



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109641968 B

(45) 授权公告日 2023.10.20

(21) 申请号 201780054101.9

(22) 申请日 2017.07.05

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 109641968 A

(43) 申请公布日 2019.04.16

(30) 优先权数据

62/359,073 2016.07.06 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2019.03.04

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2017/040665 2017.07.05

(87) PCT国际申请的公布数据

W02018/009507 EN 2018.01.11

(73) 专利权人 百时美施贵宝公司

地址 美国新泽西州

(72) 发明人 S·多伊尔 M·J·塞尔比

E·查德威克

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理人 封新琴

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 102861319 A, 2013.01.09

CN 101035561 A, 2007.09.12

Kim J E等. Combination Therapy with Anti-PD-1, Anti-TIM-3, and Focal Radiation Results in Regression of Murine Gliomas.《Clinical Cancer Research》.2016, 第23卷(第5期), 124-136.

Koyama S等. Adaptive resistance to therapeutic PD-1 blockade is associated with upregulation of alternative immune checkpoints.《Nature Communications》.2016, 10:501.

Sakuishi K等. Targeting Tim-3 and PD-1 pathways to reverse T cell exhaustion and restore anti-tumor immunity.《Journal of Experimental Medicine》.2010, 第207卷(第10期), 2187-2194.

Baghdadi M等. Combined blockade of TIM-3 and TIM-4 augments cancer vaccine efficacy against established melanomas.《Cancer Immunology Immunotherapy》.2012, 第64卷(第4期), 629-637.

审查员 陈晋

权利要求书3页 说明书35页

序列表21页 附图19页

(54) 发明名称

TIM-4拮抗剂和PD-1拮抗剂的组合及其使用方法

(57) 摘要

本申请提供了使用有效量的PD-1拮抗剂(例如,抗体)与TIM-4拮抗剂(例如,抗体)组合治疗B 瘤症的方法和组合物。

1. 在用于治疗癌症的方法中使用的抗PD-1抗体和抗TIM-4抗体的组合产品,所述抗PD-1抗体与人PD-1结合,所述抗TIM-4抗体与人TIM-4结合,其中所述抗TIM-4抗体抑制肿瘤细胞的胞葬作用,其中所述癌症选自:母细胞瘤、淋巴瘤、白血病、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胃肠癌、鳞状细胞癌、胶质瘤、肾脏癌、卵巢癌、肝癌、子宫内膜癌、前列腺癌、胰腺癌、宫颈癌、膀胱癌、乳腺癌、头颈癌、生殖细胞肿瘤、小儿肉瘤和多发性骨髓瘤。

2. 根据权利要求1所述的组合产品,其中所述头颈癌是甲状腺癌。

3. 根据权利要求1或2所述的组合产品,其中所述抗TIM-4抗体与TIM-4的IgV结构域结合。

4. 根据权利要求1或2所述的组合产品,其中所述抗PD-1抗体包含具有SEQ ID NO:13所示序列的重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域,和具有SEQ ID NO:15所示序列的轻链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域。

5. 根据权利要求1或2所述的组合产品,其中所述抗PD-1抗体包含:

- (a) 由SEQ ID NO:17所示序列组成的重链可变区CDR1;
- (b) 由SEQ ID NO:18所示序列组成的重链可变区CDR2;
- (c) 由SEQ ID NO:19所示序列组成的重链可变区CDR3;
- (d) 由SEQ ID NO:20所示序列组成的轻链可变区CDR1;
- (e) 由SEQ ID NO:21所示序列组成的轻链可变区CDR2;
- (f) 由SEQ ID NO:22所示序列组成的轻链可变区CDR3。

6. 根据权利要求1或2所述的组合产品,其中所述抗PD-1抗体包含分别具有SEQ ID NO:13和15所示序列的重链和轻链可变区。

7. 根据权利要求1或2所述的组合产品,其中所述抗PD-1抗体包含分别具有SEQ ID NO:11和12所示序列的重链和轻链。

8. 根据权利要求1或2所述的组合产品,其中所述抗PD-1抗体包含具有SEQ ID NO:1所示序列的重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域,和具有SEQ ID NO:3所示序列的轻链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域。

9. 根据权利要求1或2所述的组合产品,其中所述抗PD-1抗体包含:

- (a) 由SEQ ID NO:5所示序列组成的重链可变区CDR1;
- (b) 由SEQ ID NO:6所示序列组成的重链可变区CDR2;
- (c) 由SEQ ID NO:7所示序列组成的重链可变区CDR3;
- (d) 由SEQ ID NO:8所示序列组成的轻链可变区CDR1;
- (e) 由SEQ ID NO:9所示序列组成的轻链可变区CDR2;
- (f) 由SEQ ID NO:10所示序列组成的轻链可变区CDR3。

10. 根据权利要求9所述的组合产品,其中所述抗PD-1抗体包含分别具有SEQ ID NO:1和3所示序列的重链和轻链可变区。

11. 在用于治疗受试者中的癌症的方法中使用的抗PD-1抗体和抗TIM-4抗体的组合产品,所述抗PD-1抗体与人PD-1结合,所述抗TIM-4抗体与人TIM-4结合,其中

(a) 所述抗PD-1抗体包含具有SEQ ID NO:13所示序列的重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域,和具有SEQ ID NO:15所示序列的轻链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域;和
(b) 所述抗TIM-4抗体与TIM-4的IgV结构域结合。

12. 在用于治疗受试者中的癌症的方法中使用的抗PD-1抗体和抗TIM-4抗体的组合产品,所述抗PD-1抗体与人PD-1结合,所述抗TIM-4抗体与人TIM-4结合,其中

(a) 所述抗PD-1抗体包含具有SEQ ID NO:1所示序列的重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域,和具有SEQ ID NO:3所示序列的轻链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域;和
(b) 所述抗TIM-4抗体与TIM-4的IgV结构域结合。

13. 根据权利要求1-12中任一项所述的组合产品,其中配制所述抗PD-1抗体和所述抗TIM-4抗体用于静脉施用。

14. 根据权利要求1-12中任一项所述的组合产品,其中所述癌症是选自下组的癌症:慢性髓性白血病、急性淋巴细胞白血病、急性髓性白血病(AML)、慢性淋巴细胞白血病(CML)、结肠癌、多形性胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤和胃癌。

15. 根据权利要求1-12中任一项所述的组合产品,其中所述癌症选自下组:小细胞肺癌、非小细胞肺癌、结直肠癌、胶质母细胞瘤和费城染色体阳性急性淋巴细胞白血病(Ph+ ALL)。

16. 根据权利要求1-12中任一项所述的组合产品,进一步包含另外的治疗剂。

17. 根据权利要求16所述的组合产品,其中所述另外的治疗剂是细胞毒性剂或化学治疗剂。

18. 根据权利要求11和12中任一项所述的组合产品,其中所述受试者是人。

19. 一种组合物,其包含抗PD-1抗体和抗TIM-4抗体,所述抗PD-1抗体与人PD-1结合,所述抗TIM-4抗体与人TIM-4结合且抑制肿瘤细胞的胞葬作用。

20. 根据权利要求19所述的组合物,其中所述抗PD-1抗体包含具有SEQ ID NO:13所示序列的重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域,和具有SEQ ID NO:15所示序列的轻链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域。

21. 根据权利要求20所述的组合物,其中所述抗PD-1抗体包含:

- (a) 由SEQ ID NO:17所示序列组成的重链可变区CDR1;
- (b) 由SEQ ID NO:18所示序列组成的重链可变区CDR2;
- (c) 由SEQ ID NO:19所示序列组成的重链可变区CDR3;
- (d) 由SEQ ID NO:20所示序列组成的轻链可变区CDR1;
- (e) 由SEQ ID NO:21所示序列组成的轻链可变区CDR2;和
- (f) 由SEQ ID NO:22所示序列组成的轻链可变区CDR3。

22. 根据权利要求19所述的组合物,其中所述抗PD-1抗体包含具有SEQ ID NO:1所示序列的重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域,和具有SEQ ID NO:3所示序列的轻链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域。

23. 根据权利要求22所述的组合物,其中所述抗PD-1抗体包含:

- (a) 由SEQ ID NO:5所示序列组成的重链可变区CDR1;
- (b) 由SEQ ID NO:6所示序列组成的重链可变区CDR2;
- (c) 由SEQ ID NO:7所示序列组成的重链可变区CDR3;
- (d) 由SEQ ID NO:8所示序列组成的轻链可变区CDR1;
- (e) 由SEQ ID NO:9所示序列组成的轻链可变区CDR2;和
- (f) 由SEQ ID NO:10所示序列组成的轻链可变区CDR3。

24. 根据权利要求19-23中任一项所述的组合物,其中所述抗TIM-4抗体与TIM-4的IgV结构域结合。

25. 根据权利要求1-18中任一项所述的组合产品或根据权利要求19-24中任一项所述的组合物在制备用于治疗受试者中的癌症的药物中的用途,其中所述癌症选自:母细胞瘤、淋巴瘤、白血病、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胃肠癌、鳞状细胞癌、胶质瘤、肾脏癌、卵巢癌、肝癌、子宫内膜癌、前列腺癌、胰腺癌、宫颈癌、膀胱癌、乳腺癌、头颈癌、生殖细胞肿瘤、小儿肉瘤和多发性骨髓瘤。

26. 根据权利要求25所述的用途,其中所述头颈癌是甲状腺癌。

27. 一种用于治疗受试者中的癌症的试剂盒,所述试剂盒包括与人PD-1结合的抗PD-1抗体和与人TIM-4结合的抗TIM-4抗体的组合产品,所述试剂盒包括:

- (a) 一剂所述抗PD-1抗体;
- (b) 一剂所述抗TIM-4抗体;和
- (c) 用于使用所述抗PD-1抗体和所述抗TIM-4抗体的说明书。

TIM-4拮抗剂和PD-1拮抗剂的组合及其使用方法

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求与2016年7月6日提交的美国临时申请号62/359073的优先权。前述申请的内容通过提述由此并入。

背景技术

[0003] 国家癌症研究所估计,仅在美国,就有三分之一的人在其一生中将患上癌症。此外,约有50%至60%的患有癌症的人最终将死于这种疾病。一旦肿瘤细胞从原发部位逃逸,它们就会通过淋巴和/或循环系统,并且最终少数人在远处产生转移,并且发达国家95%的实体肿瘤死亡是由于转移引起的。

[0004] 癌症肿瘤的广泛发生强调了改进抗癌方案的必要性。然而,尽管多模式治疗取得了进展,但癌症患者的总体存活率增加受到限制。因此,本发明的目的是提供用于治疗患有这样的肿瘤的受试者的改进方法。

[0005] 发明概述

[0006] 本发明的发明人首次发现TIM-4拮抗剂(例如,抗体)和抗PD-1拮抗剂(例如,抗体)的共同施用有效抑制体内肿瘤生长,甚至协同抑制。因此,本发明的目的是提供用于治疗患有癌症的受试者的改进方法。具体地,本发明的目的是提供有效的组合治疗方案,其中TIM-4拮抗剂与抗PD-1拮抗剂组合用于治疗癌症。

[0007] 在一方面,本发明提供了通过共同施用有效量的PD-1拮抗剂和TIM-4拮抗剂来治疗受试者中的癌症的方法。

[0008] 适用于本发明方法的TIM-4拮抗剂,包括但不限于配体、抗体(例如,单克隆抗体和双特异性抗体)和多价药剂。TIM-4拮抗剂可以是非活化配体或配体结合配偶体(例如,小分子、工程化的PS模拟物或可溶性TIM-1,或其他结合蛋白)。在一个实施方案中,TIM-4拮抗剂是抗TIM4抗体。在一个实施方案中,TIM-4拮抗剂是结合TIM-4的IgV结构域内的表位的抗体。在另一个实施方案中,TIM-4拮抗剂是抗体,诸如9F4、RMT4-53、RMT4-54、F31-563或21T112。

[0009] 示例性抗TIM-4抗体含有重链和轻链,其包含9F4、RMT4-53、RMT4-54、F31-563或21T112的重链和轻链CDR,并且任选地包含与相应抗体的框架区具有至少约90%氨基酸序列同一性的框架区。抗TIM-4抗体还可以包含,与抗体9F4、RMT4-53、RMT4-54、F31-563或21T112的重链和轻链可变结构域至少约90%、95%或99%同一性的重链和轻链可变结构域。在某些实施方案中,抗TIM-4拮抗剂抗体与9F4、RMT4-53、RMT4-54、F31-563或21T112竞争结合,和/或结合TIM-4上与9F4、RMT4-53、RMT4-54、F31-563或21T112相同的表位。

[0010] 适用于本发明方法的PD-1拮抗剂,包括但不限于配体、抗体(例如,单克隆抗体和双特异性抗体)和多价药剂。在一个实施方案中,PD-1拮抗剂是抗PD-1或抗PD-L1抗体。在另一个实施方案中,PD-1拮抗剂是抗体,诸如MK-3475或CT-011。在一个实施方案中,PD-1拮抗剂是融合蛋白,例如,Fc融合蛋白,诸如AMP-244。

[0011] 示例性抗PD-1抗体是5C4(在WO 2006/121168中称为5C4;也称为MDX-1106、ONO-

4538和nivolumab)，其包含分别具有SEQ ID N0s:11和12中所示序列的重链和轻链，或其抗原结合片段和变体。在其他实施方案中，抗体包含5C4的重链和轻链CDR或可变区(VR)。因此，在一个实施方案中，抗体包含具有SEQ ID N0:13中所示序列的5C4的VH区的CDR1、CDR2和CDR3结构域，以及具有SEQ ID N0:15中所示序列的5C4的VL区的CDR1、CDR2和CDR3结构域。在另一个实施方案中，抗体包含分别具有SEQ ID N0:17、18和19中所示序列的重链CDR1、CDR2和CDR3结构域，以及分别具有SEQ ID N0:20、21和22中所示序列的轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域。在另一个实施方案中，抗体包含分别具有SEQ ID N0:13和/或SEQ ID N0:15所示氨基酸序列的VH和/或VL区。在另一个实施方案中，抗体包含分别由SEQ ID N0:14和/或SEQ ID N0:16中所示的核酸序列编码的重链可变(VH)和/或轻链可变(VL)区。在另一个实施方案中，抗体与上述抗体竞争结合，和/或结合PD-1上与上述抗体相同的表位。在另一个实施方案中，抗体与上述抗体具有至少约90%的可变区氨基酸序列同一性(例如，与SEQ ID N0:13或SEQ ID N0:15具有至少约90%、95%或99%的可变区同一性。

[0012] 在一个实施方案中，PD-1拮抗剂是抗PD-L1抗体，诸如MEDI4736(也称为抗-B7-H1)或MPDL3280A(也称为RG7446)。示例性的抗PD-L1抗体是12A4(在WO 2007/005874和美国专利号7,943,743中称为12A4)。在一个实施方案中，抗体包含12A4的重链和轻链CDR或VR。因此，在一个实施方案中，抗体包含具有SEQ ID N0:1中所示序列的12A4的VH区的CDR1、CDR2和CDR3结构域，以及具有SEQ ID N0:3中所示序列的12A4的VL区的CDR1、CDR2和CDR3结构域。在另一个实施方案中，抗体包含分别具有SEQ ID N0:5、6和7中所示序列的重链CDR1、CDR2和CDR3结构域，以及分别具有SEQ ID N0:8、9和10中所示序列的轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域。在另一个实施方案中，抗体包含分别具有SEQ ID N0:1和/或SEQ ID N0:3所示氨基酸序列的VH和/或VL区。在另一个实施方案中，抗体包含分别由SEQ ID N0:2和/或SEQ ID N0:4所示的核酸序列编码的重链可变(VH)和/或轻链可变(VL)区。在另一个实施方案中，抗体与上述抗体竞争结合，和/或结合PD-L1上与上述抗体相同的表位。在另一个实施方案中，抗体与上述抗体具有至少约90%的可变区氨基酸序列同一性(例如，与SEQ ID N0:1或SEQ ID N0:3具有至少约90%、95%或99%的可变区同一性。

[0013] 在一个实施方案中，本发明提供了一种治疗受试者中的癌症的方法，该方法包括向受试者施用有效量的PD-1拮抗剂和TIM-4拮抗剂，其中

[0014] (a) PD-1拮抗剂是抗体，其包含具有SEQ ID N0:13所示序列的重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域，和具有SEQ ID N0:15所示序列的轻链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域；和

[0015] (b) TIM-4拮抗剂是抗体。

[0016] 在另一个实施方案中，本发明提供治疗受试者中的癌症的方法，该方法包括向受试者施用有效量的PD-1拮抗剂和TIM-4拮抗剂，其中

[0017] (a) PD-1拮抗剂是抗体，其包含具有SEQ ID N0:1所示序列的重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域，和具有SEQ ID N0:3所示序列的轻链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域；和

[0018] (b) TIM-4拮抗剂是抗体。

[0019] 可以使用任何合适的方法评估本文提供的治疗方法的功效。在一个实施方案中，该治疗产生至少一种治疗效果，该治疗效果选自肿瘤大小的减少、转移病灶数量随时间的

减少、完全反应、部分反应和疾病稳定。在另一个实施方案中，PD-1拮抗剂和TIM-4拮抗剂的施用导致至少1, 1.25, 1.50, 1.75, 2, 2.25, 2.50, 2.75, 3, 3.25, 3.5, 3.75或4倍肿瘤体积的减少，例如，相对于单独用PD-1拮抗剂或TIM-4拮抗剂治疗，或相对于治疗开始前的肿瘤体积。在另一个实施方案中，PD-1拮抗剂和TIM-4拮抗剂的施用导致肿瘤体积减少至少1倍、2倍或更优选3倍，例如，相对于单独用PD-1拮抗剂或TIM-4拮抗剂治疗，或相对于治疗开始前的肿瘤体积。在进一步的实施方案中，PD-1拮抗剂和TIM-4拮抗剂的施用导致肿瘤生长抑制至少50%、60%、70%或80%，例如，相对于用单独用PD-1拮抗剂或TIM-4拮抗剂治疗，或相对于治疗开始前的肿瘤体积。在某些实施方案中，肿瘤体积减少50%、60%、70%、80%、90%或更多，例如，相对于治疗开始前的肿瘤大小。

[0020] PD-1拮抗剂和TIM-4拮抗剂可根据合适的剂量、途径(例如，静脉内、腹膜内、肌内、鞘内或皮下)施用。拮抗剂和激动剂也可以根据任何合适的方案施用。例如，拮抗剂和激动剂可以在单一制剂中同时施用。或者，可以配制拮抗剂和激动剂用于分开施用，其中它们同时或相继施用。在一个实施方案中，在施用TIM-4拮抗剂之前施用PD-1拮抗剂。在另一个实施方案中，在施用PD-1拮抗剂之前施用TIM-4拮抗剂。在进一步的实施方案中，TIM-4拮抗剂和PD-1拮抗剂同时施用。

[0021] 在一个实施方案中，癌症选自下组的癌症：癌、肉瘤、母细胞瘤、淋巴瘤和白血病。在一个实施方案中，癌症选自下组：小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胃肠癌、结直癌、胃癌、结肠癌和胶质母细胞瘤。在另一个实施方案中，癌症选自下组：慢性髓性白血病、急性淋巴细胞白血病、费城染色体阳性急性淋巴细胞白血病(Ph+ALL)、鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胶质瘤、胃肠癌、肾脏癌、卵巢癌、肝癌、结直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、前列腺癌、甲状腺癌、神经母细胞瘤、胰腺癌、多形性胶质母细胞瘤、宫颈癌、胃部癌、膀胱癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌、和头颈癌、胃癌、生殖细胞肿瘤、小儿肉瘤、鼻窦自然杀伤、多发性骨髓瘤、急性髓性白血病(AML)和慢性淋巴细胞白血病(CML)。

[0022] 其他药剂和疗法可以与本文所述的激动剂和拮抗剂组合施用。在一个实施方案中，该方法包括施用另外的治疗剂(例如，细胞毒素或化学治疗剂)。

[0023] 本文还提供了包含PD-1拮抗剂和TIM-4拮抗剂的组合物。在一个实施方案中，拮抗剂是配体、抗体(例如，单克隆抗体或双特异性抗体)或多价药剂。在另一个实施方案中，PD-1拮抗剂是抗PD-1抗体，其包含5C4的重链和轻链CDR或VR。在另一个实施方案中，PD-1拮抗剂是抗PD-L1抗体，其包含12A4的重链和轻链CDR或VR。

[0024] 还提供了用于治疗受试者中的癌症的试剂盒，该试剂盒包括：

[0025] (a)一剂量的PD-1拮抗剂；

[0026] (b)一剂量的TIM-4拮抗剂；和

[0027] (c)用于在本文所述的方法中使用PD-1拮抗剂和TIM-4拮抗剂的说明书。在一个实施方案中，TIM-4拮抗剂是抗体。在另一个实施方案中，PD-1拮抗剂是抗体。在一个具体实施方案中，PD-1拮抗剂是抗PD-1抗体，其包含具有SEQ ID NO:13所示序列的重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域，以及具有SEQ ID NO:15所示序列的轻链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域。在另一个具体的实施方案中，PD-1拮抗剂是包含抗体的抗PD-L1抗体，其包含具有SEQ ID NO:1所示序列的重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域，以及具有SEQ ID NO:3所示序列的轻链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域。

[0028] 根据以下详细描述和实施,本公开的其他特征和优点将是显而易见的,其不应被解释为限制性的。

附图说明

- [0029] 图1描述了人TIM-4同种型1和2的氨基酸序列的比对。
- [0030] 图2描述了食蟹猴、小鼠和人TIM-4同源体的氨基酸序列的比对。
- [0031] 图3A-E是描述施用对照、TIM-4拮抗剂抗体、PD-1拮抗剂抗体,或抗PD-1抗体和抗TIM-4抗体的组合后,来自小鼠的脾和肿瘤中的骨髓细胞群的图。
- [0032] 图4A-F是描述施用对照、TIM-4拮抗剂抗体、抗PD-1抗体,或抗PD-1抗体和抗TIM-4抗体的组合后,来自小鼠的脾和肿瘤中的CD8+细胞群的图。
- [0033] 图5A-F是描述施用对照、TIM-4拮抗剂抗体、抗PD-1抗体,或抗PD-1抗体和抗TIM-4抗体的组合后,来自小鼠的脾和肿瘤中的CD4+群体的图。
- [0034] 图6A-D是描述施用对照、TIM-4拮抗剂抗体、抗PD-1抗体,或抗PD-1抗体和抗TIM-4抗体的组合后,个体小鼠中肿瘤体积(mm^3)的图。
- [0035] 图7A-B是描述施用对照、TIM-4拮抗剂抗体、抗PD-1抗体,或抗PD-1抗体和抗TIM-4抗体的组合后,小鼠中的平均和中值肿瘤体积(mm^3)的图。
- [0036] 图8是描述施用对照、TIM-4拮抗剂抗体、抗PD-1抗体,或抗PD-1抗体和抗TIM-4抗体的组合后,小鼠在第28天的肿瘤体积(mm^3)的图。
- [0037] 图9(A)是描述在CT26动物模型中施用对照、TIM-4拮抗剂抗体、抗PD-1抗体,或抗PD-1抗体和抗TIM-4抗体的组合后,小鼠的存活率的图;和(B)是表示每个治疗组的中值存活率的表。
- [0038] 图10是描述在MC38动物模型中施用对照、TIM-4拮抗剂抗体、抗PD-1抗体,或抗PD-1抗体和抗TIM-4抗体的组合后,小鼠的百分比无进展存活率的图。
- [0039] 图11显示出相对于图10中所示实验中的小鼠中植入后天数的平均肿瘤体积。
- [0040] 图12A-C显示出相对于图10和11所示实验中的小鼠中植入后天数的个体肿瘤体积。

具体实施方式

[0041] 如本文所述,本发明基于以下发现:TIM-4拮抗剂(例如,抗体)和PD-1拮抗剂(例如,抗体)的共同施用有效抑制体内肿瘤生长,甚至协同抑制。因此,本发明提供了一种用于治疗受试者中的癌症的方法,该方法包括向受试者(例如,人)施用有效量的PD-1拮抗剂和TIM-4拮抗剂。

I. 定义

[0043] 为了可以更容易地理解本说明书,首先定义某些术语。在整个详细描述中阐述了另外的定义。除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与本领域普通技术人员通常理解的含义相同的含义,并且使用免疫学,蛋白质化学,生物化学,重组DNA技术和药理学的常规方法。

[0044] 如本文所使用的,单数形式“一”、“一个”和“该”包括复数提及,除非上下文另有明确规定。除非另有说明,否则“或”或“和”的使用意指“和/或”。此外,术语“包括”以及其他形

式,诸如“包括(include)”、“包括/includes)”和“包括(included)”的使用不是限制性的。

[0045] 当提及诸如量、时间的持续时间等可测量值时,本文所用的术语“约”意指包括±20%或±10%的变化,更优选±5%,甚至更优选±1%,还更优选±0.1%。因为这些变化适合于执行所公开的方法。除非另有说明,否则本文所用的表示成分的量、性质诸如分子量、反应条件等的所有数字应理解为由术语“约”修饰。

[0046] 如本文所使用的,术语“受试者”或“患者”在本文中可互换使用,并且指哺乳动物,诸如人、小鼠、大鼠、仓鼠、豚鼠、兔、猫、狗、猴、牛、马、猪等(例如,患有癌症的患者)。

[0047] “实体瘤”包括例如肉瘤、黑素瘤、癌、前列腺癌、肺癌、结肠癌或其他实体瘤癌。

[0048] 术语“癌症”、“癌性的”或“恶性的”是指或描述哺乳动物中通常以不受调节的细胞生长为特征的生理状况。如本文所使用的,该术语包括恶变前和恶性癌症。癌症的实例包括例如白血病,淋巴瘤,母细胞瘤,癌和肉瘤。这样的癌症的更具体的例子包括慢性髓性白血病、急性淋巴细胞白血病、费城染色体阳性急性淋巴细胞白血病(Ph+ALL)、鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胶质瘤、胃肠癌、肾脏癌、卵巢癌、肝癌、结直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、前列腺癌、甲状腺癌、神经母细胞瘤、胰腺癌、多形性胶质母细胞瘤、宫颈癌、胃部癌、膀胱癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌、和头颈癌、胃癌、生殖细胞肿瘤、小儿肉瘤、鼻窦自然杀伤、多发性骨髓瘤、急性髓性白血病(AML)和慢性淋巴细胞白血病(CML)。

[0049] 如本文所使用的的术语“癌”是指从上皮细胞发展的一类癌症。具体地,癌是一种癌症,其起始于排列在身体内表面或外表面的组织,并且通常由胚胎发生期间源自内胚层或外胚层胚层的细胞产生。癌的各种亚型包括腺癌(以微观腺体相关组织细胞学、组织结构和/或腺体相关分子产物,例如粘蛋白为特征),鳞状细胞癌(可观察到的特征和指示鳞状分化的特征,例如细胞间桥、角化、鳞状细胞珠),腺鳞癌(包含腺癌和鳞状细胞癌的混合肿瘤,其中,这些细胞类型的每种包括至少10%的肿瘤体积),退行性或未分化癌(一组异质性高级癌,其特征是细胞缺乏任何更具特异性分化的肿瘤的独特组织学或细胞学证据),大细胞癌(由大而单调的圆形或明显多边形的细胞组成,细胞质丰富),小细胞癌(细胞通常呈圆形,小于静息淋巴细胞直径的3倍左右,细胞质不明显)。

[0050] 如本文所使用的,术语“免疫细胞”是指在免疫应答中起作用的细胞,包括淋巴细胞,诸如B细胞和T细胞;自然杀伤细胞;骨髓细胞,诸如单核细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞和粒细胞。

[0051] 如本文所使用的术语“免疫应答”是指细胞免疫应答,包括T细胞介导的和/或B细胞介导的免疫应答,诸如T淋巴细胞、巨噬细胞和/或自然杀伤细胞的刺激。

[0052] 术语“骨髓衍生的抑制细胞”或“MDSC”在本文中可互换使用,指来自骨髓谱系(源自骨髓干细胞的细胞家族)的一种异源免疫细胞群,树突细胞、巨噬细胞和中性粒细胞也属于该群。由于血细胞生成改变,MDSC在诸如慢性感染和癌症的病理情况中强烈扩增。MDSC进一步分为两种亚型,单核细胞MDSC和粒细胞MDSC。MDSC抑制功能在于它们抑制T细胞增殖和活化的能力。例如,在慢性炎性病况(病毒和细菌感染)或癌症下,骨髓分化倾向于MDSC的扩增。这些MDSC渗入炎症部位和肿瘤,其中它们通过抑制T细胞(例如,CD8+T细胞)和NK细胞来抑制免疫应答。MDSC还通过细胞因子和TGF-β等因子的表达加速血管生成、肿瘤进展和转移。

