(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2019 年 9 月 19 日 (19.09.2019)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2019/174603 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/44* (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/078032

(22) 国际申请日: 2019 年 3 月 13 日 (13.03.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201810207977.9 2018年3月14日 (14.03.2018) CN

(71) 申请人: 上海开拓者生物医药有限公司 (SHANGHAI PHARMAEXPLORER CO., LTD.) [CN/CN]; 中国上海市浦东新区中国（上海）自由贸易试验区法拉第路56号李冰路576号4幢202室, Shanghai 201210 (CN)。 钜川生物医药 (PHARMAEXPLORER LIMITED); 英属维尔京群岛托尔托拉罗德城, Tortola (VG)。

(72) 发明人: 徐丽娜 (XU, Lina); 中国上海市浦东新区中国（上海）自由贸易试验区法拉第路56号李冰路576号4幢202室, Shanghai 201210 (CN)。 刘礼乐 (LIU, Lile); 中国上海市浦东新区中国（上海）自由贸易试验区法拉第路56号李冰路576号4幢202室, Shanghai 201210 (CN)。 杨达志 (YANG, Tatchi Teddy); 中国上海市浦东新区中国（上海）自由贸易试验区法拉第路56号李冰路576号4幢202室, Shanghai 201210 (CN)。 韦雨杏 (WEI, Yuxing); 中国上海市浦东新区中国（上海）自由贸易试验区法拉第路56号李冰路576号4幢202室, Shanghai 201210 (CN)。 邵小慧 (SHAO, Xiaohui); 中国上海市浦东新区中国（上海）自由贸易试验区法拉第路56号李冰路576号4幢202室, Shanghai 201210 (CN)。 王倩 (WANG, Qian); 中国上海市浦东新区中国（上海）自由贸易试验区法拉第路56号李冰路576号4幢202室, Shanghai 201210 (CN)。 张洁 (ZHANG, Jie); 中国上海市浦东新区中国（上海）自由贸易试验区法拉第路56号李冰路576号4幢202室, Shanghai 201210 (CN)。 王美玲 (WANG, Meiling); 中国上海市浦东新区中国（上海）自由贸易试验区法拉第路56号李冰路576号4幢202室, Shanghai 201210 (CN)。 张瑜 (ZHANG, Yu); 中国上海市浦东新区中国（上海）自由贸易试验区法拉第路56号李冰路576号4幢202室, Shanghai 201210 (CN)。 段清 (DUAN, Qing); 中国上海市浦东新区中国（上海）自由贸易试验区法拉第路56号李冰路576号4幢202室, Shanghai 201210 (CN)。 宋宁宁 (SONG, Ningning); 中国上海市浦东新区中国（上海）自由贸易试验区法拉第路56号李冰路576号4幢202室, Shanghai 201210 (CN)。

(74) 代理人: 上海一平知识产权代理有限公司 (XU & PARTNERS, LLC.); 中国上海市普陀区真北路958号天地科技广场1号楼106室, Shanghai 200333 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

(84) 指定国 (除另有指明，要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU,

(54) **Title:** ANTIBODY TARGETING CTLA-4 , PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 靶向CTLA-4抗体、其制备方法和用途

(57) **Abstract:** Disclosed by the present invention are an antibody targeting CTLA-4, a preparation method therefor and a use thereof. In particular, disclosed by the present invention is a novel fully human monoclonal antibody that targets CTLA-4. Further disclosed by the present invention is a method for preparing the monoclonal antibody. The monoclonal antibody of the present invention is capable of binding a CTLA-4 antigen with high specificity, has a high affinity, remarkable anti-tumor activity, and so on.

(57) 摘要: 本发明公开了一种靶向CTLA-4的抗体、其制备方法和用途。具体地，本发明公开了一种新的靶向CTLA-4的全人单克隆抗体。本发明还公开了制备所述的单克隆抗体的方法。本发明的单克隆抗体能够高特异性地结合CTLA-4抗原，其具有很高的亲和力并且具有显著抗肿瘤等活性。

WO 2019/174603 A1

[见续页]

IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。

— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

靶向CTLA-4抗体、其制备方法和用途

技术领域

本发明涉及生物医药领域，更具体地涉及一种CTLA-4抗体及其制备方法和应用。

背景技术

单克隆抗体的应用是过去20年时间肿瘤治疗中最成功及最具变革意义的治疗手段之一。与传统化学药物相比，抗体药物具有更高的特异性及更低的毒性。虽然单抗药物取得了持续不断的成功，但仍面临诸多挑战。

鼠源单克隆抗体最大的缺陷则是它所诱发的HAMA（人抗鼠抗体）反应。因而，鼠单抗在肿瘤、器官移植等疾病的诊断和治疗上有较大的局限性；嵌合抗体仍保留着30％的鼠源序列，可引起不同程度的HAMA反应。临床显示不同的嵌合抗体有着不同程度的免疫原性；人源化抗体又称移植抗体。简单CDR移植常常导致抗原抗体亲和力下降，由于其仍至少具有10％的异源蛋白，在临床应用中还是受到不同程度的限制。因而有待于进一步研制更完善的治疗性抗体-完全人抗体。

1994年，美国Abgenix和Genpham两公司报告了利用转基因小鼠制备完全人抗体，从而解决了人体不能被随意免疫这一人抗体制备研究的难题。此后完全人抗体制备技术的不断发展成熟，所获人单克隆抗体已具有较强的抗肿瘤活性。

癌症免疫治疗是癌症治疗最新突破，利用患者自身免疫系统来攻击肿瘤细胞。

免疫检查点是指免疫系统中存在的一些抑制性信号通路，通过调节外周组织中免疫反应的持续性和强度避免组织损伤，并参与维持对于自身抗原的耐受。利用免疫检查点的抑制性信号通路抑制T细胞活性是肿瘤逃避免疫杀伤的重要机制。针对免疫检查点的阻断是众多激活抗肿瘤免疫的有效策略之一。

免疫检查点蛋白的抑制剂具有治疗各种肿瘤类型（如转移性黑素瘤，肺癌，乳腺癌，肾细胞癌等）的潜力。最近癌症免疫治疗方法的研究已经显示出可喜的成果，特别是对转移癌癌症病例。此外，癌症免疫治疗在治疗血液癌症方面具有巨大的潜力，包括霍奇金淋巴瘤，多发性骨髓瘤，骨髓发育不良综合征，

非霍奇金淋巴瘤等。免疫检查点抑制剂引起的副作用是可以忽略的，可逆的和可控的，有效的免疫检查点抑制剂可以显著提高癌症患者的总生存期。免疫检查点抑制剂可以与靶向治疗或常规放射治疗和化学疗法结合使用，并且这种组合疗法可有效治疗许多类型的癌症。

CTLA-4（细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4或CD152）是作为主要免疫检查点分子之一的I型跨膜蛋白，其包含细胞外Ig-V样结构域，Ig-C样结构域，跨膜结构域和胞内C-末端结构域。CTLA-4主要在调节性T细胞胞内为组成型表达，在活化的T细胞表面为诱导型表达，并与配体B7.1（CD80）和B7.2（CD82）相互作用诱导抑制性信号，导致T细胞活化、增值抑制和细胞因子产生减少，CTLA-4在Treg细胞表面呈组成型高表达，参与Treg对其他效应T细胞活性的下调。

CTLA-4在T细胞激活早期阶段活性的调节至关重要，从而成为外周淋巴系统免疫耐受的主要调控机制，CTLA-4通过与CD28竞争配体，及通过其自身对TCR信号通路的抑制，调节T细胞对抗原的反应强度，从而使机体表现出对自身抗原或外源弱抗原识别的耐受。

研究认为阻断CTLA-4/B7配体相互作用，可以提高机体对肿瘤抗原的识别活性，刺激抗原特异性T细胞的增值，从而达到激活免疫系统并增强抗肿瘤免疫应答，并且已在多个同系小鼠肿瘤模型中被证明，CTLA-4的阻断促进抗肿瘤活性。因此，药物阻断CTLA-4/B7.1及B7.2途径可以为各种癌症和其他免疫疾病提供新的治疗方法。

目前，本领域现有的CTLA-4抗体还有许多的不足，比如治疗窗口较小、适应症有限、治疗成本高等，所以开发CTLA-4的阻断型抗体是治疗多种癌的迫切需求。

发明内容

为了克服目前缺少全人CTLA-4抗体及现有CTLA-4抗体在活性及安全性方面的缺点，本发明提供一种亲和力高、特异性强的CTLA-4抗体及其制备方法。

在本发明的第一方面，提供了一种抗体的重链可变区，所述的重链可变区包括以下三个互补决定区CDR：

SEQ ID NO:8n+2所示的CDR1，

SEQ ID NO:8n+3所示的CDR2，和

SEQ ID NO:8n+4所示的CDR3；

其中，各n独立地为0、1、2、3或4；

其中，上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的，并能够保留CTLA-4结合亲和力的衍生序列。

在另一优选例中，所述重链可变区具有SEQ ID NO: 8n+1所示的氨基酸序列，其中，n为0、1、2、3或4。

在本发明的第二方面，提供了一种抗体的重链，所述的重链具有如权利要求1所述的重链可变区。

在本发明的第三方面，提供了一种抗体的轻链可变区，所述的轻链可变区包括以下三个互补决定区CDR：

SEQ ID NO:8n+6所示的CDR1'，

SEQ ID NO:8n+7所示的CDR2'，和

SEQ ID NO:8n+8所示的CDR3'；

其中，各n独立地为0、1、2、3或4；

其中，上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的，并能够保留CTLA-4结合亲和力的衍生序列。

在另一优选例中，所述轻链可变区具有SEQ ID NO: 8n+5所示的氨基酸序列，其中，n为0、1、2、3或4。

在本发明的第四方面，提供了一种抗体的轻链，所述的轻链具有如权利要求3所述的轻链可变区。

在本发明的第五方面，提供了一种抗体，所述抗体具有：

(1) 如本发明的第一方面所述的重链可变区；和/或

(2) 如本发明的第三方面所述的轻链可变区；

或者，所述抗体具有：如本发明的第二方面所述的重链；和/或如本发明的第四方面所述的轻链，

其中，上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的，并能够保留CTLA-4结合亲和力的衍生序列。

在另一优选例中，上述任一CDR的氨基酸序列中包含经过添加、缺失、修饰和/或取代1、2或3个氨基酸的衍生CDR序列，并且使得含有所述衍生CDR序列的VH和VL所构成的衍生抗体能够保留与CTLA-4结合的亲和力。

在另一优选例中，所述的衍生抗体与CTLA-4结合的亲和力F1与相应非衍生的抗体与CTLA-4结合的亲和力F0之比(F1/F0)为0.5-2，较佳地为0.7-1.5，和更佳地0.8-1.2。

在另一优选例中，所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量为1-5个（如1-3个，较佳地1-2个，更佳地1个）。

在另一优选例中，所述的经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的，并能够保留CTLA-4结合亲和力的衍生序列为同源性为至少96%的氨基酸序列。

在另一优选例中，所述的抗体还包括重链恒定区和/或轻链恒定区。

在另一优选例中，所述的重链恒定区为人源的，和/或所述的轻链恒定区为人源的。

在另一优选例中，所述抗体选自下组：嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体、或其组合。

在另一优选例中，所述的全人抗体在人中的免疫原性Z1与非全人的抗体(如鼠源抗体)在人中的免疫原性Z0之比(Z1/Z0)为0-0.5，较佳地0-0.2，更佳地0-0.05(如0.001-0.05)。

在另一优选例中，所述的抗体是部分或全人源化、或全人的单克隆抗体。

在另一优选例中，所述的抗体为双链抗体、或单链抗体。

在另一优选例中，所述抗体为抗体全长蛋白、或抗原结合片段。

在另一优选例中，所述抗体为双特异性抗体、或多特异性抗体。

在另一优选例中，所述抗体具有选自下组的一个或多个特性：

(a) 抑制肿瘤细胞迁移或转移；

(b) 抑制肿瘤生长。

在另一优选例中，所述的抗体具有如本发明的第一方面所述的重链可变区和如本发明的第三方面所述的轻链可变区；

其中，所述的重链可变区包括以下三个互补决定区CDR：

SEQ ID NO:2所示的CDR1，

SEQ ID NO:3所示的CDR2，和

SEQ ID NO:4所示的CDR3；

其中，所述的轻链可变区包括以下三个互补决定区CDR：

SEQ ID NO:6所示的CDR1'，

SEQ ID NO:7所示的CDR2'，和

SEQ ID NO:8所示的CDR3'；

其中，上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的，并能够保留CTLA-4结合亲和力的衍生序列。

在另一优选例中，所述抗体的重链可变区含有SEQ ID NO:8n+1所示的氨基酸序列；和/或所述抗体的轻链可变区含有SEQ ID NO:8n+5所示的氨基酸序列，其中，各n独立地为0、1、2、3或4。

在另一优选例中，所述抗体的重链可变区含有SEQ ID NO: 1所示的氨基酸序列。

在另一优选例中，所述抗体的轻链可变区含有SEQ ID NO: 5所示的氨基酸序列。

在另一优选例中，所述抗体的重链可变区含有SEQ ID NO: 1所示的氨基酸序列，并且所述抗体的轻链可变区含有SEQ ID NO: 5所示的氨基酸序列。

在另一优选例中，所述抗体的重链可变区含有SEQ ID NO: 9所示的氨基酸序列，并且所述抗体的轻链可变区含有SEQ ID NO: 13所示的氨基酸序列。

在另一优选例中，所述抗体的重链可变区含有SEQ ID NO: 17所示的氨基酸序列，并且所述抗体的轻链可变区含有SEQ ID NO: 21所示的氨基酸序列。

在另一优选例中，所述抗体的重链可变区含有SEQ ID NO: 25所示的氨基酸序列，并且所述抗体的轻链可变区含有SEQ ID NO: 29所示的氨基酸序列。

在另一优选例中，所述抗体的重链可变区含有SEQ ID NO: 33所示的氨基酸序列，并且所述抗体的轻链可变区含有SEQ ID NO: 37所示的氨基酸序列。

在另一优选例中，所述的抗体选自下组：97A8D1、92C8B6、31C12F3、40C4C6 97B8E1。

所述重链可变区的氨基酸序列与如序列表中SEQ ID NO: 1、SEQ ID NO:9、SEQ

ID NO:17、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO: 33所示的氨基酸序列至少有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同源性。

所述轻链可变区的氨基酸序列与如序列表中SEQ ID NO: 5、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO: 37所示的氨基酸序列至少有80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同源性。

在另一优选例中，所述的抗体为去岩藻糖基化抗体。

在另一优选例中，所述的抗体为去岩藻糖基化抗体97A8D1。

在本发明的第六方面，提供了一种重组蛋白，所述的重组蛋白包括：

(i) 如本发明的第一方面所述的重链可变区、如本发明的第二方面所述的重链、如本发明的第三方面所述的轻链可变区、如本发明的第四方面所述的轻链、或如本发明的第五方面中任一项所述的抗体；以及

(ii) 任选的协助表达和/或纯化的标签序列。

在另一优选例中，所述的标签序列包括6His标签。

在另一优选例中，所述的重组蛋白(或多肽)包括融合蛋白。

在另一优选例中，所述的重组蛋白为单体、二聚体、或多聚体。

在另一优选例中，所述重组蛋白包括：

（i）如本发明的第五方面所述的抗体，所述抗体的重链可变区含有SEQ ID NO: 1所示的氨基酸序列，并且所述抗体的轻链可变区含有SEQ ID NO: 5所示的氨基酸序列，以及

（ii）任选的协助表达和/或纯化的标签序列。

在另一优选例中，所述重组蛋白包括：

（i）去岩藻糖基化抗体（例如去岩藻糖基化抗体97A8D1）；

（ii）任选的协助表达和/或纯化的标签序列。

在本发明的第七方面，提供了一种多核苷酸，所述多核苷酸编码选自下组的多肽：

（1）如本发明的第一方面所述的重链可变区、如本发明的第二方面所述的重链、如本发明的第三方面所述的轻链可变区、如本发明的第四方面所述的轻链、或如本发明的第五方面中任一项所述的抗体；以及

（2）如本发明的第六方面所述的重组蛋白。

在另一优选例中，编码所述重链可变区的多核苷酸如SEQ ID NO:41、43、45、47或49所示；和/或，

编码所述轻链可变区的多核苷酸如42、44、46、48或50所示。

在另一优选例中，编码所述重链可变区序列的多核苷酸如SEQ ID NO:41所示；并且编码所述轻链可变区序列的多核苷酸如42所示。

在另一优选例中，编码所述重链可变区的多核苷酸如SEQ ID NO:43所示；并且编码所述轻链可变区的多核苷酸如44所示。

在另一优选例中，编码所述重链可变区的多核苷酸如SEQ ID NO:45所示；并且编码所述轻链可变区的多核苷酸如46所示。

在另一优选例中，编码所述重链可变区的多核苷酸如SEQ ID NO:47所示；并且编码所述轻链可变区的多核苷酸如48所示。

在另一优选例中，编码所述重链可变区的多核苷酸如SEQ ID NO:49所示；并且编码所述轻链可变区的多核苷酸如50所示。

在本发明的第八方面，提供了一种载体，所述载体含有本发明的第七方面中任一项所述的多核苷酸。

在另一优选例中，所述的载体包括：细菌质粒、噬菌体、酵母质粒、植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒如腺病毒、逆转录病毒、或其他载体。

在本发明的第九方面，提供了一种遗传工程化的宿主细胞，所述宿主细胞含有本发明的第八方面所述的载体或基因组中整合有本发明的第七方面中任一项所述的多核苷酸。

在本发明的第十方面，提供了一种药物组合物，所述药物组合物含有：

(i) 活性成分，所述活性成分选自下组：如本发明的第一方面所述的重链可变区、如本发明的第二方面所述的重链、如本发明的第三方面所述的轻链可变区、如本发明的第四方面所述的轻链、或如本发明的第五方面中任一项所述的抗体、如本发明的第六方面所述的重组蛋白、或其组合；以及

(ii)药学上可接受的载体。

在另一优选例中，所述的药物组合物为液态制剂。

在另一优选例中，所述的药物组合物为注射剂。

在另一优选例中，所述的药物组合物包括0.01~99.99%的如本发明的第五方面中任一项所述的抗体、如本发明的第六方面所述的重组蛋白、或其组合和0.01~99.99%的药用载体，所述百分比为占所述药物组合物的质量百分比。

在本发明的第十一方面，提供了一种活性成分的用途，所述活性成分选自下组：如本发明的第一方面所述的重链可变区、如本发明的第二方面所述的重链、如本发明的第三方面所述的轻链可变区、如本发明的第四方面所述的轻链、或如本发明的第五方面中任一项所述的抗体、如本发明的第六方面所述的重组蛋白、或其组合，其中所述活性成分被用于制备预防和/或治疗CTLA-4相关肿瘤和/或病毒感染相关的疾病的药物。

在另一优选例中，所述CTLA-4相关的疾病选自下组：黑色素瘤，间皮瘤，非小细胞肺癌，乳腺癌，肝癌，滑膜肉瘤，转移性结肠癌，肾癌，膀胱癌，前列腺癌，卵巢癌，丙型肝炎病毒慢性感染，晚期实体癌，消化器官恶性肿瘤，转移性非小细胞肺癌，前列腺肿瘤，子宫内膜癌，子宫内膜癌肉瘤，复发黑色素瘤，头颈部鳞状细胞癌，肉瘤，默克尔细胞癌，皮肤T细胞淋巴瘤，输卵管癌，腹膜肿瘤，肌肉浸润性膀胱癌，广泛的阶段小细胞肺癌，成人急性髓细胞性白血病，非典型慢性粒细胞白血病，先前治疗的骨髓增生异常综合征，卵巢上皮细胞癌，泌尿系统恶性肿瘤，成人III级淋巴瘤样肉芽肿，B细胞慢性淋巴细胞白血病，皮肤B细胞非霍奇金淋巴瘤，眼内淋巴瘤，睾丸绒毛膜癌，神经母细胞瘤，食管癌等。

在本发明的第十二方面，提供了一种体外检测样品中CTLA-4蛋白的组合物，其包括如本发明的第五方面中任一项所述的抗体、如本发明的第六方面所述的重组蛋白、或其组合作为活性成分。

