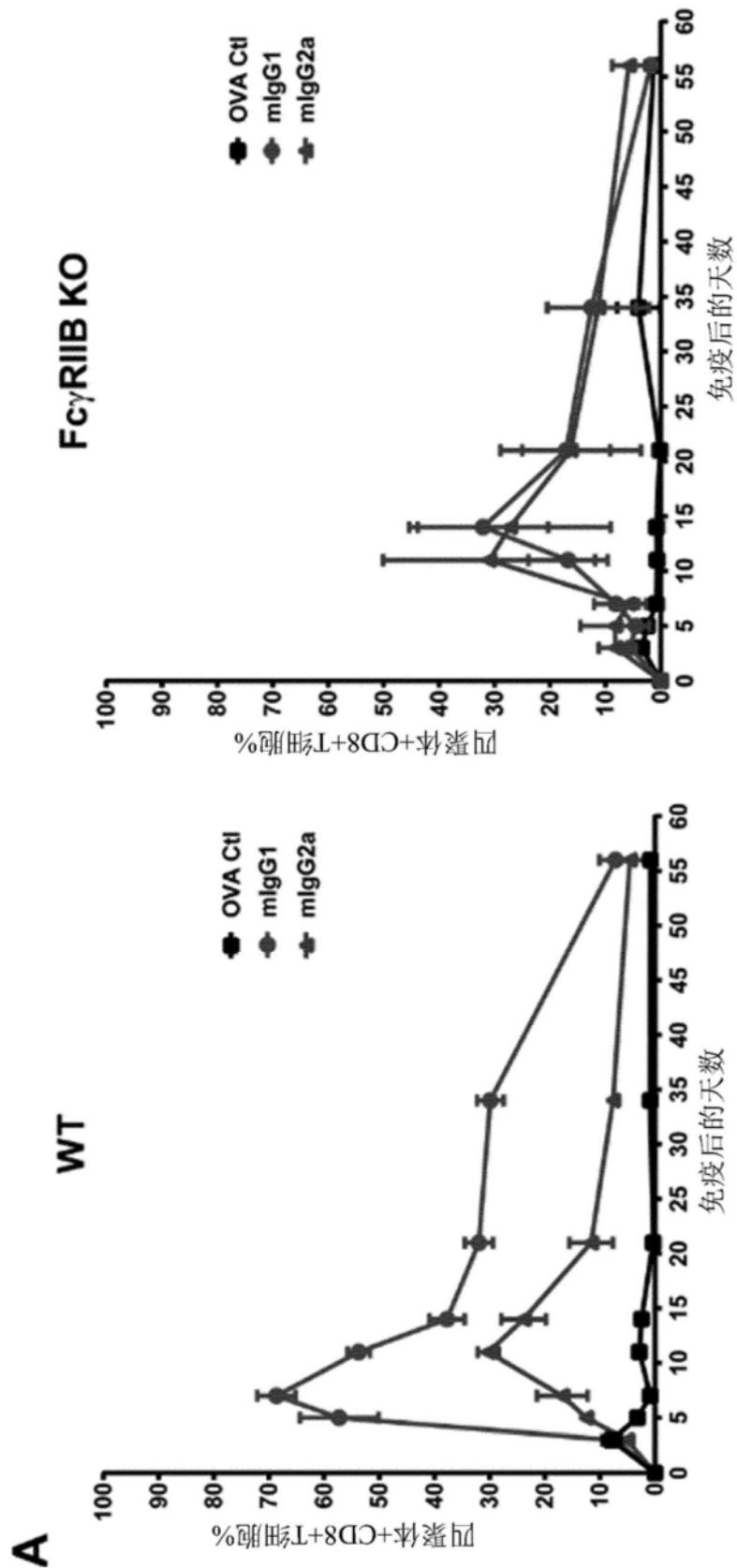


图9

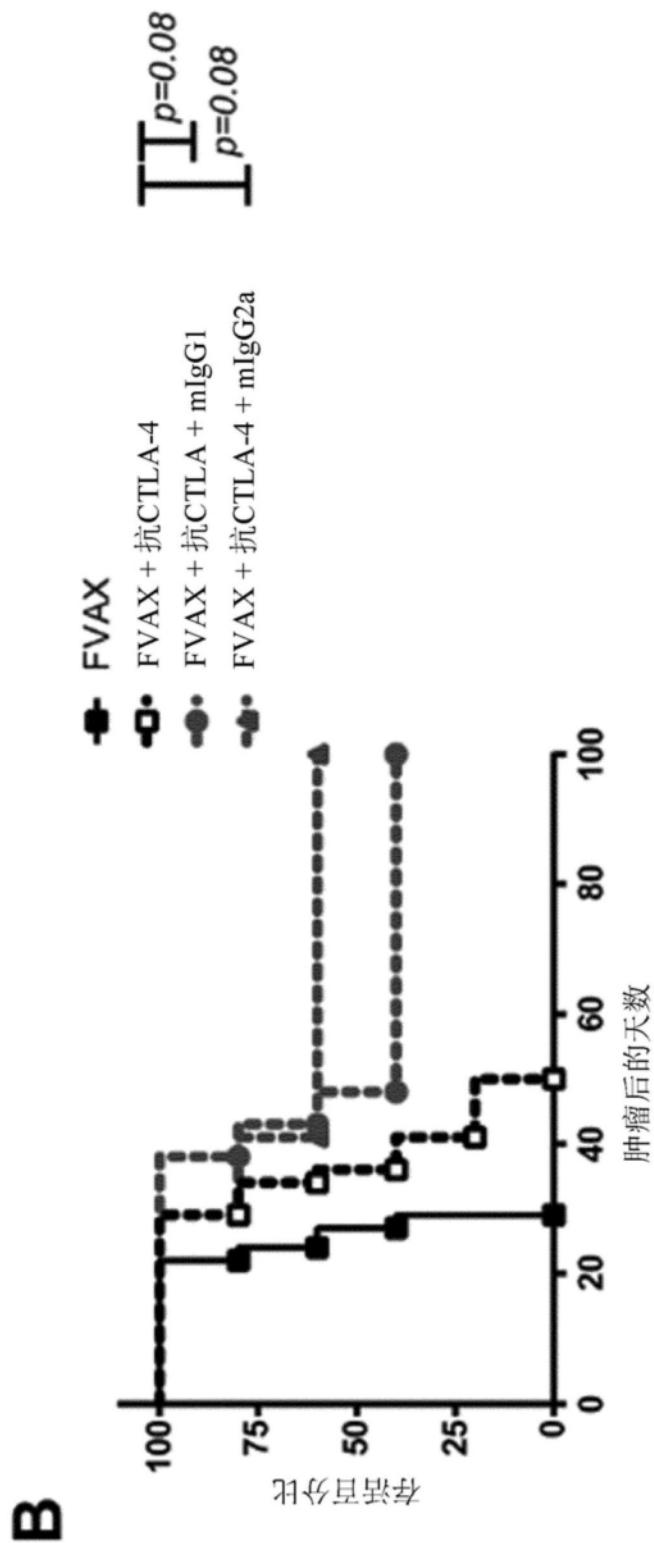


图9(续)