[0053] 术语“损伤相关分子模式”或“DAMP”在本文中可互换使用,指受损组织释放的细胞

内分子。DAMP是在细胞内具有生理作用的分子,但在暴露于细胞外环境时获得另外的功能。例如,DAMP警告身体危险,刺激炎性反应,最后促进再生过程。除了它们被死细胞被动释放之外,一些DAMP可以被经历危及生命的压力的活细胞分泌或暴露。DAMP与炎症和相关疾病有关。DAMP包括但不限于组蛋白、基因组DNA、HMGB1、IL1a、IL33、ATP、F-肌动蛋白、亲环蛋白A、HSP、尿酸晶体、S100、线粒体DNA、线粒体转录因子A、网状蛋白。

[0054] 术语“胞葬作用”指通过吞噬细胞(例如,嗜中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、肥大细胞和树突细胞)除去垂死/死细胞(例如,凋亡或坏死)的过程。在胞葬作用过程中,吞噬细胞积聚到凋亡细胞的位点,吞噬细胞的细胞膜吞噬凋亡细胞,形成大的充满液体的囊泡,含有死细胞的“胞葬体(effersome)”。胞葬作用的作用是在细胞膜完整性被破坏并且其内容物泄漏到周围组织之前去除死细胞。胞葬作用引发特定的下游细胞内信号转导途径,例如导致抗炎、抗蛋白酶和促生长作用。相反,受损的胞葬作用与自身免疫疾病和组织损伤有关。

[0055] “自噬”或“自噬作用”是通过受调节的过程分解不必要的或功能失调的细胞组分的天然的破坏性机制。自噬允许细胞组分的有序降解和再循环。在此过程中,在称为自噬体的双膜囊泡内从细胞的其余部分分离靶向的细胞质成分。然后自噬体与溶酶体融合,内容物降解并再循环。通常描述了三种不同形式的自噬,即巨自噬、微自噬和伴侣介导的自噬。在疾病的背景下,自噬被视为对促进存活的压力的适应性反应,而在其他情况下,它似乎促进细胞死亡和发病。

[0056] 如本文所使用的,术语“处理(treat)”,“处理(treating)”和“治疗(treatment)”指对受试者进行或向受试者施用活性剂或活性剂组合的任何类型的干预或过程,目的是逆转、缓解、改善、抑制或减缓或预防与疾病相关的症状、并发症、病况或生化指标的进展、发展、严重性或复发。

[0057] 如本文所使用的,“有效治疗”或“阳性治疗反应”指产生有益效果的治疗,例如改善疾病或病症(例如,癌症)的至少一种症状。有益效果可以采取相对于基线的改进的形式,即,在根据该方法开始治疗之前进行的测量或观察的改进。例如,有益效果可以采取减缓、稳定、停止或逆转受试者在任何临床阶段的癌症进展的形式,如通过减少或消除疾病的临床或诊断症状,或癌症的标志来证明。有效治疗可以例如,减小肿瘤大小,减少循环肿瘤细胞的存在,减少或预防肿瘤转移,减缓或阻止肿瘤生长和/或预防或延迟肿瘤复发或再发。

[0058] 术语“有效量”或“治疗有效量”指提供所需生物学、治疗和/或预防性结果的药剂或药剂组合的量。该结果可以是疾病的体征、症状或原因中的一种或多种的减少、改善、缓解、减轻、延迟和/或减轻,或生物系统的任何其他希望的改变。关于实体瘤,有效量包括足以引起肿瘤缩小和/或降低肿瘤生长速率(诸如抑制肿瘤生长)或预防或延迟其他不需要的细胞增殖的量。在一些实施方案中,有效量是足以延迟肿瘤发展的量。在一些实施方案中,有效量是足以预防或延迟肿瘤复发的量。有效量可以在一次或多次施用中施用。有效量的药物或组合物可以:(i)减少癌细胞的数量;(ii)减小肿瘤大小;(iii)抑制、延缓、缓慢到一定程度,并可能阻止癌细胞浸润到外周器官;(iv)抑制(即,在某种程度上缓慢并且可以阻止肿瘤转移);(v)抑制肿瘤生长;(vi)预防或延迟肿瘤的发生和/或复发;和/或(vii)在一定程度上缓解一个或多个与癌症相关的症状。在一个实例中,“有效量”是PD-1拮抗剂(例如,抗体)和TIM-4拮抗剂抗体(例如,抗体)的组合,以实现癌症的显着减少或癌症进展的减缓,

诸如晚期实体肿瘤。根据本文所述的方法,在“有效方案”中施用有效量的联合疗法,所述“有效方案”是指PD-1拮抗剂和TIM-4拮抗剂的组合,其中施用顺序和给药频率足以实现治疗。

[0059] “最佳生物剂量(OBD)”定义为在没有临幊上不可接受的毒性的情况下提供最佳和持久的体内反应的药剂或药剂的组合物的最小剂量。毒性和治疗功效可以通过细胞培养物或实验动物中的标准制药程序来确定,例如,用于确定LD50(对50%的群体致死的剂量)和ED50(在50%的群体中治疗有效的剂量)。毒性和治疗效果之间的剂量比是治疗指数,并且可以表示为LD50/ED50比。

[0060] 如本文所使用的,术语“协同作用”、“治疗性协同作用”和“协同效应”指一种现象,其中用治疗剂的组合(例如,PD-1拮抗剂与TIM-4拮抗剂组合)治疗患者表现出治疗上优于单独使用时所用组合的每个单个成分所取得的结果的结果(参见,例如,T.H.Corbett et al., 1982, *Cancer Treatment Reports*, 66, 1187)。在该上下文中,治疗上优越的结果包括以下中的一个或多个:(a)治疗反应的增加,其大于单独的每种药剂在与组合中相同的剂量下的单独作用的总和;(b)组合中一种或多种药剂的剂量减少而治疗功效没有降低;(c)不良事件的发生率降低,同时获得的治疗益处等于或大于每种药剂在与组合中相同的剂量下的单一疗法,(d)减少剂量限制性毒性,同时获得比每种药剂的单一疗法更大的治疗益处;(e)延迟或尽量减少诱导耐药性。在异种移植模型中,以其最大耐受剂量使用的组合,其中每种成分将以通常不超过其个体最大耐受剂量的剂量存在,当通过施用组合实现的肿瘤生长减少时表现出治疗协同作用。当单独施用该成分时,大于最佳成分的肿瘤生长减少的值。例如,可以根据Chou-Talalay的组合指数(CI)定理来确定药物组合的协同作用(Chou et al., *Adv. Enzyme Regul.* 1984; 22:27-55; Chou, *Cancer Res.* 2010; 70(2): 440-446)。

[0061] “无癌症”或“无疾病”或NED(无疾病证据)意指患者已证实通过目前的护理疗法标准治疗诱导的临床反应。“临床反应”是指癌症的临床体征、放射学体征和症状已经显着减少或基于临床诊断完全消失,尽管癌细胞仍然存在于体内。因此,考虑临床反应涵盖部分和完全反应。残留癌细胞的存在可以通过诸如CTC(循环肿瘤细胞)的测定来计数,并且可以预测复发。

[0062] “再发”或“复发”或“再现”在本文中可互换使用,并且指在一段改善或响应之后癌症的返回的放射学诊断,或返回的体征和症状。

[0063] 如本文所使用的,术语“拮抗剂”指阻断(例如,减少或预防)生物活性的分子。术语“抑制(inhibit)”或“抑制(inhibition)”意指减少可测量的量。

[0064] 如本文所使用的,术语“配体”指与生物分子(例如,受体)形成复合物以用于生物学目的分子。在狭义上,是一种信号触发分子,与靶蛋白上的位点结合。结合通过分子间力发生,诸如离子键、氢键和范德华力。对接(关联)通常是可逆的(解离)。配体与其靶分子之间的实际不可逆共价结合在生物系统中是罕见的。与受体(受体蛋白)结合的配体改变其化学构象(三维形状)。受体蛋白的构象状态决定了其功能状态。

[0065] 蛋白质的“水平”指使用本领域已知的用于测量蛋白质水平的任何方法测定的样品中蛋白质的量,所述方法包括电泳、毛细管电泳、高效液相色谱(HPLC)、薄层色谱(TLC)、高扩散色谱、流体或凝胶沉淀反应、吸收光谱、比色测定、分光光度测定、流式细胞术、免疫扩散、溶液相测定、免疫电泳、蛋白质印迹、放射免疫测定(RIA)、酶联免疫吸附测定

(ELISA)、免疫荧光测定和电化学发光免疫分析。

[0066] 术语“样品”指从受试者分离的流体、细胞或组织的集合。生物流体在生理温度通常是液体，并且可以包括存在于受试者或生物来源中，从其中取出、表达或以其他方式提取的天然存在的流体。生物流体的实例包括血液，血清，浆膜液，血浆，淋巴液，尿液，脑脊髓液，唾液，眼液，囊液，泪滴，粪便，痰液，粘膜分泌物，阴道分泌物，妇科液体，诸如与非实体瘤相关的腹水，胸膜、心包、腹膜、腹腔和其他体腔的液体，通过支气管灌洗收集的液体等。

[0067] 如本文所使用的，术语“对照样品”指任何临床相关的对照样品，其包括例如来自健康受试者的样品或在待评估的受试者的较早时间点制备的样品。例如，对照样品可以是在癌症发作之前、疾病的早期阶段，或在治疗施用之前或一部分治疗之前从受试者取得的样品。

[0068] 如本文所使用的，术语“抗体”包括全抗体和任何抗原结合片段（即“抗原结合片段”（也称为“抗原结合部分”））。全抗体是糖蛋白，其包含通过二硫键相互连接的至少两条重（H）链和两条轻（L）链。每条重链由重链可变区（本文中缩写为 V_H ）和重链恒定区组成。重链恒定区由三个结构域 C_H1 、 C_H2 和 C_H3 组成。每条轻链由轻链可变区（本文中缩写为 V_L ）和轻链恒定区组成。轻链恒定区由一个结构域 C_L 组成。 V_H 和 V_L 区可以进一步细分为高变区，称为互补决定区（CDR），散布有更保守的区域，称为框架区（FR）。每个 V_H 和 V_L 由三个CDR和四个FR组成，按照以下顺序从氨基末端到羧基末端排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合，包括免疫系统的多种细胞（例如，效应细胞）和经典补体系统的第一组分（C1q）。术语“抗体”还涵盖嵌合抗体、人源化抗体、完全人抗体，以及多聚体形式的抗体，诸如微抗体、双-scFv、双抗体、三抗体、四抗体和化学缀合的Fab'多聚体。

[0069] 如本文所使用的，术语“抗体片段”（也称为“抗原结合片段”或“抗原结合部分”）指保留特异性结合抗原的能力的抗体的一个或多个片段。已经显示出抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段进行。涵盖在抗体的术语“抗原结合片段”内的结合片段的实例包括（i）Fab片段，由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_H1 结构域组成的单价片段；（ii）F(ab')2片段，二价片段基本上是具有部分铰链区的Fab（参见，FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY（Paul ed., 3.sup.rd ed. 1993）；（iv）由 V_H 和 C_H1 结构域组成的Fd片段；（v）由抗体单臂的 V_L 和 V_H 结构域组成的Fv片段，（vi）dAb片段（Ward et al., (1989) Nature 341:544-546），其由 V_H 结构域组成；（vii）分离的互补决定区（CDR）；和（viii）纳米抗体（也称为单结构域抗体（sdAb）），其是含有单可变结构域和两个恒定区的重链可变区。但结构域抗体包括 V_H 片段（从骆驼科动物中发现的重链抗体工程改造的单结构域抗体，以及VNAR片段（从软骨鱼的重链抗体获得的单结构域抗体（IgNAR，'免疫球蛋白新抗原受体'））。

[0070] “抗原结合支架”是与靶标（或抗原）或表位特异性结合的蛋白质，诸如包含Ig折叠或Ig样折叠的蛋白质。抗体或其抗原结合片段也是抗原结合支架。抗原结合支架可以是单价的、多价的，例如二价、三价、四价，或结合5、6或更多个表位。多价抗原结合支架可以是单特异性的或多特异性的，即与多个（至少2、3、4或5个）彼此不同的表位结合。例如，多价单特异性抗原结合支架是结合至少2、3、4或5个相同表位的蛋白质，并且可以是包含至少2、3、4或5个相同抗原结合部分的蛋白质。例如，TIM-4结合支架可包含2-10个，例如2-6个、2-5个、2-4个或2-3个TIM-4结合部分，它们可彼此相同或不同。

[0071] 多价抗体包括包含抗体的至少2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个抗原结合部分的抗体,其抗原结合部分可包含重链的一部分和轻链的一部分。抗原结合部分可以在单个多肽上或包含多于一个多肽。例如,多价抗体可以包含2-10个抗原结合部分,它们可以彼此相同或不同。多价抗体可以是单特异性的或多特异性的。多特异性抗体可以是双特异性的、三特异性的、四特异性的或与5种或更多种不同的表位结合。

[0072] 此外,尽管Fv片段的两个结构域 V_L 和 V_H 由不同的基因编码,但它们可以使用重组方法通过合成接头连接,使得它们能够作为单个蛋白质链制备,其中 V_L 和 V_H 区配对形成单价分子(称为单链Fv(scFv);参见例如,Bird et al. (1988) *Science* 242:423-426;和Huston et al. (1988) *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 85:5879-5883)。这样的单链抗体也意图被涵盖在抗体的术语“抗原结合片段”内。使用本领域技术人员已知的常规技术获得这些抗体片段,并与完整抗体相同的方式筛选片段的效用。

[0073] 如本文所使用的,“特异性结合”抗原或其表位的抗原结合支架是结合抗原或其表位的抗原结合支架, K_D 为 $10^{-7}M$ 、 $5 \times 10^{-8}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $5 \times 10^{-9}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $5 \times 10^{-10}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $5 \times 10^{-11}M$ 、 $10^{-11}M$ 、 $5 \times 10^{-12}M$ 、 $10^{-12}M$ 或更小。例如,特异性结合TIM-4的抗原结合支架是结合TIM-4的抗原结合支架, K_D 为 $10^{-7}M$ 、 $5 \times 10^{-8}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $5 \times 10^{-9}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $5 \times 10^{-10}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $5 \times 10^{-11}M$ 、 $10^{-11}M$ 、 $5 \times 10^{-12}M$ 、 $10^{-12}M$ 或更小。例如,“特异性结合人PD-1”或“特异性结合人PD-L1”的抗体意图指分别与人PD-1或PD-L1结合的抗体, K_D 为 $10^{-7}M$ 、 $5 \times 10^{-8}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $5 \times 10^{-9}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $5 \times 10^{-10}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $5 \times 10^{-11}M$ 、 $10^{-11}M$ 、 $5 \times 10^{-12}M$ 、 $10^{-12}M$ 或更小。包含2个或更多个与抗原或表位结合的区域的抗原结合支架可以与抗原或表位特异性结合,即使它与抗原或表位结合的亲和力低于上面提供的范围,因为它将与抗原或具有增加的亲合力的表位结合。

[0074] “双特异性”或“双功能抗体”是具有两个不同重链/轻链对和两个不同结合位点的人工杂合抗体。双特异性抗体可通过多种方法产生,包括杂交瘤的融合或Fab'片段的连接。参见,例如,Songsivilai&Lachmann, *Clin.Exp.Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny et al., *J.Immunol.* 148, 1547-1553 (1992)。

[0075] 如本文所使用的,术语“单克隆抗体”指来自基本上同质的抗体群体的抗体,其对特定表位显示单一结合特异性和亲和力,除了在单克隆抗体的产生过程中可能出现的可能变体,这样的变体通常以少量存在。因此,术语“人单克隆抗体”或“单克隆抗体组合物”指具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变和任选恒定区的抗体。修饰语“单克隆”表示抗体的特征是从基本上同质的抗体群体获得的,并且不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。例如,本文描述的单克隆抗体可以通过多种技术制备。在一个实施方案中,人单克隆抗体由杂交瘤产生,所述杂交瘤包括获自转基因非人动物(例如,转基因小鼠)的B细胞,其具有包含与永生化细胞融合的人重链转基因和轻链转基因的基因组。

[0076] 术语“表位”或“抗原决定簇”指免疫球蛋白或抗体特异性结合的抗原上的位点。表位可以由连续氨基酸形成,或者由蛋白质的三级折叠并置的非连续氨基酸形成。由连续氨基酸形成的表位通常在暴露于变性溶剂时保留,而通过三级折叠形成的表位通常在用变性溶剂处理时损失。表位通常包括独特空间构象中的至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸。确定表位空间构象的方法包括本领域技术和本文所述的技术,例如,X射线晶体学、HDX-MS和二维核磁共振(参见,例如,Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology, Vol.66, G.E.Morris, Ed. (1996))。

[0077] 术语“表位作图”指鉴定抗体-抗原识别的分子决定簇的过程。

[0078] 关于两种或更多种抗体,术语“结合相同的表位”意指抗体竞争结合抗原并结合相同、重叠或包含连续或不连续的氨基酸区段。本领域技术人员理解短语“与相同表位结合”并不一定意指抗体与完全相同的氨基酸结合。抗体结合的精确氨基酸可以不同。例如,第一抗体可以结合被第二抗体结合的氨基酸区段完全包含的氨基酸区段。在另一个实例中,第一抗体结合一个或多个氨基酸区段,其与由第二抗体结合的一个或多个区段显着重叠。出于本文的目的,认为这样的抗体“结合相同的表位”。如通过给定方法(例如HDX-MS、结晶学或靶突变分析)测定的两种抗体“结合相同表位”需要通过一种或多种给定方法鉴定两种抗体的相同氨基酸。

[0079] 因此,本发明还涵盖与表位结合的抗体,所述表位包含由本文所述的特定抗体识别的表位的全部或一部分(例如,相同或重叠的区域或区域之间或跨越该区域的区域),或者与通过给定方法(例如HDX-MS、结晶学或靶突变分析)测定的相同表位结合。

[0080] 本发明还涵盖与本文所述抗体竞争结合的抗体,并任选地结合相同的表位。可以使用常规技术鉴定竞争结合的抗体。这样的技术包括,例如,免疫测定,其显示出一种抗体阻断另一种抗体与靶抗原结合的能力,即竞争性结合测定。在测定中测定竞争性结合,其中待测免疫球蛋白抑制参照抗体与共同抗原的特异性结合。已知许多类型的竞争性结合测定,例如:Biacore、流式细胞术、固相直接或间接放射免疫测定(RIA)、固相直接或间接酶免疫测定(EIA)、夹心竞争测定(参见,Stahli et al.,*Methods in Enzymology* 9:242(1983));固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(参见Kirkland et al.,*J. Immunol.* 137:3614(1986));固相直接标记测定、固相直接标记夹心测定(参见Harlow和Lane,*Antibodies: A Laboratory Manual*,Cold Spring Harbor Press(1988));使用I-125标记的固相直接标记RIA(参见Morel et al.,*Mol. Immunol.* 25(1):7(1988));固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(Cheung et al.,*Virology* 176:546(1990));和直接标记的RIA。(Moldenhauer et al.,*Scand. J. Immunol.* 32:77(1990))。一般而言,这样的测定包括使用与固体表面结合的纯化抗原或携带这些中的任一种的细胞、未标记的测试免疫球蛋白和标记的参照免疫球蛋白。通过测定在测试免疫球蛋白存在下与固体表面或细胞结合的标记物的量来测量竞争性抑制。通常,测试免疫球蛋白过量存在。通常,当竞争抗体过量存在时,它会抑制参考抗体与共同抗原的特异性结合至少50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70-75%或者更多。

[0081] 表位作图方法还包括抗原:抗体复合物的晶体的X射线分析,其提供表位的原子分辨率。其他方法监测抗体与抗原片段的结合或抗原的突变变异,其中由于抗原序列内氨基酸残基的修饰而导致的结合丧失通常被认为是表位组分的指示。另外,还可以使用用于表位作图的计算组合方法。这些方法依赖于感兴趣的抗体从组合噬菌体展示或酵母展示肽文库中亲和分离特异性短肽的能力。然后将肽视为用于定义对应于用于筛选肽文库的抗体的表位的先导物(lead)。对于表位作图,还开发了计算算法,其已经显示出映射构象不连续表位。

[0082] 包含与另一多肽或分子融合的抗原结合结构域或等同物的嵌合分子(或融合分子)也涵盖在本发明中。例如,多肽可以与抗体Fc区或其部分(例如,Fc融合蛋白)融合或缀合。与多肽融合的抗体部分可包含恒定区、铰链区、CH1结构域、CH2结构域和CH3结构域,或整个结构域或其部分的任何组合。多肽也可以与上述抗体部分融合或缀合以形成多聚体。

例如,与本发明的多肽融合的Fc部分可以通过Fc部分之间的二硫键形成二聚体。通过将多肽与IgA和IgM的部分融合,可以制备更高的多聚体形式。将本发明的多肽与抗体部分融合或缀合的方法是本领域已知的。参见,例如,美国专利号5,336,603、5,622,929、5,359,046、5,349,053、5,447,851和5,112,946;EP 307,434;EP 367,166;PCT公开号WO 96/04388和WO 91/06570;Ashkenazi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:10535-10539 (1991);Zheng et al., J. Immunol., 154:5590-5600 (1995);和Vil et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:11337-11341 (1992)。

[0083] 如本文所使用的,术语“免疫缀合物”指与治疗部分,诸如细胞毒素、药物或放射性同位素连接的抗体。当与细胞毒素缀合时,这些抗体缀合物被称为“免疫毒素”。细胞毒素或细胞毒性剂包括对细胞有害(例如,杀死)的任何药剂。实例包括紫杉醇、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、依米丁、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙碱、多柔比星、柔红霉素、二羟基蒽二酮、米托蒽醌、普卡霉素、放线菌素D、1-脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普蔡洛尔和嘌呤霉素及其类似物或同系物。治疗剂包括但不限于,抗代谢物(例如,甲氨蝶呤、6-巯嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶氨烯咪胺)、烷化剂(例如,氮芥、噻替派苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲菌素、丝裂霉素C和顺-二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂)、蒽环霉素(例如,柔红霉素(以前称为红比霉素)和多柔比星)、抗生素(例如,放线菌素(原放线菌素))、博来霉素、普卡霉素和氨茴霉素(AMC),和抗有丝分裂剂(例如,长春新碱和长春碱)。用于本发明的抗体可以与放射性同位素(例如,放射性碘)缀合,以生成用于治疗癌症的细胞毒性放射性药物。

[0084] 免疫缀合物可用于修饰给定的生物反应,药物部分不应解释为限于经典的化学治疗剂。例如,药物部分可以是具有所需生物活性的蛋白质或多肽。这样的蛋白质可包括,例如,酶活性毒素或其活性片段,诸如相思豆毒素、蓖麻毒素A、假单胞菌外毒素或白喉毒素;蛋白质,诸如肿瘤坏死因子或干扰素- α 等;或者,生物反应调节剂,诸如例如淋巴因子、白细胞介素-1(“IL-1”)、白细胞介素-2(“IL-2”)、白细胞介素-6(“IL-6”)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(“GM-CSF”)、粒细胞集落刺激因子(“G-CSF”)或其他生长因子。

[0085] 将这样的治疗部分与抗体缀合的技术是公知的,参见例如Arnon et al., “Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy”, Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp.243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985) 中的;Hellstrom et al., “Antibodies For Drug Delivery”, Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp.623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987) 中的;Thorpe, “Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review”, Monoclonal Antibodies’84: Biological and Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp.475-506 (1985) 中的; “Analysis, Results, and Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy”, Monoclonal Antibodies For Cancer Detection and Therapy, Baldwin et al. (eds.), pp.303-16 (Academic Press 1985) 中, 和Thorpe et al., “The Preparation and Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates”, Immunol. Rev., 62:119-58 (1982)。

[0086] 如本文所使用的,术语“多价”指包含两个以上生物活性区段的重组分子。形成多价分子的蛋白质片段任选地可以通过多肽接头连接,所述多肽接头附接组成部分并允许各自独立地起作用。

[0087] 如本文所使用的,“功能等同物”指保持其大量原始免疫活性的肽或多肽(例如,抗体或其抗原结合部分)。例如,某些氨基酸可以取代蛋白质结构中的其他氨基酸,而不会明显丧失与结构的相互作用结合能力,诸如例如抗体的抗原结合区或底物分子上的结合位点。因此考虑从可以对所公开组合物的氨基酸序列进行多种改变,而不会明显丧失其生物学效用或活性。氨基酸取代可以基于氨基酸侧链取代基的相对相似性,例如,它们的疏水性、亲水性、电荷、大小等。考虑到多种前述特征的示例性取代是本领域技术人员公知的,并且这样的免疫功能等同物也涵盖在本发明内。

[0088] “百分比(%)氨基酸序列同一性”在本文中定义为候选序列中氨基酸残基的百分比与选定序列中的氨基酸残基相同,在比对序列并且引入缺口(如果需要)后,以实现最大百分比序列同一性,而不考虑任何保守取代作为序列同一性的一部分。用于确定氨基酸序列同一性百分比的比对可以以本领域技术范围内的各种方式实现,例如,使用公众可获得的计算机软件,例如BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2或Megalign (DNASTAR) 软件。本领域技术人员可以确定用于测量比对的适当参数,包括在所比较的序列的全长上实现最大比对所需的所有算法。

[0089] 为了本文的目的,给定氨基酸序列A比、与或对给定氨基酸序列B的%氨基酸序列同一性(或者可以将其表述为给定氨基酸序列A,其具有或包含比、与或对给定氨基酸序列B的一定的%氨基酸序列同一性)如下计算:X/Y分数的100倍,其中X是通过序列比对程序(诸如BLAST、BLAST-2、ALIGN、ALIGN-2或Megalign (DNASTAR),在该程序中A和B的比对)评分为相同匹配的氨基酸残基数,其中Y是B中氨基酸残基的总数。应当理解,当氨基酸序列A的长度不等于氨基酸序列B的长度时,A与B的%氨基酸序列同一性将不等于B与A的%氨基酸序列同一性。

[0090] II.PD-1拮抗剂

[0091] 如本文所使用的,术语“蛋白质PD-1”、“PD-1”、PD1”、“PDCD1”可与“程序性死亡1”,“程序性细胞死亡1”互换使用。完整的人PD-1序列可以在GenBank登录号U64863 (SEQ ID NO:23) 下找到。

[0092] 如本文所使用的,术语“PD-L1”、“PDL1”、“PDCD1L1”、“PDCD1LG1”、“CD274”、“B7同系物1”、“B7-H1”、“B7-H”和“B7H1”可与“程序性细胞死亡1配体1”互换使用。完整的人PD-L1氨基酸序列-同种型前体-可在GenBank登录号NP_054862.1 (SEQ ID NO:24) 下找到。完整的人PD-L1氨基酸序列-同种型b前体-可以在GenBank登录号NP_001254635.1 (SEQ ID NO:25) 下找到。

[0093] 蛋白质程序性死亡1(PD-1)是CD28受体家族的抑制成员,其还包括CD28、CTLA-4、ICOS和BTLA。PD-1在活化的B细胞、T细胞和骨髓细胞上表达(Agata et al., supra; Okazaki et al. (2002) Curr. Opin. Immunol. 14:391779-82; Bennett et al. (2003) J Immunol 170: 711-8)。该家族的初始成员CD28和ICOS是通过添加单克隆抗体后增强T细胞增殖的功能性作用而发现的(Hutloff et al. (1999) Nature 397:263-266; Hansen et al. (1980) Immunogenics 10:247-260)。通过筛选凋亡细胞中的差异表达发现PD-1(Ishida et al.