在本发明的第十三方面，提供了一种治疗肿瘤或者病毒感染疾病的方法，包括：使用如本发明的第五方面中任一项所述的抗体、如本发明的第六方面所述的

重组蛋白、或其组合。

在另一优选例中，所述肿瘤为癌症。

应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

附图说明

图1 CTLA-4-hFc蛋白与生物素标记的配体B7.1-hFc或B7.1-hFc的结合活性。

图2 CTLA-4(Y201V)蛋白转染的HEK293细胞FACS检测结果。

图3 ELISA检测HEK293-CTLA-4细胞免疫后Harbour转基因小鼠血清抗体效价。

图4（A）和（B）FACS检测CTLA-4抗体与CHOK1-hCTLA-4的结合反应。

图5（A）和（B）FACS检测CTLA-4抗体与293F-cCTLA-4的结合反应。

图6（A）、（B）和（C）CTLA-4抗体对CTLA-4蛋白与其受体B7.1的结合的抑制。

图7（A）、（B）和（C）CTLA-4抗体对CTLA-4蛋白与其受体B7.2的结合的抑制。

图8 CTLA-4抗体在PBMC淋巴细胞刺激试验中对IL-2分泌的影响。图9（A）和（B）流式细胞实验（FACS）检测抗体与人CTLA-4表达细胞的结合。

图10（A）和（B）流式细胞实验（FACS）检测抗体与猴CTLA-4表达细胞的结合。

图11（A）和（B）全人CTLA-4抗体对CTLA-4蛋白与其受体B7.1的结合的抑制。

图12（A）和（B）全人CTLA-4抗体对CTLA-4蛋白与其受体B7.2的结合的抑制。

图13 CTLA-4全人源抗体在SEB依赖的PBMC激活试验中对IL-2分泌的影响。

图14（A）、（B）（C）和（D）CTLA-4全人源抗体在PHA诱导的T淋巴囊细胞激活试验中对IL-2分泌的影响。

图15 CTLA-4抗体对荷瘤小鼠存活率的影响。

图16 （A）、（B）（C）和（D）用液质联用测定去岩藻糖基化和岩藻糖基化抗CTLA-4抗体Fc段分子量。

图17去岩藻糖基化和岩藻糖基化抗CTLA-4抗体在SEB依赖的PBMC激活试验中对IL-2分泌的影响。

具体实施方式

本发明人通过广泛而深入的研究，采用大鼠-人嵌合抗体的转基因小鼠，采用293F-HuCTLA-4细胞（例如重组表达的293F-HuCTLA4细胞）对转基因小鼠进行免疫，意外地获得高活性的抗CTLA-4的全人抗体。实验结果表明，所述的与人源和猴源的CTLA-4蛋白均具有高度亲和力（K_D为2.15E-09nM），能够抑制CTLA-4与其受体B7.1和B7.2的结合，能在PHA诱导的人T淋巴细胞或SEB介导激活的人外周血单核细胞中显著增加IL-2的表达水平，并且缺乏与人CD28等同类蛋白抗原的交叉反应。所获得全人抗CTLA-4抗体，具有亲和力更高、体外及体内活性更强等特点。并且所述全人CTLA-4抗体（例如97A8D1）体内抗肿瘤效果优于现有技术中的抗体Ipilimumab。在此基础上完成了本发明。

术语

CTLA-4

CTLA-4即细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4，结构上属于CD28免疫球蛋白超家族，在激活的T细胞呈诱导型表达和在调节性T细胞组成型表达，作为免疫检验点蛋白，通过与CD28竞争性结合配体，从而下调T细胞的活性。对于转基因小鼠和荷瘤小鼠的研究表明，CTLA-4参与肿瘤对免疫系统识别和杀伤的逃避，所以阻断CTLA-4的活性，可能提高机体对肿瘤生长的抑制。

抗体

如本文所用，术语“抗体”或“免疫球蛋白”是有相同结构特征的约150000道尔顿的异四聚糖蛋白，其由两个相同的轻链(L)和两个相同的重链(H)组成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连，而不同免疫球蛋白同种型的重链间的二硫键数目不同。每条重链和轻链也有规则间隔的链内二硫键。每条重链的一端有可变区(VH)，其后是多个恒定区。每条轻链的一端有可变区(VL)，另一端

有恒定区；轻链的恒定区与重链的第一个恒定区相对，轻链的可变区与重链的可变区相对。特殊的氨基酸残基在轻链和重链的可变区之间形成界面。

如本文所用，术语“可变”表示抗体中可变区的某些部分在序列上有所不同，它形成了各种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而，可变性并不均匀地分布在整个抗体可变区中。它集中于轻链和重链可变区中称为互补决定区(CDR)或超变区中的三个片段中。可变区中较保守的部分称为构架区(FR)。天然重链和轻链的可变区中各自包含四个FR区，它们大致上呈β-折叠构型，由形成连接环的三个CDR相连，在某些情况下可形成部分β折叠结构。每条链中的CDR通过FR区紧密地靠在一起并与另一链的CDR一起形成了抗体的抗原结合部位(参见Kabat等, NIH Publ. No. 91-3242, 卷I，647-669页(1991))。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合，但是它们表现出不同的效应功能，例如参与抗体的依赖于抗体的细胞毒性。

脊椎动物抗体(免疫球蛋白)的“轻链”可根据其恒定区的氨基酸序列归为明显不同的两类(称为κ和λ)中的一类。根据其重链恒定区的氨基酸序列，免疫球蛋白可以分为不同的种类。主要有5类免疫球蛋白：IgA、IgD、IgE、IgG和IgM，其中一些还可进一步分成亚类(同种型)，如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA和IgA2。对应于不同类免疫球蛋白的重链恒定区分别称为α、δ、ε、γ、和μ。不同类免疫球蛋白的亚单位结构和三维构型是本领域人员所熟知的。

一般，抗体的抗原结合特性可由位于重链和轻链可变区的3个特定的区域来描述，称为可变区域(CDR)，将该段间隔成4个框架区域(FR)，4个FR的氨基酸序列相对比较保守，不直接参与结合反应。这些CDR形成环状结构，通过其间的FR形成的β折叠在空间结构上相互靠近，重链上的CDR和相应轻链上的CDR构成了抗体的抗原结合位点。可以通过比较同类型的抗体的氨基酸序列来确定是哪些氨基酸构成了FR或CDR区域。

本发明不仅包括完整的抗体，还包括具有免疫活性的抗体的片段或抗体与其他序列形成的融合蛋白。因此，本发明还包括所述抗体的片段、衍生物和类似物。

在本发明中，抗体包括用本领域技术人员熟知技术所制备的鼠的、嵌合的、人源化的或者全人的抗体。重组抗体，例如嵌合的和人源化的单克隆抗体，包

括人的和非人的部分，可以通过标准的DNA重组技术获得，它们都是有用的抗体。嵌合抗体是一个分子，其中不同的部分来自不同的动物种，例如具有来自鼠的单克隆抗体的可变区，和来自人免疫球蛋白的恒定区的嵌合抗体(见例如美国专利4,816,567和美国专利 4,816,397，在此通过引用方式整体引入本文)。人源化的抗体是指来源于非人物种的抗体分子，具有一个或多个来源于非人物种的互补决定区(CDRs)和来源于人免疫球蛋白分子的框架区域(见美国专利5,585,089，在此通过引用方式整体引入本文)。这些嵌合和人源化的单克隆抗体可以采用本领域熟知的DNA重组技术制备。

在本发明中，抗体可以是单特异性、双特异性、三特异性、或者更多的多重特异性。

在本发明中，本发明的抗体还包括其保守性变异体，指与本发明抗体的氨基酸序列相比，有至多10个，较佳地至多8个，更佳地至多5个，最佳地至多3个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表A进行氨基酸替换而产生。

表 A

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

抗CTLA-4的抗体

本发明提供一种针对**CTLA-4**的高特异性和高亲和力的抗体，其包括重链和轻链，所述重链含有重链可变区(VH)氨基酸序列，所述轻链含有轻链可变区(VL)氨基酸序列。

优选地，重链可变区（VH）包括以下三个互补决定区CDR：

SEQ ID NO:2所示的CDR1，

SEQ ID NO:3所示的CDR2，和

SEQ ID NO:4所示的CDR3；

轻链可变区（VL）包括以下三个互补决定区CDR：

SEQ ID NO:6所示的CDR1'，

SEQ ID NO:7所示的CDR2'，和

SEQ ID NO:8所示的CDR3'；

其中，上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的，并能够保留CTLA-4结合亲和力的衍生序列。

在另一优选例中，所述经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸序列所形成的序列优选为同源性或序列相同性为至少80%，较佳地至少85%，更佳地至少为90%，最佳地至少95%的氨基酸序列。

本领域普通技术人员公知的测定序列同源性或相同性的方法包括但不限于：计算机分子生物学(Computational Molecular Biology)，Lesk，A.M.编，牛津大学出版社，纽约，1988；生物计算：信息学和基因组项目(Biocomputing:Informatics and Genome Projects)，Smith，D.W.编，学术出版社，纽约，1993；序列数据的计算机分析(Computer Analysis of Sequence Data)，第一部分，Griffin，A.M.和Griffin，H.G.编，Humana Press，新泽西，1994；分子生物学中的序列分析(Sequence Analysis in Molecular Biology)，von Heinje，G.，学术出版社，1987和序列分析引物(Sequence Analysis Primer)，Gribskov，M.与Devereux，J.编M Stockton Press，纽约，1991和Carillo，H.与Lipman，D.，SIAM J. Applied Math.，48:1073(1988)。测定相同性的优选方法要在测试的序列之间得到最大的匹配。测定相同性的方法编译在公众可获得的计算机程序中。优选的测定两条序列之间相同性的计算

机程序方法包括但不限于：GCG程序包 (Devereux，J.等，1984)、BLASTP、BLASTN和FASTA(Altschul，S，F.等，1990)。公众可从NCBI和其它来源得到BLASTX程序 (BLAST手册，Altschul，S.等，NCBI NLM NIH Bethesda，Md.20894；Altschul，S.等，1990)。熟知的Smith Waterman算法也可用于测定相同性。

本发明的抗体可以是双链或单链抗体，并且可以是选自动物源抗体、嵌合抗体、人源化抗体，更优选为人源化抗体、人-动物嵌合抗体，更优选为全人源化抗体。

本发明所述抗体衍生物可以是单链抗体、和/或抗体片段，如：Fab、Fab’、(Fab’)2或该领域内其他已知的抗体衍生物等，以及IgA、IgD、IgE、IgG以及IgM抗体或其他亚型的抗体中的任意一种或几种。

其中，所述动物优选为哺乳动物，如鼠。

本发明抗体可以是靶向人CTLA-4的嵌合抗体、人源化抗体、CDR嫁接和/或修饰的抗体。

本发明上述内容中，所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量，优选为不超过初始氨基酸序列总氨基酸数量的40%，更优选为不超过35%，更优选为1-33%，更优选为5-30%，更优选为10-25%，更优选为15-20%。

本发明上述内容中，更优选地，所述添加、缺失、修饰和/或取代的氨基酸数量，可以是1-7个，更优选为1-5个，更优选为1-3个，更优选为1-2个。

在另一优选例中，所述靶向CTLA-4的抗体为97A8D1、92C8B6、31C12F3、40C4C6或97B8E1。

在另一优选例中，所述抗体97A8D1的重链可变区(VH)氨基酸序列为如SEQ ID NO.:1所示的氨基酸序列。

在另一优选例中，所述抗体97A8D1的轻链可变区氨基酸序列为如SEQ ID NO.: 5所示的氨基酸序列。

抗体的制备

本发明抗体或其片段的DNA分子的序列可以用常规技术，比如利用PCR扩增或基因组文库筛选等方法获得。此外，还可将轻链和重链的编码序列融合在一起，形成单链抗体。

一旦获得了有关的序列，就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体，再转入细胞，然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。

此外，还可用人工合成的方法来合成有关序列，尤其是片段长度较短时。通常，通过先合成多个小片段，然后再进行连接可获得序列很长的片段。

目前，已经可以完全通过化学合成来得到编码所述的本发明的抗体(或其片段，或其衍生物)的DNA序列。然后可将该DNA序列引入本领域中已知的各种现有的DNA分子(或如载体)和细胞中。此外，还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

本发明还涉及包含上述的适当DNA序列以及适当启动子或者控制序列的载体。这些载体可以用于转化适当的宿主细胞，以使其能够表达蛋白质。

宿主细胞可以是原核细胞，如细菌细胞；或是低等真核细胞，如酵母细胞；或是高等真核细胞，如哺乳动物细胞。优选的动物细胞包括(但并不限于)：CHO-S、HEK-293细胞。

通常，在适合本发明抗体表达的条件下，培养转化所得的宿主细胞。然后用常规的免疫球蛋白纯化步骤，如蛋白A-Sepharose、羟基磷灰石层析、凝胶电泳、透析、离子交换层析、疏水层析、分子筛层析或亲和层析等本领域技术人员熟知的常规分离纯化手段纯化得到本发明的抗体。

所得单克隆抗体可用常规手段来鉴定。比如，单克隆抗体的结合特异性可用免疫沉淀或体外结合试验(如放射性免疫测定(RIA)或酶联免疫吸附测定(ELISA))来测定。单克隆抗体的结合亲和力例如可用Munson等，Anal. Biochem.,107:220(1980)的Scatchard分析来测定。

本发明的抗体可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要，可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但并不限于：常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超声处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

应用

本发明还提供了本发明抗体的用途，例如用于制备用于治疗CTLA-4相关的疾病的药物。所述CTLA-4相关的疾病包括肿瘤发生、生长和/或转移、病毒感染等相关疾病等。

本发明抗体的用途，包括(但并不限于)：

(i)治疗肿瘤发生、生长和/或转移。所述肿瘤包括(但并不限于)：乳腺癌(如三阴性乳腺癌)、胰腺癌、肺癌（如非小细胞肺癌、广泛的阶段小细胞肺癌、转移性非小细胞肺癌）、恶性胶质瘤、消化器官恶性肿瘤、胃癌、肝癌、食道癌、肾癌、结直肠癌、转移性结肠癌、膀胱癌、前列腺肿瘤（如前列腺癌）、子宫内膜癌、子宫内膜癌肉瘤、宫颈癌、卵巢癌、输卵管癌、白血病（如成人急性髓细胞性白血病、非典型慢性粒细胞白血病）、骨髓癌、肉瘤（如血管肉瘤、滑膜肉瘤）、黑色素瘤、复发黑色素瘤、间皮瘤、晚期实体癌、头颈部鳞状细胞癌、默克尔细胞癌、皮肤T细胞淋巴瘤、腹膜肿瘤、肌肉浸润性膀胱癌、先前治疗的骨髓增生异常综合征、卵巢上皮细胞癌、泌尿系统恶性肿瘤、成人III级淋巴瘤样肉芽肿、B细胞慢性淋巴细胞白血病、皮肤B细胞非霍奇金淋巴瘤、眼内淋巴瘤、睾丸绒毛膜癌、神经母细胞瘤、食管癌。尤其是三阴性乳腺癌、胰腺癌、恶性胶质瘤和肺癌、更优选为三阴性乳腺癌和/或胰腺癌；

(ii)治疗病毒感染性疾病。所述病毒包括（但并不限于）：乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒（慢性感染）、艾滋病毒。

药物组合物

本发明还提供了一种组合物。在优选例中，所述的组合物是药物组合物，它含有上述的抗体或其活性片段或其融合蛋白，以及药学上可接受的载体。通常，可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中，其中pH通常约为5-8，较佳地pH约为6-8，尽管pH值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药，其中包括(但并不限于)：瘤内、腹膜内、静脉内、或局部给药。

本发明的药物组合物可直接用于结合CTLA-4蛋白分子，因而可用于预防和治疗肿瘤等疾病。此外，还可同时使用其他治疗剂。

本发明的药物组合物含有安全有效量（如0.001-99wt%，较佳地0.01-90wt%，更佳地0.1-80wt%)的本发明上述的单克隆抗体以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但并不限于)：盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式，例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量，例如每天约1微克/千克体重-约5毫克/千克体重。此外，本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。

使用药物组合物时，是将安全有效量的抗体用于哺乳动物，其中该安全有效量通常至少约10微克/千克体重，而且在大多数情况下不超过约50毫克/千克体重，较佳地该剂量是约10微克/千克体重-约20毫克/千克体重。当然，具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素，这些都是熟练医师技能范围之内的。

本发明的主要优点在于：

（1）本发明采用的转基因小鼠，与野生型小鼠比能够更容易获得全人源抗体，从而降低抗体的免疫原性；与全人抗体的转基因小鼠比，获得的抗体数量多、亲和力强，序列多样性好并且活性高。

（2）本发明采用杂交瘤技术获得抗体，与噬菌体库获得的抗体相比，抗体亲和力高，序列表达良好。

（3）本发明采用重组表达的293F-HuCTLA-4细胞，与蛋白或者多肽类免疫原相比，表达的目的蛋白构象更趋天然；与其他重组表达细胞相比，其表达量更高。

（4）本发明获得了序列不同的抗体，能够与CTLA-4抗体特异性结合，其结合活性低于纳摩尔（nM）。

（5）本发明所获得抗体具有很好的刺激T细胞激活活性，其能够阻断CTLA-4与其两个配体（B7.1和B7.2）的结合，通过逆转CTLA-4对T细胞激活活性的抑制，从而激活T细胞分泌IL-2。

（6）本发明所获得的抗体，在小鼠（例如人CTLA-4转基因小鼠）体内表

现出显著抑制肿瘤生长和提高小鼠存活率的活性。

（7）本发明所获得抗体具有一系列的优异特征：可变区序列与现有抗体同源性低（同源性<92%），各项活性均好于来自对比文件的抗体。

下面结合具体实施例，进一步详陈本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用于限制本发明的范围。下列实施例中未注明详细条件的实验方法，通常按照常规条件如美国Sambrook. J等著《分子克隆实验室指南》(黄培堂等译，北京：科学出版社，2002年)中所述的条件，或按照制造厂商所建议的条件（例如商品说明书）。除非另外说明，否则百分比和份数按重量计算。以下实施例中所用的实验材料和试剂如无特别说明均可从市售渠道获得。

实施例中所述的室温为本领域常规的室温，一般为10-30℃。

若无特别说明，实施例中所述的PBS为PBS磷酸缓冲液，pH7.2。

材料

H2L2转基因鼠获自（购自）和铂医药（上海）有限责任公司，该鼠产生具有完全人类可变区的由两条重链和两条轻链（H2L2）组成的传统四聚体抗体的小鼠。产生的抗体亲和力成熟，可变区完全人源化，具有优异的溶解性。基因工程小鼠技术是产生完全人类抗体的主要工具之一[4]。

通用方法

本发明先制备人源CTLA-4作为免疫原，采用人源抗体转基因小鼠技术进行全人源抗体的制备[Lonberg, et al.1994，Nature 368（6474）：856-859，Lonberg, N. and Huszar, D.1995，Intern. Rev. Immunol.13:65-93, and Harding, F. and Lonberg, N. ,1995，Ann. N.Y. Acad. Sci. 764:536-546]，获得CTLA-4抗体的先导抗体。再通过对先导抗体的初步生产、纯化和检定，获得具备抗体亲和力高（亲和力KD＜$1*10^{-9}$M）、有效封闭CTLA-4与受体B7.1和B7.2的结合、在人外周血单核细胞或T淋巴细胞反应中显著增加IL-2的表达水平、与人CD28等同类蛋白抗原缺乏交叉反应等优异生物性特性的CTLA-4抗体。然后通过分子生物学方法测序获知CTLA-4抗体的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列。

