



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107849144 B

(45) 授权公告日 2021.09.17

(21) 申请号 201680042887.8

(22) 申请日 2016.05.27

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 107849144 A

(43) 申请公布日 2018.03.27

(30) 优先权数据

62/168,391 2015.05.29 US

62/182,363 2015.06.19 US

62/190,653 2015.07.09 US

62/257,202 2015.11.18 US

62/280,263 2016.01.19 US

62/292,500 2016.02.08 US

62/294,558 2016.02.12 US

62/323,226 2016.04.15 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2018.01.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/034508 2016.05.27

(87) PCT国际申请的公布数据

W02016/196237 EN 2016.12.08

(73) 专利权人 艾吉纳斯公司

地址 美国马萨诸塞州

专利权人 路德维格癌症研究有限公司

纪念斯隆凯特琳癌症中心

(72) 发明人 M·V·迪杰克 C·A·蒙特

G·利特 D·沙尔

J·D·沃尔乔克 T·默霍布

D·A·萨维斯基 M·A·芬戴斯

N·S·威尔森

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

11256

代理人 陈文平 徐志明

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 103547595 A, 2014.01.29

WO 2012120125 A1, 2012.09.13

审查员 袁一方

权利要求书2页 说明书70页

序列表88页 附图51页

(54) 发明名称

抗-CTLA-4抗体及其使用方法

(57) 摘要

本公开提供了特异性地结合人CTLA-4和拮抗CTLA-4功能的抗体。还公开了包含这些抗体的药物组合物、编码这些抗体的核酸、用于产生这些抗体的表达载体和宿主细胞及使用这些抗体治疗受试者的方法。

1. 一种特异性地结合人CTLA-4蛋白的分离的抗体,其包含含有互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3的重链可变区和含有互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3的轻链可变区,其中:

(a) CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:1、2、3、4、5和6中所示的氨基酸序列组成;

(b) CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:1、2、3、29、32和36中所示的氨基酸序列组成;

(c) CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:1、2、3、29、33和37中所示的氨基酸序列组成;

(d) CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:1、2、3、30、31和6中所示的氨基酸序列组成;

(e) CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:27、2、28、4、5和6中所示的氨基酸序列组成;

(f) CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:27、2、28、29、32和36中所示的氨基酸序列组成;

(g) CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:27、2、28、29、33和37中所示的氨基酸序列组成;或

(h) CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:27、2、28、29、35和37中所示的氨基酸序列组成。

2. 如权利要求1所述的分离的抗体,其中CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:1、2、3、4、5和6中所示的氨基酸序列组成。

3. 如权利要求1所述的分离的抗体,其中所述重链可变区的氨基酸序列和所述轻链可变区的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:7和8;7和44;7和45;39和43;40和8;40和44;41和8;41和44;41和45;或41和47中所示的氨基酸序列组成。

4. 如权利要求1所述的分离的抗体,其中所述重链可变区的氨基酸序列和所述轻链可变区的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:7和8中所示的氨基酸序列组成。

5. 如权利要求1所述的分离的抗体,其中所述抗体包含人IgG₁的重链恒定区。

6. 如权利要求1所述的分离的抗体,其中所述抗体包含重链,且其中所述重链的氨基酸序列由SEQ ID NO:12、76、93或97的氨基酸序列组成。

7. 如权利要求1所述的分离的抗体,其中所述抗体包含重链和轻链,其中所述重链的氨基酸序列由SEQ ID NO:12或93的氨基酸序列组成和其中所述轻链的氨基酸序列由SEQ ID NO:13的氨基酸序列组成。

8. 如权利要求1-7任一项所述的分离的抗体,其中:

(a) 所述抗体是人抗体;

(b) 所述抗体对于CTLA-4是拮抗性的;和/或

(c) 所述抗体抑制人CTLA-4蛋白与人CD80或与人CD86的结合。

9. 如权利要求1-7任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体是双特异性的。

10. 一种药物组合物,包含权利要求1-7任一项所述的抗体及药学上可接受的载体或赋形剂。

11. 一种分离的多核苷酸,其编码权利要求1-7任一项所述的抗体的重链可变区和/或

轻链可变区,或者重链和/或轻链。

12. 一种包含权利要求11所述的多核苷酸的重组宿主细胞。

13. 一种产生结合人CTLA-4的抗体的方法,该方法包括培养权利要求12所述的宿主细胞以使得所述多核苷酸被表达和所述抗体被产生。

14. 一种重组宿主细胞,其包含:

(a) 编码权利要求1-7任一项所述的抗体的重链可变区的分离的多核苷酸,和编码权利要求1-7任一项所述的抗体的轻链可变区的分离的多核苷酸,或

(b) 编码权利要求1-7任一项所述的抗体的重链的分离的多核苷酸,和编码权利要求1-7任一项所述的抗体的轻链的分离的多核苷酸。

15. 一种产生结合人CTLA-4的抗体的方法,该方法包括培养权利要求14所述的宿主细胞以使得所述多核苷酸被表达和所述抗体被产生。

16. 权利要求1-7任一项所述的分离的抗体在制备用于以下的药物中的用途:

(a) 提高受试者中响应于抗原的T-细胞激活;

(b) 治疗癌症;和/或

(c) 治疗传染性疾病。

17. 权利要求10所述的药物组合物在制备用于以下的药物中的用途:

(a) 提高受试者中响应于抗原的T-细胞激活;

(b) 治疗癌症;和/或

(c) 治疗传染性疾病。

抗-CTLA-4抗体及其使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2015年5月29日提交的美国临时申请No:62/168,391、2015年6月19日提交的美国临时申请No:62/182,363、2015年7月09日提交的美国临时申请No:62/190,653、2015年11月18日提交的美国临时申请No:62/257,202、2016年1月19日提交的美国临时申请No:62/280,263、2016年2月08日提交的美国临时申请No:62/292,500、2016年2月12日提交的美国临时申请No:62/294,558和2016年4月15日提交的美国临时申请No:62/323,226的利益,其各自通过引用全文并入本文中。

1. 技术领域

[0003] 本公开涉及特异性地结合人CTLA-4的抗体和使用该抗体的方法。

2. 背景技术

[0004] T淋巴细胞在对抗原的适应性免疫应答中起关键作用。原始T细胞的完全激活需要至少两种信号(Bretscher 1999, Proc Natl Acad Sci USA 96:185-90)。第一种抗原特异性的信号是由T细胞受体(TCR)与抗原呈递细胞(APC)上的MHC/肽复合体的相互作用提供的。第二种共刺激性信号是由T细胞上的受体与抗原呈递细胞(APC)上的其配体之间的相互作用提供的。TCR/MHC与共刺激相互作用二者的耦合经由多种细胞内途径(包括钙-钙调磷酸酶和RAS丝裂原活化蛋白激酶)导致T细胞激活,和多种效应化合物(包括细胞因子诸如IL-2)的转录因子的随后激活。这些事件导致T细胞增殖、CD4⁺辅助T细胞(T^H)池的产生和激活的CD8⁺细胞毒性T细胞的扩增。共刺激不仅对于完全T细胞激活是关键的,其在TCR/MHC耦合期间的不存在也导致无反应性和/或细胞凋亡。

[0005] 虽然多种正向和负向共刺激途径参与T细胞调节,但最关键的是在T细胞上的CD28与APC上的B7-1(CD80)和B7-2(CD86)之间。CD28促进T细胞分化为TH1表型细胞并增强B细胞的抗体产生和T细胞的激活。APC诸如树突细胞(DC)和B细胞上表达的B7-1和B7-2具有重叠但不同的功能。B7-2是组成型地表达的,且与TCR/MHC耦合(信号1)一致地在APC上快速上调。B7-1表达在静止细胞上非常低,但通常在延长的T细胞刺激后被诱导。这些差异暗示,尽管B7-2在T细胞激活的启动时可能是重要的,但是B7-1可能在保持免疫应答方面起更大作用。

[0006] 在T细胞激活后,负向调节受体细胞毒性T淋巴细胞抗原4(CTLA4)在T细胞上被上调(Alegre等,2001, Nat Rev Immunol 1:220-8)。CTLA4在结构上与CD28同源,但更紧密地结合B7-1和B7-2配体二者。CTLA4以几种方式抑制免疫反应:它与CD28竞争B7配体并因此阻断共刺激;它负向地传递信号以抑制T细胞激活;且它可以通过转胞吞作用(trans-endocytosis)从相对的细胞捕获CD80和CD86,从而导致受损的经由CD28的共刺激(Krummel和Allison,1995, J Exp Med 182:459-465;Walunas等,1994, Immunity 1:405-413;Qureshi等,2011, Science 332:600-603)。

[0007] 由于B7共刺激途径在促进和保持免疫反应方面的关键作用,设计为拮抗这一途径

的治疗剂对于治疗自身免疫性疾病和病症是有希望的。

3. 发明内容

[0008] 本公开提供了特异性地结合人CTLA-4和拮抗CTLA-4功能(例如,CTLA-4-介导的免疫抑制)的抗体。还提供了包含这些抗体的药物组合物、编码这些抗体的核酸、用于产生这些抗体的表达载体和宿主细胞及使用这些抗体治疗受试者的方法。本文公开的抗体特别可用于提高响应于抗原(例如,肿瘤抗原)的T-细胞激活和/或降低Treg-介导的免疫抑制,且因此用于治疗受试者中的癌症。

[0009] 因此,在一个方面,本公开提供了分离的抗体,其包含含有互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3的重链可变区和含有互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3的轻链可变区,其中:

[0010] (a) CDRH1包含SYX₁MX₂(SEQ ID NO:22)的氨基酸序列,其中X₁是S或A;和X₂是N或S;

[0011] (b) CDRH2包含SISSSSSYIYYADSVKG(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列;

[0012] (c) CDRH3包含VGLMGPFXI(SEQ ID NO:23)的氨基酸序列,其中X是D或N;

[0013] (d) CDRL1包含RASQSVX₁X₂YLX₃(SEQ ID NO:24)的氨基酸序列,其中X₁是S或G;X₂是R、S或T;和X₃是G或A;

[0014] (e) CDRL2包含X₁X₂SX₃RAT(SEQ ID NO:25)的氨基酸序列,其中X₁是G或A;X₂是A或T;和X₃是T、S、R或N;和

[0015] (f) CDRL3包含QQYGX₁SPX₂T(SEQ ID NO:26)的氨基酸序列,其中X₁是S或T;和X₂是W或F。

[0016] 在某些实施方式中,CDRH1包含选自SEQ ID NO:1和27的氨基酸序列。在某些实施方式中,CDRH3包含选自SEQ ID NO:3和28的氨基酸序列。在某些实施方式中,CDRL1包含选自SEQ ID NO:4、29和30的氨基酸序列。在某些实施方式中,CDRL2包含选自SEQ ID NO:5和31-35的氨基酸序列。在某些实施方式中,CDRL3包含选自SEQ ID NO:6、36和37的氨基酸序列。在某些实施方式中,CDRH1、CDRH2和CDRH3分别包含SEQ ID NO:1、2和3;27、2和3;或27、2和28中所示的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列。在某些实施方式中,CDRL1、CDRL2和CDRL3分别包含SEQ ID NO:4、5和6;29、32和36;29、33和37;30、31和6;29、34和6;或29、35和37中所示的CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。在某些实施方式中,CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3分别包含SEQ ID NO:1、2、3、4、5和6中所示的氨基酸序列。

[0017] 在另一个方面,本公开提供了特异性地结合人CTLA-4蛋白的分离的抗体,其包含含有互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3的重链可变区及含有互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3的轻链可变区,其中:

[0018] (a) CDRH1包含SYX₁MX₂(SEQ ID NO:22)的氨基酸序列,其中X₁是S或A;和X₂是N或S;

[0019] (b) CDRH2包含SISSSSSYIYYADSVKG(SEQ ID NO:2)的氨基酸序列;

[0020] (c) CDRH3包含VGLMGPFXI(SEQ ID NO:23)的氨基酸序列,其中X是D或N;

[0021] (d) CDRL1包含RASQSVX₁X₂YLX₃(SEQ ID NO:24)的氨基酸序列,其中X₁是S或G;X₂是R、S或T;和X₃是G或A;

[0022] (e) CDRL2包含X₁X₂SX₃RAT(SEQ ID NO:25)的氨基酸序列,其中X₁是G或A;X₂是A或T;和X₃是T、S、R或N;和

[0023] (f) CDRL3包含QQYGX₁SPX₂T(SEQ ID NO:26)的氨基酸序列,其中X₁是S或T;和X₂是W

或F。

[0024] 在某些实施方式中,CDRH1包含选自SEQ ID NO:1和27的氨基酸序列。在某些实施方式中,CDRH3包含选自SEQ ID NO:3和28的氨基酸序列。在某些实施方式中,CDRL1包含选自SEQ ID NO:4、29和30的氨基酸序列。在某些实施方式中,CDRL2包含选自SEQ ID NO:5和31-35的氨基酸序列。在某些实施方式中,CDRL3包含选自SEQ ID NO:6、36和37的氨基酸序列。在某些实施方式中,CDRH1、CDRH2和CDRH3分别包含SEQ ID NO:1、2和3;27、2和3;或27、2和28中所示的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列。在某些实施方式中,CDRL1、CDRL2和CDRL3分别包含SEQ ID NO:4、5和6;29、32和36;29、33和37;30、31和6;29、34和6;或29、35和37中所示的CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

[0025] 在另一个方面,本公开提供了特异性地结合人CTLA-4蛋白的分离的抗体,其包含含有互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3的重链可变区及含有互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3的轻链可变区,其中CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3分别包含SEQ ID NO:1、2、3、4、5和6中所示的氨基酸序列。

[0026] 在某些实施方式中,所述抗体包含含有SEQ ID NO:72的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含含有与选自SEQ ID NO:7和38-42的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%或100%同一的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施方式中,重链可变区包含选自SEQ ID NO:7和38-42的氨基酸序列。在某些实施方式中,重链可变区包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:93的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:94的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:76的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,抗体包含含有SEQ ID NO:97的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,抗体包含具有源自人IGHV3-21种系序列(例如,IGHV3-21*01,例如,具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列)的氨基酸序列的重链可变区。

[0027] 在某些实施方式中,所述抗体包含含有SEQ ID NO:73的氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含含有与选自SEQ ID NO:8和43-47的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%或100%同一的氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含含有选自SEQ ID NO:8和43-47的氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含含有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链。在某些实施方式中,所述抗体包含含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的轻链。在某些实施方式中,所述抗体包含具有源自人IGKV3-20种系序列(例如,IGKV3-20*01,例如,具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列)或人IGKV3-11种系序列(例如,IGKV3-11*01,例如,具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列)的氨基酸序列的轻链可变区。

[0028] 在另一个方面,本公开提供了特异性地结合人CTLA-4蛋白的分离的抗体,其包含含有选自SEQ ID NO:7和38-42的氨基酸序列的重链可变区。

[0029] 在另一个方面,本公开提供了特异性地结合人CTLA-4蛋白的分离的抗体,其包含含有选自SEQ ID NO:8和43-47的氨基酸序列的轻链可变区。

[0030] 在另一个方面,本公开提供了特异性地结合人CTLA-4蛋白的分离的抗体,其包含

重链可变区和轻链可变区,其中重链可变区和轻链可变区分别包含SEQ ID NO:7和8;7和44;7和45;38和8;38和45;39和43;39和45;39和46;39和47;40和43;40和8;40和44;40和45;41和8;41和44;41和45;41和47;42和43;或42和45中所示的氨基酸序列。在某些实施方式中,所述抗体包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区;和含有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链;和含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链。在某些实施方式中,所述抗体包含含有SEQ ID NO:93的氨基酸序列的重链;和含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链。在某些实施方式中,所述抗体包含含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的重链;和含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链。在某些实施方式中,所述抗体包含含有SEQ ID NO:94的氨基酸序列的重链;和含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链。在某些实施方式中,所述抗体包含含有SEQ ID NO:76的氨基酸序列的重链;和含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链。在某些实施方式中,所述抗体包含含有SEQ ID NO:97的氨基酸序列的重链;和含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链。

[0031] 在另一个方面,本公开提供了特异性地结合人CTLA-4蛋白的分离的抗体,其包含具有源自人IGHV3-21种系序列的氨基酸序列的重链可变区;和具有源自人IGKV3-20种系序列或人IGKV3-11种系序列的氨基酸序列的轻链可变区。

[0032] 在另一个方面,本公开提供了与包含分别SEQ ID NO:7和8中所示的重链和轻链可变区氨基酸序列的抗体交叉竞争与人CTLA-4蛋白的结合的分离的抗体。

[0033] 在另一个方面,本公开提供了与包含分别SEQ ID NO:7和8中所示的重链和轻链可变区氨基酸序列的抗体结合人CTLA-4蛋白上的相同表位的分离的抗体。

[0034] 在另一个方面,本公开提供了结合人CTLA-4的表位的抗体。在某些实施方式中,抗体结合人CTLA-4的包含SEQ ID NO:77的残基140-141、基本上由其组成或由其组成的表位。在某些实施方式中,抗体结合人CTLA-4的由SEQ ID NO:77的残基140-141组成的表位。在某些实施方式中,抗体结合选自SEQ ID NO:77的残基140和141的人CTLA-4的至少一个残基。在某些实施方式中,抗体结合人CTLA-4的包含SEQ ID NO:77的残基140-143、基本上由其组成或由其组成的表位。在某些实施方式中,抗体结合人CTLA-4的由SEQ ID NO:77的残基140-143组成的表位。在某些实施方式中,抗体结合人CTLA-4的包含SEQ ID NO:77的残基135-143、基本上由其组成或由其组成的表位。在某些实施方式中,抗体结合人CTLA-4的由SEQ ID NO:77的残基135-143组成的表位。在某些实施方式中,抗体结合人CTLA-4的包含SEQ ID NO:77的残基140-149、基本上由其组成或由其组成的表位。在某些实施方式中,抗体结合人CTLA-4的由SEQ ID NO:77的残基140-149组成的表位。在某些实施方式中,抗体结合人CTLA-4的包含SEQ ID NO:77的残基135-149、基本上由其组成或由其组成的表位。在某些实施方式中,抗体结合人CTLA-4的由SEQ ID NO:77的残基135-149组成的表位。在某些实施方式中,抗体结合人CTLA-4的包含SEQ ID NO:77的残基80-82、基本上由其组成或由其组成的表位。在某些实施方式中,抗体结合人CTLA-4的由SEQ ID NO:77的残基80-82组成的表位。

[0035] 在另一个方面,本公开提供了一种抗体,其中在抗体与人CTLA-4蛋白结合接着加入氘时,在包含SEQ ID NO:77的残基140-141的区域中人CTLA-4蛋白中的氢与氘的交换相对于在不存在该抗体的情况下相同区域中人CTLA-4蛋白中的氢与氘的交换显著减少,如通

过氢/氘交换测定的。在某些实施方式中,所述人CTLA-4的区域包含SEQ ID NO:77的残基140-143。在某些实施方式中,人CTLA-4的区域包含SEQ ID NO:77的残基135-143。在某些实施方式中,人CTLA-4的区域包含SEQ ID NO:77的残基140-149。在某些实施方式中,人CTLA-4的区域包含SEQ ID NO:77的残基135-149。在某些实施方式中,在抗体与人CTLA-4蛋白结合接着加入氘时,在包含SEQ ID NO:77的残基80-82的区域中人CTLA-4蛋白中的氢与氘的交换相对于在不存在该抗体的情况下相同区域中人CTLA-4蛋白中的氢与氘的交换显著减少,如通过氢/氘交换测定的。

[0036] 在某些实施方式中,所述抗体包含选自人IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂的重链恒定区。在某些实施方式中,重链恒定区是IgG₁。在某些实施方式中,重链恒定区是IgG₂。在某些实施方式中,所述抗体包含选自人IgG κ 和IgG λ 的轻链恒定区。

[0037] 在某些实施方式中,所述抗体包含作为野生型人IgG重链恒定区的变体的人IgG重链恒定区,其中所述变体人IgG重链恒定区以比野生型人IgG重链恒定区结合选自Fc γ RIIB和Fc γ RIIA的人Fc γ 受体更高的亲和力结合所述人Fc γ 受体。在某些实施方式中,所述抗体包含作为野生型人IgG重链恒定区的变体的人IgG重链恒定区,其中所述变体人IgG重链恒定区以比野生型人IgG重链恒定区结合人Fc γ RIIB更高的亲和力结合人Fc γ RIIB。在某些实施方式中,变体人IgG重链恒定区是变体人IgG₁、变体人IgG₂或变体人IgG₄重链恒定区。在某些实施方式中,变体人IgG重链恒定区包含根据EU编号系统的一个或多个以下氨基酸突变:G236D、P238D、S239D、S267E、L328F和L328E。在某些实施方式中,变体人IgG重链恒定区包含选自以下的一组氨基酸突变:根据EU编号系统,S267E和L328F;P238D和L328E;P238D和选自E233D、G237D、H268D、P271G和A330R的一个或多个置换;P238D、E233D、G237D、H268D、P271G和A330R;G236D和S267E;S239D和S267E;V262E、S267E和L328F;及V264E、S267E和L328F。在某些实施方式中,变体人IgG重链恒定区还包含降低IgG对人Fc γ RIIIA、人Fc γ RIIA或人Fc γ RI的亲和力一个或多个氨基酸突变。在某些实施方式中,Fc γ RIIB在选自巨噬细胞、单核细胞、B细胞、树突状细胞、内皮细胞和活化的T细胞的细胞上表达。

[0038] 在某些实施方式中,所述抗体包含作为野生型人IgG重链恒定区的变体的人IgG重链恒定区,其中变体人IgG重链恒定区以比野生型人IgG重链恒定区结合人Fc γ 受体更高的亲和力结合人Fc γ 受体。在某些实施方式中,人Fc γ 受体包含免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM)。在某些实施方式中,人Fc γ 受体选自Fc γ RIIIA、Fc γ RIIA和Fc γ RI。在某些实施方式中,人Fc γ 受体是Fc γ RIIIA。在某些实施方式中,变体人IgG重链恒定区包含根据EU编号系统的一个或多个以下氨基酸突变:G236A、S239D、F243L、T256A、K290A、R292P、S298A、Y300L、V305I、A330L、I332E、E333A、K334A、A339T和P396L。在某些实施方式中,变体人IgG重链恒定区包含选自以下的一组氨基酸突变:根据EU编号系统,S239D;T256A;K290A;S298A;I332E;E333A;K334A;A339T;S239D和I332E;S239D、A330L和I332E;S298A、E333A和K334A;G236A、S239D和I332E;及F243L、R292P、Y300L、V305I和P396L。在某些实施方式中,变体人IgG重链恒定区包含根据EU编号系统的以下氨基酸突变:S239D、A330L和I332E。在某些实施方式中,变体人IgG重链恒定区包含根据EU编号系统的以下氨基酸突变:S239D和I332E。在某些实施方式中,变体人IgG重链恒定区是包含根据EU编号系统的以下氨基酸突变的变体人IgG₁重链恒定区:S239D和I332E。在某些实施方式中,所述抗体包含去岩藻糖基化的Fc区。在某些实施方式中,抗体配制用于肿瘤内递送。在某些实施方式中,抗体或药物组合物

肿瘤内施用。在某些实施方式中,抗体配制用于递送到肿瘤引流淋巴结中。在某些实施方式中,抗体或药物组合物递送到肿瘤引流淋巴结。在某些实施方式中,抗体配制用于皮下递送。在某些实施方式中,抗体或药物组合物皮下递送。

[0039] 在某些实施方式中,人Fc γ 受体是Fc γ RIIc。在某些实施方式中,人Fc γ 受体在选自巨噬细胞、单核细胞、B细胞和树突状细胞的细胞上表达。在某些实施方式中,抗体是人抗体。在某些实施方式中,抗体对于CTLA-4是拮抗性的。在某些实施方式中,抗体抑制人CTLA-4蛋白与人CD80或与人CD86的结合。

[0040] 在某些实施方式中,抗体与细胞毒性剂、细胞生长抑制剂、毒素、放射性核素或可检测标记偶联。

[0041] 在一个实施方式中,本发明涉及用作药物的本发明的抗体。

[0042] 在一个实施方式中,本发明涉及本发明的抗体在制备用于免疫治疗的药物组合物或药物中的用途。优选地,免疫治疗是用于提高受试者中响应于抗原的T-细胞激活,任选地用于治疗癌症或者用于治疗或预防传染性疾病。

[0043] 在一个实施方式中,本发明涉及用作诊断剂的本发明的抗体。

[0044] 在一个实施方式中,本发明涉及本发明的抗体用于体外检测生物样品中的人CTLA-4的用途。

[0045] 在另一个方面,本公开提供了包含本文公开的抗-CTLA-4抗体及药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物。

[0046] 在另一个方面,本公开提供了编码本文公开的抗体的重链和/或轻链的分离的多核苷酸。在另一个方面,本公开提供了包含该多核苷酸的载体。在另一个方面,本公开提供了包含该多核苷酸或载体的重组宿主细胞。在另一个方面,本公开提供了产生结合人CTLA-4的抗体的方法,该方法包括培养宿主细胞以使得所述多核苷酸被表达和所述抗体被产生。

[0047] 在另一个方面,本公开提供了提高受试者中响应于抗原的T-细胞激活的方法,该方法包括向受试者施用有效量的本文公开的抗-CTLA-4抗体或药物组合物。在另一个方面,本公开提供了治疗受试者的癌症的方法,该方法包括向受试者施用有效量的本文公开的抗-CTLA-4抗体或药物组合物。在某些实施方式中,本文公开的抗-CTLA-4抗体或药物组合物皮下或静脉内施用。在某些实施方式中,本文公开的抗-CTLA-4抗体或药物组合物以0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、6mg/kg或10mg/kg任选地按照每三周一次的间隔静脉内施用。在某些实施方式中,本文公开的抗-CTLA-4抗体或药物组合物肿瘤内施用。在某些实施方式中,本文公开的抗-CTLA-4抗体或药物组合物以0.01mg/kg、0.03mg/kg、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg或3mg/kg任选地按照每三周一次的间隔肿瘤内施用。在某些实施方式中,本文公开的抗-CTLA-4抗体或药物组合物以0.03mg/kg、0.1mg/kg或0.3mg/kg任选地按照每三周一次的间隔肿瘤内施用。在某些实施方式中,本文公开的抗-CTLA-4抗体或药物组合物以比通过全身性施用给予的剂量低最多5-倍、10-倍、20-倍、30-倍、40-倍、50-倍、60-倍、70-倍、80-倍、90-倍、100-倍或200-倍的剂量肿瘤内施用。在某些实施方式中,本文公开的抗-CTLA-4抗体或药物组合物以比通过全身性施用给予的剂量低最多10-倍的剂量肿瘤内施用。在某些实施方式中,本文公开的抗-CTLA-4抗体或药物组合物以比通过全身性施用给予的剂量低最多100-倍的剂量肿瘤内施用。在某些实施方式中,本文公开的抗-CTLA-4抗体或药物组合物肿瘤内施用且该方法还包括向受试者施用另外的治疗剂。在某些实施方式

中,另外的治疗剂全身性施用。在某些实施方式中,受试者患有实体肿瘤且另外的治疗剂是抗-PD-1抗体。在某些实施方式中,抗-PD-1抗体是帕姆单抗或纳武单抗。在某些实施方式中,受试者患有头颈鳞状细胞癌且另外的治疗剂是抗-EGFR抗体。在某些实施方式中,抗-EGFR抗体是西妥昔单抗。在某些实施方式中,受试者患有HER2+乳腺癌且另外的治疗剂是抗-HER2抗体。在某些实施方式中,抗-HER2抗体是曲妥珠单抗。在某些实施方式中,这些方法进一步包括向受试者施用化疗剂。在某些实施方式中,化疗剂全身性施用。在某些实施方式中,化疗剂是吉西他滨。在某些实施方式中,本文公开的抗-CTLA-4抗体或药物组合物肿瘤内施用且受试者患有晚期或转移性实体肿瘤。在某些实施方式中,本文公开的抗-CTLA-4抗体或药物组合物肿瘤内施用且受试者患有头颈癌(例如,复发性/难治性头颈鳞状细胞癌)。在某些实施方式中,本文公开的抗-CTLA-4抗体或药物组合物肿瘤内施用且受试者患有乳腺癌(例如,复发性/难治性HER2+乳腺癌)。在某些实施方式中,本文公开的抗-CTLA-4抗体或药物组合物递送到肿瘤引流淋巴结。在某些实施方式中,本文公开的抗-CTLA-4抗体或药物组合物通过局部化的施用(例如,皮下施用)递送。在某些实施方式中,本文公开的抗-CTLA-4抗体或药物组合物以0.01mg/kg、0.03mg/kg、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg或3mg/kg通过局部化的施用(例如,皮下施用)递送。在某些实施方式中,本文公开的抗-CTLA-4抗体或药物组合物以比通过全身性施用给予的剂量低最多5-倍、10-倍、20-倍、30-倍、40-倍、50-倍、60-倍、70-倍、80-倍、90-倍、100-倍或200-倍的剂量通过局部化的施用(例如,皮下施用)递送。在某些实施方式中,本文公开的抗-CTLA-4抗体或药物组合物以比通过全身性施用给予的剂量低最多10-倍的剂量通过局部化的施用(例如,皮下施用)递送。在某些实施方式中,本文公开的抗-CTLA-4抗体或药物组合物以比通过全身性施用给予的剂量低最多100-倍的剂量通过局部化的施用(例如,皮下施用)递送。在某些实施方式中,本文公开的抗-CTLA-4抗体或药物组合物通过局部化的施用(例如,皮下施用)递送且该方法还包括向受试者施用另外的治疗剂。在某些实施方式中,另外的治疗剂是疫苗。在某些实施方式中,疫苗包括包含与抗原性肽复合的热休克蛋白的热休克蛋白肽复合物(HSPPC)。在一个实施方式中,热休克蛋白是gp96蛋白并与肿瘤相关抗原性肽复合,其中HSPPC源自从受试者获得的肿瘤。在某些实施方式中,热休克蛋白选自hsc70、hsp70、hsp90、hsp110、grp170、gp96、钙网蛋白、其突变体,及其两种或更多种的组合。在某些实施方式中,热休克蛋白是hsc70。在某些实施方式中,热休克蛋白是hsp70。在某些实施方式中,抗原性肽是合成的。在某些实施方式中,受试者患有癌症。在某些实施方式中,受试者患有传染性疾病。在某些实施方式中,这些方法进一步包括向受试者施用另外的治疗剂。在某些实施方式中,另外的治疗剂是化疗剂或检查点靶向剂。在某些实施方式中,检查点靶向剂选自拮抗剂抗-PD-1抗体、拮抗剂抗-PD-L1抗体、拮抗剂抗-PD-L2抗体、拮抗剂抗-CTLA-4抗体、拮抗剂抗-TIM-3抗体、拮抗剂抗-LAG-3抗体、拮抗剂抗-CEACAM1抗体、激动剂抗-GITR抗体、激动剂抗-OX40抗体和激动剂抗-CD137抗体、激动剂抗-DR3抗体、激动剂抗-TNFSF14抗体及激动剂抗-CD27抗体。在某些实施方式中,另外的治疗剂是放疗。在某些实施方式中,另外的治疗剂是吡咯酮-2,3-双加氧酶(IDO)的抑制剂。合适的IDO抑制剂包括,但不限于epacadostat、F001287、indoximod和NLG919。在某些实施方式中,另外的治疗剂是疫苗。在某些实施方式中,疫苗包括包含与抗原性肽复合的热休克蛋白的热休克蛋白肽复合物(HSPPC)。在一个实施方式中,热休克蛋白是gp96蛋白并与肿瘤相关抗原性肽复合,其中HSPPC源自从受试者获得的肿瘤。

[0048] 在一个实施方式中,本发明涉及用作药物的本发明的抗体、本发明的多核苷酸、本发明的载体和/或本发明的重组宿主细胞。

[0049] 在一个实施方式中,本发明涉及用作诊断剂的本发明的抗体、本发明的多核苷酸、本发明的载体和/或本发明的重组宿主细胞。

[0050] 在一个实施方式中,本发明涉及本发明的抗体、本发明的多核苷酸、本发明的载体和/或本发明的重组宿主细胞用于体外检测生物样品中的人CTLA-4的用途。

[0051] 在一个方面,本文提供了包含本文公开的抗-CTLA-4抗体及药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物,其用作药物。

[0052] 在一个方面,本文提供了包含本文公开的抗-CTLA-4抗体及药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物,其用作诊断剂。

[0053] 在一个方面,本文提供了包含本文公开的抗-CTLA-4抗体、本发明的多核苷酸、本发明的载体和/或本发明的重组宿主细胞及药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物。在一个方面,药物组合物用作药物和/或诊断剂。

[0054] 在一个方面,本发明涉及本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,其用于提高响应于抗原的T-细胞激活的方法中。

[0055] 在一个方面,本发明涉及本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,其用于提高受试者中响应于抗原的T-细胞激活的方法中。

[0056] 在一个方面,本发明涉及本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,其用于提高受试者中响应于抗原的T-细胞激活的方法中,该方法包括向受试者施用有效量的本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物。

[0057] 在一个方面,本发明涉及本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,其用于治疗癌症的方法中。

[0058] 在一个方面,本发明涉及本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,其用于治疗受试者的癌症的方法中。

[0059] 在一个方面,本发明涉及本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,其用于治疗受试者的癌症的方法中,该方法包括向受试者施用有效量的本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物。

[0060] 在一个方面,本发明涉及(a)本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物及(b)另外的治疗剂,优选抗-PD-1抗体,其用药物。

[0061] 在一个方面,本发明涉及(a)本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物及(b)另外的治疗剂,优选抗-PD-1抗体,其用于治疗癌症的方法中。在优选的实施方式中,癌症是实体肿瘤。在另一个优选的实施方式中,本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物肿瘤内施用于受试者,优选以0.01mg/kg、0.03mg/kg、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg或3mg/kg任选地按照每三周一次的间隔肿瘤内施用于受试者。

[0062] 在一个方面,本发明涉及药物组合物、试剂盒或药盒,其包含(a)本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物及(b)另外的治疗剂,优选抗-PD-1抗体。

[0063] 在一个方面,本发明涉及(a)本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物及(b)抗-EGFR抗体,和任选地(c)化疗剂,其用作药物。

[0064] 在一个方面,本发明涉及(a)本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或

药物组合物和 (b) 抗-EGFR 抗体, 及任选地 (c) 化疗剂, 其用于治疗癌症的方法中。在优选的实施方式中, 癌症是头颈鳞状细胞癌。在另一个优选的实施方式中, 本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物肿瘤内施用于受试者, 优选以 0.01mg/kg、0.03mg/kg、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg 或 3mg/kg 任选地按照每三周一次的间隔肿瘤内施用于受试者。

[0065] 在一个方面, 本发明涉及药物组合物、试剂盒或药盒, 包含 (a) 本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物和 (b) 抗-EGFR 抗体, 及任选地 (c) 化疗剂。

[0066] 在一个方面, 本发明涉及 (a) 本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物和 (b) 抗-HER2 抗体, 及任选地 (c) 化疗剂, 其用作药物。

[0067] 在一个方面, 本发明涉及 (a) 本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物和 (b) 抗-HER2 抗体, 及任选地 (c) 化疗剂, 其用于治疗 HER2+ 乳腺癌的方法中。在另一个优选的实施方式中, 本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物肿瘤内施用于受试者, 优选以 0.01mg/kg、0.03mg/kg、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg 或 3mg/kg 任选地按照每三周一次的间隔肿瘤内施用于受试者。

[0068] 在一个方面, 本发明涉及药物组合物、试剂盒或药盒, 其包含 (a) 本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物和 (b) 抗-HER2 抗体, 及任选地 (c) 化疗剂。

[0069] 在一个方面, 本发明涉及本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物, 其用于治疗癌症的方法中, 其中本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物肿瘤内施用于受试者, 优选以 0.01mg/kg、0.03mg/kg、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg 或 3mg/kg 任选地按照每三周一次的间隔肿瘤内施用于受试者。

[0070] 在一个方面, 本发明涉及本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物, 其用于治疗癌症的方法中, 其中本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物皮下或静脉内施用于受试者, 优选以 0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、6mg/kg 或 10mg/kg 任选地按照每三周一次的间隔静脉内施用于受试者。

[0071] 在一个方面, 本发明涉及 (a) 本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物和 (b) 另外的治疗剂, 其用作药物。在优选的实施方式中, 另外的治疗剂是化疗剂或检查点靶向剂或吡咯胺-2,3-双加氧酶 (IDO) 的抑制剂或疫苗。

[0072] 在一个方面, 本发明涉及 (a) 本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物和 (b) 另外的治疗剂, 其用于治疗癌症的方法中。在优选的实施方式中, 另外的治疗剂是化疗剂或检查点靶向剂或吡咯胺-2,3-双加氧酶 (IDO) 的抑制剂或疫苗。

[0073] 在一个方面, 本发明涉及药物组合物、试剂盒或药盒, 其包含 (a) 本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物和 (b) 另外的治疗剂。在优选的实施方式中, 另外的治疗剂是化疗剂或检查点靶向剂或吡咯胺-2,3-双加氧酶 (IDO) 的抑制剂或疫苗。

[0074] 在一个方面, 本发明涉及本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物, 其用于治疗癌症的方法中和/或用于提高响应于抗原的 T-细胞激活的方法中, 其中本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物递送至肿瘤引流淋巴结。

[0075] 在一个方面, 本发明涉及本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物在治疗癌症的方法中和/或在提高受试者的响应于抗原的 T-细胞激活的方法中的用途, 其中本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物递送至肿瘤引流淋

巴结。

[0076] 在一个方面,本发明涉及本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物在制备用于免疫治疗的药物中的用途,例如,用于提高受试者的响应于抗原的T-细胞激活、治疗癌症或者治疗或预防传染性疾病。

[0077] 在一个方面,本发明涉及本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物在制备用于免疫治疗的药物中的用途,例如,用于提高受试者的响应于抗原的T-细胞激活、治疗癌症或者治疗或预防传染性疾病,其中本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物递送至肿瘤引流淋巴结。

[0078] 在一个方面,本发明涉及(a)本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物和(b)抗-HER2抗体,及任选地(c)化疗剂在制备用于免疫治疗的药物中的用途,例如,用于提高受试者的响应于抗原的T-细胞激活、治疗癌症或者治疗或预防传染性疾病。

[0079] 在一个方面,本发明涉及(a)本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物和(b)抗-HER2抗体,及任选地(c)化疗剂在制备用于免疫治疗的药物中的用途,例如,用于提高受试者的响应于抗原的T-细胞激活、治疗癌症或者治疗或预防传染性疾病,其中本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物递送至肿瘤引流淋巴结。