(1992) *EMBO J* 11:3887-95)。通过分别筛选细胞毒性T淋巴细胞和TH1细胞中的差异表达发现该家族的其他成员CTLA-4和BTLA。CD28、ICOS和CTLA-4都具有未配对的半胱氨酸残基,其允许同源二聚化。相反,建议PD-1作为单体存在,其缺乏其他CD28家族成员中未配对的半胱氨酸残基特征。

[0094] PD-1蛋白是55kDa的I型跨膜蛋白,其是Ig基因超家族的一部分(Agata et al. (1996) *Int Immunol* 8:765-72)。PD-1含有膜近端免疫受体酪氨酸抑制基序(ITIM)和膜远端酪氨酸基开关基序(ITS) (Thomas, M.L. (1995) *J Exp Med* 181:1953-6; Vivier, E和 Daeron, M (1997) *Immunol Today* 18:286-91)。虽然结构上与CTLA-4相似,但PD-1缺乏对B7-1和B7-2结合至关重要的MYPPPY基序(SEQ ID NO:27)。

[0095] 与PD-1是CD28家族的抑制成员一致,PD-1缺陷型动物产生多种自身免疫表型,包括自身免疫性心肌病和伴有关节炎和肾炎的狼疮样综合征(Nishimura et al. (1999) *Immunity* 11:141-51; Nishimura et al. (2001) *Science* 291:319-22)。此外,已发现PD-1在自身免疫性脑脊髓炎、系统性红斑狼疮、移植物抗宿主病(GVHD)、I型糖尿病和类风湿性关节炎中起作用(Salama et al. (2003) *J Exp Med* 198:71-78; Prokunina和Alarcon-Riquelme (2004) *Hum Mol Genet* 13:R143; Nielsen et al. (2004) *Lupus* 13:510)。在鼠B细胞肿瘤系中,显示PD-1的ITS对于阻断下游效应分子的BCR介导的Ca²⁺流动和酪氨酸磷酸化是必需的(Okazaki et al. (2001) *PNAS* 98:13866-71)。

[0096] 已经鉴定了PD-1的两种配体,PD-L1和PD-L2,其已显示在与PD-1结合时下调T细胞活化(Freeman et al. (2000) *J Exp Med* 192:1027-34; Latchman et al. (2001) *Nat Immunol* 2:261-8; Carter et al. (2002) *Eur J Immunol* 32:634-43)。PD-L1和PD-L2都是与PD-1结合的B7同源物,但不与其他CD28家族成员结合。PD-L1在多种人类癌症中是丰富的(Dong et al. (2002) *Nat. Med.* 8:787-9)。PD-1和PD-L1之间的相互作用导致肿瘤浸润淋巴细胞的减少、T细胞受体介导的增殖的减少和癌细胞的免疫逃避(Dong et al. (2003) *J. Mol. Med.* 81:281-7; Blank et al. (2005) *Cancer Immunol. Immunother.* 54:307-314; Konishi et al. (2004) *Clin. Cancer Res.* 10:5094-100)。通过抑制PD-1与PD-L1的局部相互作用可以逆转免疫抑制,并且当PD-1与PD-L2的相互作用被阻断时,效果也是相加的(Iwai et al. (2002) *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 99:12293-7; Brown et al. (2003) *J. Immunol.* 170:1257-66)。

[0097] 本发明的方法涉及使用PD-1拮抗剂(例如,抗体)与TIM-4拮抗剂(例如,抗体)用于治疗癌症。因此,本发明的PD-1拮抗剂与PD-1的配体结合并干扰、减少或抑制一种或多种配体与PD-1受体的结合,或直接与PD-1受体结合,而不参与通过PD-1受体的信号转导。在一个实施方案中,PD-1拮抗剂直接结合PD-1并阻断PD-1抑制性信号转导。在另一个实施方案中,PD-1拮抗剂结合PD-1的一种或多种配体(例如,PD-L1和PD-L2)并减少或抑制配体触发通过PD-1的抑制性信号转导。在一个实施方案中,PD-1拮抗剂直接结合PD-L1,抑制或阻止PD-L1结合PD-1,从而阻断PD-1抑制性信号转导。

[0098] 用于本发明方法和组合物的PD-1拮抗剂包括PD-1结合支架蛋白,包括但不限于PD-1配体、抗体和多价药剂。在一个具体实施方案中,拮抗剂是融合蛋白,诸如AMP-224。在另一个实施方案中,拮抗剂是抗PD-1抗体(“PD-1抗体”)。适用于本发明的抗人PD-1抗体(或由其衍生的VH和/或VL结构域)可以使用本领域公知的方法生成。或者,可以使用本领域公

认的抗PD-1抗体。例如,可以使用抗体nivolumab (OPDIVOTM)、MK-3475 (pembrolizumab (KEYTRUDATM)、PDR001或CT-011。另外,可以使用WO 2006/121168中描述的单克隆抗体5C4、17D8、2D3、4H1、4A11、7D3和5F4,其教导通过提及并入本文。也可以使用与任何这些本领域公认的抗体竞争结合PD-1的抗体。

[0099] 示例性的抗PD-1抗体是5C4,其包含分别具有SEQ ID NO:11和12中所示序列的重链和轻链,或其抗原结合片段和变体。在其他实施方案中,抗体包含重链和轻链CDR或5C4的可变区。因此,在一个实施方案中,抗体包含具有SEQ ID NO:13所示序列的5C4的VH的CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及具有SEQ ID NO:15所示序列的5C4的VL的CDR1、CDR2和CDR3结构域。在另一个实施方案中,抗体包含分别具有SEQ ID NO:17、18和19中所示序列的CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及分别具有SEQ ID NO:20、21和22中所示序列的CDR1、CDR2和CDR3结构域。在另一个实施方案中,抗体包含分别具有SEQ ID NO:13和/或SEQ ID NO:15所示氨基酸序列的VH和/或VL区。在另一个实施方案中,抗体包含分别由SEQ ID NO:14和/或SEQ ID NO:16中所示核酸序列编码的重链可变(VH)和/或轻链可变(VL)区。在另一个实施方案中,抗体与上述抗体竞争结合和/或结合PD-1上与上述抗体相同的表位。在另一个实施方案中,抗体与上述抗体具有至少约90%的可变区氨基酸序列同一性(例如,与SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:15具有至少约90%、95%或99%的可变区同一性)。

[0100] 在某些实施方案中,PD1抗体显示出一种或多种所需的功能特性,诸如与PD-1的高亲和力结合,例如与 K_D 为10-7M或更低的人PD-1结合;与其他CD28家族成员例如CD28、CTLA-4和ICOS缺乏显着的交叉反应;在混合淋巴细胞反应(MLR)测定中刺激T细胞增殖的能力;增加MLR中IFN- γ 和/或IL-2分泌的能力;抑制一种或多种PD-1配体(例如,PD-L1和/或PD-L2)与PD-1结合的能力;刺激抗原特异性记忆反应的能力;刺激抗体反应和/或抑制体内肿瘤细胞生长的能力。

[0101] 在另一个实施方案中,PD-1拮抗剂是抗PD-L1抗体。适用于本发明的抗人PD-L1抗体(或由其衍生的VH和/或VL结构域)可以使用本领域公知的方法生成。或者,可以使用本领域公认的抗PD-L1抗体。例如,可以使用MEDI4736(也称为抗B7-H1;durvalumab (IMFINZITM))、MPDL3280A(atezolizumab (TECENTRIQTM)也称为RG7446)和avelumab (BAVENCIOTM)。另外,可以使用WO 2007/005874和美国专利号7,943,743中描述的单克隆抗体12A4、3G10、10A5、5F8、10H10、1B12、7H1、11E6、12B7和13G4,其教导在此通过提及由此并入。也可以使用与任何这些本领域公认的抗体竞争结合PD-L1的抗体。

[0102] 示例性的抗PD-L1抗体是12A4(WO 2007/005874和美国专利号7,943,743)。在一个实施方案中,抗体包含12A4的重链和轻链CDR或VR。因此,在一个实施方案中,抗体包含具有SEQ ID NO:1中所示序列的12A4的VH区的CDR1、CDR2和CDR3结构域,和具有SEQ ID NO:3中所示序列的12A4的VL区的CDR1、CDR2和CDR3结构域。在另一个实施方案中,抗体包含分别具有SEQ ID NO:5、6和7中所示序列的重链CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及分别具有SEQ ID NO:8、9和10中所示序列的轻链CDR1、CDR2和CDR3结构域。在另一个实施方案中,抗体包含分别具有SEQ ID NO:1和/或SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的VH和/或VL区。在另一个实施方案中,抗体包含分别由SEQ ID NO:2和/或SEQ ID NO:4所示的核酸序列编码的重链可变(VH)和/或轻链可变(VL)区。在另一个实施方案中,抗体与上述抗体竞争结合和/或结合PD-1上与上述抗体相同的表位。在另一个实施方案中,抗体与上述抗体具有至少约90%的可变区

氨基酸序列同一性(例如,与SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:3具有至少约90%、95%或99%的可变区同一性)。

[0103] 抗PD-1或抗PD-L1抗体可分别与PD-1或PD-L1结合, K_D 为 10^{-7} M、 5×10^{-8} M、 10^{-8} M、 5×10^{-9} M、 10^{-9} M、 5×10^{-10} M、 10^{-10} M或更小。

[0104] 在某些实施方案中,抗PD-1或抗PD-L1抗体是IgG抗体,诸如IgG1、IgG2或IgG4抗体。在具体的实施方案中,抗PD-1或PD-L1抗体具有无效的恒定区。抗PD-1或PD-L1抗体可以是IgG4抗体,例如具有S228P突变的IgG4抗体。

[0105] III. TIM-4拮抗剂

[0106] 如本文所使用的,术语“TIM-4”和“TIMD-4”,也称为“T细胞免疫球蛋白和含有粘蛋白结构域的蛋白质4”、“T细胞免疫球蛋白粘蛋白受体4”、“T细胞膜蛋白质4”和“SMUCKLER”可互换使用。人TIM-4的同种型-1的完整氨基酸和核苷酸序列可分别在GenBank登录号NP_612388.2和NM_138379.2下找到(SEQ ID NO:26-27)。人TIM-4的同种型-2的完整氨基酸和核苷酸序列可分别在GenBank登录号NP_001140198.1和NM_001146726.1下找到(SEQ ID NO:28-29)(Jones et al., Int Arch Allergy Immunol. 2006; 141 (4):331-6)。图1中描述了两种人同种型的比对。

[0107] 来自食蟹猴的TIM-4同种型的氨基酸序列可以在GenBank登录号XP_005558436和EHH54702下找到,并且鼠TIM-4同种型的氨基酸序列可以在GenBank登录号NP_848874和NP_599009下找到。图2中提供了小鼠、食蟹猴和人TIM-4多肽的氨基酸序列的比对,并且人、食蟹猴和鼠_{同源体}的全长和IgV区的百分比同一性列于表1中。

[0108] 表1.TIM-4同源体

	hTIM4-FL	hTIM4 IgV
[0109]	食蟹猴	87%
	小鼠	49%
		64%

[0110] 蛋白质“TIM-4”是I型膜蛋白,即T细胞免疫球蛋白和含有粘蛋白结构域(TIM)家族的成员。人类TIM家族在人类染色体5q33.2上包含三个成员(TIM-1、TIM-3和TIM-4),位于与哮喘、过敏和自身免疫相关的染色体区域。TIM蛋白是I型细胞表面糖蛋白,具有共同的结构特征,包括具有高度保守的半胱氨酸残基的N-末端免疫球蛋白(IgV)样结构域、具有O-连接和N-连接糖基化的富含苏氨酸的粘蛋白结构域、单个跨膜结构域和细胞质区。虽然人TIM-1和TIM-3的细胞质结构域含有酪氨酸磷酸化基序,但TIM-4缺乏磷酸酪氨酸基序。

[0111] TIM-4在骨髓细胞上表达,包括来自脾、淋巴结或腹膜腔的树突细胞(DC)和巨噬细胞。已经证明TIM-4通过IgV结构域与TIM-1、MerTK、^{整联蛋白} $\alpha v \beta 3$ 和磷脂酰丝氨酸结合。MerTK和整联蛋白 $\alpha v \beta 3$ 可能在某些TIM4介导的生物活性中起作用(Nishi et al. (2014) Mol Cell Biol. 34 (8):1512-20和Toda et al. (2012) Mol Cell Biol. 32 (1):118-25)。TIM-4通过在免疫应答的诱导期期间抑制幼稚T细胞并增强效应期的T细胞应答来差异调节T细胞稳态(Rodriguez-Manzanet等,同上)。例如,TIM-4与存在于活化的T细胞上的TIM-1结合,并共刺激T细胞增殖。

[0112] TIM-4通过N-末端免疫球蛋白可变(IgV)结构域中的FG-CC'结合裂缝与磷脂酰丝氨酸(PS)结合。在DAMP释放后TIM-4上调,并通过巨噬细胞增强凋亡细胞的胞葬作用

(Kobayashi, 2007; Albacker, et al., J. Immunol. 2010; 185: 6839-6849; Mizui et al. Int. Immunol. 2008; 20: 695-708)。相反, TIM-4敲除小鼠在溶酶体降解、抗原呈递和交叉激活中具有缺陷(Miyanishi 2012, Rodrigues-Manzaneta, 2010)。

[0113] 已经证明TIM-4在肿瘤微环境(TME)中的巨噬细胞和DC上表达,并且可以调节骨髓细胞和肿瘤内的抗原特异性细胞毒性T细胞之间的相互作用。Bahgadadi等(同上)报道了TIM-4+骨髓衍生的巨噬细胞(BMDM)摄取凋亡的肿瘤细胞,表明TIM-4通过促进摄入的肿瘤细胞过度溶酶体降解而有助于免疫耐受,导致TIM-4+肿瘤相关巨噬细胞的肿瘤抗原呈递受损。抑制该功能似乎在用抗TIM-4阻断抗体单一疗法后促进抗肿瘤活性,并且当在疫苗疗法模型的背景下与抗TIM-3阻断抗体组合时显示出协同的抗肿瘤活性(Baghadadi 2013)。

[0114] 关于TIM-4使用的术语“拮抗剂”指在体外、原位或体内部分或完全抑制TIM-4的一种或多种生物活性的任何分子。这样的生物活性的实例包括TIM-4与PS的结合,肿瘤细胞的胞葬作用和肿瘤抗原呈递的抑制,以及文献中进一步报道的那些。TIM-4拮抗剂可以以直接或间接方式起作用。例如, TIM-4拮抗剂可以起到在体外、原位或体内部分或完全抑制TIM-4的一种或多种生物活性的作用,这是由于阻断直接结合TIM-4至PS和/或阻断TIM-4与其他PS受体的相互作用,并降低细胞参与肿瘤细胞的胞葬作用的能力。拮抗剂还可以通过干扰TIM-4与TIM-1的相互作用起作用,由此阻止直接T细胞调节活性。TIM-4拮抗剂还可以间接地起到在体外、原位或体内部分或完全抑制TIM-4的一种或多种生物活性的作用,例如,抑制另一个分子,然后阻止TIM-4的激活或表达。考虑拮抗剂可以充当间接起作用以阻断、抑制或降低TIM-4表达或活性的分子。

[0115] TIM-4拮抗剂可以是直接或间接抑制或降低TIM-4活性并减少肿瘤生长的任何分子,无论是单独使用还是与另一种治疗如PD-1拮抗剂组合。示例性TIM-4拮抗剂包括TIM-4结合支架,诸如抗TIM-4抗体(“TIM-4抗体”),例如嵌合、人源化或完全人抗体、其抗原结合部分,或基于或衍生自任何这些的分子。TIM-4拮抗剂也可以是非抗体蛋白质。例如, TIM-4拮抗剂还包括修饰的TIM-4配体或结合蛋白,例如TIM-1和衍生自PS或基于PS的分子。此外, TIM-4调节的生物学可能受到融合蛋白诸如TIM-4:Ig的干扰。

[0116] TIM-4拮抗剂可以是单价的或多价的。在某些实施方案中, TIM-4拮抗剂是二价、三价、四价或结合5、6、7、8、9、10或更多个TIM-4表位,其可以是相同或不同的TIM-4表位。在某些实施方案中, TIM-4拮抗剂是多价单特异性TIM-4结合支架,例如包含TIM-4结合支架的蛋白质,其包含至少2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个特异性结合相同TIM-4表位的区域,该结合区可以由相同或不同的氨基酸序列组成。例如, TIM-4拮抗剂可以是TIM-4结合支架,其包含相同TIM-4结合区的2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个重复序列,例如N-末端IgV区或其含有IgV区的FG-CC’结合裂缝的部分。

[0117] 在某些实施方案中, TIM-4拮抗剂特异性结合TIM-4,但不显着或特异性结合TIM家族的其他成员,诸如TIM-1或TIM-3。在其他实施方案中, TIM-4拮抗剂特异性结合TIM-4和TIM-1。

[0118] 在另一个实施方案中, TIM-4拮抗剂是抗体,例如与人TIM-4结合的抗体, K_D 为 $10^{-7} M$ 、 $5 \times 10^{-8} M$ 、 $10^{-8} M$ 、 $5 \times 10^{-9} M$ 、 $10^{-9} M$ 、 $5 \times 10^{-10} M$ 、 $10^{-10} M$ 或更低, 其中抗体抑制肿瘤生长, 和/或增加肿瘤抗原特异性CTL。结合人TIM-4的抗体是本领域已知的。这些抗体中的任何一种都可以与PD-1拮抗剂组合使用, 条件是它们的组合导致抑制肿瘤生长或肿瘤大小减小, 例如

在患有癌症的受试者中。示例性抗体包括与TIM-4的N末端IgV结构域特异性结合的抗体(例如,FG-CC"结合裂缝)。抗TIM-4抗体包括结合人TIM-4的抗体,例如9F4(BioLegend)。抗小鼠抗TIM4抗体包括RMT4-53(BioXCell,Genetex)、RMT4-54(BioLegend)F31-5G3和21H12(分别来自BioLegend, BD Biosciences)。这些抗体的变体,诸如包含这些抗体的CDR的抗体,或与这些抗体或抗体中的一种竞争与人或鼠TIM-4结合的抗体,或结合TIM-4上的与这些可以与PD-1拮抗剂组合使用的抗体相同或相似表位的抗体。

[0119] 在某些实施方案中,用于本文所述方法的抗TIM4抗体结合人TIM-4上不是IgV结构域的区域,并且可以是例如茎结构域或TIM-4的细胞外结构域中的任何其他区域,条件是该抗体拮抗TIM-4的生物活性,并且当用于治疗癌症时(至少相对于单独的任何一种药剂),其与PD-1拮抗剂至少具有累加效应。

[0120] 在另一个实施方案中,TIM-4拮抗剂是多价药剂,诸如多聚体(例如,具有三聚结构域的多肽构建体和结合TIM-4的多肽)。

[0121] 还可以使用与本文列出的任何示例性药剂竞争结合TIM-4并且抑制肿瘤生长或减小肿瘤大小的药剂。可以使用具有VH和VL链的抗体,所述VH和VL链包含与本文列出的任何抗TIM-4抗体的氨基酸序列具有至少90%、95%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0122] 可以通过用磷脂酰丝氨酸(PS)结合剂(例如,膜联蛋白V肽,TIM-4结合片段)成像来监测TIM-4拮抗剂的施用,其中PS结合剂可以被标记用于成像,例如,PET、SPECT、荧光等。使结合剂与靶肿瘤细胞接触,并且结合剂的存在表明PS存在并且能够与TIM-4相互作用。

[0123] 例如,膜联蛋白V是人体中普遍存在的细胞内蛋白质,其对膜结合的组成型阴离子磷脂磷脂酰丝氨酸(PS)具有纳摩尔亲和力,其在凋亡或生理应激细胞的表面上选择性表达。因此,放射性标记形式的膜联蛋白V已用于动物模型和人类I期和II期试验中,以利用示踪剂作为治疗功效的早期替代标志物(例如,Blankenberg et al. Proc. Am. J. Thoracic. Soc. 2009;6:469-476)。例如,肿瘤微环境中PS的体内监测可以用与标记放射性示踪剂(用于PET或SPECT)连接的抗膜联蛋白V,或用与标记物或放射性示踪剂连接的TIM-4融合蛋白进行。标签可包括用于近红外成像的q点,或其他更常规的标记物。可以用放射性标记的抗体进行pK/Kd研究。

[0124] IV. 成分

[0125] 在一个方面,本发明提供了包含PD-1拮抗剂和TIM-4拮抗剂的组合物(例如,在单一组合物中一起配制或单独配制)。在一个实施方案中,PD-1拮抗剂是nivolumab、pembrolizumab、durvalumab、atezolizumab、avelumab或PDR001。在一个实施方案中,组合物包含PD-1拮抗剂和TIM-4拮抗剂,其中(a)PD-1拮抗剂是抗PD-1抗体,其包含具有SEQ ID NO:13所示序列的重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域的,以及具有SEQ ID NO:15所示序列的轻链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域;(b)TIM-4拮抗剂是抗体。在另一个实施方案中,组合物包含PD-1拮抗剂和TIM-4拮抗剂,其中(a)PD-1拮抗剂是抗PD-L1抗体,其包含具有SEQ ID NO:1中所示序列的重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及具有SEQ ID NO:3中所示序列的轻链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域,和(b)TIM-4拮抗剂是抗体。

[0126] 适合向人类患者施用的药物组合物通常配制用于肠胃外施用,例如在液体载体中,或适于重构成液体溶液或悬浮液用于静脉内施用。

[0127] 一般而言,此类组合物通常包含药学上可接受的载体。如本文所使用的,术语“药

学上可接受的”意指由政府管理机构批准或在美国药典或其他公认的药典中列出用于动物,特别是人类。术语“载体”指与化合物一起施用的稀释剂、佐剂、赋形剂或载体。这样的药物载体可以是无菌液体,诸如水和油,包括石油、动物、植物或合成来源的那些,诸如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油、甘油聚乙二醇蓖麻油酸酯等。水或盐水溶液和葡萄糖水溶液和甘油溶液可用作载体,特别是用于可注射溶液。用于肠胃外施用的液体组合物可以配制用于通过注射或连续输注施用。通过注射或输注施用的途径包括静脉内、腹膜内、肌肉内、鞘内和皮下。

[0128] 对于口服使用,本发明的药物组合物可以例如以片剂或胶囊、粉末、可分散的颗粒或扁囊剂的形式施用,或作为水溶液或悬浮液施用。在口服使用片剂的情况下,通常使用的载体包括乳糖、玉米淀粉、碳酸镁、滑石和糖,并且通常加入润滑剂诸如硬脂酸镁。对于胶囊形式的口服施用,有用的载体包括乳糖、玉米淀粉、碳酸镁、滑石和糖。当含水悬浮液用于口服施用时,通常加入乳化剂和/或悬浮剂。

[0129] 此外,可以将甜味剂和/或调味剂加入口腔组合物中。对于肌内、腹膜内、皮下和静脉内使用,通常使用活性成分的无菌溶液,并且应适当调节和缓冲溶液的pH。对于静脉内使用,应控制溶质的总浓度以使制剂等渗。

[0130] 为了制备根据本发明的栓剂,首先将低熔点蜡诸如脂肪酸甘油酯或可可脂的混合物熔化,并且例如通过搅拌将活性成分均匀地分散在蜡中。然后将熔融的均匀混合物倒入方便大小的模具中并使其冷却,从而固化。

[0131] 液体制剂包括溶液、悬浮液和乳液。这样的制剂的例子是用于肠胃外注射的水或水/丙二醇溶液。液体制剂还可包括用于鼻内施用的溶液。

[0132] 适于吸入的气溶胶制剂可包括溶液和粉末形式的固体,其可与药学上可接受的载体(诸如惰性压缩气体)组合。

[0133] 还包括固体制剂,其用于在使用前不久转化为用于口服或肠胃外施用的液体制剂。这样的液体形式包括溶液、悬浮液和乳液。

[0134] V. 患者人群

[0135] 本文提供了治疗患者癌症的有效方法,例如,使用TIM-4拮抗剂和PD-1拮抗剂的组合。在一个实施方案中,患者患有选自下组的癌症:癌、肉瘤、母细胞瘤、白血病和淋巴瘤。在另一个实施方案中,患者患有选自下组的癌症:非小细胞肺癌、小细胞肺癌、胃肠癌、结直肠癌、胃部癌、结肠癌和胶质母细胞瘤。在另一个实施方案中,患者患有选自以下的癌症:慢性髓性白血病、急性淋巴细胞白血病、费城染色体阳性急性淋巴细胞白血病(Ph+ALL)、鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胶质瘤、胃肠癌、肾脏癌、卵巢癌、肝癌、子宫内膜癌、肾癌、前列腺癌、甲状腺癌、神经母细胞瘤、胰腺癌、多形性胶质母细胞瘤、宫颈癌、胃部癌、膀胱癌、肝癌、乳腺癌、结肠癌、和头颈癌、胃癌、生殖细胞肿瘤、小儿肉瘤、鼻窦自然杀伤、多发性骨髓瘤、急性髓性白血病(AML)和慢性淋巴细胞白血病(CML)。

[0136] VI. 其他药剂/治疗

[0137] 本发明的组合(例如,PD-1拮抗剂与TIM-4拮抗剂组合)也可以与其他公知的疗法联合使用,这些疗法因其对抗正在治疗的癌症的特殊用途而被选择。当不合适时,本发明的组合可以替代地与已知的药学上可接受的药剂顺序使用。

[0138] 例如,本文所述的PD-1拮抗剂和TIM-4拮抗剂可进一步与另外的治疗组合(例如,

同时或分开),诸如放射、化疗(例如,使用喜树碱(CPT-11)、5-氟尿嘧啶(5-FU)、顺铂、多柔比星、伊立替康、太平洋紫杉醇、吉西他滨、顺铂、太平洋紫杉醇、多柔比星、5-fu或喜树碱+apo21/TRAIL(6X组合))、一种或多种蛋白酶体抑制剂(例如,硼替佐米)或MG132)、一种或多种Bcl-2抑制剂(例如,BH3I-2'(bcl-x1抑制剂)、AT-101(R-(-)-棉酚衍生物)、ABT-263(小分子)、GX-15-070(奥巴克拉(obatoclax))或MCL-1(髓细胞白血病细胞分化蛋白-1)拮抗剂)、iAP(凋亡蛋白抑制剂)拮抗剂(例如,smac7、smac4、小分子模拟物、合成的smac肽(参见Fulda et al., Nat Med 2002;8:808-15)、ISIS23722(LY2181308)或AEG-35156(GEM-640))、HDAC(组蛋白去乙酰化酶)抑制剂、抗CD20抗体(例如,利妥昔单抗)、血管生成发生抑制剂(例如,贝伐单抗)、靶向VEGF和VEGFR的抗血管生成剂、合成的三萜(参见Hyer et al., Cancer Research 2005;65:4799-808)、c-FLIP(细胞FLICE抑制蛋白)调节剂(例如,PPAR γ 的天然和合成配体(过氧化物酶体增殖物激活受体 γ)、5809354或5569100)、激酶抑制剂(例如,索拉非尼),和/或基因毒性药物。

[0139] 本文所述的PD-1拮抗剂和TIM-4拮抗剂可进一步与一种或多种抗增殖细胞毒性剂组合使用。可用作抗增殖细胞毒性剂的化合物的类别包括但不限于以下:

[0140] 烷基化剂(包括但不限于氮芥子(nitrogen mustard)、乙烯亚胺衍生物、烷基磺酸盐、亚硝基脲和三氮烯):尿嘧啶氮芥、氮芥(Chlormethine)、环磷酰胺(CYTOXANTM)fosfamide、美法仑、苯丁酸氮芥、哌泊溴烷、曲他胺、三亚乙基硫代磷酰胺、白消安、卡莫司汀、洛莫司汀、链佐星、达卡巴嗪和替莫唑胺。

[0141] 抗代谢物(包括但不限于叶酸拮抗剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物和腺苷脱氨酶抑制剂):甲氨蝶呤、5-氟尿嘧啶、氟尿苷、阿糖胞苷、6-巯嘌呤、6-硫鸟嘌呤、氟达拉滨磷酸盐、喷司他丁(Pentostatine)和吉西他滨。

[0142] 适用于本发明方法的抗增殖剂包括但不限于紫杉烷、太平洋紫杉醇(太平洋紫杉醇可以作为TAXOL.RTM.商购)、多西紫杉醇、圆皮海绵内酯(DDM)、dictyostatin(DCT)、Peloruside A、埃坡霉素、埃坡霉素A、埃坡霉素B、埃坡霉素C、埃坡霉素D、埃坡霉素E、埃坡霉素F、呋喃埃坡霉素D、脱氧埃坡霉素B1、[17]-脱氢脱氧埃坡霉素B、[18]脱氢癸氧基埃坡霉素B,C12,13-环丙基-埃坡霉素A、C6-C8桥联埃坡霉素A、反式-9,10-脱氢埃坡霉素D、顺式-9,10-脱氢埃坡霉素D、16-去甲基埃坡霉素B、埃坡霉素B10、圆皮海绵内酯、帕土匹龙(patupilone)(EP0-906)、KOS-862、KOS-1584、ZK-EPO、ABJ-789、XAA296A(圆皮海绵内酯)、TZT-1027(索利多亭)、ILX-651(盐酸tasidotin)、软海绵素B、艾立布林甲磺酸盐(E-7389)、Hemiasperlin(HTI-286)、E-7974、Cyrptophycins、LY-355703、美登木素生物碱免疫缀合物(Maytansinoid immunoconjugate)(DM-1)、MKC-1、ABT-751、T1-38067、T-900607、SB-715992(ispinesib)、SB-743921、MK-0731、STA-5312、eleutherobin、17 β -乙酰氨基-2-乙氧基-6-氨基-B-高-雌-1,3,5(10)-三烯-3-醇、cyclostreptin、isolaulimalide、laulimalide、4-表-7-脱羟基-14,16-二甲基-(+)-圆皮海绵内酯和cryptothilone 1,以及本领域已知的其他微管稳定剂。

[0143] 在需要与本发明的化学治疗方法联合或在治疗之前使异常增殖细胞静止的情况下,激素和类固醇(包括合成类似物),诸如17 α -乙炔雌二醇、己烯雌酚、睾酮、泼尼松、氟甲睾酮、丙酸甲雄烷酮、睾内酯,醋酸甲地孕酮、甲泼尼龙、甲基睾酮、泼尼松龙、曲安西龙、氯烯雌醚、羟孕酮、氨鲁米特、雌氮芥、甲孕酮、亮丙瑞林、氟他胺、托瑞米芬、ZOLADEXTM,也可以

施用于患者。当使用本发明的方法或组合物时,也可以根据需要施用在临床环境中用于调节肿瘤生长或转移的其他药剂,诸如抗模拟剂。

[0144] 安全有效地施用化学治疗剂的方法是本领域技术人员已知的。另外,它们的施用在标准文献中描述。例如,许多化学治疗剂的施用描述于Physicians' Desk Reference (PDR),例如1996年版(Medical Economics Company, Montvale, N.J. 07645-1742, USA);其公开内容通过提述并入本文。