实施例1 CTLA-4抗体的制备

（一）免疫原A的制备

将人源CTLA-4蛋白胞外区氨基酸序列Lys36-Asp161克隆到带有人IgG Fc片段（hFc）的pCpC载体（购自Invitrogen，V044-50）并按已建立的标准分子生物学方法制备质粒，具体方法参见Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis T.（1989）. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition（Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press）。对HEK293细胞（购自Invitrogen）进行瞬时转染（PEI，Polysciences）并使用FreeStyle ™293（Invitrogen）在37℃下进行扩大培养。4天后收集细胞培养液，离心去除细胞成分，得含CTLA-4蛋白胞外区的培养上清液。将培养上清液上样到蛋白A亲和层析柱（Mabselect Sure，购自GE Healthcare），同时用紫外（UV）检测仪监测紫外吸收值（A280nm）的变化。上样后用PBS磷酸盐缓冲液（pH7.2）清洗蛋白A亲和层析柱直到紫外吸收值回到基线，然后用0.1M甘氨酸盐酸（pH2.5）洗脱，收集从蛋白A亲和层析柱上洗脱下来的带hFc标签的CTLA-4蛋白（CTLA-4-hFc），用PBS磷酸盐缓冲液（pH7.2）在4℃冰箱透析过夜。透析后的蛋白经0.22微米无菌过滤后分装于-80℃保存，即获得纯化的免疫原A。免疫原A在使用前需要进行一系列质控检测，如检测其蛋白浓度、纯度、分子量和生物活性等，结果如图1和表1所示。表1说明CTLA-4与B7.1或B7.2在蛋白水平的结合随B7.1或B7.2的浓度变化而变化，其中对照蛋白为非CTLA-4融合蛋白，表中的数据为OD_{450nm}值。

其中，免疫原A生物活性采用ELISA检测，具体为：

将带hFc标签的CTLA-4蛋白（CTLA-4-hFc，即免疫原A），用PBS稀释至1μg/mL，以100μl/孔加入ELISA微孔板，4℃孵育过夜。用ELISA封闭液（含1%BSA，pH7.4的PBS磷酸缓冲液，所述百分比为质量百分比）37℃封闭两小时后，再加入梯度稀释的生物素标记的B7.1或B7.2-hFc，37℃温育1小时。生物素标记的B7.1-hFc或B7.2-hFc的制备方法如下：将B7.1-hFc或B7.2-hFc与生物素化试剂反应即可。所述B7.1-hFc或B7.2-hFc的制备方法与免疫原A的制备方法相同，其中B7.1胞外区蛋白（Val35-Asn242）的氨基酸序列信息参见Uniprot数据库，编号P33681；B7.2胞外区蛋白（Ala24-Pro247）的氨基酸序列信息参见Uniprot

数据库，编号P42081；所述生物素化试剂购自Sigma，商品号B3295；与生物素化试剂反应的操作步骤参见该生物素化试剂的说明书。加入链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶（购自Sigma商品号S2438），室温孵育30分钟，用洗液将未结合的链霉亲和素标记的辣根过氧化物酶洗去，加入100微升/孔TMB显色液。室温孵育15分钟后，加入50微升1N盐酸终止显色反应，用ELISA读板机读取OD_{450nm}读数。

表1 CTLA-4-hFc蛋白与生物素标记的配体B7.1-hFc或B7.1-hFc的结合活性

	包被的CTLA-4-hFc，1ug/ml										
生物素标记的配体，nM	40	13	4.4	1.5	0.49	0.16	0.06	0.02	6.1E-03	2.0E-03	6.8E-04
生物素标记的B7.1-hFc	2.65	2.69	2.72	2.65	2.74	2.7	2.36	1.15	0.44	0.23	0.18
生物素标记的B7.2-hFc	2.72	2.81	2.84	2.58	1.31	0.45	0.19	0.19	0.16	0.14	0.15

具体活性结果如表1和图1所示，表明表达的配体和受体蛋白有正确的构象，适合进行免疫、建立受体-配体结合阻断检测方法及进行抗体活性鉴定。

（二）免疫原B的制备

人源CTLA-4全长氨基酸序列被突变为CTLA-4 (Y201V)，并克隆到pIRES载体（购自Clontech）并制备质粒。对HEK293细胞系和CHOK1细胞系（均购自Invitrogen）进行质粒转染（转染使用X-treme GENE HP DNA Transfection Reagent，购自Roche公司，货号Cat #06 366 236 001，并按说明书操作）后，在含0.5 μg/ml嘌呤霉素的含10%（w/w）FBS的DMEM培养基中选择性培养2周，用有限稀释法在96孔培养板中进行亚克隆，并置于37℃，5%（v/v）CO_2培养。大约2周后选择部分单克隆孔扩增到6孔板中。对扩增后的克隆用已知的CTLA-4抗体染色，经流式细胞分析法进行筛选。选择长势较好、荧光强度较高、单克隆的细胞系继续扩大培养并液氮冻存，即获得免疫原B。具体选择结果如表2和图2所示，表2中阳性细胞（%）指阳性细胞占总细胞数目的百分比。图2说明，HEK293细胞有较高水平CTLA-4的表达，适合用做免疫原和进行抗体结合活性鉴定。

表2 CTLA-4(Y201V)蛋白转染的HEK293细胞FACS筛选检测结果

编号	重组细胞克隆	IgG 对照		抗-CTLA-4 mAb	
		Gated (%)	MFI	Gated (%)	MFI
1	4-2C3	3.5	5.2	99.1	545.6
2	4-1E10	4.0	5.2	99.2	545.5
3	4-1C5	2.9	5.1	99.7	504.5
4	4-2D2	3.8	5.1	99.1	424.9

（三）杂交瘤细胞的制备和抗体筛选

Harbour转基因小鼠引入了人免疫球蛋白可变区基因和大鼠免疫球蛋白恒定区基因，而小鼠本身的Ig表达则被沉默（F.G. Franklin, et al, patent #WO 2010/070263 A1）。该转基因小鼠经抗原免疫后能产生与正常小鼠（如Balb/c）相当的免疫反应和抗体效价。

A、免疫原A免疫采用6~8周龄Harbour人源抗体转基因小鼠（购自北京维通利华公司），小鼠在SPF条件下饲养。初次免疫时，免疫原A蛋白用弗氏完全佐剂乳化后腹腔注射0.25毫升，即每只小鼠注射100微克免疫原A蛋白。加强免疫时，免疫原A蛋白用弗氏不完全佐剂乳化后腹腔注射0.25毫升，即每只小鼠注射50微克免疫原A蛋白。初次免疫与第一次加强免疫之间间隔2周，以后每次加强免疫之间间隔3周。每次加强免疫1周后采血，用ELISA和FACS检测血清中免疫原A的抗体效价和特异性，结果如图3和表3所示。表3说明，经CTLA-4-hFc免疫的小鼠的免疫后血清对免疫原均有不同程度的结合，呈现抗原抗体反应，其中最高稀释度在一千（1000）左右。其中空白对照为1%（w/w）BSA，其中批次指第三次加强免疫后第七天的小鼠血清，表中的数据为OD_{450nm}值。

B、免疫原B免疫采用6~8周龄Harbour人源抗体转基因小鼠（购自北京维通利华公司），小鼠在SPF条件下饲养。将按步骤（二）中的得到的含人源CTLA-4的HEK293-hCTLA-4(Y201V)稳定细胞系在T-75细胞培养瓶中扩大培养至90%汇合度，吸尽培养基。用DMEM基础培养基（购自Invitrogen）洗涤2次，然后用无酶细胞解离液（购自Invitrogen）37℃处理直至细胞从培养皿壁上可脱落，收集细胞。用DMEM基础培养基洗涤2次，进行细胞计数后将细胞用磷酸盐缓冲液（pH7.2）稀释至2×10^7细胞每毫升。每只小鼠每次免疫时腹腔注射0.5毫升细胞悬液。第一次与第二次免疫之间间隔2周，以后每次免疫间隔3周。除第一

次免疫以外，每次免疫1周后采血，用ELISA检测血清中抗体效价和特异性。表3和图3为HEK-CTLA-4细胞免疫血清，用ELISA进行抗体效价检测的结果。

表3 ELISA检测HEK293-CTLA-4细胞免疫后Harbour转基因小鼠血清抗体效价

OD_{450nm}	血清稀释度						
批次	1:100	$1:10^3$	$1:10^4$	$1:10^5$	$1:10^6$	$1:10^7$	空白对照
3171（TB3）	2.91	1.44	0.88	0.64	0.74	0.62	0.86
3172（TB3）	2.91	1.71	0.83	0.59	0.65	0.58	0.81
3173（TB3）	2.93	1.75	0.79	0.6	0.57	0.6	0.71
3174（TB3）	2.87	1.13	0.83	0.59	0.63	0.56	0.84
3175（TB3）	2.68	0.95	0.79	0.56	0.62	0.56	0.73

通常以免疫原A或B进行免疫，大部分小鼠经3次免疫后ELISA效价可达到1:1000以上，说明H2L2小鼠可对免疫原产生较好的体液免疫反应，其脾细胞可以用来进行杂交瘤细胞制备。

A或B步骤完成前，将所选择的每只小鼠最后一次免疫腹腔注射100微克纯化的CTLA-4-hFc（针对免疫原A和免疫原B）进行免疫反应的小鼠）或含人源CTLA-4的HEK293-hCTLA-4稳定细胞（针对免疫原B进行免疫反应的小鼠），5天后处死小鼠，收集脾细胞。加入NH_4OH至终浓度1%（w/w），裂解脾细胞中参杂的红细胞，获得脾细胞悬液。用DMEM基础培养基1000转每分钟离心清洗细胞3次，然后按活细胞数目5:1比率与小鼠骨髓瘤细胞SP2/0混合（购自ATCC），采用高效电融合或PEG方法（参见METHODS IN ENZYMOLOGY, VOL. 220）进行细胞融合。融合后的细胞稀释到含20%胎牛血清、1×HAT的DMEM培养基中，所述百分比为质量百分比。然后按1×10^5/20微升每孔加入到96孔细胞培养板中，放入5% CO_2、37℃培养箱中，所述百分比为体积百分比。14天后用ELISA和Acumen（微孔板细胞检测法）筛选细胞融合板上清，将ELISA中OD_{450nm}>1.0和Acumen中MFI值>100的阳性克隆扩增到24孔板，在含10%（w/w）胎牛血清的DMEM（Invitrogen）的培养基中，在37℃，5%（v/v）CO_2条件下扩大培养。培养3天后取24孔板中扩大培养的培养液进行离心，收集上清液，对上清液进行抗体亚型分析。用ELISA、FACS确定对CTLA-4蛋白和CTLA-4阳性细胞的结合活性，

配体受体结合实验确定抗体样品对CTLA-4受体的封闭活性。

根据24孔板筛选结果，挑选ELISA实验中OD_{450nm}>1.0、FACS实验中MFI值>50和配体受体结合实验中杂交瘤细胞培养上清对CTLA-4受体的封闭抑制率达到60%的杂交瘤细胞为符合条件的阳性克隆。选择符合条件的杂交瘤细胞用有限稀释法在96孔板进行亚克隆，在含10%（w/w）FBS的DMEM培养基中（购自Invitrogen）37℃，5%（v/v）CO_2条件下培养。亚克隆后10天用ELISA和Acumen进行初步筛选，挑选阳性单克隆扩增到24孔板继续培养。3天后用FACS确定抗原结合阳性并用CTLA-4受体配体结合实验评估生物活性（评估标准为ELISA实验中OD_{450nm}>1.0、FACS实验中MFI值>50和配体受体结合实验中杂交瘤细胞培养上清对B7.1配体的封闭抑制率达到60%）。

根据24孔板样品检测结果，阳性克隆在含10%（w/w）FBS的DMEM（购自Invitrogen）培养基中，在37℃，5%（v/v）CO_2条件下进行扩大培养，细胞悬浮于冻存液[含有20%（w/w）FBS和10%（w/w）DMSO的DMEM]中，按常规方法液氮冻存即得本发明杂交瘤细胞，并可用于后续的抗体生产、纯化和氨基酸序列测定。

实施例2 嵌合抗体的鉴定

（一）流式细胞实验（FACS）检测抗体与CTLA-4表达细胞的结合

将实施例1步骤（二）中所述含有编码人源CTLA-4全长核苷酸序列的pIRES质粒转染293F细胞株得含人CTLA-4的293F稳转细胞株（此处称为HEK293-hCTLA-4稳定细胞株），将带有猴源CTLA-4全长基因的pIRES质粒，其中猴源CTLA-4核苷酸酸序列的数据库登录号为XM_005574014.1，转染HEK293细胞株的含猴CTLA-4的HEK293稳转细胞株（此处称为HEK293-cCTLA-4稳定细胞株）。将HEK293-hCTLA-4稳定细胞株和HEK293-cCTLA-4稳定细胞株在T-75细胞培养瓶中扩大培养至90%汇合度，吸尽培养基，用HBSS缓冲液（Hanks Balanced Salt Solution，购自Invitrogen）洗涤2次，然后用无酶细胞解离液（Versene solution，购自Life technology公司）处理和收集细胞。用HBSS缓冲液洗涤细胞2次，进行细胞计数后将细胞用HBSS缓冲液稀释至2×10^6细胞每毫升，加入1%山羊血清封闭液，所述百分比为质量百分比。冰上孵育30分钟，然后用HBSS

缓冲液离心洗涤2次。将收集的细胞用FACS缓冲液（含有1%BSA的HBSS，所述百分比为质量百分比）悬浮至2×10^6细胞/mL，按每孔100微升加入到96孔FACS反应板中，加入实施例2所得的纯化的CTLA-4抗体待测样品每孔100微升，冰上孵育2小时。用FACS缓冲液离心洗涤2次，加入每孔100微升荧光（Alexa 488）标记的二抗（购自Invitrogen），冰上孵育1小时。用FACS缓冲液离心洗涤3次，加入每孔100微升固定液[4%（v/v）多聚甲醛]悬浮细胞，10分钟后用FACS缓冲液离心洗涤2次。用100微升FACS缓冲液悬浮细胞，用FACS（FACS Calibur，购自BD公司）检测和分析结果。

表4 FACS检测CTLA-4抗体与CHOK1-hCTLA-4的结合反应

克隆 ID	平均荧光强度			
	抗体浓度（nM）			
	66.67	6.67	0.67	0.07
97A8D1	617	395	116	20
92C8B6	603	420	154	29
31C12F3	469	386	95	27.6
40C4C6	449	403	146	43.3
97B8E1	606	347	125	22
IgG 对照	8	3	2	2

表5 FACS检测CTLA-4抗体与293F-cCTLA-4的结合反应

克隆 ID	平均荧光强度							
	抗体浓度（nM）							
	200	40	8	1.6	0.32	0.064	0.0128	0.000128
hIgG1	4.9	3.3	2.9	2.6	2.4	2.6	2.6	2.7
40C4C6	643.1	625.6	618.8	421.2	218.6	68.6	23.0	2.4
31C12F3	667.9	711.7	653.8	454.9	260.8	97.7	34.3	2.4
92C8B6	711.1	800.1	721.9	465.1	208.1	67.7	22.2	2.3
97A8D1	830.7	910.0	753.8	513.1	225.4	67.2	23.1	2.4
97B8E1	783.7	810.0	756.7	504.1	269.9	96.8	35.7	2.3

结果如图4和图5，表4和表5所示，待测抗体可结合细胞表面的人或猴CTLA-4蛋白，各抗体活性相当，表明抗体与CTLA-4结合能力较强。其中IgG对照为人IgG，表中的数据为MFI所测细胞群的平均荧光强度值。

（二）检测CTLA-4抗体阻断CTLA-4蛋白与其配体B7.1或B7.2的结合

CTLA-4蛋白的受体配体结合试验检测CTLA-4抗体阻断CTLA-4蛋白与其配

体B7.1或B7.2的结合。

CTLA-4胞外区蛋白（CTLA-4-hFc）用PBS稀释到终浓度1.0μg/mL，然后以100μl每孔加到96孔ELISA板。用塑料膜封好4℃孵育过夜，第二天用洗板液[含0.01%（v/v）Tween20的PBS]洗板2次，加入封闭液[含0.01%（v/v）Tween20和1%（w/w）BSA的PBS]室温封闭2小时。倒掉封闭液，先加入实施例2所得的纯化的CTLA-4抗体待测样品50μl每孔，后加入生物素标记的B7.1胞外区蛋白（B7.1-hFc）或B7.2-hFc，每孔100微升，混匀后37℃孵育。2小时后，用洗板液[含0.01%（v/v）Tween20的PBS]洗板3次。加入HRP（辣根过氧化物酶）标记的亲和素稀释液（购自Sigma）每孔100微升，37℃孵育2小时后，用洗板液[含0.01%（v/v）Tween20的PBS]洗板3次。加入TMB底物100μl每孔，室温孵育30分钟后，加入终止液（1.0N HCl）100μl每孔。用ELISA读板机（SpectraMax 384plus, Molecular Device）读取A450nm数值，结果如图6，图7和表6、表7所示。

表6 CTLA-4抗体对CTLA-4蛋白与其受体B7.1的结合的抑制

抑制率（%）	抗体浓度（nM）							
克隆号	66.7	22.2	7.4	2.5	0.823	0.274	0.091	0.00091
40C4C6	89.7	87.5	80.7	75.2	63.1	40.0	12.7	0
31C12F3	94.4	93.6	89.6	87.7	72.2	25.7	1.7	0
92C8B6	97.0	96.0	97.0	94.0	93.0	55.0	8.0	0.0
97A8D1	97.0	91.0	91.0	93.0	78.0	4.0	-1.0	0.0
97B8E1	96.0	89.0	89.0	87.0	75.0	4.0	-2.0	0.0
hIgG4	-10.0	-41.0	-40.0	-39.0	-37.0	-41.0	-36.0	0.0

表7 CTLA-4抗体对CTLA-4蛋白与其受体B7.2的结合的抑制

抑制率（%）	抗体浓度（nM）							
克隆号	66.7	22.2	7.4	2.5	0.823	0.274	0.091	0.00091
40C4C6	88.7	84.6	76.6	66.6	53.3	26.4	5.3	0
31C12F3	92.8	92.1	89.9	83.6	60.2	17.1	-8.8	0
92C8B6	95	94	95	92	90	60	23	0
97A8D1	95	94	95	91	76	6	-21	0
97B8E1	93	91	89	78	62	2	-29	0
hIgG4	61	10	-12	-7	-1	-10	-8	0

结果表明，所得抗体可不同程度的抑制CTLA-4蛋白与其配体B7.1或B7.2的结合，所测抗体活性相当。其中IgG对照为人IgG，表中的数据为抑制率（%）。

（三）淋巴细胞刺激实验检测CTLA-4抗体对淋巴细胞活性的影响

淋巴细胞刺激实验检测CTLA-4抗体阻断CTLA-4蛋白与其受体B7.1和B7.2

的结合从而解除其对T淋巴细胞活性的抑制，从而刺激T细胞的增殖。

1.Ficoll分离全血获取外周血单核淋巴细胞PBMC

将新鲜获取的全血用磷酸缓冲液PBS以1:1的体积比例稀释得稀释后的全血，用无菌吸管轻轻将稀释后的全血铺平在Ficoll液面（购自GE Healthcare），Ficoll与稀释后的全血的体积比为3:4，避免震荡混匀，以400g转速室温20℃梯度离心30分钟，离心后的离心管分为三层，上层为血浆，中间乳白色分层即为单核淋巴细胞。用无菌吸管轻轻吸取中间层细胞，收集至新的离心管，用PBS磷酸缓冲液稀释至三倍体积，100g转速室温离心10分钟，弃上清。将淋巴细胞用PBS磷酸缓冲液重悬至10mL，重复前面步骤取出血小板。最后将淋巴细胞重悬至10mL含有10%胎牛血清的多组份RPMI1640培养基（购自Invitrogen）备用，即为外周血单核淋巴细胞PBMC，所述百分比为质量百分比。

2.SEB依赖的PBMC刺激实验

试验前，配制等体积比稀释的待测实施例2所得的纯化的CTLA-4抗体，得待测样品溶液。

将获得的外周血单核淋巴细胞PBMC以1×10^5个细胞100微升每孔铺至96孔细胞培养板，然后将所述的待测样品溶液加入培养板，室温培养30分钟。最后加入超抗原SEB，每反应孔中含有50微升100ng/ml SEB，保证每个反应孔250μL体积，将反应板于37℃、5%CO_2培养箱培养72小时后收集上清，得细胞上清液，于-20℃冻存，所述百分比为体积百分比。

3.细胞上清中细胞因子白介素IL-2酶联免疫吸附检测

细胞上清中细胞因子白介素IL-2酶联免疫吸附检测使用R&D system相关检测试剂盒Quantikine ELISA human IL-2（S2050），并按照说明书操作。除检测抗体外的所有检测试剂均由检测试剂盒提供。