附图说明

[0080] 图1A是抗-CTLA-4抗体AGEN1884和参比抗-CTLA-4IgG₁抗体与嵌合和单体重组人、食蟹猴、小鼠和大鼠CTLA-4的结合亲和力(K_D)的表格,如通过表面等离子体共振测量的。图1B是显示AGEN1884w、参比抗-CTLA-4IgG₁抗体和IgG₁同种型对照与CTLA-4-表达细胞的结合的曲线图,如通过流式细胞术测量的。计算平均荧光强度(MFI)并针对一定范围的抗体浓度作图。图1C和1D显示了,相对于同种型对照IgG₁抗体显示的,AGEN1884和参比抗-CTLA-4IgG₁抗体结合重组人(rh)和食蟹猴(rc)CTLA-4的选择性,如与相关家族成员(重组人CD28、ICOS、BTLA和PD-1,及重组食蟹猴PD-1)比较的。该结合通过悬浮阵列技术(suspension array technology)测量且三种不同抗体浓度(10、100和1000ng/ml)下的平均荧光强度(MFI)显示于图1C中。图1D是基于图1C中显示的数据的相对结合亲和力的概要表格。

[0081] 图2A显示AGEN1884w、抗-CTLA-4参比抗体和IgG₁同种型对照抗体与活化的原代人CD4+T细胞的结合。简言之,新分离的CD4+T细胞在通过流式细胞术进行抗体结合分析之前使用板结合的抗-CD3和抗-CD28抗体刺激五天。计算在一定抗体浓度范围内的平均荧光强度(MFI)。图2B显示使用激活的(抗-CD3和抗-CD28与重组IL-2,三天)原代食蟹猴CD8+T细胞在浓度滴定上AGEN1884和抗-CTLA-4参比抗体与IgG₁同种型对照抗体相比的细胞内结合。数据通过流式细胞术产生并显示为CTLA-4+T细胞作为总CD8+T细胞群体的比例的百分比。图2C显示测试AGEN1884w和IgG₁同种型对照抗体与植物凝集素刺激的CD4+人、食蟹猴、大鼠或小鼠T细胞的结合的流式细胞分析的结果。

[0082] 图3A是使用悬浮阵列技术的配体阻断分析的示意图。图3B和3C显示在剂量滴定的AGEN1884、参比抗-CTLA-4IgG₁抗体或同种型对照(IgG₁)抗体不存在(100%)或存在的情况下重组CD80-Fc(图3B)和CD86-Fc蛋白(图3C)结合CTLA-4偶联珠的百分比。图3D显示在提高

浓度的AGEN1884w、参比抗-CTLA-4IgG₁抗体或同种型对照(IgG₁)抗体的存在下重组CD80-Fc和CD86-Fc结合CTLA-4表达T细胞(Jurkat)的百分比。图3E显示其中在添加固定浓度的直接荧光团偶联AGEN1884w或参比抗-CTLA-4IgG₁抗体之前,CTLA-4表达T细胞(Jurkat)与滴定剂量的CD80-Fc或CD86-Fc孵育的分析的结果。计算平均荧光强度(MFI)并针对一定范围的CD80-Fc或CD86-Fc浓度作图。

[0083] 图4A描绘了葡萄球菌肠毒素A(SEA)刺激时抗-CTLA-4抗体对原代人PBMC的培养物的功能活性。具体地,图4A显示与IgG₁同种型对照相比,响应于AGEN1884w和参比抗-CTLA-4IgG₁抗体的剂量反应的IL-2产生的倍数变化。误差棒代表来自三个重复孔的标准差。图4B和4C是CTLA-4的阻断导致T细胞激活的IL-2-荧光素酶报告分析的结果。CD3和CD28共表达人T细胞系(Jurkat)(除在IL-2启动子的控制下的荧光素酶报告基因外,其经工程化以组成型地表达细胞表面CTLA-4)与表达CD80和CD86的抗原呈递细胞系(Raji)共培养。图4B是显示Raji细胞上CD80和CD86的表达的一对柱状图,如通过流式细胞术测量的。TCR信号传导在提高浓度的AGEN1884w或IgG₁同种型对照抗体存在下使用抗-CD3抗体触发。图4C显示相对于IgG₁同种型对照抗体,响应于提高浓度的AGEN1884w的荧光素酶表达(IL-2基因激活的替代标志物)的倍数增加。图4D和4E是测试抗-CTLA-4抗体AGEN1884w降低高浓度抗-CD3抗体存在下原代CD8+T细胞的IFN γ 产生的能力的分析的结果。原代人T细胞在提高浓度的溶解的(图4D)或板结合的(图4E)AGEN1884w或IgG₁同种型对照抗体存在下用抗-CD3抗体(10 μ g/ml)刺激。CD8+IFN γ +T细胞的百分比针对测试的抗体浓度作图。点线描绘了在不存在抗-CD3抗体刺激的情况下CD8+IFN γ +T细胞的频率。图4F是显示抗-CTLA-4抗体AGEN1884w单独或与抗-LAG-3抗体AGEN1746、抗-PD-1抗体纳武单抗或抗-PD-1抗体帕姆单抗组合在葡萄球菌肠毒素A(SEA)刺激下对原代人PBMC培养物的功能活性的曲线图。显示了IL-2浓度的平均值和标准差。IC代表同种型对照。

[0084] 图5A显示AGEN2041w、参比抗-CTLA-4IgG₁抗体和参比抗-CTLA-4IgG₂抗体与嵌合和单体重组人和食蟹猴CTLA-4的结合亲和力(K_D),如通过表面等离子体共振测量的。图5B是显示AGEN2041w、参比抗-CTLA-4IgG₂抗体和IgG₂同种型对照与CTLA-4-表达细胞的结合的曲线图,如在流式细胞分析中测量的。计算平均荧光强度(MFI)并针对测试的不同抗体浓度作图。图5C是显示在提高浓度的AGEN2041w或参比抗-CTLA-4IgG₂抗体(在添加珠之前12、37、111、333、1000、3000和9000ng/ml)存在下CD80和CD86结合CTLA-4的百分比的曲线图,如通过悬浮阵列技术测量的。图5D和5E是分别与图1C和1D中显示的相似表格,其中AGEN2041w和参比抗-CTLA-4IgG₂抗体结合重组人(rh)和食蟹猴(rc)CTLA-4的选择性,如与相关家族成员(重组人CD28、ICOS、BTLA和PD-1;及重组食蟹猴PD-1)相比的,相对于同种型对照IgG₂抗体进行测试。图5D显示如通过悬浮阵列技术测量的MFI值且图5E是是基于图5D中显示的数据的概要表格。

[0085] 图6A描绘了葡萄球菌肠毒素A(SEA)刺激时抗-CTLA-4抗体对原代人PBMC的培养物的功能活性。图6A显示与IgG₂同种型对照抗体相比,响应于AGEN1884w和AGEN2041w的剂量反应的IL-2产生的倍数变化。误差棒代表来自三个重复孔的标准差。图6B是显示测试AGEN2041w和IgG₂同种型对照抗体的IL-2-荧光素酶报告分析的结果的曲线图。荧光素酶表达(IL-2基因激活的替代标志物)的倍数变化对于提高剂量的AGEN2041w和同种型对照抗体显示。

[0086] 图7A是显示AGEN1884w-105(通过稳定克隆105产生的AGEN1884w)、参比抗-CTLA-4IgG₁抗体和IgG₁同种型对照与CTLA-4-表达细胞的结合的曲线图,如在流式细胞分析中测量的。计算平均荧光强度(MFI)并针对抗体滴定作图。图7B是检验在葡萄球菌肠毒素A(SEA)刺激后通过AGEN1884w-105、参比抗-CTLA-4IgG₁抗体和IgG₁同种型对照增强的IL-2产生的分析的结果。在图7B中,显示六个生物学重复及IL-2倍数变化的平均值(棒)。

[0087] 图8A、8B和8C分别是剂量滴定的抗体对表达Fc γ RIIA^{H131}(图8A)、Fc γ RIIB(图8B)和Fc γ RIIIA^{V158}(图8C)的CHO细胞的结合曲线。第二检测抗体的平均荧光强度(MFI)作图。误差棒代表三个重复的标准差。测试的抗体是AGEN1884w-FortiCHO、AGEN1884w-PowerCHO、AGEN2041w、参比抗-CTLA-4IgG₁抗体和IgG₁同种型对照抗体。

[0088] 图9A和9B是显示在与Fc γ RIIA(图9A)或Fc γ RIIIA(图9B)结合的AGEN1884w-FortiCHO、AGEN1884w-PowerCHO、AGEN2041w和参比抗-CTLA-4IgG₁抗体的一定范围的抗体浓度下三个重复样品的平均反应(响应单位, RU)的曲线图,如通过表面等离子体共振测定的。

[0089] 图10A是Fc γ 受体IIIA(Fc γ RIIIA)基因报告分析的示意图。图10B-10G是来自报告分析的结果,其中AGEN1884w-105或AGEN1884w(图10B、10C、10F和10G中的AGEN1884w-105;图10D和10E中的AGEN1884w)激活表达Fc γ RIIIA V158变体或Fc γ RIIIA F158变体的报告体细胞系的能力与参比抗-CTLA-4IgG₁抗体(图10B和10C)、AGEN2041w(图10D和10E)和AGEN1884w N297变体(图10F和10G)的能力比较。相对光单位(RLU)针对一定范围的抗体浓度作图。

[0090] 图11是报告分析的结果,其中在抗体结合于CTLA-4-表达靶细胞时,测试AGEN2041w、参比抗-CTLA-4IgG₂抗体和IgG₂同种型对照抗体激活表达Fc γ RIIA^{H131}变体的报告体细胞系的能力。相对光单位(RLU)针对一定范围的抗体浓度作图。

[0091] 图12A是显示AGEN1884w-105、AGEN1884w-N297变体和IgG₁同种型对照与CTLA-4-表达细胞的结合的曲线图,如在流式细胞分析中测量的。计算平均荧光强度(MFI)并针对测试的不同抗体浓度作图。图12B是检验葡萄球菌肠毒素A(SEA)刺激后AGEN1884w-105、AGEN1884w-N297A和IgG₁同种型对照诱导的IL-2产生的分析的结果。在图12B中,显示了六个生物学重复和IL-2倍数变化的平均值(棒)。

[0092] 图13A和13B是来自检验阻断FcR啮合对抗-CTLA-4抗体的拮抗性活性的影响的分析的结果。在图13A中,显示了七个生物学重复和IL-2倍数变化的平均值(棒)。在图13B中,显示了IL-2产生(pg/ml)的七个生物学重复。

[0093] 图14是显示人PBMC在葡萄球菌肠毒素A(SEA)刺激时响应于10 μ g/ml的AGEN1884w、AGEN1884w-N297A、AGEN1884w-S267E/L328F、AGEN1884w-S239D/A330L/I332E、AGEN2041w、IgG₁同种型对照抗体或IgG₂同种型对照抗体的IL-2产生的曲线图。显示了各测试抗体的IL-2产生的平均值(棒)。

[0094] 图15是显示在效应细胞以及剂量滴定的AGEN1884w、参比抗-CTLA-4IgG₁抗体或同种型对照抗体的存在下靶细胞裂解的百分比的曲线图。经工程化以在细胞表面上组成型地表达CTLA-4的Jurkat细胞用作靶细胞且NK92-Fc γ RIIIA细胞用作效应细胞。

[0095] 图16比较了CD80-Fc-His、CD86-Fc-His、参比抗-CTLA-4IgG₁抗体和AGEN1884对于CTLA-4的结合亲和力(K_D)。Walker和Sansom, Nat. Rev. Immunology 2011指的是Walker和

Sansom Nat.Rev.Immunol. (2011) 11 (12) :852-63.Xu等,JI 2012指的是Xu等,J Immunol. (2012) 189 (9) :4470-7。

[0096] 图17A是人CTLA-4 (SEQ ID NO:77)、食蟹猴CTLA-4 (SEQ ID NO:84)、小鼠CTLA-4 (SEQ ID NO:85) 和大鼠CTLA-4 (SEQ ID NO:86) 的序列比对。点代表与对应人残基相同的残基。*(星号) 指示具有单一的完全保守残基的位置。:(冒号) 指示具有强相似特性的基团之间的保守。(句点) 指示具有弱相似特性的基团之间的保守。图17B和17C是人CTLA-4 (SEQ ID NO:77)、食蟹猴CTLA-4 (SEQ ID NO:84)、人CD28 (SEQ ID NO:87)、人ICOS (SEQ ID NO:88)、人BTLA (SEQ ID NO:89) 和人PD-1 (SEQ ID NO:90) 的序列比对。在人CTLA-4结合于AGEN1884w-Fab时显示氘吸收的强烈下降的两个区域在图17A-C中加下划线:Q⁸⁰VT⁸²和Y¹³⁵PPPYLIGNGTQI¹⁴⁹。图17D是Protein Data Bank文件3osk和1i8l中的X-射线坐标的复合装配。这一复合结构分析表明CTLA-4和B7-1簇的菊花链簇集(daisy-chain clustering)。这提供了人B7-1二聚体以及人CTLA-4二聚体的模型,其据信是信号传导活性免疫复合体的最简单寡聚形式。CTLA-4和B7-1之间的接触位点包括M¹³⁴YPPYY¹⁴⁰区域,但不限于这一特定基序。图17E是AGEN1884w-Fab与人CTLA-4的结合的模型。在图17A-17E的在前说明中所述的CTLA-4的所有残基按照SEQ ID NO:77编号。

[0097] 图18A和18B是来自食蟹猴的T细胞依赖性抗原反应(TDAR) 研究的结果。AGEN1884w (10mg/kg)、参比抗-CTLA-4IgG₁抗体(3mg/kg) (图18A)、AGEN2041w (10mg/kg) (图18B) 或对照品(图18A和18B) 在第1和29天通过静脉内施用(缓慢浓注) 与HBsAg疫苗(30μg,在后腿中) 一起给予。重复样品使用ELISA分析抗-HBsAg (IgG) 血清滴度。数据点代表各处理组的平均值±SEM。

[0098] 图19A和19B分别是可变重链BADD411-2354 (SEQ ID NO:7)、BADD412-2356 (SEQ ID NO:38)、BADD412-2357 (SEQ ID NO:39)、BADD412-2358 (SEQ ID NO:40)、BADD412-2359 (SEQ ID NO:41) 和BADD412-2360 (SEQ ID NO:42) 及可变轻链BADD412-2367 (SEQ ID NO:43)、BADD412-2376 (SEQ ID NO:8)、BADD412-2382 (SEQ ID NO:44)、BADD412-2384 (SEQ ID NO:45)、BADD412-2390 (SEQ ID NO:46) 和BADD412-2393 (SEQ ID NO:47) 的序列比对。显示的重链和轻链CDR根据Kabat确定。

[0099] 图20A-20E是显示在剂量滴定的19种抗-CTLA-4抗体 (AGEN1884-AGEN1902) 存在下重组CD80-PE或CD86-PE结合CTLA-4偶联珠的百分比的曲线图,如通过悬浮阵列技术测量的。

5. 具体实施方式

[0100] 本公开提供了特异性地结合人CTLA-4并拮抗CTLA-4功能(例如,CTLA-4-介导的免疫抑制) 的抗体。还提供了包含这些抗体的药物组合物、编码这些抗体的核酸、用于产生这些抗体的表达载体和宿主细胞及使用这些抗体治疗受试者的方法。本文公开的抗体特别可用于提高受试者中响应于抗原(例如,肿瘤抗原) 的T-细胞激活,且因此用于治疗受试者的癌症或者预防或治疗传染性疾病。本文公开的抗体也可用于治疗癌症或者预防或治疗传染性疾病的药物组合物中,或用于治疗癌症或者预防或治疗传染性疾病的药物的制备中。

[0101] 5.1定义

[0102] 如本文中使用的,术语“约”和“大约”在用于修饰数值或数值范围时表明高于该值

5%-10%或低于该值5%-10%的偏差保留在所述值或范围的预定含义内的范围。

[0103] 如本文中使用的,术语“CTLA-4”是指细胞毒性T-淋巴细胞相关蛋白4。CTLA-4核苷酸和多肽序列是本领域中公知的。示例性的人CTLA-4氨基酸序列显示于GenBank保藏GI:15778585中且示例性的小鼠CTLA-4氨基酸序列显示于GenBank保藏GI:15778586中。

[0104] 如本文中使用的,术语“抗体”和“(多个)抗体”包括全长抗体、抗体的抗原结合片段及包含抗体CDR、VH区或VL区的分子。抗体的实例包括单克隆抗体、重组产生的抗体、单特异性抗体、多特异性抗体(包括双特异性抗体)、人抗体、人源化抗体、嵌合抗体、免疫球蛋白、合成抗体、包含两条重链和两条轻链分子的四聚体抗体、抗体轻链单体、抗体重链单体、抗体轻链二聚体、抗体重链二聚体、抗体轻链-抗体重链对、胞内抗体、异缀合抗体(heteroconjugate antibody)、单域抗体、单价抗体、单链抗体或单链Fvs(scFv)、骆驼化抗体(camelized antibody)、affybodies、Fab片段、F(ab')₂片段、二硫键连接的Fvs(sdFv)、抗-独特型(抗-Id)抗体(包括,例如,抗-抗-Id抗体)及上述任一的抗原结合片段。在某些实施方式中,本文所述的抗体是指多克隆抗体群体。抗体可以是免疫球蛋白分子的任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY),任何类别(例如,IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁或IgA₂)或任何亚类(例如,IgG_{2a}或IgG_{2b})。在某些实施方式中,本文所述的抗体是IgG抗体或者其类别(例如,人IgG₁或IgG₄)或亚类。在具体的实施方式中,抗体是人源化单克隆抗体。在另一具体的实施方式中,抗体是人单克隆抗体。在某些实施方式中,本文所述的抗体是IgG₁或IgG₂抗体。

[0105] 如本文中使用的,术语“VH区”和“VL区”分别是指单一抗体重链和轻链可变区,其包含FR(框架区)1、2、3和4及CDR(互补决定区)1、2和3(参见Kabat等(1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest. (NIH Publication No.91-3242, Bethesda)。

[0106] 如本文中使用的,术语“CDR”或“互补决定区”意思是在重链和轻链多肽两者的可变区内发现的非连续的抗原组合位点。这些特定区域已由Kabat等,J.Biol.Chem.252,6609-6616(1977)和Kabat等,Sequences of protein of immunological interest.(1991)、Chothia等,J.Mol.Biol.196:901-917(1987)以及MacCallum等,J.Mol.Biol.262:732-745(1996)描述,其中该定义包括了在相互之间进行比较时氨基酸残基的重叠或亚组。显示了涵盖以上引用的每个文献所定义的CDR的氨基酸残基用于比较。优选地,术语“CDR”是由Kabat在序列比较的基础上所定义的CDR。CDRH1、CDRH2和CDRH3表示重链CDR,且CDRL1、CDRL2和CDRL3表示轻链CDR。

[0107] 如本文中使用的,术语“EU编号系统”是指用于抗体恒定区的EU编号规则,如Edelman,G.M.等,Proc.Natl.Acad.USA,63,78-85(1969)和Kabat等,在“Sequences of Proteins of Immunological Interest”,U.S.Dept.Health and Human Services,5th edition,1991中所述的。

[0108] 如本文中使用的,术语“框架(FR)氨基酸残基”是指免疫球蛋白链的框架区中的那些氨基酸。如本文中使用的,术语“框架区”或“FR区”包括作为可变区的部分但非CDR(例如,使用CDR的Kabat定义)的部分的氨基酸残基。

[0109] 如本文中使用的,术语“去岩藻糖基化”或“去岩藻糖基的”在Fc的情况中是指基本上缺乏直接或间接地与人IgG1Fc区的残基297(根据EU索引编号的(Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National

Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) 或者非-IgG1或非人IgG1免疫球蛋白中的对应残基共价连接的岩藻糖。因此,在包含多个去岩藻糖基的抗体的组合物中,至少70%的抗体在抗体Fc区的残基297处不是直接或间接地(例如,通过中介糖)岩藻糖基化的,且在一些实施方式中,至少80%、85%、90%、95%或99%在Fc区的残基297处不是直接或间接地岩藻糖基化的。

[0110] 如本文中使用的,术语“特异性结合”是指抗体以至少约 1×10^{-6} M、 1×10^{-7} M、 1×10^{-8} M、 1×10^{-9} M、 1×10^{-10} M、 1×10^{-11} M、 1×10^{-12} M或更小的解离常数(Kd)结合抗原和/或以比其对于非特异性抗原的亲合力高至少两倍的亲合力结合抗原的能力。

[0111] 如本文中使用的,“表位”是本领域中的术语且是指抗体可以与其特异性结合的抗原的局部区域。表位可以是,例如,多肽的连续氨基酸(线性或连续表位)或者表位可以,例如,从一个或多个多肽的两个或更多个非连续区域集合到一起(构象、非线性、不连续或非连续表位)。在某些实施方式中,抗体与其结合的表位可以通过,例如,NMR谱、X-射线衍射晶体学研究、ELISA分析、与质谱偶联的氢/氘交换(例如,液相色谱电喷雾质谱)、基于阵列的寡肽扫描分析和/或诱变作图(例如,定点诱变作图)确定。对于X-射线晶体学,结晶可以使用本领域中的任何已知方法完成(例如,Gieg r等,(1994) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 50 (Pt 4):339-350;McPherson A(1990) *Eur J Biochem* 189:1-23;Chayen NE(1997) *Structure* 5:1269-1274;McPherson A(1976) *J Biol Chem* 251:6300-6303)。抗体:抗原晶体可以使用公知的X-射线衍射技术进行研究且可以使用计算机软件如X-PLOR (Yale University,1992,distributed by Molecular Simulations,Inc.;参见例如Meth Enzymol (1985) 114&115卷,eds Wyckoff HW等.;U.S.2004/0014194)和BUSTER(Bricogne G (1993) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 49 (Pt 1):37-60;Bricogne G(1997) *Meth Enzymol* 276A:361-423,ed Carter CW;Roversi P等,(2000) *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr* 56 (Pt 10):1316-1323)进行优化。诱变作图研究可以使用本领域技术人员已知的任何方法完成。参见,例如,Champe M等,(1995) *J Biol Chem* 270:1388-1394和Cunningham BC&Wells JA(1989) *Science* 244:1081-1085对于诱变技术的描述,包括丙氨酸扫描诱变技术。在具体的实施方式中,抗体或其抗原结合片段的表位使用丙氨酸扫描诱变研究确定。

[0112] 如本文中使用的,术语“治疗”、“处理”和“疗法”是指本文中所述的治疗性或预防性措施。“治疗”的方法利用抗体至患有疾病或障碍或易患这种疾病或障碍的受试者的施用以预防、治愈、延迟疾病或障碍、减轻疾病或障碍的严重性或改善疾病或障碍的一种或多种症状或疾病或障碍的复发,或者延长受试者的存活期超出在没有这种治疗的情况下预期的存活期。

[0113] 如本文中使用的,术语“有效量”在治疗施用于受试者的情况中是指实现所需的预防或治疗效应的治疗量。

[0114] 如本文中使用的,术语“受试者”包括任何人或非人动物。

[0115] 氢-氘交换使用包括以下步骤的分析进行评估:(a) 获得单独CTLA-4或CTLA-4与抗体组合在水性缓冲液中的溶液并将这一溶液稀释到大约90%v/v过量的氧化氘标记缓冲液中例如0、60、300、1800和7200秒;(b) 通过降低pH淬灭氢-氘交换;(c) 使样品经历蛋白酶消化和质谱分析;和(d) 计算CTLA-4蛋白水解肽中的氘掺入并比较在抗体存在或不存在下的

氘掺入。如通过前述分析评价的,如果在抗-CTLA-4抗体存在的情况下的氢-氘交换相对于抗体不存在的情况下的氢-氘交换降低至少10%,则CTLA-4蛋白水解肽中的氢-氘交换被“降低”。

[0116] 5.2抗-CTLA-4抗体

[0117] 在一个方面,本公开提供了特异性地结合人CTLA-4和拮抗CTLA-4功能的抗体。示例性抗体的氨基酸序列在本文中的表1-6中给出。

[0118] 表1. 示例性抗-CTLA-4抗体的可变区、CDR和框架 (FR) 的序列

[0119]

SEQ ID NO:	描述	氨基酸序列
1	Kabat CDRH1 (AGEN1884w)	SYSMN
2	Kabat CDRH2 (AGEN1884w)	SISSSSSYIYYADSVKG
3	Kabat CDRH3 (AGEN1884w)	VGLMGPFDI
4	Kabat CDRL1 (AGEN1884w)	RASQSVSRYLG
5	Kabat CDRL2 (AGEN1884w)	GASTRAT
6	Kabat CDRL3 (AGEN1884w)	QQYGSSPWT
7	VH (AGEN1884w)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQA PGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQ

[0120]

		MNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVTVSS
8	VL (AGEN1884w)	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSRYLGWYQQKPG QAPRLLIYGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTITRLEPEDFA VYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK
9	种系序列: IGHV3-21*01	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQA PGKGLEWVSSISSSSSSIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCAR
10	种系序列: IGKV3-20*01	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPG GQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED FAVYYCQQYGSSP
11	种系序列: IGKV3-11*01	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFA VYYCQQRSNWPP
12	AGEN1884w 全长重链(具有 C-末端赖氨酸)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQA PGKGLEWVSSISSSSSSIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
93	AGEN1884w 全长重链(不具 有 C-末端赖氨 酸)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQA PGKGLEWVSSISSSSSSIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVKPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
13	AGEN1884w 全长轻链序列	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSRYLGWYQQKPG QAPRLLIYGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTITRLEPEDFA VYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKIDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
14	AGEN2041w 全长重链序列 (具有 C-末端 赖氨酸)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQA PGKGLEWVSSISSSSSSIYYADSVKGRFTISRDNANKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKTVKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGL PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0121]

94	AGEN2041w 全长重链序列 (不具有 C-末端赖氨酸)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQA PGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVTVSSASTK GPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSNFGTQTYTCNVD HKPSNTKVDKTVKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAK TKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDWLNGKEYCKVSNKGL PAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
15	AGEN1884 全 长轻链序列	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSRYLGWYQQKPG QAPRLLIYGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTITRLEPEDFA VYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIKRSVAAPSVFIFPPSDEQL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC
16	IMGT CDRH1 (AGEN1884w)	GFTFSSYS
17	IMGT CDRH2 (AGEN1884w)	ISSSSSYI
18	IMGT CDRH3 (AGEN1884w)	ARVGLMGPFDI
19	IMGT CDRL1 (AGEN1884w)	QSVSRY
20	IMGT CDRL2 (AGEN1884w)	GAS
21	IMGT CDRL3 (AGEN1884w)	QQYGSSPWT
22	CDRH1 共有序 列	SYX ₁ MX ₂ , 其中 X ₁ 是 S 或 A; 和 X ₂ 是 N 或 S
23	CDRH3 共有序 列	VGLMGPFXI, 其中 X 是 D 或 N
24	CDRL1 共有序 列	RASQSVX ₁ X ₂ YLX ₃ , 其中 X ₁ 是 S 或 G; X ₂ 是 R、S 或 T; 和 X ₃ 是 G 或 A
25	CDRL2 共有序 列	X ₁ X ₂ SX ₃ RAT, 其中 X ₁ 是 G 或 A; X ₂ 是 A 或 T; 和 X ₃ 是 T、S、R 或 N
26	CDRL3 共有序 列	QQYGX ₁ SPX ₂ T, 其中 X ₁ 是 S 或 T; 和 X ₂ 是 W 或 F
27	CDRH1	SYAMS
28	CDRH3	VGLMGPFNI
29	CDRL1	RASQSVSSYLA

[0122]

30	CDRL1	RASQSVGTYLA
31	CDRL2	GASRRAT
32	CDRL2	ATSSRAT
33	CDRL2	GASSRAT
34	CDRL2	AASTRAT
35	CDRL2	GASNRAT
36	CDRL3	QQYGTSPWT
37	CDRL3	QQYGSSPFT
38	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLVWVSSISSSSSSIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVTVSS
39	VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQA PGKGLEWVSSISSSSSSIYYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVTVSS
40	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQA PGKGLEWVSSISSSSSSIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVTVSS
41	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQA PGKGLVWVSSISSSSSSIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFNIWGQGTMTVTVSS
42	VH	EVQLVESGGGLVQPGGSLTSCAASGFTFSSYSMNWVRQA PGKGLEWVSSISSSSSSIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVTVSS
43	VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVGTYLAWYQHKVG QAPRLLIYGASRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK
44	VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPG QAPSLLIYATSSRATGIPDRFSGSVSGTDFTLTISRLEPEDFA VYYCQQYGTSPWTFGQGTKVEIK
45	VL	EIVLTQSPATLSFSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTTISRLEPEDF AVYYCQQYGSSPFTFGPGTKVDIK
46	VL	EIVLTQSPATLSVSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYAASTRATGIPDRFSGSASGTDFTLTISRLEPEDFA VYYCQQYGSSPWTFGQGTKVEIK
47	VL	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPG QAPRLLIYGASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFA VYYCQQYGSSPFTFGPGTKVDIK
48	VH FR1	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS
49	VH FR2	WVRQAPGKGLEWVS
50	VH FR3	RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
51	VH FR4	WGQGTMTVTVSS
52	VH FR1	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS
53	VH FR2	WVRQAPGKGLWVS
54	VH FR3	RFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR
55	VH FR1	EVQLLESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS
56	VH FR1	EVQLVESGGGLVQPGGSLTSCAASGFTFS
57	VL FR1	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC
58	VL FR2	WYQQKPGQAPRLLIY
59	VL FR3	GIPDRFSGSGSGTDFTLTITRLEPEDFAVYYC

[0123]

60	VL FR4	FGQGTKVEIK
61	VL FR1	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC
62	VL FR2	WYQHKVGQAPRLLIY
63	VL FR3	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
64	VL FR2	WYQQKPGQAPSLLIY
65	VL FR3	GIPDRFSGSVSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
66	VL FR1	EIVLTQSPATLSFSPGERATLSC
67	VL FR3	GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
68	VL FR4	FGPGTKVDIK
69	VL FR1	EIVLTQSPATLSVSPGERATLSC
70	VL FR3	GIPDRFSGSASGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC
71	VL FR3	GIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDFAVYYC
72	VH 共有序列	EVQLX ₁ ESGGGLVX ₂ PGGSLX ₃ LSCAASGFTFSSYX ₄ MX ₅ WV RQAPGKGLX ₆ WVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAXN ₇ LYLQMNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFX ₈ IWGQGTMTVTS S, 其中 X ₁ 是V或L; X ₂ 是K或Q; X ₃ 是R或T; X ₄ 是S或A; X ₅ 是N或S; X ₆ 是E或V; X ₇ 是S或T; 和 X ₈ 是D或N
73	VL 共有序列	EIVLTQSPX ₁ TLX ₂ SPGERATLSCRASQSVX ₃ X ₄ YLX ₅ WYQX ₆ KX ₇ GQAPX ₈ LLIYX ₉ X ₁₀ SX ₁₁ RATGIPX ₁₂ RFSGSX ₁₃ SGTDFTX ₁₄ TIX ₁₅ X ₁₆ LEPEDFAVYYCQQYGX ₁₇ SPX ₁₈ TFGX ₁₉ GTKVX ₂₀ IK, 其中 X ₁ 是G或A; X ₂ 是L、V或F; X ₃ 是S或G; X ₄ 是R、T或S; X ₅ 是G或A; X ₆ 是Q或H; X ₇ 是P或V; X ₈ 是R或S; X ₉ 是G或A; X ₁₀ 是A或T; X ₁₁ 是T、R、S或N; X ₁₂ 是D或A; X ₁₃ 是G、V或A; X ₁₄ 是L或F; X ₁₅ 是T或S; X ₁₆ 是R或S; X ₁₇ 是S或T; X ₁₈ 是W或F; X ₁₉ 是Q或P; 和

[0124]

		X ₂₀ 是 E 或 D
74	AGEN1884w N297A 全长重 链(具有 C-末 端赖氨酸)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQA PGKGLEWVSSISSSSSSIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
95	AGEN1884w N297A 全长重 链(不具有 C- 末端赖氨酸)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQA PGKGLEWVSSISSSSSSIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYASTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
75	AGEN1884w S267E/L328F 全长重链(具有 C-末端赖氨酸)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQA PGKGLEWVSSISSSSSSIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK AFPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
96	AGEN1884w S267E/L328F 全长重链(不具 有 C-末端赖氨 酸)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQA PGKGLEWVSSISSSSSSIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVEHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK AFPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
76	AGEN1884w S239D/A330L/ I332E 全长重 链(具有 C-末 端赖氨酸)	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQA PGKGLEWVSSISSSSSSIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN

[0125]

		AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
97	AGEN1884w S239D/A330L/ I332E 全长重 链(不具有 C- 末端赖氨酸)	EVQLVESGGGLVPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQA PGKGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARVGLMGPFDIWGQGTMTVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPLPEEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

[0126] 表2. 示例性抗-CTLA-4抗体的重链CDR序列¹

[0127]

抗体	CDRH1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)
AGEN1884w	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1885	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1886	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1887	SYAMS (27)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1888	SYAMS (27)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1889	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1890	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1891	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1892	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1893	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1894	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1895	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1896	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1897	SYAMS (27)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFNI (28)
AGEN1898	SYAMS (27)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFNI (28)
AGEN1899	SYAMS (27)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFNI (28)
AGEN1900	SYAMS (27)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFNI (28)
AGEN1901	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)
AGEN1902	SYSMN (1)	SISSSSSYIYYADSVKG (2)	VGLMGPFDI (3)

[0128] ¹表2中的VH CDR按照Kabat确定。[0129] 表3. 示例性抗-CTLA-4抗体的轻链CDR序列²

[0130]

抗体	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
AGEN1884w	RASQSVSRYLG (4)	GASTRAT(5)	QQYGSSPWT (6)
AGEN1885	RASQSVSSYLA (29)	ATSSRAT(32)	QQYGTSPWT (36)
AGEN1886	RASQSVSSYLA (29)	GASSRAT(33)	QQYGSSPFT (37)
AGEN1887	RASQSVSRYLG (4)	GASTRAT(5)	QQYGSSPWT (6)
AGEN1888	RASQSVSSYLA (29)	GASSRAT(33)	QQYGSSPFT (37)

[0131]

AGEN1889	RASQSVGTYLA (30)	GASRRAT(31)	QQYGSSPWT (6)
AGEN1890	RASQSVSSYLA (29)	GASSRAT(33)	QQYGSSPFT (37)
AGEN1891	RASQSVSSYLA (29)	AASTRAT(34)	QQYGSSPWT (6)
AGEN1892	RASQSVSSYLA (29)	GASNRAT(35)	QQYGSSPFT (37)
AGEN1893	RASQSVGTYLA (30)	GASRRAT(31)	QQYGSSPWT (6)
AGEN1894	RASQSVSRYLG (4)	GASTRAT(5)	QQYGSSPWT (6)
AGEN1895	RASQSVSSYLA (29)	ATSSRAT(32)	QQYGTSPWT (36)
AGEN1896	RASQSVSSYLA (29)	GASSRAT(33)	QQYGSSPFT (37)
AGEN1897	RASQSVSRYLG (4)	GASTRAT(5)	QQYGSSPWT (6)
AGEN1898	RASQSVSSYLA (29)	ATSSRAT(32)	QQYGTSPWT (36)
AGEN1899	RASQSVSSYLA (29)	GASSRAT(33)	QQYGSSPFT (37)
AGEN1900	RASQSVSSYLA (29)	GASNRAT(35)	QQYGSSPFT (37)
AGEN1901	RASQSVGTYLA (30)	GASRRAT(31)	QQYGSSPWT (6)
AGEN1902	RASQSVSSYLA (29)	GASSRAT(33)	QQYGSSPFT (37)

[0132] ²表3中的VL CDR按照Kabat确定。[0133] 表4. 示例性抗-CTLA-4抗体的VH框架 (FR) 序列³

[0134]

抗体	VH FR1 (SEQ ID NO:)	VH FR2 (SEQ ID NO:)	VH FR3 (SEQ ID NO:)	VH FR4 (SEQ ID NO:)
AGEN1884 w	EVQLVESGGGLVKPGG SLRLSCAASGFTFS (48)	WVRQAPGKG LEWVS (49)	RFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTV SS (51)
AGEN1885	EVQLVESGGGLVKPGG SLRLSCAASGFTFS (48)	WVRQAPGKG LEWVS (49)	RFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTV SS (51)
AGEN1886	EVQLVESGGGLVKPGG SLRLSCAASGFTFS (48)	WVRQAPGKG LEWVS (49)	RFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTV SS (51)
AGEN1887	EVQLLES GGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFS (52)	WVRQAPGKG LVWVS (53)	RFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTV SS (51)
AGEN1888	EVQLLES GGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFS (52)	WVRQAPGKG LVWVS (53)	RFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTV SS (51)
AGEN1889	EVQLVESGGGLVKPGG SLRLSCAASGFTFS (48)	WVRQAPGKG LEWVS (49)	RFTISRDNAKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (54)	WGQGTMTV SS (51)
AGEN1890	EVQLVESGGGLVKPGG SLRLSCAASGFTFS (48)	WVRQAPGKG LEWVS (49)	RFTISRDNAKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (54)	WGQGTMTV SS (51)
AGEN1891	EVQLVESGGGLVKPGG SLRLSCAASGFTFS (48)	WVRQAPGKG LEWVS (49)	RFTISRDNAKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (54)	WGQGTMTV SS (51)
AGEN1892	EVQLVESGGGLVKPGG SLRLSCAASGFTFS (48)	WVRQAPGKG LEWVS (49)	RFTISRDNAKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (54)	WGQGTMTV SS (51)
AGEN1893	EVQLLES GGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFS (55)	WVRQAPGKG LEWVS (49)	RFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTV SS (51)
AGEN1894	EVQLLES GGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFS (55)	WVRQAPGKG LEWVS (49)	RFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTV SS (51)

[0135]