[0145] PD-1拮抗剂和TIM4拮抗剂也可以与一种或多种刺激免疫系统的免疫治疗剂组合,例如结合人CTLA-4、LAG-3、GITR、OX40、IDO、CSF-1R等的药剂。

[0146] 可根据本领域公知的治疗方案施用化学治疗剂和/或放射疗法。对于本领域技术人员显而易见的是,化学治疗剂和/或放射疗法的施用可以根据所治疗的疾病和化学治疗剂和/或放射疗法对那种疾病的已知作用而变化。而且,根据熟练临床医生的知识,鉴于观察到的施用治疗剂对患者的影响,并且鉴于观察到的疾病对于施用的治疗剂反应,可以改变治疗方案(例如,施用剂量和时间)。

[0147] VII. 治疗方案

[0148] 用于治疗患者癌症的合适治疗方案包括,例如,向患者施用有效量的PD-1拮抗剂(例如,抗体)和TIM-4拮抗剂(例如,抗体)。

[0149] 如本文所使用的,辅助或组合施用(共同施用)包括以相同或不同剂型同时施用两种拮抗剂,或单独施用两种拮抗剂(例如,顺序施用)。因此,PD-1拮抗剂(例如,抗体)和TIM-4拮抗剂(例如,抗体)可以在单一制剂中同时施用。或者,可以配制PD-1拮抗剂和TIM-4拮抗剂用于单独施用,并同时或依次施用。

[0150] 例如,可首先施用PD-1拮抗剂,然后施用TIM-4拮抗剂(例如,紧接其后),反之亦然。在一个实施方案中,在施用TIM-4拮抗剂之前施用PD-1拮抗剂,例如,首先将PD-1拮抗剂输注到患者体内,10分钟至3小时后输注TIM-4拮抗剂。在一个实施方案中,在施用PD-1拮抗剂之前施用TIM-4拮抗剂,例如,首先将TIM-4拮抗剂输注到患者体内,10分钟至3小时后输注PD-1拮抗剂。这种同时或顺序施用优选导致两种拮抗剂同时存在于治疗的患者中。在另一个实施方案中,同时施用TIM-4拮抗剂和PD-1拮抗剂。

[0151] 在一个实施方案中,向受试者施用单剂量的TIM-4拮抗剂和单剂量的PD-1拮抗剂,例如抗PD-1或抗PD-L1抗体。在某些实施方案中,多个(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个)剂量的TIM-4拮抗剂和多个(例如,2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个剂量的PD-1拮抗剂施用于需要治疗的受试者。TIM-4拮抗剂和PD-1拮抗剂的施用可以在同一天,或者,TIM-4拮抗剂可以在PD-1拮抗剂之前或之后1天或更多天施用。

[0152] 在一个实施方案中,TIM-4拮抗剂和PD-1拮抗剂的施用可以每周或每月进行,其中方案,它们可以在同一天(例如,同时)或一个接一个地施用(例如,彼此之前或之后一分钟、几小时或几天)。在一个实施方案中,每三天施用TIM-4拮抗剂和PD-1拮抗剂。

[0153] 在一个实施方案中,PD-1拮抗剂和/或TIM-4拮抗剂的剂量随时间变化。例如,PD-1拮抗剂和/或TIM-4拮抗剂可以最初以高剂量施用并且可以随时间降低。在另一个实施方案中,PD-1拮抗剂和/或TIM-4拮抗剂最初以低剂量施用并随时间增加。

[0154] 在另一个实施方案中,对于每个剂量,施用的PD-1拮抗剂和/或TIM-4拮抗剂的量是恒定的。在另一个实施方案中,PD-1拮抗剂和/或TIM-4拮抗剂的量随每次给药而变化。例

如,拮抗剂的维持(或后续)剂量可以高于首先施用的负荷剂量或与其相同。在另一个实施方案中,拮抗剂a的维持剂量可以低于负荷剂量或与其相同。临床医生可以通过所治疗患者的病况来保证优选的剂量。剂量可取决于许多因素,包括疾病的阶段等。基于一种或多种这样的因子的存在应施用的具体剂量在技术人员的技能范围内。一般地,用较小剂量开始治疗,所述较小剂量小于化合物的最佳剂量。此后,少量增加剂量直至达到在这种情况下的最佳效果。为方便起见,如果需要,可以将总日剂量分开并在一天中分份施用。也可以使用间歇疗法(例如,三周中的一周或四周中的三周)。

[0155] 在一个实施方案中,TIM-4拮抗剂(例如,抗体)以0.1、0.3、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10mg/kg体重的剂量施用。在另一个实施方案中,PD-1拮抗剂(例如,抗体)以0.5、1、2、3、4、5、6、7、8、9或10mg/kg体重的剂量施用。通常,200 μ g/小鼠约为10mg/kg、100 μ g/小鼠约为5mg/kg。因此,基于本文所述的实验,一剂或多剂的1-20mg/kg体重,1-10mg/kg体重,5-20mg/kg体重或5-10mg/kg体重的TIM-4拮抗剂和PD-1拮抗剂可以施用于受试者。在某些实施方案中,使用0.3mg/kg至10mg/kg体重的TIM-4拮抗剂的剂量和使用至少1mg/kg例如1-10mg/kg体重的PD-1拮抗剂的剂量。

[0156] VIII. 结果

[0157] 根据本文公开的方法治疗的患者(例如人)优选经历至少一种癌症体征的改善。在一个实施方案中,通过减少可测量的肿瘤病变的量和/或大小来测量改善。在另一个实施方案中,可以在胸部X射线或CT或MRI胶片上测量损伤。在另一个实施方案中,细胞学或组织学可用于评价对治疗的响应性。

[0158] 在一个实施方案中,所治疗的患者表现出肿瘤大小的减小、转移性病变的数量随时间的减少、完全反应、部分反应和稳定疾病。在另一个实施方案中,所治疗的患者经历肿瘤缩小和/或生长速率降低,即抑制肿瘤生长。在另一个实施方案中,减少或抑制不需要的细胞增殖。在还另一个实施方案中,可以发生以下一种或多种:可以减少癌细胞的数量;可以减小肿瘤大小;可以抑制、延迟、减慢或停止癌细胞浸润到外周器官;可以减缓或抑制肿瘤转移;可以抑制肿瘤生长;可以预防或延迟肿瘤复发;可以在一定程度上缓解与癌症相关的一种或多种症状。

[0159] 在另一个实施方案中,治疗方法产生的可比临床受益率(CBR=CR(完全反应)、PR(部分反应)或SD(稳定疾病) ≥ 6 个月)优于单独使用PD-1(例如抗体)或TIM-4拮抗剂(例如抗体)所达到的效果。在其他实施方案中,例如,与单独用PD-1拮抗剂或TIM-4拮抗剂治疗相比或相对于在治疗的第一天或刚开始治疗前的肿瘤生长,临床受益率的改善约为10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%或更高。

[0160] 在另一个实施方案中,PD-1拮抗剂和TIM-4拮抗剂的施用导致肿瘤体积减少至少三倍(例如,减少3.5倍),例如,相对于单独用PD-1拮抗剂或TIM-4拮抗剂的治疗或相对于在治疗的第一天或在刚开始治疗前的肿瘤生长。

[0161] 在另一个实施方案中,施用PD-1拮抗剂和TIM-4拮抗剂导致肿瘤生长抑制至少80%,例如,相对于单独使用PD-1拮抗剂或TIM-4拮抗剂的治疗或相对于在治疗的第一天或在刚开始治疗前的肿瘤生长。

[0162] 在某些实施方案中,相对于开始治疗前或治疗第一天的肿块,施用PD-1拮抗剂和TIM-4拮抗剂使肿块减少至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、

99%。在一些实施方案中,如本文所述的治疗后不再可检测到肿块。在一些实施方案中,受试者处于部分或完全缓解期。在某些实施方案中,受试者具有增加的总存活率、中值存活率和/或无进展存活。

[0163] IX. 试剂盒和单位剂量型

[0164] 本文还提供了试剂盒,其包含含有(a)PD-1拮抗剂和(b)TIM-4拮抗剂和药学上可接受的载体的药物组合物,其治疗有效量适用于前述方法。在一个实施方案中,PD-1拮抗剂是抗体(例如,分别为5C4或12A4)。在另一个实施方案中,TIM-4拮抗剂是抗体。试剂盒还可任选地包括说明书,例如包括施用方案,以允许医师(例如,医生\护士或患者)将包含在其中的组合物施用于患有癌症的患者。该试剂盒还可包括注射器。

[0165] 任选地,试剂盒包括单剂量药物组合物的多个包装,每个包含有效量的PD-1拮抗剂和TIM-4拮抗剂,用于根据上文提供的方法单次施用。施用药物组合物所必需的器械或装置也可包括在试剂盒中。例如,试剂盒可以提供一个或多个预填充的注射器,其含有一定量的PD-1拮抗剂和TIM-4拮抗剂。

[0166] 在一个实施方案中,本发明提供了用于治疗患者中的癌症的试剂盒,该试剂盒包含:

[0167] (a)一剂PD-1拮抗剂;

[0168] (b)一剂TIM-4拮抗剂;和

[0169] (c)在本文所述的方法中使用PD-1拮抗剂和TIM-4拮抗剂的说明书。

[0170] 在一个实施方案中,本发明提供了用于治疗患者中的癌症的试剂盒,该试剂盒包含:

[0171] (a)一剂或多剂PD-1拮抗剂;

[0172] (b)一剂或多剂TIM-4拮抗剂;和

[0173] (c)在本文所述方法中使用PD-1拮抗剂和TIM-4拮抗剂的说明书。

[0174] 在某些实施方案中,TIM-4拮抗剂是抗体。在某些实施方案中,PD-1拮抗剂是抗体。在具体的实施方案中,PD-1拮抗剂是抗PD-1抗体,其包含具有SEQ ID NO:13所示序列的重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及具有SEQ ID NO:15所示序列的轻链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域。在另一个具体实施方案中,PD-1拮抗剂是抗PD-L1抗体,其包含具有SEQ ID NO:1所示序列的重链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及具有SEQ ID NO:3所示序列的轻链可变区中的CDR1、CDR2和CDR3结构域。

[0175] 以下实施例仅是说明性的,不应被解释为以任何方式限制本公开的范围,因为在阅读本公开后许多变化和等同物对于本领域技术人员将显而易见。

[0176] 本申请中引用的所有参考文献、Genbank条目、专利和公开的专利申请的内容通过提述明确地并入本文。

[0177] 实施例

[0178] 材料和方法

[0179] 动物

[0180] 在研究中使用10至11周龄的雌性C57/BL6小鼠(Harlan)。根据实验动物管理评估和认可协会(AAALAC)国际法规,小鼠随意接受食物和水并维持在受控环境中。所有动物研究均已获得相应的伦理委员会的批准,因此必须按照1964年赫尔辛基宣言及其后来的修正

案中规定的道德标准进行。

[0181] 抗体

[0182] 通过Bristol-Myers Squibb(Biologics Discovery,CA)产生并纯化抗小鼠PD-1mAb(抗mPD-1mAb)克隆4H2,小鼠IgG1同种型。先前已经描述了抗TIM-4mAb、RMT4-53(Yeung et al.,J.Immunol.2009;191:4447-4455)。简言之,将Sprague Dawley大鼠用含有鼠TIM-4的细胞外结构域(aa 1-288)的TIM-4-Ig融合蛋白免疫小鼠IgG2a的Fc部分,并将LN细胞与P3U1骨髓瘤细胞融合。RMT4-53与TIM-4/NRK细胞反应,但不与亲本NRK或其他转染的TIM家族反应(TIM-1B6/NRK、TIM-1BALB/NRK、TIM-2/NRK、TIM-3B6/NRK、TIM-3BALB/NRK)细胞。证明抗体具有<0.5EU/mg内毒素水平,>95%纯度和<5%高分子量物质。在使用前将抗mPD-1mAb(克隆4H2;小鼠IgG1)和抗mTIM-4抗体(克隆RM4-53;大鼠IgG2a)的储备溶液保持在4°C。在无菌磷酸盐缓冲盐水(pH 7.0)中制备抗mPD-1mAb和抗mTIM-4mAb的给药溶液,并保持在4°C。

[0183] 细胞系

[0184] CT-26是具有成纤维细胞形态(ATCC)的未分化的结肠癌细胞系。小鼠以80%发生率用10³个细胞和以100%发生率用10⁴个细胞皮下接种发生致死肿瘤。当小鼠用10⁴细胞静脉内接种时发生肺转移(Wang et al.J.Immunol.1995;154:4685-4692)。MC38细胞系衍生自具有上皮形态的C57BL6鼠结肠腺癌细胞(CD44+ALDH1+)。

[0185] TIM-4的表达

[0186] 通过流式细胞术证实TIM-4在小鼠腹膜巨噬细胞和TAM上的表达。

[0187] 免疫组织化学

[0188] 使用兔抗TIM4(Atlas抗体,HPA015625)的免疫组织化学分析证明了TIM-4在人扁桃体、肺和肝中存在的组织驻留巨噬细胞上的表达。将固定组织上的表达切片并施加到厚度为5微米的Superfrost Plus载玻片上。允许切片在室温下干燥过夜。然后将组织在二甲苯中脱石蜡,接着在梯度系列的乙醇中水合成蒸馏水。使用HIER和Biocare Medical EDTA, pH 8.2(1X)在约115°C进行抗原修复1分钟,然后在室温下冷却20分钟。将切片在TNT缓冲液(TBS+0.5%Tween)中冲洗并使用PAP笔分离。用Biocare Medical Background Sniper在室温下封闭30分钟,然后用1X TNT缓冲液冲洗,在Dako过氧化物酶块中在室温温育10分钟并用2X TNT缓冲液冲洗。使用Biocare Medical Renaissance抗体稀释剂和背景还原剂中的1/1000稀释度在室温和3X TNT缓冲液冲洗下进行一抗染色60分钟。使用适当数量的滴剂施加检测抗体以覆盖Biocare Medical MACH3兔聚合物-HRP切片,并在室温下温育30分钟,然后进行3X TNT缓冲液冲洗。将样品与Biocare Medical Betazoid DAB一起温育,并通过将载玻片置于水中来停止反应。将切片在苏木精,Leica中复染30秒,在自来水中洗涤,在Bluing溶液中温育45秒至1分钟,在水中洗涤2X,在分级系列的醇和二甲苯中脱水,然后包埋。

[0189] 实施例1:抗TIM-4抗体对胞葬作用的抑制

[0190] 从BALB/c小鼠分离胸腺细胞,用或不用地塞米松培养4小时以诱导细胞凋亡。然后根据制造商的说明书(Thermofisher Scientific)将细胞与pHrodo染料一起温育5-10分钟。简言之,在不含血清1x的培养基中洗涤2×10⁷个细胞,并重悬于1mL稀释剂C(目录号G8278)中。然后通过加入1mL的2x染料溶液(通过将4mL的PKH26乙醇染料溶液(目录号

P9691)加入到1mL稀释剂C中)对细胞进行染色,并通过移液管混合样品。在定期混合下温育5分钟。通过加入等体积的血清终止染色反应并温育1分钟。然后将细胞在不含血清的培养基中洗涤1次,在PBS中洗涤2次。 3×10^6 个pHrodo标记的细胞腹膜内注射到BALB/c小鼠中,并且,腹膜巨噬细胞通过藉由将3-5mL冰冷的PBS+2mM EDTA注射到安乐死小鼠的腹腔内、触诊腹部然后经由针吸取收集溶液进行灌洗收集。在注射pHrodo标记的胸腺细胞T前1小时,给实验动物注射RMT4-53抗TIM4抗体。

[0191] 使用流式细胞术测量腹膜巨噬细胞对凋亡细胞的摄取。简言之,将腹膜巨噬细胞在PBS中洗涤2次,重悬于100 μ L活力染料(eBioscience)中,并在冰上温育15分钟。将细胞在PBS中洗涤1次,并在冰上在FcBlock(BioLegend)中温育15分钟。然后将细胞用CD45(BD)、Tim-4(BioLegend)、CD11b(BioLegend)、CD206(BioLegend)和F4/80+(BioLegend)的抗体在冰上染色30分钟。然后将细胞洗涤1次并重悬于Perm/Fix中。然后在LSR Fortessa X20(BD)上收集样品。为了鉴定参与_{胞耕作用}的细胞,来自活细胞群的CD45+/CD11b+骨髓细胞被门控。在这些细胞中,参与_{胞耕作用}的巨噬细胞被定义为F4/80+、OPKH26+。结果列于表2中。

[0192] 表2.

	% 凋亡细胞
[0193]	对照 25-40
	对照 + Dex 50-70
	实验 + 抗TIM4 10-15
[0194]	实验 + Dex和TIM-4 22-42

[0195] 结果表明相对于非凋亡细胞(25-40%),凋亡细胞的_{胞耕作用}(50-70%)增加。添加抗TIM-4阻断任何人都大大减少了活细胞和凋亡细胞的摄取。这表明TIM-4是细胞摄取的重要介质。

[0196] 实施例2:用抗TIM-4抗体与抗PD-1抗体联合治疗抑制CT26模型体内肿瘤生长

[0197] 在鼠肿瘤模型中进行实验以测试抗TIM-4和抗PD-1的组合将增强抗肿瘤功效的假设。在用抗TIM4抗体、RTM-453单独或与抗PD1抗体IgG1D265A组合治疗后,评价SC CT-26小鼠,即结肠腺癌肿瘤模型(TGM-1438)的肿瘤生长。

[0198] 在第0天,将雌性BALB/c小鼠(Harlan;大约8-9周龄)皮下植入 10^6 个CT-26细胞。按照以下方案,在2X/周施用后,通过体重和肿瘤测量评价60只小鼠:

[0199] 表3:给药方案:

组	N	治疗	给药方案
[0200]	1	mIgG1 同种型对照mAb	0.45 mg, IP, d. 7, 10, 13
	2	mPD-1 IgG1 D265A mAb + 对照 mAb	0.2 + 0.25* mg, IP, d. 7, 10, 13
	4	mTIM-4大鼠IgG2a mAb + 对照 mAb	0.25 + 0.2* mg, IP, d. 7, 10, 13
	6	mTIM-4 + mPD-1 mAbs	0.25 mg + 0.2 mg, IP, d. 7, 10, 13

[0201] 在给药当天,将两种抗体组合,并将总共100 μ L的组合抗体注射到小鼠中。收集每组5只小鼠的脾脏和肿瘤,并按照以下方案在第16天处理用于肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)和脾免疫细胞的流式细胞术分析:

[0202] 简言之,将细胞重悬于PBS中并等分到平板中(脾脏 2×10^6 个/孔,所有肿瘤细胞/孔)然后在PBS中洗涤2次,退格。然后将细胞重悬于100 μ L活力染料(eBioscience)中并在冰上温育15分钟。将细胞在PBS中洗涤1次,并在50 μ LFcBlock(BioLegend)中在冰上温育15分钟,然后如下所述用50 μ L抗体染色混合物染色30分钟。然后用FACS缓冲液洗涤细胞1次,并重悬于Perm/Fix中。然后在LSR Fortessa X20(BD)上收集样品。

[0203] T细胞板

Fluor	特异性	克隆	抗体	目录号	公司	Ab diln
AlexaFluor488 (FITC)	CD107a	1D4B	AlexaFluor [®] 488 抗小鼠 CD107a (LAMP-1) 抗体	121608	BioLegend	1:100
PE	CD115	AF598	PE 抗小鼠 CD115 (CSF-1R) 抗体	135506	BioLegend	1:100
PerCp-Cy5.5	CD49b	DX5	PerCp/Cy5.5 抗小鼠 CD49b (pan-NK细胞) 抗体	108916	BioLegend	1:100
BUV395	CD45	30-F11	BUV395 大鼠抗小鼠 CD45 抗体	564279	eBioscience	1:100
BV421	CD8	53-6.7	Brilliant Violet 421 [™] 抗小鼠 CD8a 抗体	100738	BioLegend	1:200
BV510	CD4	RM4-5	Brilliant Violet 510 [™] 抗小鼠 CD4 抗体	100553	BioLegend	1:200
BV605	Thy1.2	53-2.1	Brilliant Violet 605 [™] 抗小鼠 CD90.2 (Thy-1.2) 抗体	140317	BioLegend	1:200
BV711	CD62L	MEL-14	Brilliant Violet 711 [™] 抗小鼠 CD62L 抗体	104445	BioLegend	1:200
BV785	CD44	IM7	Brilliant Violet 785 [™] 抗小鼠 CD44 抗体	103041	BioLegend	1:200
APC	FoxP3	FJK-16s	抗小鼠/大鼠 Foxp3 APC	17-5773-80B	eBioscience	1:100
PE-Cy7	Ki-67	Sola15	抗小鼠/大鼠 Ki-67 PE-花青	25-5698-82	eBioscience	1:100
APC eFluor780 (APC-Cy7)	可固定的活力染料	n/a	eFluor [®] 780 可固定的活力染料	65-0865-14	eBioscience	1:1000
Fc 阻断	阻断	93	TruStain FcX 抗小鼠 CD16/32	101320	BioLegend	

[0205] Ki-67+用于评估增殖细胞;

[0206] CD44/CD62L分析以确定子集T细胞为幼稚、激活和记忆T细胞亚群;

[0207] FoxP3评估Tregs的群体(FoxP3+CD4+T细胞);

[0208] CD8+CD107a+评估脱颗粒CD8+T细胞(抗原/肿瘤特异性CTL)

[0209] 骨髓板

Fluor	特异性	克隆	抗体	目录号	公司	
AlexaFluor488 (FITC)	CD11c	N418	FITC 抗小鼠 CD11c 抗体	117306	BioLegend	1:100
PE	CD115	AF598	PE 抗小鼠 CD115 (CSF-1R) 抗体	135506	BioLegend	1:100
PerCp-Cy5.5	CD49b	DX5	PerCp/Cy5.5 抗小鼠 CD49b (pan-NK cells) 抗体	108916	BioLegend	1:100
BUV395	CD45	30-F11	BUV395 大鼠 抗小鼠 CD45 抗体	564279	eBioscience	1:100
BV 421	Ly6C	HK1.4	Brilliant Violet 421™ 抗小鼠 Ly6C 抗体	128032	BioLegend	1:200
BV 605	Thy 1.2 (CD90.2)	53-2.1	Brilliant Violet 605™ 抗小鼠 Thy1.2 抗体	140317	BioLegend	1:200
BV 711	Gr-1	RB6-8C5	Brilliant Violet 711™ 抗小鼠 Gr-1 抗体	104731	BioLegend	1:200
BV 785	F4-80	BM8	Brilliant Violet 785™ 抗小鼠 F4/80 抗体	123141	BioLegend	1:200
APC	Ly6G	1A8	APC 抗小鼠 Ly-6G 抗体	127614	BioLegend	1:200
AF-700	CD11b	M1/70	Alexa Fluor 700 抗小鼠 / 人 CD11b 抗体	101222	BioLegend	1:100
PE-Cy7	MHC II	M5/114.15.2	PE-Cy7 抗小鼠 I-A/I-E 抗体	107630	eBioscience	1:100
APC eFluor 780 (APC-Cy7)	可固定的活力染料	n/a	eFluor® 780 可固定的活力染料	65-0865-14	eBioscience	1:1000
Fc 阻断	阻断	93	TruStain FcX 抗小鼠 CD16/32	101320	BioLegend	

- [0211] 用于TAM、MDSC、NK细胞、B细胞的骨髓细胞亚群
- [0212] CD80、CD86染色活化的APC
- [0213] 图3中显示了脾和肿瘤中的骨髓细胞群。脾和肿瘤浸润淋巴细胞中的CD8+T细胞群显示在图4中。脾和肿瘤浸润淋巴细胞中的CD4+细胞群显示在图5中。数据显示骨髓细胞群的移位和肿瘤浸润淋巴细胞中活化T细胞的增加。
- [0214] 监测每组剩余的10只小鼠的肿瘤生长。每周两次测量肿瘤大小和体重。通过将肿瘤长度乘以肿瘤宽度的平方除以2来计算肿瘤大小(以 mm^3 测量)。当皮下肿瘤达到 200mm^3 的中值尺寸(建立的模型)时,开始治疗。
- [0215] 与抗PD-1抗体组合施用的抗TIM-4抗体提供比单独任何一种药剂活性高的抗肿瘤活性。该组合显示肿瘤生长速率降低(图6-8),并且总体存活率增加(图9)。总之,与单独使用单一药剂引发的活性相比,TIM-4mAb和PD-1mAb的组合产生了协同活性。因此,该研究的结果表明抗mTIM-4mAb和PD-1mAb的组合方案是良好耐受的并且导致显着的抗肿瘤活性。
- [0216] 实施例3:通过用抗TIM-4抗体和抗PD-1抗体的组合治疗抑制MC38模型中体内肿瘤生长
- [0217] 在用抗TIM4抗体、RTM-453单独或与抗PD1抗体IgG1D265A组合治疗后,评价MC38小鼠(结肠腺癌肿瘤模型)的肿瘤生长。
- [0218] 在第0天,将雌性C57/BL6小鼠(Harlan;大约8-9周龄)皮下植入 10^6 个MC38细胞。在第6天开始给药小鼠。每4天IP施用200 μg /注射三剂。当将两种抗体施用于小鼠时,首先将抗体组合,并一起施用于小鼠。使用卡尺测量肿瘤,并使用公式 $(\text{L}2 \times \text{W}) / 2$ 计算肿瘤体积。无进展生存定义为肿瘤达到4x初始肿瘤体积的天数。
- [0219] 结果在图10、11和12以及表X中提供。图10提供了相对于植入后天数的无进展存活百分比,表明,分别相对于每种抗体和相对于同种型对照,施用抗PD-1和抗TIM4抗体的组合导致更高百分比的无进展存活。表X显示组合治疗分别相对于每种抗体和相对于同种型对照,提供更完全的回归。图11显示了相对于植入后天数的MC38平均肿瘤体积,表明组合治疗分别相对于每种抗体和相对于同种型对照,减少了更多的平均肿瘤体积。图12A-C显示了MC38个体肿瘤体积,并证实了图10、11和表X中所示的结果。
- [0220] 表5:肿瘤完全消退的小鼠数量
- [0221]
- | 治疗 | 完全回归 |
|------------------------------|------|
| 同种型对照 | 0/10 |
| 抗PD1单独 | 2/10 |
| 抗TIM4 (RMT4-53mIgG1D265A) 单独 | 0/10 |

抗PD1+抗TIM4 (RMT4-53mIgG1D265A)

4/10

[0222] 因此,在CT26和MC39动物模型中施用抗TIM4抗体与抗PD-1抗体的组合相对于单独每种抗体产生更强的抗肿瘤效果。

[0223] 序列表的汇总

SEQ ID NO:	序列
1	<p>重链可变区 (VH) 氨基酸序列</p> <p>抗PD-L1 mAb (12A4; WO 2007/005874和美国专利号7,943,743中的12A4)</p> <p>QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKTSGDTFSTYAI SWVRQAPGQGLEWMGGII PIFGKAHYAQK FQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYFCARKFHFVS GSPFGMDVWQGQTTVTVSS</p>
2	<p>重链可变区 (VH) 核苷酸序列</p> <p>抗PD-L1 mAb (12A4; WO 2007/005874和美国专利号7,943,743中的12A4)</p> <p>cag gtc cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag cct ggg tcc tcg gtg aag gtc tcc tgc aag act tct gga gac acc ttc agc acc tat gct atc agc tgg gtg cga cag gcc cct gga caa ggg ctt gag tgg atg gga ggg atc atc cct ata ttt ggt aaa gca cac tac gca cag aag ttc cag ggc aga gtc acg att acc gcg gac gaa tcc acg agc aca gcc tac atg gag ctg agc ctg aga tct gag gac acg gcc gtg tat ttt tgt gcg aga aag ttt cac ttt gtt tcg ggg agc ccc ttc ggt atg gac gtc tgg ggc caa ggg acc acg gtc acc gtc tcc</p>
3	<p>轻链可变区 (VL) 氨基酸序列</p> <p>抗PD-L1 mAb (12A4; WO 2007/005874和美国专利号7,943,743中的12A4)</p> <p>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA WYQQKPGQAPRLLIY</p>

SEQ ID NO:	序列
	DASNRATGIPARFSGSGSGTDFLTISSEPEDFAVYYCQQRSNWPTFG QGTKVEIK
4	轻链可变区 (VL) 核苷酸序列 抗PD-L1 mAb (12A4; WO 2007/005874和美国专利号7,943,743中的12A4) gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agc agc tac tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag cgt agc aac tgg ccg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa
5	重链CDR1氨基酸序列 抗PD-L1 mAb (12A4; WO 2007/005874和美国专利号7,943,743中的12A4) TYAIS
6	重链CDR2氨基酸序列 抗PD-L1 mAb (12A4; 12A4 in WO 2007/005874和美国专利号7,943,743) GIIPIFGKAHYAQKFQ
7	重链CDR3氨基酸序列 抗PD-L1 mAb (12A4; 12A4 in WO 2007/005874和美国专利号7,943,743) KFHFVSGSPFGMDV
8	轻链CDR1氨基酸序列 抗PD-L1 mAb (12A4; WO 2007/005874和美国专利号7,943,743中的12A4)