测定细胞上清中细胞因子白介素IL-2含量的酶联免疫吸附检测采用双抗夹心ELISA试剂盒（购自R&D Systems，IL-2 Cat # S2050）。实验操作严格按照试剂盒说明书要求，所有检测试剂均由试剂盒提供。具体实验简述如下：将IL-2多克隆抗体包被于ELISA微孔板上，将步骤2.获得的细胞上清液作为待测

样品，加入标准品和待测样品室温孵育2小时。每孔加入400微升洗液，重复洗板4次；再加入抗人IL-2的辣根过氧化物酶标抗体，室温孵育2小时，与微孔板上的IL-2形成免疫复合物，清洗微孔；加入底物显色，避光室温30分钟，最终加入终止液，用酶标仪测定A450nm吸光度。检测CTLA-4抗体在步骤2.所述PBMC刺激实验中对IL-2分泌的影响。结果如图8，和表8所示。

表8 CTLA-4抗体在PBMC淋巴细胞刺激试验中对IL-2分泌的影响

克隆 ID	IL-2 (pg/mL)				
	抗体浓度（ug/mL）				
	10	2	4	0.08	0.016
97A8D1	7979.7	4947.6	1523.1	742.1	336.3
92C8B6	6119.7	3737.2	1418.8	830.5	355.1
97B8E1	7911.4	4449.5	1947.4	823.6	446.1
IgG 对照	超出范围	102.1	343.0	222.9	178.0

结果表明，在PBMC淋巴细胞刺激试验中待测抗体可使PBMC的IL-2分泌增强，并且激活作用呈浓度梯度依赖性，其中97A8D1活性率优于其他抗体。其中hIgG对照为人IgG，表中的数据为IL-2值（pg/mL）。

实施例3 轻重链可变区氨基酸序列测定

总RNA分离：将实施例1亚克隆培养所得的上清液检验过抗原结合后（即经过实施例3-6的检定和活性测定后），通过离心搜集5×10^7个杂交瘤细胞，加入1mL Trizol混匀并转移到1.5mL离心管中，室温静置5分钟。加0.2mL氯仿，振荡15秒，静置2分钟后于4℃，12000g离心5分钟，取上清转移到新的1.5mL离心管中。加入0.5mL异丙醇，将管中液体轻轻混匀，室温静置10分钟后于4℃，12000g离心15分钟，弃上清。加入1mL 75%乙醇（所述百分比为体积百分比），轻轻洗涤沉淀，4℃，12000g离心5分钟后弃上清，将沉淀物晾干，加入DEPC处理过的H_2O溶解（55℃水浴促溶10分钟），即得总RNA。

逆转录与PCR：取1μg总RNA，配置20μl体系，加入逆转录酶后于42℃反应60分钟，于7℃反应10分钟终止反应。配置50μl PCR体系，包括1μl cDNA、每种引物25pmol、1μl DNA聚合酶以及相配的缓冲体系、250μmol dNTPs。设置PCR程序，预变性95℃3分钟，变性95℃30秒，退火55℃ 30秒，延伸72℃35秒，35

个循环后再额外于72℃延伸5分钟，得PCR产物。其中逆转录所用的试剂盒为PrimeScript RT Master Mix，购自Takara，货号RR036；PCR所用的试剂盒为Q5超保真酶，购自NEB，货号M0492。

克隆与测序：取5μl PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳检测，将检测阳性样品使用柱回收试剂盒纯化，其中回收试剂盒为NucleoSpin® Gel & PCR Clean-up，购自MACHEREY-NAGEL，货号740609。进行连接反应：样品50ng，T载体50ng，连接酶0.5μl，缓冲液1μl，反应体系10μl，于16℃反应半小时得连接产物，其中连接的试剂盒为T4 DNA连接酶，购自NEB，货号M0402；取5μl连接产物加入100μl的感受态细胞（Ecos 101competent cells，购自Yeastern，货号FYE607）中，冰浴5分钟。而后于42℃水浴热激1分钟，放回冰上1分钟后加入650μl无抗生素SOC培养基，于37℃摇床上以200RPM的速度复苏30分钟，取出200μl涂布于含抗生素的LB固体培养基上于37℃孵箱过夜培养。次日，使用T载体上引物M13F和M13R配置30μl PCR体系，进行菌落PCR，用移液器枪头蘸取菌落于PCR反应体系中吹吸，并吸出0.5μl点于另一块含100nM氨苄青霉素的LB固体培养皿上以保存菌株。PCR反应结束后，取出5μl进行琼脂糖凝胶电泳检测，将阳性样品进行测序。其中，测序的步骤参见Kabat，Sequences of Proteins of Immunological Interest，National Institutes of Health，Bethesda，Md.（1991）。

测序结果如表9所示：

表9 CTLA-4抗体基因序列编号

克隆号	重链蛋白可变区	轻链蛋白可变区
97A8D1	**41** (CDR1: nt 88-105) (CDR2: nt 148-198) (CDR3: nt 289-321)	**42** (CDR1: nt 73-108) (CDR2: nt 151-177) (CDR3: nt 268-294)
92C8B6	**43** (CDR1: nt 88-105) (CDR2: nt 148-198) (CDR3: nt 289-327)	**44** (CDR1: nt 73-105) (CDR2: nt 148-174) (CDR3: nt 265-294)
31C12F3	**45** (CDR1: nt 88-105) (CDR2: nt 148-198) (CDR3: nt 286-327)	**46** (CDR1: nt 73-105) (CDR2: nt 148-174) (CDR3: nt 265-291)
40C4C6	**47** (CDR1: nt 88-105) (CDR2: nt 148-198) (CDR3: nt 289-327)	**48** (CDR1: nt 73-105) (CDR2: nt 148-174) (CDR3: nt 265-291)
97B8E1	**49**	**50**

	(CDR1: nt 88-105) (CDR2: nt 148-198) (CDR3: nt 289-330)	(CDR1: nt 73-105) (CDR2: nt 148-174) (CDR3: nt 265-291)

其中，表9中的数字即为序列表“SEQ ID NO:”编号，如编码97A8D1的重链蛋白可变区的核苷酸序列为序列表SEQ ID NO:41。

其中，编码97A8D1的重链蛋白可变区中CDR1域的核苷酸序列为序列表SEQ ID NO:41中的第88位至第105位；

编码97A8D1的重链蛋白可变区中CDR2域的核苷酸序列为序列表SEQ ID NO:41中的第148位至第198位；

编码97A8D1的重链蛋白可变区中CDR3域的核苷酸序列为序列表SEQ ID NO:41中的第289位至第321位；

编码97A8D1的轻链蛋白可变区中CDR1域的核苷酸序列为序列表SEQ ID NO:42中的第73位至第108位；

编码97A8D1的轻链蛋白可变区中CDR2域的核苷酸序列为序列表SEQ ID NO:42中的第151位至第177位；

编码97A8D1的轻链蛋白可变区中CDR3域的核苷酸序列为序列表SEQ ID NO:42中的第268位至第294位；

编码92C8B6的重链蛋白可变区中CDR1域的核苷酸序列为序列表SEQ ID NO:43中的第88位至第105位；

编码92C8B6的重链蛋白可变区中CDR2域的核苷酸序列为序列表SEQ ID NO:43中的第148位至第198位；

编码92C8B6的重链蛋白可变区中CDR3域的核苷酸序列为序列表SEQ ID NO:43中的第289位至第327位；

编码92C8B6的轻链蛋白可变区中CDR1域的核苷酸序列为序列表SEQ ID NO:44中的第73位至第105位；

编码92C8B6的轻链蛋白可变区中CDR2域的核苷酸序列为序列表SEQ ID NO:44中的第148位至第174位；

编码92C8B6的轻链蛋白可变区中CDR3域的核苷酸序列为序列表SEQ ID NO:44中的第265位至第294位；

编码31C12F3的重链蛋白可变区中CDR1域的核苷酸序列为序列表SEQ ID NO:45中的第88位至第105位；

编码31C12F3的重链蛋白可变区中CDR2域的核苷酸序列为序列表SEQ ID NO:45中的第148位至第198位；

编码31C12F3的重链蛋白可变区中CDR3域的核苷酸序列为序列表SEQ ID NO:45中的第286位至第327位；

编码31C12F3的轻链蛋白可变区中CDR1域的核苷酸序列为序列表SEQ ID NO:46中的第73位至第105位；

编码31C12F3的轻链蛋白可变区中CDR2域的核苷酸序列为序列表SEQ ID NO:46中的第148.位至第174位；

编码31C12F3的轻链蛋白可变区中CDR3域的核苷酸序列为序列表SEQ ID NO:46中的第265位至第291位；

编码40C4C6的重链蛋白可变区中CDR1域的核苷酸序列为序列表SEQ ID NO:47中的第88位至第105位；

编码40C4C6的重链蛋白可变区中CDR2域的核苷酸序列为序列表SEQ ID NO:47中的第148位至第198位；

编码40C4C6的重链蛋白可变区中CDR3域的核苷酸序列为序列表SEQ ID NO:47中的第289位至第327位；

编码40C4C6的轻链蛋白可变区中CDR1域的核苷酸序列为序列表SEQ ID NO:48中的第73位至第105位；

编码40C4C6的轻链蛋白可变区中CDR2域的核苷酸序列为序列表SEQ ID NO:48中的第148位至第174位；

编码40C4C6的轻链蛋白可变区中CDR3域的核苷酸序列为序列表SEQ ID NO:48中的第265位至第291位。

编码97B8E1的重链蛋白可变区中CDR1域的核苷酸序列为序列表SEQ ID NO:49中的第88位至第105位；

编码97B8E1的重链蛋白可变区中CDR2域的核苷酸序列为序列表SEQ ID NO:49中的第148位至第198位；

编码97B8E1的重链蛋白可变区中CDR3域的核苷酸序列为序列表SEQ ID NO:49中的第289位至第330位；

编码97B8E1的轻链蛋白可变区中CDR1域的核苷酸序列为序列表SEQ ID NO:50中的第73位至第105位；

编码97B8E1的轻链蛋白可变区中CDR2域的核苷酸序列为序列表SEQ ID NO:50中的第148位至第174位；

编码97B8E1的轻链蛋白可变区中CDR3域的核苷酸序列为序列表SEQ ID NO:50中的第265位至第291位。

实施例4 全人抗体IgG转化和制备

（一）质粒构建与准备：实施例2已从杂交瘤细胞的培养上清液中获得了纯化的CTLA-4抗体，并根据实施例7的测序结果明确了CTLA-4抗体的重链可变区和轻链可变区序列。将CTLA-4抗体的重链可变区序列重组到包含信号肽和人源重链抗体IgG1恒定区的表达载体（其中表达载体购买自Invitrogen）中，将CTLA-4抗体的轻链可变区序列重组到包含信号肽和人源抗体轻链kappa恒定区的表达载体当中，得重组质粒并经测序验证（测序方法与实施例7中测序方法相同）。使用碱裂解法试剂盒（购自MACHEREY-NAGEL）中量抽提高纯度的重组质粒，质量为500μg以上，经0.22μm滤膜（购自Millopore）过滤，供转染使用。

（二）细胞转染：在培养基Freestyle 293 expression medium（购自Invitrogen）培养293E细胞（购自Invitrogen）。摇床设置为37℃、130RPM，8% CO_2（v/v）浓度。

Freestyle 293 expression medium在转染时添加10%（v/v）F68（购自Invitrogen）至F68终浓度为0.1%（v/v），得含0.1%（v/v）F68的Freestyle 293表达培养基，即培养基A。

取5mL培养基A和200μg/mL PEI（购自Sigma）混匀，得培养基B。取5mL培养基A和100μg/mL步骤（1）所得的重组质粒混匀，得培养基C。5分钟后将培养基B和培养基C合并混匀，静置15分钟，得混合液D。将10mL混合液D缓缓加入100mL含293E细胞的培养基Freestyle 293 expression medium中至293E的细胞密度为1.5×10^6/mL，边加边振荡，避免PEI过度集中，放入摇床培养。第二天加入蛋白胨至终浓度为0.5%（w/v）。第5~7天，测培养液抗体效价。第6~7天，离心（3500RPM，30分钟）收集上清，经0.22μm滤膜过滤，得滤好的细胞上清液，以供纯化。

（三）抗体纯化：对于连续生产的无内毒素的层析柱和Protein A填料（购自GE），使用0.1M NaOH处理30分钟或者5个柱体积的0.5M NaOH冲洗。对于长

期未使用的柱料和层析柱至少使用1M NaOH浸泡1h，用无内毒的水冲洗至中性，用10倍柱体积的1%（v/v）Triton×100对柱料清洗。使用5个柱体积的PBS（PBS磷酸缓冲液，pH7.2）进行平衡，将步骤（2）所得过滤好的细胞上清液上柱，必要时收集流穿液。上柱完成后，使用5倍柱体积的PBS清洗。用5倍柱体积的0.1M pH3.0的Glycine-HCl进行洗脱，收集洗脱液，并用0.5倍柱体积洗脱液的pH8.5的1MTris-HCl（1.5M NaCl）中和，收获全人CTLA-4抗体。上述所用溶液均需要新配置。收获全人CTLA-4抗体后，在1×PBS中透析4小时，避免内毒素污染。透析结束后，使用分光光度或试剂盒测定浓度，使用HPLC-SEC测定抗体纯度，使用内毒素检测试剂盒（购自Lonza）检测抗体内毒素含量。

实施例5 流式细胞实验（FACS）检测全人抗体与CTLA-4表达细胞的结合

对所获全人CTLA-4抗体与细胞表达CTLA-4的结合活性进行鉴定，检测结果分别如图9、图10和表10、表11所示。

表10. 流式细胞实验（FACS）检测抗体与人CTLA-4表达细胞的结合

克隆 ID	平均荧光强度									
	抗体浓度（nM）									
	200	40	8	1.6	0.32	0.064	0.0128	0.000128	200	40
97A8D1	1016	1017	919	580	196	66	22	3	1016	1017
92C8B6	1061	1035	827	509	203	67	23	3	1061	1035
31C12F3	998	941	756	547	260	96	34	3	998	941
40C4C6	963	967	795	553	233	74	24	3	963	967
97B8E1	886	902	727	491	229	85	31	3	886	902
IgG 对照	6	4	3	3	3	3	3	3	6	4

表11. 流式细胞实验（FACS）检测抗体与猴CTLA-4表达细胞的结合

克隆 ID	平均荧光强度							
	抗体浓度（nM）							
	200	40	8	1.6	0.32	0.064	0.0128	0.000128
97A8D1	831	910	754	513	225	67	23	2
92C8B6	711	800	722	465	208	68	22	2
31C12F3	668	712	654	455	261	98	34	2
40C4C6	643	626	619	421	219	69	23	2
97B8E1	784	810	757	504	270	97	36	2
IgG 对照	5	3	3	3	2	3	3	3

结果表明，经过全人IgG转化并制备所得全人CTLA-4抗体能够以较高的活

性与人和猴的CTLA-4结合，抗体活性接近。

实施例6 检测CTLA-4抗体阻断CTLA-4蛋白与其配体B7.1或B7.2的结合

对所获全人CTLA-4抗体进行阻断活性鉴定，检测结果分别如图11、图12和表12、表13所示。

表12 全人CTLA-4抗体对CTLA-4蛋白与其受体B7.1的结合的抑制

克隆 ID	%阻断							
	抗体浓度（nM）							
	200	40	8	1.6	0.32	0.064	0.0128	0.000128
40C4C6	99.4	99.4	99.2	98.1	82.1	35	9.3	0
31C12F3	99.3	99.1	98.5	95.9	74.5	30.4	5.1	0
92C8B6	99.3	98.9	98.1	93.7	65.1	21.4	5.3	0
92C8B6	99.5	99.4	99.3	97.7	71.2	24.4	7.2	0
97A8D1	98.4	97.2	95.2	90.6	67.8	28.7	6.1	0
hIgG1	-0.3	1.6	-0.1	1.3	1	0.2	-2	0

表13 全人CTLA-4抗体对CTLA-4蛋白与其受体B7.2的结合的抑制

克隆 ID	%阻断							
	抗体浓度（nM）							
	200	40	8	1.6	0.32	0.064	0.0128	0.000128
40C4C6	99.1	99.1	99.1	99.1	89.2	52.4	30	0
31C12F3	99.2	99.1	99.1	99	84.4	48.1	25.6	0
92C8B6	99.2	99.2	99.2	98.7	78.5	36.7	25	0
hIgG1	12.4	18.3	4.9	4.1	15.5	12.9	12.3	0
97A8D1	99.2	99.2	99.2	99	84.1	48.4	33	0
97B8E1	99.1	99	99	98.7	82.3	42.8	26.3	0
hIgG1	12.4	18.3	4.9	4.1	15.5	12.9	12.3	0

图11、图12和表12、表13表明，经过全人IgG转化并制备所得全人CTLA-4抗体能够阻断CTLA-4与B7.1和B7.2的结合，所测抗体阻断活性相当。

实施例7 淋巴细胞刺激实验检测CTLA-4抗体对淋巴细胞活性的影响

实验方法见实施例2（三），检测结果见表14和图13。

表14 CTLA-4全人源抗体在SEB依赖的PBMC激活试验中对IL-2分泌的影响

克隆 ID	IL-2 分泌量, pg/ml											
	30ug/ml		10ug/ml		3.3ug/ml		1.1ug/ml		0.37ug/ml		0.13ug/ml	
	N=1	N=2	N=1	N=2	N=1	N=2	N=1	N=2	N=1	N=2	N=1	N=2
40C4C6	6839	7408	5267	4813	3773	3618	3199	3008	2369	2162	2135	1826
31C12F3	5924	7372	5021	3811	4422	3327	2647	3631	1765	2001	1656	1634
92C8B6	7240	6592	6674	5205	4856	3491	3606	2928	2811	1858	1567	1386
97B8E1	7653	8206	6649	5209	4240	4200	3455	2555	2481	1865	1572	1447
97A8D1	6088	7542	5075	5562	4664	3331	2660	2610	2114	1956	1516	1504
hIgG1	210	210	196	190	208	219	166	274	220	254	257	221

从表14、图13可见，全人源化抗体在SEB依赖的PBMC激活试验中，能够显著刺激IL-2分泌，并且该活性具有浓度梯度依赖效应，表明CTLA-4抗体能够逆转CTLA-4对T细胞激活的抑制作用，所测抗体活性水平相当。其中IgG对照为人IgG1（hIgG1），表14中的数据为IL-2浓度。

实施例8 PHA诱导的CD3+T淋巴细胞实验检测CTLA-4抗体阻断B7.1或B7.2与CTLA-4结合后对T淋巴细胞的激活

检测CTLA-4抗体阻断B7.1或B7.2与CTLA-4结合后对T淋巴细胞的激活。

T细胞组成型表达CD28，PHA可非特异性激活T细胞，从而诱导CTLA-4的膜表达；Raji细胞组成型表达CTLA-4/CD28的配体B7.1和B7.2；当激活的T细胞与Raji细胞孵育时，CTLA-4和CD28竞争性结合配体，由于CTLA-4对配体的亲和力高于CD28，所以与Raji细胞孵育时，表现为T细胞激活的部分下调，当CTLA-4的配体结合能力被阻断时，T细胞激活的下调会被逆转，即表现为IL-2分泌的提高。

（一） PHA诱导人CD3+细胞的活化

从全血中用使用试剂FICOLL PAQUE PLUS，并按照其说明书操作分离PBMC细胞。具体步骤如4.4.2中（5）所述。

使用人CD3+细胞提取试剂盒（MagCellectTM Human CD3+ T Cell Isolation Kit）对所得的PBMC细胞按说明书进行操作，得分离纯化的CD3+细胞，将人CD3+T

细胞接种到6孔板中，加入10 μg/mL PHA，处理72小时，以获得CTLA-4过表达的CD3+T细胞囊。

（二）丝裂霉素处理Raji细胞

使用前，将Raji细胞用10 μg/mL丝裂霉素，37℃处理1.5小时，用PBS洗3次以去除残留的丝裂霉素。同时配制等体积比稀释的待测的纯化CTLA-4抗体，得待测样品溶液。