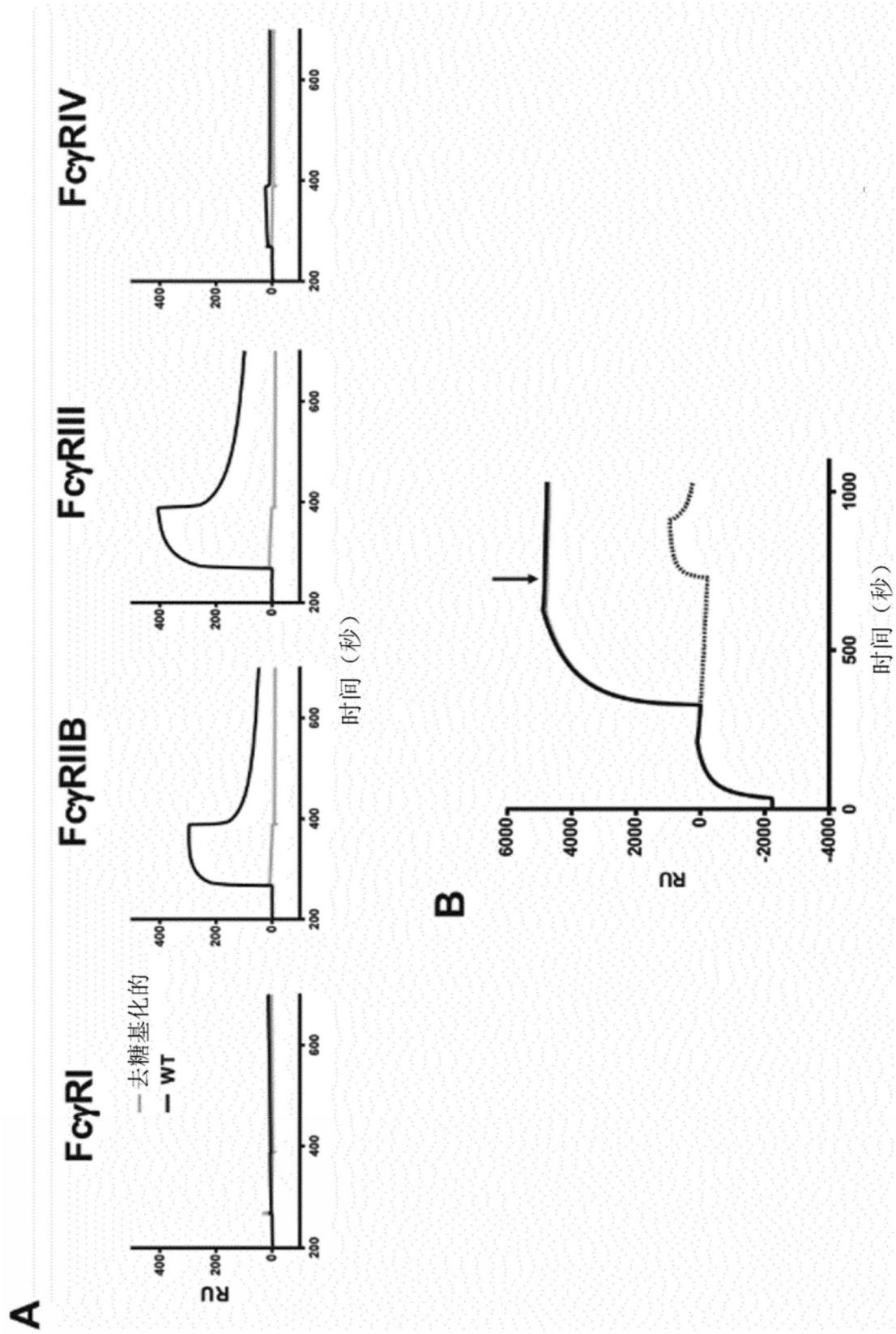


图10

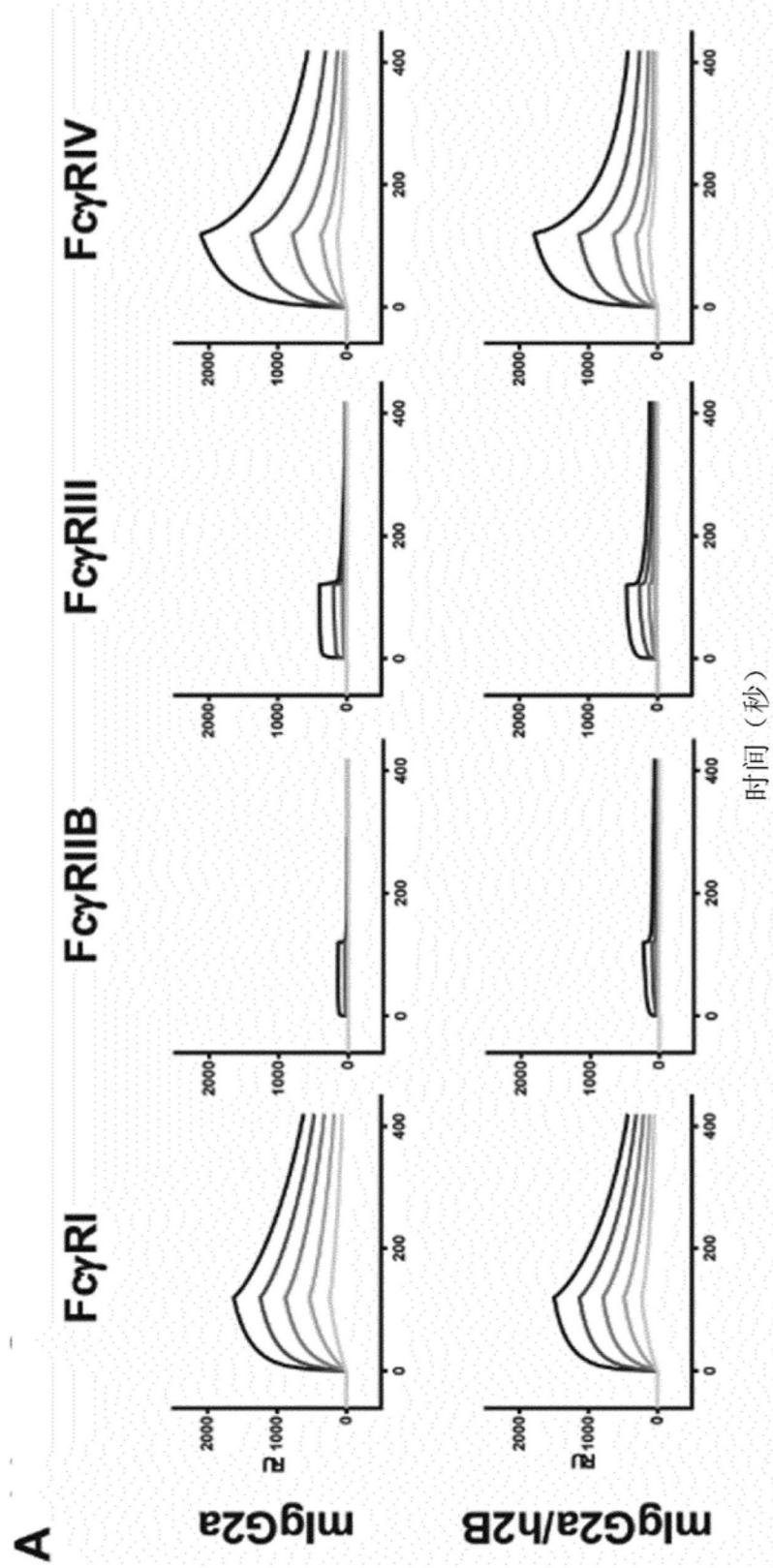


图11

结合滴定曲线 (HDLM2细胞)