[0225]

SEQ ID NO:	序列
	RASQSVSSYLA
9	<p>轻链CDR2氨基酸序列</p> <p>抗PD-L1 mAb (12A4; WO 2007/005874和美国专利号7,943,743中的12A4)</p> <p>DASNRAT</p>
10	<p>轻链CDR3氨基酸序列</p> <p>抗PD-L1 mAb (12A4; WO 2007/005874和美国专利号7,943,743中的12A4)</p> <p>QQRSNWPT</p>
11 [0226]	<p>重链氨基酸序列</p> <p>抗PD-1 mAb (5C4 in WO 2006/121168)</p> <p>(可变区域加下划线；恒定区粗体)</p> <p><u>QVQLVESGGVVQPGRSRLLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGL</u> <u>EWVAVIWYDGSKRYYADSVKGRFTISRDN SKNTLFLQMN SLRAEDT</u> <u>AVYYCATNDDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAA</u> <u>LGCLVKDYFPEPVTVWSNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVVT</u> <u>VPSSSLGTKYTCNVDHKPNTKVDKRVESKYGPPCP PCPAPEFLG</u> <u>GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGV</u> <u>EVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG</u> <u>LPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPS</u> <u>DIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNV</u> <u>FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGK</u></p>
12	<p>轻链氨基酸序列</p> <p>抗PD-1 mAb (5C4 in WO 2006/121168)</p> <p>(可变区域加下划线；恒定区粗体)</p>

SEQ ID NO:	序列
	<u>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA</u> WYQQKPGQAPRLLI <u>YDASNRATGIPARFSGSGSGTDF</u> TLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPR <u>TFGQGTKVEIK</u> RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPRE <u>KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL</u> SKADYEKHK <u>VYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC</u>
13	<p>重链可变区 (VH) 氨基酸序列</p> <p>抗PD-1 mAb (WO 2006/121168中的5C4)</p> <p>(来自WO 2006/121168的SEQ ID NO:4)</p> <p>QVQLVESGGVVQPGRSLRLDCKASGITFSNSGMHWVRQAPGKGLEWVAV I_{WYDGSKRYYADSVKGRFTISRDNSKNTFLQMN}SLRAEDTAVYYCATND DYWGQGTLVTVSS</p>
14	<p>重链可变区 (VH) 核苷酸序列</p> <p>抗PD-1 mAb (WO 2006/121168中的5C4)</p> <p>(来自WO 2006/121168的SEQ ID NO:60)</p> <p>cag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg tcc ctg aga ctc gac tgt aaa gcg tct gga atc acc ttc agt aac tct ggc atg cac tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg gca gtt att tgg tat gat gga agt aaa aga tac tat gca gac tcc gtg aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc aag aac acg ctg ttt ctg caa atg aac agc ctg aga gcc gag gac acg gct gtg tat tac tgt gcg aca aac gac gac tac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tca</p>
15	<p>轻链可变区 (VL) 氨基酸序列</p> <p>抗PD-1 mAb (WO 2006/121168中的5C4)</p> <p>(来自WO 2006/121168 的SEQ ID NO:11)</p> <p>EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLA <u>WYQQKPGQAPRLLIYD</u> <u>ASNRATGIPARFSGSGSGTDF</u>TLTISSLEPEDFAVYYCQQSSNWPR<u>TFGQ</u> <u>GTKVEIK</u></p>
16	轻链可变区 (VL) 核苷酸序列

SEQ ID NO:	序列
	<p>抗PD-1 mAb (WO 2006/121168中的5C4) (来自WO 2006/121168的SEQ ID NO:67)</p> <p>gaa att gtg ttg aca cag tct cca gcc acc ctg tct ttg tct cca ggg gaa aga gcc acc ctc tcc tgc agg gcc agt cag agt gtt agt agt tac tta gcc tgg tac caa cag aaa cct ggc cag gct ccc agg ctc ctc atc tat gat gca tcc aac agg gcc act ggc atc cca gcc agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc cta gag cct gaa gat ttt gca gtt tat tac tgt cag cag agt agc aac tgg cct cgg acg ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa</p>
17 [0228]	<p>重链CDR1氨基酸序列 抗PD-1 mAb (WO 2006/121168中的5C4) (来自WO 2006/121168的SEQ ID NO:18)</p> <p>NSGMH</p>
18	<p>重链CDR2氨基酸序列 抗PD-1 mAb (WO 2006/121168中的5C4) (来自WO 2006/121168的SEQ ID NO:25)</p> <p>VIWYDGSKRYYADSVKG</p>
19	<p>重链CDR3氨基酸序列 抗PD-1 mAb (WO 2006/121168中的5C4) (来自WO 2006/121168的SEQ ID NO:32)</p> <p>NDDY</p>
20	<p>轻链CDR1氨基酸序列 抗PD-1 mAb (WO 2006/121168中的5C4)</p>

[0229]

SEQ ID NO:	序列
	(来自WO 2006/121168的SEQ ID NO:39) RASQSVSSYLA
21	轻链CDR2氨基酸序列 抗PD-1 mAb (WO 2006/121168中的5C4) (来自WO 2006/121168的SEQ ID NO:46) DASN RAT
22	轻链CDR3氨基酸序列 抗PD-1 mAb (WO 2006/121168中的5C4) (来自WO 2006/121168的SEQ ID NO:53) QQSSNWPRT
23	完整的PD-1序列 (GenBank登录号: U64863) agtttccctt ccgctcacct ccgcctgagc agtggagaag gcggcactct ggtggggctg ctccaggcat gcagatccca caggcgcctt ggccagtcgt ctgggcggtg ctacaactgg gctggcggcc agatggttc ttagactccc cagacaggcc ctggaacccc cccaccttct tcccagccct gctcgtggtg accgaagggg acaacgccc ac ttccacctgc agtttctcca acacatcgg a gacttcgtg ctaaactggt accgcatgag cccagcaac cagacggaca agctggccgc cttcccgag gaccgcagcc agccggccca ggactgccc tc tccgtgtca cacaactgcc caacggcgt gacttccaca tgagcgtggt cagggccgg cgcaatgaca gcggcaccta cctctgtggg gccatctccc tggccccc aa ggcgcagatc aaagagagcc tgcggccaga gctcagggtg acagagagaa gggcagaatgt gcccacagcc caccggcggcc cctcaccag gccagccggc cagttccaaa ccctgggtgg tgggtcgtg ggccggcctgc tgggcaggct ggtgctgcta gtctgggtcc tggccgtcat ctgctccgg gcccacagag ggacaatagg agccaggcgc accggccagc ccctgaagga ggacccctca gcccgtgc tgttctctgt ggactatggg gagctggatt tccagtggcg agagaagacc ccggagccccc

SEQ ID NO:	序列
[0230]	ccgtgccctg tgtccctgag cagacggagt atgccaccat tgtcttcct agcggaatgg gcacccatc ccccgccccgc aggggctcag ccgacggccc tcggagtgcc cagccactga ggcctgagga tggacactgc tcttggcccc tctgaccggc ttccttggcc accagtgttc tgcagaccct ccaccatgag cccgggtcag cgcatttcct caggagaagc aggcagggtg caggccattg caggccgtcc aggggctgag ctgcctgggg ggcaccgggg ctccagcctg cacctgcacc aggcacagcc ccaccacagg actcatgtct caatgcccac agtgagccca ggcagcaggt gtcaccgtcc cctacaggga gggccagatg cagtcactgc ttcaggtct gccagcacag agctgcctgc gtccagctcc ctgaatctct gctgctgctg ctgctgctgc tgctgctgcc tgcggcccg ggctgaaggc ggcgtggccc tgcctgacgc cccggagcct cctgcctgaa cttggggct ggttggagat ggccttggag cagccaagggt gcccctggca gtggcatccc gaaacgcccct ggacgcaggg cccaaagactg ggcacaggag tgggaggtac atggggctgg ggactccccca ggagttatct gtcctctgca ggccttagaga agtttcaggg aaggtcagaa gagtcctgg ctgtgggtgg cagggcagga aaccctccac acctttacac atgcccaggc agcacccatc gccccttgc gggcagggaa gctgaggcag taagcggca ggcagagctg gaggccttgc aggccagcca gcactctggc ctccctccgc cgcattccac cccagccct cacaccactc gggagagggc catcctacgg tcccaaggcagg aggaggcag ggctgggtt gactcaggcc ctcctccatc gtggccaccc ggggtgtggg agggcagaag tgcaggcacc tagggccccca catgtgcccac ccctgggagc ttccttggaa acccattcc gaaattattt aaaggggttg gcccggctcc caccaggggc tgggtgggaa ggtacaggcg ttccccccggg gccttagtacc cccgcgtggc ctatccactc ctcacatcca cacactgcac ccccactcct gggcagggc caccagcactc caggcggcca gcaggcaccc gatggctgg gacaagggtat ccccttccc tgggttcta ttatattata attataatta aatatgagag catgt
24	人PD-L1氨基酸序列 - 同种型a前体 (GenBank登录号 NP_054862.1) MRIFAVFIFM TYWHLLNAFT VTVPKDLYVV EYGSNMTIEC KFPVEKQLDL AALIVYWEME DKNIIQFVHG EEDLKVKQHSS YRQRARLLKD QLSLGNAALQ ITDVKLQDAG VYRCMISYGG ADYKRITVKV NAPYNKINQR ILVVDPVTSE HELTCQAEGY PKAEVWTSS DHQVLSGKTT TTNSKREEKL FNVTSITLRIN TTTNEIFYCT FRRLDPEENH TAEVVIPELP LAHPPNERTH LVILGAILLC LGVALTFIFR LRKGRRMMDVK KCGIQDTNSK KQSDTHLEET
25	人PD-L1氨基酸序列 - 同种型b前体 (GenBank登录号NP_001254635.1)

SEQ ID NO:	序列
	MRIFAVFIFM TYWHLLNAPY NKinQRILVV DPVTSEHELT CQAEQYPKAE VIWTSSDHQV LSGKTTTNS KREEKLFNVT STLRINTTN EIFYCTFRRRL DPEENHTAEL VIPELPLAHP PNERTHLVIL GAILLCLGVA LTFIFRLRKG RMMDVKKCGI QDTNSKKQSD THLEET
26	人TIM-4氨基酸序列 - 同种型1 (GenBank登录号NP_612388.2) MSKEPLILWLMIEFWWLYLTPVTSETVVTEVLGHRTLPCLYSSWSHNSNSMCWGKDQCPYSGC KEALIR TDGMRVTSRKSAKYRLQGTIPRGDVSLTILNPSESDSGVYCCRIEVPGWFNDVKINVRLNLQRA STTHR TATTTTRRTTTSPTTRQMTTPAALPTTVVTPDLTGTPLQMTTIAVFTTANTCLSLTPST LPEEAT GLLTPEPSKEGPILTAESETVLPDSWSSVESTSADTVLLTSKESKVWDLPLSTSHVSMWKTSDS VSSPQP GASDTAVPEQNKKTTKGQMDGIPMSMKNEMPISQLLMIIAPSLGFVLFALFVAFLLRGKLMETY CSQKHT RLDYIGDSKNVLNDVQHGREDEDGLFTL
27	智人T细胞 (TIMD4), 转录变体1, mRNA (GenBank登录号NM_138379.2) ATAAGAGGTTGGGCTTGGATAGATAGACAGACTCCTGGTCCGGTCAACCGTAAATGTCCA AAGAAC CTCTCATTCTCTGGCTGATGATTGAGTTGGTGGCTTACCTGACACCAGTCACCCAGAGAC TGTTG GACGGAGGTTTGGGTACCGGGTGAACCTTGCCCTGTGTACTCATCCTGGTCTCACACAGC AACAGC ATGTGCTGGGGAAAGACCAGTGCCTACTCCGGTTGCAAGGAGGCGCTCATCCGCACTGATG GAATGA GGGTGACCTCAAGAAAGTCAGCAAAATATAGACTTCAGGGACTATCCGAGAGGTGATGTCTC CTTGAC CATCTTAAACCCAGTGAAAGTGACAGCGGTGTACTGCTGCCGATAGAAGTGCCTGGCTGG TTCAAC GATGTAAGATAAACGTGCGCCTGAATCTACAGAGAGCCTAACAAACCACGCACAGAACAGCAA CCACCA CCACACGCAAAACAACAACAAGCCCCACCACCCGACAAATGACAACAACCCAGCTGC ACTTCC AACAAACAGTCGTGACCACACCGATCTCACACCGGAACACCACACTCCAGATGACAACCATTGCC GTCTC ACAACAGCAAACACGTGCCTTCACTAACCCCAAGCACCCCTCCGGAGGAAGGCCACAGGTCTTC TGACTC CCGAGCCTCTAAGGAAGGGCCATCCTCACTGCAGAATCAGAAACTGTCCTCCCCAGTGATT CTGGAG TAGTGTGAGTCTACTTCTGCTGACACTGTCCTGCTGACATCCAAAGAGTCAAAGTTGGAT CTCCCA TCAACATCCCACGTGTAATGTGGAAAACGAGTGATTCTGTCTTCTCCTCAGCCTGGAGCAT CTGATA CAGCAGTCCCTGAGCAGAACAAAACAACAAAACAGGACAGATGGATGGAATACCATGTC GAAGAA TGAAATGCCCATCTCCAACACTGATGATCATCGCCCCCTCCTGGATTGTGCTTCGCA TTGTT GTGGCGTTCTCCTGAGAGGGAAACTCATGGAAACCTATTGTTCGCAGAAACACACAAGGCTAG ACTACA TTGGAGATAGTAAAATGTCTCAATGACGTGCAGCATGGAAGGGAAAGACGAAGACGGC TACCC CTAACAAACGCACTGATGTCAGTGTAGATTGAGGATGGGGCATGACACTCCAGTGTCAA TTAGTA

[0231]

SEQ ID NO:	序列
	GATTCCCTGTTCATAAAAAAGACTCACTTATTCCATGGATGTCATTGATCCAGGCTTGCTT AGTTTC ATGAATGAAGGGTACTTTAGAGACCACAACTCTGTCAAAAA
	<p>人TIM-4氨基酸序列同种型2 (GenBank登录号NP_001140198.1)</p> <p>MSKEPLILWLMIEFWWLYLTPVTSETVVTEVLGHRVTLPCLYSSWSHNSNSMCWGKDQCPYSGC KEALIR TDGMRVTSRKSAYRLQGTIPRGDVSLTILNPSESDGVYCCRIEVPGWFNDVKINVRLNLQRA STTHR TATTTTRRTTTSPTTTRQMTTPAALPTTVVTPDLTTGTPLQMTTIAVFTTANTCLSLPST LPEEAT GLLTPEPSKEGPILTAESETVLPDSWSSVESTSADTVLLTSKASDTAVPEQNKTGQMDGI PMSMKN EMPISQLLMIIAPSLGFVLFALFVAFLRGKLMETYCSQKHRLDYIGDSKNVLNDVQHGREDE DGLFTL</p>
[0232]	<p>智人T细胞 (TIMD4), 转录变体2, mRNA (GenBank登录号NM_001146726.1)</p> <p>ATAAGAGGTTGGGCTTGGATAGATAGACAGACTCCTGGTCCGGTCAACCGTCAAAATGTCCA AAGAAC CTCTCATTCTCTGGCTGATGATTGAGTTGGCTTACCTGACACCAGTCACCTCAGAGAC TGTTGT GACGGAGGTTTGGGTACCCGGGTACTTGCCTGTACTCATCCTGGTCTCACACAGC AACAGC ATGTGCTGGGGAAAGACCAGTGCCCCTACTCCGGTTGCAAGGAGGCGCTCATCCGACTGATG GAATGA GGGTGACCTCAAGAAAGTCAGCAAAATATAGACTTCAGGGACTATCCGAGAGGTGATGTCTC CTTGAC CATCTTAAACCCAGTGAAAGTGACAGCGGTGTACTGCTGCCGCATAGAAGTGCCTGGCTGG TTCAAC GATGAAAGATAAACGTGCGCCTGAATCTACAGAGGCCTAACAAACCACGCACAGAACAGCAA CCACCA CCACACGCAGAACACAACAAGCCCCACCACCCGACAAATGACAACAACCCAGCTGC ACTTCC AACACAGTCGTGACCACACCGATCTCACACCGGAACACCACCTCCAGATGACAACCATTGCC GTCTC ACAACAGCAAACACGTGCCTTCACTAACCCCAAGCACCCTCCGGAGGAAGCCACAGGTCTTC TGACTC CCGAGCCTCTAAGGAAGGGCCATCCTCACTGCAGAATCAGAAACTGTCCTCCCCAGTGATTC CTGGAG TAGTGTGAGTCATTCTGCTGACACTGTCCTGCTGACATCCAAAGCATCTGATACAGCAGTT CCTGAG CAGAACAAAACAACAAAACAGGACAGATGGATGGAATACCCATGTCAATGAAGAATGAAATGC CCATCT CCCAACTACTGATGATCATGCCCTCCTGGGATTGCTGCTTCGCATTGTTGTGGCGTT TCTCCT GAGAGGGAAACTCATGGAAACCTATTGTCGCAGAAACACACAAGGCTAGACTACATTGGAGAT AGTAAA AATGTCCTCAATGACGTGCAGCATGGAAGGGAAAGACGAAGACGGCTTTTACCCCTAAACAC GCAGTA GCATGTTAGATTGAGGATGGGGCATGACACTCCAGTGTCAAAATAAGTCTTAGTAGATTCCCT TGTTTC ATAAAAAAAGACTCACTTATTCCATGGATGTCATTGATCCAGGCTGCTTAGTTCATGAATGA AGGGTA CTTAGAGACCACAACTCTGTCAAAAA</p>

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 百时美施贵宝公司
- [0003] <120> TIM-4拮抗剂和PD-1拮抗剂的组合及其使用方法
- [0004] <130> MXI-550PC
- [0005] <140> PCT/US2017/040665
- [0006] <141> 2017-07-05
- [0007] <150> US 62/359,073
- [0008] <151> 2016-07-06
- [0009] <160> 32
- [0010] <170> PatentIn version 3.5
- [0011] <210> 1
- [0012] <211> 123
- [0013] <212> PRT
- [0014] <213> Artificial Sequence
- [0015] <220>
- [0016] <223> Synthetic: Heavy Chain Variable Region (VH) Amino Acid Sequence
- [0017] Anti-PD-L1 mAb (12A4; 12A4 in WO 2007/005874 and US Patent No. 7,943,743)
- [0019] <400> 1
- [0020] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
- [0021] 1 5 10 15
- [0022] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Thr Ser Gly Asp Thr Phe Ser Thr Tyr
- [0023] 20 25 30
- [0024] Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
- [0025] 35 40 45
- [0026] Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Lys Ala His Tyr Ala Gln Lys Phe
- [0027] 50 55 60
- [0028] Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
- [0029] 65 70 75 80
- [0030] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
- [0031] 85 90 95
- [0032] Ala Arg Lys Phe His Phe Val Ser Gly Ser Pro Phe Gly Met Asp Val
- [0033] 100 105 110
- [0034] Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
- [0035] 115 120
- [0036] <210> 2
- [0037] <211> 366
- [0038] <212> DNA
- [0039] <213> Artificial Sequence
- [0040] <220>
- [0041] <223> Synthetic: Heavy Chain Variable Region (VH) Nucleotide Sequence

[0042]	Anti-PD-L1 mAb (12A4; 12A4 in WO 2007/005874 and US Patent No. 7,943,743)			
[0044]	<400> 2			
[0045]	caggtccagc tgggtcagtc tggggctgag gtgaagaagc ctgggtcctc ggtgaaggc 60			
[0046]	tcctgcaaga cttctggaga caccttcagc acctatgcta tcagctgggt gcgacaggcc 120			
[0047]	cctggacaag ggcttgagt gatgggaggg atcatcccta tatttggtaa agcacactac 180			
[0048]	gcacagaagt tccagggcag agtcacgatt accgcggacg aatccacgag cacagcctac 240			
[0049]	atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attttgc gagaaagttt 300			
[0050]	cactttgttt cggggagccc cttcggtatg gacgtctggg gccaaggac cacggtcacc 360			
[0051]	gtctcc 366			
[0052]	<210> 3			
[0053]	<211> 106			
[0054]	<212> PRT			
[0055]	<213> Artificial Sequence			
[0056]	<220>			
[0057]	<223> Synthetic: Light Chain Variable Region (VL) Amino Acid Sequence			
[0058]	Anti-PD-L1 mAb (12A4; 12A4 in WO 2007/005874 and US Patent No. 7,943,743)			
[0060]	<400> 3			
[0061]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly			
[0062]	1	5	10	15
[0063]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr			
[0064]	20	25	30	
[0065]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile			
[0066]	35	40	45	
[0067]	Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly			
[0068]	50	55	60	
[0069]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro			
[0070]	65	70	75	80
[0071]	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr			
[0072]	85	90	95	
[0073]	Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys			
[0074]	100	105		
[0075]	<210> 4			
[0076]	<211> 318			
[0077]	<212> DNA			
[0078]	<213> Artificial Sequence			
[0079]	<220>			
[0080]	<223> Synthetic: Light Chain Variable Region (VL) Nucleotide Sequence			
[0081]	Anti-PD-L1 mAb (12A4; 12A4 in WO 2007/005874 and US Patent No. 7,943,743)			
[0083]	<400> 4			

[0084]	gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtcttgc ctccagggga aagagccacc	60
[0085]	ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agctacttag cctgttacca acagaaacct	120
[0086]	ggccaggctc ccaggctc catctatgtat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc	180
[0087]	aggttcagtgc cagtggttc tggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct	240
[0088]	gaagattttc cagtttattatctgtcagcag cgtacacttgc ggcgcacgtt cggccaagggg	300
[0089]	accaagggtgg aaatcaaa	318
[0090]	<210> 5	
[0091]	<211> 5	
[0092]	<212> PRT	
[0093]	<213> Artificial Sequence	
[0094]	<220>	
[0095]	<223> Synthetic: Heavy Chain CDR1 Amino Acid Sequence Anti-PD-L1 mAb	
[0096]	(12A4; 12A4 in WO 2007/005874 and US Patent No. 7,943,743)	
[0097]	<400> 5	
[0098]	Thr Tyr Ala Ile Ser	
[0099]	1 5	
[0100]	<210> 6	
[0101]	<211> 16	
[0102]	<212> PRT	
[0103]	<213> Artificial Sequence	
[0104]	<220>	
[0105]	<223> Synthetic: Heavy Chain CDR2 Amino Acid Sequence Anti-PD-L1 mAb	
[0106]	(12A4; 12A4 in WO 2007/005874 and US Patent No. 7,943,743)	
[0107]	<400> 6	
[0108]	Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Lys Ala His Tyr Ala Gln Lys Phe Gln	
[0109]	1 5 10 15	
[0110]	<210> 7	
[0111]	<211> 14	
[0112]	<212> PRT	
[0113]	<213> Artificial Sequence	
[0114]	<220>	
[0115]	<223> Synthetic: Heavy Chain CDR3 Amino Acid Sequence Anti-PD-L1 mAb	
[0116]	(12A4; 12A4 in WO 2007/005874 and US Patent No. 7,943,743)	
[0117]	<400> 7	
[0118]	Lys Phe His Phe Val Ser Gly Ser Pro Phe Gly Met Asp Val	
[0119]	1 5 10	
[0120]	<210> 8	
[0121]	<211> 11	
[0122]	<212> PRT	
[0123]	<213> Artificial Sequence	
[0124]	<220>	
[0125]	<223> Synthetic: Light Chain CDR1 Amino Acid Sequence Anti-PD-L1 mAb	

- [0126] (12A4; 12A4 in WO 2007/005874 and US Patent No. 7,943,743)
- [0127] <400> 8
- [0128] Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
- [0129] 1 5 10
- [0130] <210> 9
- [0131] <211> 7
- [0132] <212> PRT
- [0133] <213> Artificial Sequence
- [0134] <220>
- [0135] <223> Synthetic: Light Chain CDR2 Amino Acid Sequence Anti-PD-L1 mAb
- [0136] (12A4; 12A4 in WO 2007/005874 and US Patent No. 7,943,743)
- [0137] <400> 9
- [0138] Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr
- [0139] 1 5
- [0140] <210> 10
- [0141] <211> 8
- [0142] <212> PRT
- [0143] <213> Artificial Sequence
- [0144] <220>
- [0145] <223> Synthetic: Light Chain CDR3 Amino Acid Sequence Anti-PD-L1 mAb
- [0146] (12A4; 12A4 in WO 2007/005874 and US Patent No. 7,943,743)
- [0147] <400> 10
- [0148] Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Thr
- [0149] 1 5
- [0150] <210> 11
- [0151] <211> 440
- [0152] <212> PRT
- [0153] <213> Artificial Sequence
- [0154] <220>
- [0155] <223> Synthetic: Heavy Chain Amino Acid Sequence Anti-PD-1 mAb (5C4 in
- [0156] WO 2006/121168) (variable region underlined; constant region
- [0157] bold)
- [0158] <400> 11
- [0159] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
- [0160] 1 5 10 15
- [0161] Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser
- [0162] 20 25 30
- [0163] Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
- [0164] 35 40 45
- [0165] Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
- [0166] 50 55 60
- [0167] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe

[0168]	65	70	75	80
[0169]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0170]		85	90	95
[0171]	Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser			
[0172]		100	105	110
[0173]	Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser			
[0174]		115	120	125
[0175]	Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp			
[0176]		130	135	140
[0177]	Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr			
[0178]		145	150	155
[0179]	Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr			
[0180]		165	170	175
[0181]	Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys			
[0182]		180	185	190
[0183]	Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp			
[0184]		195	200	205
[0185]	Lys Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala			
[0186]		210	215	220
[0187]	Pro Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro			
[0188]		225	230	235
[0189]	Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val			
[0190]		245	250	255
[0191]	Val Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val			
[0192]		260	265	270
[0193]	Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln			
[0194]		275	280	285
[0195]	Phe Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln			
[0196]		290	295	300
[0197]	Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly			
[0198]		305	310	315
[0199]	Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro			
[0200]		325	330	335
[0201]	Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr			
[0202]		340	345	350
[0203]	Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser			
[0204]		355	360	365
[0205]	Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr			
[0206]		370	375	380
[0207]	Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr			
[0208]		385	390	395
[0209]	Ser Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe			400

[0210]	405	410	415
[0211]	Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys		
[0212]	420	425	430
[0213]	Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
[0214]	435	440	
[0215]	<210> 12		
[0216]	<211> 214		
[0217]	<212> PRT		
[0218]	<213> Artificial Sequence		
[0219]	<220>		
[0220]	<223> Synthetic: Light Chain Amino Acid Sequence Anti-PD-1 mAb (5C4 in		
[0221]	WO 2006/121168) (variable region underlined; constant region		
[0222]	bold)		
[0223]	<400> 12		
[0224]	Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
[0225]	1 5 10 15		
[0226]	Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr		
[0227]	20 25 30		
[0228]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile		
[0229]	35 40 45		
[0230]	Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly		
[0231]	50 55 60		
[0232]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro		
[0233]	65 70 75 80		
[0234]	Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg		
[0235]	85 90 95		
[0236]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala		
[0237]	100 105 110		
[0238]	Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly		
[0239]	115 120 125		
[0240]	Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala		
[0241]	130 135 140		
[0242]	Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln		
[0243]	145 150 155 160		
[0244]	Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser		
[0245]	165 170 175		
[0246]	Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr		
[0247]	180 185 190		
[0248]	Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser		
[0249]	195 200 205		
[0250]	Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
[0251]	210		

[0252]	<210>	13		
[0253]	<211>	113		
[0254]	<212>	PRT		
[0255]	<213>	Artificial Sequence		
[0256]	<220>			
[0257]	<223>	Synthetic: Heavy Chain Variable Region (VH) Amino Acid Sequence		
[0258]		Anti-PD-1 mAb (5C4 in WO 2006/121168) (SEQ ID NO:4 from WO		
[0259]		2006/121168)		
[0260]	<400>	13		
[0261]	Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg			
[0262]	1	5	10	15
[0263]	Ser Leu Arg Leu Asp Cys Lys Ala Ser Gly Ile Thr Phe Ser Asn Ser			
[0264]	20	25	30	
[0265]	Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
[0266]	35	40	45	
[0267]	Ala Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
[0268]	50	55	60	
[0269]	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Phe			
[0270]	65	70	75	80
[0271]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
[0272]	85	90	95	
[0273]	Ala Thr Asn Asp Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser			
[0274]	100	105	110	
[0275]	Ser			
[0276]	<210>	14		
[0277]	<211>	339		
[0278]	<212>	DNA		
[0279]	<213>	Artificial Sequence		
[0280]	<220>			
[0281]	<223>	Synthetic: Heavy Chain Variable Region (VH) Nucleotide Sequence		
[0282]		Anti-PD-1 mAb (5C4 in WO 2006/121168) (SEQ ID NO:60 from WO		
[0283]		2006/121168)		
[0284]	<400>	14		
[0285]	caggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc gtgggtccagc ctgggaggc cctgagactc	60		
[0286]	gactgtaaag cgtctggaat caccttcagt aactctggca tgcactgggt ccgccaggct	120		
[0287]	ccaggcaagg ggctggagtg ggtggcagtt atttggatg atggaagtaa aagataactat	180		
[0288]	gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca attccaagaa cacgctgttt	240		
[0289]	ctgcaaatga acagcctgag agccgaggac acggctgtgt attactgtgc gacaaacgac	300		
[0290]	gactactggg gccagggAAC cctggtcacc gtctcctca	339		
[0291]	<210>	15		
[0292]	<211>	107		
[0293]	<212>	PRT		