（三） Raji介导的T细胞囊的激活

将步骤①所得的CD3+T细胞囊接种至96孔细胞培养板，接种密度分别为1×10^5 cells/孔 接种体积为每孔50 μL，加入待测样品溶液，每孔50 μL，共同孵育30分钟，然后加入步骤②的Raji细胞，以100 μL 3×10^4 cells/孔铺至96细胞培养板，于37℃，5% CO2培养箱孵育4天。收集细胞上清，用于细胞因子检测，所述百分比为体积百分比。

（四） 细胞上清中细胞因子白介素IL-2 酶联免疫吸附检测

将步骤③所得的细胞上清中细胞因子白介素IL-2进行酶联免疫吸附检测。使用R&D system相关检测试剂盒Quantikine ELISA human IL-2（S2050），并按照说明书操作。除检测抗体外的所有检测试剂均由检测试剂盒提供。

CTLA-4全人源抗体在PHA诱导的T淋巴囊细胞激活试验中对IL-2分泌的影响见图14。结果表明，所测抗体均能刺激T细胞分泌IL2，并且该效应与抗体浓度呈剂量相关性，即随抗体浓度提高IL2水平也升高，其中92C8B6和97A8D1活性最好。

实施例9 抗CTLA-4抗体亲和力的分析测定

将抗人Fc IgG固定在流通池1和2上：将HBS-EP+（10 mmol/L HEPES，150 mmol/L NaCl，3mM EDTA，0.05% P20，pH 7.4）用作运行缓冲液，使用固定向导模板进行抗人Fc IgG的固定。串联S CM5传感器芯片的流通池1和2用新鲜混合的50 mmol/L NHS和200 mmol/L EDC活化。用10 mmol/L NaAC（pH4.5）稀释抗人Fc IgG至20 μg/mL，注射到活化的流通池1和2中。剩余的活性偶联位点用1 mol/L乙醇胺封闭。

将重组His标记的hCTLA-4 ECD蛋白稀释至50 nmol/L，随后用HBS-EP+缓冲

液以2倍比例连续稀释4次。His标记的hCTLA-4 ECD蛋白浓度为0 nmol/L，3.125 nmol/L，6.25 nmol/L，12.5 nmol/L，25 nmol/L和50 nmol/L。用HBS-EP+作为运行缓冲液进行KD测量。每个抗体以10 μL/min的流速注射到CM5传感器流动池2上以达到响应230RU。然后将制备的His标记的hCTLA-4ECD蛋白以30 μL/min的流速注入流通池1和2，持续180秒。缓冲液流动维持400秒以进行解离测量（30 μL/min）。为了从表面除去测试的抗体，将10 mmol/L甘氨酸-HCl pH1.5注射20秒（30 μL/min）。流动池1用作参考流动池。对于每个浓度的连续稀释的His-标记的CTLA-4ECD蛋白重复上述步骤。使用Biacore T200评估软件1.0评估每种抗体的KD值，并且使用1:1结合模型拟合数据。结果见表15。

表15 抗CTLA-4抗体亲和力的分析测定

克隆 ID	K_D (nM)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)
97A8D1	2.15E-09	4.05E+05	8.70E-04
92C8B6	2.52E-09	7.44E+05	0.001873
31C12F3	2.62E-09	4.50E+05	0.00118
40C4C6	2.36E-09	7.20E+05	0.0017
97B8E1	3.50E-09	4.31E+05	0.001506

结果表明，所测抗体的KD值均在纳摩水平，且与工具抗体相当，表明这些抗体对人CTLA-4 ECD均有较好的亲和力，其中，97A8D1抗体对人CTLA-4 ECD的亲和力最好，适合作为候选抗体进行体内活性的确认。

实施例10 抗CTLA-4抗体小鼠体内抗肿瘤活性评价

采用MC38同系小鼠模型，使用人CTLA-4基因敲入的C57BL/6小鼠评价抗体在小鼠体内的抗肿瘤活性。实验设计为，选择50只人CTLA-4基因敲入的C57BL/6小鼠，分为6组，每组10只，使用Ipilimumab和同型抗体hIgG1作为对照，样品为92C8B6、97A8D1和97B8E1。给药途径为腹腔注射，给药剂量为10 mg/kg，在0、3、6、10天腹腔注射，第24天处死小鼠，测量肿瘤体积，小鼠体重，肿瘤重量及小鼠存活率。实验结果见图15。

图15结果表明，本发明的抗体（包括92C8B6、97A8D1和97B8E1）能够显著

抑制肿瘤生长，抑制效果显著优于对照抗体Ipilimumab（例如97A8D1的中位生存期为22.5天，优于Ipilimumab的中位生存期19天）。

实施例11 去岩藻糖抗CTLA-4抗体的制备和表征

在该实施例中，在缺乏岩藻糖基转移酶的细胞系中表达全人抗CTLA-4抗体97A8D1，使得该细胞系产生去岩藻糖基化的蛋白质。通过液质联用技术分析去岩藻糖基化抗体97A8D1和岩藻糖基化抗体97A8D1经过Ide Z和EndoS酶解后的分子量，确定抗体Fc端是否带有岩藻糖。分析结果见图16。

图16结果表明，经过酶处理后,去岩藻糖基化抗体97A8D1去糖后Fc分子量为23755 Da（图16A），不去糖的Fc分子量为23957Da（图16B）,两者分子量相差202Da(GlcNAc)。经过酶处理后，岩藻糖基化抗体97A8D1去糖后Fc分子量为23755Da（图16C），不去糖的Fc分子量为24104Da（图16D），两者分子量相差349Da(Fuc+GlcNAc)，又因为去岩藻糖基化抗体的Fc分子量(23957Da)比岩藻糖基化抗体的Fc分子量(24104Da)少147Da，所以在分子量水平上推测去岩藻糖基化抗体不含岩藻糖，岩藻糖基化抗体含有岩藻糖。

实施例12 淋巴细胞刺激实验检测去岩藻糖基化抗CTLA-4抗体对淋巴细胞活性的影响

实验方法见实施例2（三），检测结果见表18和图17。

表18去岩藻糖基化和岩藻糖基化抗CTLA-4抗体在SEB依赖的PBMC激活试验中对IL-2分泌的影响

克隆 ID	IL-2 分泌量, pg/ml											
	30ug/ml		6ug/ml		1.2ug/ml		0.24ug/ml		0.048ug/ml		0.0096ug/ml	
	N=1	N=2	N=1	N=2	N=1	N=2	N=1	N=2	N=1	N=2	N=1	N=2
去岩藻糖基化 97A8D1	17792	24639	19119	23609	25546	21592	17778	21179	10239	11260	3230	3632
岩藻糖基化 97A8D1	21635	25325	21230	22142	14892	20251	7824	9596	2574	2988	1436	1024
hIgG1	432	480	609	871	507	634	760	634	515	615	581	548

从表18、图17表去岩藻糖基化和岩藻糖基化抗CTLA-4抗体均能够逆转CTLA-4对T细胞激活的抑制作用,但去岩藻糖基化抗CTLA-4抗体活性要优于岩藻糖基化抗CTLA-4抗体。

讨论

（1）可以通过对野生型小鼠进行免疫获得抗体，但是需要对鼠源抗体进行人源化改造而获得人源化抗体，缺点在于改造后的抗体免疫原性可能更强、抗体结构可能会改变从而导致活性丢失或可生产性变差。

（2）可以通过对全人源转基因小鼠进行免疫获得全人抗体，但是所获得抗体的数量或亲和力会较差。

（3）可通过构建免疫小鼠抗体库用噬菌体展示技术对抗体进行表达和活性筛选，但是涉及到抗体重轻链的随机重新组合，会导致形成的抗体可生产性较差。

（4）可通过构建人源抗体库用噬菌体展示技术对抗体进行表达和活性筛选，但是因为未经免疫，所得抗体亲和力会较差。

（5）免疫原可以为多肽，蛋白，其他种类细胞和基因等，但是会存在构象不正确、表达量低、免疫原性差等问题。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考，就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解，在阅读了本发明的上述讲授内容之后，本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改，这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。

本发明涉及的序列信息如下：

CTLA-4抗体的氨基酸序列编号对应的氨基酸序列，其中CDR1、CDR2、CDR3、CDR1'、CDR2'、CDR3'分别用下划线标示出来：

SEQ ID No.1 >97A8D1_VH (mAb49)

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCVASGFTFN NYGMNWVRQA PGKGLEWVAV IWYGGRNKFY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LEMNSLRAED TAVYYCARAD WGGWFDPWGQ GTLVTVSS

SEQ ID No.5 >97A8D1_VL (mAb49)

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRASQSVS STYLAWYQQK PGQAPRLLIH GAFSRATGIP DRFSGSGSGP DFTLTISRLE PEDFAVYYCQ QYGTSPFTFG PGTKVDIK

SEQ ID No.9>92C8B6_VH (mAb42)

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS NFGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLF LQMNGLRAED TAVYYCAKGG ILMAGTLDYW GQGTLVTVSS

SEQ ID No.13>92C8B6_VL (mAb42)

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSVS TYLNWYQQKP GKAPKLLIYA ASSFQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYFCQQ SYSTPFTFGP GTKVDIK

SEQ ID No.17>31C12F3_VH (mAb010)

QVQLVESGGG VVQPGRSLIL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV VWYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMSSLRAED TAVYYCARGG IVVPGLFEYW GQGSLVTVSS

SEQ ID No.21>31C12F3_VL (mAb010)

DIQMTQSPSS LSASVGDRVA ITCRTSQSIS NLLNWYQQKP GKAPELLIYA PSSFQSGVPS RFRGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ SYSTPFTFGP GTKVDIK

SEQ ID No.25>40C4C6_VH (mAb09)

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAV IWYDGRNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCARAS GSYSYYFDYW GQGTLVTVSS

SEQ ID No.29>40C4C6_VL (mAb09)

DIQMTQSPSS LSASVGGRVT ITCRASQSIS SFLNWYQHEL GKAPKLLIYG ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ TYSTPFTFGP GTKVDIK

SEQ ID No.33>97B8E1_VH (mAb50)

QVQLVESGGG VVQPGRSLRL SCAASGFTFS SYVMHWVRQA PGKGLEWVAV IWSDGRNKYY TDSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMSSLRAED TAVYYCARSG IALAGNAFDI WGQGTMVTVS S

SEQ ID No.37>97B8E1_VL (mAb50)

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCRASQSIS SYLNWYQQKP GKAPKLLIYA ASSLQSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ SYSTPFTFGP GTKVDIK

CTLA-4抗体的编码氨基酸序列对应的核苷酸序列，其中CDR1、CDR2、CDR3、CDR1'、CDR2'、CDR3'的编码核苷酸序列分别用下划线标示出来：

SEQ ID No.41_97A8D1_VH (mAb49)

CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTAGCGTCTGGATTCACCTTCAATAA CTATGGCATGAACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATTTGGTATGGTGGACGTAATAAATTCTATGCAG

ACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATTTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGGAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT
GTGTATTACTGTGCGAGAGCTGACTGGGGAGGGTGGTTCGACCCCTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID No.42_97A8D1_VL (mAb49)
GAAATTGTGTTGACGCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGGGAAAGAGCCACCCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGAGTGTTAGCAG
CACCTACTTAGCCTGGTACCAGCAGAAACCTGGCCAGGCTCCCAGGCTCCTCATCCATGGTGCATTCAGCAGGGCCACTGGCATCCCAGACA
GGTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGCCAGACTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTAT
GGTACCTCACCATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA

SEQ ID No.43_92C8B6_VH (mAb42)
CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAA
CTTTGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAG
ACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTTTCTGCAAATGAACGGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT
GTGTATTACTGTGCGAAAGGGGGTATATTAATGGCTGGTACGCTGGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID No.44_92C8B6_VL (mAb42)
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCGTTAGCAC
CTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTCCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGT
TCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTTCTGTCAACAGAGTTAC
AGTACCCCATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA

SEQ ID No.45_31C12F3_VH (mAb010)
CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGATACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGTTTCACCTTCAGTAG
CTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTGTTTGGTATGATGGAAGTAATAAATACTATGCAG
ACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT
GTGTATTACTGTGCGAGAGGGGGTATAGTAGTGCCTGGCCTCTTTGAGTACTGGGGCCAGGGATCCCTGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID No.46_31C12F3_VL (mAb010)
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCGCCATCACTTGCCGGACAAGTCAGAGCATTAGTAA
CTTGTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTGAGCTCCTGATCTATGCTCCATCCAGTTTCCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGT
TCAGGGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGTAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTAC
AGTACCCCATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA

SEQ ID No.47_40C4C6_VH (mAb09)
CAGGTGCAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAG
CTATGGCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTATGATGGAAGAAATAAATATTATGCAG
ACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT
GTATATTACTGTGCGAGGGCTTCGGGGAGTTATTCGTACTACTTTGACTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCTCCTCA

SEQ ID No.48_40C4C6_VL (mAb09)
GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGGCAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAG
TTTTTTAAATTGGTATCAACATGAACTAGGGAAAGCCCCTAAACTCCTGATCTATGGTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA
AGGTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAC
TTACAGTACCCCATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA

SEQ ID No.49_97B8E1_VH (mAb50)
CAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTGGTCCAGCCTGGGAGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCGTCTGGATTCACCTTCAGTAG
TTATGTCATGCACTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGCAAGGGGCTGGAGTGGGTGGCAGTTATATGGTCTGATGGAAGAAATAAATACTATACAG
ACTCCGTGAAGGGCCGATTCACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACACGCTGTATCTGCAAATGAGCAGCCTGAGAGCCGAGGACACGGCT
GTGTATTACTGTGCGCGGTCGGGTATAGCGCTGGCTGGTAACGCTTTTGATATCTGGGGCCAAGGGACAATGGTCACCGTCTCTTCA

SEQ ID No.50_97B8E1_VL (mAb50)

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACAGAGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAG
TTATTTAAATTGGTATCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTCCCATCAAGGT
TCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCAACTTACTACTGTCAACAGAGTTAC
AGTACCCCATTCACTTTCGGCCCTGGGACCAAAGTGGATATCAAA

表16 CTLA-4抗体的CDR区序列

AA		VH			VL		
mAb#	克隆#	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1'	CDR2'	CDR3'
mAb049	97A8D1	nnygmn	viwyggrnkfyadsvkg	aradwggwfdp	asqsvsstylaw	gafsratgi	qqygtspft
mAb042	92C8B6	snfgmh	viwydgsnkyyadsvkg	akggilmagtldy	asqsvstylnw	aassfqsgv	qqsystpft
mAb010	31C12F3	ssygmh	vvwydgsnkyyadsvkg	arggivvpglfey	tsqsis--nllnw	apssfqsgv	qqsystpft
mAb009	40C4C6	ssygmh	viwydgrnkyyadsvkg	arasgsysyyfdy	asqsis--sflnw	gasslqsgv	qqtystpft
mAb050	97B8E1	ssyvmh	viwsdgrnkyytdsvkg	arsgialagnafdi	asqsissylnw	aasslqsgv	qqsystpft

表17 CTLA-4抗体的CDR区序列编号如下：

AA		VH			VL		
mAb#	Clone#	CDR1 SEQ ID No.	CDR2 SEQ ID No.	CDR3 SEQ ID No.	CDR1' SEQ ID No.	CDR2' SEQ ID No.	CDR3' SEQ ID No.
mAb049	97A8D1	2	3	4	6	7	8
mAb042	92C8B6	10	11	12	14	15	16
mAb010	31C12F3	18	19	20	22	23	24
mAb009	40C4C6	26	27	28	30	31	32
mAb050	97B8E1	34	35	36	38	39	40

参考文献：

[4]任军,黄红艳, 靶向免疫检查点的肿瘤免疫治疗现状与趋势[J]. 中国肿瘤临床, 2014, 41(7):415-419

权 利 要 求

1. 一种抗体的重链可变区，其特征在于，所述的重链可变区包括以下三个互补决定区CDR：

SEQ ID NO:8n+2所示的CDR1，

SEQ ID NO:8n+3所示的CDR2，和

SEQ ID NO:8n+4所示的CDR3；

其中，各n独立地为0、1、2、3或4；

其中，上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的，并能够保留CTLA-4结合亲和力的衍生序列。

2．一种抗体的重链，其特征在于，所述的重链具有如权利要求1所述的重链可变区。

3. 一种抗体的轻链可变区，其特征在于，所述的轻链可变区包括以下三个互补决定区CDR：

SEQ ID NO:8n+6所示的CDR1'，

SEQ ID NO:8n+7所示的CDR2'，和

SEQ ID NO:8n+8所示的CDR3'；

其中，各n独立地为0、1、2、3或4；

其中，上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的，并能够保留CTLA-4结合亲和力的衍生序列。

4．一种抗体的轻链，其特征在于，所述的轻链具有如权利要求3所述的轻链可变区。

5．一种抗体，其特征在于，所述抗体具有：

(1) 如权利要求1所述的重链可变区；和/或

(2) 如权利要求3所述的轻链可变区；

或者，所述抗体具有：如权利要求2所述的重链；和/或如权利要求4所述的轻链，

其中，上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的，并能够保留CTLA-4结合亲和力的衍生序列。

6. 如权利要求5所述的抗体，其特征在于，所述的抗体具有如权利要求1所述的重链可变区和如权利要求3所述的轻链可变区；

其中，所述的重链可变区包括以下三个互补决定区CDR：

SEQ ID NO:2所示的CDR1，

SEQ ID NO:3所示的CDR2，和

SEQ ID NO:4所示的CDR3；

其中，所述的轻链可变区包括以下三个互补决定区CDR：

SEQ ID NO:6所示的CDR1'，

SEQ ID NO:7所示的CDR2'，和

SEQ ID NO:8所示的CDR3'；

其中，上述氨基酸序列中任意一种氨基酸序列还包括任选地经过添加、缺失、修饰和/或取代至少一个氨基酸的，并能够保留CTLA-4结合亲和力的衍生序列。

7. 如权利要求5所述的抗体，其特征在于，所述抗体的重链可变区含有SEQ ID NO:8n+1所示的氨基酸序列；和/或所述抗体的轻链可变区含有SEQ ID NO:8n+5所示的氨基酸序列，其中，各n独立地为0、1、2、3或4。

8. 如权利要求6所述的抗体，其特征在于，所述抗体的重链可变区含有SEQ ID NO: 1所示的氨基酸序列，并且所述抗体的轻链可变区含有SEQ ID NO: 5所示的氨基酸序列。

9. 一种重组蛋白，其特征在于，所述的重组蛋白包括：

(i) 如权利要求1所述的重链可变区、如权利要求2所述的重链、如权利要求3所述的轻链可变区、如权利要求4所述的轻链、或如权利要求5-8中任一项所述的抗体；以及

(ii) 任选的协助表达和/或纯化的标签序列。

10. 一种多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸编码选自下组的多肽：

（1）如权利要求1所述的重链可变区、如权利要求2所述的重链、如权利要求3所述的轻链可变区、如权利要求4所述的轻链、或如权利要求5-8中任一项所述的抗体；以及

（2）如权利要求9所述的重组蛋白。

11. 如权利要求10所述的多核苷酸，其特征在于，编码所述重链可变区的多核苷酸如SEQ ID NO:41、43、45、47或49所示；和/或，

编码所述轻链可变区的多核苷酸如42、44、46、48或50所示。

12. 如权利要求11所述的多核苷酸，其特征在于，编码所述重链可变区序列的多核苷酸如SEQ ID NO:41所示；并且编码所述轻链可变区序列的多核苷酸如42所示。

13．一种载体，其特征在于，所述载体含有本发明权利要求10-12中任一项所述的多核苷酸。

14．一种遗传工程化的宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞含有权利要求13所述的载体或基因组中整合有权利要求10-12中任一项所述的多核苷酸。

15.一种药物组合物，其特征在于，所述药物组合物含有：

(i) 活性成分，所述活性成分选自下组：如权利要求1所述的重链可变区、如权利要求2所述的重链、如权利要求3所述的轻链可变区、如权利要求4所述的轻链、或如权利要求5-8中任一项所述的抗体、如权利要求9所述的重组蛋白、或其组合；以及