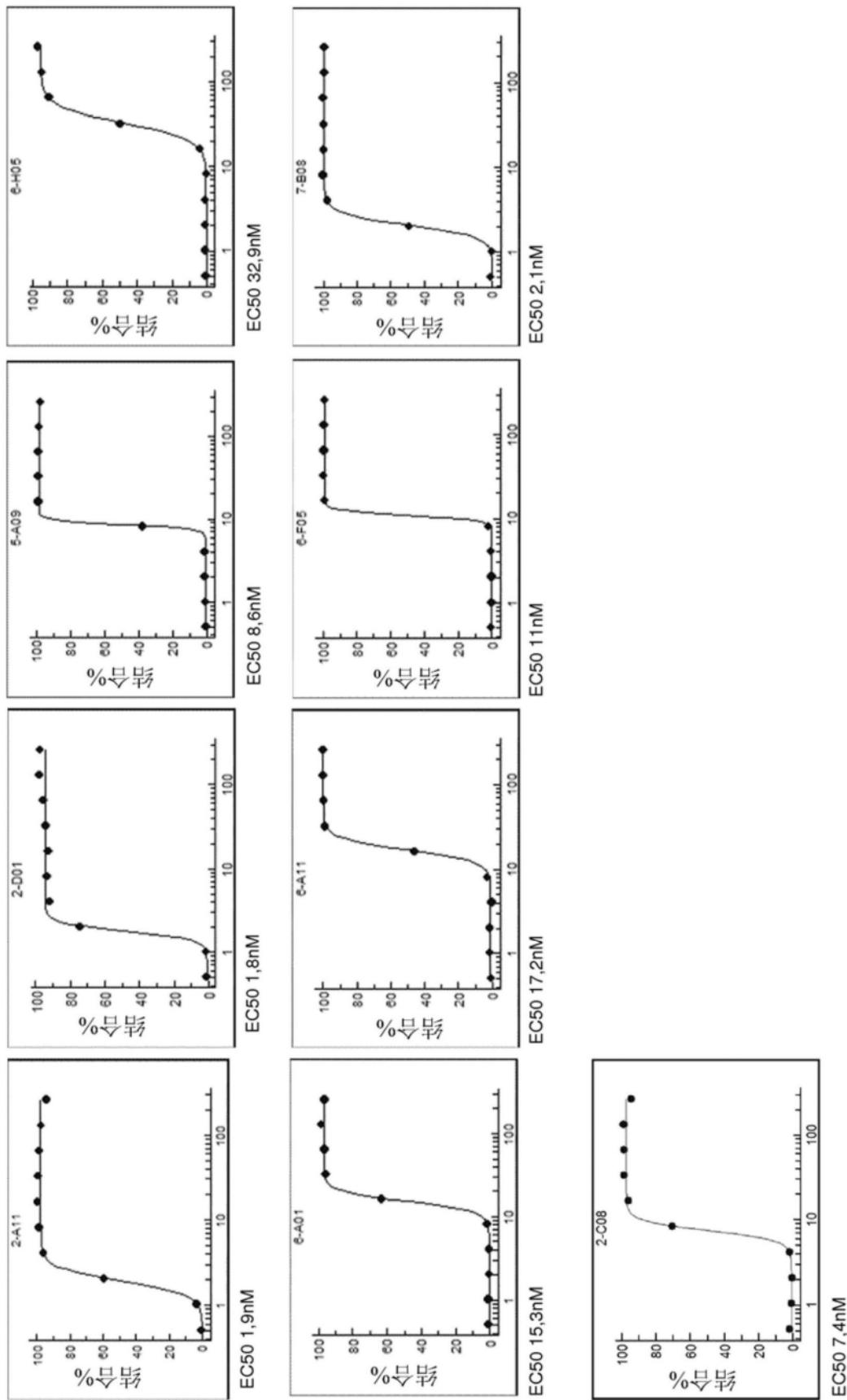


图12

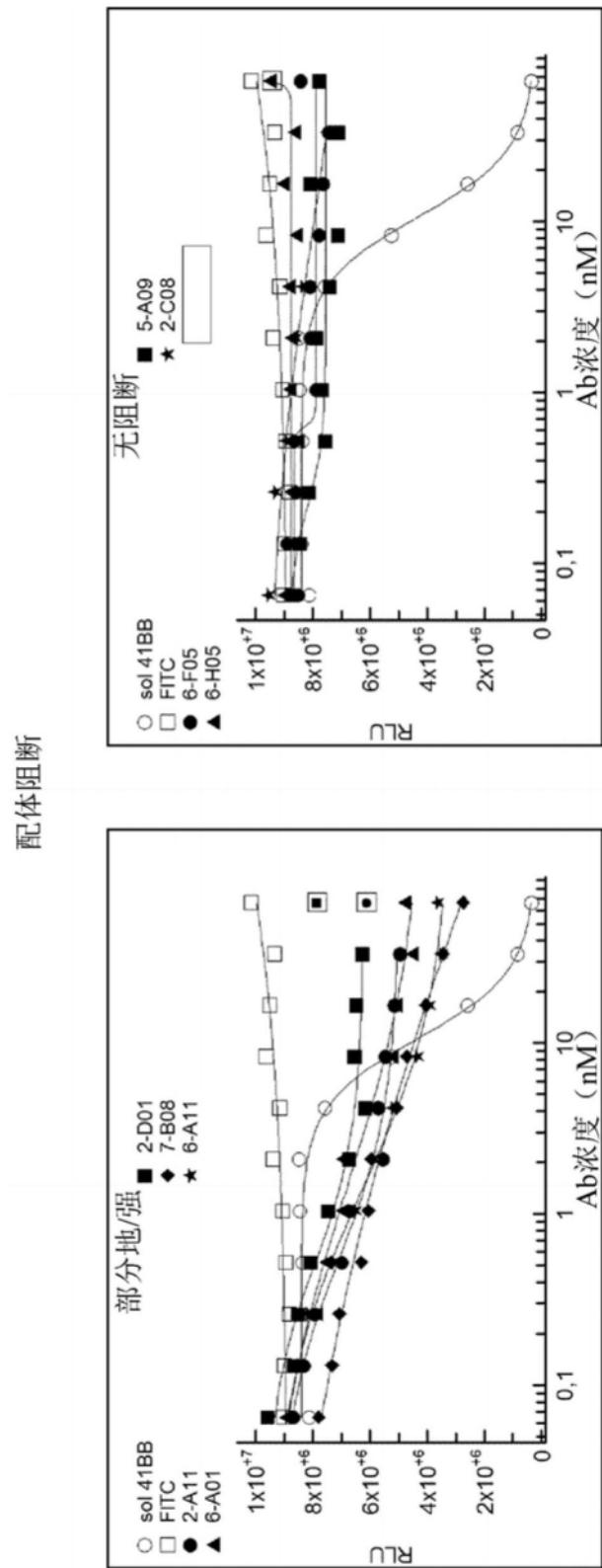
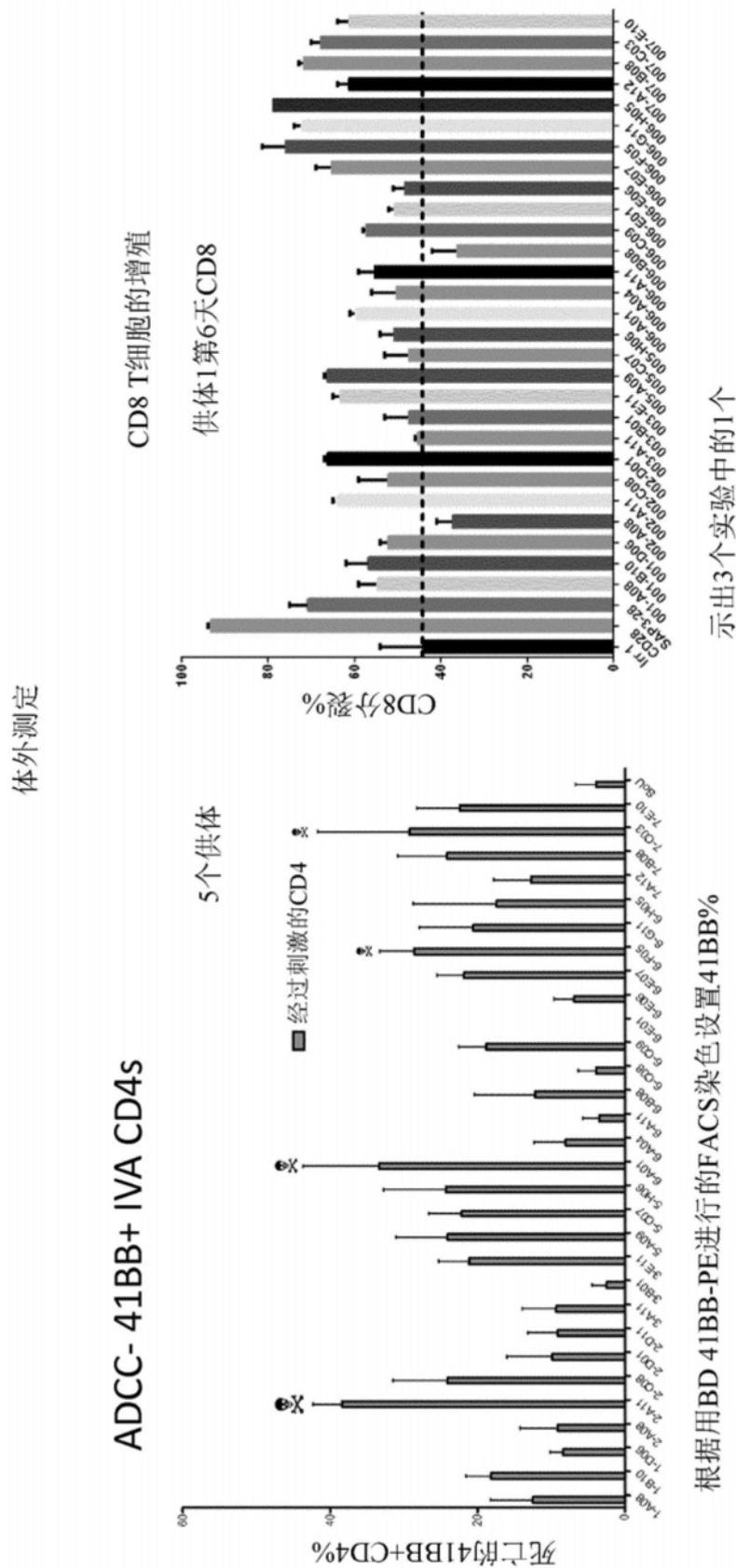