AGEN1895	EVQLLESGGGLVKPGG SLRLSCAASGFTFS (55)	WVRQAPGKG LEWVS (49)	RFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVTV SS (51)
AGEN1896	EVQLLESGGGLVKPGG SLRLSCAASGFTFS (55)	WVRQAPGKG LEWVS (49)	RFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVTV SS (51)
AGEN1897	EVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFS (52)	WVRQAPGKG LVWVS (53)	RFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVTV SS (51)
AGEN1898	EVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFS (52)	WVRQAPGKG LVWVS (53)	RFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVTV SS (51)
AGEN1899	EVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFS (52)	WVRQAPGKG LVWVS (53)	RFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVTV SS (51)
AGEN1900	EVQLLESGGGLVQPGG SLRLSCAASGFTFS (52)	WVRQAPGKG LVWVS (53)	RFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVTV SS (51)
AGEN1901	EVQLVESGGGLVQPGG SLTLSCAASGFTFS (56)	WVRQAPGKG LEWVS (49)	RFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVTV SS (51)
AGEN1902	EVQLVESGGGLVQPGG SLTLSCAASGFTFS (56)	WVRQAPGKG LEWVS (49)	RFTISRDNAKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAR (50)	WGQGTMTVTV SS (51)

[0136] ³表4中所述的VH框架区基于Kabat编号系统对于CDR的边界确定。换句话说，VH CDR通过Kabat确定且框架区是以FR1、CDRH1、FR2、CDRH2、FR3、CDRH3和FR4的形式在可变区中围绕CDR的氨基酸残基。

[0137] 表5. 示例性抗-CTLA-4抗体的VL框架 (FR) 序列⁴

[0138]

抗体	VL FR1 (SEQ ID NO:)	VL FR2 (SEQ ID NO:)	VL FR3 (SEQ ID NO:)	VL FR4 (SEQ ID NO:)
AGEN1884 _w	EIVLTQSPGTLSS PGERATLSC (57)	WYQQKPGQA PRLIIY (58)	GIPDRFSGSGSDFTLT ITRLEPEDFAVYYC (59)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1885	EIVLTQSPATLSL PGERATLSC (61)	WYQQKPGQA PSLLIY (64)	GIPDRFSGSVSGDFTLT ISRLEPEDFAVYYC (63)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1886	EIVLTQSPATLSFS PGERATLSC (66)	WYQQKPGQA PRLIIY (58)	GIPDRFSGSGSDFTFT ISRLEPEDFAVYYC (67)	FGPGTKVDIK (68)
AGEN1887	EIVLTQSPGTLSS PGERATLSC (57)	WYQQKPGQA PRLIIY (58)	GIPDRFSGSGSDFTLT ITRLEPEDFAVYYC (59)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1888	EIVLTQSPATLSFS PGERATLSC (66)	WYQQKPGQA PRLIIY (58)	GIPDRFSGSGSDFTFT ISRLEPEDFAVYYC (67)	FGPGTKVDIK (68)
AGEN1889	EIVLTQSPATLSL PGERATLSC (61)	WYQHKVGQA PRLIIY (62)	GIPDRFSGSGSDFTLT ISRLEPEDFAVYYC (63)	FGQGTKVEIK (60)

[0139]

AGEN1890	EIVLTQSPATLSFS PGERATLSC (66)	WYQQKPGQA PRLLIY (58)	GIPDRFSGSGSGTDFTFT ISRLEPEDFAVYYC (67)	FGPGTKVDIK (68)
AGEN1891	EIVLTQSPATLSVS PGERATLSC (69)	WYQQKPGQA PRLLIY (58)	GIPDRFSGSASGTDFTLT ISRLEPEDFAVYYC (70)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1892	EIVLTQSPATLSLS PGERATLSC (61)	WYQQKPGQA PRLLIY (58)	GIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYC (71)	FGPGTKVDIK (68)
AGEN1893	EIVLTQSPATLSLS PGERATLSC (61)	WYQHKVGQA PRLLIY (62)	GIPDRFSGSGSGTDFTLT ISRLEPEDFAVYYC (63)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1894	EIVLTQSPGTLSS PGERATLSC (57)	WYQQKPGQA PRLLIY (58)	GIPDRFSGSGSGTDFTLT ITRLEPEDFAVYYC (59)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1895	EIVLTQSPATLSLS PGERATLSC (61)	WYQQKPGQA PSLLIY (64)	GIPDRFSGSVSGTDFTLT ISRLEPEDFAVYYC (63)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1896	EIVLTQSPATLSFS PGERATLSC (66)	WYQQKPGQA PRLLIY (58)	GIPDRFSGSGSGTDFTFT ISRLEPEDFAVYYC (67)	FGPGTKVDIK (68)
AGEN1897	EIVLTQSPGTLSS PGERATLSC (57)	WYQQKPGQA PRLLIY (58)	GIPDRFSGSGSGTDFTLT ITRLEPEDFAVYYC (59)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1898	EIVLTQSPATLSLS PGERATLSC (61)	WYQQKPGQA PSLLIY (64)	GIPDRFSGSVSGTDFTLT ISRLEPEDFAVYYC (63)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1899	EIVLTQSPATLSFS PGERATLSC (66)	WYQQKPGQA PRLLIY (58)	GIPDRFSGSGSGTDFTFT ISRLEPEDFAVYYC (67)	FGPGTKVDIK (68)
AGEN1900	EIVLTQSPATLSLS PGERATLSC (61)	WYQQKPGQA PRLLIY (58)	GIPARFSGSGSGTDFTLT ISSLEPEDFAVYYC (71)	FGPGTKVDIK (68)
AGEN1901	EIVLTQSPATLSLS PGERATLSC (61)	WYQHKVGQA PRLLIY (62)	GIPDRFSGSGSGTDFTLT ISRLEPEDFAVYYC (63)	FGQGTKVEIK (60)
AGEN1902	EIVLTQSPATLSFS PGERATLSC (66)	WYQQKPGQA PRLLIY (58)	GIPDRFSGSGSGTDFTFT ISRLEPEDFAVYYC (67)	FGPGTKVDIK (68)

[0140] ⁴表5中所述的VL框架区基于Kabat编号系统对于CDR的边界确定。换句话说,VL CDR通过Kabat确定且框架区是以FR1、CDRL1、FR2、CDRL2、FR3、CDRL3和FR4的形式在可变区中围绕CDR的氨基酸残基。

[0141] 表6. 示例性抗-CTLA-4抗体的VH和VL序列

[0142]

抗体	重链可变区	SEQ ID NO:	轻链可变区	SEQ ID NO:
AGEN1884w	BADD411-2354	7	BADD412-2376	8
AGEN1885	BADD411-2354	7	BADD412-2382	44
AGEN1886	BADD411-2354	7	BADD412-2384	45

[0143]

AGEN1887	BADD412-2356	38	BADD412-2376	8
AGEN1888	BADD412-2356	38	BADD412-2384	45
AGEN1889	BADD412-2357	39	BADD412-2367	43
AGEN1890	BADD412-2357	39	BADD412-2384	45
AGEN1891	BADD412-2357	39	BADD412-2390	46
AGEN1892	BADD412-2357	39	BADD412-2393	47
AGEN1893	BADD412-2358	40	BADD412-2367	43
AGEN1894	BADD412-2358	40	BADD412-2376	8
AGEN1895	BADD412-2358	40	BADD412-2382	44
AGEN1896	BADD412-2358	40	BADD412-2384	45
AGEN1897	BADD412-2359	41	BADD412-2376	8
AGEN1898	BADD412-2359	41	BADD412-2382	44
AGEN1899	BADD412-2359	41	BADD412-2384	45
AGEN1900	BADD412-2359	41	BADD412-2393	47
AGEN1901	BADD412-2360	42	BADD412-2367	43
AGEN1902	BADD412-2360	42	BADD412-2384	45

[0144] 表7.CTLA-4和家族成员的示例性序列

[0145]

SEQ ID NO:	描述	氨基酸序列
77	人 CTLA-4 (P16410)	MACLGFRHKAQLNLATRTWPCTLLFFLLFIPVFCKAMH VAQPAVVLASSRGIA SFVCEYASPGKATEVRVTVLRQAD SQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQ GLRAMDTGLYICKVELMYPPPPYYLGIGNGTQIYVIDPEPC PDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKMLKKRSPLT TGVYVKMPPTPECEKQFQPYFIPIN
78	CTLA-4 表位	QVT
79	CTLA-4 表位	YPPPPYYLGIGNGTQI
80	CTLA-4 表位	YLG I
81	CTLA-4 表位	MYPPPPYY
82	CTLA-4 表位	YPPPPYYLG I
83	CTLA-4 表位	YLGIGNGTQI
84	MACFA CTLA-4 (G7PL88)	MACLGFRHKAQLNLATRTWPCTLLFFLLFIPVFCKAMH VAQPAVVLANSRGIA SFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADS QVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQG LRAMDTGLYICKVELMYPPPPYYMGIGNGTQIYVIDPEPCP DSDDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKMLKKRSPLTT GVYVKMPPTPECEKQFQPYFIPIN

[0146]

85	小鼠 CTLA-4 (P09793)	MACLGLRRYKAQLQLPSRTWPFVALLTLLFIPVFSEAIQV TQPSVVLASSHGVASFPCEYSPSHNTDEVVRTVLRQTN DQMTEVCATTFTTEKNTVGFLDYPFCSGTFNESRVNLTIQ GLRAVDTGlyLCKVELMYPPPYFVGMGNGTQIYVIDPEP CPDSDFLWILVAVSLGLFFYSFLVSAVSLSKMLKKRSPL TTGVYVKMPTEPECEKQFQPYFIPIN
86	大鼠 CTLA-4 (Q62859)	MACLGLQRYKTHLQLPSRTWPFVLLSLLFIPIFSEAIQVT QPSVVLASSHGVASFPCEYASSHNTDEVVRTVLRQTN QVTEVCATTFTVKNTLGFLDDPFCSGTFNESRVNLTIQG LRAADTGlyFCKVELMYPPPYFVGMGNGTQIYVIDPEPC PDSDFLWILAAVSSGLFFYSFLVTAVSLNRTLKKRSPLT TGVYVKMPTEPECEKQFQPYFIPIN
87	人 CD28 (P10747)	MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLS KYSYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVYGNYSQQQLQV YSKTGFNC DGKLGNESVTfYLQNLVYNQTDIYFCKIEVM YPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKPFVWL VVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMT PRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS
88	人 ICOS (Q9Y6W8)	MKSGLWYFFLFCRLIKVLTGEINGSANYEMFIFHNGGVQI LCKYPDIVQQFKMQLLKGGQILCDLTCTKSGSNTVSIKSL KFCHSQLSNNSVSFFLYNLDHSHANYFCNLSIFDPPPF KVTLTGGYLHIYESQLCCQLKFWLPICAAFFVVCILGCIL ICWLTKKKYSSSVHDPNGEYMFMRVNTAKKSRLTDVTL
89	人 BTLA (Q7Z6A9)	MKTLPAMLGTGKLFWVFFLIPYLDIWNHIGKESCDVQLYI KRQSEHSILAGDPFELECPVKYCANRPHVTWCKLNGTT CVKLEDRQTSWKEEKNIFFILHFEPVLPNDNGSYRCSA NFQSNLIESHSTTLVTDVKSASERPSKDEMASRPWLLY RLLPLGGLPLLITTCFCLFCCLRRHQGKQNELSDTAGREI NLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFR MQEGSEVYSNPCLEENKPGIVYASLNHSHVIGPNSRLARN VKEAPTEYASICVRS
90	人 PD-1 (Q15116)	MQIPQAPWPVWVAVLQLGWRPGWFLDSPDRPWNPPTF SPALLVVTEGDNATFTCSFSNTSESVLWYRMSPSNQ TDKLAAPFEDRSQPGQDCRFRTQLPNGRDFHMSVVR ARRNDSGYLCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVP TAHPSPSPRPAGQFQTLVVGVGGLLSLVLVWVLA CSRAARGTIGARRTGQPLKEDPSAVPVFVSVDYGELDFQ WREKTPEPPVPCVPEQTEYATIVFPSGMGTSSPARRGS ADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL

[0147] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人CTLA-4蛋白的分离的抗体,包含:

[0148] (a) 包含氨基酸序列SYX₁MX₂ (SEQ ID NO:22)的CDRH1,其中X₁是S或A;和X₂是N或S;和/或

[0149] (b) 包含氨基酸序列SISSSSSYIYADSVKG (SEQ ID NO:2)的CDRH2;和/或

[0150] (c) 包含氨基酸序列VGLMGPFXI (SEQ ID NO:23)的CDRH3,其中X是D或N;和/或

[0151] (d) 包含氨基酸序列RASQSVX₁X₂YLX₃ (SEQ ID NO:24)的CDRL1,其中X₁是S或G;X₂是R、S或T;和X₃是G或A;和/或

[0152] (e) 包含氨基酸序列X₁X₂SX₃RAT (SEQ ID NO:25)的CDRL2,其中:X₁是G或A;X₂是A或T;和X₃是T、S、R或N;和/或

[0153] (f) 包含氨基酸序列QQYGX₁SPX₂T (SEQ ID NO:26)的CDRL3,其中:X₁是S或T;和X₂是W或F。

[0154] 在某些实施方式中,所述抗体包含上述VH CDR中的一个、两个或全部三个。在某些

实施方式中,所述抗体包含表2中抗体之一的CDRH1。在某些实施方式中,所述抗体包含表2中抗体之一的CDRH2。在某些实施方式中,所述抗体包含表2中抗体之一的CDRH3。在某些实施方式中,所述抗体包含表2中抗体之一的VH CDR中的一个、两个或全部三个(例如,表2的一行中的VH CDR,例如,所有VH CDR来自抗体AGEN1884w)。在某些实施方式中,所述抗体包含本文所述的VH框架。在某些实施方式中,所述抗体包含表4中所示抗体的VH框架区(例如,表4的一行中的一个、两个、三个或四个框架区)。

[0155] 在某些实施方式中,所述抗体包含上述VL CDR中的一个、两个或全部三个。在某些实施方式中,所述抗体包含表3中抗体之一的CDRL1。在某些实施方式中,所述抗体包含表3中抗体之一的CDRL2。在某些实施方式中,所述抗体包含表3中抗体之一的CDRL3。在某些实施方式中,所述抗体包含表3中抗体之一的一个、两个或全部三个VL CDR(例如,表3的一行中的VL CDR,例如,所有VL CDR来自抗体AGEN1884w)。在某些实施方式中,所述抗体包含本文所述的VL框架区。在某些实施方式中,所述抗体包含表5中所示抗体的VL框架区(FR)(例如,表5的一行中的一个、两个、三个或四个框架区)。

[0156] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人CTLA-4蛋白的分离的抗体,包含含有互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3的重链可变区及含有互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3的轻链可变区,其中:

[0157] (a) CDRH1包含氨基酸序列SYX₁MX₂(SEQ ID NO:22),其中X₁是S或A;和X₂是N或S;

[0158] (b) CDRH2包含氨基酸序列SISSSSSYIYYADSVKG(SEQ ID NO:2);

[0159] (c) CDRH3包含氨基酸序列VGLMGPFXI(SEQ ID NO:23),其中X是D或N;

[0160] (d) CDRL1包含氨基酸序列RASQSVX₁X₂YLX₃(SEQ ID NO:24),其中X₁是S或G;X₂是R、S或T;和X₃是G或A;

[0161] (e) CDRL2包含氨基酸序列X₁X₂SX₃RAT(SEQ ID NO:25),其中X₁是G或A;X₂是A或T;和X₃是T、S、R或N;和

[0162] (f) CDRL3包含氨基酸序列QQYGX₁SPX₂T(SEQ ID NO:26),其中X₁是S或T;和X₂是W或F。

[0163] 在某些实施方式中,CDRH1包含选自SEQ ID NO:1和27的氨基酸序列。在某些实施方式中,CDRH3包含选自SEQ ID NO:3和28的氨基酸序列。在某些实施方式中,CDRL1包含选自SEQ ID NO:4、29和30的氨基酸序列。在某些实施方式中,CDRL2包含选自SEQ ID NO:5和31-35的氨基酸序列。在某些实施方式中,CDRL3包含选自SEQ ID NO:6、36和37的氨基酸序列。在某些实施方式中,CDRH1、CDRH2和CDRH3分别包含表2中抗体的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列。在某些实施方式中,CDRL1、CDRL2和CDRL3分别包含表3中抗体的CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

[0164] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人CTLA-4蛋白的分离的抗体,包含含有互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3的重链可变区,其中CDRH1、CDRH2和CDRH3分别包含SEQ ID NO:1、2和3;27、2和3;或27、2和28中所示的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列。

[0165] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人CTLA-4蛋白的分离的抗体,包含含有互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3的轻链可变区,其中CDRL1、CDRL2和CDRL3分别包含SEQ ID NO:4、5和6;29、32和36;29、33和37;30、31和6;29、34和6;或29、35和37中所示的CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

[0166] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人CTLA-4蛋白的分离的抗体,包含含有互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3的重链可变区,及含有互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3的轻链可变区,其中CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3分别包含SEQ ID NO: 1、2、3、4、5和6;1、2、3、29、32和36;1、2、3、29、33和37;27、2、3、4、5和6;27、2、3、29、33和37;1、2、3、30、31和6;1、2、3、29、34和6;1、2、3、29、35和37;27、2、28、4、5和6;27、2、28、29、32和36;27、2、28、29、33和37;或27、2、28、29、35和37中所示的CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3氨基酸序列。

[0167] 在某些实施方式中,所述抗体包含含有CDRH1、CDRH2和CDRH3区的重链可变区及含有CDRL1、CDRL2和CDRL3区的轻链可变区,其中CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3区分别包含SEQ ID NO:1、2、3、4、5和6中所示的氨基酸序列。

[0168] 在某些实施方式中,抗体的CDR可以按照Chothia编号方案确定,该Chothia编号方案涉及免疫球蛋白结构环的位置(参见,例如,Chothia C&Lesk AM, (1987), J Mol Biol 196:901-917;Al-Lazikani B等, (1997) J Mol Biol 273:927-948;Chothia C等, (1992) J Mol Biol 227:799-817;Tramontano A等, (1990) J Mol Biol 215(1):175-82;和U.S. 专利 No.7,709,226)。通常,当使用Kabat编号规则时,Chothia CDRH1环存在于重链氨基酸26-32、33或34处,Chothia CDRH2环存在于重链氨基酸52-56处,且Chothia CDRH3环存在于重链氨基酸95-102处,而Chothia CDRL1环存在于轻链氨基酸24-34处,Chothia CDRL2环存在于轻链氨基酸50-56处,和Chothia CDRL3环存在于轻链氨基酸89-97处。当使用Kabat编号规则编号时,Chothia CDRH1环的末尾在H32和H34之间变化,这取决于该环的长度(这是因为Kabat编号方案设置H35A和H35B处的插入。如果35A和35B都不存在,则环结束于32;如果仅35A存在,则环结束于33;如果35A和35B都存在,则环结束于34)。

[0169] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人CTLA-4蛋白的分离的抗体,该抗体包含本文表6中公开的抗体(例如,AGEN1884w或AGEN2041w)的VL的Chothia VL CDR。在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人CTLA-4蛋白的分离的抗体,该抗体包含本文表6中公开的抗体(例如,AGEN1884w或AGEN2041w)的Chothia VH CDR。在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人CTLA-4蛋白的分离的抗体,该抗体包含本文表6中公开的抗体(例如,AGEN1884w或AGEN2041w)的Chothia VH CDR和Chothia VL CDR。在某些实施方式中,特异性地结合人CTLA-4蛋白的抗体包含一个或多个CDR,其中Chothia和Kabat CDR具有相同的氨基酸序列。在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人CTLA-4蛋白且包含Kabat CDR和Chothia CDR的组分的分离的抗体。

[0170] 在某些实施方式中,抗体的CDR可以按照IMGT编号系统确定,如Lefranc M-P, (1999) The Immunologist 7:132-136和Lefranc M-P等, (1999) Nucleic Acid Res 27:209-212中所述的。按照IMGT编号方案,CDRH1在位置26-35处,CDRH2在位置51-57处,CDRH3在位置93-102处,CDRL1在位置27-32处,CDRL2在位置50-52处,和CDRL3在位置89-97处。在特定的实施方式中,本公开提供了特异性地结合人CTLA-4蛋白且包含本文表6中公开的抗体(例如,AGEN1884w或AGEN2041w)的CDR的抗体,如通过IMGT编号系统确定的,例如,如Lefranc M-P (1999),同上和Lefranc M-P等, (1999),同上中所述的。

[0171] 在某些实施方式中,抗体的CDR可以按照MacCallum RM等, (1996) J Mol Biol 262:732-745确定。也参见,例如,Martin A. "Protein Sequence and Structure Analysis

of Antibody Variable Domains,”in Antibody Engineering, Kontermann和Dübel, eds., Chapter 31, pp.422-439, Springer-Verlag, Berlin (2001)。在特定的实施方式中,本公开提供了特异性地结合人CTLA-4蛋白且包含本文表6中公开的抗体(例如,AGEN1884w或AGEN2041w)的CDR的抗体,如通过MacCallum RM等的方法确定的。

[0172] 在某些实施方式中,抗体的CDR可以按照AbM编号方案确定,该方案涉及AbM高变区,其代表Kabat CDR和Chothia结构环之间的折衷,且由Oxford Molecular’s AbM抗体建模软件(Oxford Molecular Group, Inc.)使用。在特定的实施方式中,本公开提供了特异性地结合人CTLA-4蛋白且包含本文表6中公开的抗体(例如,AGEN1884w或AGEN2041w)的CDR的抗体,如通过AbM编号方案确定的。

[0173] 因此,在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人CTLA-4蛋白的分离的抗体,其中所述抗体包含含有SEQ ID NO:7中所示的CDRH1、CDRH2和CDRH3区氨基酸序列的重链可变区及SEQ ID NO:8中所示的CDRL1、CDRL2和CDRL3区氨基酸序列,其中各CDR按照Kabat定义、Chothia定义、Kabat定义和Chothia定义的组合、IMGT编号系统、AbM定义或CDR的接触定义限定。

[0174] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人CTLA-4蛋白的分离的抗体,该抗体包含含有CDRH1、CDRH2和CDRH3区的重链可变区及含有CDRL1、CDRL2和CDRL3区的轻链可变区,其中CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3区分别包含SEQ ID NO:16、17、18、19、20和21中所示的氨基酸序列。

[0175] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人CTLA-4蛋白的分离的抗体,包含含有SEQ ID NO:72的氨基酸序列的重链可变区。

[0176] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人CTLA-4蛋白的分离的抗体,其包含具有源自人IGHV3-21种系序列的氨基酸序列的重链可变区。选自框架1、框架2、框架3、CDRH1和CDRH2的一个或多个区(例如,这些区中的两个、三个、四个或五个)可以源自人IGHV3-21种系序列。在一个实施方式中,框架1、框架2、框架3、CDRH1和CDRH2全部源自人IGHV3-21种系序列。

[0177] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人CTLA-4蛋白的分离的抗体,包含含有与选自SEQ ID NO:7和38-42的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%或100%(例如,至少86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%)同一的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含具有选自SEQ ID NO:7和38-42的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含具有SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含具有SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,所述抗体包含具有SEQ ID NO:93所示的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,所述抗体包含具有SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,所述抗体包含具有SEQ ID NO:94所示的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,所述抗体包含具有SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列的重链。在某些实施方式中,所述抗体包含具有SEQ ID NO:97所示的氨基酸序列的重链。

[0178] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人CTLA-4蛋白的分离的抗体,包含含有SEQ ID NO:73的氨基酸序列的轻链可变区。

[0179] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人CTLA-4蛋白的分离的抗体,包

含具有源自人IGKV3-20或IGKV3-11种系序列的氨基酸序列的轻链可变区。选自框架1、框架2、框架3、CDRL1和CDRL2的一个或多个区(例如,这些区中的两个、三个、四个或五个)可以源自人IGKV3-20或IGKV3-11种系序列。在一个实施方式中,框架1、框架2、框架3、CDRL1和CDRL2全部源自人IGKV3-20或IGKV3-11种系序列。

[0180] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人CTLA-4蛋白的分离的抗体,包含含有与选自SEQ ID NO:8和43-47的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%或100%(例如,至少86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%)同一的氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含具有选自SEQ ID NO:8和43-47的氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含具有SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含具有SEQ ID NO:13中所示的氨基酸序列的轻链。在某些实施方式中,所述抗体包含具有SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列的轻链。

[0181] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人CTLA-4蛋白的分离的抗体,包含具有源自人IGHV3-21种系序列的氨基酸序列的重链可变区,和具有源自人IGKV3-20或IGKV3-11种系序列的氨基酸序列的轻链可变区。选自框架1、框架2、框架3、CDRH1和CDRH2的一个或多个区(例如,这些区中的两个、三个、四个或五个)可以源自人IGHV3-21种系序列。在一个实施方式中,框架1、框架2、框架3、CDRH1和CDRH2全部源自人IGHV3-21种系序列。选自框架1、框架2、框架3、CDRL1和CDRL2的一个或多个区(例如,这些区中的两个、三个、四个或五个)可以源自人IGKV3-20或IGKV3-11种系序列。在一个实施方式中,框架1、框架2、框架3、CDRL1和CDRL2全部源自人IGKV3-20或IGKV3-11种系序列。

[0182] 在某些实施方式中,本公开提供了特异性地结合人CTLA-4蛋白的分离的抗体,包含含有与选自SEQ ID NO:7和38-42的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%或100%(例如,至少86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%)同一的氨基酸序列的重链可变区,及含有与选自SEQ ID NO:8和43-47的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%或100%(例如,至少86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%)同一的氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含具有选自SEQ ID NO:7和38-42的氨基酸序列的重链可变区及具有选自SEQ ID NO:8和43-47的氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含分别SEQ ID NO:7和8;7和44;7和45;38和8;38和45;39和43;39和45;39和46;39和47;40和43;40和8;40和44;40和45;41和8;41和44;41和45;41和47;42和43;或42和45中所示的重链可变区和轻链可变区氨基酸序列。在某些实施方式中,所述抗体包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的重链可变区;和含有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施方式中,所述抗体包含含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的重链;和含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链。在某些实施方式中,所述抗体包含含有SEQ ID NO:93的氨基酸序列的重链;和含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链。在某些实施方式中,所述抗体包含含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的重链;和含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链。在某些实施方式中,所述抗体包含含有SEQ ID NO:94的氨基酸序列的重链;和含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链。在某些实施方式中,所述抗体包含含有SEQ ID NO:76的氨基酸序列的重链;和含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链。在某些实施方式中,所述抗体包含含有SEQ ID NO:97的氨基酸序列的重链;和含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的轻链。

[0183] 在某些实施方式中,本公开提供了与包含分别SEQ ID NO:7和8中所示的重链和轻链可变区氨基酸序列的抗体交叉竞争与人CTLA-4蛋白的结合的分离的抗体。

[0184] 在某些实施方式中,本公开提供了与包含分别SEQ ID NO:7和8中所示的重链和轻链可变区氨基酸序列的抗体结合相同的人CTLA-4蛋白上的表位的分离的抗体。

[0185] 任何Ig恒定区可以用于本文公开的抗体中。在某些实施方式中,Ig区是人IgG₁或人IgG₂重链恒定区。

[0186] 在某些实施方式中,本文所述的抗体的IgG区具有提高的对CD32B(也称为Fc γ RIIB或FCGR2B)的亲和力,例如,如与具有野生型Fc区,例如,IgG₁Fc的抗体相比的。在某些实施方式中,本文所述的抗体具有相对于CD32A(Fc γ RIIA)和CD16(Fc γ RIIIA)两者选择性提高的对CD32B(Fc γ RIIB)的亲和力。导致对CD32B的提高的亲亲和力的序列改变是本领域中已知的,例如,在Mimoto等,Protein Engineering,Design&Selection 10:589-598(2013),Chu等,Molecular Immunology 45:3926-3933(2008)和Strohl,Current Opinion in Biology 20:685-691(2009)中,其各自通过引用全文并入本文中。在某些实施方式中,所述抗体包含含有选自以下的突变的重链恒定区,例如,IgG₁恒定区,或其片段:G236D、P238D、S239D、S267E、L328F和L328E及其组合,按照EU索引编号的(Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,U.S.Department of Health and Human Services,Bethesda(1991))。在某些实施方式中,所述抗体包含含有S267E和L328F置换的重链恒定区,例如,IgG₁恒定区,或其片段。在某些实施方式中,所述抗体包含含有P238D和L328E置换的重链恒定区,例如,IgG₁恒定区,或其片段。在某些实施方式中,所述抗体包含含有P238D置换和选自E233D、G237D、H268D、P271G、A330R及其组合的置换的重链恒定区,例如,IgG₁恒定区,或其片段。在某些实施方式中,所述抗体包含含有P238D、E233D、G237D、H268D、P271G和A330R置换的重链恒定区,例如,IgG₁恒定区,或其片段。在某些实施方式中,所述抗体包含含有G236D和S267E的重链恒定区,例如,IgG₁恒定区,或其片段。在某些实施方式中,所述抗体包含含有S239D和S267E的重链恒定区,例如,IgG₁恒定区,或其片段。在某些实施方式中,所述抗体包含含有V262E、S267E和L328F的重链恒定区,例如,IgG₁恒定区,或其片段。在某些实施方式中,所述抗体包含含有V264E、S267E和L328F的重链恒定区,例如,IgG₁恒定区,或其片段。

[0187] 在某些实施方式中,本文所述抗体的IgG区具有对于Fc γ RIIIA的提高的亲和力,例如,如与具有野生型Fc区,例如,IgG₁Fc的抗体相比的。导致对Fc γ RIIIA的提高的亲亲和力的序列改变是本领域中已知的,例如,在Kellner等,Methods 65:105-113(2014),Lazar等,Proc Natl Acad Sci 103:4005-4010(2006),Shields等,J Biol Chem.276(9):6591-6604(2001)中,其各自通过引用全文并入本文中。在某些实施方式中,所述抗体包含含有选自以下的突变的重链恒定区,例如,IgG₁恒定区,或其片段:G236A、S239D、F243L、T256A、K290A、R292P、S298A、Y300L、V305I、A330L、I332E、E333A、K334A、A339T和P396L及其组合,按照EU索引编号的(Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,U.S.Department of Health and Human Services,Bethesda(1991))。在某些实施方式中,所述抗体包含含有S239D的重链恒定区,例如,IgG₁恒定区,或其片段。在某些实施方式中,所述抗体包含含有T256A的重链恒定区,例如,IgG₁恒定区,或其片段。在某些实施方式中,所述抗体包含含有K290A的重链恒定区,例如,IgG₁恒定区,或其片段。在某些实施方式中,

所述抗体包含含有S298A的重链恒定区,例如,IgG1恒定区,或其片段。在某些实施方式中,所述抗体包含含有I332E的重链恒定区,例如,IgG1恒定区,或其片段。在某些实施方式中,所述抗体包含含有E333A的重链恒定区,例如,IgG1恒定区,或其片段。在某些实施方式中,所述抗体包含含有K334A的重链恒定区,例如,IgG1恒定区,或其片段。在某些实施方式中,所述抗体包含含有A339T的重链恒定区,例如,IgG1恒定区,或其片段。在某些实施方式中,所述抗体包含含有S239D和I332E的重链恒定区,例如,IgG1恒定区,或其片段。在某些实施方式中,所述抗体包含含有S239D、A330L和I332E的重链恒定区,例如,IgG1恒定区,或其片段。在某些实施方式中,所述抗体包含含有S298A、E333A和K334A的重链恒定区,例如,IgG1恒定区,或其片段。在某些实施方式中,所述抗体包含含有G236A、S239D和I332E的重链恒定区,例如,IgG1恒定区,或其片段。在某些实施方式中,所述抗体包含含有F243L、R292P、Y300L、V305I和P396L的重链恒定区,例如,IgG1恒定区,或其片段。

[0188] 在某些实施方式中,本文所述的抗体表现出抗体-依赖性细胞毒性 (ADCC) 活性。在某些实施方式中,本文所述的抗体启动天然杀伤细胞介导的细胞耗竭。在某些实施方式中,本文所述的抗体用于治疗天然杀伤细胞浸润的肿瘤。在某些实施方式中,本文所述的抗体表现出抗体-依赖性细胞吞噬 (ADCP) 活性。在某些实施方式中,本文所述的抗体启动巨噬细胞介导的细胞耗竭。在某些实施方式中,本文所述的抗体用于治疗巨噬细胞浸润的肿瘤。在某些实施方式中,本文所述的抗体选择性地耗竭肿瘤内调节性T细胞。

[0189] 在某些实施方式中,本文公开的抗体是可激活的抗体,其在激活状态中结合人CTLA-4蛋白。在某些实施方式中,可激活的抗体包含屏蔽部分 (masking moiety),其抑制未切割状态的抗体与人CTLA-4蛋白的结合,及至少一个与抗体偶联的可切割部分,例如,其中可切割部分是起到在肿瘤微环境中富集的蛋白酶的底物的作用的多肽。示例性的可激活抗体公开于例如,U.S. 专利No. 8,513,390和8,518,404及U.S. 专利申请公开No. US 2014/0255313,US 2014/0010810,US 2014/0023664中,其通过引用并入本文中。在某些实施方式中,可激活抗体包含作为野生型人IgG重链恒定区的变体的人IgG重链恒定区,其中变体人IgG重链恒定区以比野生型人IgG重链恒定区结合人Fc γ RIIIA更高的亲和力结合人Fc γ RIIIA。

[0190] 5.3 药物组合物

[0191] 本文提供了在生理上可接受的载体、赋形剂或稳定剂中包含具有所需纯度水平的本文所述的抗-CTLA-4抗体的组合物 (Remington's Pharmaceutical Sciences (1990) Mack Publishing Co., Easton, PA)。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所使用的剂量和浓度下对于接受者是无毒的,并包括缓冲剂如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂 (如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化己烷双胺;苯扎氯铵、苯索氯铵;酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量 (少于约10个残基) 多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖类,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐反离子,如钠;金属复合物 (例如,Zn-蛋白复合物) 和/或非离子表面活性剂,如TWEENTM、PLURONICSTM或聚乙二醇 (PEG)。

[0192] 在具体的实施方式中,药物组合物在药学上可接受的载体中包含本文所述的抗-

CTLA-4抗体和任选地一种或多种另外的预防或治疗剂。在具体的实施方式中,药物组合物在药学上可接受的载体中包含有效量的本文所述的抗体或其抗原结合片段和任选地一种或多种另外的预防或治疗剂。在一些实施方式中,抗体是包括在药物组合物中的唯一活性成分。本文所述的药物组合物可用于抑制CTLA-4活性和治疗病症如癌症或传染性疾病。

[0193] 在一个方面,本文提供了包含本发明的抗-CTLA-4抗体和药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物,其用作药物。

[0194] 在一个方面,本文提供了包含本发明的抗-CTLA-4抗体和药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物,其用于治疗癌症的方法中。

[0195] 用于肠胃外制剂中的药学上可接受的载体包括水性媒介物、非水性媒介物、抗微生物剂、等渗剂、缓冲剂、抗氧化剂、局部麻醉剂、助悬剂和分散剂、乳化剂、掩蔽剂或螯合剂和其它药学上可接受的物质。水性媒介物的实例包括氯化钠注射液、林格氏注射液、等渗葡萄糖注射液、无菌水注射液、葡萄糖和乳酸林格氏注射液。非水性肠胃外媒介物包括植物来源的不挥发性油、棉籽油、玉米油、芝麻油和花生油。可以向包装在多剂量容器中的肠胃外制剂中添加抑菌或抑真菌浓度的抗微生物剂,其包括苯酚类或甲酚类、汞剂、苯甲醇、氯丁醇、对羟基苯甲酸甲酯和丙酯、硫柳汞、苯扎氯铵和苄索氯铵。等渗剂包括氯化钠和葡萄糖。缓冲剂包括磷酸盐和柠檬酸盐。抗氧化剂包括硫酸氢钠。局部麻醉剂包括盐酸普鲁卡因。助悬剂和分散剂包括羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素和聚乙烯吡咯烷酮。乳化剂包括聚山梨醇酯80(TWEEN®80)。金属离子的掩蔽剂或螯合剂包括EDTA。药物载体还包括用于水混溶性媒介物的乙醇、聚乙二醇和丙二醇及用于pH调节的氢氧化钠、盐酸、柠檬酸或乳酸。

[0196] 药物组合物可以配制用于对受试者的任何施用途径。施用途径的具体实例包括鼻内、口服、肺、透皮、皮内和肠胃外。本文中设想肠胃外施用,特征为皮下、肌肉内或静脉内。注射剂可以以常规形式制备,或者作为液体溶液或悬浮液、适合于注射前在液体中溶解或悬浮的固体形式,或作为乳液。注射剂、溶液和乳液还包含一种或多种赋形剂。合适的赋形剂是,例如,水、盐水、右旋糖、甘油或乙醇。另外,如果需要,待施用的药物组合物还可以包含少量的非毒性辅助物质如湿润剂或乳化剂、pH缓冲剂、稳定剂、溶解性增强剂和其它这类试剂,如,例如,乙酸钠、单月桂酸山梨醇酐酯、油酸三乙醇胺和环糊精。

[0197] 用于抗体的肠胃外施用的制剂包括准备用于注射的无菌溶液、准备用于恰在使用前与溶剂组合的无菌干燥可溶性产物如冻干粉末,包括皮下注射片、准备用于注射的无菌悬浮液、准备用于恰在使用前与媒介物组合的无菌干燥不溶性产物和无菌乳液。溶液可以是水性的或非水性的。

[0198] 如果静脉内施用,合适的载体包括生理盐水或磷酸盐缓冲盐水(PBS),及包含增稠剂和增溶剂如葡萄糖、聚乙二醇和聚丙二醇及其混合物的溶液。

[0199] 包含抗体的局部混合物如对于局部和全身性施用所述制备。所得混合物可以是溶液、悬浮液、乳液等且可以配制为霜剂、凝胶、油膏、乳液、溶液、酞剂、洗剂、悬浮液、酞剂、贴片、泡沫剂、气雾剂、灌洗剂、喷雾剂、栓剂、创可贴、皮肤贴片或适合局部施用的任何其它制剂。

[0200] 本文所述的抗-CTLA-4抗体可以配置为用于局部应用的气雾剂,如通过吸入(参见,例如,U.S.专利No.4,044,126、4,414,209和4,364,923,其描述了用于递送可用于治疗

炎性疾病,特别是哮喘的类固醇的气雾剂)。用于施用于呼吸道的这些制剂可以是气雾剂或用于喷雾器的溶液的形式,或者为用于吹入的微细粉,单独或与惰性载体如乳糖组合。在这种情况下,在一个实施方式中,制剂的颗粒具有小于50微米的直径,在一个实施方式中小于10微米。

[0201] 本文所述的抗-CTLA-4抗体可以配置以凝胶、霜剂和洗剂的形式用于区域或局部应用,如用于局部应用于皮肤和粘膜(如在眼睛中),且用于应用于眼睛或者用于脑池内或脊柱内应用。局部施用设想用于透皮递送且也用于施用于眼睛或粘膜,或用于吸入疗法。抗体单独地或与其它药学上可接受的赋形剂组合的鼻用溶液也可施用。