(ii)药学上可接受的载体。

16. 一种活性成分的用途，其特征在于，所述活性成分选自下组：如权利要求1所述的重链可变区、如权利要求2所述的重链、如权利要求3所述的轻链可变区、如权利要求4所述的轻链、或如权利要求5-8中任一项所述的抗体、如权利要求9所述的重组蛋白、或其组合，其中所述活性成分被用于制备预防和/或治疗CTLA-4相关肿瘤和/或病毒感染相关的疾病的药物。

17. 一种体外检测样品中CTLA-4蛋白的组合物，其特征在于，其包括如权利要求5-8中任一项所述的抗体、如权利要求9所述的重组蛋白、或其组合作为活性成分。

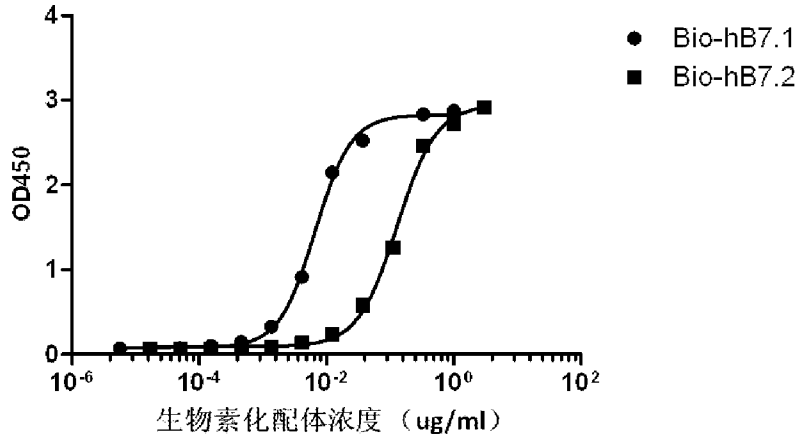

Bio-hB7.1
Bio-hB7.2
OD450
生物素化配体浓度（ug/ml）

图 1

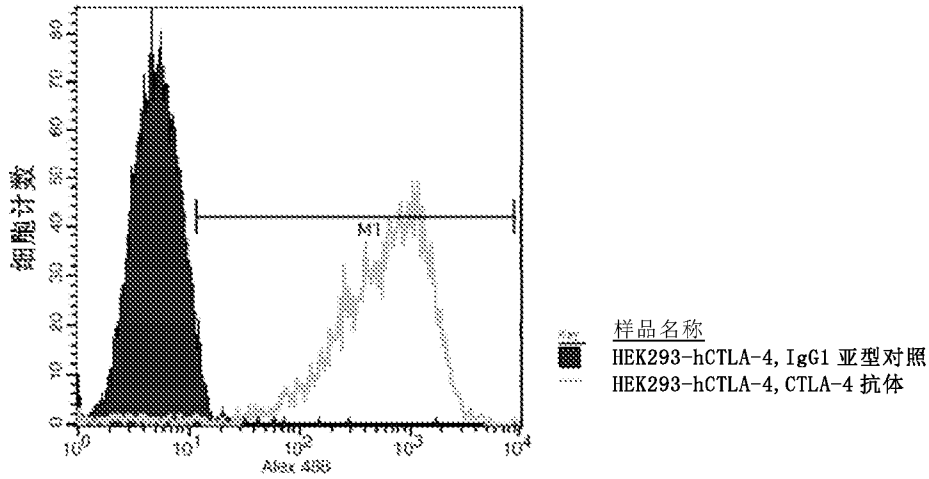

细胞计数
M1
样品名称
HEK293-hCTLA-4, IgG1 亚型对照
HEK293-hCTLA-4, CTLA-4 抗体

图 2

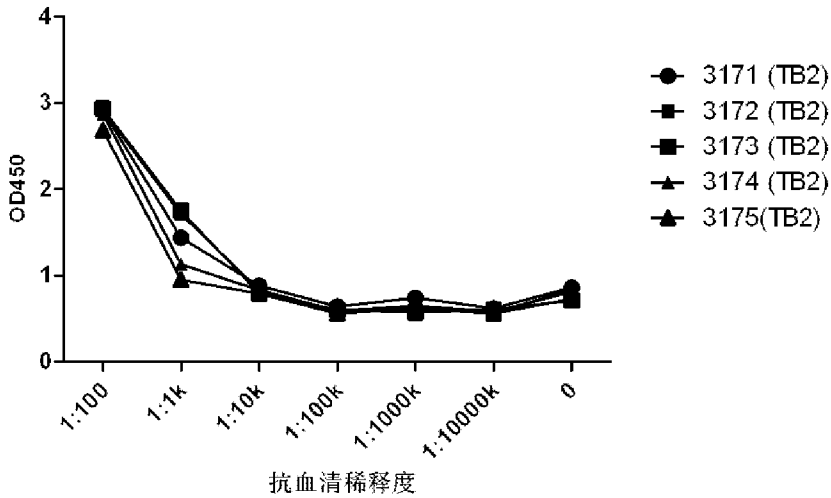

3171 (TB2)
3172 (TB2)
3173 (TB2)
3174 (TB2)
3175(TB2)
OD450
1:100
1:1k
1:10k
1:100k
1:1000k
1:10000k
0
抗血清稀释度

图 3

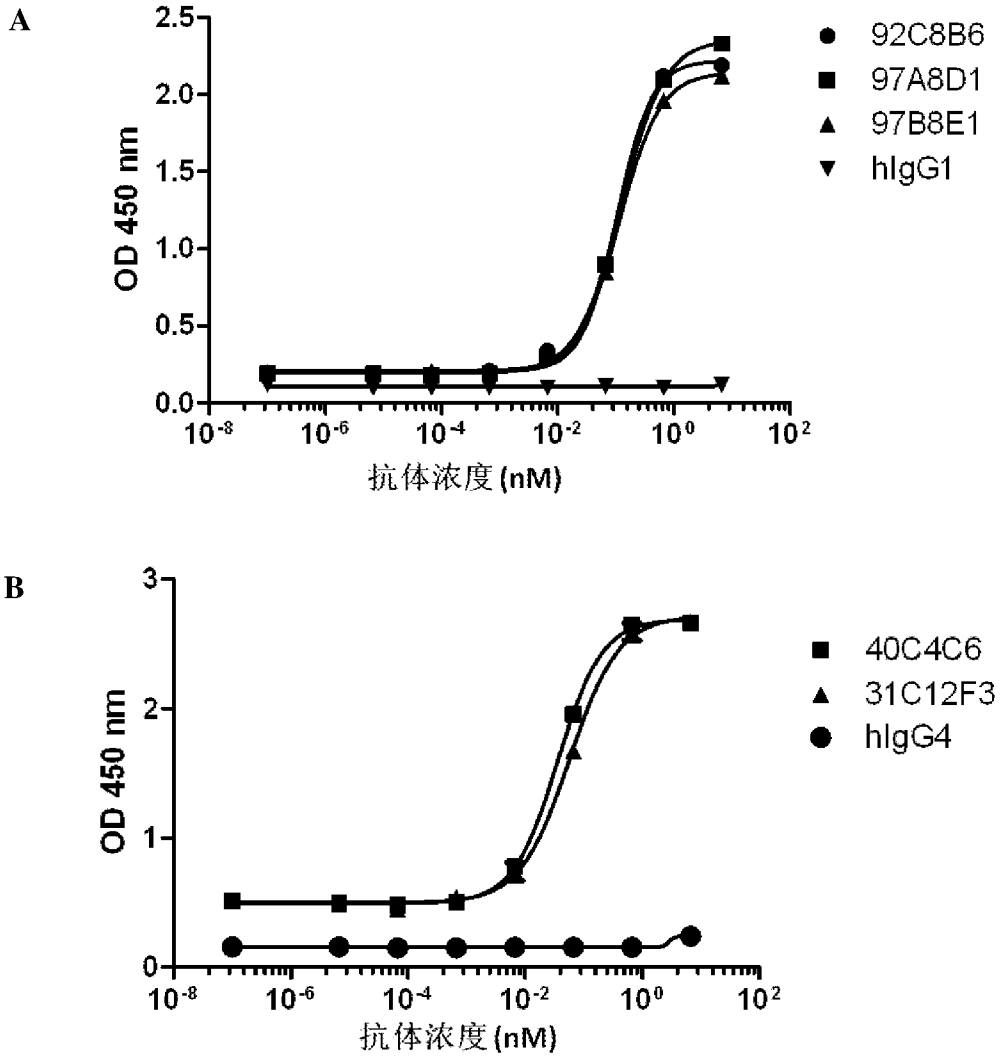
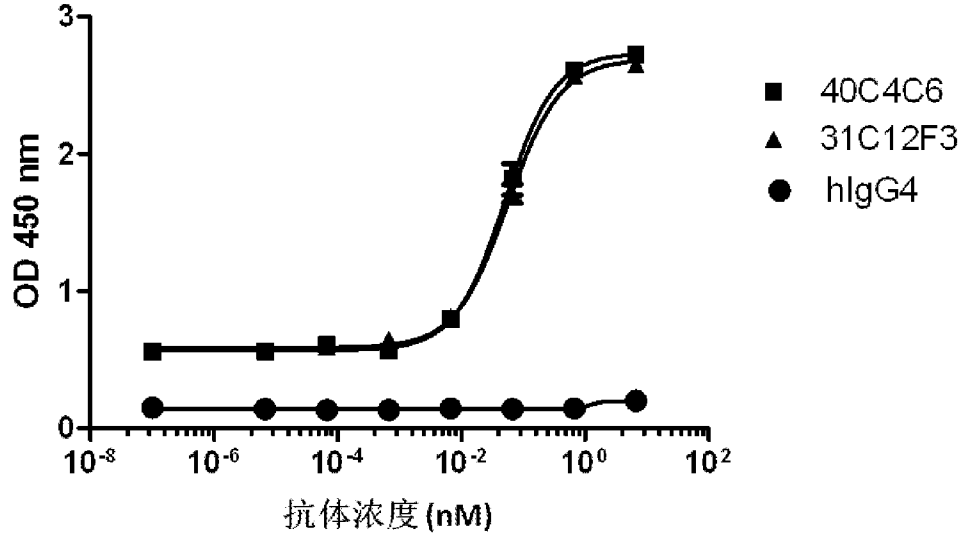

A
OD 450 nm
2.5
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
10-8
10-6
10-4
10-2
100
102
抗体浓度(nM)
92C8B6
97A8D1
97B8E1
hIgG1
B
OD 450 nm
3
2
1
0
10-8
10-6
10-4
10-2
100
102
抗体浓度(nM)
40C4C6
31C12F3
hIgG4

图 4

A


OD 450 nm
3
2
1
0
10-8
10-6
10-4
10-2
100
102
抗体浓度(nM)
40C4C6
31C12F3
hIgG4

B

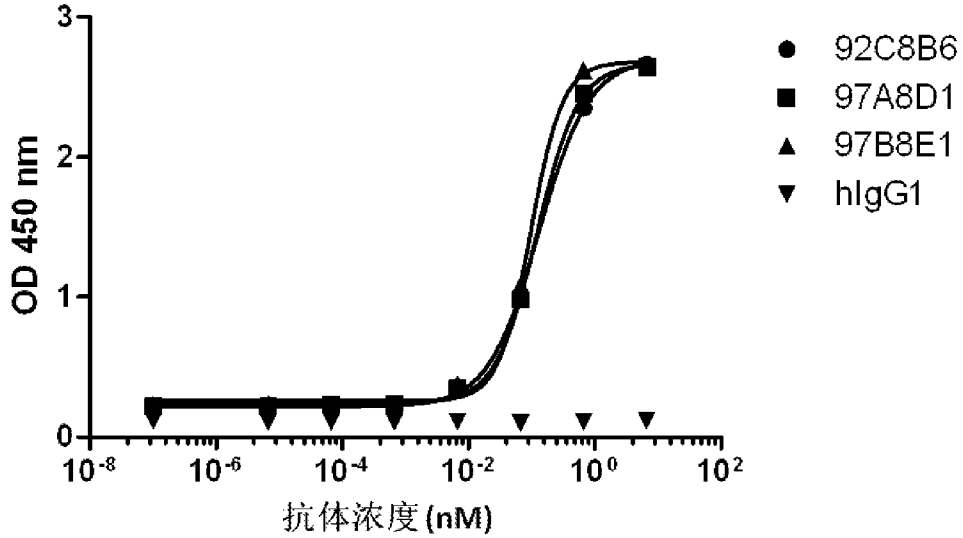

OD 450 nm
3
2
1
0
10-8
10-6
10-4
10-2
100
102
抗体浓度(nM)
92C8B6
97A8D1
97B8E1
hIgG1

图 5

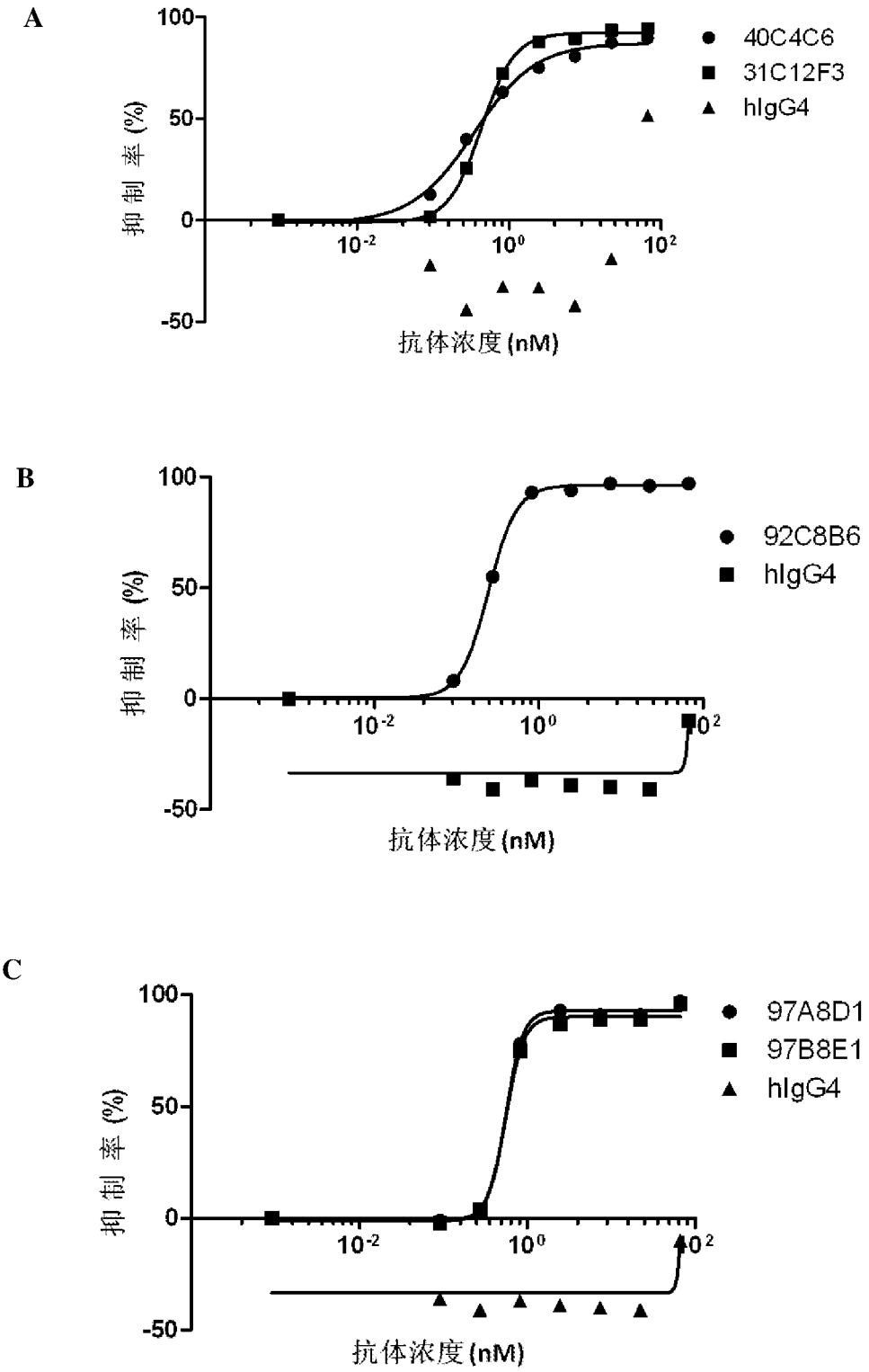
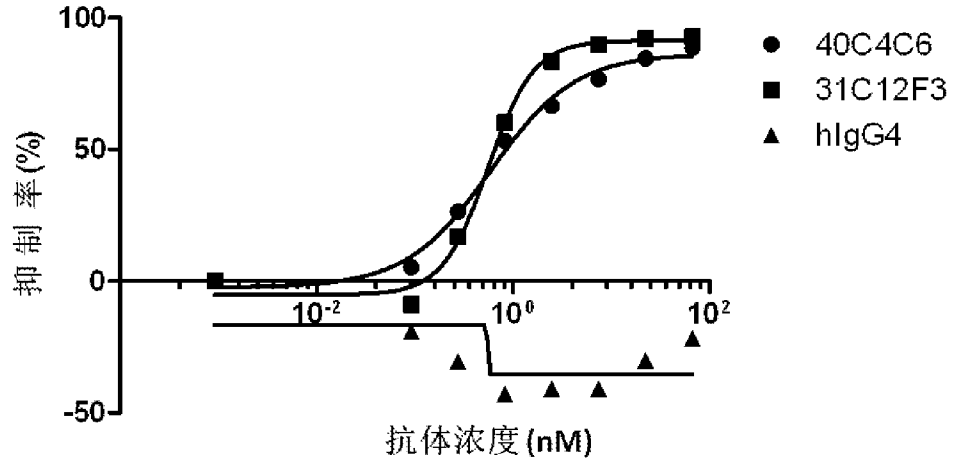
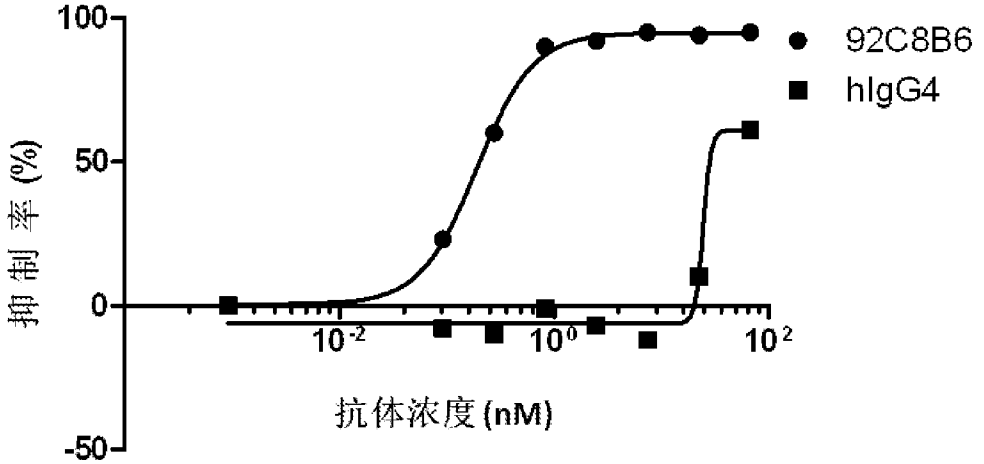

A
100
50
0
-50
抑制率(%)
10-2
100
102
抗体浓度(nM)
40C4C6
31C12F3
hIgG4
B
100
50
0
-50
抑制率(%)
10-2
100
102
抗体浓度(nM)
92C8B6
hIgG4
C
100
50
0
-50
抑制率(%)
10-2
100
102
抗体浓度(nM)
97A8D1
97B8E1
hIgG4