图13



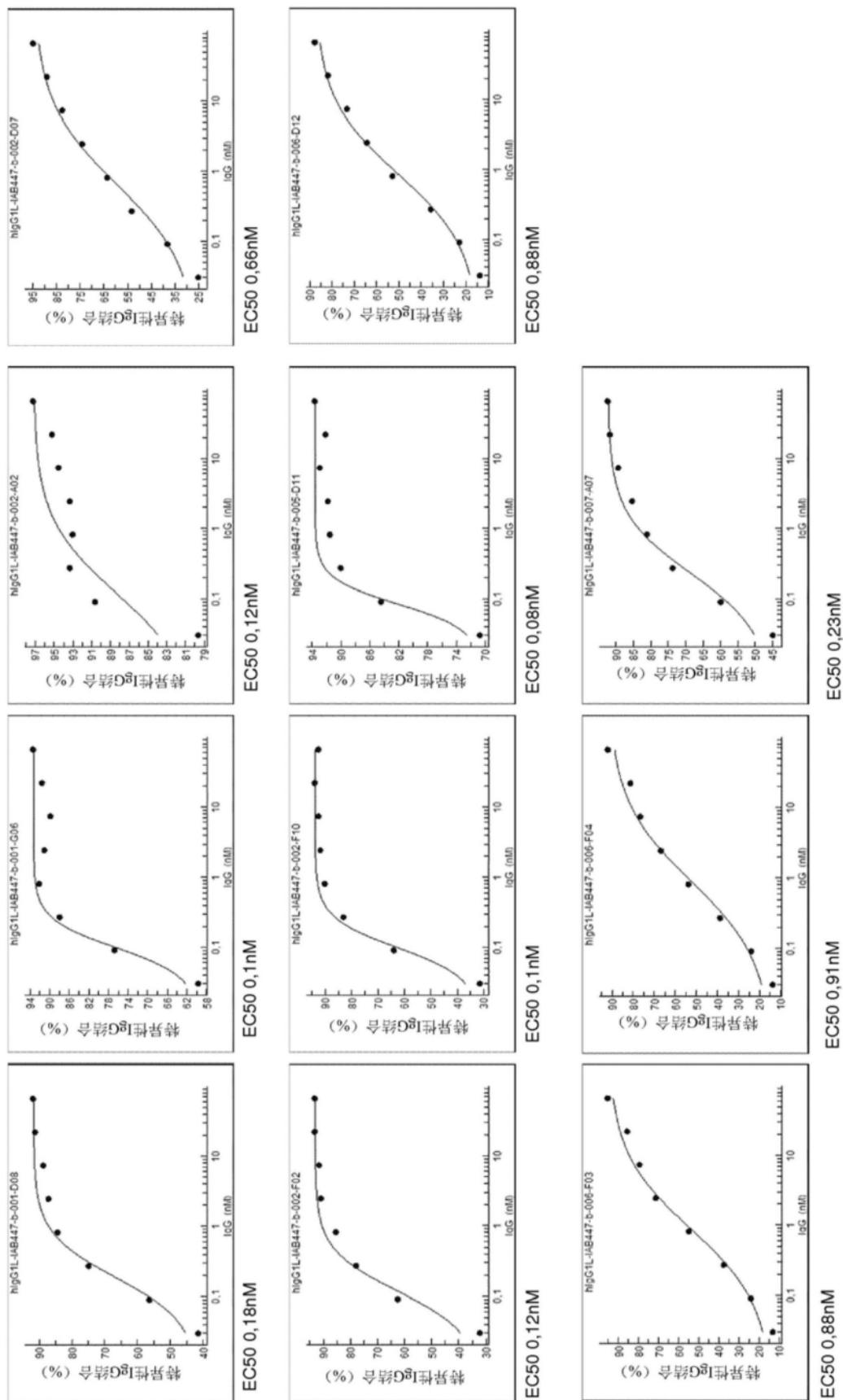
与体外激活的 λ CD4+ T细胞结合

图15

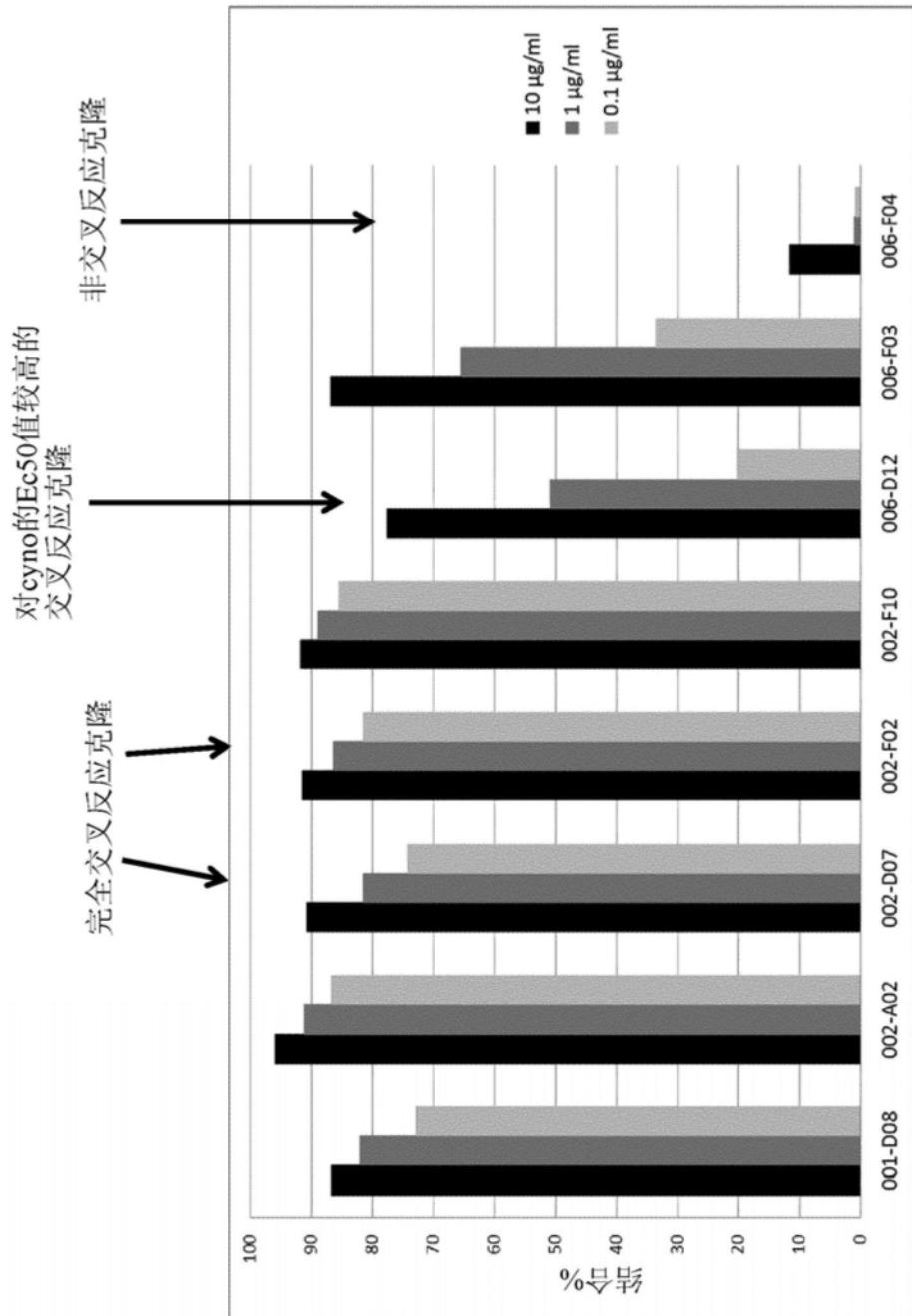
Cyno对激活的CD4⁺ T细胞的交叉反应性