[0202] 透皮贴片,包括离子电渗和电泳装置,是本领域技术人员公知的,且可以用于施用抗体。例如,这类贴片公开于U.S. 专利No.6,267,983、6,261,595、6,256,533、6,167,301、6,024,975、6,010715、5,985,317、5,983,134、5,948,433和5,860,957中。

[0203] 在某些实施方式中,包含本文所述的抗体或其抗原结合片段的药物组合物是冻干粉末,其可以重构用于作为溶液、乳液和其它混合物施用。它也可以重构并配制为固体或凝胶。冻干粉末通过溶解本文所述的抗体或其抗原结合片段或其药学上可接受的衍生物在适合的溶剂中来制备。在一些实施方式中,冻干粉末是无菌的。溶剂可以包含提高稳定性的赋形剂或者粉末或从粉末制备的重构溶液的其它药理组分。可以使用的赋形剂包括,但不限于右旋糖、山梨醇、果糖、玉米糖浆、木糖醇、甘油、葡萄糖、蔗糖或其它合适的试剂。溶剂还可以包含缓冲剂,如柠檬酸盐、磷酸钠或磷酸钾或者本领域技术人员已知在一个实施方式中,在大约中性pH下的其它这类缓冲剂。溶液的后续无菌过滤接着在本领域技术人员已知的标准条件下冻干提供了所需的制剂。在一个实施方式中,所得溶液分配到小瓶中用于冻干。各小瓶包含化合物的单一剂量或多个剂量。冻干粉末可以在适宜条件下储存,如在约4℃至室温下。这一冻干粉末用注射水重构提供了用于肠胃外施用的制剂。对于重构,冻干粉末添加到无菌水或其它合适的载体中。精确量取决于所选择的化合物。这种量可以经验地确定。

[0204] 本文所述的抗-CTLA-4抗体和本文提供的其它组合物也可以配制为靶向于待治疗受试者的特定组织、受体或其它身体区域。许多这类靶向方法是本领域技术人员公知的。所有这类靶向方法在本文中设想用于本组合物。对于靶向方法的非限制性实例,参见,例如, U.S. 专利No.6,316,652、6,274,552、6,271,359、6,253,872、6,139,865、6,131,570、6,120,751、6,071,495、6,060,082、6,048,736、6,039,975、6,004,534、5,985,307、5,972,366、5,900,252、5,840,674、5,759,542和5,709,874。在具体的实施方式中,本文所述的抗体或其抗原结合片段靶向于肿瘤。

[0205] 待用于体内施用的组合物可以是无菌的。这容易地通过经例如,无菌过滤膜的过滤完成。

[0206] 5.4使用方法

[0207] 在另一个方面,本公开提供了使用本文公开的抗-CTLA-4抗体治疗受试者的方法。受试者中受益于CTLA-4功能的抑制的任何疾病或障碍可以使用本文公开的抗-CTLA-4抗体来治疗。本文公开的抗-CTLA-4抗体特别可用于抑制对肿瘤的免疫系统耐受,且因此可用作癌症患者的免疫治疗。例如,在某些实施方式中,本公开提供了提高受试者中响应于抗原的T-细胞激活的方法,该方法包括向受试者施用有效量的如本文公开的抗-CTLA-4抗体或其

药物组合物。在某些实施方式中,本公开提供了治疗受试者的癌症的方法,该方法包括向受试者施用有效量的如本文公开的抗体或药物组合物。在某些实施方式中,受试者之前已接受免疫治疗。在某些实施方式中,受试者之前未接受任何免疫治疗。在某些实施方式中,癌症是晚期或转移性癌症。可以用本文公开的抗-CTLA-4抗体或药物组合物治疗的癌症包括,但不限于实体癌症(例如,复发性或难治性实体癌症,和晚期或转移性实体癌症)、癌瘤、肉瘤、黑素瘤(例如,III期或IV期黑素瘤)、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、尿路上皮癌、卵巢癌、前列腺癌(例如,转移性激素难治的前列腺癌和进行性转移性前列腺癌)、胰腺癌、乳腺癌(例如,HER2⁺乳腺癌(例如,复发性/难治性HER2⁺乳腺癌))、头颈癌(例如,复发性/难治性头颈鳞状细胞癌(HNSCC))、神经胶质瘤、恶性胶质瘤、多形性胶质母细胞瘤、脑转移瘤、Merkel细胞癌、胃癌、胃食管癌、肾细胞癌、葡萄膜黑素瘤、结肠癌、子宫颈癌、淋巴瘤(例如,复发性或难治性淋巴瘤)、非霍奇金淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤、白血病和多发性骨髓瘤。在某些实施方式中,癌症用本文公开的抗-CTLA-4抗体或药物组合物的肿瘤内施用来治疗。可以用本文公开的抗-CTLA-4抗体或药物组合物的肿瘤内施用治疗的癌症包括,但不限于实体肿瘤(例如,晚期或转移性实体肿瘤)、头颈癌(例如,复发性/难治性头颈鳞状细胞癌(HNSCC))和乳腺癌(例如,HER2⁺乳腺癌(例如,复发性/难治性HER2⁺乳腺癌))。

[0208] 可以用本文公开的抗-CTLA-4抗体或药物组合物治疗的另外的癌症包括,但不限于B细胞淋巴瘤(例如,B细胞慢性淋巴细胞性白血病、B细胞非霍奇金淋巴瘤、皮肤B细胞淋巴瘤、弥散性大B细胞淋巴瘤)、基底细胞癌、膀胱癌、胚细胞瘤、脑转移瘤、乳腺癌、Burkitt淋巴瘤、癌瘤(例如,腺癌(例如,胃食管连接部的腺癌))、子宫颈癌、结肠癌、结肠直肠癌(结肠癌和直肠癌)、子宫内膜癌、食管癌、尤文肉瘤、滤泡性淋巴瘤、胃癌、胃食管连接部癌、胃肠癌、成胶质细胞瘤(例如,多形性胶质母细胞瘤,例如,新诊断的或复发的)、神经胶质瘤、头颈癌(例如,头颈鳞状细胞癌)、肝转移、霍奇金和非霍奇金淋巴瘤、肾癌(例如,肾细胞癌和肾母细胞瘤)、喉癌、白血病(例如,慢性髓细胞性白血病、毛细胞白血病)、肝脏癌(例如,肝癌和肝细胞癌)、肺癌(例如,非小细胞肺癌和小细胞肺癌)、淋巴母细胞性淋巴瘤、淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、转移性脑瘤、转移性癌、骨髓瘤(例如,多发性骨髓瘤)、成神经细胞瘤、眼黑色素瘤、口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌(例如,胰腺导管腺癌(pancreatic ductal adenocarcinoma))、前列腺癌(例如,激素难治性(例如,去势抵抗性的)、转移性、转移性激素难治性(例如,去势抵抗性的、非雄激素依赖性的))、肾细胞癌(例如,转移性的)、唾液腺癌、肉瘤(例如,横纹肌肉瘤)、皮肤癌(例如,黑素瘤(例如,转移性黑素瘤))、软组织肉瘤、实体肿瘤、鳞状细胞癌、滑膜肉瘤(synovial sarcoma)、睾丸癌、甲状腺癌、移行细胞癌(泌尿道上皮细胞癌)、葡萄膜黑素瘤(例如,转移性的)、疣状癌、外阴癌和瓦氏巨球蛋白血症。

[0209] 在一些实施方式中,按照本文所述的方法治疗的癌症是人肉瘤或癌瘤,例如,纤维肉瘤、黏液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨源性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤(lymphangioendotheliosarcoma)、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌(例如,转移性的)、肝细胞癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、维尔姆斯瘤、子宫颈癌、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、多形性胶质母细胞瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质

瘤、脑膜瘤、黑素瘤、成神经细胞瘤或成视网膜细胞瘤。在某些实施方式中,按照本文所述的方法治疗的癌症是急性淋巴细胞性白血病或急性髓细胞性白血病(例如,原始粒细胞性、前髓细胞性、髓细胞单核细胞性、单核细胞性和红白血病);慢性白血病(慢性髓细胞性(粒细胞性)白血病或慢性淋巴细胞性白血病);霍奇金病;非霍奇金病;急性髓性白血病;B-细胞淋巴瘤;T-细胞淋巴瘤;间变性大细胞淋巴瘤;眼内淋巴瘤;滤泡性淋巴瘤;小肠淋巴瘤;或脾边缘区淋巴瘤。在某些实施方式中,按照本文所述的方法治疗的癌症是多发性骨髓瘤、瓦氏巨球蛋白血症、重链病、胃肠道基质肿瘤、头和/或颈癌症(例如,喉咽的鳞状细胞癌、喉头的鳞状细胞癌、口咽的细胞癌或喉头的疣状癌)、子宫内膜间质肉瘤、肥大细胞肉瘤、成人软组织肉瘤、子宫肉瘤、Merkel细胞癌、尿路上皮癌、具有脑转移的黑素瘤、葡萄膜黑素瘤、具有肝转移的葡萄膜黑素瘤、非小细胞肺癌、直肠癌或骨髓增生异常综合征。在一些实施方式中,按照该方法治疗的癌症是转移性的。

[0210] 在某些实施方式中,按照本文所述的方法治疗的癌症包括前列腺癌、乳腺癌、肺癌、结肠直肠癌、黑素瘤、支气管癌、膀胱癌、脑或中枢神经系统癌、外周神经系统癌、子宫或子宫内膜癌、口腔或咽的癌症、非霍奇金淋巴瘤、甲状腺癌、肾癌、胆道癌、小肠或阑尾癌、唾液腺癌、甲状腺癌、肾上腺癌、鳞状细胞癌、间皮瘤、骨癌、胸腺瘤(thyoma)/胸腺癌、成胶质细胞瘤、骨髓增生异常综合征、软组织肉瘤、DIPG、腺癌、骨肉瘤、软骨肉瘤、白血病或胰腺癌。在一些实施方式中,按照本文所述的方法治疗的癌症包括癌瘤(例如,腺癌)、淋巴瘤、胚细胞瘤、黑素瘤、肉瘤或白血病。在某些实施方式中,按照本文所述的方法治疗的癌症包括鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胃肠癌、霍奇金淋巴瘤、非霍奇金淋巴瘤、胰腺癌、成胶质细胞瘤、神经胶质瘤、子宫颈癌、卵巢癌、肝脏癌(例如,肝癌和肝细胞瘤)、膀胱癌、乳腺癌、炎性乳腺癌、Merkel细胞癌、结肠癌、结肠直肠癌、胃癌、尿道膀胱癌、子宫内膜癌、骨髓瘤(例如,多发性骨髓瘤)、唾液腺癌、肾癌(例如,肾细胞癌和肾母细胞瘤)、基底细胞癌、黑素瘤、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、睾丸癌、食管癌、浆液性腺癌或各种类型的头颈癌。在某些实施方式中,按照本文所述的方法治疗的癌症包括促纤维增生性黑素瘤、炎性乳腺癌、胸腺瘤、直肠癌、肛门癌或者可手术治疗的或非可手术治疗的脑干神经胶质瘤。在具体的实施方式中,癌症是实体肿瘤。在另一具体的实施方式中,癌症是多形性胶质母细胞瘤。在一些实施方式中,多形性胶质母细胞瘤是复发的。在一些实施方式中,多形性胶质母细胞瘤是新诊断的。在一些实施方式中,多形性胶质母细胞瘤是在具有非甲基化MGMT启动子的受试者中。在一些实施方式中,多形性胶质母细胞瘤是贝伐单抗疗法难治的。在一些实施方式中,多形性胶质母细胞瘤是在未接受贝伐单抗疗法的受试者中。

[0211] 在一些实施方式中,按照本文所述的方法治疗的癌症是转移性黑素瘤(例如,抗性转移性黑素瘤)、转移性卵巢癌或转移性肾细胞癌。在某些实施方式中,按照本文所述的方法治疗的癌症是伊匹单抗抗性的黑素瘤。在一些实施方式中,按照本文所述的方法治疗的癌症是纳武单抗或帕姆单抗抗性的黑素瘤。在一些实施方式中,按照本文所述的方法治疗的癌症是伊匹单抗及纳武单抗或帕姆单抗抗性的黑素瘤。

[0212] 在某些实施方式中,本公开提供了预防或治疗受试者的传染性疾病的方法,该方法包括向受试者施用有效量的如本文公开的抗-CTLA-4抗体或其药物组合物。在一个实施方式中,本文提供了用于预防和/或治疗感染(例如,病毒感染、细菌感染、真菌感染、原生动物感染或寄生虫感染)的方法。根据该方法预防和/或治疗的感染可以由本文确定的传染剂

引起。在具体的实施方式中,本文所述的抗-CTLA-4抗体或其组合物是施用于受试者的唯一活性剂。在一些实施方式中,本文所述的抗-CTLA-4抗体或其组合物与用于治疗传染性疾病的抗-感染干预(例如,抗病毒剂、抗菌剂、抗真菌剂或抗蠕虫剂)结合使用。

[0213] 可以通过本文公开的抗-CTLA-4抗体或药物组合物治疗和/或预防的传染性疾病由传染剂引起,包括但不限于细菌、寄生虫、真菌、原生动物和病毒。在具体的实施方式中,通过本文公开的抗-CTLA-4抗体或药物组合物治疗和/或预防的传染性疾病通过病毒引起。可以按照本文所述的方法预防和/或治疗的病毒疾病或病毒感染包括,但不限于通过甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒、流感(例如,甲型流感或乙型流感)病毒、水痘病毒、腺病毒、I型单纯疱疹病毒(HSV-I)、II型单纯疱疹病毒(HSV-II)、牛瘟病毒、鼻病毒、艾柯病毒、轮状病毒、呼吸道合胞体病毒、乳头状瘤病毒、乳多空病毒、巨细胞病毒、棘病毒(echinovirus)、虫媒病毒、汉坦病毒(hantavirus)、柯萨奇病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、风疹病毒、脊髓灰质炎病毒、天花病毒、EB病毒、I型人类免疫缺陷病毒(HIV-I)和II型人类免疫缺陷病毒(HIV-II),及病毒疾病如病毒性脑膜炎、脑炎、登革热或天花的病毒剂引起的那些。

[0214] 可以预防和/或治疗的细菌感染包括由大肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、普通变形杆菌、*Staphylococcus viridans*和铜绿假单胞菌引起的感染。可以按照本文所述的方法预防和/或治疗的由细菌(例如,大肠杆菌、肺炎克雷伯氏菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、普通变形杆菌、*Staphylococcus viridans*和铜绿假单胞菌)引起的细菌疾病包括,但不限于*Mycobacteria rickettsia*、支原体、奈瑟氏菌属、肺炎链球菌、伯氏疏螺旋体(莱姆病)、炭疽芽孢杆菌(*Bacillus anthracis*) (炭疽)、破伤风、链球菌属、葡萄球菌属、分支杆菌属、百日咳(*pertussis*)、霍乱、瘟疫、白喉、衣原体、金黄色葡萄球菌和军团菌属。

[0215] 可以按照本文所述的方法预防和/或治疗的由原生动物引起的原生动物疾病或原生动物感染包括,但不限于利什曼原虫病、球虫病、锥虫血吸虫病或疟疾。可以按照本文所述的方法预防和/或治疗的由寄生虫引起的寄生虫病或寄生虫感染包括,但不限于衣原体和立克次氏体。

[0216] 可以按照本文所述的方法预防和/或治疗的真菌疾病或真菌感染包括,但不限于由念珠菌感染引起的那些、接合菌病、念珠菌乳腺炎、具有潜伏coccidioidal meningoencephalitis)和脑脊髓血管炎(*cerebrospinal vasculitis*)、黑曲霉感染、镰刀菌角膜炎(*Fusarium keratitis*)、副鼻窦真菌病(*paranasal sinus mycoses*)、烟曲霉心内膜炎、胫骨软骨发育不良、光滑念珠菌阴道炎、口咽部念珠菌病、X-连锁慢性肉芽肿病、脚癣、皮肤念珠菌病、霉菌性胎盘炎、播散性毛孢子菌病、变应性支气管肺曲霉病、真菌性角膜炎、新型隐球菌感染、真菌性腹膜炎、膝弯孢霉(*Curvularia geniculata*)感染、葡萄球菌眼内炎、孢子丝菌病和皮真菌病。

[0217] 在某些实施方式中,传染性疾病是急性的。在某些实施方式中,传染性疾病是慢性的。在某些实施方式中,传染性疾病由黄病毒引起,例如,西尼罗病毒、圣路易型脑炎病毒、玻瓦桑病毒、蜱传脑炎病毒、登革热病毒、寨卡病毒、基萨诺尔森林病病毒、黄热病病毒和基孔肯雅病毒。在某些实施方式中,传染性疾病由埃博拉病毒引起。在某些实施方式中,传染

性疾病由流感病毒引起。在某些实施方式中,传染性疾病由人免疫缺陷病毒(HIV)、乙型肝炎病毒(HBV)或丙型肝炎病毒(HCV)引起。在某些实施方式中,如本文公开的抗-CTLA-4抗体或其药物组合物促进病毒控制。在某些实施方式中,如本文公开的抗-CTLA-4抗体或其药物组合物消除病毒库(viral reservoir)。

[0218] 在一个方面,本发明涉及本发明的抗-CTLA-4抗体和/或包含本发明的抗-CTLA-4抗体和药学上可接受的载体或赋形剂的本发明的药物组合物,其用作药物。

[0219] 在一个方面,本发明涉及本发明的抗-CTLA-4抗体和/或其与药学上可接受的载体或赋形剂结合在制备用于免疫疗法(例如,用于提高受试者中响应于抗原的T-细胞激活、治疗癌症或者治疗或预防传染性疾病的免疫疗法)的药物组合物或药物中的用途。

[0220] 在一个方面,本发明涉及本发明的抗-CTLA-4抗体和/或包含本发明的抗-CTLA-4抗体和药学上可接受的载体或赋形剂的本发明的药物组合物,其用于治疗癌症的方法中。

[0221] 在一个方面,本发明涉及本发明的抗-CTLA-4抗体和/或包含本发明的抗-CTLA-4抗体和药学上可接受的载体或赋形剂的本发明的药物组合物,其用于抑制对肿瘤的免疫系统耐受和/或患有癌症的受试者的免疫治疗的方法中。

[0222] 在一个方面,本发明涉及本发明的抗-CTLA-4抗体和/或包含本发明的抗-CTLA-4抗体和药学上可接受的载体或赋形剂的本发明的药物组合物,其用于治疗传染性疾病的方法中。

[0223] 在某些实施方式中,这些方法还包括向受试者施用另外的治疗剂。在某些实施方式中,另外的治疗剂是化疗剂或检查点靶向剂。在某些实施方式中,检查点靶向剂选自拮抗剂抗-PD-1抗体、拮抗剂抗-PD-L1抗体、拮抗剂抗-PD-L2抗体、拮抗剂抗-CTLA-4抗体、拮抗剂抗-TIM-3抗体、拮抗剂抗-LAG-3抗体、拮抗剂抗-CEACAM1抗体、激动剂抗-GITR抗体、激动剂抗-OX40抗体、激动剂抗-CD137抗体、激动剂抗-DR3抗体、激动剂抗-TNFSF14抗体和激动剂抗-CD27抗体。在某些实施方式中,检查点靶向剂是拮抗剂抗-PD-1抗体。在某些实施方式中,检查点靶向剂是拮抗剂抗-PD-L1抗体。在某些实施方式中,检查点靶向剂是拮抗剂抗-LAG-3抗体。在某些实施方式中,另外的治疗剂是肿瘤坏死因子受体超家族成员或肿瘤坏死因子超家族成员的激动剂。

[0224] 在某些实施方式中,本发明涉及(a)本发明的抗-CTLA-4抗体和/或包含本发明的抗-CTLA-4抗体和药学上可接受的载体或赋形剂的本发明的药物组合物,和(b)另外的治疗剂,其用作药物。在优选的实施方式中,另外的治疗剂是化疗剂或检查点靶向剂。

[0225] 在某些实施方式中,本发明涉及(a)本发明的抗-CTLA-4抗体和/或包含本发明的抗-CTLA-4抗体和药学上可接受的载体或赋形剂的本发明的药物组合物,和(b)另外的治疗剂,其用于治疗癌症的方法中。

[0226] 在某些实施方式中,本发明涉及(a)本发明的抗-CTLA-4抗体和/或包含本发明的抗-CTLA-4抗体和药学上可接受的载体或赋形剂的本发明的药物组合物,和(b)另外的治疗剂,其用于治疗传染性疾病的方法中。

[0227] 在某些实施方式中,本文公开的抗-CTLA-4抗体与靶向免疫调节酶如IDO(吡啶胺-(2,3)-双加氧酶)和/或TDO(色氨酸2,3-双加氧酶)的化合物结合施用于受试者。在某些实施方式中,这样的化合物选自epacadostat(Incyte Corp;参见,例如,WO 2010/005958,其通过引用全文并入本文中)、F001287(Flexus Biosciences)、indoximod(NewLink

Genetics) 和NLG919 (NewLink Genetics)。在一个实施方式中,化合物是epacadostat。在另一实施方式中,化合物是F001287。在另一实施方式中,化合物是indoximod。在另一实施方式中,化合物是NLG919。

[0228] 在某些实施方式中,本发明涉及(a) 本发明的抗-CTLA-4抗体和/或包含本发明的抗-CTLA-4抗体和药学上可接受的载体或赋形剂的本发明的药物组合物,和(b) 靶向免疫调节酶的化合物,其用作药物。在优选的实施方式中,该化合物靶向IDO和/或TDO。

[0229] 在某些实施方式中,本发明涉及(a) 本发明的抗-CTLA-4抗体和/或包含本发明的抗-CTLA-4抗体和药学上可接受的载体或赋形剂的本发明的药物组合物,和(b) 靶向免疫调节酶的化合物,其用于治疗癌症的方法中。在优选的实施方式中,该化合物靶向IDO和/或TDO。

[0230] 在某些实施方式中,本文公开的抗-CTLA-4抗体与疫苗结合施用于受试者。在某些实施方式中,疫苗是基于热休克蛋白的肿瘤疫苗或基于热休克蛋白的病原体疫苗。在具体的实施方式中,本文公开的抗-CTLA-4抗体与基于热休克蛋白的肿瘤疫苗结合施用于受试者。热休克蛋白(HSP)是在所有物种中普遍存在的高度保守蛋白质的家族。它们的表达可以由热休克或其它形式的应激(包括暴露于毒素、氧化应激或葡萄糖饥饿)而有力地诱导到高得多的水平。根据分子量分类为五个家族:HSP-110、-90、-70、-60和-28。HSP通过抗原呈递细胞(APC)如巨噬细胞和树突状细胞(DC)中的交叉呈递途径递送免疫原性肽,从而导致T细胞激活。HSP作为肿瘤相关抗原性肽的伴侣蛋白载体发挥作用,从而形成能够诱导肿瘤特异性免疫的复合体。在从死亡肿瘤细胞释放时,HSP-抗原复合体由抗原呈递细胞(APC)摄取,其中抗原被加工成结合MHC I类和II类分子的肽,从而导致抗-肿瘤CD8+和CD4+T细胞的激活。由源自肿瘤制备物的HSP复合体诱发的免疫特异性地针对由各受试者的癌症表达的独特抗原性肽库。

[0231] 热休克蛋白肽复合物(HSPPC)是由与抗原性肽非共价复合的热休克蛋白组成的蛋白质肽复合体。HSPPC诱导先天性和适应性免疫反应两者。在具体的实施方式中,抗原性肽显示出对于所治疗的癌症的抗原性。HSPPC通过膜受体(主要CD91)或通过结合Toll-样受体被APC有效地捕获。HSPPC内化导致APC用趋化因子的功能性成熟和细胞因子产生,从而导致天然杀伤细胞(NK)、单核细胞的激活及Th1和Th-2介导的免疫反应。在某些实施方式中,本文公开的方法中使用的HSPPC包含与抗原性肽复合的应激蛋白的hsp60、hsp70或hsp90家族的一种或多种热休克蛋白。在某些实施方式中,HSPPC包含hsc70、hsp70、hsp90、hsp110、grp170、gp96、钙网蛋白或其两者或更多者的组合。

[0232] 在具体的实施方式中,本文公开的抗-CTLA-4抗体与热休克蛋白肽复合物(HSPPC),例如,热休克蛋白肽复合物-96(HSPPC-96)组合施用于受试者以治疗癌症。HSPPC-96包含与抗原性肽复合的96 kDa热休克蛋白(Hsp),gp96。HSPPC-96是从受试者的肿瘤制得的癌症免疫疗法且包含癌症的抗原性“指纹”。在某些实施方式中,这一指纹包含仅在该特定受试者的特定癌细胞中存在的独特抗原,且疫苗的注射意图刺激受试者的免疫系统以识别和攻击具有特定癌症指纹的任何细胞。

[0233] 在某些实施方式中,HSPPC,例如,HSPPC-96,由受试者的肿瘤组织产生。在具体的实施方式中,HSPPC(例如,HSPPC-96)由所治疗的癌症或其转移的类型的肿瘤产生。在另一具体的实施方式中,HSPPC(例如,HSPPC-96)是所治疗的受试者自体的。在某些实施方式中,

肿瘤组织是非坏死肿瘤组织。在某些实施方式中,至少1克(例如,至少1、至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9或至少10克)的非坏死肿瘤组织用于产生疫苗方案。在某些实施方式中,在手术切除后,非坏死肿瘤组织在用于疫苗制备之前冷冻。在一些实施方式中,HSPPC,例如,HSPPC-96,通过纯化技术从肿瘤组织分离,过滤并制备用于可注射疫苗。在某些实施方式中,受试者施用6-12剂的HSPPC,例如,HSPCC-96。在这样的实施方式中,HSPPC,例如,HSPPC-96,剂量可以每周施用前4个剂量和随后每两周施用2-8个另外的剂量。

[0234] 可以根据本文所述的方法使用的HSPPC的进一步实例公开于以下专利和专利申请(其通过引用全文并入本文)中:U.S. 专利No. 6,391,306,6,383,492,6,403,095,6,410,026,6,436,404,6,447,780,6,447,781和6,610,659。

[0235] 在某些实施方式中,本发明涉及(a)本发明的抗-CTLA-4抗体和/或包含本发明的抗-CTLA-4抗体和药学上可接受的载体或赋形剂的本发明的药物组合物,和(b)疫苗,其用作药物。在优选的实施方式中,疫苗是基于热休克蛋白的肿瘤疫苗或基于热休克蛋白的病原体疫苗。在优选的实施方式中,疫苗是基于热休克蛋白的病毒疫苗。

[0236] 在某些实施方式中,本发明涉及(a)本发明的抗-CTLA-4抗体和/或包含本发明的抗-CTLA-4抗体和药学上可接受的载体或赋形剂的本发明的药物组合物,和(b)疫苗,其用于治疗癌症的方法中。在优选的实施方式中,疫苗是基于热休克蛋白的肿瘤疫苗。

[0237] 抗-CTLA-4抗体和另外的治疗剂(例如,化疗剂、检查点靶向剂、IDO抑制剂和/或疫苗)可以作为独立的剂型单独地、依次地或同时地施用。在一个实施方式中,抗-CTLA-4抗体肠胃外施用,且IDO抑制剂口服施用。

[0238] 在某些实施方式中,本文公开的抗-CTLA-4抗体肿瘤内施用于受试者。在某些实施方式中,本文公开的抗-CTLA-4抗体与另外的治疗剂组合肿瘤内施用于受试者。在某些实施方式中,另外的治疗剂全身性施用。在某些实施方式中,受试者患有实体肿瘤。在某些实施方式中,受试者患有头颈鳞状细胞癌(HNSCC)。在某些实施方式中,受试者患有HER2⁺乳腺癌。在某些实施方式中,全身性施用的另外的治疗剂是抗-PD-1抗体(例如,帕姆单抗或纳武单抗)。在某些实施方式中,全身性施用的另外的治疗剂是抗-EGFR抗体(例如,西妥昔单抗)。在某些实施方式中,全身性施用的另外的治疗剂是抗-HER2抗体(例如,曲妥珠单抗)。在某些实施方式中,全身性施用的另外的治疗剂是化疗剂(例如,吉西他滨)。在某些实施方式中,受试者患有实体肿瘤且全身性施用的另外的治疗剂是抗-PD-1抗体(例如,帕姆单抗或纳武单抗)。在某些实施方式中,受试者患有头颈鳞状细胞癌(HNSCC)且全身性施用的另外的治疗剂是抗-EGFR抗体(例如,西妥昔单抗)。在某些实施方式中,受试者患有HER2⁺乳腺癌且全身性施用的另外的治疗剂是抗-HER2抗体(例如,曲妥珠单抗)。在某些实施方式中,受试者还接受化疗剂(例如,吉西他滨)。在一个方面,本发明涉及本发明的抗-CTLA-4抗体和/或药物组合物及任选地另外的治疗剂,其用于治疗癌症的方法中,其中本发明的抗-CTLA-4抗体和/或药物组合物肿瘤内施用于受试者。在一个优选的实施方式中,另外的治疗剂施用于受试者,更优选地,另外的治疗剂全身性施用于受试者。

[0239] 在某些实施方式中,抗-PD-1抗体用于本文公开的方法中。在某些实施方式中,抗-PD-1抗体是由Bristol-Myers Squibb开发的纳武单抗,也称为BMS-936558或MDX1106。在某些实施方式中,抗-PD-1抗体是由Merck&Co开发的帕姆单抗,也称为Lambrolizumab或MK-3475。在某些实施方式中,抗-PD-1抗体是由CureTech开发的Pidilizumab,也称为CT-011。

在某些实施方式中,抗-PD-1抗体是由Medimmune开发的MEDI0680,也称为AMP-514。在某些实施方式中,抗-PD-1抗体是由Novartis Pharmaceuticals开发的PDR001。在某些实施方式中,抗-PD-1抗体是由Regeneron Pharmaceuticals开发的REGN2810。在某些实施方式中,抗-PD-1抗体是由Pfizer开发的PF-06801591。在某些实施方式中,抗-PD-1抗体是由BeiGene开发的BGB-A317。在某些实施方式中,抗-PD-1抗体是由AnaptysBio和Tesarro开发的TSR-042。在某些实施方式中,抗-PD-1抗体是由Hengrui开发的SHR-1210。

[0240] 可以用于本文公开的治疗方法中的抗-PD-1抗体的进一步非限制性实例为所有目的公开于以下专利和专利申请(其通过引用全文并入本文)中:U.S.专利No.6,808,710; U.S.专利No.7,332,582;U.S.专利No.7,488,802;U.S.专利No.8,008,449;U.S.专利No.8,114,845;U.S.专利No.8,168,757;U.S.专利No.8,354,509;U.S.专利No.8,686,119;U.S.专利No.8,735,553;U.S.专利No.8,747,847;U.S.专利No.8,779,105;U.S.专利No.8,927,697;U.S.专利No.8,993,731;U.S.专利No.9,102,727;U.S.专利No.9,205,148;U.S.公开No.US 2013/0202623 A1;U.S.公开No.US 2013/0291136 A1;U.S.公开No.US 2014/0044738 A1;U.S.公开No.US 2014/0356363 A1;U.S.公开No.US 2016/0075783 A1;和PCT公开No.WO 2013/033091 A1;PCT公开No.WO 2015/036394 A1;PCT公开No.WO 2014/179664 A2;PCT公开No.WO 2014/209804 A1;PCT公开No.WO 2014/206107 A1;PCT公开No.WO 2015/058573 A1;PCT公开No.WO 2015/085847 A1;PCT公开No.WO 2015/200119 A1;PCT公开No.WO 2016/015685 A1;和PCT公开No.WO 2016/020856 A1。

[0241] 在某些实施方式中,抗-PD-L1抗体用于本文公开的方法中。在某些实施方式中,抗-PD-L1抗体是由Genentech开发的阿特珠单抗(atezolizumab)。在某些实施方式中,抗-PD-L1抗体是由AstraZeneca、Celgene和Medimmune开发的durvalumab。在某些实施方式中,抗-PD-L1抗体是由Merck Serono和Pfizer开发的avelumab,也称为MSB0010718C。在某些实施方式中,抗-PD-L1抗体是由Bristol-Myers Squibb开发的MDX-1105。在某些实施方式中,抗-PD-L1抗体是由Amplimmune和GSK开发的AMP-224。

[0242] 可以用于本文公开的治疗方法中的抗-PD-L1抗体的非限制性实例为所有目的公开于以下专利和专利申请(其通过引用全文并入本文)中:US专利No.7,943,743;US专利No.8,168,179;US专利No.8,217,149;U.S.专利No.8,552,154;U.S.专利No.8,779,108;U.S.专利No.8,981,063;U.S.专利No.9,175,082;U.S.公开No.US 2010/0203056 A1;U.S.公开No.US 2003/0232323 A1;U.S.公开No.US 2013/0323249 A1;U.S.公开No.US 2014/0341917 A1;U.S.公开No.US 2014/0044738 A1;U.S.公开No.US 2015/0203580 A1;U.S.公开No.US 2015/0225483 A1;U.S.公开No.US 2015/0346208 A1;U.S.公开No.US 2015/0355184 A1;及PCT公开No.WO 2014/100079 A1;PCT公开No.WO 2014/022758 A1;PCT公开No.WO 2014/055897 A2;PCT公开No.WO 2015/061668 A1;PCT公开No.WO 2015/109124 A1;PCT公开No.WO 2015/195163 A1;PCT公开No.WO 2016/000619 A1;和PCT公开No.WO 2016/030350 A1。

[0243] 在某些实施方式中,抗-LAG-3抗体用于本文公开的方法中。在某些实施方式中,抗-LAG-3抗体是由Bristol-Myers Squibb开发的BMS-986016。在某些实施方式中,抗-LAG-3抗体是由Novartis开发的LAG525。在某些实施方式中,抗-LAG-3抗体是由GSK开发的GSK2831781。

[0244] 可以用于本文公开的治疗方法中的抗-LAG-3抗体的非限制性实例为所有目的公开于以下专利和专利申请(其通过引用全文并入本文)中:US专利No.9,244,059;U.S.公开No.US 2011/0150892 A1;U.S.公开No.US 2014/0093511 A1;U.S.公开No.US 2014/0286935 A1;U.S.公开No.US 2015/0259420 A1;和PCT公开No.WO 2015/042246 A1;PCT公开No.WO 2015/116539 A1;PCT公开No.WO 2015/200119 A1;和PCT公开No.WO 2016/028672 A1。

[0245] 在某些实施方式中,抗-EGFR抗体用于本文公开的方法中。在某些实施方式中,抗-EGFR抗体是由Bristol-Myers Squibb和ImClone开发的西妥昔单抗,由Abgenix和Amgen开发的帕尼单抗,由CMI Cuba和YM BioSciences开发的尼妥珠单抗,由ImClone开发的necitumumab,由Genmab开发的zalutumumab,由Takeda开发的马妥珠单抗,由Merck Serono和Symphogen开发的Sym004,由Glycart和Roche开发的imgatuzumab,由Genentech和Roche开发的duligotumab,由Abbott开发的depatuxizumab,由Abbvie开发的depatuxizumab mafodotin,由Adimab和Merrimack开发的MM-151,由Green Cross开发的GC1118,由Amgen和ImmunoGen开发的AMG 595,由Glycotope开发的CetuGEX,由ImmunoGen开发的laprituximab,由Genmab和Janssen Biotech开发的JNJ-61186372,由Sinocelltech开发的SCT200,由Lilly开发的LY3164530,由Shanghai Henlius开发的HLX07或由Synermore开发的SYN004。

[0246] 在某些实施方式中,抗-HER2抗体用于本文公开的方法中。在某些实施方式中,抗-HER2抗体是由Genentech和Roche开发的曲妥珠单抗,由Genentech和Roche开发的trastuzumab emtansine,由Genentech开发的帕妥珠单抗,由Fresenius开发的ertumaxomab,由MacroGenics开发的margetuximab,由Merrimack开发的MM-111,由Celltrion开发的CT-P06,由Pfizer开发的PF-05280014,由Merrimack开发的MM-302,由Merck&Co开发的SB3,由Shanghai CP Guojian开发的CMAB302,由Glycotope开发的TrasGEX,由Ambrx和Zhejiang Medicine开发的ARX788,由Synthon开发的SYD985,由Bristol-Myers Squibb和f-star开发的FS102,由Biocad开发的BCD-022,由Amgen开发的ABP 980,由Daiichi Sankyo开发的DS-8201a,由Shanghai Henlius开发的HLX02或由Biocon和Mylan开发的CANMAb。

[0247] 本文所述的抗体或药物组合物可以通过多种途径递送到受试者。这些包括,但不限于肠胃外、鼻内、气管内、口服、皮内、局部、肌肉内、腹膜内、透皮、静脉内、肿瘤内、结膜和皮下途径。也可以使用肺部施用,例如,通过使用吸入器或喷雾器,及用作喷雾的具有雾化剂的制剂。在某些实施方式中,本文所述的抗体或药物组合物皮下或静脉内递送。在某些实施方式中,本文所述的抗体或药物组合物肿瘤内施用。在某些实施方式中,本文公开的抗-CTLA-4抗体或药物组合物递送至肿瘤引流淋巴结。在某些实施方式中,本文所述的抗体或药物组合物通过局部化施用(例如,皮下施用)递送。在某些实施方式中,本文公开的抗-CTLA-4抗体或药物组合物系统性递送。在某些实施方式中,本文公开的抗-CTLA-4抗体或药物组合物局部递送。

[0248] 在一个方面,本发明涉及本发明的抗-CTLA-4抗体和/或药物组合物和任选地另外的治疗剂,其用于治疗癌症的方法中,其中本发明的抗-CTLA-4抗体和/或药物组合物肿瘤内递送到受试者,递送至受试者的肿瘤引流淋巴结或通过局部化施用(例如,皮下施用)递

送至受试者。

[0249] 有效地治疗和/或预防病症的抗体或组合物的量取决于疾病的性质,且可以通过标准临床技术确定。

[0250] 组合物中使用的精确剂量也取决于施用途及感染或由其引起的疾病的严重性,且应当根据实施者的判断和各受试者的情况决定。例如,有效剂量也可以根据施用的方式、目标位点、患者的生理状态(包括年龄、体重和健康)(无论患者是人或动物)、施用的其它药物治疗或者治疗是预防性或治疗性的而变化。通常,患者是人,但非人哺乳动物包括转基因动物也可以被治疗。治疗剂量最佳地滴定以优化安全性和效力。