- [0294] <213> Artificial Sequence
- [0295] <220>
- [0296] <223> Synthetic: Light Chain Variable Region (VL) Amino Acid Sequence
- [0297] Anti-PD-1 mAb (5C4 in WO 2006/121168) (SEQ ID NO:11 from WO
- [0298] 2006/121168)
- [0299] <400> 15
- [0300] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
- [0301] 1 5 10 15
- [0302] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
- [0303] 20 25 30
- [0304] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
- [0305] 35 40 45
- [0306] Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
- [0307] 50 55 60
- [0308] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
- [0309] 65 70 75 80
- [0310] Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg
- [0311] 85 90 95
- [0312] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
- [0313] 100 105
- [0314] <210> 16
- [0315] <211> 321
- [0316] <212> DNA
- [0317] <213> Artificial Sequence
- [0318] <220>
- [0319] <223> Synthetic: Light Chain Variable Region (VL) Nucleotide Sequence
- [0320] Anti-PD-1 mAb (5C4 in WO 2006/121168) (SEQ ID NO:67 from WO
- [0321] 2006/121168)
- [0322] <400> 16
- [0323] gaaatttgtt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggta aagagccacc 60
- [0324] ctctcctgca gggccagtca gagtgtagt agttacttag cctggtagca acagaaacct 120
- [0325] gcccaggctc ccaggctcct catctatgtat gcatccaaca gggccactgg catcccagcc 180
- [0326] agttcagtgc cagtggttc tggacagac ttcactctca ccatcagcag cctagagcct 240
- [0327] gaagatttttgc agtttattat ctttcagcag agtagcaact ggcctcgac gttcggccaa 300
- [0328] gggaccaagg tggaaatcaa a 321
- [0329] <210> 17
- [0330] <211> 5
- [0331] <212> PRT
- [0332] <213> Artificial Sequence
- [0333] <220>
- [0334] <223> Synthetic: Heavy Chain CDR1 Amino Acid Sequence Anti-PD-1 mAb
- [0335] (5C4 in WO 2006/121168) (SEQ ID NO:18 from WO 2006/121168)

- [0336] <400> 17
- [0337] Asn Ser Gly Met His
- [0338] 1 5
- [0339] <210> 18
- [0340] <211> 17
- [0341] <212> PRT
- [0342] <213> Artificial Sequence
- [0343] <220>
- [0344] <223> Synthetic: Heavy Chain CDR2 Amino Acid Sequence Anti-PD-1 mAb
(5C4 in WO 2006/121168) (SEQ ID NO:25 from WO 2006/121168)
- [0346] <400> 18
- [0347] Val Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Lys Arg Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
- [0348] 1 5 10 15
- [0349] Gly
- [0350] <210> 19
- [0351] <211> 4
- [0352] <212> PRT
- [0353] <213> Artificial Sequence
- [0354] <220>
- [0355] <223> Synthetic: Heavy Chain CDR3 Amino Acid Sequence Anti-PD-1 mAb
(5C4 in WO 2006/121168) (SEQ ID NO:32 from WO 2006/121168)
- [0357] <400> 19
- [0358] Asn Asp Asp Tyr
- [0359] 1
- [0360] <210> 20
- [0361] <211> 11
- [0362] <212> PRT
- [0363] <213> Artificial Sequence
- [0364] <220>
- [0365] <223> Synthetic: Light Chain CDR1 Amino Acid Sequence Anti-PD-1 mAb
(5C4 in WO 2006/121168) (SEQ ID NO:39 from WO 2006/121168)
- [0367] <400> 20
- [0368] Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
- [0369] 1 5 10
- [0370] <210> 21
- [0371] <211> 7
- [0372] <212> PRT
- [0373] <213> Artificial Sequence
- [0374] <220>
- [0375] <223> Synthetic: Light Chain CDR2 Amino Acid Sequence Anti-PD-1 mAb
(5C4 in WO 2006/121168) (SEQ ID NO:46 from WO 2006/121168)
- [0377] <400> 21

[0378] Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr

[0379] 1 5

[0380] <210> 22

[0381] <211> 9

[0382] <212> PRT

[0383] <213> Artificial Sequence

[0384] <220>

[0385] <223> Synthetic: Light Chain CDR3 Amino Acid Sequence Anti-PD-1 mAb

[0386] (5C4 in WO 2006/121168) (SEQ ID NO:53 from WO 2006/121168)

[0387] <400> 22

[0388] Gln Gln Ser Ser Asn Trp Pro Arg Thr

[0389] 1 5

[0390] <210> 23

[0391] <211> 2106

[0392] <212> DNA

[0393] <213> Homo sapiens

[0394] <220>

[0395] <221> misc_feature

[0396] <222> (1) .. (2106)

[0397] <223> Complete PD-1 sequence

[0398] <400> 23

[0399] agttccctt ccgctcacct ccgcctgagc agtggagaag gcggcactct ggtggggctg 60

[0400] ctccaggcat gcagatccca caggcgcctt ggccagtcgt ctggcggtg ctacaactgg 120

[0401] gctggcgcc aggatggttc ttagactccc cagacaggcc ctggaacccc cccaccttct 180

[0402] tcccagccct gctcgtggc accgaagggg acaacgccc ac ttcacctgc agcttctcca 240

[0403] acacatcgga gagcttcgtg ctaaactggt accgcatttgc cccagcaac cagacggaca 300

[0404] agctggccgc cttccccc gagccgcacc acggccggca ggactgccc ttccgtgtca 360

[0405] cacaactgcc caacggcggt gacttccaca tgagcgtggt cagggccgg cgcaatgaca 420

[0406] gccgcaccta cctctgtggg gccatctccc tggcccccgg ggcgcagatc aaagagagcc 480

[0407] tgcgggcaga gctcagggtg acagagagaa gggcagaatg gcccacagcc caccggcc 540

[0408] cctcacccag gccagccggc cagttccaaa ccctgggtgg tgggtcggt ggcggcctgc 600

[0409] tggcagccct ggtgctgcta gtctgggtcc tggccgtcat ctgctccgg gccgcacgg 660

[0410] ggacaatagg agccaggcgcc accggccagc ccctgaagga ggacccctca ggcgtgcctg 720

[0411] tttctctgt ggactatggg gagctggatt tccagtgcc agagaagacc ccggagccccc 780

[0412] ccgtgccttg tggacactgc tctggcccc tctgaccggc ttccctggcc accagtgttc 840

[0413] gcacccatc ccccgccgc agggctcag ccgcggccc tcggagtgcc cagccactga 900

[0414] ggcctgagga tggacactgc tctggcccc tctgaccggc ttccctggcc accagtgttc 960

[0415] tgcagaccct ccaccatgag cccgggtcag cgcatttcct caggagaagc aggcagggtg 1020

[0416] caggccattt caggccgtcc agggctgag ctgcctgggg ggcaccgggg ctccagccctg 1080

[0417] cacctgcacc aggcacagcc ccaccacagg actcatgtct caatgcccac agtgagccca 1140

[0418] ggcagcagggt gtcaccgtcc cctacaggga gggccagatg cagtcactgc ttcaggtcct 1200

[0419] gccagcacag agctgcctgc gtccagctcc ctgaatctct gtcgtgtctg ctgctgctgc 1260

[0420]	tgctgctgcc	tgccggccgg	ggctgaaggc	gccgtggccc	tgcctgacgc	cccgagcc	1320									
[0421]	cctgcctgaa	cttggggct	ggttggagat	ggccttggag	cagccaaggt	gcccctggca	1380									
[0422]	gtggcatccc	gaaacgcctt	ggacgcagg	cccaagactg	ggcacaggag	tgggaggtac	1440									
[0423]	atggggctgg	ggactcccca	ggagttatct	gctccctgca	ggccttagaga	agtttcagg	1500									
[0424]	aaggtcagaa	gagctcctgg	ctgtggtggg	cagggcagga	aaccctccc	acctttacac	1560									
[0425]	atgcccaggc	agcacctcag	gcccttgtg	gggcaggaa	gctgaggcag	taagcggca	1620									
[0426]	ggcagagctg	gaggccttgc	agggcagcca	gcactctggc	ctccctggc	cgcattccac	1680									
[0427]	cccagccct	cacaccactc	gggagaggaa	catcctacgg	tcccaagg	tcaggaggcag	1740									
[0428]	ggctggggtt	gactcaggcc	cctccagct	gtggccac	gggtgttggg	agggcagaag	1800									
[0429]	tgcaggcacc	tagggccccc	catgtgccc	ccctgggagc	tctccttgg	acccattcct	1860									
[0430]	gaaattattt	aaaggggtt	gcccggctcc	caccagg	tgggtggaa	ggtacaggc	1920									
[0431]	ttccccggg	gcctagtaacc	cccgctggc	ctatccactc	ctcacatcca	cacactgcac	1980									
[0432]	ccccactcct	ggggcagg	gaccagc	caggcggcc	gcaggcac	ctggctgg	2040									
[0433]	gacaagg	gatcccccttccc	tgtgttcta	ttatattata	attataatta	aatatgagag	2100									
[0434]	catgct						2106									
[0435]	<210>	24														
[0436]	<211>	290														
[0437]	<212>	PRT														
[0438]	<213>	Homo sapiens														
[0439]	<220>															
[0440]	<221>	misc_feature														
[0441]	<222>	(1) .. (290)														
[0442]	<223>	Human PD-L1 amino acid sequence - isoform a precursor														
[0443]	<400>	24														
[0444]	Met	Arg	Ile	Phe	Ala	Val	Phe	Ile	Phe	Met	Thr	Tyr	Trp	His	Leu	Leu
[0445]	1															15
[0446]	Asn	Ala	Phe	Thr	Val	Thr	Val	Pro	Lys	Asp	Leu	Tyr	Val	Val	Glu	Tyr
[0447]																30
[0448]	Gly	Ser	Asn	Met	Thr	Ile	Glu	Cys	Lys	Phe	Pro	Val	Glu	Lys	Gln	Leu
[0449]																45
[0450]	Asp	Leu	Ala	Ala	Leu	Ile	Val	Tyr	Trp	Glu	Met	Glu	Asp	Lys	Asn	Ile
[0451]																60
[0452]	Ile	Gln	Phe	Val	His	Gly	Glu	Glu	Asp	Leu	Lys	Val	Gln	His	Ser	Ser
[0453]																80
[0454]	Tyr	Arg	Gln	Arg	Ala	Arg	Leu	Leu	Lys	Asp	Gln	Leu	Ser	Leu	Gly	Asn
[0455]																95
[0456]	Ala	Ala	Leu	Gln	Ile	Thr	Asp	Val	Lys	Leu	Gln	Asp	Ala	Gly	Val	Tyr
[0457]																110
[0458]	Arg	Cys	Met	Ile	Ser	Tyr	Gly	Gly	Ala	Asp	Tyr	Lys	Arg	Ile	Thr	Val
[0459]																125
[0460]	Lys	Val	Asn	Ala	Pro	Tyr	Asn	Lys	Ile	Asn	Gln	Arg	Ile	Leu	Val	Val
[0461]																140

[0462]	Asp Pro Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr			
[0463]	145	150	155	160
[0464]	Pro Lys Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser			
[0465]	165	170	175	
[0466]	Gly Lys Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn			
[0467]	180	185	190	
[0468]	Val Thr Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr			
[0469]	195	200	205	
[0470]	Cys Thr Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu			
[0471]	210	215	220	
[0472]	Val Ile Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His			
[0473]	225	230	235	240
[0474]	Leu Val Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr			
[0475]	245	250	255	
[0476]	Phe Ile Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys			
[0477]	260	265	270	
[0478]	Gly Ile Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu			
[0479]	275	280	285	
[0480]	Glu Thr			
[0481]	290			
[0482]	<210> 25			
[0483]	<211> 176			
[0484]	<212> PRT			
[0485]	<213> Homo sapiens			
[0486]	<220>			
[0487]	<221> misc_feature			
[0488]	<222> (1) .. (176)			
[0489]	<223> Human PD-L1 amino acid sequence - isoform b precursor			
[0490]	<400> 25			
[0491]	Met Arg Ile Phe Ala Val Phe Ile Phe Met Thr Tyr Trp His Leu Leu			
[0492]	1	5	10	15
[0493]	Asn Ala Pro Tyr Asn Lys Ile Asn Gln Arg Ile Leu Val Val Asp Pro			
[0494]	20	25	30	
[0495]	Val Thr Ser Glu His Glu Leu Thr Cys Gln Ala Glu Gly Tyr Pro Lys			
[0496]	35	40	45	
[0497]	Ala Glu Val Ile Trp Thr Ser Ser Asp His Gln Val Leu Ser Gly Lys			
[0498]	50	55	60	
[0499]	Thr Thr Thr Asn Ser Lys Arg Glu Glu Lys Leu Phe Asn Val Thr			
[0500]	65	70	75	80
[0501]	Ser Thr Leu Arg Ile Asn Thr Thr Asn Glu Ile Phe Tyr Cys Thr			
[0502]	85	90	95	
[0503]	Phe Arg Arg Leu Asp Pro Glu Glu Asn His Thr Ala Glu Leu Val Ile			

[0504]	100	105	110
[0505]	Pro Glu Leu Pro Leu Ala His Pro Pro Asn Glu Arg Thr His Leu Val		
[0506]	115	120	125
[0507]	Ile Leu Gly Ala Ile Leu Leu Cys Leu Gly Val Ala Leu Thr Phe Ile		
[0508]	130	135	140
[0509]	Phe Arg Leu Arg Lys Gly Arg Met Met Asp Val Lys Lys Cys Gly Ile		
[0510]	145	150	155
[0511]	Gln Asp Thr Asn Ser Lys Lys Gln Ser Asp Thr His Leu Glu Glu Thr		
[0512]	165	170	175
[0513]	<210> 26		
[0514]	<211> 378		
[0515]	<212> PRT		
[0516]	<213> Homo sapiens		
[0517]	<220>		
[0518]	<221> misc_feature		
[0519]	<222> (1) .. (378)		
[0520]	<223> Human TIM-4 amino acid sequence - isoform 1		
[0521]	<400> 26		
[0522]	Met Ser Lys Glu Pro Leu Ile Leu Trp Leu Met Ile Glu Phe Trp Trp		
[0523]	1 5 10 15		
[0524]	Leu Tyr Leu Thr Pro Val Thr Ser Glu Thr Val Val Thr Glu Val Leu		
[0525]	20 25 30		
[0526]	Gly His Arg Val Thr Leu Pro Cys Leu Tyr Ser Ser Trp Ser His Asn		
[0527]	35 40 45		
[0528]	Ser Asn Ser Met Cys Trp Gly Lys Asp Gln Cys Pro Tyr Ser Gly Cys		
[0529]	50 55 60		
[0530]	Lys Glu Ala Leu Ile Arg Thr Asp Gly Met Arg Val Thr Ser Arg Lys		
[0531]	65 70 75 80		
[0532]	Ser Ala Lys Tyr Arg Leu Gln Gly Thr Ile Pro Arg Gly Asp Val Ser		
[0533]	85 90 95		
[0534]	Leu Thr Ile Leu Asn Pro Ser Glu Ser Asp Ser Gly Val Tyr Cys Cys		
[0535]	100 105 110		
[0536]	Arg Ile Glu Val Pro Gly Trp Phe Asn Asp Val Lys Ile Asn Val Arg		
[0537]	115 120 125		
[0538]	Leu Asn Leu Gln Arg Ala Ser Thr Thr His Arg Thr Ala Thr Thr		
[0539]	130 135 140		
[0540]	Thr Thr Arg Arg Thr Thr Thr Ser Pro Thr Thr Thr Arg Gln Met		
[0541]	145 150 155 160		
[0542]	Thr Thr Thr Pro Ala Ala Leu Pro Thr Thr Val Val Thr Thr Pro Asp		
[0543]	165 170 175		
[0544]	Leu Thr Thr Gly Thr Pro Leu Gln Met Thr Thr Ile Ala Val Phe Thr		
[0545]	180 185 190		

[0546] Thr Ala Asn Thr Cys Leu Ser Leu Thr Pro Ser Thr Leu Pro Glu Glu
 [0547] 195 200 205
 [0548] Ala Thr Gly Leu Leu Thr Pro Glu Pro Ser Lys Glu Gly Pro Ile Leu
 [0549] 210 215 220
 [0550] Thr Ala Glu Ser Glu Thr Val Leu Pro Ser Asp Ser Trp Ser Ser Val
 [0551] 225 230 235 240
 [0552] Glu Ser Thr Ser Ala Asp Thr Val Leu Leu Thr Ser Lys Glu Ser Lys
 [0553] 245 250 255
 [0554] Val Trp Asp Leu Pro Ser Thr Ser His Val Ser Met Trp Lys Thr Ser
 [0555] 260 265 270
 [0556] Asp Ser Val Ser Ser Pro Gln Pro Gly Ala Ser Asp Thr Ala Val Pro
 [0557] 275 280 285
 [0558] Glu Gln Asn Lys Thr Thr Lys Thr Gly Gln Met Asp Gly Ile Pro Met
 [0559] 290 295 300
 [0560] Ser Met Lys Asn Glu Met Pro Ile Ser Gln Leu Leu Met Ile Ile Ala
 [0561] 305 310 315 320
 [0562] Pro Ser Leu Gly Phe Val Leu Phe Ala Leu Phe Val Ala Phe Leu Leu
 [0563] 325 330 335
 [0564] Arg Gly Lys Leu Met Glu Thr Tyr Cys Ser Gln Lys His Thr Arg Leu
 [0565] 340 345 350
 [0566] Asp Tyr Ile Gly Asp Ser Lys Asn Val Leu Asn Asp Val Gln His Gly
 [0567] 355 360 365
 [0568] Arg Glu Asp Glu Asp Gly Leu Phe Thr Leu
 [0569] 370 375
 [0570] <210> 27
 [0571] <211> 1374
 [0572] <212> DNA
 [0573] <213> Homo sapiens
 [0574] <220>
 [0575] <221> misc_feature
 [0576] <222> (1) .. (1374)
 [0577] <223> Homo sapiens T-cell (TIMD4) , transcript variant 1, mRNA
 [0578] <400> 27
 [0579] ataagaggtt gggctttgga tagatagaca gactcctggg tccggtaac cgtcaaaatg 60
 [0580] tccaaagaac ctctcattct ctggctgatg attgagttt ggtggcttta cctgacaccca 120
 [0581] gtcacttcag agactgttgt gacggagggtt ttgggtcacc gggtgacttt gccctgtctg 180
 [0582] tactcatcct ggtctcacaa cagcaacagc atgtgctggg ggaagacca gtccccctac 240
 [0583] tccggttgca aggaggcgct catccgcact gatggaatga gggtgacctc aagaaagtca 300
 [0584] gcaaaatata gacttcaggg gactatcccg agaggtgatg tctccttgac catcttaaac 360
 [0585] cccagtgaaa gtgacagcgg tgtgtactgc tgccgcata gaaatgcctgg ctgggtcaac 420
 [0586] gatgtaaaga taaacgtgcg cctgaatcta cagagagcct caacaaccac gcacagaaca 480
 [0587] gcaaccacca ccacacgcag aacaacaaca acaagccccca ccaccacccg acaaatgaca 540

[0588] acaaccccag ctgcacttcc aacaacagtc gtgaccacac ccgatctcac aaccggaaca 600
 [0589] ccactccaga tgacaaccat tgccgtcttc acaacagcaa acacgtgcct ttcactaacc 660
 [0590] ccaagcaccc ttccggagga agccacaggt cttctgactc ccgagccttc taaggaaggg 720
 [0591] cccatcctca ctgcagaatc agaaaactgtc ctccccagtg attcctggag tagtgtttag 780
 [0592] tctacttctg ctgacactgt cctgctgaca tccaaagagt ccaaagtttggatctccca 840
 [0593] tcaacatccc acgtgtcaat gtggaaaacg agtgattctg tgtcttctcc tcagcctgga 900
 [0594] gcatctgata cagcagttcc tgagcagaac aaaacaacaa aaacaggaca gatggatgga 960
 [0595] atacccatgt caatgaagaa tgaaatgccc atctcccaac tactgatgat catgcxxxxx 1020
 [0596] tccttggat ttgtgcttt cgcatgtt gtggcggttc tcctgagagg gaaactcatg 1080
 [0597] gaaacctatt gttcgcagaa acacacaagg ctagactaca ttggagatag taaaaatgtc 1140
 [0598] ctaaatgacg tgcagcatgg aaggaaagac gaagacggcc ttttaccct ctaacaacgc 1200
 [0599] agtagcatgt tagattgagg atggggcat gacactccag tgtcaaaata agtcttagta 1260
 [0600] gatttcctg tttcataaaa aagactcaacttccatgg atgtcattga tccaggctt 1320
 [0601] cttagtttc atgaatgaag ggtactttag agaccacaac ttctctgtca aaaa 1374
 [0602] <210> 28
 [0603] <211> 350
 [0604] <212> PRT
 [0605] <213> Homo sapiens
 [0606] <220>
 [0607] <221> misc_feature
 [0608] <222> (1) .. (350)
 [0609] <223> Human TIM-4 amino acid sequence isoform 2
 [0610] <400> 28
 [0611] Met Ser Lys Glu Pro Leu Ile Leu Trp Leu Met Ile Glu Phe Trp Trp
 [0612] 1 5 10 15
 [0613] Leu Tyr Leu Thr Pro Val Thr Ser Glu Thr Val Val Thr Glu Val Leu
 [0614] 20 25 30
 [0615] Gly His Arg Val Thr Leu Pro Cys Leu Tyr Ser Ser Trp Ser His Asn
 [0616] 35 40 45
 [0617] Ser Asn Ser Met Cys Trp Gly Lys Asp Gln Cys Pro Tyr Ser Gly Cys
 [0618] 50 55 60
 [0619] Lys Glu Ala Leu Ile Arg Thr Asp Gly Met Arg Val Thr Ser Arg Lys
 [0620] 65 70 75 80
 [0621] Ser Ala Lys Tyr Arg Leu Gln Gly Thr Ile Pro Arg Gly Asp Val Ser
 [0622] 85 90 95
 [0623] Leu Thr Ile Leu Asn Pro Ser Glu Ser Asp Ser Gly Val Tyr Cys Cys
 [0624] 100 105 110
 [0625] Arg Ile Glu Val Pro Gly Trp Phe Asn Asp Val Lys Ile Asn Val Arg
 [0626] 115 120 125
 [0627] Leu Asn Leu Gln Arg Ala Ser Thr Thr Thr His Arg Thr Ala Thr Thr
 [0628] 130 135 140
 [0629] Thr Thr Arg Arg Thr Thr Thr Ser Pro Thr Thr Arg Gln Met

[0630]	145	150	155	160
[0631]	Thr Thr Thr Pro Ala Ala Leu Pro Thr Thr Val Val Thr Thr Pro Asp			
[0632]	165	170	175	
[0633]	Leu Thr Thr Gly Thr Pro Leu Gln Met Thr Thr Ile Ala Val Phe Thr			
[0634]	180	185	190	
[0635]	Thr Ala Asn Thr Cys Leu Ser Leu Thr Pro Ser Thr Leu Pro Glu Glu			
[0636]	195	200	205	
[0637]	Ala Thr Gly Leu Leu Thr Pro Glu Pro Ser Lys Glu Gly Pro Ile Leu			
[0638]	210	215	220	
[0639]	Thr Ala Glu Ser Glu Thr Val Leu Pro Ser Asp Ser Trp Ser Ser Val			
[0640]	225	230	235	240
[0641]	Glu Ser Thr Ser Ala Asp Thr Val Leu Leu Thr Ser Lys Ala Ser Asp			
[0642]	245	250	255	
[0643]	Thr Ala Val Pro Glu Gln Asn Lys Thr Thr Lys Thr Gly Gln Met Asp			
[0644]	260	265	270	
[0645]	Gly Ile Pro Met Ser Met Lys Asn Glu Met Pro Ile Ser Gln Leu Leu			
[0646]	275	280	285	
[0647]	Met Ile Ile Ala Pro Ser Leu Gly Phe Val Leu Phe Ala Leu Phe Val			
[0648]	290	295	300	
[0649]	Ala Phe Leu Leu Arg Gly Lys Leu Met Glu Thr Tyr Cys Ser Gln Lys			
[0650]	305	310	315	320
[0651]	His Thr Arg Leu Asp Tyr Ile Gly Asp Ser Lys Asn Val Leu Asn Asp			
[0652]	325	330	335	
[0653]	Val Gln His Gly Arg Glu Asp Glu Asp Gly Leu Phe Thr Leu			
[0654]	340	345	350	
[0655]	<210> 29			
[0656]	<211> 1290			
[0657]	<212> DNA			
[0658]	<213> Homo sapiens			
[0659]	<220>			
[0660]	<221> misc_feature			
[0661]	<222> (1)...(1290)			
[0662]	<223> Homo sapiens T-cell (TIMD4), transcript variant 2, mRNA			
[0663]	<400> 29			
[0664]	ataagaggtt gggctttgga tagatagaca gactcctggg tccggtaac cgtcaaaatg 60			
[0665]	tccaaagaac ctctcattct ctggctgatg attgagttt ggtggcttta cctgacaccca 120			
[0666]	gtcacttcag agactgttgt gacggagggtt ttgggtcacc gggtgacttt gccctgtctg 180			
[0667]	tactcatcct ggtctcacaa cagcaacagc atgtgctggg ggaaagacca gtgcccctac 240			
[0668]	tccggttgca aggaggcgct catccgact gatggaatga gggtgacctc aagaaagtca 300			
[0669]	gcaaaatata gacttcaggg gactatcccg agaggtgatg tctccttgac catcttaaac 360			
[0670]	cccagtgaaa gtgacagcgg tgtgtactgc tgccgcatag aagtgcctgg ctggttcaac 420			
[0671]	gatgtaaaga taaacgtcgc cctgaatcta cagagagcct caacaaccac gcacagaaca 480			

[0672]	gcaaccacca	ccacacgcag	aacaacaaca	acaagccccca	ccaccacccg	acaaatgaca	540										
[0673]	acaacccag	ctgcacttcc	aacaacagtc	gtgaccacac	ccgatctcac	aaccggaaca	600										
[0674]	ccactccaga	tgacaaccat	tgccgtcttc	acaacagcaa	acacgtgcct	ttcactaacc	660										
[0675]	ccaaggcaccc	ttccggagga	agccacaggt	cttctgactc	ccgagccttc	taaggaaggg	720										
[0676]	cccatcctca	ctgcagaatc	agaaactgtc	ctccccagtg	attcctggag	tagtgttag	780										
[0677]	tctacttctg	ctgacactgt	cctgctgaca	tccaaagcat	ctgatacagc	agttcctgag	840										
[0678]	cagaacaaaa	caacaaaaac	aggacagatg	gatggaatac	ccatgtcaat	gaagaatgaa	900										
[0679]	atgcccattct	cccaactact	gatgatcatc	gccccctcct	tggatttgc	gctttcgca	960										
[0680]	ttgtttgtgg	cgtttctcct	gagagggaaa	ctcatggaaa	cctattgttc	gcagaaacac	1020										
[0681]	acaaggctag	actacattgg	agatagtaaa	aatgtcctca	atgacgtgca	gcatggaagg	1080										
[0682]	gaagacgaag	acggccttt	taccctctaa	caacgcagta	gcatgtttaga	ttgaggatgg	1140										
[0683]	gggcatgaca	ctccagtgte	aaaataagtc	tttagtagatt	tcctgttgc	ataaaaaaaga	1200										
[0684]	ctcacttatt	ccatggatgt	cattgatcca	ggcttgctt	agttcatga	atgaaggta	1260										
[0685]	cttagagac	cacaacttct	ctgtcaaaaa				1290										
[0686]	<210>	30															
[0687]	<211>	377															
[0688]	<212>	PRT															
[0689]	<213>	Macaca fascicularis															
[0690]	<220>																
[0691]	<221>	misc_feature															
[0692]	<222>	(1) .. (377)															
[0693]	<223>	TIM-4 ortholog															
[0694]	<400>	30															
[0695]	Met	Ser	Lys	Glu	Pro	Leu	Ile	Leu	Trp	Leu	Val	Met	Glu	Phe	Trp	Trp	
[0696]	1			5					10								15
[0697]	Leu	Tyr	Leu	Thr	Pro	Val	Thr	Ser	Glu	Thr	Val	Val	Thr	Glu	Val	Leu	
[0698]					20				25								30
[0699]	Gly	His	Arg	Val	Thr	Leu	Pro	Cys	Leu	Tyr	Ser	Ser	Trp	Ser	Gln	Asn	
[0700]					35				40								45
[0701]	Ser	Asn	Ser	Met	Cys	Trp	Gly	Lys	Asp	Lys	Cys	Pro	Tyr	Ser	Gly	Cys	
[0702]				50			55					60					
[0703]	Lys	Glu	Ala	Leu	Ile	Arg	Thr	Asp	Gly	Thr	Arg	Val	Thr	Ser	Arg	Lys	
[0704]				65			70			75			80				
[0705]	Ser	Ala	Lys	Tyr	Arg	Leu	Pro	Gly	Thr	Ile	Gln	Arg	Gly	Asn	Val	Ser	
[0706]					85				90				95				
[0707]	Leu	Thr	Ile	Leu	Asn	Pro	Arg	Glu	Gly	Asp	Ser	Gly	Val	Tyr	Cys	Cys	
[0708]					100			105				110					
[0709]	Arg	Ile	Glu	Val	Pro	Gly	Trp	Phe	Asn	Asp	Val	Lys	Ile	Asn	Val	Arg	
[0710]					115			120				125					
[0711]	Leu	Asn	Leu	Gln	Arg	Glu	Thr	Cys	Leu	Leu	Leu	Val	Thr	Ala	Ser	Thr	
[0712]					130			135			140						
[0713]	Thr	Thr	Arg	Arg	Thr	Arg	Thr	Ser	Pro	Pro	Pro	Thr	Thr	Pro	His	Val	