图16

配体阻断

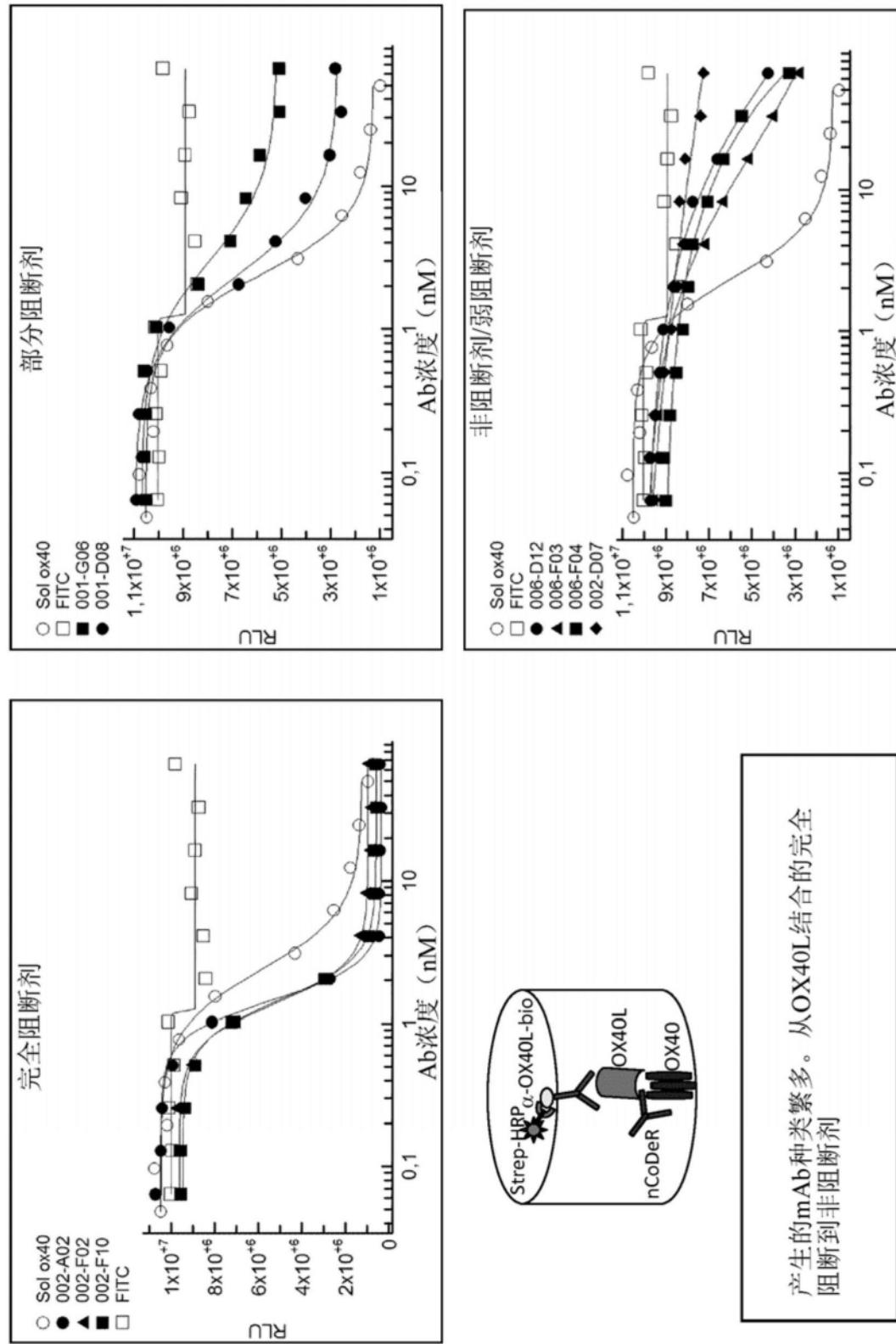


图17

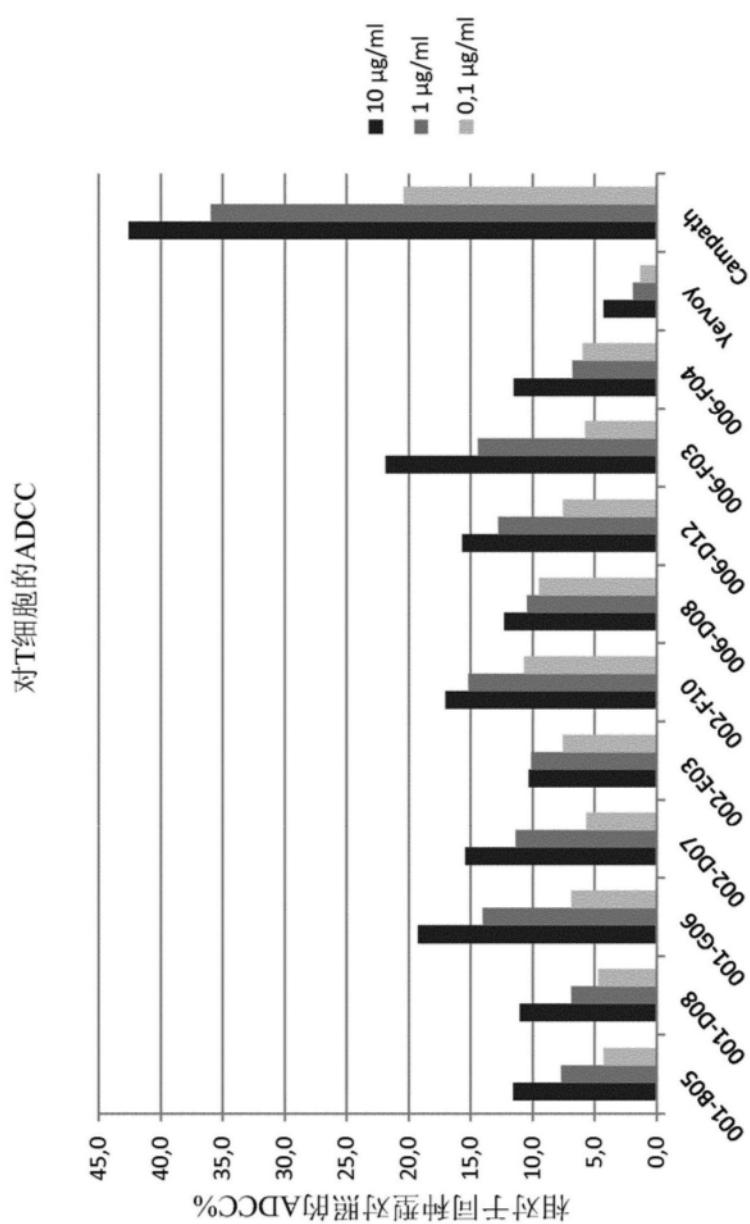
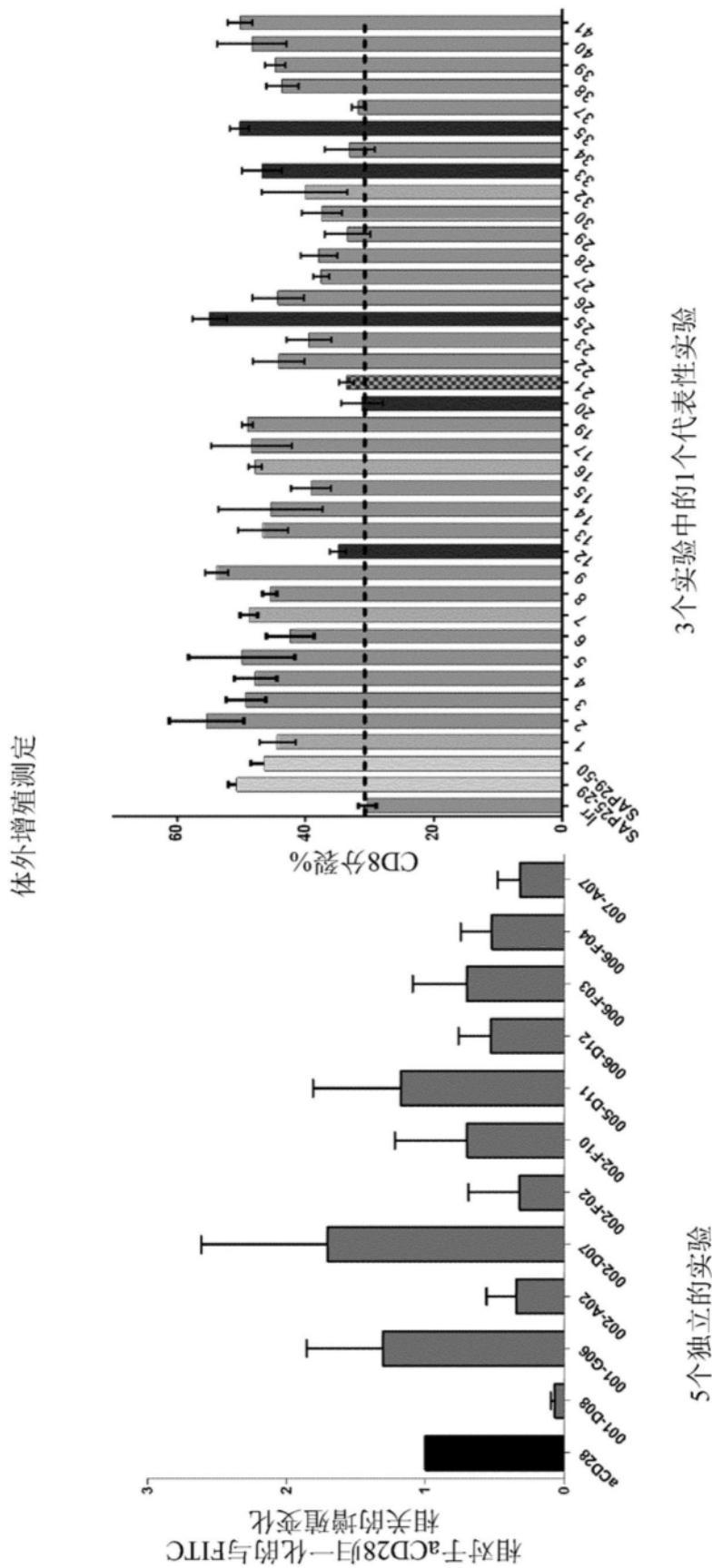