图 6

A


100
50
0
-50
抑制率(%)
10-2
100
102
抗体浓度(nM)
40C4C6
31C12F3
hIgG4

B


100
50
0
-50
抑制率(%)
10-2
100
102
抗体浓度(nM)
92C8B6
hIgG4

C

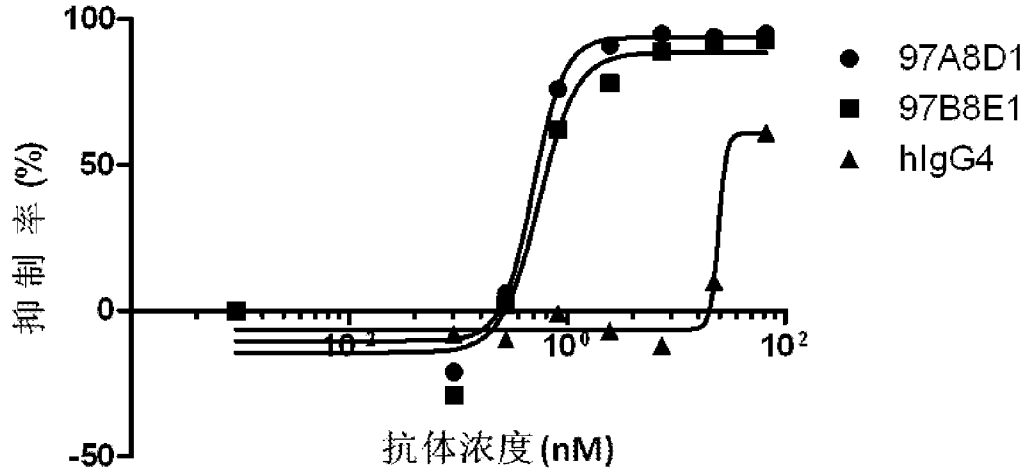

100
50
0
-50
抑制率(%)
10-2
100
102
抗体浓度(nM)
97A8D1
97B8E1
hIgG4

图 7

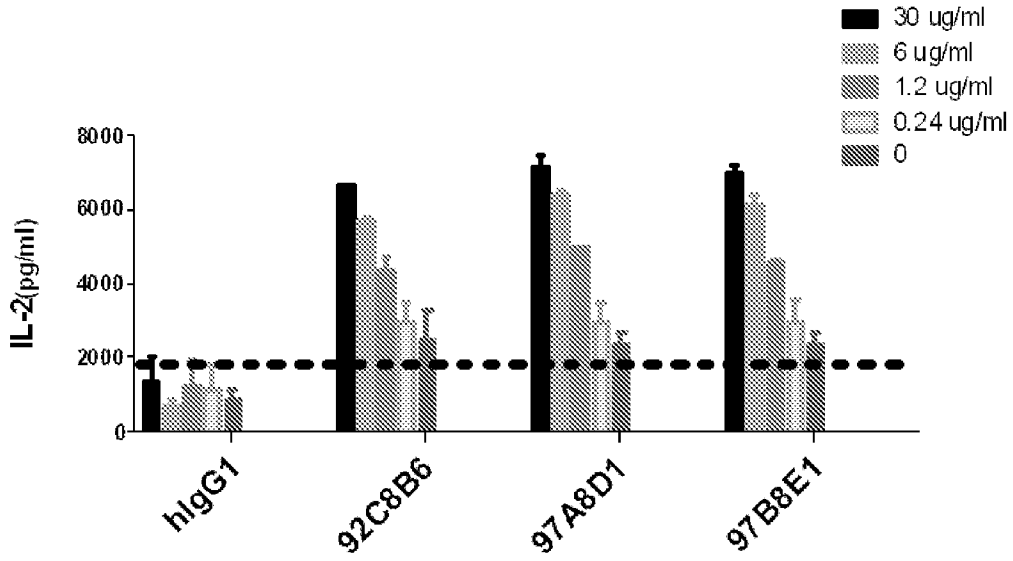

30 ug/ml
6 ug/ml
1.2 ug/ml
0.24 ug/ml
0
IL-2(pg/ml)
8000
6000
4000
2000
0
hIgG1
92C8B6
97A8D1
97B8E1

图 8

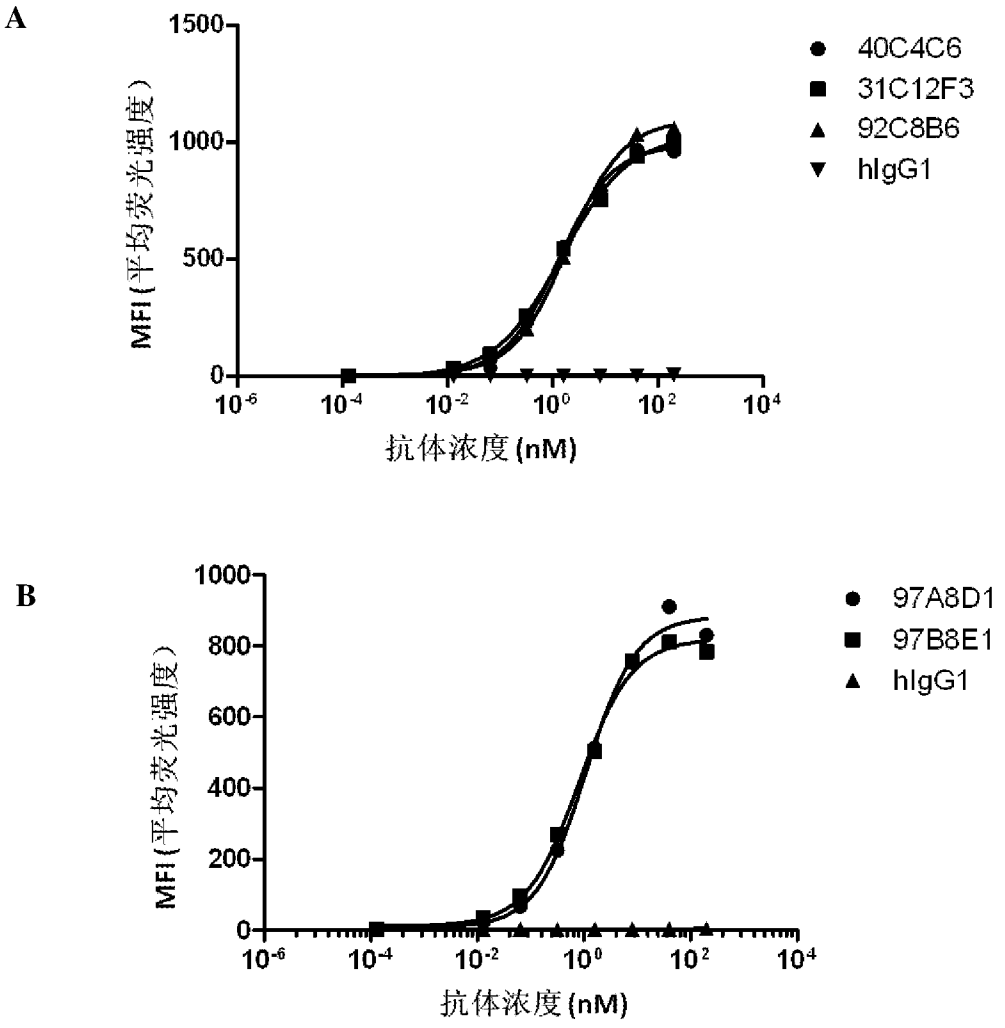

A
1500
1000
500
0
MFI (平均荧光强度)
40C4C6
31C12F3
92C8B6
hIgG1
抗体浓度 (nM)
B
1000
800
600
400
200
0
MFI (平均荧光强度)
97A8D1
97B8E1
hIgG1
抗体浓度 (nM)

图 9

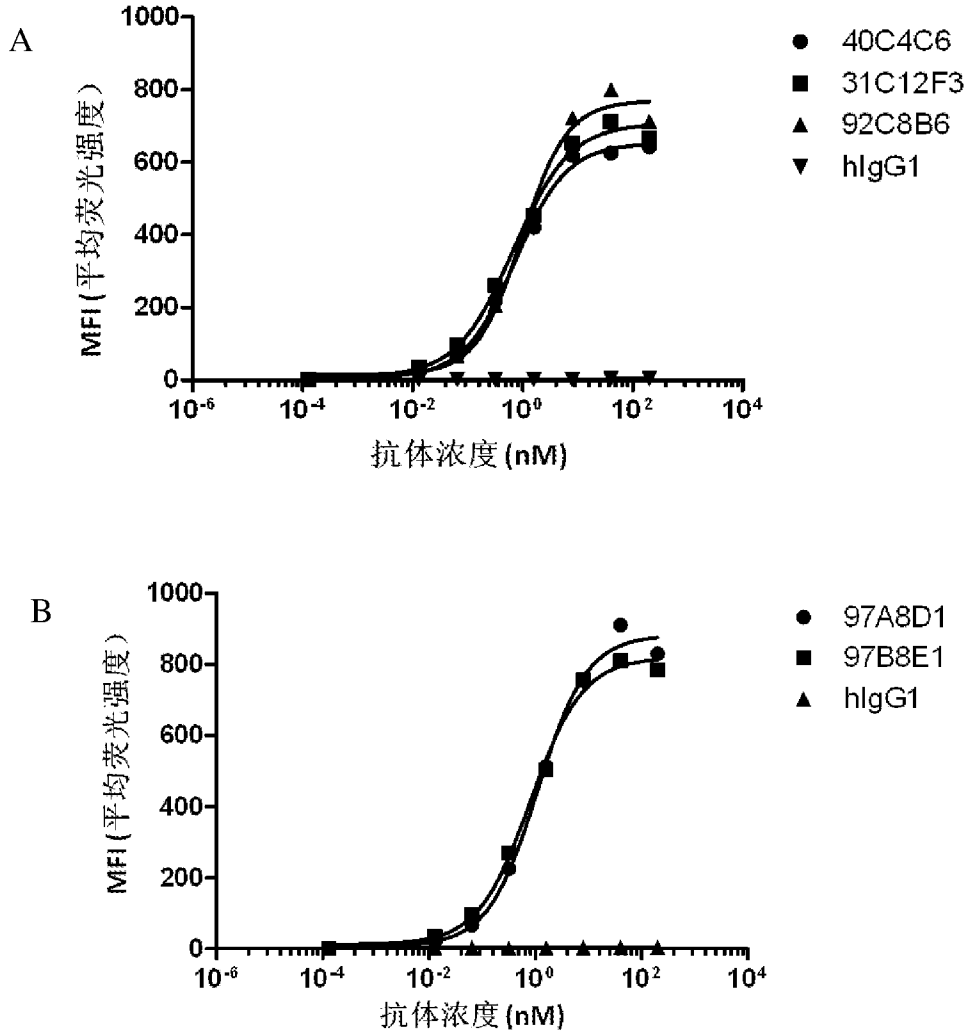

A
1000
800
600
400
200
0
MFI (平均荧光强度)
10^{-6}
10^{-4}
10^{-2}
10^{0}
10^{2}
10^{4}
抗体浓度 (nM)
40C4C6
31C12F3
92C8B6
hIgG1
B
1000
800
600
400
200
0
MFI (平均荧光强度)
10^{-6}
10^{-4}
10^{-2}
10^{0}
10^{2}
10^{4}
抗体浓度 (nM)
97A8D1
97B8E1
hIgG1

图 10

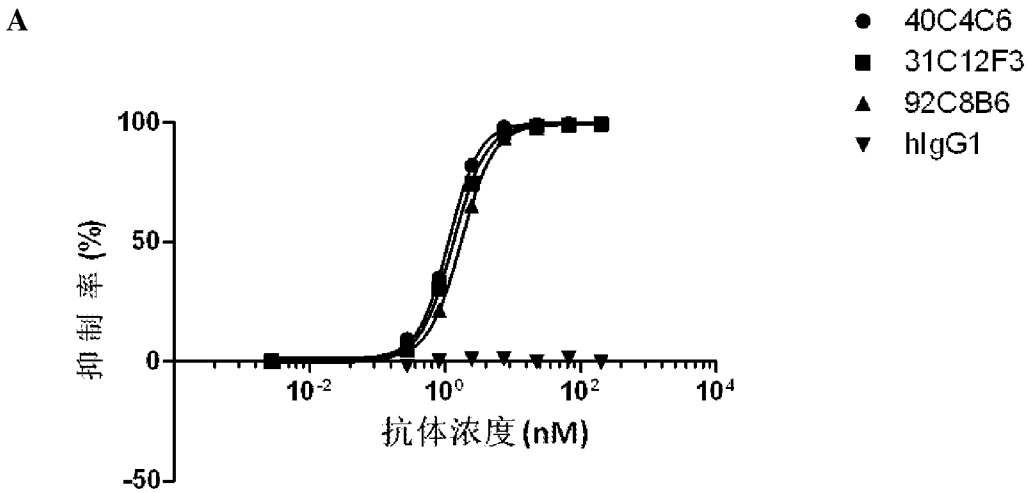

A
100
50
0
-50
抑制率 (%)
10^{-2}
10^{0}
10^{2}
10^{4}
抗体浓度 (nM)
40C4C6
31C12F3
92C8B6
hIgG1

图 11

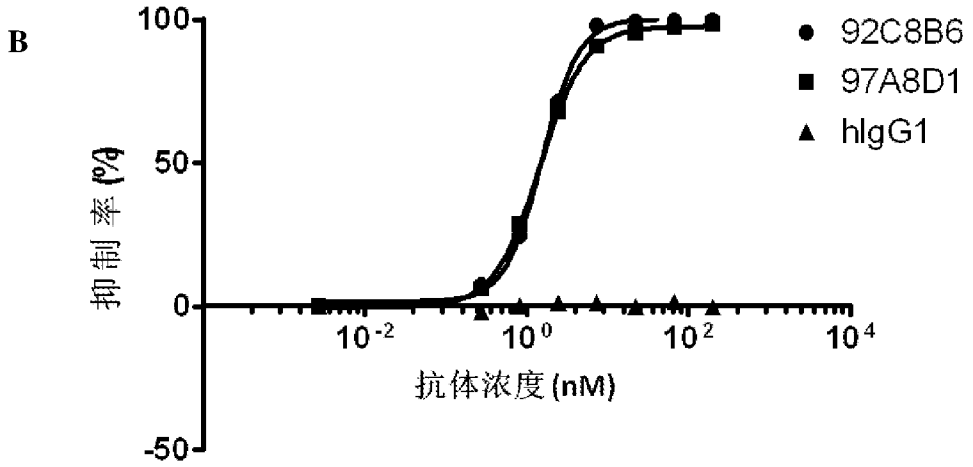
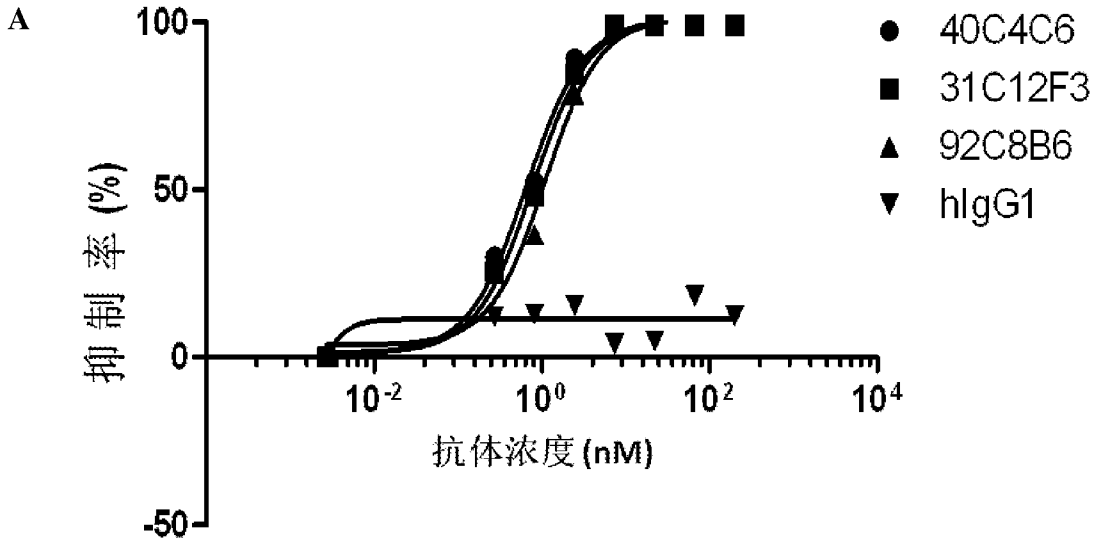

B
100
50
0
-50
抑制率(%)
10-2
100
102
104
抗体浓度(nM)
92C8B6
97A8D1
hIgG1

图 11（续）


A
100
50
0
-50
抑制率(%)
10-2
100
102
104
抗体浓度(nM)
40C4C6
31C12F3
92C8B6
hIgG1

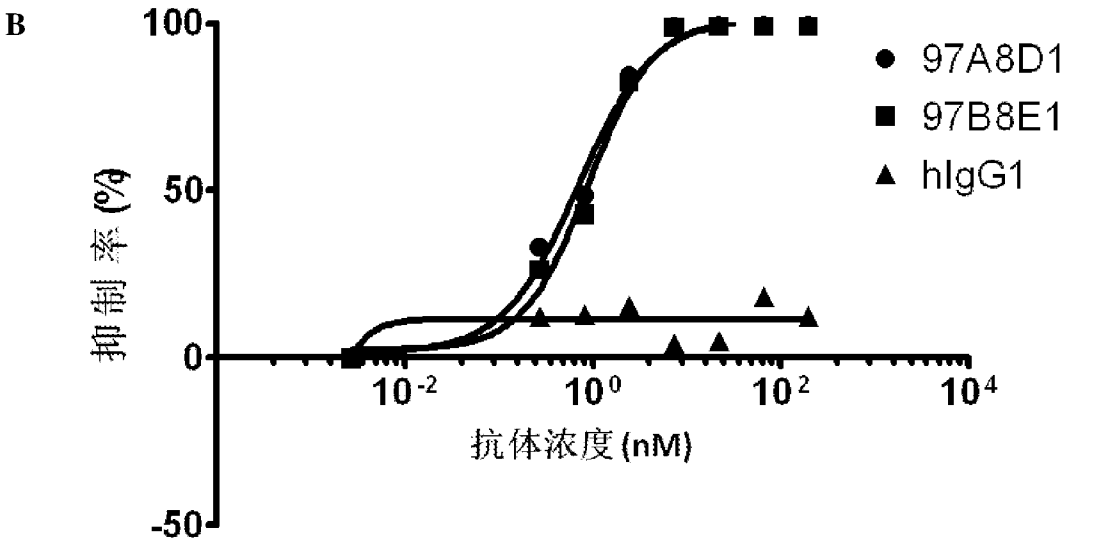

B
100
50
0
-50
抑制率(%)
10-2
100
102
104
抗体浓度(nM)
97A8D1
97B8E1
hIgG1

图 12

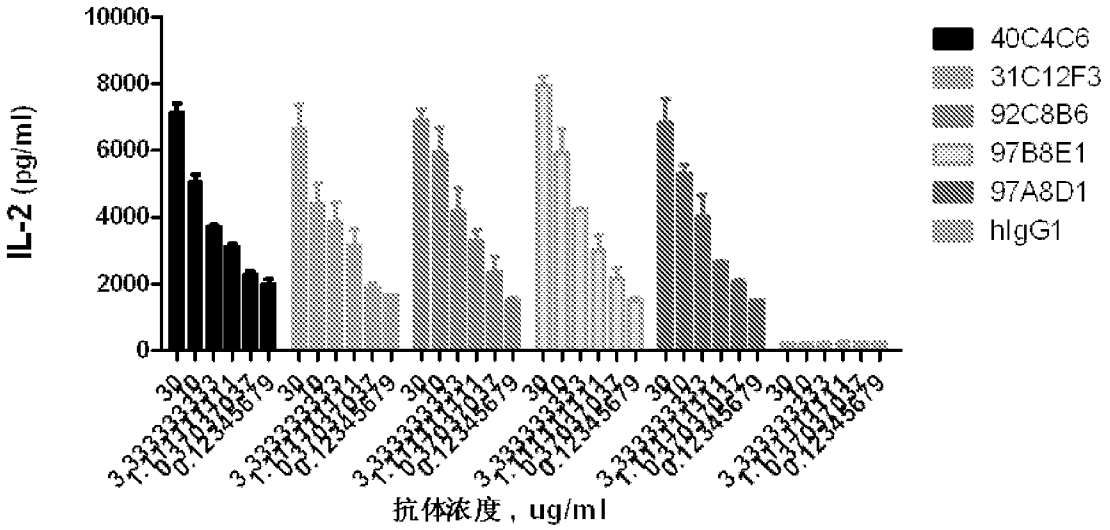
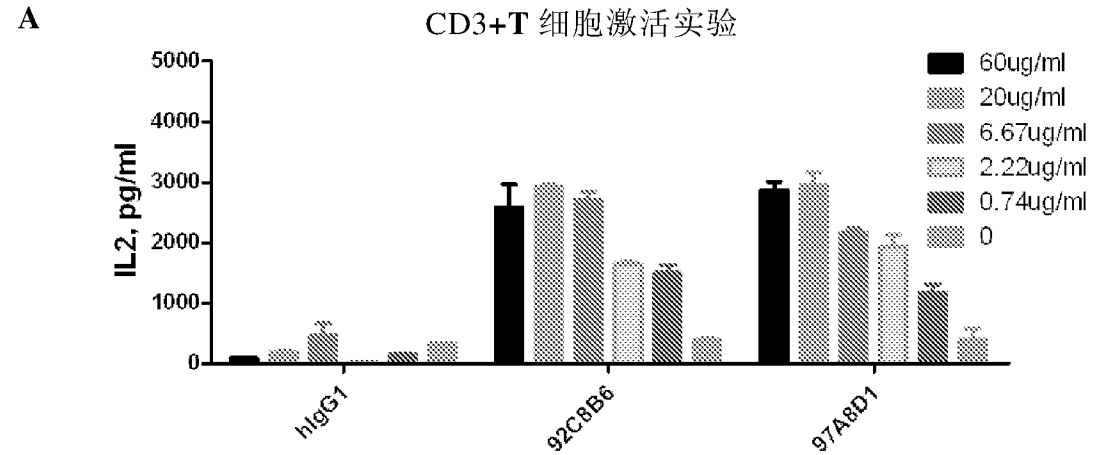