[0714]	145	150	155	160
[0715]	Thr Thr Thr Arg Ala Ala Leu Pro Thr Thr Val Met Thr Thr Pro Asp			
[0716]	165	170	175	
[0717]	Leu Thr Thr Glu Thr Pro Leu Gln Thr Thr Thr Ala Val Phe Thr			
[0718]	180	185	190	
[0719]	Thr Ala Asn Thr Cys Pro Ser Pro Thr Pro Ser Thr Leu Pro Glu Ala			
[0720]	195	200	205	
[0721]	Ala Thr Gly Leu Leu Thr Pro Glu Pro Ser Lys Glu Gly Pro Ile Leu			
[0722]	210	215	220	
[0723]	Thr Ala Glu Ser Glu Pro Val Leu Pro Ser Asp Ser Trp Ser Ser Thr			
[0724]	225	230	235	240
[0725]	Glu Ser Pro Ala Asp Thr Val Leu Leu Thr Ser Arg Glu Ser Lys Val			
[0726]	245	250	255	
[0727]	Trp Asp Leu Pro Pro Thr Ser His Val Ser Met Trp Lys Thr Ser Asp			
[0728]	260	265	270	
[0729]	Ser Val Ser Ser Pro Gln Pro Gly Ala Ser Asp Thr Ala Val Pro Glu			
[0730]	275	280	285	
[0731]	Gln Asn Lys Thr Thr Lys Thr Gly Gln Met Asp Gly Met Pro Met Pro			
[0732]	290	295	300	
[0733]	Met Lys Asn Glu Met Pro Ile Ser Gln Leu Leu Met Ile Leu Ala Pro			
[0734]	305	310	315	320
[0735]	Ser Leu Gly Phe Val Leu Leu Ala Leu Leu Met Ala Phe Leu Leu Arg			
[0736]	325	330	335	
[0737]	Gly Lys Leu Met Glu Thr Asn Cys Leu Gln Lys His Thr Arg Leu Asp			
[0738]	340	345	350	
[0739]	Cys Ile Gly Asp Ser Lys Asn Val Leu Asn Asp Met Arg His Gly Arg			
[0740]	355	360	365	
[0741]	Glu Asp Glu Asp Gly Leu Phe Thr Leu			
[0742]	370	375		
[0743]	<210> 31			
[0744]	<211> 369			
[0745]	<212> PRT			
[0746]	<213> Macaca fascicularis			
[0747]	<220>			
[0748]	<221> misc_feature			
[0749]	<222> (1)...(369)			
[0750]	<223> TIM-4 ortholog			
[0751]	<400> 31			
[0752]	Met Ser Lys Glu Pro Leu Ile Leu Trp Leu Val Met Glu Phe Trp Trp			
[0753]	1 5 10 15			
[0754]	Leu Tyr Leu Thr Pro Val Thr Ser Glu Thr Val Val Thr Glu Val Leu			
[0755]	20 25 30			

[0756]	Gly His Arg Val Thr Leu Pro Cys Leu Tyr Ser Ser Trp Ser Gln Asn		
[0757]	35	40	45
[0758]	Ser Asn Ser Met Cys Trp Gly Lys Asp Lys Cys Pro Tyr Ser Gly Cys		
[0759]	50	55	60
[0760]	Lys Glu Ala Leu Ile Arg Thr Asp Gly Thr Arg Val Thr Ser Arg Lys		
[0761]	65	70	75
[0762]	Ser Ala Lys Tyr Arg Leu Pro Gly Thr Ile Gln Arg Gly Asn Val Ser		
[0763]	85	90	95
[0764]	Leu Thr Ile Leu Asn Pro Arg Glu Gly Asp Ser Gly Val Tyr Cys Cys		
[0765]	100	105	110
[0766]	Arg Ile Glu Val Pro Gly Trp Phe Asn Asp Val Lys Ile Asn Val Arg		
[0767]	115	120	125
[0768]	Leu Asn Leu Gln Arg Ala Ser Thr Thr Arg Arg Thr Arg Thr Thr		
[0769]	130	135	140
[0770]	Ser Pro Pro Thr Thr Pro His Val Thr Thr Arg Ala Ala Leu Pro		
[0771]	145	150	155
[0772]	Thr Thr Val Met Thr Thr Pro Asp Leu Thr Thr Glu Thr Pro Leu Gln		
[0773]	165	170	175
[0774]	Thr Thr Thr Ala Val Phe Thr Thr Ala Asn Thr Cys Pro Ser Pro		
[0775]	180	185	190
[0776]	Thr Pro Ser Thr Leu Pro Glu Ala Ala Thr Gly Leu Leu Thr Pro Glu		
[0777]	195	200	205
[0778]	Pro Ser Lys Glu Gly Pro Ile Leu Thr Ala Glu Ser Glu Pro Val Leu		
[0779]	210	215	220
[0780]	Pro Ser Asp Ser Trp Asn Ser Thr Glu Ser Pro Ala Asp Thr Val Leu		
[0781]	225	230	235
[0782]	Leu Thr Ser Arg Glu Ser Lys Val Trp Asp Leu Pro Pro Thr Ser His		
[0783]	245	250	255
[0784]	Val Ser Met Trp Thr Thr Ser Asp Ser Val Ser Ser Pro Gln Pro Gly		
[0785]	260	265	270
[0786]	Ala Ser Asp Thr Ala Val Pro Glu Gln Asn Lys Thr Thr Lys Thr Gly		
[0787]	275	280	285
[0788]	Gln Met Asp Gly Met Pro Met Pro Lys Asn Glu Met Pro Ile Ser		
[0789]	290	295	300
[0790]	Gln Leu Leu Met Ile Leu Ala Pro Ser Leu Gly Phe Val Leu Leu Ala		
[0791]	305	310	315
[0792]	Leu Leu Met Ala Phe Leu Leu Arg Gly Lys Leu Met Glu Thr Asn Cys		
[0793]	325	330	335
[0794]	Leu Gln Lys His Thr Arg Leu Asp Cys Ile Gly Asp Ser Lys Asn Val		
[0795]	340	345	350
[0796]	Leu Asn Asp Met Arg His Gly Arg Glu Asp Glu Asp Gly Leu Phe Thr		
[0797]	355	360	365

[0798]	Leu				
[0799]	<210>	32			
[0800]	<211>	343			
[0801]	<212>	PRT			
[0802]	<213>	Mus musculus			
[0803]	<220>				
[0804]	<221>	misc_feature			
[0805]	<222>	(1) .. (343)			
[0806]	<223>	TIM-4 ortholog			
[0807]	<400>	32			
[0808]	Met Ser Lys Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Val Thr Glu Leu Trp Trp				
[0809]	1	5	10	15	
[0810]	Leu Tyr Leu Thr Pro Ala Ala Ser Glu Asp Thr Ile Ile Gly Phe Leu				
[0811]		20	25	30	
[0812]	Gly Gln Pro Val Thr Leu Pro Cys His Tyr Leu Ser Trp Ser Gln Ser				
[0813]		35	40	45	
[0814]	Arg Asn Ser Met Cys Trp Gly Lys Gly Ser Cys Pro Asn Ser Lys Cys				
[0815]		50	55	60	
[0816]	Asn Ala Glu Leu Leu Arg Thr Asp Gly Thr Arg Ile Ile Ser Arg Lys				
[0817]		65	70	75	80
[0818]	Ser Thr Lys Tyr Thr Leu Leu Gly Lys Val Gln Phe Gly Glu Val Ser				
[0819]		85	90	95	
[0820]	Leu Thr Ile Ser Asn Thr Asn Arg Gly Asp Ser Gly Val Tyr Cys Cys				
[0821]		100	105	110	
[0822]	Arg Ile Glu Val Pro Gly Trp Phe Asn Asp Val Lys Lys Asn Val Arg				
[0823]		115	120	125	
[0824]	Leu Glu Leu Arg Arg Ala Thr Thr Thr Lys Lys Pro Thr Thr Thr Thr				
[0825]		130	135	140	
[0826]	Arg Pro Thr Thr Pro Tyr Val Thr Thr Thr Pro Glu Leu Leu				
[0827]		145	150	155	160
[0828]	Pro Thr Thr Val Met Thr Thr Ser Val Leu Pro Thr Thr Pro Pro				
[0829]		165	170	175	
[0830]	Gln Thr Leu Ala Thr Thr Ala Phe Ser Thr Ala Val Thr Thr Cys Pro				
[0831]		180	185	190	
[0832]	Ser Thr Thr Pro Gly Ser Phe Ser Gln Glu Thr Thr Lys Gly Ser Ala				
[0833]		195	200	205	
[0834]	Phe Thr Thr Glu Ser Glu Thr Leu Pro Ala Ser Asn His Ser Gln Arg				
[0835]		210	215	220	
[0836]	Ser Met Met Thr Ile Ser Thr Asp Ile Ala Val Leu Arg Pro Thr Gly				
[0837]		225	230	235	240
[0838]	Ser Asn Pro Gly Ile Leu Pro Ser Thr Ser Gln Leu Thr Thr Gln Lys				
[0839]		245	250	255	

[0840]	Thr Thr Leu Thr Thr Ser Glu Ser Leu Gln Lys Thr Thr Lys Ser His		
[0841]	260	265	270
[0842]	Gln Ile Asn Ser Arg Gln Thr Ile Leu Ile Ile Ala Cys Cys Val Gly		
[0843]	275	280	285
[0844]	Phe Val Leu Met Val Leu Leu Phe Leu Ala Phe Leu Leu Arg Gly Lys		
[0845]	290	295	300
[0846]	Val Thr Gly Ala Asn Cys Leu Gln Arg His Lys Arg Pro Asp Asn Thr		
[0847]	305	310	315
[0848]	320	325	330
[0849]	Glu Asp Ser Asp Ser Val Leu Asn Asp Met Ser His Gly Arg Asp Asp		
[0850]	335	340	
[0851]	Glu Asp Gly Ile Phe Thr Leu		

hum_TIM4_1_NP_612388	MSKEPL <u>LILWLMIEFWWLYLTPVTSETVVTEVLGHRVTLPCLYSSWHSNSN</u>	50
hum_TIM4_2_NP_001140198	MSKEPL <u>LILWLMIEFWWLYLTPVTSETVVTEVLGHRVTLPCLYSSWHSNSN</u>	50
<hr/>		
hum_TIM4_1_NP_612388	SM <u>C</u> WGKDQCP <u>YSGC</u> KEALIRT <u>DGM</u> RVT <u>SRK</u> SAKYR <u>LQGT</u> IP <u>RGD</u> V <u>S</u> L <u>T</u> I <u>L</u>	100
hum_TIM4_2_NP_001140198	SM <u>C</u> WGKDQCP <u>YSGC</u> KEALIRT <u>DGM</u> RVT <u>SRK</u> SAKYR <u>LQGT</u> IP <u>RGD</u> V <u>S</u> L <u>T</u> I <u>L</u>	100
<hr/>		
hum_TIM4_1_NP_612388	NPSESDSGVY <u>CCR</u> IEVP <u>GW</u> FDVKINVRLN <u>QRA</u> ST <u>THR</u> T <u>ATT</u> <u>TT</u> R <u>RT</u>	150
hum_TIM4_2_NP_001140198	NPSESDSGVY <u>CCR</u> IEVP <u>GW</u> FDVKINVRLN <u>QRA</u> ST <u>THR</u> T <u>ATT</u> <u>TT</u> R <u>RT</u>	150
<hr/>		
hum_TIM4_1_NP_612388	TT <u>S</u> PTT <u>TRQ</u> MT <u>TT</u> PA <u>AL</u> PTT <u>V</u> V <u>TT</u> PD <u>L</u> TT <u>GT</u> PL <u>Q</u> MT <u>TT</u> IA <u>V</u> F <u>T</u> T <u>ANT</u> <u>C</u> LS <u>L</u>	160
hum_TIM4_2_NP_001140198	TT <u>S</u> PTT <u>TRQ</u> MT <u>TT</u> PA <u>AL</u> PTT <u>V</u> V <u>TT</u> PD <u>L</u> TT <u>GT</u> PL <u>Q</u> MT <u>TT</u> IA <u>V</u> F <u>T</u> T <u>ANT</u> <u>C</u> LS <u>L</u>	160
<hr/>		
hum_TIM4_1_NP_612388	TP <u>ST</u> LP <u>EE</u> AT <u>GL</u> LP <u>E</u> PS <u>K</u> EG <u>P</u> IL <u>T</u> A <u>E</u> SET <u>V</u> L <u>P</u> SD <u>S</u> W <u>SS</u> V <u>E</u> ST <u>S</u> AD <u>T</u> V <u>L</u>	210
hum_TIM4_2_NP_001140198	TP <u>ST</u> LP <u>EE</u> AT <u>GL</u> LP <u>E</u> PS <u>K</u> EG <u>P</u> IL <u>T</u> A <u>E</u> SET <u>V</u> L <u>P</u> SD <u>S</u> W <u>SS</u> V <u>E</u> ST <u>S</u> AD <u>T</u> V <u>L</u>	210
<hr/>		
hum_TIM4_1_NP_612388	TS <u>K</u> E <u>S</u> K <u>V</u> W <u>D</u> L <u>P</u> ST <u>SH</u> V <u>S</u> M <u>W</u> K <u>T</u> SD <u>S</u> V <u>S</u> S <u>P</u> Q <u>G</u> A <u>S</u> D <u>T</u> A <u>V</u> P <u>E</u> Q <u>N</u> K <u>T</u> T <u>K</u> T <u>G</u> Q <u>M</u> D	260
hum_TIM4_2_NP_001140198	TS <u>K</u> E <u>S</u> K <u>V</u> W <u>D</u> L <u>P</u> ST <u>SH</u> V <u>S</u> M <u>W</u> K <u>T</u> SD <u>S</u> V <u>S</u> S <u>P</u> Q <u>G</u> A <u>S</u> D <u>T</u> A <u>V</u> P <u>E</u> Q <u>N</u> K <u>T</u> T <u>K</u> T <u>G</u> Q <u>M</u> D	260
<hr/>		
hum_TIM4_1_NP_612388	GIP <u>M</u> SM <u>K</u> N <u>E</u> M <u>P</u> I <u>S</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>H</u> <u>T</u>	310
hum_TIM4_2_NP_001140198	GIP <u>M</u> SM <u>K</u> N <u>E</u> M <u>P</u> I <u>S</u> <u>Q</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>I</u> <u>A</u> <u>P</u> <u>S</u> <u>L</u> <u>G</u> <u>F</u> <u>E</u> <u>V</u> <u>I</u> <u>L</u> <u>F</u> <u>A</u> <u>V</u> <u>F</u> <u>L</u> <u>L</u> <u>R</u> <u>G</u> <u>K</u> <u>L</u> <u>M</u> <u>E</u> <u>T</u> <u>Y</u> <u>C</u> <u>S</u> <u>Q</u> <u>K</u> <u>H</u> <u>T</u>	310
<hr/>		
hum_TIM4_1_NP_612388	RL <u>D</u> <u>Y</u> <u>T</u> IG <u>D</u> SK <u>N</u> V <u>L</u> ND <u>V</u> Q <u>H</u> GRE <u>D</u> E <u>D</u> GL <u>F</u> <u>T</u> L	360
hum_TIM4_2_NP_001140198	RL <u>D</u> <u>Y</u> <u>T</u> IG <u>D</u> SK <u>N</u> V <u>L</u> ND <u>V</u> Q <u>H</u> GRE <u>D</u> E <u>D</u> GL <u>F</u> <u>T</u> L	360
<hr/>		

图1

■ IG样结构域	S/T富集结构域(粘蛋白)
CYC (C-C)对基于4JH和4QYC结构	信号/跨膜结构域

10	20	30	40	50	60	70
TTIM4_cyno1_EHH54702	MSKEPLILWLVMEFWWLYLTPVTSETVVTEVLGHRTVLPCLYSSWSQNSNSMCWGDCKCPYSGCKEALIRTDDGTR	75				
TTIM4_cyno2_XP_005558436	MSKEFLILWLVMEFWWLYLTPVTSETVVTEVLGHRTVLPCLYSSWSQNSNSMCWGDCKCPYSGCKEALIRTDDGTR	75				
hum _TIM4_1NP_612388	MSKEPLILWLVMEFWWLYLTPVTSETVVTEVLGHRTVLPCLYSSWSQNSNSMCWGDCKCPYSGCKEALIRTDDGMR	75				
TTIM4_mus_NP_848874	MSKGLLLWLVTELWWLYLTPAASEDTIIGFLQQPVTLPCHYLSWSQRNSNSMCWGDCKCPNSKCNNAELLRTDDGTR	75				
80	90	100	120	130	140	150
TTIM4_cyno1_EHH54702	VTSRKSAKYRLPGTIQRGNVSLTINPREGDSGVYCCRIEVPGWFNDVKINVNLQRETCILLVTTASTTTRTR	150				
TTIM4_cyno2_XP_005558436	VTSRKSAKYRLPGTIQRGNVSLTINPREGDSGVYCCRIEVPGWFNDVKINVNLQRASTTTHRTATTTRRTT	142				
hum _TIM4_1NP_612388	VTSRKSAKYRLPGTIQRGDVSLTINPSESDGSVYCCRIEVPGWFNDVKINVNLQRASTTTHRTATTTRRTT	150				
TTIM4_mus_NP_848874	IIISRKSTKTYLGLGVQFGEVSLTISNTNRGDSGVYCCRIEVPGWFNDVKINVNLQRASTTTHRTATTTRRTT	142				
160	170	180	190	200	210	220
TTIM4_cyno1_EHH54702	TTSPPTTPHVTTR-AALEPTTVMMTPDLTTETPLQTTAVETTAN-TCPSPPTPSTLPEAATGLLTPEPSKEGPI	223				
TTIM4_cyno2_XP_005558436	TTSPPTTPHVTTR-AALEPTTVMMTPDLTTETPLQTTAVETTAN-TCPSPPTPSTLPEAATGLLTPEPSKEGPI	215				
hum _TIM4_1NP_612388	TTSPPTTRQMTTTR-AALEPTTVMMTPDLTTGTPLQMTTIAVETTAN-TCPSPPTPSTLPEAATGLLTPEPSKEGPI	223				
TTIM4_mus_NP_848874	TTRPTTTPYVTTTPELLPTVMMTTSVLPTTSQLTTPQTLATAFSTAVTCPSTTPGSFSQETT-----KGSAA	208				
230	240	250	260	270	280	300
TTIM4_cyno1_EHH54702	LTAESEPVLPs-DSWSSTESP-ADTVLVLTSRESKVWDLPPTSHVSMMWRTSDSVSSPQPGASDTAVPEQNKTTKG	296				
TTIM4_cyno2_XP_005558436	LTAESEPVLPs-DSWNSTESP-ADTVLVLTSRESKVWDLPPTSHVSMMWRTSDSVSSPQPGASDTAVPEQNKTTKG	288				
hum _TIM4_1NP_612388	LTAESETVLPs-DSWSSVESTSADTVLVLTSKESKVWDLPLSTSADTVLVLTSKESKVWDLPLSTSADTVLVLTSKE	297				
TTIM4_mus_NP_848874	FTTESETLPASNGSQRSMMTISTDIAVLRTPTGSNPGILPSTSSQLTTQKTTLTTSES-----LQKTTKSH	272				
310	320	330	340	350	360	370
TTIM4_cyno1_EHH54702	QMDGMPMPMKNEMPISQLMILAPSILGFVLLA-LIMMAFLRGGKLMETNCQKHTRLDCIGDSKNVNLDMRHGED	370				
TTIM4_cyno2_XP_005558436	QMDGMPMPMKNEMPISQLMILAPSILGFVLLA-LIMMAFLRGGKLMETNCQKHTRLDCIGDSKNVNLDMRHGED	362				
hum _TIM4_1NP_612388	QMDGTPMSMKNEMPISQLMIIAPSILGFVLLA-LFVAFLRGGKLMETYCQSKHTRLDYIGDSKNVNLNDVQHGED	371				
TTIM4_mus_NP_848874	QIN-----SRQTILLIACCVGFVLMVLLFLAFLRGGKVTGANCLQRHKRPDNTEDSDSVLNDMSHGRDD	336				
380						
TTIM4_cyno1_EHH54702	EDGLFTL	377				
TTIM4_cyno2_XP_005558436	EDGLFTL	369				
hum _TIM4_1NP_612388	EDGLFTL	378				
TTIM4_mus_NP_848874	EDGLFTL	343				