图18



使用hOx40 KI / OT1转移模型的体内激动活性

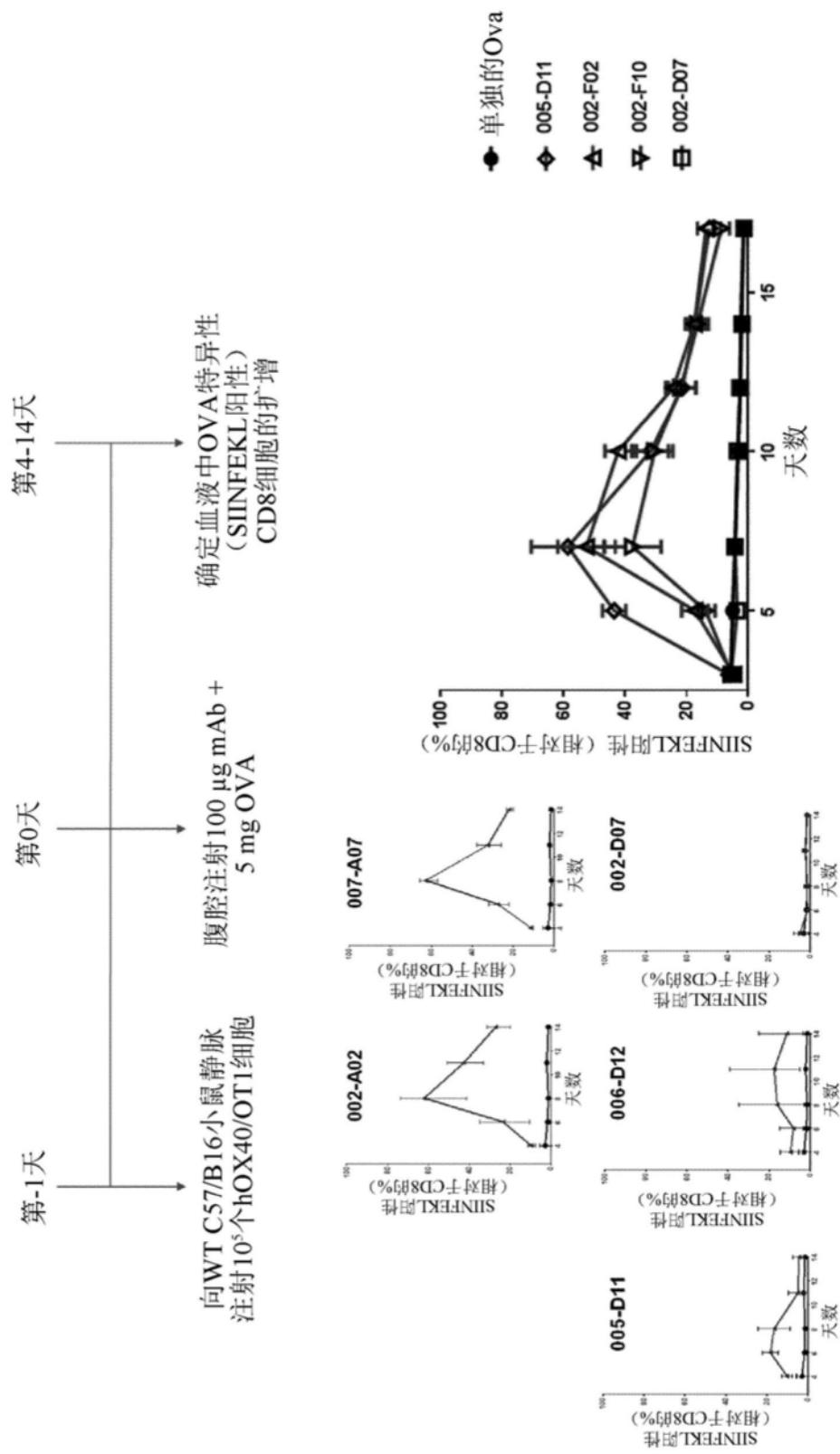


图20

总结							
	结构域	EC50	解离率	KD (M x 10 ⁻⁹)	ADCC	体外激动 (SOTON)	配体结合抑制 (ELISA)
001-D08	1	0.2	慢	7.5	5th	++	强, 部分地
001-G06	1	0.1	慢	2.2	2nd	+++	弱, 部分地
002-A02	3/4		慢	0.02	-		是, 强
002-D07	2	0.7	快	20	4th	++	完全地
002-F02	2		快	2.2	-		部分地
002-F10	2	0.1	慢	10	3rd	-	无阻断
005-D11	3/4		中等	2.8	-	+++	部分地
006-D12		0.9		15	4th		完全地
006-F03	3/4	0.9	中等	7.1	1st	++	完全地
006-F04	3/4		快	10	-	++	完全地
007-A07	1		中等	4	-	++	完全地