IL-2 (pg/ml)
10000
8000
6000
4000
2000
0
40C4C6
31C12F3
92C8B6
97B8E1
97A8D1
hIgG1
抗体浓度，ug/ml

图 13


A
CD3+T 细胞激活实验
IL2, pg/ml
5000
4000
3000
2000
1000
0
60ug/ml
20ug/ml
6.67ug/ml
2.22ug/ml
0.74ug/ml
0
hIgG1
92C8B6
97A8D1

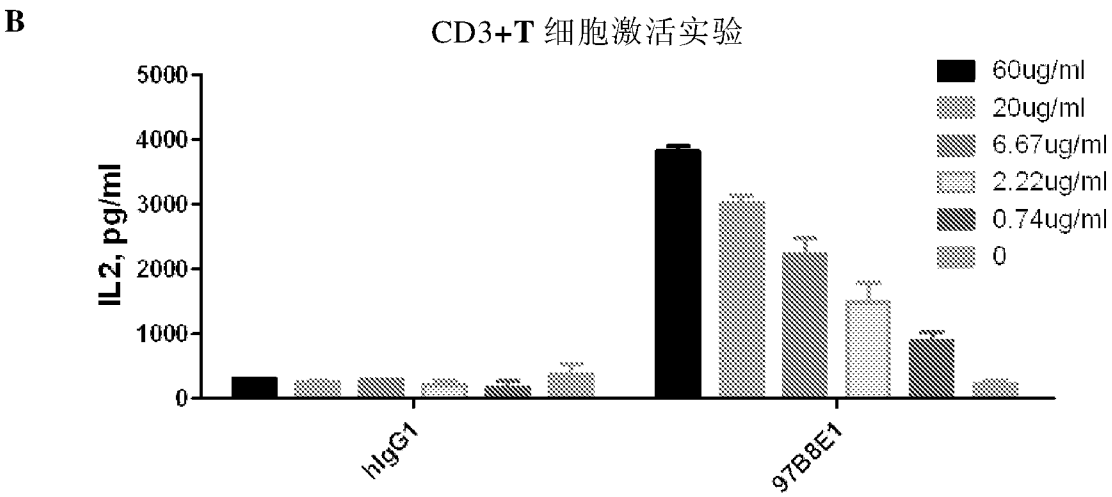
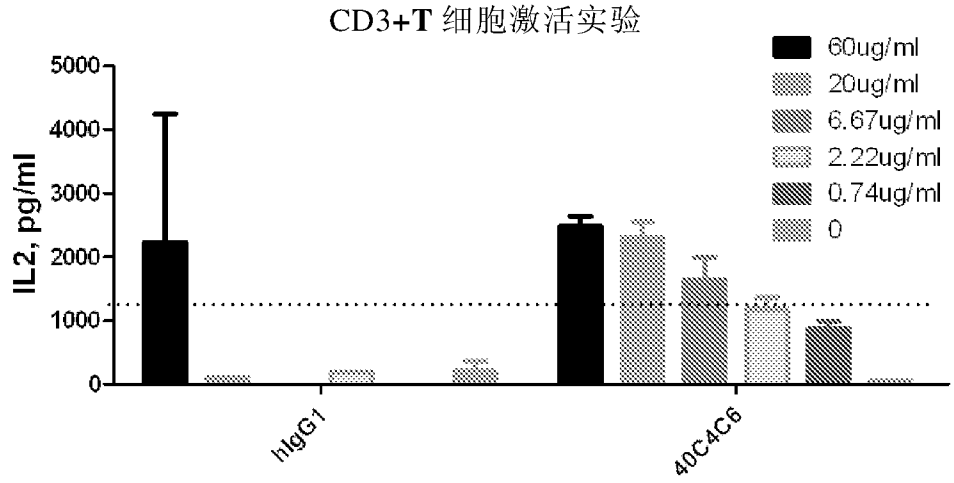

B
CD3+T 细胞激活实验
IL2, pg/ml
5000
4000
3000
2000
1000
0
60ug/ml
20ug/ml
6.67ug/ml
2.22ug/ml
0.74ug/ml
0
hIgG1
97B8E1

图 14

C



D

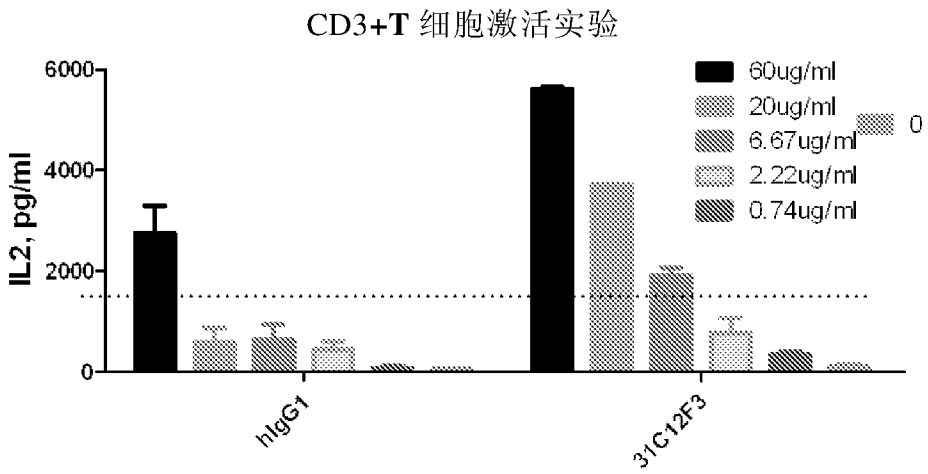
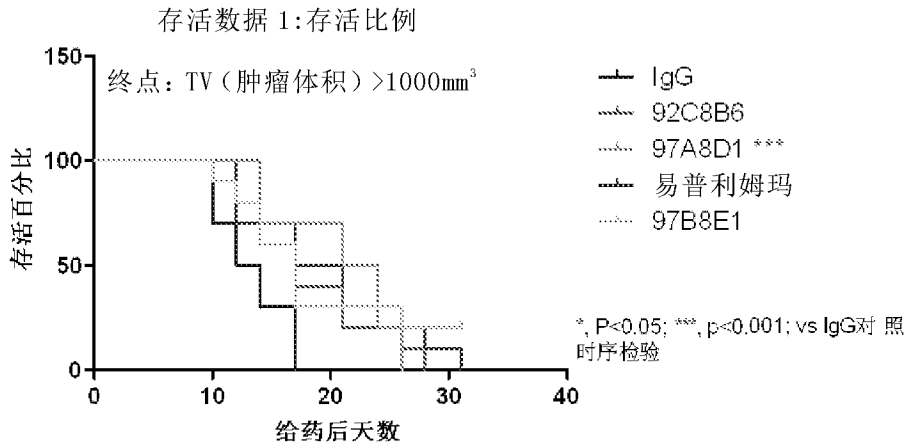


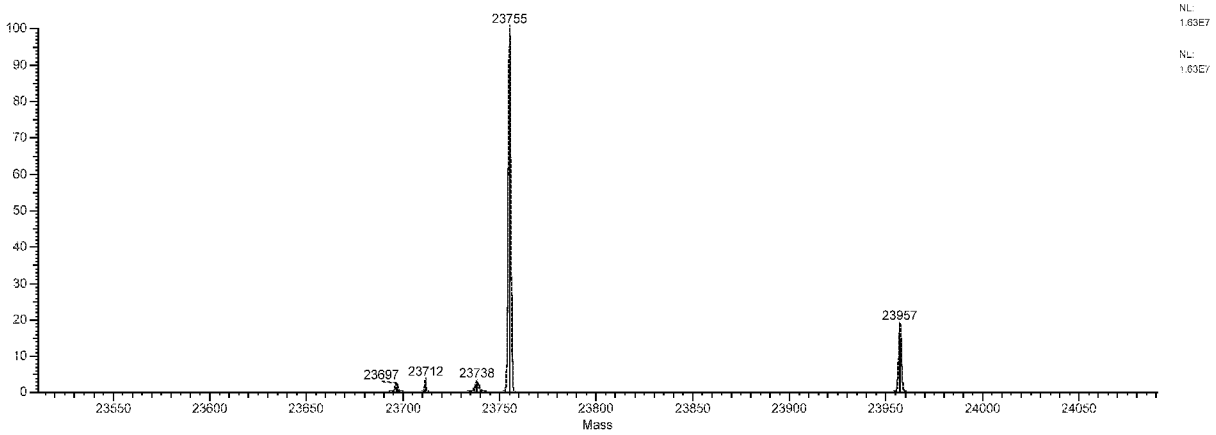
图 14（续）



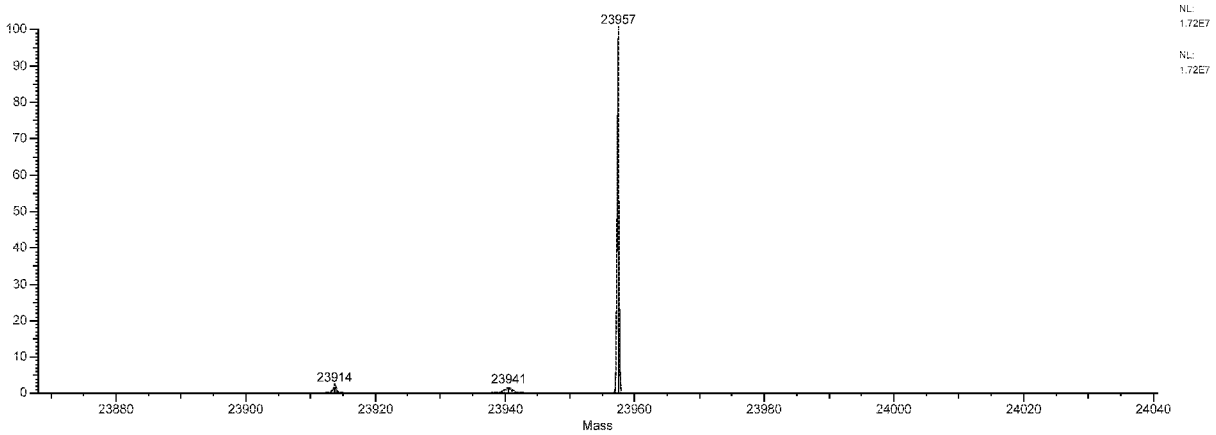
	IgG	易普利姆玛	92C8B6	97A8D1	97B8E1
中位生存期	13	19	17	22.5	17

图 15

A 去岩藻糖基化抗体去糖后 Fc 分子量



B 去岩藻糖基化抗体不去糖 Fc 分子量



C 岩藻糖基化抗体去糖后 Fc 分子量

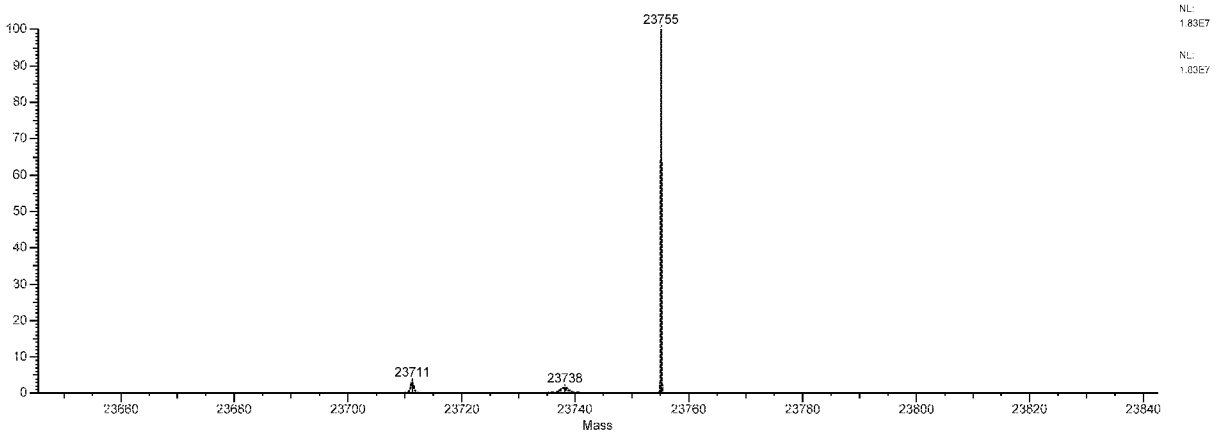


图 16

D 岩藻糖基化抗体不去糖 Fc 分子量

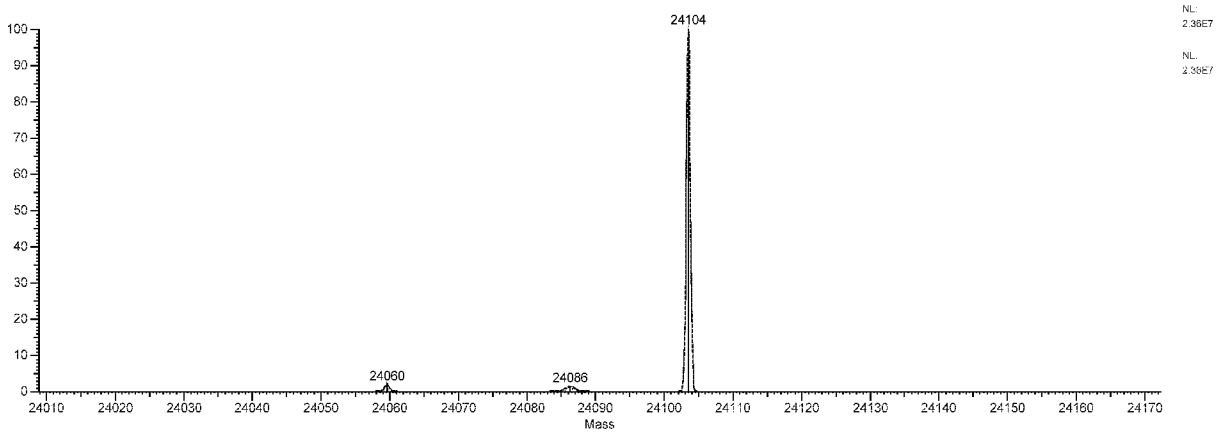


图 16（续）

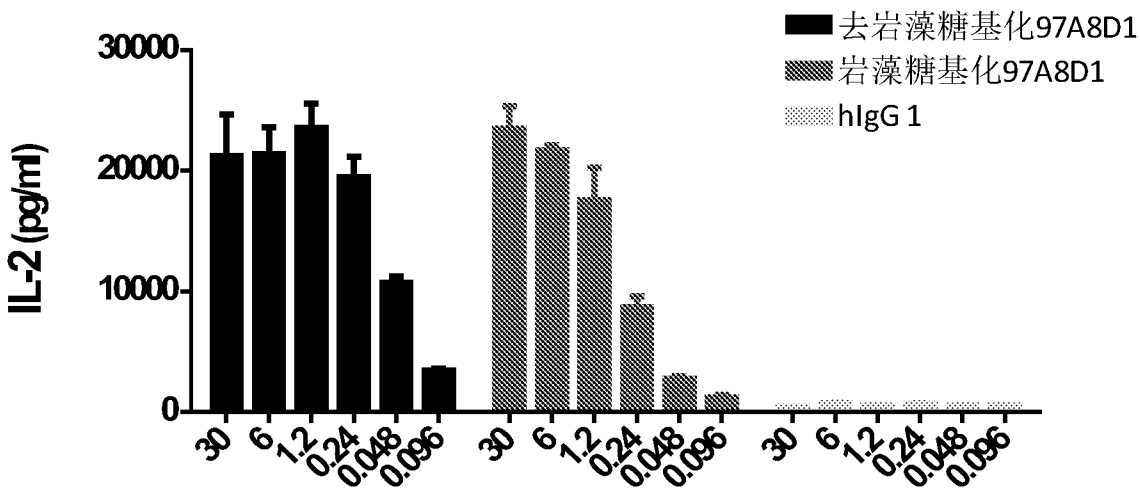


图 17

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/078032

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; A61K 39/44(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CCNABS, CPRS, DWPI, SIPOABS, CNKI, NCBI, ISI Web of Science, GenBank, 中国专利生物序列检索系统, China Patents Biological Sequence Search System: 抗体, 单抗, 人, 淋巴, 抗原, 4, antibody, monoclonal, mAb, human, CTLA, cytotoxic, T, lymphocyte, associated, antigen, 本申请的SEQ ID NOs: 1-50

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 107406504 A (CAI, ZELING) 28 November 2017 (2017-11-28) entire document, in particular to abstract, claims, and embodiments	1-17

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
22 April 2019	**08 May 2019**

Name and mailing address of the ISA/CN	Authorized officer
State Intellectual Property Office of the P. R. China (ISA/CN) **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088** **China**	
Facsimile No. **(86-10)62019451**	Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/078032

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
   a. ☑ forming part of the international application as filed:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2019/078032

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 107406504 A	28 November 2017	EP 3383904 A1	10 October 2018
		WO 2017084078 A1	26 May 2017

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2019/078032

A. 主题的分类

C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; A61K 39/44(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K; C12N; A61K; A61P

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称，和使用的检索词（如使用））

CNABS、CPRS、DWPI、SIPOABS、CNKI、NCBI、ISI Web of Science、GenBank、中国专利生物序列检索系统:抗体，单抗，人，淋巴，抗原，4，antibody， monoclonal，mAb，human，CTLA，cytotoxic，T，lymphocyte，associated，antigen，本申请的SEQ ID NOs：1-50

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
X	CN 107406504 A (蔡则玲) 2017年 11月 28日 (2017-11-28) 全文，尤其是摘要，权利要求书和实施例	1-17

☐ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件，或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件（如具体说明的）

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布，与申请不相抵触，但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件，单独考虑该文件，认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件，当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时，要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2019年 4月 22日	2019年 5月 8日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 吴永庆 电话号码 +86-10-62089161

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2019/078032

第I栏　核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列,国际检索是基于下列序列表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：
   - ☑ 附件C/ST.25文本文件形式
   - ☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三.1(a)仅为国际检索目的以附件C/ST.25文本文件形式与国际申请同时提交的：

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的：
   - ☐ 附件C/ST.25文本文件形式（细则13之三.1(a)）
   - ☐ 纸件或图形文件形式（细则13之三.1(b)和行政规程第713段）

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

3. 补充意见：

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2019/078032

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
CN 107406504 A	2017年 11月 28日	EP 3383904 A1	2018年 10月 10日
		WO 2017084078 A1	2017年 5月 26日