[0251] 在某些实施方式中,本文所述的抗-CTLA-4抗体或药物组合物以0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、6mg/kg、10mg/kg、约0.1mg/kg、约0.3mg/kg、约1mg/kg、约3mg/kg、约6mg/kg或约10mg/kg施用于受试者(例如,通过静脉内注射)。在某些实施方式中,本文所述的抗-CTLA-4抗体或药物组合物以如上所述的剂量每三周施用于受试者(例如,通过静脉内注射)。

[0252] 在一个方面,本发明涉及本发明的抗-CTLA-4抗体和/或药物组合物和任选地另外的治疗剂,其用于治疗癌症的方法中,其中本发明的抗-CTLA-4抗体和/或药物组合物以0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、6mg/kg、10mg/kg、约0.1mg/kg、约0.3mg/kg、约1mg/kg、约3mg/kg、约6mg/kg或约10mg/kg施用于受试者,更优选每三周施用。

[0253] 在某些实施方式中,本文所述的抗-CTLA-4抗体或药物组合物以0.1mg/kg或约0.1mg/kg每三周施用于受试者(例如,通过静脉内注射)。在某些实施方式中,本文所述的抗-CTLA-4抗体或药物组合物以0.3mg/kg或约0.3mg/kg每三周施用于受试者(例如,通过静脉内注射)。在某些实施方式中,本文所述的抗-CTLA-4抗体或药物组合物以1mg/kg或约1mg/kg每三周施用于受试者(例如,通过静脉内注射)。在某些实施方式中,本文所述的抗-CTLA-4抗体或药物组合物以3mg/kg或约3mg/kg每三周施用于受试者(例如,通过静脉内注射)。在某些实施方式中,本文所述的抗-CTLA-4抗体或药物组合物以6mg/kg或约6mg/kg每三周施用于受试者(例如,通过静脉内注射)。在某些实施方式中,本文所述的抗-CTLA-4抗体或药物组合物以10mg/kg或约10mg/kg每三周施用于受试者(例如,通过静脉内注射)。

[0254] 在某些实施方式中,本文所述的抗-CTLA-4抗体或药物组合物以0.01mg/kg、0.03mg/kg、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、约0.01mg/kg、约0.03mg/kg、约0.1mg/kg、约0.3mg/kg、约1mg/kg或约3mg/kg通过肿瘤内注射施用于受试者。在某些实施方式中,本文所述的抗-CTLA-4抗体或药物组合物以如上所述的剂量每三周通过肿瘤内注射施用于受试者。

[0255] 在某些实施方式中,本文所述的抗-CTLA-4抗体或药物组合物以0.01mg/kg或约0.01mg/kg每三周通过肿瘤内注射施用于受试者。在某些实施方式中,本文所述的抗-CTLA-4抗体或药物组合物以0.03mg/kg或约0.03mg/kg每三周通过肿瘤内注射施用于受试者。在某些实施方式中,本文所述的抗-CTLA-4抗体或药物组合物以0.1mg/kg或约0.1mg/kg每三周通过肿瘤内注射施用于受试者。在某些实施方式中,本文所述的抗-CTLA-4抗体或药物组合物以0.3mg/kg或约0.3mg/kg每三周通过肿瘤内注射施用于受试者。在某些实施方式中,本文所述的抗-CTLA-4抗体或药物组合物以1mg/kg或约1mg/kg每三周通过肿瘤内注射施用于受试者。在某些实施方式中,本文所述的抗-CTLA-4抗体或药物组合物以3mg/kg或约3mg/kg

kg每三周通过肿瘤内注射施用于受试者。

[0256] 在某些实施方式中,本文所述的抗-CTLA-4抗体或药物组合物以0.01mg/kg、0.03mg/kg、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、约0.01mg/kg、约0.03mg/kg、约0.1mg/kg、约0.3mg/kg、约1mg/kg或约3mg/kg通过局部化施用(例如,皮下施用)施用于受试者。

[0257] 本文所述的抗-CTLA-4抗体也可以用于利用本领域技术人员已知的经典免疫组织学方法(包括免疫测定,如酶联免疫吸附分析(ELISA)、免疫沉淀或蛋白质印迹)测定生物样品中的CTLA-4蛋白水平。合适的抗体测定标记是本领域中已知的且包括酶标记如葡萄糖氧化酶;放射性同位素如碘(^{125}I , ^{121}I)、碳(^{14}C)、硫(^{35}S)、氚(^3H)、铟(^{121}In)和锝(^{99}Tc);发光标记如鲁米诺;和荧光标记如荧光素和罗丹明,及生物素。这样的标记可以用于标记本文所述的抗体或其抗原结合片段。或者,识别本文所述的抗-CTLA-4抗体或其抗原结合片段的第二抗体可以被标记并与抗-CTLA-4抗体或其抗原结合片段结合使用以检测CTLA-4蛋白水平。在一个实施方式中,本发明涉及本发明的抗-CTLA-4抗体用于体外测定和/或检测生物样品中的CTLA-4蛋白水平的用途。

[0258] 测定CTLA-4蛋白的表达水平意图包括直接地(例如,通过测定或估算绝对蛋白质水平)或相对地(例如,通过与第二生物样品中的疾病相关蛋白质水平比较)定性或定量地测量或估算第一生物样品中的CTLA-4蛋白水平。第一生物样品中的CTLA-4多肽表达水平可以测量或估算并与标准CTLA-4蛋白水平相比较,该标准获自从不具有障碍的个体获得的第二生物样品或通过平均来自不具有障碍的个体群体的水平而确定。如本领域中理解的,一旦“标准”CTLA-4多肽水平已知,其可以重复地用作进行比较的标准。

[0259] 如本文中使用的,术语“生物样品”是指从受试者获得的任何生物样品,潜在地表达CTLA-4的细胞系、组织或其它细胞来源。用于从动物(例如,人)获得组织活检样品和体液的方法是本领域中公知的。生物样品包括外周血单核细胞。

[0260] 本文所述的抗-CTLA-4抗体或其抗原结合片段可以用于预后、诊断、监测和筛选应用,包括技术人员公知和标准的和基于本说明书的体外和体内应用。用于体外评估和评价免疫系统状态和/或免疫反应的预后、诊断、监测和筛选分析和试剂盒可以用于预测、诊断和监测以评价患者样品,包括已知具有或怀疑具有免疫系统功能障碍的那些,或相对于预期的或所需的免疫系统反应、抗原反应或疫苗反应。免疫系统状态和/或免疫反应的评估和评价也可用于确定患者对于药物的临床试验或对于特定化疗剂或抗体或其抗原结合片段(包括其组合)相对于不同药剂或抗体或其抗原结合片段的施用的适合性。这一类型的预后和诊断监测和评估实际上早已利用针对乳腺癌中的HER2蛋白的抗体(HercepTestTM,Dako),其中该分析也用于评价用于Herceptin[®]的抗体治疗的患者。体内应用包括定向细胞治疗和免疫系统调节和免疫反应的放射成像。

[0261] 在一个方面,本发明涉及本发明的抗-CTLA-4抗体和/或药物组合物,其用作诊断剂。

[0262] 在一个方面,本发明涉及本发明的抗-CTLA-4抗体和/或药物组合物,其用于预测、诊断和/或监测免疫系统功能障碍和/或癌症的方法中。

[0263] 在一个实施方式中,本发明涉及本发明的抗-CTLA-4抗体用于通过体外测定和/或检测受试者生物样品中的CTLA-4蛋白水平预测、诊断和/或监测受试者的免疫系统功能障碍和/或癌症的用途。

[0264] 在一个实施方式中,抗-CTLA-4抗体或其抗原结合片段可以用于活检样品的免疫组织化学中。在另一实施方式中,抗-CTLA-4抗体或其抗原结合片段可以用于检测CTLA-4的水平或在其膜表面上包含CTLA-4的细胞的水平,该水平然后可以与某些疾病症状相关联。本文所述的抗-CTLA-4抗体或其抗原结合片段可以携带可检测的或功能性的标记。当使用荧光标记时,当前可用的显微术和荧光激活细胞分选分析(FACS)或本领域中已知的两种方法过程的组合可以用于鉴定和定量特异性结合成员。本文所述的抗-CTLA-4抗体或其抗原结合片段可以携带荧光标记。示例性的荧光标记包括,例如,反应性的和偶联的探针,例如氨基香豆素、荧光素和德克萨斯红、Alexa Fluor染料、Cy染料和DyLight染料。抗-CTLA-4抗体或其抗原结合片段可以携带放射性标记,如同位素³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、³⁶Cl、⁵¹Cr、⁵⁷Co、⁵⁸Co、⁵⁹Fe、⁶⁷Cu、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹¹⁷Lu、¹²¹I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁹⁸Au、²¹¹At、²¹³Bi、²²⁵Ac和¹⁸⁶Re。当使用放射性标记时,当前可用的本领域已知的计数过程可以用于鉴定和定量抗-CTLA-4抗体或其抗原结合片段与CTLA-4(例如,人CTLA-4)的特异性结合。在其中标记是酶的情况下,检测可以通过如本领域中已知的任何当前采用的比色的、光谱光度测量的、荧光光度的、电泳检测的或气体定量的技术完成。这可以通过在允许形成抗体或其抗原结合片段和CTLA-4之间的复合物的条件下使样品或对照样品与抗-CTLA-4抗体或其抗原结合片段接触来实现。检测抗体或其抗原结合片段和CTLA-4之间形成的任何复合物并在样品或对照样品中进行比较。鉴于本文所述的抗体与CTLA-4的特异性结合,抗体或其抗原结合片段可以用于特异性检测细胞表面上的CTLA-4表达。本文所述的抗体或其抗原结合片段也可以用于通过免疫亲和纯化来纯化CTLA-4。本文还包括用于定量分析例如CTLA-4或CTLA-4/CTLA-4配体复合物的存在水平的可制备成测试试剂盒形式的分析系统。系统或测试试剂盒可以包含标记的组分,例如,标记的抗体,和一种或多种另外的免疫化学试剂。

[0265] 在一个实施方式中,本发明涉及用于测定和/或检测生物样品中的CTLA-4蛋白水平的体外方法,包括(1)在允许形成抗体或其抗原结合片段和CTLA-4之间的复合物的条件下使样品和任选地对照样品与本发明的抗-CTLA-4抗体或其抗原结合片段接触,和(2)检测和比较样品和任选地对照样品中形成的复合物。

[0266] 5.5产生抗-CTLA-4抗体的多核苷酸、载体和方法

[0267] 在另一个方面,本文提供了包含编码特异性结合CTLA-4(例如,人CTLA-4)抗原的本文所述的抗体或其片段(例如,轻链可变区和/或重链可变区)的核苷酸序列的多核苷酸,及载体,例如,用于在宿主细胞(例如,大肠杆菌和哺乳动物细胞)中重组表达的包含这类多核苷酸的载体。本文提供了编码任何本文中提供的抗体的核苷酸序列的多核苷酸,以及包含这样的多核苷酸序列的载体,例如,用于在宿主细胞,例如,哺乳动物细胞中有效表达的表达载体。

[0268] 如本文中使用的,“分离的”多核苷酸或核酸分子是其与在核酸分子的天然来源(例如,小鼠或人)中存在的其它核酸分子分离的一种多核苷酸或核酸分子。此外,“分离的”核酸分子如cDNA分子可以基本上不含其它细胞物质,或在通过重组技术产生时基本上不含培养基,或在化学合成时基本上不含化学前体或其它化学品。例如,表述“基本上不含”包括具有少于约15%、10%、5%、2%、1%、0.5%或0.1%(特别地少于约10%)的其它物质(例如,细胞物质、培养基、其它核酸分子、化学前体和/或其它化学品)的多核苷酸或核酸分子的制备物。在具体的实施方式中,编码本文所述的抗体的核酸分子被分离或纯化。

[0269] 在特定方面中,本文提供了包含编码抗体或其抗原结合片段(其特异性地结合CTLA-4多肽(例如,人CTLA-4)且包含如本文所述的氨基酸序列)以及与这样的抗体竞争结合CTLA-4多肽(例如,以剂量依赖性的方式)或与这样的抗体结合相同的表位的抗体的核苷酸序列的多核苷酸。

[0270] 在某些方面中,本文提供了包含编码本文所述抗体的轻链或重链的核苷酸序列的多核苷酸。多核苷酸可以包含编码含有本文所述的抗体的VL FR和CDR的轻链的核苷酸序列(参见,例如,表1)。

[0271] 本文还提供了编码抗-CTLA-4抗体的多核苷酸,其例如通过密码子/RNA优化、用异源信号序列的替换和mRNA不稳定性元件的消除进行优化。通过引入密码子变化和/或消除mRNA中的抑制性区域产生用于重组表达的编码抗-CTLA-4抗体或其片段(例如,轻链、重链、VH域或VL域)的优化核酸的方法可以相应地通过采用例如,U.S. 专利No.5,965,726;6,174,666;6,291,664;6,414,132和6,794,498中描述的优化方法进行。例如,RNA内的潜在剪接位点和不稳定性元件(例如,富A/T或A/U元件)可以突变而不改变该核酸序列编码的氨基酸以提高用于重组表达的RNA的稳定性。该改变利用了遗传密码的简并性,例如,使用对于相同氨基酸的可选密码子。在一些实施方式中,可能希望改变一个或多个密码子以编码保守性突变,例如,具有与原始氨基酸相似的化学结构和/或性质的相似氨基酸。这样的方法可以相对于通过未优化的多核苷酸编码的抗-CTLA-4抗体的表达提高抗-CTLA-4抗体或其片段的表达至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍或更高。

[0272] 在某些实施方式中,编码本文所述的抗-CTLA-4抗体或其片段(例如,VL域和/或VH域)的优化多核苷酸序列可以与编码本文所述的抗-CTLA-4抗体或其片段(例如,VL域和/或VH域)的未优化多核苷酸序列的反义(例如,互补)多核苷酸杂交。在特定的实施方式中,编码本文所述的抗-CTLA-4抗体或其片段的优化核苷酸序列在高严格性条件下与编码本文所述的抗-CTLA-4抗体或其片段的未优化多核苷酸序列的反义多核苷酸杂交。在具体的实施方式中,编码本文所述的抗-CTLA-4抗体或其片段的优化核苷酸序列在高严格性、中等或低严格性杂交条件下与编码本文所述的抗-CTLA-4抗体或其片段的未优化多核苷酸序列的反义多核苷酸杂交。关于杂交条件的信息已经被描述,参见,例如,U.S. 专利申请公开No.US 2005/0048549(例如,72-73段),其通过引用并入本文。

[0273] 多核苷酸可以通过本领域中已知的任何方法获得,并测定多核苷酸的核苷酸序列。编码本文所述的抗体(例如,表1中所述的抗体)及这些抗体的改变形式的核苷酸序列可以使用本领域中公知的方法确定,即,已知编码特定氨基酸的核苷酸密码子以产生编码该抗体的核酸的方式组装。编码抗体的这种多核苷酸可以从化学合成的寡核苷酸组装(例如,如Kutmeier G等,(1994),BioTechniques 17:242-6中所述),简言之,其涉及包含编码抗体的序列的部分的重叠寡核苷酸的合成,那些寡核苷酸的退火和连接,和然后连接的寡核苷酸通过PCR的扩增。

[0274] 或者,编码本文所述的抗体的多核苷酸可以使用本领域中公知的方法从来自合适来源(例如,杂交瘤)的核酸产生(例如,PCR和其它分子克隆方法)。例如,使用可与已知序列的3'和5'末端杂交的合成引物的PCR扩增可以使用从产生目标抗体的杂交瘤细胞获得的基因组DNA进行。这样的PCR扩增方法可以用于获得包含编码抗体轻链和/或重链的序列的核

酸。这样的PCR扩增方法可以用于获得包含编码抗体的可变轻链区和/或可变重链区的序列的核酸。扩增的核酸可以克隆到用于在宿主细胞中表达和用于进一步克隆的载体中,例如,以产生嵌合和人源化抗体。

[0275] 如果包含编码特定抗体的核酸的克隆不可得,但抗体分子的序列已知,则编码免疫球蛋白的核酸可以化学合成或通过使用可与序列的3'和5'末端杂交的合成引物的PCR扩增或通过使用对于特定基因序列特异性的寡核苷酸探针的克隆以鉴定例如来自编码抗体的cDNA文库的cDNA克隆而从合适的来源(例如,抗体cDNA文库或从自表达抗体的任何组织或细胞(如选择为表达本文所述的抗体的杂交瘤细胞)产生的cDNA文库,或由其分离的核酸(优选聚A+RNA))获得。通过PCR产生的扩增的核酸然后可以使用本领域中公知的任何方法克隆到可复制克隆载体中。

[0276] 编码本文所述的抗-CTLA-4抗体的DNA可以使用常规程序(例如,通过使用能够特异性地结合编码抗-CTLA-4抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)容易地分离和测序。杂交瘤细胞可以用作这类DNA的来源。一旦分离,DNA可以置于表达载体中,其然后转染到宿主细胞如大肠杆菌细胞、猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞(例如,来自CHO GS System™(Lonza)的CHO细胞)或否则不产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞中以获得重组宿主细胞中抗-CTLA-4抗体的合成。

[0277] 为产生全抗体,包括VH或VL核苷酸序列、限制性位点和保护限制性位点的侧翼序列的PCR引物可以用于扩增scFv克隆中的VH或VL序列。利用本领域技术人员已知的克隆技术,PCR扩增的VH域可以克隆到表达重链恒定区(例如,人 γ 4恒定区)的载体中,且PCR扩增的VL域可以克隆到表达轻链恒定区(例如,人 κ 或 λ 恒定区)的载体中。在某些实施方式中,用于表达VH或VL域的载体包含EF-1 α 启动子、分泌信号、用于可变区、恒定域和选择标记如新霉素的克隆位点。VH和VL域也可以克隆到表达必要的恒定区的一个载体中。重链转换载体和轻链转换载体然后使用本领域技术人员已知的技术共转染到细胞系中以产生表达全长抗体(例如,IgG)的稳定或瞬时细胞系。

[0278] DNA也可以例如通过用人重链和轻链恒定域的编码序列替代鼠序列或者通过共价接合全部或部分非免疫球蛋白多肽的编码序列到免疫球蛋白编码序列进行修饰。

[0279] 还提供了在高严格性、中等或低严格性杂交条件下与编码本文所述的抗体的多核苷酸杂交的多核苷酸。在特定的实施方式中,本文所述的多核苷酸在高严格性、中等或低严格性杂交条件下与编码本文提供的VH域和/或VL域的多核苷酸杂交。

[0280] 杂交条件已经在本领域中描述且是本领域技术人员已知的。例如,在严格条件下的杂交可以包括在约45℃下6x氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中与滤器结合的DNA杂交,接着在约50-65℃下0.2xSSC/0.1%SDS中的一个或多个洗涤;在高度严格条件下的杂交可以包括在约45℃下6xSSC中与滤器结合的核酸杂交,接着在约68℃下0.1xSSC/0.2%SDS中的一个或多个洗涤。在其它严格杂交条件下的杂交是本领域技术人员已知的且已经被描述,参见,例如,Ausubel FM等,eds.,(1989)Current Protocols in Molecular Biology,Vol.I,Green Publishing Associates,Inc.and John Wiley&Sons,Inc.,New York,6.3.1-6.3.6和2.10.3页。

[0281] 在某些方面中,本文提供了表达(例如,重组表达)特异性地结合CTLA-4(例如,人CTLA-4)的本文所述的抗体(或其抗原结合片段)的细胞(例如,宿主细胞),及相关多核苷酸

和表达载体。本文提供了用于在宿主细胞中,优选在哺乳动物细胞中重组表达的包含含有编码抗-CTLA-4抗体或片段的核苷酸序列的多核苷酸的载体(例如,表达载体)。本文还提供了包含用于重组表达本文所述的抗-CTLA-4抗体(例如,人或人源化抗体)的这类载体的宿主细胞。在特定的方面中,本文提供了用于产生本文所述的抗体的方法,包括从宿主细胞表达这样的抗体。

[0282] 特异性结合CTLA-4(例如,人CTLA-4)的本文所述的抗体(例如,全长抗体、抗体的重链和/或轻链或者本文所述的单链抗体)的重组表达包括构建包含编码抗体的多核苷酸的表达载体。一旦编码本文所述的抗体分子、抗体的重链和/或轻链或其片段(例如,重链和/或轻链可变区)的多核苷酸已经获得,用于产生抗体分子的载体可以使用本领域中公知的技术通过重组DNA技术产生。因此,用于通过表达包含抗体或抗体片段(例如,轻链或重链)编码核苷酸序列的多核苷酸制备蛋白质的方法在本文中描述。本领域技术人员公知的方法可以用于构建包含抗体或抗体片段(例如,轻链或重链)编码序列及适宜的转录和翻译控制信号的表达载体。这些方法包括,例如,体外重组DNA技术、合成技术和体内遗传重组。还提供了包含任选与启动子连接的编码本文所述的抗体分子、抗体的重链或轻链、抗体或其片段的重链或轻链可变区或者重链或轻链CDR的核苷酸序列的可复制载体。这样的载体可以,例如,包括编码抗体分子的恒定区的核苷酸序列(参见,例如,国际公开No. WO 86/05807和WO 89/01036;和U.S. 专利No. 5,122,464),且抗体的可变区可以克隆到这样的载体中用于表达整个重链、整个轻链或整个重链和轻链两者。

[0283] 表达载体可以通过常规技术转移到细胞(例如,宿主细胞)且所得细胞然后通过常规技术培养以产生本文所述的抗体或其片段。因此,本文提供了包含编码本文所述的抗体或其片段,或者其重链或轻链或其片段,或者本文所述的单链抗体的多核苷酸的宿主细胞,该多核苷酸与用于在宿主细胞中表达这样的序列的启动子可操作地连接。在某些实施方式中,为了表达双链抗体,单独地编码重链和轻链两者的载体可以在宿主细胞中共表达以表达整个免疫球蛋白分子,如以下详述的。在某些实施方式中,宿主细胞包含编码本文所述的抗体或其片段的重链和轻链两者的多核苷酸。在特定的实施方式中,宿主细胞包含两个不同的载体,第一载体包含编码本文所述的抗体或其片段的重链或重链可变区的多核苷酸,和第二载体包含编码本文所述的抗体或其片段的轻链或轻链可变区的多核苷酸。在其它实施方式中,第一宿主细胞包含含有编码本文所述的抗体或其片段的重链或重链可变区的多核苷酸的第一载体,和第二宿主细胞包含含有编码本文所述的抗体或其片段的轻链或轻链可变区的多核苷酸的第二载体。在特定的实施方式中,由第一细胞表达的重链/重链可变区与第二细胞的轻链/轻链可变区结合以形成本文所述的抗-CTLA-4抗体或其抗原结合片段。在某些实施方式中,本文提供了包含这样的第一宿主细胞和这样的第二宿主细胞的宿主细胞群体。

[0284] 在特定的实施方式中,本文提供包含含有编码本文所述的抗-CTLA-4抗体的轻链/轻链可变区的多核苷酸的第一载体和含有编码本文所述的抗-CTLA-4抗体的重链/重链可变区的多核苷酸的第二载体的载体群体。

[0285] 多种宿主-表达载体系统可以用于表达本文所述的抗体分子(参见,例如,U.S. 专利No. 5,807,715)。这样的宿主-表达系统代表目标编码序列可以通过其产生并随后纯化的媒介,但也代表在用适宜的核苷酸编码序列转化或转染时可以原位表达本文所述的抗体分

子的细胞。这些包括,但不限于用包含抗体编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的微生物如细菌(例如,大肠杆菌和枯草芽孢杆菌);用包含抗体编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如,毕赤酵母);用包含抗体编码序列的重组病毒表达载体(例如,杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用重组病毒表达载体(例如,花椰菜花叶病毒,CaMV;烟草花叶病毒,TMV)感染的或用包含抗体编码序列的重组质粒表达载体(例如,Ti质粒)转化的植物细胞系统(例如,绿藻如莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*));或携带包含源自哺乳动物细胞基因组的启动子(例如,金属硫蛋白启动子)或源自哺乳动物病毒的启动子(例如,腺病毒晚期启动子;牛痘病毒7.5K启动子)的重组表达构建体的哺乳动物细胞系统(例如,COS(例如,COS1或COS)、CHO、BHK、MDCK、HEK 293、NS0、PER.C6、VERO、CRL7030、HsS78Bst、HeLa、和NIH 3T3、HEK-293T、HepG2、SP210、R1.1、B-W、L-M、BSC1、BSC40、YB/20和BMT10细胞)。在具体的实施方式中,用于表达本文所述的抗体或其抗原结合片段的细胞是CHO细胞,例如来自CHO GS SystemTM(Lonza)的CHO细胞。在特定的实施方式中,用于表达本文所述的抗体的细胞是人细胞,例如,人细胞系。在具体的实施方式中,哺乳动物表达载体是pOptiVECTM或pcDNA3.3。在特定的实施方式中,尤其用于表达完整重组抗体分子的细菌细胞如大肠杆菌或真核细胞(例如,哺乳动物细胞)用于重组抗体分子的表达。例如,与载体如来自人巨细胞病毒的主要中早期基因启动子元件结合的哺乳动物细胞如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞是抗体的有效表达系统(Foecking MK&Hofstetter H(1986) Gene 45:101-5;和Cockett MI等,(1990) Biotechnology 8(7):662-7)。在某些实施方式中,本文所述的抗体通过CHO细胞或NS0细胞产生。在具体的实施方式中,编码本文所述的抗体(其特异性地结合CTLA-4(例如,人CTLA-4))的核苷酸序列的表达通过组成型启动子、诱导型启动子或组织特异性启动子调节。

[0286] 在细菌系统中,多种表达载体可以有利地根据所表达抗体分子预期的用途来选择。例如,当待产生大量的这种抗体用于生产抗体分子的药物组合物时,指导高水平的容易纯化的融合蛋白产物的表达的载体可能是希望的。这样的载体包括,但不限于大肠杆菌表达载体pUR278(Ruether U&Mueller-Hill B(1983) EMBO J 2:1791-1794),其中抗体编码序列可以单独地与lac Z编码区同框连接到载体中,使得产生融合蛋白;pIN载体(Inouye S&Inouye M(1985) Nuc Acids Res 13:3101-3109;Van Heeke G&Schuster SM(1989) J Biol Chem 24:5503-5509);等等。例如,pGEX载体也可以用于表达作为与谷胱甘肽5-转移酶(GST)的融合蛋白的外源多肽。一般地,这样的融合蛋白是可溶性的且可以通过吸附和结合基质谷胱甘肽琼脂糖珠从裂解的细胞纯化,接着在游离谷胱甘肽的存在下洗脱。pGEX载体设计为包括凝血酶或因子Xa蛋白酶切割位点以使得克隆的靶基因产物可以从GST部分释放。

[0287] 在昆虫系统中,例如,苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*)核多角体病毒(AcNPV)可以用作表达外源基因的载体。病毒在草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞中生长。抗体编码序列可以单独地克隆到病毒的非必需区(例如多角体基因)中并置于AcNPV启动子(例如多角体启动子)的控制下。

[0288] 在哺乳动物宿主细胞中,可以使用多种基于病毒的表达系统。在其中腺病毒用作表达载体的情况中,目标抗体编码序列可以连接到腺病毒转录/翻译控制复合体,例如,晚期启动子和三联体前导序列。这一嵌合基因然后可以通过体外或体内重组插入到腺病毒基

基因组中。病毒基因组的非必需区(例如,E1或E3区)中的插入将产生有活力的且能够在感染的宿主中表达抗体分子的重组病毒(例如,参见Logan J&Shenk T(1984)PNAS 81(12):3655-9)。特定的启动信号也可能是插入的抗体编码序列的高效翻译所需的。这些信号包括ATG启动密码子和相邻序列。此外,启动密码子必须与所需编码序列的阅读框同相以确保整个插入片段的翻译。这些外源翻译控制信号和启动密码子可以是多种来源的,天然的和合成的。表达的效率可以通过包括适宜的转录增强子元件、转录终止子等增强(参见,例如,Bitter G等,(1987)Methods Enzymol.153:516-544)。

[0289] 另外,可以选择调节插入序列的表达或者以所需的特定方式修饰和加工基因产物的宿主细胞株。蛋白质产物的这样的修饰(例如,糖基化)和加工(例如,切割)对于蛋白质的功能可能是重要的。不同的宿主细胞具有用于蛋白质和基因产物的翻译后加工和修饰的特定的特定机制。适宜的细胞系或宿主系统可以选择为确保所表达的外源蛋白的正确修饰和加工。为此目的,可以使用具有用于初级转录物的适当加工、基因产物的糖基化和磷酸化的细胞机制的真核宿主细胞。这样的哺乳动物宿主细胞包括,但不限于CHO、VERO、BHK、Hela、MDCK、HEK 293、NIH 3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20和T47D、NS0(不内源地产生任何免疫球蛋白链的鼠骨髓瘤细胞系)、CRL7030、COS(例如,COS1或COS)、PER.C6、VERO、HsS78Bst、HEK-293T、HepG2、SP210、R1.1、B-W、L-M、BSC1、BSC40、YB/20、BMT10和HsS78Bst细胞。在某些实施方式中,本文所述的抗-CTLA-4抗体在哺乳动物细胞,如CHO细胞中产生。

[0290] 在具体的实施方式中,本文所述的抗体或其抗原结合片段具有降低的岩藻糖含量或没有岩藻糖含量。这样的抗体可以使用本领域技术人员已知的技术产生。例如,抗体可以在岩藻糖化能力缺陷或缺乏的细胞中表达。在具体的实例中,敲除 α 1,6-岩藻糖基转移酶的两个等位基因的细胞系可以用于产生具有降低的岩藻糖含量的抗体或其抗原结合片段。

Potelligent[®]系统(Lonza)是可以用于产生具有降低的岩藻糖含量的抗体或其抗原结合片段的这种系统的实例。

[0291] 对于重组蛋白的长期、高产率的生产,可以生成稳定的表达细胞。例如,稳定地表达本文所述的抗-CTLA-4抗体或其抗原结合片段的细胞系可以工程化。在特定的实施方式中,本文提供的细胞稳定地表达轻链/轻链可变区和重链/重链可变区,其结合以形成本文所述的抗体或其抗原结合片段。

[0292] 在某些方面中,替代使用包含病毒复制起点的表达载体,宿主细胞可以用通过适宜的表达控制元件(例如,启动子、增强子、序列、转录终止子、多腺苷酸化位点等)控制的DNA和选择标记转化。在引入外源DNA/多核苷酸后,工程化细胞可以允许在富集培养基中生长1-2天,和然后转换到选择培养基。重组质粒中的选择标记赋予对选择的抗性且允许细胞稳定地整合质粒到其染色体中和生长以形成基因座,其随后可以克隆和扩增到细胞系中。这一方法可以有利地用于使表达本文所述的抗-CTLA-4抗体或其片段的细胞系工程化。这样的工程化细胞系可以特别地用于筛选和评价直接或间接地与抗体分子相互作用的组合物。

[0293] 可以使用多种选择系统,包括但不限于分别tk-、hgprt-或aprt-细胞中的单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler M等,(1977)Cell 11(1):223-32)、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(Szybalska EH&Szybalski W(1962)PNAS 48(12):2026-2034)和腺嘌呤磷酸核糖基转移酶(Lowy I等,(1980)Cell 22(3):817-23)基因。而且,抗代谢物抗性可以用作对于以下

基因的选择基础:dhfr,其赋予对甲氨喋呤的抗性(Wigler M等,(1980)PNAS 77(6):3567-70;O'Hare K等,(1981)PNAS 78:1527-31);gpt,其赋予对霉酚酸的抗性(Mulligan RC& Berg P(1981)PNAS 78(4):2072-6);neo,其赋予对氨基糖苷G-418的抗性(Wu GY&Wu CH (1991)Biotherapy 3:87-95;Tolstoshev P(1993)Ann Rev Pharmacol Toxicol 32:573-596;Mulligan RC(1993)Science 260:926-932;和Morgan RA&Anderson WF(1993)Ann Rev Biochem 62:191-217;Nabel GJ&Felgner PL(1993)Trends Biotechnol 11(5):211-5);和hygro,其赋予对潮霉素的抗性(Santerre RF等,(1984)Gene 30(1-3):147-56)。重组DNA技术领域通常已知的方法可以日常地应用于选择所需的重组克隆且这样的方法描述于,例如,Ausubel FM等,(eds.),Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley& Sons,NY(1993);Kriegler M,Gene Transfer and Expression,A Laboratory Manual,Stockton Press,NY(1990);和第12和13章,Dracopoli NC等,(eds.),Current Protocols in Human Genetics,John Wiley&Sons,NY(1994);Colbère-Garapin F等,(1981)J Mol Biol 150:1-14中,其通过引用全文合并于此。

[0294] 抗体分子的表达水平可以通过载体扩增提高(综述参见Bebbington CR& Hentschel CCG,The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning,Vol.3(Academic Press,New York,1987))。当表达抗体的载体系统中的标记是可扩增的时,宿主细胞培养物中存在的抑制剂水平的提高将增加标记基因的拷贝数。由于扩增的区域与抗体基因相关,抗体的产生也增加(Crouse GF等,(1983)Mol Cell Biol 3:257-66)。

[0295] 宿主细胞可以用本文所述的两种或更多种表达载体共转染,第一载体编码重链衍生的多肽和第二载体编码轻链衍生的多肽。两个载体可以包含相同的选择标记,这使得能够等同地表达重链和轻链多肽。宿主细胞可以用不同量的两种或更多种表达载体共转染。例如,宿主细胞可以用以下比率中任一种的第一表达载体和第二表达载体转染:1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:12、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45或1:50。

[0296] 或者,可以使用编码且能够表达重链和轻链多肽两者的单一载体。在这样的情况中,轻链应当置于重链之前以避免过量的毒性游离重链(Proudfoot NJ(1986)Nature 322:562-565;和Köhler G(1980)PNAS 77:2197-2199)。重链和轻链的编码序列可以包含cDNA或基因组DNA。表达载体可以是单顺反子的或多顺反子的。多顺反子的核酸构建体可以编码2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个或者2-5、5-10或10-20个范围的基因/核苷酸序列。例如,双顺反子的核酸构建体可以按以下顺序包含启动子、第一基因(例如,本文所述的抗体的重链)和第二基因(例如,本文所述的抗体的轻链)。在这样的表达载体中,两个基因的转录可以通过启动子驱动,而来自第一基因的mRNA的翻译可以通过帽依赖性(cap-dependent)的扫描机制和来自第二基因的mRNA的翻译可以通过非帽依赖性的机制,例如,通过IRES。

[0297] 一旦本文所述的抗体分子已经通过重组表达产生,它可以通过本领域已知用于免疫球蛋白分子纯化的任何方法进行纯化,例如,通过色谱(例如,离子交换色谱、亲和色谱,特别是通过对于蛋白A后的特定抗原的亲合力、和胶柱(sizing column)色谱)、离心、差异溶解性或通过任何其它用于蛋白质纯化的标准技术。此外,本文所述的抗体可以与本文所述的或本领域中另外已知的异源多肽序列融合以促进纯化。

[0298] 在特定的实施方式中,本文所述的抗体或其抗原结合片段被分离或纯化。通常,分离的抗体是基本上不含具有与分离的抗体不同的抗原特异性的其它抗体的抗体。例如,在特定的实施方式中,本文所述的抗体的制备物基本上不含细胞物质和/或化学前体。表述“基本上不含细胞物质”包括其中抗体与它从其中分离或重组产生的细胞的细胞组分分离的抗体制备物。因此,基本上不含细胞物质的抗体包括具有少于约30%、20%、10%、5%、2%、1%、0.5%或0.1% (以干重计)的异源蛋白质(本文中也称为“污染蛋白质”)和/或抗体的变体,例如,抗体的不同翻译后修饰的形式或抗体的其它不同形式(例如,抗体片段),的抗体制备物。当抗体重组产生时,它一般也基本上不含培养基,即,培养基占蛋白质制备物体积的少于约20%、10%、2%、1%、0.5%或0.1%。当抗体通过化学合成产生时,它一般基本上不含化学前体或其它化学品,即,它与参与蛋白质合成的化学前体或其它化学品分离。因此,这样的抗体制备物具有少于约30%、20%、10%或5% (以干重计)的化学前体或目标抗体以外的化合物。。在具体的实施方式中,本文所述的抗体被分离或纯化。

[0299] 特异性地结合CTLA-4 (例如,人CTLA-4)的抗体或其片段可以通过本领域中已知用于抗体的合成的任何方法产生,例如,通过化学合成或通过重组表达技术。除非另外指明,本文所述的方法采用分子生物学、微生物学、遗传分析、重组DNA、有机化学、生物化学、PCR、寡核苷酸合成和修饰、核酸杂交及现有技术的相关领域中的常规技术。这些技术描述于,例如,本文中引用的参考文献中且在文献中完全说明。参见,例如,Maniatis T等,(1982) *Molecular Cloning:A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J等,(1989) *Molecular Cloning:A Laboratory Manual*, Second Edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press; Sambrook J等,(2001) *Molecular Cloning:A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Ausubel FM等, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley&Sons (1987 and annual updates); *Current Protocols in Immunology*, John Wiley&Sons (1987及年度更新) Gait(ed.) (1984) *Oligonucleotide Synthesis:A Practical Approach*, IRL Press; Eckstein(ed.) (1991) *Oligonucleotides and Analogues:A Practical Approach*, IRL Press; Birren B等, (eds.) (1999) *Genome Analysis:A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press。

[0300] 在具体的实施方式中,本文所述的抗体是通过涉及DNA序列的生成(例如,经由合成)、遗传工程的任何方式制备、表达、生成或分离的抗体(例如,重组抗体)。在某些实施方式中,这样的抗体包含不天然存在于动物或哺乳动物(例如,人)体内的抗体种系库内的序列(例如,DNA序列或氨基酸序列)。

[0301] 在一个方面,本文提供了制备特异性结合CTLA-4 (例如,人CTLA-4)的抗体或其抗原结合片段的方法,包括培养本文所述的细胞或宿主细胞。在特定的方面中,本文提供了产生特异性结合CTLA-4 (例如,人CTLA-4)的抗体或其抗原结合片段的方法,包括使用本文所述的细胞或宿主细胞(例如,包含编码本文所述的抗体的多核苷酸的细胞或宿主细胞)表达(例如,重组表达)抗体或其抗原结合片段。在特定的实施方式中,细胞是分离的细胞。在特定的实施方式中,外源多核苷酸已经被引入细胞中。在特定的实施方式中,该方法进一步包括纯化从细胞或宿主细胞获得的抗体或其抗原结合片段的步骤。优选地,该方法体外进行。