图21

来自(人类)不同区室的TREG和效应细胞

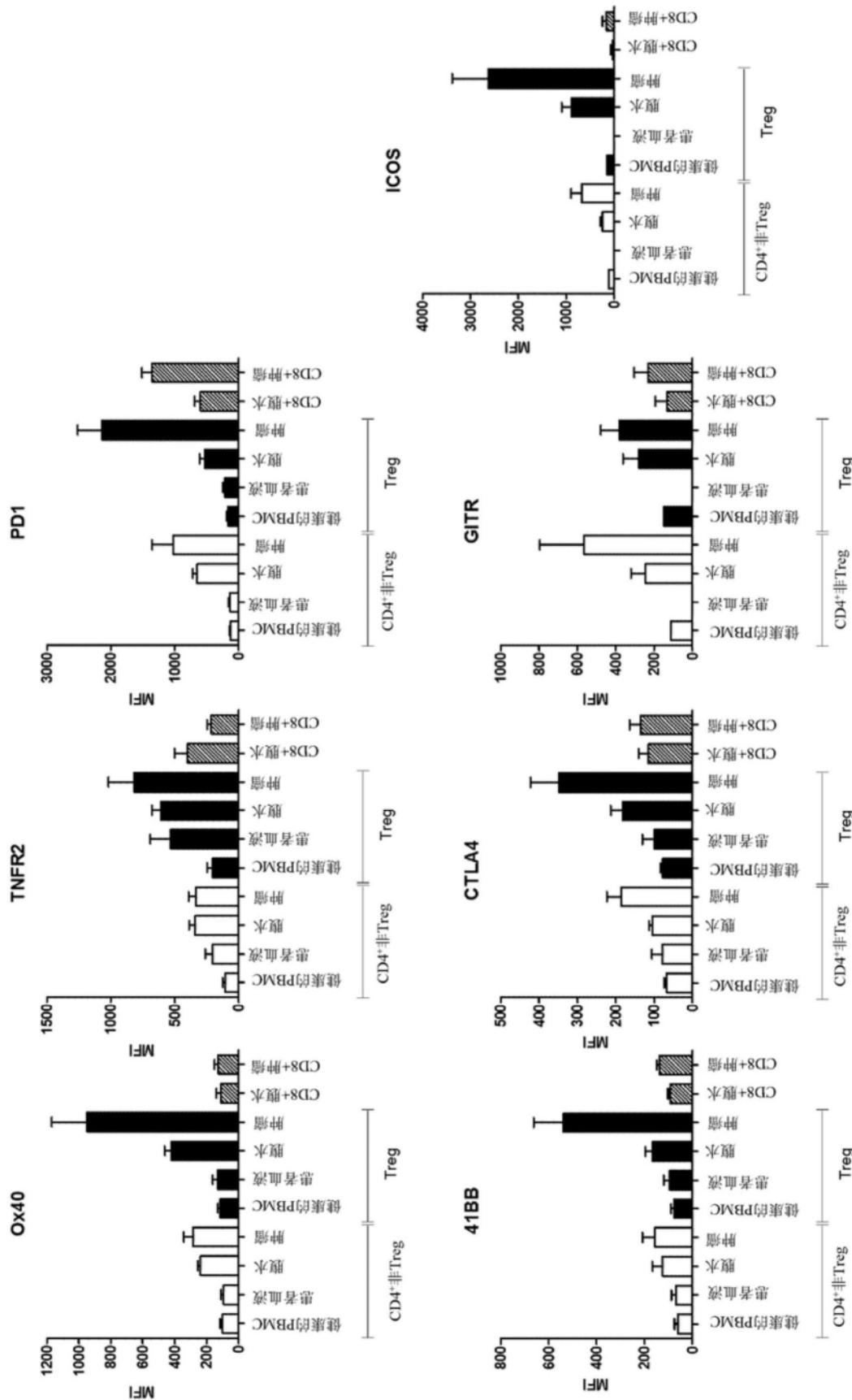


图22

来自（小鼠）不同器官的Treg细胞上的受体表达