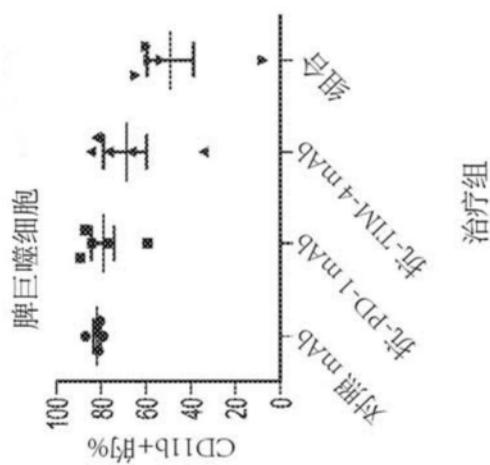


图3A

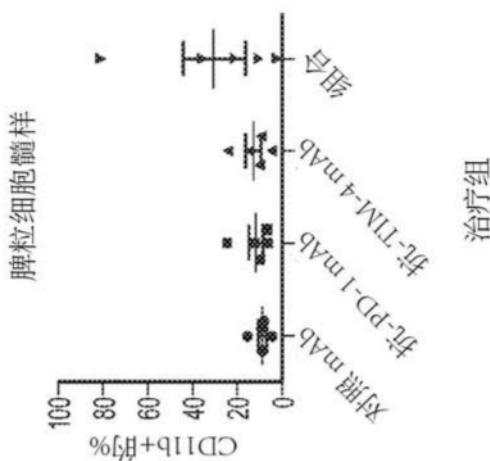


图3B

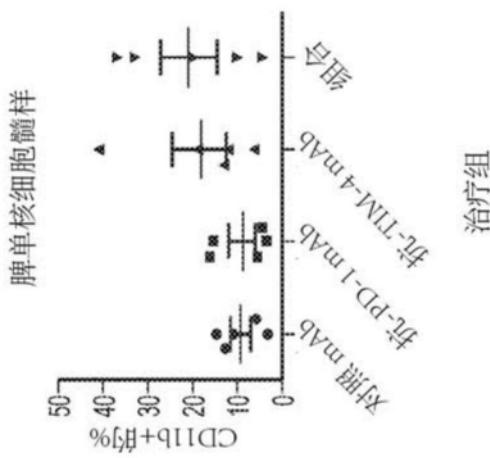


图3C

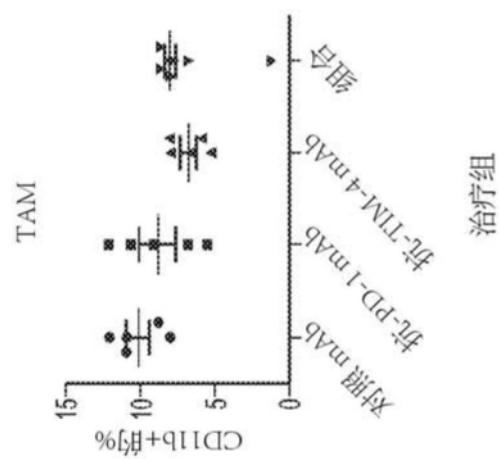


图3D

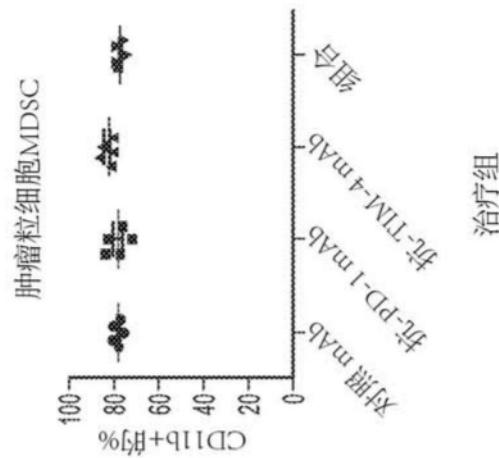


图3E

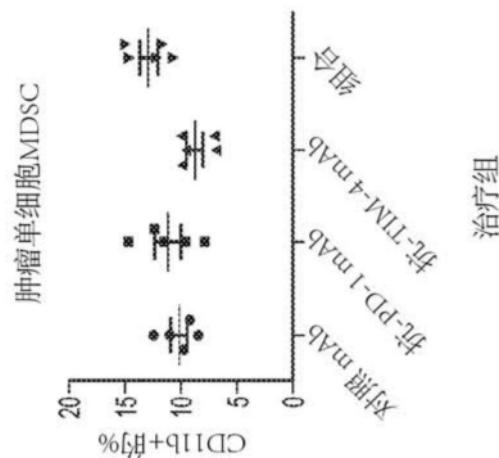


图3F

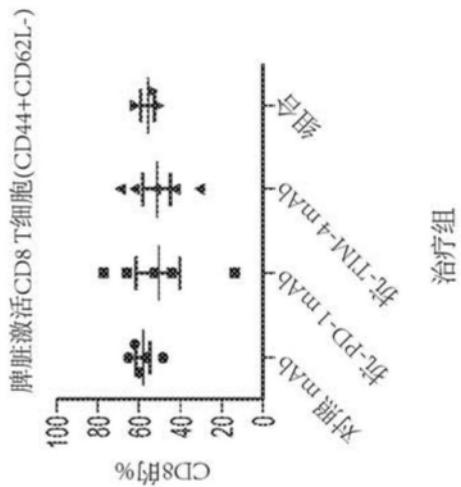


图4A

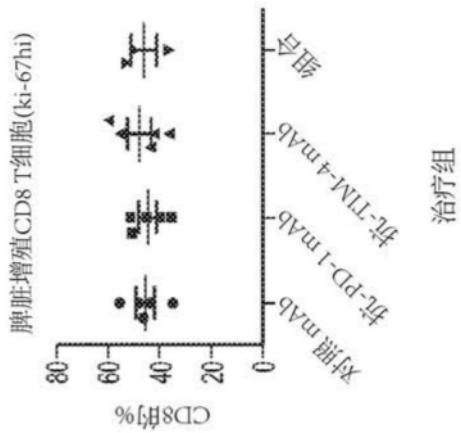


图4B

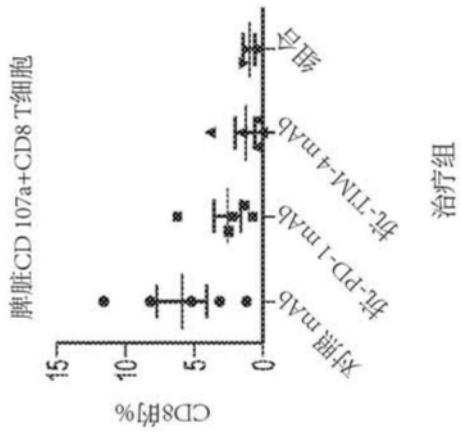


图4C

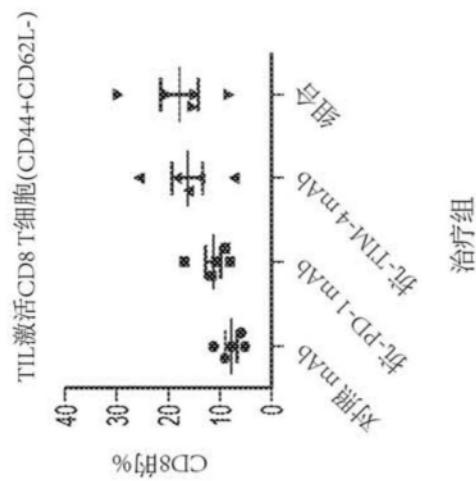


图4D

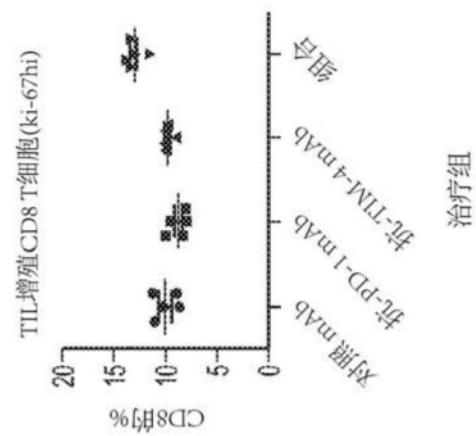


图4E

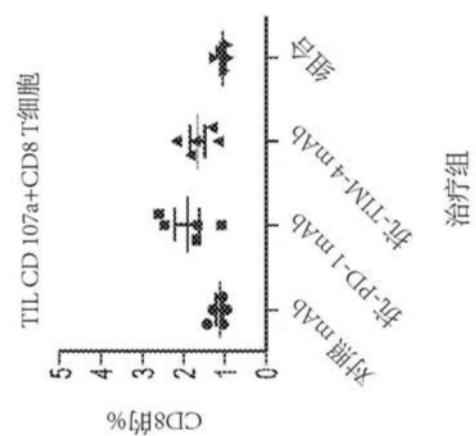


图4F

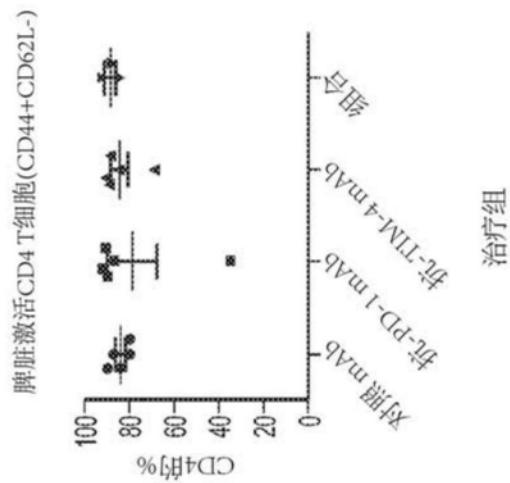


图5A

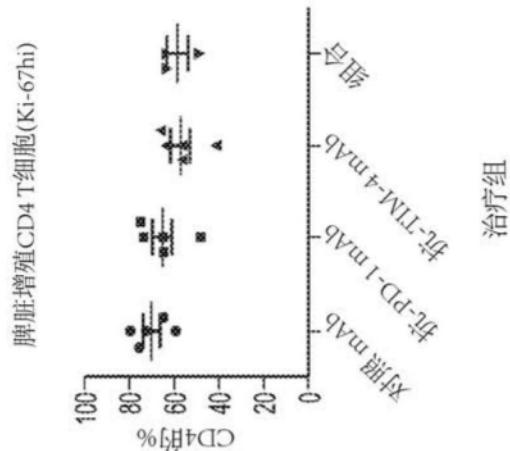


图5B

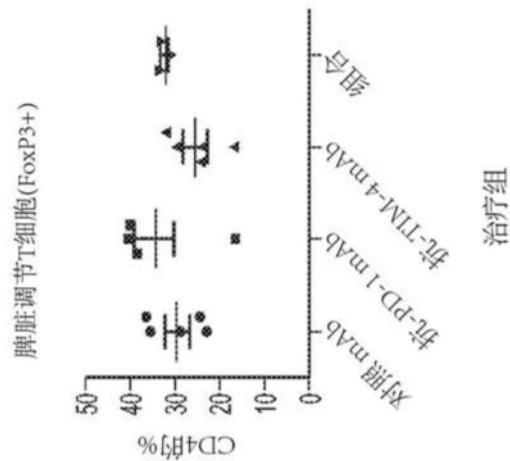


图5C

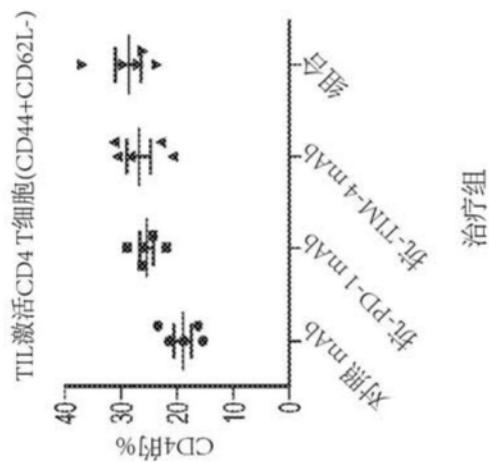


图5D

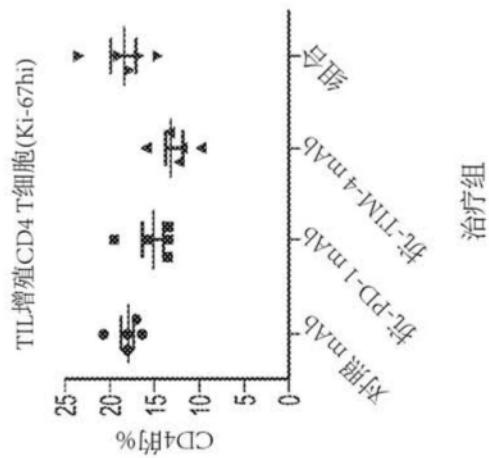


图5E

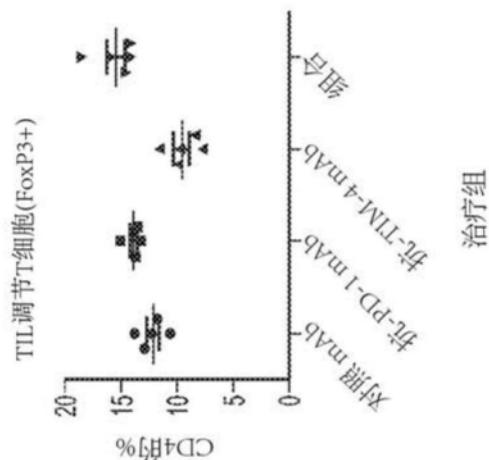


图5F

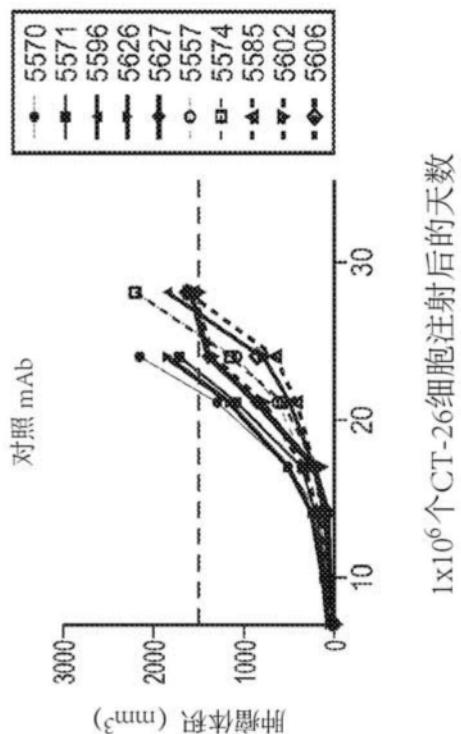


图6A

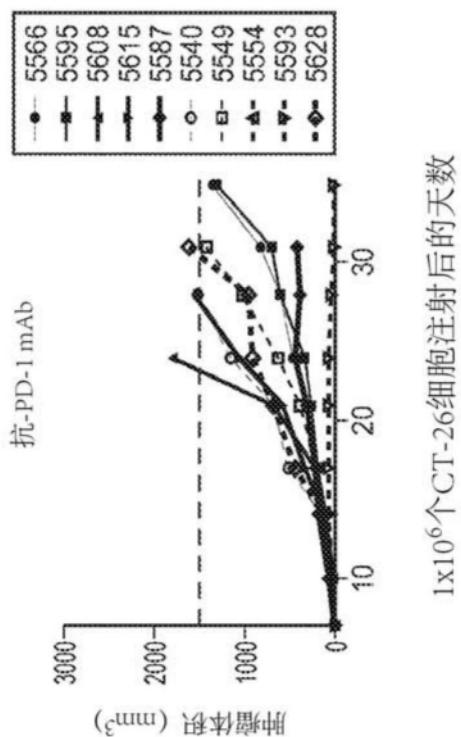


图6B

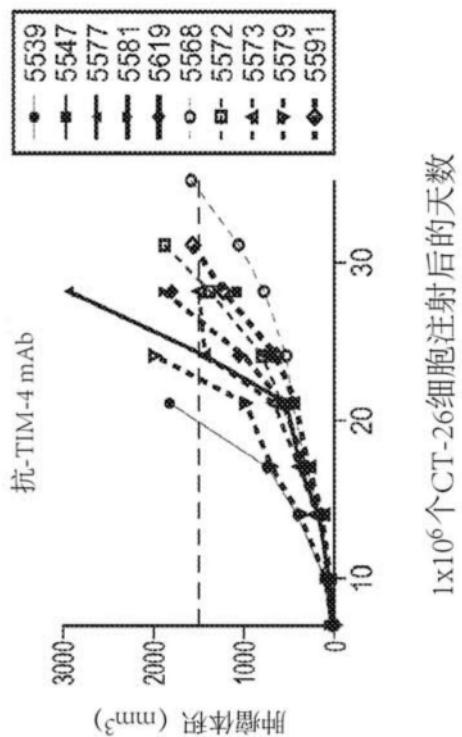


图6C

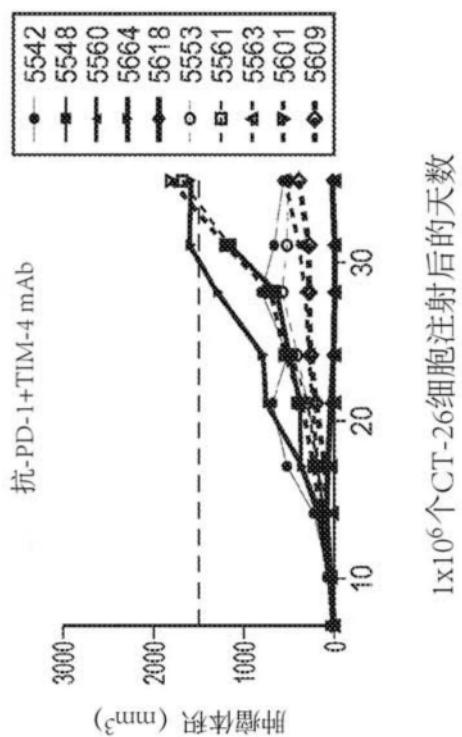


图6D

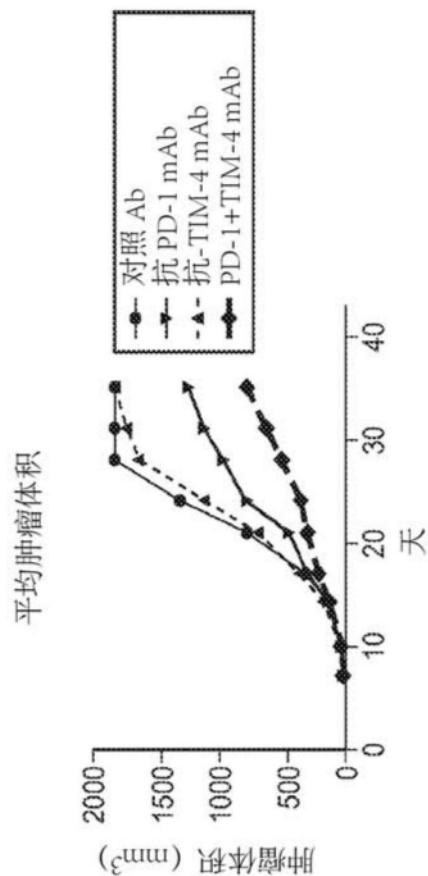


图7A

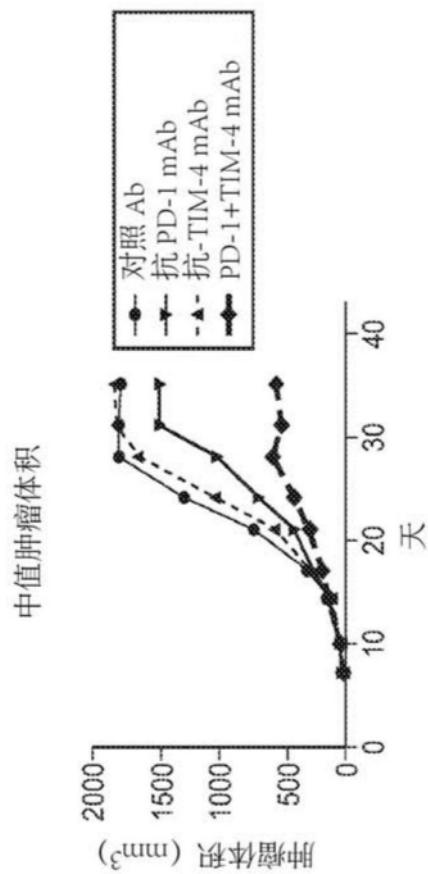


图7B

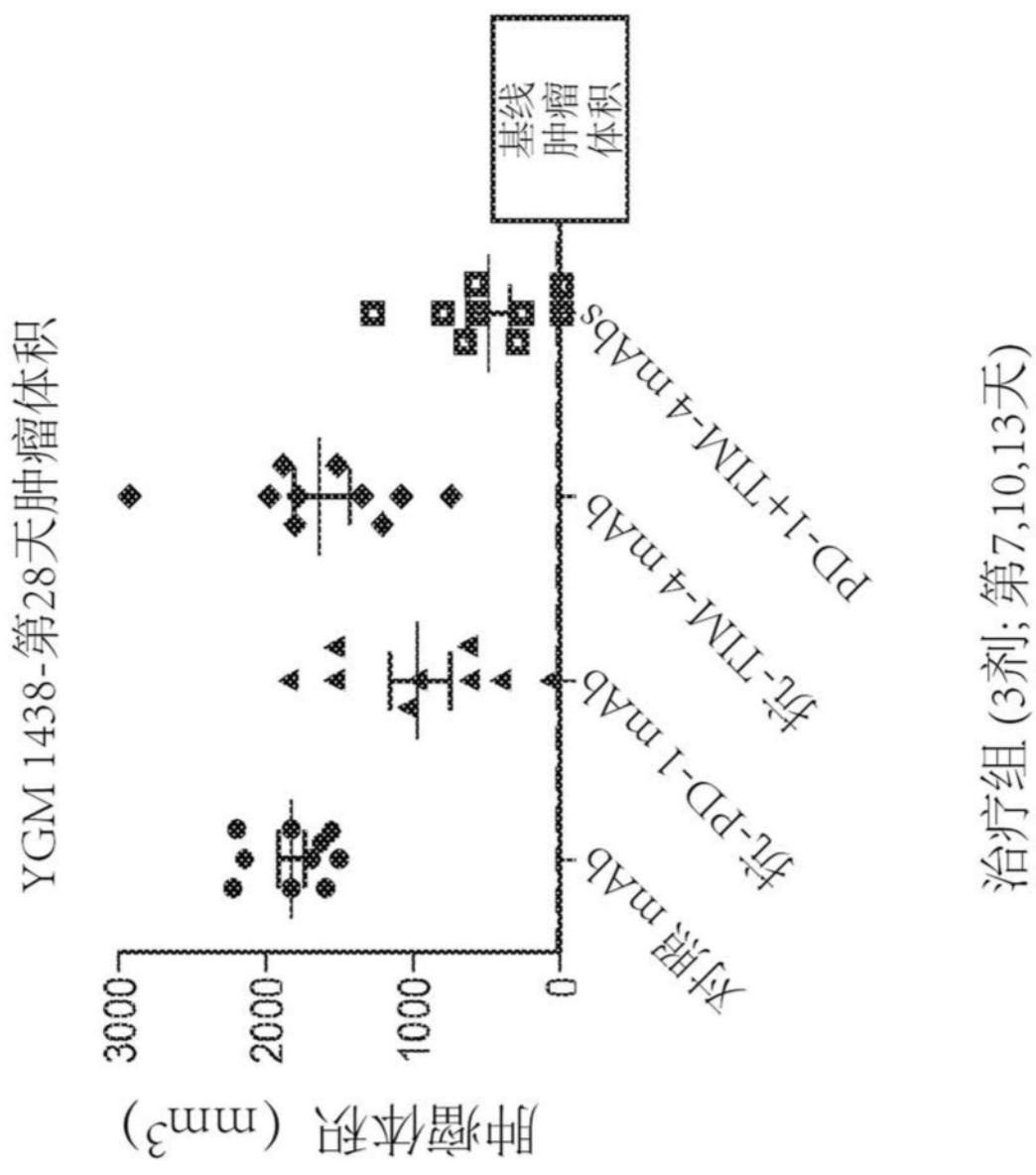


图8

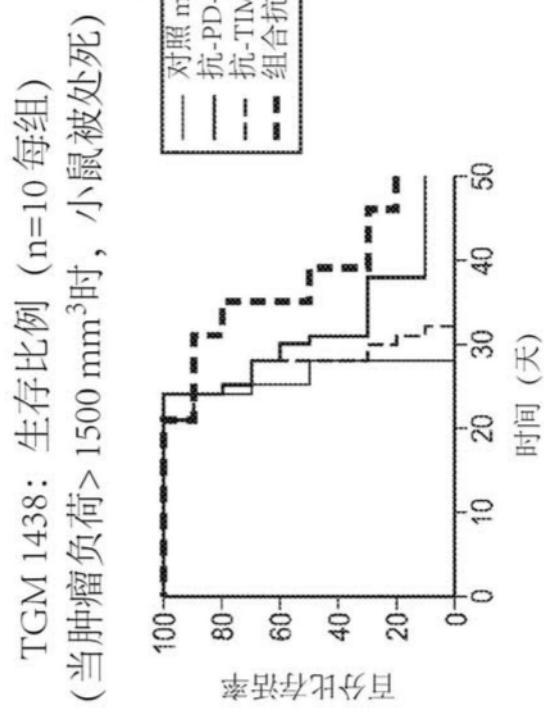


图9A

中值存活率	对照 mAb	抗-PD-1	抗-TIM-4	组合抗PD-1和抗TIM-4
	26.5	30.5	28	37

图9B

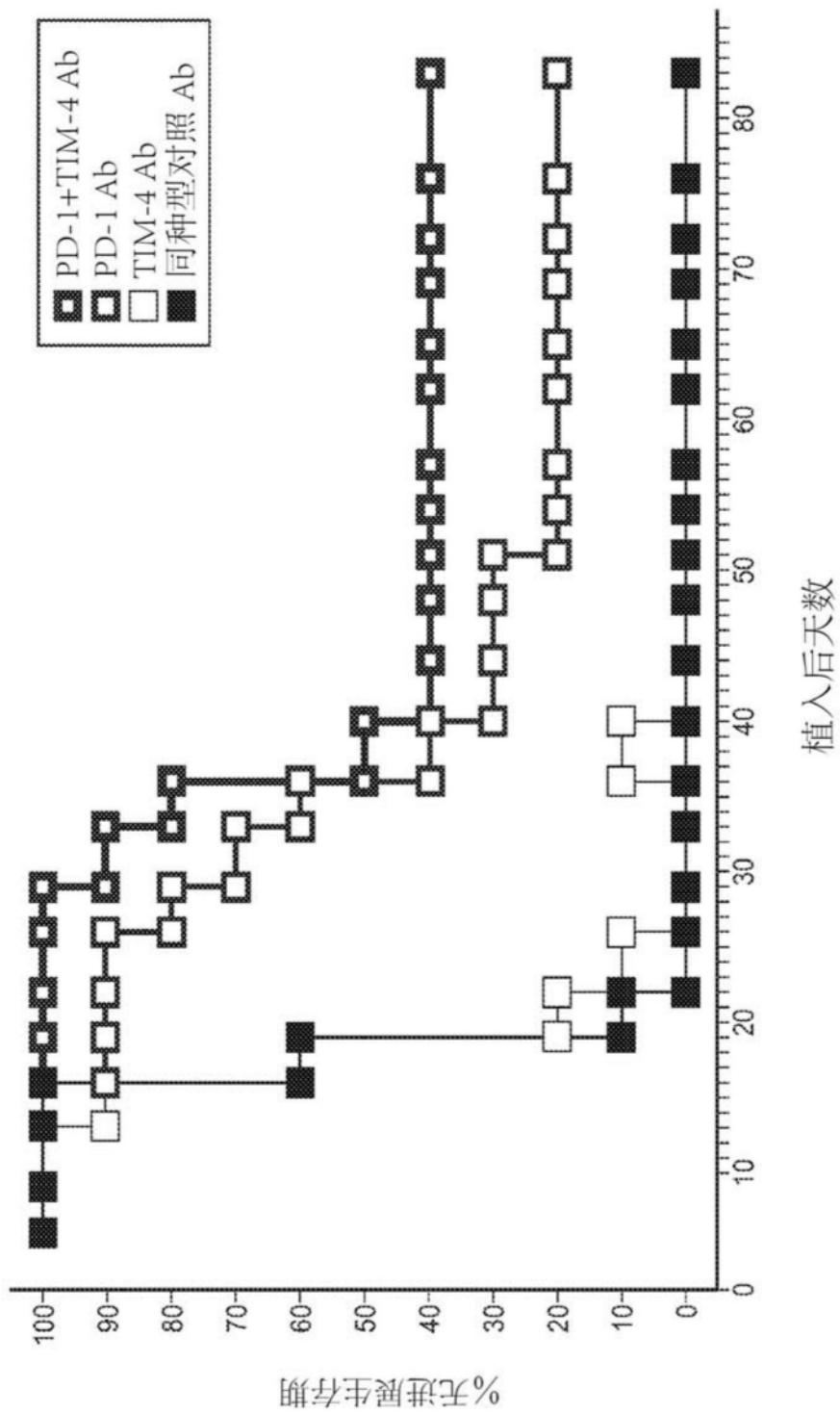


图10

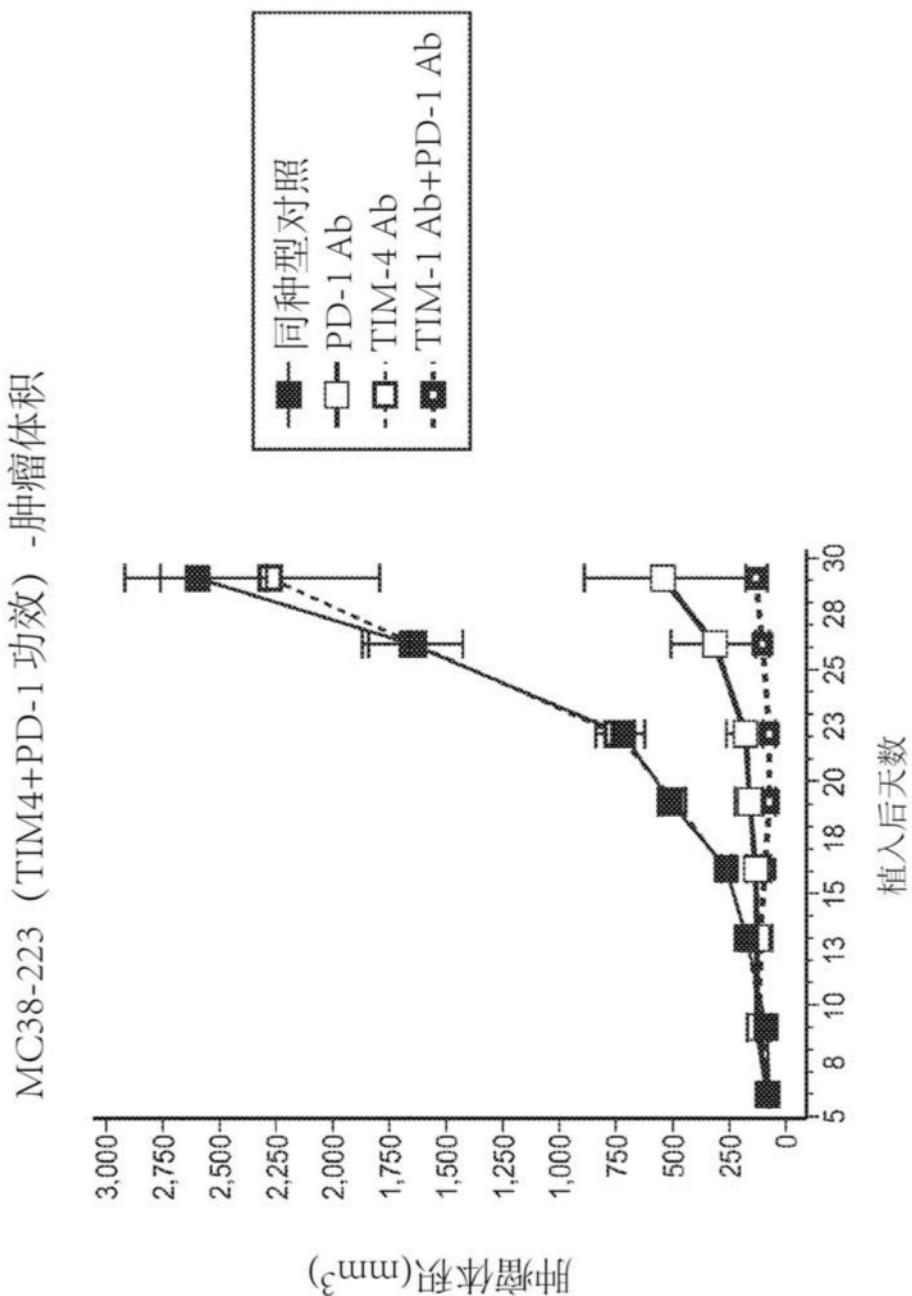


图11

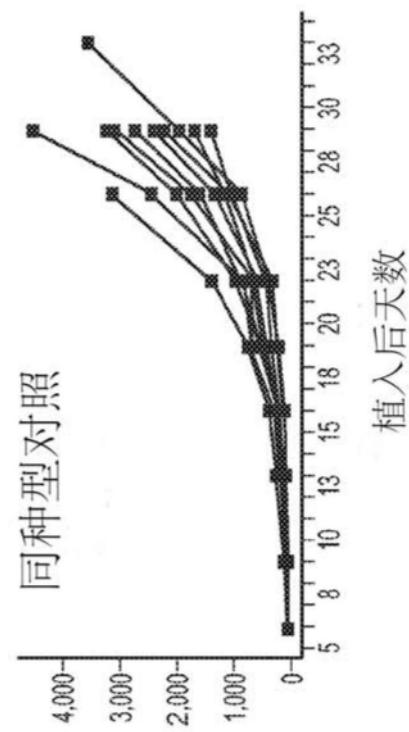


图12A

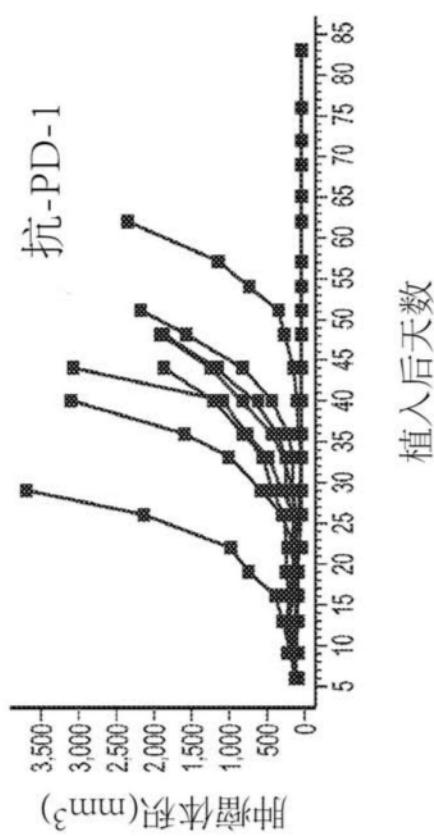


图12B

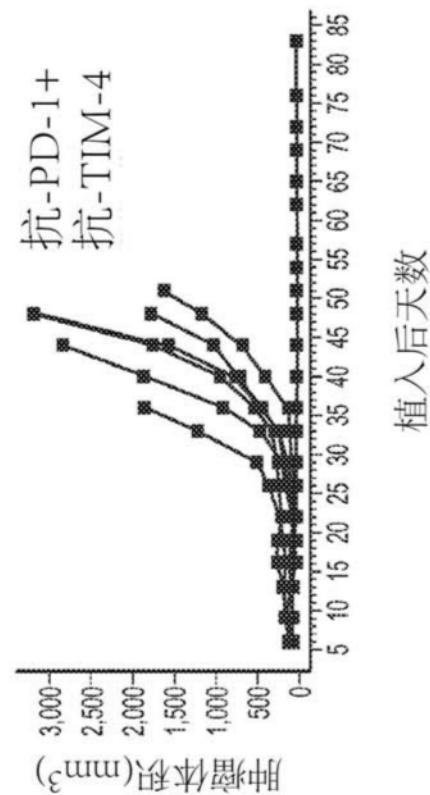


图12C