[0302] 用于产生多克隆抗体的方法是本领域中已知的(参见,例如, *Short Protocols in*

Molecular Biology, (2002) 5th Ed., 第11章, Ausubel FM等, eds., John Wiley and Sons, New York)。

[0303] 单克隆抗体可以使用本领域中已知的广泛的技术制备, 包括使用杂交瘤、重组和噬菌体展示技术, 或其组合。例如, 单克隆抗体可以使用杂交瘤技术产生, 包括本领域中已知的和, 例如, 在Harlow E&Lane D, Antibodies: A Laboratory Manual, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988); Hammerling GJ等, in: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas 563-681 (Elsevier, N.Y., 1981) 中教导的那些。如本文中使用的术语“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。例如, 单克隆抗体可以从外源表达本文所述的抗体或其片段, 例如, 这种抗体的轻链和/或重链, 的宿主细胞重组产生。

[0304] 在特定的实施方式中, 如本文中使用的“单克隆抗体”是通过单一细胞(例如, 产生重组抗体的杂交瘤或宿主细胞)产生的抗体, 其中抗体特异性地结合CTLA-4(例如, 人CTLA-4), 如例如, 通过ELISA或本领域中已知的或本文提供的实施例中的其它抗原结合或竞争结合分析测定的。在特定的实施方式中, 单克隆抗体可以是嵌合抗体或人源化抗体。在某些实施方式中, 单克隆抗体是单价抗体或多价(例如, 二价)抗体。在特定的实施方式中, 单克隆抗体是单特异性的或多特异性的抗体(例如, 双特异性抗体)。例如, 本文所述的单克隆抗体可以, 例如, 通过如Kohler G&Milstein C (1975) Nature 256:495中所述的杂交瘤方法产生或可以, 例如, 使用本文所述的技术从噬菌体文库分离。用于制备克隆细胞系和由此表达的单克隆抗体的其它方法是本领域中公知的(参见, 例如, Short Protocols in Molecular Biology, (2002) 5th Ed., 第11章, Ausubel FM等, 同上)。

[0305] 使用杂交瘤技术产生和筛选特异性抗体的方法是日常的和本领域中公知的。例如, 在杂交瘤方法中, 小鼠或其它适宜的宿主动物如绵羊、山羊、兔、大鼠、仓鼠或猕猴被免疫以诱导产生或能够产生特异性地结合用于免疫的蛋白质(例如, CTLA-4(例如, 人CTLA-4))的抗体的淋巴细胞。或者, 淋巴细胞可以在体外进行免疫。淋巴细胞然后使用合适的融合剂如聚乙二醇与骨髓瘤细胞融合以形成杂交瘤细胞(Goding JW (Ed), Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986))。另外, RIMMS(多位点重复免疫)技术可以用于免疫动物(Kilpatrick KE等, (1997) Hybridoma 16:381-9, 通过引用全文并入)。

[0306] 在一些实施方式中, 小鼠(或其它动物, 如大鼠、猴、驴、猪、绵羊、仓鼠或狗)可以用抗原(例如, CTLA-4(例如, 人CTLA-4))免疫且一旦检测到免疫反应, 例如, 对于该抗原特异性的抗体在小鼠血清中检测到, 收获小鼠脾脏并分离脾细胞。脾细胞然后通过公知的技术与任何合适的骨髓瘤细胞融合, 例如可从American Type Culture Collection(ATCC®)(Manassas, VA)获得的细胞系SP20的细胞, 以形成杂交瘤。选择杂交瘤并通过有限的稀释进行克隆。在某些实施方式中, 收获免疫小鼠的淋巴结并与NS0骨髓瘤细胞融合。

[0307] 如此制备的杂交瘤细胞在优选包含抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞的生长或存活的一种或多种物质的合适培养基中接种和生长。例如, 如果亲本骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT或HPRT), 用于杂交瘤的培养基通常包括次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸苷(HAT培养基), 该物质阻止HGPRT-缺陷细胞的生长。

[0308] 特定的实施方式采用高效地融合、支持所选择的抗体-产生细胞的稳定高水平抗体产生和对如HAT培养基的培养基敏感的骨髓瘤细胞。在这些骨髓瘤细胞系中有鼠骨髓瘤

系,如NS0细胞系或可从Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, CA, USA获得的源自MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤的那些,及可从American Type Culture Collection, Rockville, MD, USA获得的SP-2或X63-Ag8.653细胞。人骨髓瘤和小鼠-人杂交骨髓瘤细胞系也已经描述用于产生人单克隆抗体(Kozbor D(1984) J Immunol 133:3001-5; Brodeur等, Monoclonal Antibodies Production Techniques and Applications, pp.51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987))。

[0309] 杂交瘤细胞在其中生长的培养基测定针对CTLA-4 (例如, 人CTLA-4) 的单克隆抗体的产生。通过杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性通过本领域中已知的方法(例如, 免疫沉淀)或通过体外结合分析如放射免疫分析(RIA)或酶联免疫吸附分析(ELISA)测定。

[0310] 在鉴定产生具有所需特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞后, 克隆可以通过有限稀释过程亚克隆并通过标准方法生长(Goding JW (Ed), Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, 同上)。用于这一目的的合适的培养基包括, 例如, D-MEM或RPMI 1640培养基。另外, 杂交瘤细胞可以在动物中作为腹水瘤在体内生长。

[0311] 通过亚克隆分泌的单克隆抗体通过常规免疫球蛋白纯化过程如, 例如, 蛋白A琼脂糖、羟基磷灰石色谱、凝胶电泳、透析或亲和色谱从培养基、腹水或血清适当地分离。

[0312] 本文所述的抗体包括识别特定CTLA-4 (例如, 人CTLA-4) 的抗体片段且可以通过本领域技术人员已知的任何技术产生。例如, 本文所述的Fab和F(ab')₂片段可以使用如木瓜蛋白酶(以产生Fab片段)或胰蛋白酶(以产生F(ab')₂片段)的胰通过免疫球蛋白分子的蛋白水解切割产生。Fab片段对应于抗体分子的两个相同臂之一且包含与重链的VH和CH1域配对的完整轻链。F(ab')₂片段包含通过铰链区中的二硫键连接的抗体分子的两个抗原结合臂。

[0313] 此外, 本文所述的抗体或其抗原结合片段还可以使用本领域中已知的各种噬菌体展示方法产生。在噬菌体展示方法中, 功能性抗体结构域展示在携带编码它们的多核苷酸序列的噬菌体颗粒的表面上。特别地, 编码VH和VL域的DNA序列从动物cDNA文库(例如, 受影响的组织的人或鼠cDNA文库)扩增。编码VH和VL域的DNA通过PCR与scFv接头重组在一起并克隆到噬粒载体中。载体电穿孔到大肠杆菌中且大肠杆菌用辅助噬菌体感染。用于这些方法中的噬菌体通常是丝状噬菌体, 包括fd和M13, 且VH和VL域通常与噬菌体基因III或基因VIII重组融合。可以用抗原选择或鉴定表达与特定抗原结合的抗原结合结构域的噬菌体, 例如, 使用标记的抗原或者结合或捕获到固体表面或珠的抗原。可以用于制备本文所述的抗体的噬菌体展示方法的实例包括Brinkman U等, (1995) J Immunol Methods 182:41-50; Ames RS等, (1995) J Immunol Methods 184:177-186; Kettleborough CA等, (1994) Eur J Immunol 24:952-958; Persic L等, (1997) Gene 187:9-18; Burton DR&Barbas CF (1994) Advan Immunol 57:191-280; PCT申请No. PCT/GB91/001134; 国际公开No. WO 90/02809, WO 91/10737, WO 92/01047, WO 92/18619, WO 93/1 1236, WO 95/15982, WO 95/20401和WO 97/13844; 及U.S. 专利No. 5,698,426, 5,223,409, 5,403,484, 5,580,717, 5,427,908, 5,750,753, 5,821,047, 5,571,698, 5,427,908, 5,516,637, 5,780,225, 5,658,727, 5,733,743和5,969,108中公开的那些。

[0314] 如上述文献中描述的, 在噬菌体选择后, 来自噬菌体的抗体编码区可以分离并用于产生全抗体, 包括人抗体, 或任何其它所需的抗原结合片段, 且在任何所需的宿主中表

达,包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母和细菌,例如,如下所述的。重组产生抗体片段如Fab、Fab' 和F(ab')₂片段的技术也可以使用本领域技术人员已知的方法来利用,如PCT公开No.WO 92/22324;Mullinax RL等,(1992) BioTechniques 12(6):864-9;Sawai H等,(1995) Am J Reprod Immunol 34:26-34;和Better M等,(1988) Science 240:1041-1043中公开的那些方法。

[0315] 在某些实施方式中,为生成全抗体,包括VH或VL核苷酸序列、限制性位点和保护限制性位点的侧翼序列的PCR引物可以用于从模板(例如,scFv克隆)扩增VH或VL序列。利用本领域技术人员已知的克隆技术,PCR扩增的VH域可以克隆到表达VH恒定区的载体中,且PCR扩增的VL域可以克隆到表达VL恒定区(例如,人κ或λ恒定区)的载体中。VH和VL域也可以克隆到表达必要恒定区的一个载体中。重链转化载体和轻链转化载体然后使用本领域技术人员已知的技术共转染到细胞系中以产生表达全长抗体(例如,IgG)的稳定或瞬时细胞系。

[0316] 嵌合抗体是其中抗体的不同部分源自不同免疫球蛋白分子的分子。例如,嵌合抗体可以包含与人抗体的恒定区融合的小鼠或大鼠单克隆抗体的可变区。用于产生嵌合抗体的方法是本领域中已知的。参见,例如,Morrison SL(1985) Science 229:1202-7;Oi VT&Morrison SL(1986) BioTechniques 4:214-221;Gillies SD等,(1989) J Immunol Methods 125:191-202;及U.S.专利No.5,807,715,4,816,567,4,816,397和6,331,415。

[0317] 人源化抗体能够结合预定的抗原且其包含具有基本上人免疫球蛋白的氨基酸序列的框架区和具有基本上非-人免疫球蛋白(例如,鼠免疫球蛋白)的氨基酸序列的CDR。在特定的实施方式中,人源化抗体也包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常人免疫球蛋白的恒定区的一部分。抗体也可以包括重链的CH1、铰链、CH2、CH3和CH4区。人源化抗体可以选自任何类别的免疫球蛋白,包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE,和任何同种型,包括IgG₁、IgG₂、IgG₃和IgG₄。人源化抗体可以使用本领域中已知的多种技术产生,包括但不限于,CDR-移植(欧洲专利No.EP 239400;国际公开No.WO 91/09967;和U.S.专利No.5,225,539,5,530,101和5,585,089)、镶嵌(veneering)或表面重塑(resurfacing)(欧洲专利No.EP 592106和EP 519596;Padlan EA(1991) Mol Immunol 28(4/5):489-498;Studnicka GM等,(1994) Prot Engineering 7(6):805-814;和Roguska MA等,(1994) PNAS 91:969-973),链改组(U.S.专利No.5,565,332),及例如,U.S.专利No.6,407,213,U.S.专利No.5,766,886,国际公开No.WO 93/17105;Tan P等,(2002) J Immunol 169:1119-25;Caldas C等,(2000) Protein Eng.13(5):353-60;Morea V等,(2000) Methods 20(3):267-79;Baca M等,(1997) J Biol Chem 272(16):10678-84;Roguska MA等,(1996) Protein Eng 9(10):895-904;Couto JR等,(1995) Cancer Res.55(23Supp):5973s-5977s;Couto JR等,(1995) Cancer Res 55(8):1717-22;Sandhu JS(1994) Gene 150(2):409-10和Pedersen JT等,(1994) J Mol Biol 235(3):959-73中公开的技术。也参见U.S.申请公开No.US 2005/0042664 A1 (Feb.24,2005),其通过引用全文并入本文中。

[0318] 用于制备多特异性抗体(例如,双特异性抗体)的方法已经被描述,参见,例如,U.S.专利No.7,951,917;7,183,076;8,227,577;5,837,242;5,989,830;5,869,620;6,132,992和8,586,713。

[0319] 单域抗体,例如,缺乏轻链的抗体,可以通过本领域中公知的方法产生。参见Riechmann L&Muyldermans S(1999) J Immunol 231:25-38;Nuttall SD等,(2000) Curr

Pharm Biotechnol 1 (3):253-263;Muyltermans S, (2001) J Biotechnol 74 (4):277-302; U.S. 专利No.6,005,079;及国际公开No.WO 94/04678,WO 94/25591和WO 01/44301。

[0320] 此外,特异性地结合CTLA-4抗原的抗体随之可以用于使用本领域技术人员公知的技术生成“模拟”抗原的抗-独特型抗体(参见,例如,Greenspan NS&Bona CA (1989) FASEB J 7 (5):437-444;和Nissinoff A (1991) J Immunol 147 (8):2429-2438)。

[0321] 在特定的实施方式中,与本文所述的抗-CTLA-4抗体结合相同的CTLA-4(例如,人CTLA-4)的表位的本文所述的抗体是人抗体或其抗原结合片段。在特定的实施方式中,竞争地阻断(例如,以剂量依赖性的方式)任何一种本文所述的抗体与CTLA-4(例如,人CTLA-4)的结合的本文所述的抗体是人抗体或其抗原结合片段。人抗体可以使用本领域中已知的任何方法产生。例如,可以使用不能够表达功能性内源免疫球蛋白但可以表达人免疫球蛋白基因的转基因小鼠。特别地,人重链和轻链免疫球蛋白基因复合体可以随机地或通过同源重组引入到小鼠胚胎干细胞中。或者,除人重链和轻链基因外,人可变区、恒定区和多变区可以引入小鼠胚胎干细胞中。小鼠重链和轻链免疫球蛋白基因可以通过同源重组单独或与入免疫球蛋白基因座的引入同时地赋予非功能。特别地, J_H 区的纯合删除阻止内源抗体产生。修饰的胚胎干细胞被扩增并微量注射到囊胚中以产生嵌合小鼠。嵌合小鼠然后可以繁殖以产生表达人抗体的纯合后代。转基因小鼠用所选择的抗原,例如,抗原(例如,CTLA-4)的全部或一部分,以正常方式进行免疫。针对抗原的单克隆抗体可以使用常规杂交瘤技术从免疫的转基因小鼠获得。转基因小鼠携带的人免疫球蛋白转基因在B细胞分化过程中重排,并随后发生类别转换和体细胞突变。因此,使用这样的技术,有可能产生治疗上有用的IgG、IgA、IgM和IgE抗体。对于用于产生人抗体的这一技术的综述,参见Lonberg N&Huszar D (1995) Int Rev Immunol 13:65-93。对于用于产生人抗体和人单克隆抗体的这一技术和用于产生这样的抗体的方案的详细讨论,参见,例如,国际公开No.WO 98/24893,WO 96/34096和WO 96/33735;及U.S. 专利No.5,413,923,5,625,126,5,633,425,5,569,825,5,661,016,5,545,806,5,814,318和5,939,598。能够产生人抗体的小鼠的实例包括XenomouseTM(Abgenix, Inc.; U.S. 专利No.6,075,181和6,150,184)、HuAb-MouseTM(Mederex, Inc./Gen Pharm; U.S. 专利No.5,545,806和5,569,825)、Trans Chromo MouseTM(Kirin)和KM MouseTM(Medarex/Kirin)。

[0322] 特异性地结合CTLA-4(例如,人CTLA-4)的人抗体可以通过本领域中已知的多种方法制备,包括使用源自人免疫球蛋白序列的抗体文库的上述噬菌体展示方法。也参见U.S. 专利No.4,444,887,4,716,111和5,885,793;及和国际公开No.WO 98/46645,WO 98/50433,WO 98/24893,WO 98/16654,WO 96/34096,WO 96/33735和WO 91/10741。

[0323] 在一些实施方式中,人抗体可以使用小鼠-人杂交瘤产生。例如,用Epstein-Barr病毒(EBV)转化的人外周血淋巴细胞可以与小鼠骨髓瘤细胞融合以产生分泌人单克隆抗体的小鼠-人杂交瘤,且这些小鼠-人杂交瘤可以进行筛选以确定分泌特异性地结合靶抗原(例如,CTLA-4(例如,人CTLA-4))的人单克隆抗体的小鼠-人杂交瘤。这样的方法是已知的且描述于本领域中,参见,例如,Shinmoto H等,(2004) Cytotechnology 46:19-23; Naganawa Y等,(2005) Human Antibodies 14:27-31。

[0324] 5.6试剂盒

[0325] 还提供了包含一种或多种本文所述的抗体,或者其药物组合物或偶联物的试剂

盒。在具体的实施方式中,本文提供了包含填充本文所述的药物组合物的一种或多种成分(如本文提供的一种或多种抗体或其抗原结合片段)的一个或多个容器的药物包装或试剂盒。在一些实施方式中,试剂盒包含本文所述的药物组合物和任何预防或治疗剂,如本文所述的那些。在某些实施方式中,试剂盒可以包含T-细胞丝裂原,如例如,植物血凝素(PHA)和/或乙酸肉豆蔻酸佛波醇酯(PMA),或者TCR复合物刺激抗体,如抗-CD3抗体和抗-CD28抗体。任选地与这样的容器结合的可以是管理药物或生物产品的制造、使用或销售的政府机构规定的形式的通告,该通告反映了政府机构对于制造、使用和销售用于人施用的批准。

[0326] 还提供了可以用于上述方法的试剂盒。在一个实施方式中,试剂盒在一个或多个容器中包含本文所述的抗体,优选纯化的抗体。在具体的实施方式中,本文所述的试剂盒包含作为对照的基本上分离的CTLA-4抗原(例如,人CTLA-4)。在另一具体的实施方式中,本文所述的试剂盒还包含不与CTLA-4抗原反应的对照抗体。在另一具体的实施方式中,本文所述的试剂盒包含用于检测抗体与CTLA-4抗原的结合的一个或多个元件(例如,抗体可以与可检测的基质如荧光化合物、酶底物、放射性化合物或发光化合物偶联,或者识别第一抗体的第二抗体可以与可检测的基质偶联)。在特定的实施方式中,本文提供的试剂盒可以包括重组产生的或化学合成的CTLA-4抗原。试剂盒中提供的CTLA-4抗原也可以附接于固体支持物。在更具体的实施方式中,上述试剂盒的检测手段包括CTLA-4抗原附接于其上的固体支持物。这样的试剂盒还可以包括非附接的报告体标记的抗-人抗体或抗-小鼠/大鼠抗体。在这一实施方式中,抗体与CTLA-4抗原的结合可以通过所述报告体标记的抗体的结合来检测。

[0327] 在一个实施方式中,本发明涉及本发明的试剂盒用于生物样品中人CTLA-4的体外测定和/或检测的用途。

[0328] 6. 实施例

[0329] 本章节(即,第6节)中的实施例通过举例说明来提供,而不是通过限制的方式。

[0330] 6.1 实施例1: 抗-CTLA-4抗体的表征

[0331] 本实施例描述了结合人CTLA-4的抗体的表征。特别地,名称AGEN1884的抗体在以下描述的多种分析中表征。抗-CTLA-4抗体AGEN1884包含含有SEQ ID NO:93的氨基酸序列的重链和含有SEQ ID NO:15的氨基酸序列的轻链。抗体AGEN1884是在轻链恒定域中包含根据Kabat编号的T109S置换(即,相对于野生型Fc序列在109位苏氨酸被丝氨酸置换)的人IgG₁抗体,该置换有助于可变区克隆成与恒定区同框。这一突变是不影响抗体结合或功能的保守修饰。也产生了在根据Kabat编号的109位包含苏氨酸的野生型对应物,命名为AGEN1884w。抗体AGEN1884w是包含SEQ ID NO:93的重链和SEQ ID NO:13的轻链的人IgG₁抗体。

[0332] 6.1.1 通过表面等离子体共振的动力学分析

[0333] 表面等离子体共振用于测定抗-CTLA-4抗体AGEN1884和参比抗-CTLA-4IgG₁抗体的亲和力(BIAcore® T100/T200灵敏度增强系统(GE Healthcare)和Fab-捕获分析)。所有相互作用在25℃下使用1xDPBS(PAA,H15-002)加P20(0.05%,Pierce,28320)作为运行缓冲液进行分析。抗-CTLA-4抗体(运行缓冲液中8μg/ml)通过固定的抗-人Fab抗体(GE Healthcare,Fab Capture Kit,28958325)捕获到CM5传感芯片(GE Healthcare, Series S CM5,BR-1005-30)的芯片表面上。为检测CTLA-4抗原的非特异性相互作用,抗体捕获仅在流

动池2中进行,而在流动池1中,仅捕获抗体被固定。在抗-CTLA-4抗体捕获后,CTLA-4抗原以不同的量通过两个流动池运行。具体地,重组人CTLA-4-Fc (R&D Systems,#7268-CT)、重组人CTLA-4 (Sino Biological,#11159-H08H)、重组食蟹猴CTLA-4-Fc (Sino Biological,#90213-C02H) 和重组食蟹猴CTLA-4 (Sino Biological,#90213-C08H) 以100nM、25nM和6.25nM运行;且重组小鼠CTLA-4-Fc (R&D,#434-CT)、重组大鼠CTLA-4-Fc (Sino Biological,#81069-R02H) 和重组大鼠CTLA-4 (Sino Biological,#81069-R08H) 以400nM、100nM和25nM运行。空白曲线(仅运行缓冲液)也包括在各运行中。结合运行90秒和解离运行600秒,流速为10 μ l/min。在各运行后,再生步骤用10mM Glycine pH 2.0 (GE Healthcare, BR-1003-55) 以30 μ l/min进行60秒。结合曲线使用BIAcore[®] T200评估软件版本2.0.1,应用具有Rmax整体拟合的Langmuir 1:1模型进行评估。从这些值,计算AGEN1884和参比抗-CTLA-4抗体对于各种抗原的亲和力(K_D)并显示于图1A中。本研究使用的重组单体食蟹猴CTLA-4、小鼠CTLA-4-Fc和单体大鼠CTLA-4未通过质量控制评估。抗-CTLA-4抗体与重组小鼠CTLA-4-Fc蛋白(其显示50%聚集)的结合很可能是由于非特异性相互作用。表面等离子体共振分析之后使用通过质量控制评估的重组小鼠CTLA-4-Fc (Sino Biological,#81069-R02H) 对于AGEN1884w以360nM、120nM、40nM和13.3nM重复两次。AGEN1884w不显示任何可检测的与小鼠CTLA-4的结合。

[0334] 6.1.2与过表达CTLA-4的细胞的抗体结合

[0335] 过表达人CTLA-4的Jurkat细胞 (Promega) 维持在包含10%FBS (Gemini Bio Products)、100 μ g/ml潮霉素B (Gibco) 和500 μ g/ml G418 (Promega) 的RPMI1640 (Life Technologies) 中。在用抗体染色前,细胞在FACS缓冲液(具有2%FBS的PBS)中洗涤一次。AGEN1884w、参比抗-CTLA-4IgG₁抗体和IgG₁同种型对照以10 μ g/ml开始的系列稀释液以100 μ l的体积添加到96-孔圆底平板的重复孔并在4 $^{\circ}$ C下孵育30分钟。细胞用150 μ l FACS缓冲液洗涤三次并用包含0.25 μ l PE偶联的小鼠抗-人 κ 抗体 (Invitrogen) 的100 μ l FACS缓冲液在4 $^{\circ}$ C下染色30分钟。细胞然后洗涤两次并重悬浮在100 μ l FACS缓冲液中。样品在LSRFortessa (BD Biosciences) 上获得。平均荧光强度(MFI)使用FlowJo软件(FlowJo, LLC) 进行分析并使用Prism 6 (GraphPad软件) 作图。如图1B中所示,抗体AGEN1884w结合于Jurkat细胞的表面上表达的人CTLA-4。

[0336] 6.1.3 CTLA-4抗体选择性分析

[0337] AGEN1884对于CTLA-4的选择性使用悬浮阵列技术作为多重分析以针对免疫球蛋白超家族的其它成员进行评定。多种免疫球蛋白超家族成员使用标准NHS-酯化学作用与Luminex[®]微球化学偶联。AGEN1884、参比抗-CTLA-4IgG₁抗体和IgG₁同种型对照的纯化材料在分析缓冲液(Roche 11112589001)中稀释到10ng/ml、100ng/ml和1000ng/ml。简言之,25 μ l的各稀释液在96半孔滤板 (Millipore, MABVN1250) 中在黑暗中(20 $^{\circ}$ C, 650rpm)用5 μ l分析缓冲液中的1500Luminex[®]微球孵育1小时。Luminex[®]微球与重组人CTLA-4-Fc (R&D Systems,#7268-CT)、重组食蟹猴CTLA-4-Fc (Sino Biological,#90213-C02H)、rhCD28-Fc (R&D,#342-CD-200)、rhICOS-Fc (R&D,#169-CS-050)、rhBTLA-Fc (Sino Biological,#11896-H02H)、rhPD-1-Fc (R&D Systems,#1086-PD) 或重组食蟹猴PD-1-Fc (内部产生) 通过与COOH珠表面的胺偶联来进行偶联。标准曲线使用25 μ l人IgG₁标准品 (Sigma, I5154) 以1:3

稀释系列(0.08-540ng/ml)的重复生成。检测使用60 μ l的用R-PE(2.5 μ g/ml;JIR 109-116-098,AbDSerotec Rapid RPE Antibody Conjugation Kit,LNK022RPE)标记的山羊抗-人IgG F(ab)₂和另一小时的孵育时间(20 $^{\circ}$ C,650rpm)进行。平板使用Luminex[®] 200系统(Millipore)进行分析。总共100个珠在48 μ l样品体积中按照孔计数。PE MFI值用于确定与上述重组蛋白的特异性或非特异性结合。

[0338] 如图1C和1D中所示,抗体AGEN1884显示与人和食蟹猴CTLA-4的特异性结合。在测试浓度下没有观察到与其它所列免疫球蛋白超家族成员的显著结合。

[0339] 6.1.4抗体与由活化T细胞表达的CTLA-4的结合

[0340] 接着,检查AGEN1884w与活化人T细胞的表面上表达的CTLA-4的结合。通过Ficoll梯度密度分离从健康供体血沉棕黄层(Research Blood Components,LLC)分离的人PBMC使用磁珠(Stemcell Technologies)富集未受影响的CD4⁺T细胞。富集的CD4⁺T细胞群体然后以1x 10⁶/ml重悬于补充有10%人AB血清(Sigma)的RPMI1640培养基中。100 μ l中的1x 10⁵细胞接种到用抗-CD3抗体(3 μ g/ml,BD Biosciences)和抗-CD28抗体(10 μ g/ml,BD Biosciences)预涂覆的平底96孔板的各孔中并在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下培养。在第5天,合并细胞并使用Muse Cell Analyzer(EMD Millipore)计数。50,000个细胞在96-孔圆底平板上用10 μ g/ml开始系列稀释的100 μ l的AGEN1884w、参比抗-CTLA-4IgG₁抗体和IgG₁同种型对照在4 $^{\circ}$ C下染色30分钟。细胞用150 μ l FACS缓冲液洗涤三次并用含0.25 μ l PE标记的小鼠抗-人 κ 抗体(Invitrogen)和1 μ l的APC-CD4(BD Bioscience)的100 μ l FACS缓冲液在4 $^{\circ}$ C下染色30分钟。细胞然后洗涤两次并重悬于100 μ l的FACS缓冲液中。样品在FACSCanto II System(BD Biosciences)上获得。CD4⁺T细胞中PE的平均荧光强度(MFI)使用FlowJo软件(FlowJo,LLC)进行分析。如图2A中所示,AGEN1884w结合于活化人CD4⁺T细胞的表面上表达的CTLA-4。

[0341] 抗体AGEN1884与食蟹猴(*Macaca fascicularis*)CTLA-4的结合特征通过流式细胞分析进行分析。通过ficoll梯度分离的食蟹猴PBMC(Biomedical Primate Research Centre,Netherlands)在50U/ml IL-2(BioLegend,589106)存在下在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下在补充有10%胎牛血清、10mM HEPES和1X Pen/Strep-Glutamine的RPMI-1640培养基中使用板结合的8 μ g/ml抗-CD3(BD,557052)和0.1 μ g/ml抗-CD28抗体(eBioscience,Cat.16-0289-85)激活3天。在激活后,细胞在4 $^{\circ}$ C下用在FACS缓冲液(具有2%FBS的PBS)中1:100稀释的抗-CD8a抗体(eBioscience,9043-0087-120)孵育30分钟。细胞然后用FACS缓冲液洗涤两次并按照制造商的方案应用于BD Bioscience Kit(51-2090KZ)的Cytofix/Cytoperm程序。9-0.037 μ g/ml的AGEN1884、参比抗-CTLA-4IgG₁抗体和IgG₁同种型对照的1:3系列稀释液应用于细胞。样品悬浮于200 μ l的FACS缓冲液中并使用FACS Diva流式细胞仪(BD Biosciences)分析。当用于细胞内染色时,抗-CTLA-4抗体AGEN1884显示与活化的食蟹猴CD8⁺T细胞的结合(图2B)。

[0342] 此外,来自人、食蟹猴(Indochinese)、大鼠或小鼠的外周血单核细胞(PBMC)等分到96-孔圆底组织培养板的孔中(1x 10⁵细胞/孔)并在37 $^{\circ}$ C和5%CO₂下补充有10%胎牛血清、15mM HEPES、100IU/ml青霉素、100mg/ml链霉素、2mM L-谷氨酰胺、100IU/ml IL-2(Peprotech)和1 μ g/ml植物凝集素(PHA)(Roche)的RPMI-1640中刺激4天。在刺激后,洗涤细胞并加入5%热灭活人AB血清(Sigma-Aldrich)以阻断Fc受体和防止抗体的非特异性结合。细胞再次洗涤并重悬于100 μ l的稀释APC-偶联抗-CD4抗体(克隆OKT4、GK15或W3/25;

Biolegend) 中。在黑暗中孵育45分钟后,细胞洗涤三次并按照制造商的指示使用FoxP3/Transcription Factor Staining Buffer Set(eBioscience) 渗透。在渗透后,细胞在黑暗中4℃下用0.00003μg/ml-10μg/ml范围的荧光标记(Pacific Blue™) AGEN1884w或同种型对照抗体的系列稀释液孵育45分钟。细胞在使用Becton Dickinson LSRFortessa™的流式细胞分析之前洗涤两次。数据使用FlowJo软件(版本10) 分析。如图2C中所示,抗体AGEN1884w结合于PHA-刺激的CD4+人和食蟹猴T细胞,但不结合大鼠或小鼠T细胞。

[0343] 6.1.5配体阻断活性

[0344] 为确定抗-CTLA-4抗体是否阻断配体CD80和CD86的结合,使用悬浮阵列技术进行分级分析设置(图3A中显示的示意图)。5μl分析缓冲液中的1200Luminex®珠(Luminex Corp, #14LC10014-01) 添加到96-孔半区域平板(Corning, Inc., 3884) 的各孔。珠通过与COOH珠表面的胺偶联与CTLA-4抗原(rhCTLA-4-Fc, R&D, #7268-CT) 偶联。偶联反应使用50μg/ml的CTLA-4抗原和 1×10^7 Luminex珠/ml进行。标准NHS酯化学作用用于形成抗原的伯胺基与珠表面上的羧基之间的碳二亚胺键(Luminex Xmap细则手册第3章)。

[0345] 蛋白质的抗原偶联是简单的两步碳二亚胺过程,其中微球羧基首先在Sulfo-NHS(N-羟基琥珀酰亚胺)存在下用EDC(1-乙基-3-[3-二甲基氨基丙基]碳二亚胺盐酸盐)试剂激活以形成sulfo-NHS-酯中间体。反应性中间体然后通过靶分子(抗体、蛋白质或肽)的伯胺的反应以形成共价酰胺键而取代。偶联的珠用不同浓度的抗-CTLA-4抗体(在添加珠前,每孔25μl分析缓冲液中9000ng/ml-12ng/ml的浓度)在20℃和650rpm下孵育1小时。测试的抗-CTLA-4抗体是AGEN1884、参比抗-CTLA-4IgG₁抗体和IgG₁同种型对照抗体。之后,30μl的R-PE标记的CD80(R&D Systems, #140-B1) 或CD86(R&D Systems, #141-B2) 以1nM的浓度添加到各孔,给出60μl的总孔体积(1200珠/孔和0.5nM的标记CD80或CD86的终浓度)。配体的标记使用R-PE标记试剂盒(AbD Serotec, LYNX Rapid RPE Antibody Conjugation Kit, LNK023RPE) 按照制造商的方案内部进行。平板使用Luminex®200系统(Millipore) 进行分析。100个珠在50μl样品体积中按照孔计数。配体阻断潜能使用仅配体对照的非竞争信号(100%结合)的MFI值计算。PE可检测信号表明与抗原的配体结合。AGEN1884以56ng/ml的估计IC₅₀抑制CD80(图3B) 和CD86(图3C) 与CTLA-4的结合。

[0346] 接着,检查抗-CTLA-4抗体阻断重组CD80-Fc和CD86-Fc与细胞表面表达的CTLA-4的结合的能力。简言之,CTLA-4表达T细胞(Jurkat) 用提高浓度的AGEN1884w、参比抗-CTLA-4IgG₁抗体或IgG₁同种型对照抗体(0、0.001、0.004、0.012、0.037、0.11、0.33、0.99和2.96μg/ml) 孵育,然后与固定浓度(0.625μg/ml) 的荧光标记CD80-Fc或CD86-Fc孵育。被CD80-Fc或CD86-Fc结合的细胞的百分比通过流式细胞术测定。如图3D中所示,AGEN1884w和参比抗-CTLA-4IgG₁抗体抑制CD80-Fc和CD86-Fc与表达CTLA-4的Jurkat细胞的结合。

[0347] 此外,检查抗-CTLA-4抗体AGEN1884w破坏细胞表面表达的CTLA-4和重组CD80或CD86的预形成复合物的能力。简言之,经工程化以在细胞表面上组成型表达CTLA-4的Jurkat细胞在96-孔圆底平板中4℃下用系列稀释的CD80-Fc或CD86-Fc(R&D Systems) (10-0.0002μg/ml) 孵育30分钟。在洗涤后,添加固定浓度(67nM) 的荧光标记(PerCP-CY5.5) AGEN1884w或参比抗-CTLA-4IgG₁抗体且平板在4℃下孵育30分钟。平板再次洗涤且细胞重悬于100μl的PBS中的1%多聚甲醛(Alfa Aear) 中。样品使用Becton Dickinson FACSCanto™流式细胞仪分析且数据使用FlowJo软件(版本10) 分析。抗体AGEN1884w以剂量

依赖性的方式破坏CTLA-4和CD80或CD86的预形成复合物(图3E)。

[0348] 6.1.6在葡萄球菌肠毒素A(SEA)刺激后抗-CTLA-4抗体对人T细胞的作用

[0349] 抗-CTLA-4抗体对原代人T细胞的功能活性在葡萄球菌肠毒素A(SEA)刺激后评价。在补充有青霉素、链霉素和10%FBS(Hyclone)的RPMI1640中低温保存的PBMC(10^5 细胞/孔)添加到96-孔NUNC LON delta表面板(NUNC™)。细胞在37℃、5%CO₂和97%湿度下在3.2、16、80、400、2000、10000和50000ng/ml的抗体浓度及100ng/ml的SEA(Toxin Technologies)的存在下培养5天。测试的抗体是AGEN1884w、参比抗-CTLA-4IgG₁抗体和IgG₁同种型对照。收集澄清的上清液并在-80℃下储存直到分析。IL-2的滴度通过电化学发光(MSD)产生。

[0350] 如图4A中所示,AGEN1884w在SEA刺激存在下增加T细胞的IL-2产生。

[0351] 6.1.7抗-CTLA-4抗体对IL-2-荧光素酶报告细胞素的作用

[0352] 抗-CTLA-4抗体AGEN1884w的功能活性进一步使用IL-2-荧光素酶报告分析进行分析。简言之,内源表达CD28的人T细胞系(Jurkat)被工程化以组成型表达细胞表面CTLA-4和通过IL-2启动子驱动的荧光素酶报告基因。工程化Jurkat细胞系与表达CD80和CD86的抗原呈递细胞系(Raji)共培养。T细胞受体(TCR)触发(信号1)用小鼠抗-人CD3抗体和山羊抗-小鼠IgG(H+L)抗体获得;且共刺激信号传导(信号2)通过Raji细胞上表达的CD80和CD86反式提供。Raji细胞上CD80和CD86的表达通过流式细胞术确认(图4B)。Jurkat T细胞系上TCR的交联触发IL-2表达,导致荧光素酶产生,这是T细胞激活的替代标志物。这两种细胞系的共培养导致抑制性共受体CTLA-4(Jurkat细胞上表达的)与其天然配体CD80和CD86(Raji细胞上表达的)的啮合,从而抑制T细胞激活,这通过荧光素酶表达的缺乏证明。这种抑制在添加提高浓度的AGEN1884w(0-300mg/ml)时缓解,因为AGEN1884w阻断CTLA-4与其配体CD80和CD86的相互作用并改变这些配体与共刺激T细胞共受体CD28的相互作用。荧光素酶表达使用Bio-Glo™试剂定量且所得数据用于确定最大倍数反应值(AGEN1884w与IgG₁同种型对照抗体相比的倍数增加)。

[0353] 如图4C中所示,抗-CTLA-4抗体AGEN1884w在这一IL-2-荧光素酶报告分析中剂量依赖性地缓解CTLA-4介导的T细胞抑制。

[0354] 6.1.8抗-CTLA-4抗体的激动性活性的缺乏

[0355] 评估了AGEN1884w介导CTLA-4正向信号传导的潜能。原代CD3-表达人T细胞使用Miltenyi Pan T细胞微珠试剂盒从外周血单核细胞分离,并与板结合的抗-CD3抗体(克隆SP34,10μg/ml)培养以激活TCR信号传导。AGEN1884w或IgG₁同种型对照抗体以可溶性或板结合的形式(0.003-50μg/ml)包括在TCR激活的环境中。在培养四天和用Brefeldin A(BD GolgiPlug™)最终6-小时孵育后,细胞用针对表面谱系标志物的荧光团偶联抗体染色,包括抗-CD3抗体(APC Cy7,克隆SP34)、抗-CD8抗体(PE Cy7,克隆SK1)和抗-CD4抗体(PercP Cy5.5,克隆L200),接着细胞用Cytofix-Cytoperm™(Beckton Dickinson)渗透。对于细胞内细胞因子产生的评估,细胞用抗-IFNγ抗体(Alexa fluor 647,克隆B27)和抗-TNFα抗体(PE,克隆Mab11)染色。获取细胞用于使用FACSCanto II的流式细胞分析,且数据分析用Flowjo版本10进行。