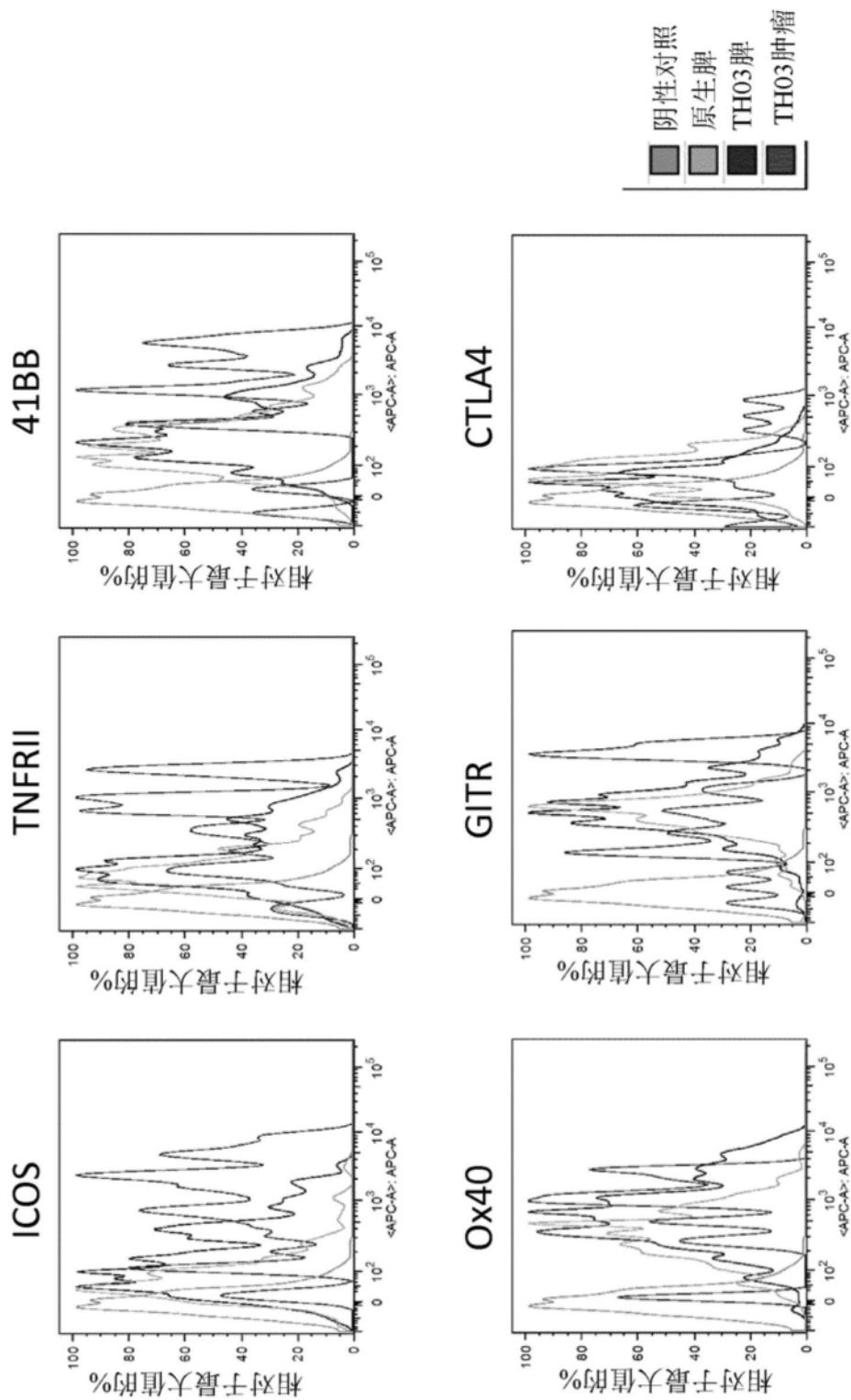


图23

与(小鼠)其它细胞类型相比, Treg细胞上的受体表达

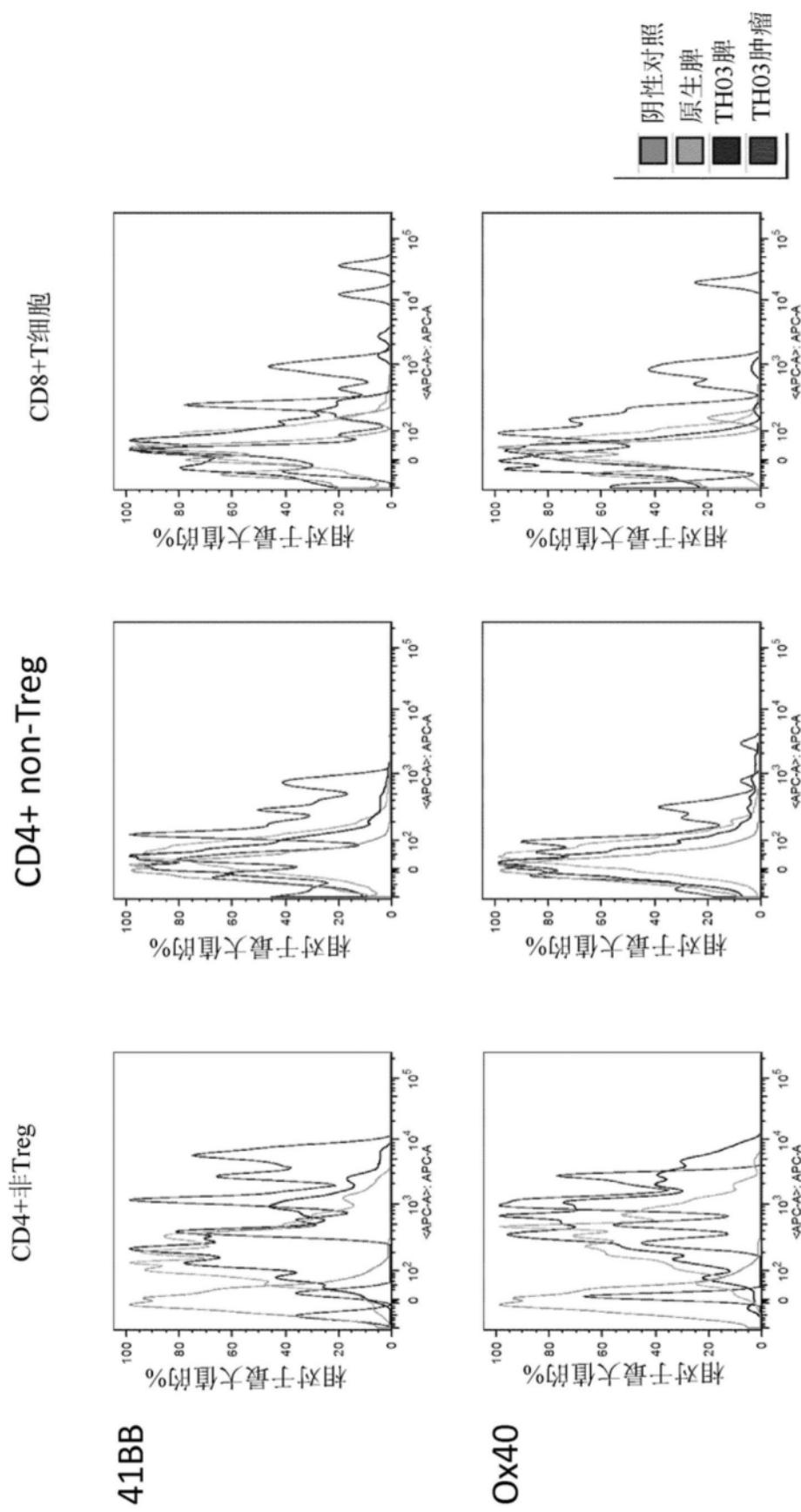


图24