[0356] 提高浓度的可溶性的(图4D)或板结合的(图4E)AGEN1884w对CD8+IFNγ+T细胞的百分比没有影响,如与IgG₁同种型对照抗体相比的。在高达50μg/ml的浓度下,AGEN1884w不

作为CTLA-4激动剂抗体发挥作用。

[0357] 6.1.9与抗-LAG-3抗体或抗-PD-1抗体的组合

[0358] 接着,使用用葡萄球菌肠毒素A (SEA) 亚最佳刺激的PBMC检查抗-CTLA-4抗体AGEN1884w与抗-LAG-3拮抗剂抗体或抗-PD-1拮抗剂抗体的协同。简言之,低温保存的人PBMC (Research Blood Components) 在96-孔NUNCTM delta表面板 (NUNCTM) 中补充有NormocinTM (Invivogen#ant-nr) 和10%热灭活FBS (Gibco, Invitrogen Corporation) 的RPMI1640中以10⁵细胞/孔铺板。细胞在10μg/ml可溶性AGEN1884w或IgG₁同种型对照以及5μg/ml抗-LAG-3IgG₁抗体AGEN1746、纳武单抗 (批号AAB5719, Myoderm)、帕姆单抗 (批号7002688300, Myoderm)、IgG₁同种型对照或IgG₄同种型对照存在下用100ng/ml SEA (Toxin Technologies) 在37℃、5%CO₂和97%湿度下培养5天。测试的抗体及其相应浓度显示于图4F中。这一分析中使用的抗-LAG-3抗体AGEN1746基于U.S. 申请公开No. US 2011/0150892 (通过引用并入本文) 中提供的抗体25F7的可变区产生。AGEN1746包含SEQ ID NO:91的氨基酸序列的重链和SEQ ID NO:92的氨基酸序列的轻链 (表8)。收集澄清的上清液并储存在-80℃下直到分析。IL-2细胞因子使用AlphaLISA (Perkin Elmer) 检测。计算IL-2浓度的平均值和标准差。

[0359] 表8. 抗-LAG-3抗体AGEN1746的序列

SEQ ID NO:	描述	氨基酸序列
91	AGEN1746重链	QVQLQQWGAGLLKPSETLSLTCAVYGGSFSDYYWNWIRQPP GKGLEWIGEINHNGNTNSNPSLKSRVTLSDTSKNQFSLKLRS VTAADTAVYYCAFGYSDYEYNWFDPWGQGTLTVSSASTKG PSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALT SGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE KTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
92	AGEN1746轻链	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSISSYLAWYQQKPGQA PRLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYY CQQRSNWPLTFGQGTNLEIKRSVAAPSVFIFPPSDEQLKSGT ASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGE
		C

[0362] 如图4F中所示,抗-CTLA-4抗体AGEN1884w与抗-LAG-3抗体AGEN1746、抗-PD-1抗体纳武单抗或抗-PD-1抗体帕姆单抗的组合相对于单药剂处理增强用SEA超抗原亚最佳刺激的PBMC的IL-2产生。

[0363] 6.2实施例2:具有IgG₁或IgG₂恒定区的抗-CTLA-4抗体的比较

[0364] 在这一实施例中,AGEN1884w,其是人IgG₁抗体,转化为人IgG₂抗体,AGEN2041w。抗体AGEN2041w与AGEN1884w共有相同的重链可变区和相同的轻链,但包含人IgG₂恒定区。抗体AGEN2041w包含SEQ ID NO:94的重链序列和SEQ ID NO:13的轻链序列。

[0365] 另外,具有突变的Fc区的多种AGEN1884w也进行测试以检查Fc γ R相互作用对于抗-CTLA-4抗体的拮抗活性的影响。AGEN1884w-N297A包含SEQ ID NO:95的重链序列和SEQ

ID NO:13的轻链序列。AGEN1884w-S267E/L328F包含SEQ ID NO:96的重链序列和SEQ ID NO:13的轻链序列。AGEN1884w-S239D/A330L/I332E包含SEQ ID NO:97的重链序列和SEQ ID NO:13的轻链序列。所有残基根据EU编号系统编号。

[0366] 6.2.1具有IgG₂恒定区的抗-CTLA-4抗体的结合、配体阻断和选择性分析

[0367] 抗-CTLA-4抗体AGEN2041w、参比抗-CTLA-4IgG₁抗体和参比抗-CTLA-4IgG₂抗体的亲和力如6.1.1节中描述的通过表面等离子体共振进行分析。测试的CTLA-4抗原是重组人CTLA-4-Fc (R&D Systems, #7268-CT)、重组人CTLA-4 (Sino Biological, #11159-H08H)、重组食蟹猴CTLA-4-Fc (Sino Biological, #90213-C02H) 和重组食蟹猴CTLA-4 (Sino Biological, #90213-C08H)。亲和力值列于图5A中。

[0368] 接着, AGEN2041w与过表达人CTLA-4的Jurkat细胞的结合在类似于6.1.2节中所述分析的流式细胞分析中进行分析。简言之, 过表达人CTLA-4的Jurkat细胞 (Promega) 首先用系列稀释的AGEN2041w、参比抗-CTLA-4IgG₂抗体或IgG₂同种型对照染色和然后用APC-偶联的小鼠抗-人 κ 抗体 (Invitrogen) 染色。样品在FACSCanto II (BD Biosciences) 上获得且使用FlowJo软件 (FlowJo, LLC) 分析平均荧光强度 (MFI)。AGEN2041w结合于过表达人CTLA-4的Jurkat细胞 (图5B)。

[0369] AGEN2041w、参比抗-CTLA-4IgG₂抗体和IgG₂同种型对照的配体阻断活性使用如6.1.5节中描述的悬浮阵列技术检查。如图5C中所示, AGEN2041w抑制CD80和CD86与CTLA-4的结合。

[0370] AGEN2041w和参比抗-CTLA-4IgG₂抗体的选择性使用如6.1.3节中描述的悬浮阵列技术与IgG₂同种型对照抗体进行比较。如图5D和5E中所示, AGEN2041w特异性地结合于人和食蟹猴CTLA-4。没有观察到与相关家族成员 (重组人CD28、ICOS、BTLA和PD-1; 和重组食蟹猴PD-1) 的显著结合。

[0371] 6.2.2具有IgG₁或IgG₂恒定区的抗-CTLA-4抗体在葡萄球菌肠毒素A (SEA) 刺激后对人T细胞的作用

[0372] 抗-CTLA-4抗体AGEN1884w和AGEN2041w的功能活性在原代人PBMC分析中测试IL-2的诱导。该分析如6.1.6节中所述的进行。简言之, 人PBMC在0.016、0.08、0.4、2.0、10、50和250 μ g/ml的提高抗体浓度及100ng/ml的SEA (Toxin Technologies) 存在下培养5天。测试的抗体是抗-CTLA-4抗体AGEN1884w和AGEN2041w、IgG₁同种型对照和IgG₂同种型对照。IL-2的滴度通过电化学发光 (MSD) 测定。

[0373] 如图6A中所示, AGEN1884w和AGEN2041w两者在SEA刺激后刺激IL-2的产生。

[0374] 6.2.3具有IgG₂恒定区的抗-CTLA-4抗体对IL-2-荧光素酶报告细胞系的作用

[0375] 接着, 抗-CTLA-4抗体AGEN2041w的功能活性使用类似于如上所述的IL-2-荧光素酶报告分析进行评估。简言之, 经遗传工程化以表达表面CTLA-4和IL-2启动子下游的荧光素酶报告基因的T细胞 (Jurkat) 添加到包含提高浓度的AGEN2041w或IgG₂同种型对照的孔中。随后, 内源表达CD80和CD86且遗传工程化以表达“T细胞激活剂”的Raji细胞添加到细胞培养物。“T细胞激活剂”是以抗原依赖性的方式结合T细胞受体 (TCR) (导致T细胞激活) 的专有细胞表面受体。遗传工程化的Jurkat细胞系上TCR的刺激触发IL-2表达, 导致荧光素酶产生。AGEN2041w添加到这一分析中阻断CTLA-4 (在Jurkat细胞上表达的) 与其天然配体CD80和CD86 (在Raji细胞上表达的) 的啮合, 从而增加荧光素酶的产生。荧光素酶浓度使用Bio-

Glo™定量且所得数据用于确定最大倍数反应值(与没有抗体的情况下的基础荧光素酶活性相比的AGEN2041w的倍数提高)。

[0376] 如图6B中所示,提高浓度的AGEN2041w以剂量依赖性的方式导致增强的T细胞激活。相反,IgG₂同种型对照甚至在所测试的最高浓度下不增强荧光素酶表达。

[0377] 6.2.4通过稳定克隆产生的AGEN1884w的表征

[0378] 在这一实施例中,通过稳定克隆105产生的AGEN1884w (AGEN1884w-105) 检查其与细胞表面表达的CTLA-4的结合和在原代人PBMC分析中的功能活性。

[0379] AGEN1884w-105与过表达人CTLA-4的Jurkat细胞的结合在类似于6.1.2节中所述分析的流式细胞分析中进行分析。简言之,过表达人CTLA-4的Jurkat细胞(Promega)首先用系列稀释的AGEN1884w-105、参比抗-CTLA-4IgG₁抗体或IgG₁同种型对照染色和然后用PE-偶联的小鼠抗-人 κ 抗体(Invitrogen)染色。样品在FACSCanto II (BD Biosciences) 上获得且使用FlowJo软件(FlowJo, LLC) 分析平均荧光强度(MFI)。AGEN1884w-105结合于过表达人CTLA-4的Jurkat细胞(图7A)。

[0380] AGEN1884w-105诱导IL-2产生的能力在类似于6.1.6节中所述分析的分析中检验。简言之,人PBMC在100ng/ml的SEA (Toxin Technologies) 及20 μ g/ml的AGEN1884w-105、参比抗-CTLA-4IgG₁抗体或IgG₁同种型对照的存在下培养5天。IL-2的滴度通过电化学发光(MSD)测定。如图7B中所示的,AGEN1884w-105在SEA刺激后诱导IL-2产生。

[0381] 6.2.5抗-CTLA-4抗体与表面表达的Fc γ 受体的结合

[0382] 抗-CTLA-4抗体与CHO细胞表面上表达的人Fc γ RIIA、Fc γ RIIB和Fc γ RIIIA的结合通过流式细胞术测量。简言之,CHO细胞用编码人Fc γ RIIA^{H131}、Fc γ RIIB或Fc γ RIIIA^{V158}的cDNA转染,从而产生以下CHO细胞系:rCHO-huFc γ RIIA⁺、rCHO-huFc γ RIIB⁺和rCHO-huFc γ RIIIA⁺。进行0.0056-1000 μ g/ml范围的剂量滴定的抗体的结合且第一抗体使用与藻红蛋白(PE)偶联的抗-人F(ab')₂第二抗体(Jackson Immune Research)检测。样品通过流式细胞术测试,且PE平均荧光强度(MFI)值被分析和用于生成结合曲线。测试的抗体是AGEN1884w、AGEN2041w、参比抗-CTLA-4IgG₁抗体和IgG₁同种型对照抗体。在两种不同生长培养基中产生的AGEN1884w用于这一研究中:来自Life Technologies Inc./Thermo的生长培养基CD FortiCHO™ (AGEN1884w-FortiCHO) 和来自Lonza的生长培养基PowerCHO™ 2 (AGEN1884w-PowerCHO)。参比抗-CTLA-4IgG₁抗体包含来自AGEN1884w中的一个的不同IgG₁异型。IgG₁同种型对照抗体仅以1000 μ g/ml测试。

[0383] 如图8A中所示,AGEN1884w-FortiCHO、AGEN1884w-PowerCHO和AGEN2041w表现出与参比抗-CTLA-4IgG₁抗体相比增强的与Fc γ RIIA^{H131}-表达细胞的结合。类似地,AGEN1884w-PowerCHO和AGEN1884w-FortiCHO与Fc γ RIIB-表达细胞的结合强于参比抗-CTLA-4IgG₁抗体的结合(图8B)。全部IgG₁抗体、AGEN1884w-FortiCHO、AGEN1884w-PowerCHO和参比抗-CTLA-4 IgG₁抗体类似地与细胞表面上表达的Fc γ RIIIA^{V158}结合(图8C)。AGEN2041w显示出与IgG₁抗体相比较弱的与Fc γ RIIB(图8B)和Fc γ RIIIA^{V158}(图8C)的结合。

[0384] 6.2.6抗-CTLA-4抗体与重组Fc γ 受体的结合

[0385] 抗-CTLA-4抗体、AGEN1884w-FortiCHO、AGEN1884w-PowerCHO、AGEN2041w和参比抗-CTLA-4IgG₁抗体与人Fc γ RIIA和Fc γ RIIIA的结合使用表面等离子体共振(BIAcore® 3000)测量。

[0386] 对于与Fc γ RIIA的结合,对于CM5芯片的直接固定方法使用标准胺化学应用。重组人Fc γ RIIA-His蛋白在乙酸钠溶液,pH 4.0中稀释到10 μ g/ml的浓度并以5 μ l/min的流速使用8分钟的注射固定到流动池2和4。用作参比流动池的流动池1和3是伪偶联的(sham-coupled),即,胺偶联试剂如在没有Fc γ RIIA的流动池2和4中一样在该流动池上运行。固定的Fc γ RIIA表面的性能在各流动池上使用HBS-EP Biacore运行缓冲液中的1mg/ml的曲妥珠单抗以100 μ l/min的流速测试0.5分钟的注射。

[0387] 对于与Fc γ RIIIA的结合,捕获方法通过固定于CM5芯片的抗-tetra His抗体进行。小鼠抗-His抗体在乙酸钠溶液,pH 5.0中稀释到10 μ g/ml的浓度并通过标准胺化学以10 μ l/min的流速使用5分钟的注射固定到全部四个流动池。重组人Fc γ RIIIA-His蛋白通过以5 μ l/min的流速注射1 μ g/ml浓度的Fc γ RIIIA-His溶液2分钟捕获到芯片表面。

[0388] 所有测试抗体在分析前缓冲液交换到Biacore运行缓冲液中。缓冲液交换样品和中间原液的蛋白质浓度通过使用Nanodrop 1000分光光度计测量280nm的吸光度来测定。

[0389] 各样品在以1000 μ g/ml开始2-倍稀释的8-点浓度系列中分析。收集数据并使用Biacore控制软件4.1版和BIAevaluation软件4.1版处理。剂量响应曲线拟合五参数logistic (5PL) 模型。所使用的默认曲线权重因子是:

[0390] 变异(variance) = $0.02 \times \text{响应(RU)}^{1.8}$

[0391] 结合数据也使用StatLIA 3.2版分析。并行性用StatLIA中的卡方检验(P<0.01)评估。

[0392] AGEN1884w-FortiCHO、AGEN1884w-PowerCHO、AGEN2041w和参比抗-CTLA-4 IgG₁抗体对于人Fc γ RIIA和人Fc γ RIIIA的平均响应(共振单位)分别显示于图9A和9B中。

[0393] 6.2.7抗-CTLA-4抗体对Fc γ 受体IIIA报告细胞系的作用

[0394] AGEN1884w共啮合CTLA-4及通过激活Fc γ 受体发信号的能力使用表达Fc γ 受体IIIA(Fc γ RIIIA)的报告细胞系(Promega)以及靶细胞进行评估(图10A显示的分析示意图)。在这一分析中,表达人CTLA-4的Jurkat细胞用作靶细胞。稳定表达Fc γ RIIIA(V158变体(高亲和力)或F158变体(低亲和力))及驱动萤火虫荧光素酶表达的NFAT反应元件的工程化Jurkat细胞用作效应细胞。该分析按照制造商的指示进行。简言之,25 μ l的表达CTLA-4的靶细胞(25,000细胞)与96-孔白色平底板中25 μ l的以4 μ g/ml开始的系列稀释抗体混合。25 μ l中的150,000个效应细胞然后添加到孔且平板在37 $^{\circ}$ C下孵育过夜。抗体/抗原复合体(其中抗原位于靶细胞的表面上)与Fc γ RIIIA的结合对效应细胞的启动子/报告基因构建体给出信号且导致荧光素酶基因转录。在第二天,平板取出孵育器并使其冷却30分钟。75 μ l的室温Bio-Glo试剂(Promega)添加到各孔,通过EnVision Multimode Plate Reader(Perkin Elmer)测量发光,并记录相对光单位(RLU)。测试的抗体是AGEN1884w-105或AGEN 1884w(对于图10B、10C、10F和10G的AGEN1884w-105,及对于图10D和10E的AGEN1884w);AGEN1884w-N297A(图10F和10G);AGEN2041w(图10D和10E);参比抗-CTLA-4IgG₁抗体(图10B和10C);和IgG₁同种型对照抗体(图10B-10G)。

[0395] 当结合表达CTLA-4的细胞时,IgG₁抗体AGEN1884w-105激活Fc γ RIIIA V158变体(图10B)和Fc γ RIIIA F158变体(图10C)两者。如所预期的,IgG₂抗体AGEN2041w不通过Fc γ RIIIA发信号(图10D和10E)。为确认这一报告体分析的特异性,AGEN1884w (AGEN1884w-N297A)的Fc受体(FcR)-沉默的变体在相同的分析中测试且这一突变体也不通过Fc γ RIIIA

发信号(图10F和10G)。

[0396] 6.2.8抗-CTLA-4抗体对Fc γ 受体IIA报告细胞系的作用

[0397] 接着,AGEN2041w共啮合CTLA-4及通过Fc γ RIIA发信号的能力使用表达Fc γ RIIA的报告细胞系(Promega)与靶细胞(表达人CTLA-4的Jurkat细胞)一起评估。表达具有高亲和力131H/H多态性的Fc γ RIIA和驱动萤火虫荧光素酶表达的NFAT反应元件的Jurkat细胞用作效应细胞。简言之,25 μ l的靶细胞(6×10^6 个细胞/ml)与96-孔白色分析平板的重复孔中25 μ l的以0.1 μ g/ml开始的系列稀释抗体混合。测试的抗体是AGEN2041w、参比抗-CTLA-4IgG₂抗体和IgG₂同种型对照抗体。然后,25 μ l的效应细胞(6×10^6 细胞/ml)添加到各孔,得到1:1效应-靶比率。平板在37℃和5%CO₂下孵育20小时。在这一孵育后,Bio-Glo荧光素酶 Assay Reagent (Promega)在室温下解冻且75 μ l添加到各孔。在5-10分钟内,使用EnVision多标记读板仪(PerkinElmer)测量发光。从各样品计数减去背景发光并记录调整的相对光单位(RLU)。

[0398] 如图11中所示,当与表达CTLA-4的细胞结合时,IgG₂抗体AGEN2041w激活Fc γ RIIA^{H131}。

[0399] 6.2.9 Fc γ 受体结合对抗-CTLA-4抗体的拮抗活性的影响

[0400] 在这一实施例中,检查了Fc γ R结合对抗-CTLA-4抗体的拮抗活性的影响。

[0401] 首先,AGEN1884w-105和AGEN1884w-N297A与细胞表面表达的CTLA-4的结合在与6.1.2节中所述的分析相似的流式细胞术分析中比较。简言之,过表达人CTLA-4的Jurkat细胞(Promega)首先用系列稀释的AGEN1884w-105、AGEN1884w-N297A或IgG₁同种型对照染色且然后用PE-偶联的小鼠抗-人 κ 抗体(Invitrogen)染色。样品在FACSCanto II (BD Biosciences)上获取且使用FlowJo软件(FlowJo, LLC)分析平均荧光强度(MFI)。AGEN1884w-105和AGEN1884w-N297A显示相似的与过表达人CTLA-4的Jurkat细胞的结合(图12A)。

[0402] 接着,体外功能活性对Fc受体(FcR)啮合的依赖性在与6.1.6节中所述的分析相似的分析中评估。简言之,人PBMC在100ng/ml的SEA (Toxin Technologies)和20 μ g/ml的AGEN1884w-105、AGEN1884w-N297A或IgG₁同种型对照的存在下培养5天。IL-2的滴度通过电化学发光(MSD)测定。

[0403] 尽管与细胞表面表达的CTLA-4相似地结合(图12A),AGEN1884w-N297A在原代人PBMC分析中与AGEN1884w-105相比显示降低的IL-2分泌增强(图12B)。

[0404] 作为功能活性需要FcR啮合的进一步证据,测试抗-CTLA-4抗体在FcR阻断剂存在或不存在的条件下诱导IL-2分泌的能力。

[0405] 在补充有青霉素、链霉素和10%FBS的RPMI1640 (Hyclone)中冷冻保存的PBMC(10^5 细胞/孔)添加到96-孔NUNCTM三角表面平板(NUNCTM)。细胞在37℃、5%CO₂和97%湿度下用100ng/ml的SEA (Toxin Technologies)和10 μ g/ml的抗-CTLA-4IgG₁抗体或人IgG₁同种型对照在FcR阻断剂存在或不存在的条件下培养5天。测试的抗-CTLA-4抗体是参比IgG₁抗体(图13A)和AGEN1884w-105(图13B)。FcR阻断剂是抗-CD16 (Biolegend#302013)、抗-CD32 (R&D#AF1330)和抗-CD64 (R&D#AF1257)抗体(各10 μ g/ml)(图13A)或单独的抗-CD32抗体(eBiosciences#16-0329-81)(图13B)。在图13B的对照组中,AGEN1884w-105和人IgG₁同种型对照也如图中所示与小鼠IgG₁同种型对照(Biolegend#400124)孵育。收集澄清的上清液

并在-80℃下储存直到分析。IL-2的滴度通过电化学发光 (MSD) 产生。

[0406] 使用针对CD16、CD32和CD64的抗体 (图13A) 或使用针对CD32的抗体 (图13B), FcR阻断减弱了抗-CTLA-4抗体在这种原代人PBMC分析中诱导IL-2分泌的能力。

[0407] 接着, 具有突变的Fc区的多种抗-CTLA-4抗体的功能活性使用PBMC测试。简言之, 冷冻保存的人PBMC (Research Blood Components) 在补充有Normocin™ (Invivogen) 和10% 热灭活FBS (Gibco, Invitrogen Corporation) 的RPMI1640中以 10^5 细胞/孔接种在96-孔NUNC三角表面平板 (NUNC™) 中。细胞在37℃、5% CO₂和97%湿度下在142ng/ml的SEA (Toxin Technologies) 和10μg/ml的AGEN1884w、AGEN1884w-N297A、AGEN1884w-S267E/L328F、AGEN1884w-S239D/A330L/I332E、AGEN2041w、IgG₁同种型对照抗体或IgG₂同种型对照抗体的存在下培养5天。收集澄清的上清液并在-80℃下储存直到分析。IL-2的浓度通过ELISA测量。

[0408] 具有Fc区中的三重突变S239D/A330L/I332E的AGEN1884w (其增强与Fc γ RIIIA的结合) 比具有野生型IgG₁Fc区的AGEN1884w刺激更多的IL-2分泌 (图14)。

[0409] 6.2.10 Fc介导的效应细胞潜能

[0410] 在这一实施例中, 抗体AGEN1884w分析其介导NK细胞的细胞毒性的能力。简言之, 工程化以在细胞表面 (靶细胞) 上组成型表达CTLA-4的Jurkat细胞在96-孔圆底平板中以 1×10^4 细胞/孔培养。提高浓度的AGEN1884w、参比抗-CTLA-4IgG₁抗体或同种型对照抗体 (全部在0-10μg/ml下) 和 5×10^4 NK92-Fc γ RIIIA细胞 (效应细胞) 添加到靶细胞。在37℃和5% CO₂下孵育6小时后, 靶细胞的裂解使用Cytotoxicity Detection Kit (LDH) (Roche) 按照制造商的指示通过上清液中释放的乳酸脱氢酶 (LDH) 的光度测定定量进行评估。数据使用SoftMax® Pro Microplate Data Acquisition & Analysis软件获取。所有抗体浓度一式三份测试。

[0411] 如图15中所示, 抗体AGEN1884w在效应细胞的存在下有效地介导CTLA-4表达靶细胞的裂解。

[0412] 6.2.11 抗-CTLA-4抗体的表位作图

[0413] AGEN1884w的Fab片段 (AGEN1884w-Fab) 与人CTLA-4的细胞外结构域的相互作用通过氢-氘交换 (HDX) 质谱进行研究。在pH 7.4的磷酸盐缓冲盐水溶液中单独的或与AGEN1884w-Fab组合的CTLA-4细胞外结构域用十倍体积的氧化氘标记缓冲液稀释并在室温下孵育不同的时间段 (0、60、300、1800和7200秒)。氘交换为氢通过添加一体积的4M盐酸胍, 0.85M TCEP (三 (2-羧乙基) 膦) 缓冲液淬灭且最终pH为2.5。样品然后经历柱上胃蛋白酶/XIII型蛋白酶消化和LC-MS分析。质谱在仅MS模式中记录。对于氘掺入的计算, 给定肽的质谱在提取的离子色谱峰上合并并计算加权的平均m/z。从原始肽 (0分钟) 的质量到加权平均质量的质量增加对应于氘掺入的水平。对于所有肽在交换时间上的氘累积曲线进行作图用于进一步分析并用HDEaminer软件进行比较。

[0414] 大多数的CTLA-4肽在存在或不存在抗-人CTLA-4Fab的情况下显示相同或相似的氘水平。但是, 发现几个肽片段在Fab结合时具有显著降低的氘掺入。这一段落中的所有残基按照SEQ ID NO: 77编号。两个区域, Q⁸⁰VT⁸² (SEQ ID NO: 78) 和Y¹³⁵PPPYLGIGNGTQI¹⁴⁹ (SEQ ID NO: 79), 在人CTLA-4结合于Fab时经历强的氘保护。氘摄取的最强降低在Y¹⁴⁰L¹⁴¹处观察到, 其因此表现为是CTLA-4上AGEN1884w的表位的主要特征。人和食蟹猴CTLA-4 (AGEN1884w

强烈结合这两者)的序列的研究揭示了在上述两个区域中几乎完全的序列同一性,除了141位处甲硫氨酸置换为亮氨酸(图17A)。相反,AGEN1884w不以任何显著的水平结合小鼠或大鼠CTLA-4(数据未显示),其在四个位置的三个中在Y¹⁴⁰LGI¹⁴³(SEQ ID NO:80)处不同于人CTLA-4(图17A)。进一步的选择性数据显示,AGEN1884w以高特异性结合人和食蟹猴CTLA-4且不结合其它相关CD28家族成员,包括CD28、ICOS、BTLA和PD-1(数据未显示)。这些相关蛋白质之间的序列比较显示,非-CTLA-4蛋白全部在Y¹⁴⁰LGI¹⁴³(SEQ ID NO:80)序列处不同(图17B),进一步支持这一表位对于AGEN1884w的结合的重要性。

[0415] 6.2.12食蟹猴中的T-依赖性抗体反应(TDAR)研究

[0416] 在食蟹猴中进行八周TDAR研究以检查AGEN1884w和AGEN2041w增强对于乙型肝炎疫苗(ENERIX-G[®])(HBsAg)的T细胞依赖性抗体反应的能力。HBsAg疫苗在第1天(启动)和第29天(加强)在三个皮下注射中以10μg/注射(总共30μg)施用在后腿中。AGEN1884w(N=6)或AGEN2041w(N=6)在第1天和第29天与疫苗抗原一起通过静脉内浓注(10mg/kg)给予两次。采用相同的给药时间表,一个对照动物组(N=3)与3mg/kg的参比抗-CTLA-4IgG₁抗体结合给予HBsAg疫苗,且另一对照动物组(N=6)接受HBsAg及对照品:20mM tris-HCl,100mM NaCl,1%甘露醇,0.10mM DTPA,0.01%聚山梨醇酯80,pH 7.0,但无抗-CTLA-4抗体。在八周研究期间,抗-HBsAg(IgG)分析在整个研究的选定时间点(第-20、-7、+15、+29、+43、+59和+69天)收集的血清样品上进行。血清滴度通过比色ELISA分析测量。

[0417] 给予AGEN1884w、AGEN2041w、参比抗-CTLA-4IgG₁抗体或对照品的动物在第二疫苗剂量后具有正常的回忆反应及可测量的抗体滴度,其达到峰值和然后下降(图18A和18B)。但是,AGEN1884w、AGEN2041w和参比抗-CTLA-4IgG₁抗体相对于在没有抗-CTLA-4抗体的情况下给予的对照品显示为增强抗-HBsAg IgG反应。

[0418] 实施例3:抗-CTLA-4抗体的表征

[0419] 在这一实施例中,表征以下19种抗-CTLA-4抗体的结合和配体阻断:AGEN1884、AGEN1885、AGEN1886、AGEN1887、AGEN1888、AGEN1889、AGEN1890、AGEN1891、AGEN1892、AGEN1893、AGEN1894、AGEN1895、AGEN1896、AGEN1897、AGEN1898、AGEN1899、AGEN1900、AGEN1901和AGEN1902。这些抗体的可变重链和可变轻链序列公开于表6中。图19A和19B分别显示可变重链和可变轻链的序列比对。

[0420] 6.3抗-CTLA-4抗体的结合和配体阻断分析

[0421] 上述的19种抗-CTLA-4抗体的亲和力在与6.1.1节中所述的分析相似的分析方法中通过表面等离子体共振进行分析。测试的CTLA-4抗原是重组人CTLA-4-Fc(R&D Systems,#7268-CT)。抗-CTLA-4抗体(运行缓冲液中6μg/ml)捕获到CM5传感芯片的芯片表面上。19种抗体以nM亲和力结合重组人CTLA-4(数据未显示)。

[0422] 19种抗-CTLA-4抗体的配体阻断活性在与6.1.5节中所述的分析相似的分析方法中使用悬浮阵列技术检查。配体阻断在不同浓度的抗-CTLA-4抗体(在添加珠前3,000ng/ml-12ng/ml)存在下测试。如图20A-20E中所示,所有19种抗-CTLA-4抗体阻断CTLA-4与CD80和CD86的结合。

[0423] 本发明在范围上不限于本文所述的具体实施方式。事实上,除所描述的那些改变之外的本发明的各种改变从前述说明和附图将对于本领域技术人员变得明显。这样的改变意图落入所附权利要求的范围内。

[0424] 本文中引用的所有参考文献(例如,公开出版物或专利或专利申请)通过引用全文和为所有目的并入以达到如同各单个参考文献(例如,公开出版物或专利或专利申请)特别地和个别地表示通过引用全文和为所有目的并入的程度。其它实施方式在以下权利要求内。

序列表

	<110>	AGENUS INC., LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH LTD, MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER
	<120>	抗-CTLA-4 抗体及其使用方法
	<130>	581170:AGBW-004PC
	<140>	
	<141>	
	<150>	62/168,391
	<151>	2015-05-29
	<150>	62/182,363
	<151>	2015-06-19
	<150>	62/190,653
	<151>	2015-07-09
[0001]	<150>	62/257,202
	<151>	2015-11-18
	<150>	62/280,263
	<151>	2016-01-19
	<150>	62/292,500
	<151>	2016-02-08
	<150>	62/294,558
	<151>	2016-02-12
	<150>	62/323,226
	<151>	2016-04-15
	<160>	97
	<170>	PatentIn version 3.5
	<210>	1
	<211>	5
	<212>	PRT
	<213>	人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 1

Ser Tyr Ser Met Asn

1 5

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 2

Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

[0002]

Gly

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 3

Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile

1 5

<210> 4

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 4

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Tyr Leu Gly

1 5 10

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 5

[0003]

Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr

1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 6

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr

1 5

<210> 7

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 7

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

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

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

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

[0004] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

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

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 8

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Tyr
20 25 30

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

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

[0005]

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 9

<211> 98

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 9

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

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

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

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

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

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

[0006]

Ala Arg

<210> 10

<211> 96

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 10

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80

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

<210> 11

<211> 96

<212> PRT

<213> 人工序列

[0007]

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 11

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Pro
85 90 95

<210> 12

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 12

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

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

[0008]

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

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

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

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

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

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

[0010]

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 13

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 13

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Tyr
20 25 30

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

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

[0011] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp
85 90 95

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

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 14

<211> 444

<212> PRT

<213> 人工序列

[0012]

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 14

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

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

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

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

	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Lys	Asn	Ser	Leu	Tyr
	65					70				75					80	
	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85						90					95	
	Ala	Arg	Val	Gly	Leu	Met	Gly	Pro	Phe	Asp	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			100						105					110		
	Met	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro
		115						120					125			
	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly
	130						135					140				
[0013]	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn
	145					150					155				160	
	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln
				165					170						175	
	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser
			180						185					190		
	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser
		195						200				205				
	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys
	210						215					220				
	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe
	225					230					235				240	

Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
420 425 430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 15

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 15

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

[0015]

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Tyr
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ser Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

[0016]

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 16

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 16

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ser
1 5

<210> 17
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 从合成文库获得

<400> 17

Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile
1 5

<210> 18
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 从合成文库获得

[0017]

<400> 18

Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 19
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 从合成文库获得

<400> 19

Gln Ser Val Ser Arg Tyr
1 5

<210> 20
<211> 3

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 从合成文库获得

<400> 20

Gly Ala Ser
1

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 从合成文库获得

<400> 21

[0018]

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 从合成文库获得

<220>
<221> 变体
<222> (3)..(3)
<223> 可以是 Ser 或 Ala

<220>
<221> 变体
<222> (5)..(5)
<223> 可以是 Asn 或 Ser

<400> 22

Ser Tyr Xaa Met Xaa

1 5

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<220>

<221> 变体

<222> (8)..(8)

<223> 可以是 Asp 或 Asn

<400> 23

[0019]

Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Xaa Ile

1 5

<210> 24

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<220>

<221> 变体

<222> (7)..(7)

<223> 可以是 Ser 或 Gly

<220>

<221> 变体

<222> (8)..(8)

<223> 可以是 Arg, Ser 或 Thr

<220>

<221> 变体

<222> (11).. (11)

<223> 可以是 Gly 或 Ala

<400> 24

Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Xaa	Xaa	Tyr	Leu	Xaa
1				5					10	

<210> 25

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

[0020]

<220>

<221> 变体

<222> (1).. (1)

<223> 可以是 Gly 或 Ala

<220>

<221> 变体

<222> (2).. (2)

<223> 可以是 Ala 或 Thr

<220>

<221> 变体

<222> (4).. (4)

<223> 可以是 Thr, Ser, Arg 或 Asn

<400> 25

Xaa	Xaa	Ser	Xaa	Arg	Ala	Thr
1				5		

<210> 26

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 从合成文库获得

<220>
<221> 变体
<222> (5).. (5)
<223> 可以是 Ser 或 Thr

<220>
<221> 变体
<222> (8).. (8)
<223> 可以是 Trp 或 Phe

<400> 26

[0021] Gln Gln Tyr Gly Xaa Ser Pro Xaa Thr
1 5

<210> 27
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 从合成文库获得

<400> 27

Ser Tyr Ala Met Ser
1 5

<210> 28
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 28

Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asn Ile
1 5

<210> 29

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 29

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

[0022]

<210> 30

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 30

Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Thr Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 31

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 31

Gly Ala Ser Arg Arg Ala Thr
1 5

<210> 32

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 32

Ala Thr Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

[0023]

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 33

Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr
1 5

<210> 34

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 34

Ala Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

<210> 35

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 35

Gly Ala Ser Asn Arg Ala Thr
1 5

<210> 36

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

[0024]

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 36

Gln Gln Tyr Gly Thr Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 37

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 37

Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Phe Thr
1 5

<210> 38
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 从合成文库获得

<400> 38

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

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

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

[0025]

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

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

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

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

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 39
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 从合成文库获得

<400> 39

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

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

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

[0026]

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

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

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

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

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 40
<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 40

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

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

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

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

[0027]

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

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

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

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 41

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 41

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

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

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

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

[0028] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asn Ile Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 42

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 42

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

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

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

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

[0029] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

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

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 43

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 43

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Thr Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln His Lys Val Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
65 70 75 80

[0030]

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 44

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 44

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

Ser Val Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

[0031]

<210> 45

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 45

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 46

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

[0032]

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 46

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

Ser Ala Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 47

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 47

[0033]

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

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

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
100 105

<210> 48

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 48

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

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

[0034]

<210> 49

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 49

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser
1 5 10

<210> 50

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 50

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 51

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

[0035] <400> 51

Trp Gly Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 52

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 52

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

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

<210> 53
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 从合成文库获得

<400> 53

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Val Trp Val Ser
1 5 10

<210> 54
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 从合成文库获得

[0036]

<400> 54

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 55
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 从合成文库获得

<400> 55

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

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

<210> 56

<211> 30

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 56

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

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

[0037]

<210> 57

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 57

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 58

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 58

Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile	Tyr
1				5					10					15

<210> 59

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

[0038] <400> 59

Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr
1				5					10					15	

Leu	Thr	Ile	Thr	Arg	Leu	Glu	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
			20					25					30		

<210> 60

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 60

Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys
1				5					10

<210> 61
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 从合成文库获得

<400> 61

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

[0039]

<210> 62
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 从合成文库获得

<400> 62

Trp Tyr Gln His Lys Val Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 63
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 从合成文库获得

<400> 63

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 64

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 64

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Ser Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 65

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 65

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Val Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 66

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0040]

<223> 从合成文库获得

<400> 66

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

<210> 67

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

[0041] <400> 67

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Phe Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 68

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 68

Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys
1 5 10

<210> 69
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 从合成文库获得

<400> 69

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys
20

[0042] <210> 70
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 从合成文库获得

<400> 70

Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Ala Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 71
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 从合成文库获得

<400> 71

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 72

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<220>

<221> 变体

[0043]

<222> (5).. (5)

<223> 可以是 Val 或 Leu

<220>

<221> 变体

<222> (13).. (13)

<223> 可以是 Lys 或 Gln

<220>

<221> 变体

<222> (19).. (19)

<223> 可以是 Arg 或 Thr

<220>

<221> 变体

<222> (33).. (33)

<223> 可以是 Ser 或 Ala

<220>

<221> 变体

<222> (35).. (35)

<223> 可以是 Asn 或 Ser

<220>
 <221> 变体
 <222> (46).. (46)
 <223> 可以是 Glu 或 Val

<220>
 <221> 变体
 <222> (78).. (78)
 <223> 可以是 Ser 或 Thr

<220>
 <221> 变体
 <222> (106).. (106)
 <223> 可以是 Asp 或 Asn

<400> 72

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

[0044] Ser Leu Xaa Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

Ala	Arg	Val	Gly	Leu	Met	Gly	Pro	Phe	Xaa	Ile	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr
			100				105						110		

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 73
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 从合成文库获得

<220>
<221> 变体
<222> (9).. (9)
<223> 可以是 Gly 或 Ala

[0045]

<220>
<221> 变体
<222> (13).. (13)
<223> 可以是 Leu, Val 或 Phe

<220>
<221> 变体
<222> (30).. (30)
<223> 可以是 Ser 或 Gly

<220>
<221> 变体
<222> (31).. (31)
<223> 可以是 Arg, Thr 或 Ser

<220>
<221> 变体
<222> (34).. (34)
<223> 可以是 Gly 或 Ala

<220>
<221> 变体
<222> (38).. (38)
<223> 可以是 Gln 或 His

	<220>
	<221> 变体
	<222> (40).. (40)
	<223> 可以是 Pro 或 Val
	<220>
	<221> 变体
	<222> (45).. (45)
	<223> 可以是 Arg 或 Ser
	<220>
	<221> 变体
	<222> (50).. (50)
	<223> 可以是 Gly 或 Ala
	<220>
	<221> 变体
	<222> (51).. (51)
	<223> 可以是 Ala 或 Thr
[0046]	<220>
	<221> 变体
	<222> (53).. (53)
	<223> 可以是 Thr, Arg, Ser 或 Asn
	<220>
	<221> 变体
	<222> (60).. (60)
	<223> 可以是 Asp 或 Ala
	<220>
	<221> 变体
	<222> (66).. (66)
	<223> 可以是 Gly, Val 或 Ala
	<220>
	<221> 变体
	<222> (73).. (73)
	<223> 可以是 Leu 或 Phe
	<220>
	<221> 变体
	<222> (76).. (76)
	<223> 可以是 Thr 或 Ser

<220>
<221> 变体
<222> (77)..(77)
<223> 可以是 Arg 或 Ser

<220>
<221> 变体
<222> (93)..(93)
<223> 可以是 Ser 或 Thr

<220>
<221> 变体
<222> (96)..(96)
<223> 可以是 Trp 或 Phe

<220>
<221> 变体
<222> (100)..(100)
<223> 可以是 Gln 或 Pro

[0047] <220>
<221> 变体
<222> (105)..(105)
<223> 可以是 Glu 或 Asp

<400> 73

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Xaa Thr Leu Ser Xaa Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Xaa Xaa Tyr
20 25 30

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

Tyr Xaa Xaa Ser Xaa Arg Ala Thr Gly Ile Pro Xaa Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Xaa Ser Gly Thr Asp Phe Thr Xaa Thr Ile Xaa Xaa Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Xaa Ser Pro Xaa
85 90 95

Thr Phe Gly Xaa Gly Thr Lys Val Xaa Ile Lys
100 105

<210> 74

<211> 448

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 74

[0048]

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

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

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

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

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

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

	Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr	
	100	105 110
	Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro	
	115	120 125
	Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly	
	130	135 140
	Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn	
	145	150 155 160
	Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln	
	165	170 175
[0049]	Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser	
	180	185 190
	Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser	
	195	200 205
	Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr	
	210	215 220
	His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser	
	225	230 235 240
	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg	
	245	250 255
	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro	
	260	265 270

<210> 75
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 从合成文库获得

<400> 75

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

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

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

[0051]

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

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

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

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

Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	
	130						135					140					
	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	
	145					150					155					160	
	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	
					165					170						175	
	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	
				180						185					190		
	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	
		195						200						205			
[0052]	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	
	210						215						220				
	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	
	225					230					235					240	
	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	
					245					250					255		
	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Glu	His	Glu	Asp	Pro	
				260						265					270		
	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	
		275						280						285			
	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	
	290							295						300			

	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr	
	305 310 315 320	
	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr	
	325 330 335	
	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu	
	340 345 350	
	Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys	
	355 360 365	
	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser	
	370 375 380	
[0053]	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp	
	385 390 395 400	
	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser	
	405 410 415	
	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala	
	420 425 430	
	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
	435 440 445	
	<210> 76	
	<211> 448	
	<212> PRT	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 从合成文库获得	

<400> 76

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

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

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

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

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

[0054]

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

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

Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

[0055] Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Leu Pro Glu Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

[0056] Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445

<210> 77

<211> 223

<212> PRT

<213> 智人

<400> 77

Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Gln Leu Asn Leu Ala
 1 5 10 15

Thr Arg Thr Trp Pro Cys Thr Leu Leu Phe Phe Leu Leu Phe Ile Pro
 20 25 30

Val Phe Cys Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
 35 40 45

	Ser	Ser	Arg	Gly	Ile	Ala	Ser	Phe	Val	Cys	Glu	Tyr	Ala	Ser	Pro	Gly	
	50						55					60					
	Lys	Ala	Thr	Glu	Val	Arg	Val	Thr	Val	Leu	Arg	Gln	Ala	Asp	Ser	Gln	
	65					70					75					80	
	Val	Thr	Glu	Val	Cys	Ala	Ala	Thr	Tyr	Met	Met	Gly	Asn	Glu	Leu	Thr	
					85					90					95		
	Phe	Leu	Asp	Asp	Ser	Ile	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Gly	Asn	Gln	Val	
				100					105					110			
	Asn	Leu	Thr	Ile	Gln	Gly	Leu	Arg	Ala	Met	Asp	Thr	Gly	Leu	Tyr	Ile	
		115						120					125				
[0057]	Cys	Lys	Val	Glu	Leu	Met	Tyr	Pro	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Ile	Gly	
	130						135					140					
	Asn	Gly	Thr	Gln	Ile	Tyr	Val	Ile	Asp	Pro	Glu	Pro	Cys	Pro	Asp	Ser	
	145					150					155					160	
	Asp	Phe	Leu	Leu	Trp	Ile	Leu	Ala	Ala	Val	Ser	Ser	Gly	Leu	Phe	Phe	
					165					170					175		
	Tyr	Ser	Phe	Leu	Leu	Thr	Ala	Val	Ser	Leu	Ser	Lys	Met	Leu	Lys	Lys	
				180					185					190			
	Arg	Ser	Pro	Leu	Thr	Thr	Gly	Val	Tyr	Val	Lys	Met	Pro	Pro	Thr	Glu	
			195					200					205				
	Pro	Glu	Cys	Glu	Lys	Gln	Phe	Gln	Pro	Tyr	Phe	Ile	Pro	Ile	Asn		
	210						215					220					

<210> 78
<211> 3
<212> PRT
<213> 智人

<400> 78

Gln Val Thr
1

<210> 79
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 79

Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
1 5 10 15

[0058]

<210> 80
<211> 4
<212> PRT
<213> 智人

<400> 80

Tyr Leu Gly Ile
1

<210> 81
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 81

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr
1 5

<210> 82
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 82

Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile
1 5

<210> 83
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 83

Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
1 5 10

[0059]

<210> 84
<211> 223
<212> PRT
<213> 猕猴

<400> 84

Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Arg Leu Asn Leu Ala
1 5 10 15

Thr Arg Thr Arg Pro Tyr Thr Leu Leu Phe Ser Leu Leu Phe Ile Pro
20 25 30

Val Phe Ser Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala
35 40 45

Asn Ser Arg Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly
50 55 60

Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln
65 70 75 80

Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr
85 90 95

Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val
100 105 110

Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile
115 120 125

Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Met Gly Ile Gly
130 135 140

[0060]

Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser
145 150 155 160

Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe
165 170 175

Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys
180 185 190

Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu
195 200 205

Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn
210 215 220

<210> 85

<211> 223

<212> PRT

<213> 小鼠

<400> 85

Met Ala Cys Leu Gly Leu Arg Arg Tyr Lys Ala Gln Leu Gln Leu Pro

1 5 10 15

Ser Arg Thr Trp Pro Phe Val Ala Leu Leu Thr Leu Leu Phe Ile Pro

20 25 30

Val Phe Ser Glu Ala Ile Gln Val Thr Gln Pro Ser Val Val Leu Ala

35 40 45

Ser Ser His Gly Val Ala Ser Phe Pro Cys Glu Tyr Ser Pro Ser His

50 55 60

[0061] Asn Thr Asp Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Thr Asn Asp Gln

65 70 75 80

Met Thr Glu Val Cys Ala Thr Thr Phe Thr Glu Lys Asn Thr Val Gly

85 90 95

Phe Leu Asp Tyr Pro Phe Cys Ser Gly Thr Phe Asn Glu Ser Arg Val

100 105 110

Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr Leu

115 120 125

Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Phe Val Gly Met Gly

130 135 140

Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser

145 150 155 160

Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Val Ala Val Ser Leu Gly Leu Phe Phe
165 170 175

Tyr Ser Phe Leu Val Ser Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys
180 185 190

Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu
195 200 205

Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn
210 215 220

<210> 86
<211> 223
<212> PRT
<213> 大鼠

[0062]

<400> 86

Met Ala Cys Leu Gly Leu Gln Arg Tyr Lys Thr His Leu Gln Leu Pro
1 5 10 15

Ser Arg Thr Trp Pro Phe Gly Val Leu Leu Ser Leu Leu Phe Ile Pro
20 25 30

Ile Phe Ser Glu Ala Ile Gln Val Thr Gln Pro Ser Val Val Leu Ala
35 40 45

Ser Ser His Gly Val Ala Ser Phe Pro Cys Glu Tyr Ala Ser Ser His
50 55 60

Asn Thr Asp Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Thr Asn Asp Gln
65 70 75 80

Val Thr Glu Val Cys Ala Thr Thr Phe Thr Val Lys Asn Thr Leu Gly
85 90 95

Phe Leu Asp Asp Pro Phe Cys Ser Gly Thr Phe Asn Glu Ser Arg Val
100 105 110

Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Ala Asp Thr Gly Leu Tyr Phe
115 120 125

Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Phe Val Gly Met Gly
130 135 140

Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser
145 150 155 160

Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe
165 170 175

[0063]

Tyr Ser Phe Leu Val Thr Ala Val Ser Leu Asn Arg Thr Leu Lys Lys
180 185 190

Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu
195 200 205

Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn
210 215 220

<210> 87

<211> 220

<212> PRT

<213> 智人

<400> 87

Met Leu Arg Leu Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val

1	5	10	15
Thr Gly Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr			
20	25	30	
Asp Asn Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser			
35	40	45	
Arg Glu Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu			
50	55	60	
Val Cys Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser			
65	70	75	80
Lys Thr Gly Phe Asn Cys Asp Gly Lys Leu Gly Asn Glu Ser Val Thr			
85	90	95	
[0064]			
Phe Tyr Leu Gln Asn Leu Tyr Val Asn Gln Thr Asp Ile Tyr Phe Cys			
100	105	110	
Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser			
115	120	125	
Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro			
130	135	140	
Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly			
145	150	155	160
Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile			
165	170	175	
Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met			

180 185 190

Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro
195 200 205

Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
210 215 220

<210> 88
<211> 199
<212> PRT
<213> 智人

<400> 88

Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe Leu Phe Cys Leu Arg Ile Lys
1 5 10 15

[0065]

Val Leu Thr Gly Glu Ile Asn Gly Ser Ala Asn Tyr Glu Met Phe Ile
20 25 30

Phe His Asn Gly Gly Val Gln Ile Leu Cys Lys Tyr Pro Asp Ile Val
35 40 45

Gln Gln Phe Lys Met Gln Leu Leu Lys Gly Gly Gln Ile Leu Cys Asp
50 55 60

Leu Thr Lys Thr Lys Gly Ser Gly Asn Thr Val Ser Ile Lys Ser Leu
65 70 75 80

Lys Phe Cys His Ser Gln Leu Ser Asn Asn Ser Val Ser Phe Phe Leu
85 90 95

Tyr Asn Leu Asp His Ser His Ala Asn Tyr Tyr Phe Cys Asn Leu Ser
100 105 110

Ile Phe Asp Pro Pro Pro Phe Lys Val Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu
115 120 125

His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Phe Trp Leu Pro
130 135 140

Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu
145 150 155 160

Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro
165 170 175

Asn Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser
180 185 190

[0066] Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu
195

<210> 89
<211> 289
<212> PRT
<213> 智人

<400> 89

Met Lys Thr Leu Pro Ala Met Leu Gly Thr Gly Lys Leu Phe Trp Val
1 5 10 15

Phe Phe Leu Ile Pro Tyr Leu Asp Ile Trp Asn Ile His Gly Lys Glu
20 25 30

Ser Cys Asp Val Gln Leu Tyr Ile Lys Arg Gln Ser Glu His Ser Ile
35 40 45

	Leu	Ala	Gly	Asp	Pro	Phe	Glu	Leu	Glu	Cys	Pro	Val	Lys	Tyr	Cys	Ala
	50						55					60				
	Asn	Arg	Pro	His	Val	Thr	Trp	Cys	Lys	Leu	Asn	Gly	Thr	Thr	Cys	Val
	65					70					75				80	
	Lys	Leu	Glu	Asp	Arg	Gln	Thr	Ser	Trp	Lys	Glu	Glu	Lys	Asn	Ile	Ser
					85					90					95	
	Phe	Phe	Ile	Leu	His	Phe	Glu	Pro	Val	Leu	Pro	Asn	Asp	Asn	Gly	Ser
				100					105						110	
	Tyr	Arg	Cys	Ser	Ala	Asn	Phe	Gln	Ser	Asn	Leu	Ile	Glu	Ser	His	Ser
		115						120					125			
[0067]	Thr	Thr	Leu	Tyr	Val	Thr	Asp	Val	Lys	Ser	Ala	Ser	Glu	Arg	Pro	Ser
	130						135					140				
	Lys	Asp	Glu	Met	Ala	Ser	Arg	Pro	Trp	Leu	Leu	Tyr	Arg	Leu	Leu	Pro
	145					150					155				160	
	Leu	Gly	Gly	Leu	Pro	Leu	Leu	Ile	Thr	Thr	Cys	Phe	Cys	Leu	Phe	Cys
					165					170					175	
	Cys	Leu	Arg	Arg	His	Gln	Gly	Lys	Gln	Asn	Glu	Leu	Ser	Asp	Thr	Ala
					180					185					190	
	Gly	Arg	Glu	Ile	Asn	Leu	Val	Asp	Ala	His	Leu	Lys	Ser	Glu	Gln	Thr
		195						200					205			
	Glu	Ala	Ser	Thr	Arg	Gln	Asn	Ser	Gln	Val	Leu	Leu	Ser	Glu	Thr	Gly
	210						215					220				

Ile Tyr Asp Asn Asp Pro Asp Leu Cys Phe Arg Met Gln Glu Gly Ser
225 230 235 240

Glu Val Tyr Ser Asn Pro Cys Leu Glu Glu Asn Lys Pro Gly Ile Val
245 250 255

Tyr Ala Ser Leu Asn His Ser Val Ile Gly Pro Asn Ser Arg Leu Ala
260 265 270

Arg Asn Val Lys Glu Ala Pro Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Cys Val Arg
275 280 285

Ser

[0068] <210> 90
<211> 288
<212> PRT
<213> 智人

<400> 90

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
1 5 10 15

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
50 55 60

	Leu	Asn	Trp	Tyr	Arg	Met	Ser	Pro	Ser	Asn	Gln	Thr	Asp	Lys	Leu	Ala
	65					70					75					80
	Ala	Phe	Pro	Glu	Asp	Arg	Ser	Gln	Pro	Gly	Gln	Asp	Cys	Arg	Phe	Arg
					85					90					95	
	Val	Thr	Gln	Leu	Pro	Asn	Gly	Arg	Asp	Phe	His	Met	Ser	Val	Val	Arg
				100					105						110	
	Ala	Arg	Arg	Asn	Asp	Ser	Gly	Thr	Tyr	Leu	Cys	Gly	Ala	Ile	Ser	Leu
				115					120					125		
	Ala	Pro	Lys	Ala	Gln	Ile	Lys	Glu	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Leu	Arg	Val
		130						135					140			
[0069]	Thr	Glu	Arg	Arg	Ala	Glu	Val	Pro	Thr	Ala	His	Pro	Ser	Pro	Ser	Pro
	145					150					155					160
	Arg	Pro	Ala	Gly	Gln	Phe	Gln	Thr	Leu	Val	Val	Gly	Val	Val	Gly	Gly
					165					170					175	
	Leu	Leu	Gly	Ser	Leu	Val	Leu	Leu	Val	Trp	Val	Leu	Ala	Val	Ile	Cys
				180						185					190	
	Ser	Arg	Ala	Ala	Arg	Gly	Thr	Ile	Gly	Ala	Arg	Arg	Thr	Gly	Gln	Pro
			195						200					205		
	Leu	Lys	Glu	Asp	Pro	Ser	Ala	Val	Pro	Val	Phe	Ser	Val	Asp	Tyr	Gly
		210						215					220			
	Glu	Leu	Asp	Phe	Gln	Trp	Arg	Glu	Lys	Thr	Pro	Glu	Pro	Pro	Val	Pro
	225					230					235					240

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly
245 250 255

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg
260 265 270

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu
275 280 285

<210> 91

<211> 449

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 91

[0070]

Gln Val Gln Leu Gln Gln Trp Gly Ala Gly Leu Leu Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

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

Tyr Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn His Asn Gly Asn Thr Asn Ser Asn Pro Ser Leu Lys
50 55 60

Ser Arg Val Thr Leu Ser Leu Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Arg Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

	Phe Gly Tyr Ser Asp Tyr Glu Tyr Asn Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln	
	100	105 110
	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val	
	115	120 125
	Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala	
	130	135 140
	Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser	
	145	150 155 160
	Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val	
		165 170 175
[0071]	Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro	
	180	185 190
	Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys	
	195	200 205
	Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp	
	210	215 220
	Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly	
	225	230 235 240
	Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile	
		245 250 255
	Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu	
	260	265 270

	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
	275				280				285								
	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	
	290				295				300								
	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	
	305				310				315				320				
	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	
					325				330				335				
	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	
	340				345				350								
[0072]	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	
	355				360				365								
	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	
	370				375				380								
	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	
	385				390				395				400				
	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	
					405				410				415				
	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	
	420				425				430								
	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	
	435				440				445								

Gly

<210> 92

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 92

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

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

[0073]

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Asn Leu Glu Ile Lys Arg Ser Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115

120

125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205

[0074]

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 93

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 93

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

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

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

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

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

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

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

[0075] Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr
	210						215					220				
	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser
	225					230					235				240	
	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg
					245					250					255	
	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro
				260						265					270	
	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala
			275						280					285		
[0076]	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val
	290						295					300				
	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr
	305					310					315				320	
	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
					325					330					335	
	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu
				340					345					350		
	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
			355					360					365			
	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser
	370						375					380				

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 94

<211> 443

<212> PRT

<213> 人工序列

[0077] <220>

<223> 从合成文库获得

<400> 94

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

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

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

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

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr			
	100	105	110
Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro			
	115	120	125
Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly			
	130	135	140
Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn			
145	150	155	160
[0078]			
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln			
	165	170	175
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser			
	180	185	190
Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser			
	195	200	205
Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys			
	210	215	220
Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe			
225	230	235	240
Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val			

	245		250		255
Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe					
	260		265		270
Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro					
	275		280		285
Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr					
	290		295		300
Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val					
305		310		315	320
Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr					
	325		330		335
[0079]					
Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg					
	340		345		350
Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly					
	355		360		365
Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro					
	370		375		380
Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser					
385		390		395	400
Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln					
	405		410		415
Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His					

420

425

430

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly

435

440

<210> 95

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 95

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1

5

10

15

[0080]

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

20

25

30

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

35

40

45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65

70

75

80

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

85

90

95

Ala Arg Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr

100

105

110

	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Ala	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	
	290						295					300					
	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	
	305					310					315				320		
	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	
					325					330					335		
	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	
				340					345						350		
	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	
			355					360					365				
[0082]	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	
	370						375						380				
	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	
	385					390					395				400		
	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	
					405					410					415		
	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	
					420				425						430		
	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly		
			435					440					445				
	<210>	96															
	<211>	447															
	<212>	PRT															

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 96

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

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

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

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

[0083]

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

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

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

Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145	150	155	160
Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln			
165	170	175	
Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser			
180	185	190	
Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser			
195	200	205	
Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr			
210	215	220	
His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser			
225	230	235	240
[0084]			
Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg			
245	250	255	
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu His Glu Asp Pro			
260	265	270	
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala			
275	280	285	
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val			
290	295	300	
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr			
305	310	315	320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr			

325

330

335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

[0085]

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 97

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 从合成文库获得

<400> 97

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

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

[0087] Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Leu Pro Glu Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	
	370						375					380					
	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	
	385					390					395					400	
[0088]	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	
					405					410					415		
	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	
					420					425					430		
	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly		
		435						440						445			

表面等离子体共振(K_D)

	人		食蟹猴		小鼠		大鼠	
	CTLA-4		CTLA-4		CTLA-4		CTLA-4	
	二聚体	单体	二聚体	单体	二聚体	单体	二聚体	单体
AGEN1884	0.6 nM	0.8 nM	6.2 nM	1.6 nM	9.9 nM	无结合	26 nM	无结合
参比抗体(IgG1)	0.54 nM	1.2 nM	1.2 nM	0.75 nM	1.2 nM	22 nM	22 nM	22 nM

图1A

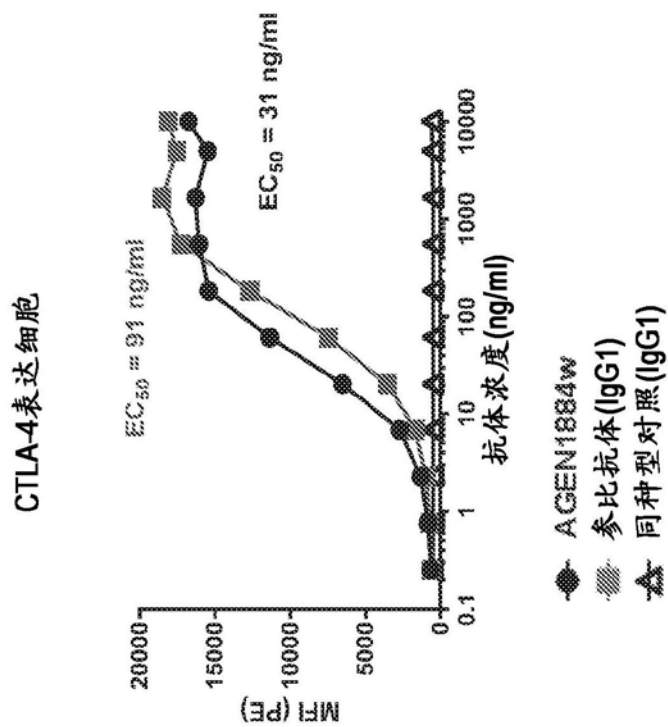


图1B

CTLA-4选择性分析

	浓度 ng/ml	rhCTLA-4 Fc (R&D)	rcCTLA-4 Fc (Sino)	rhCD28 Fc (R&D)	rhICOS Fc (R&D)	rhBTLA Fc (Sino)	rhPD-1 Fc (R&D)	rcPD-1 Fc (4AB)
AGEN1884	1000	22729	16557	45	43	87	15	32
	100	20859	12676	48	47	115	25	41
	10	7820	4096	77	60	95	32	46
参比抗体 (IgG1)	1000	20845	21580	52	46	97	24	40
	100	19131	19810	55	53	87	28	41
	10	6825	7245	65	57	92	35	41
同种型 对照 (IgG1)	1000	79	154	57	34	73	31	49
	100	75	166	67	67	123	39	45
	10	88	175	52	48	91	31	30

图1C

原代人T细胞
(表面)

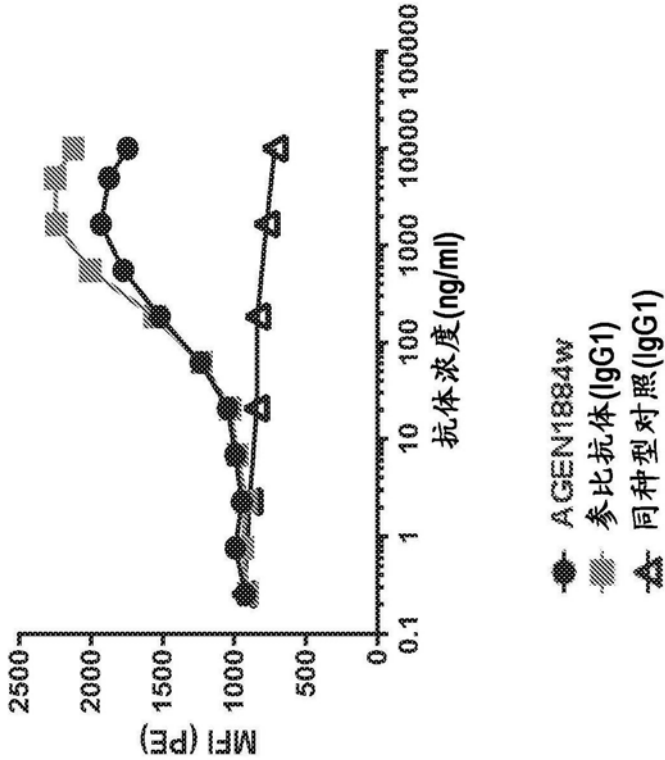


图2A

相对结合亲和力

AGEN1884	参比抗体(IgG1)	同种型对照(IgG1)
+++	+++	-
+++	+++	-
-	-	-
-	-	-
-	-	-
-	-	-
-	-	-
rhCTLA-4		
rcCTLA-4		
rhCD28		
rhICOS		
rhBTLA		
rhPD-1		
rcPD-1		

图1D

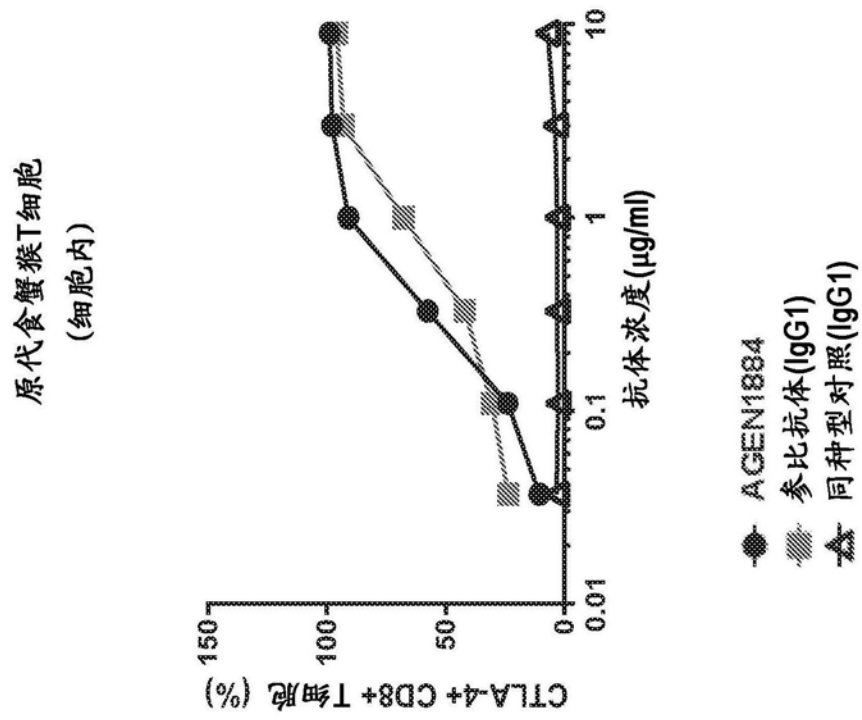


图2B

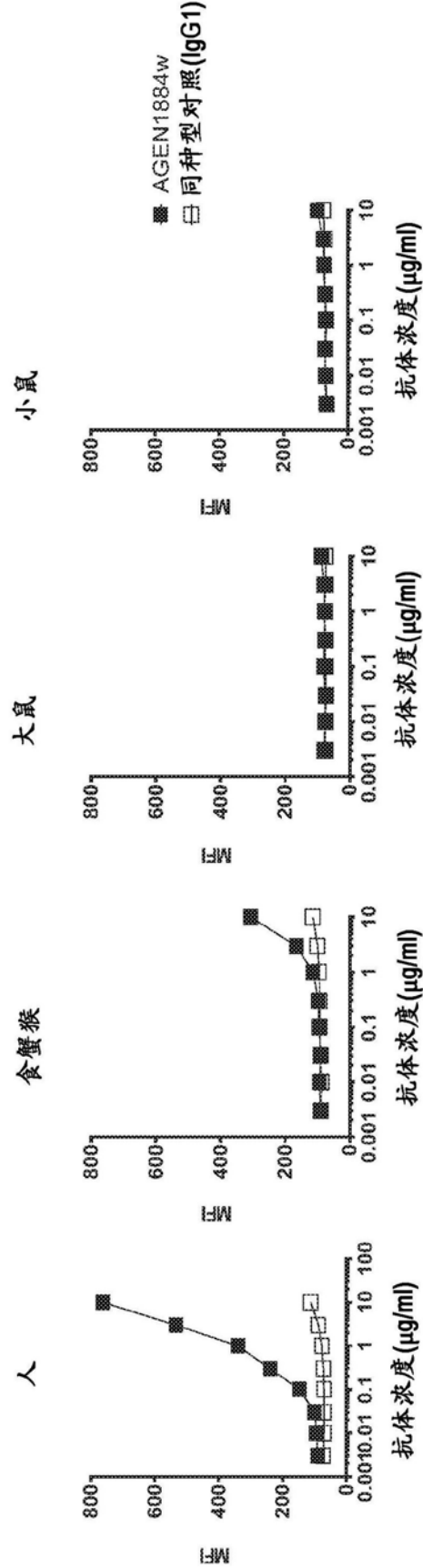


图2C

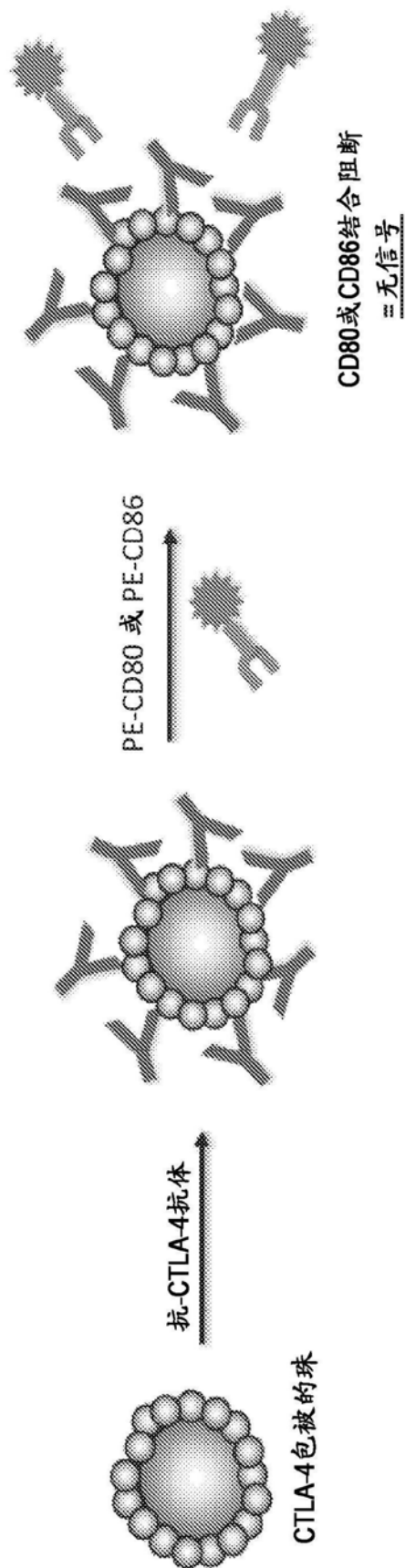


图3A

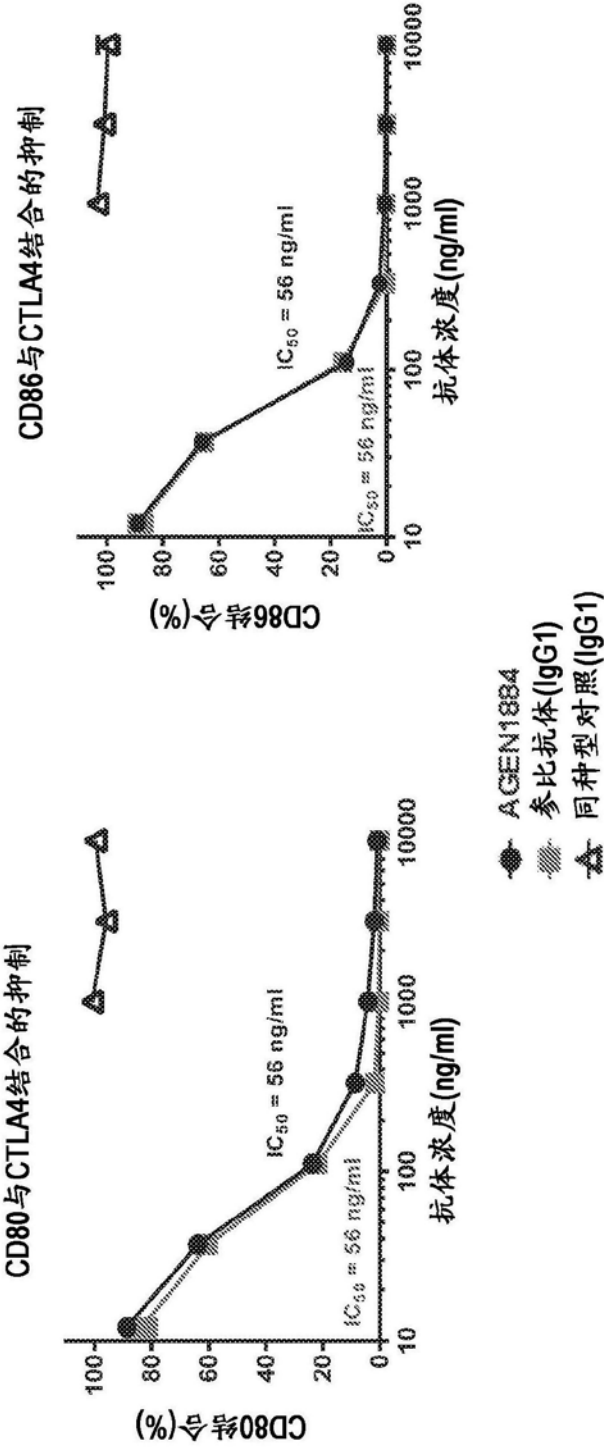


图 3B

图 3C

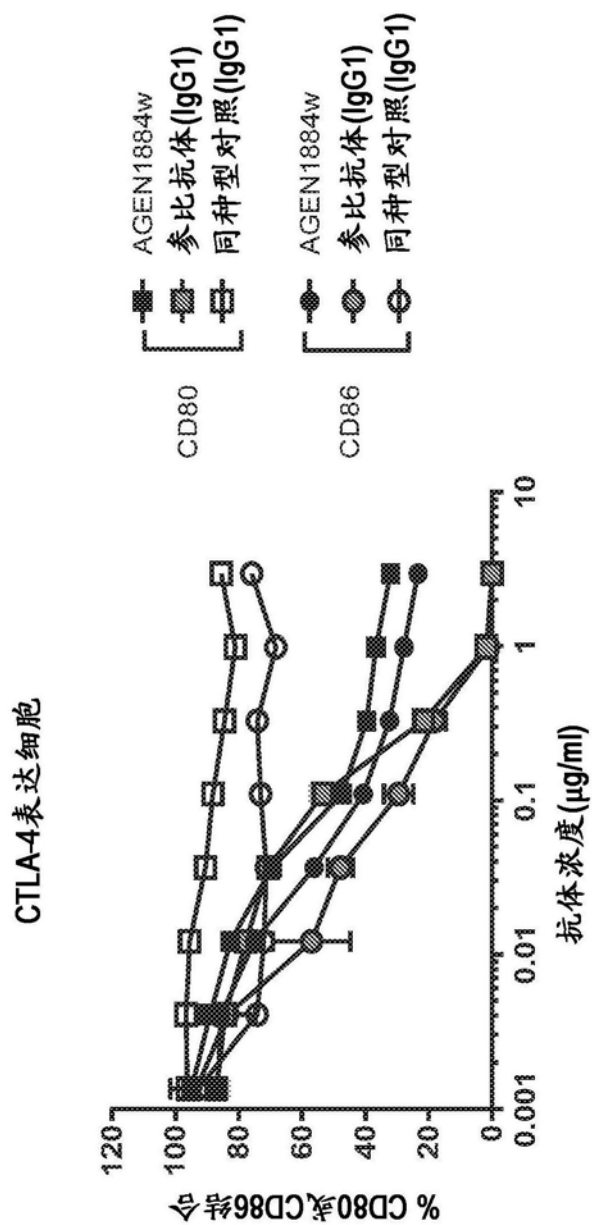


图3D

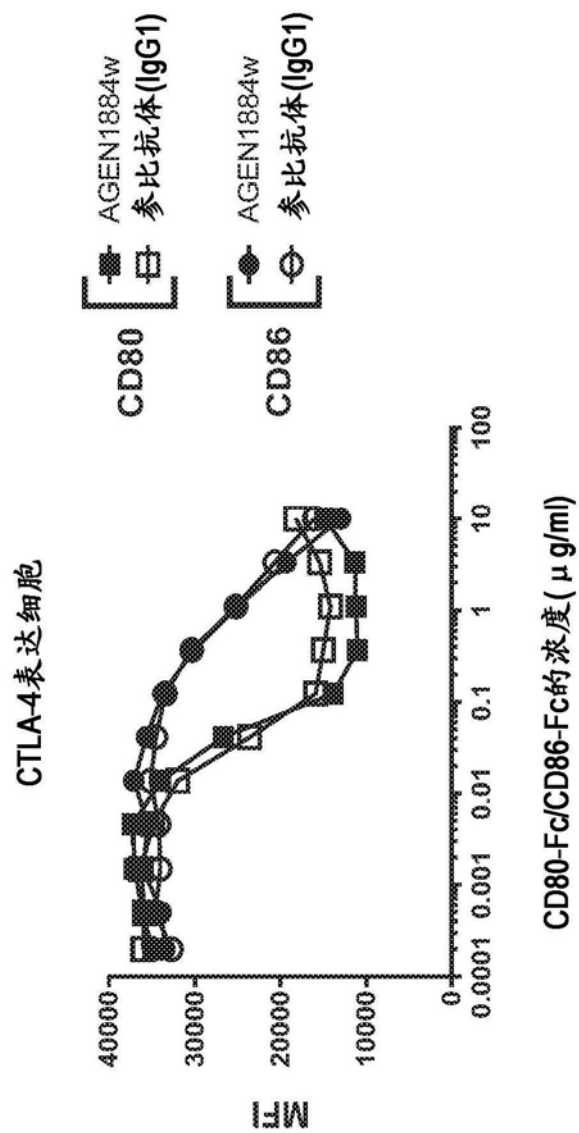


图3E

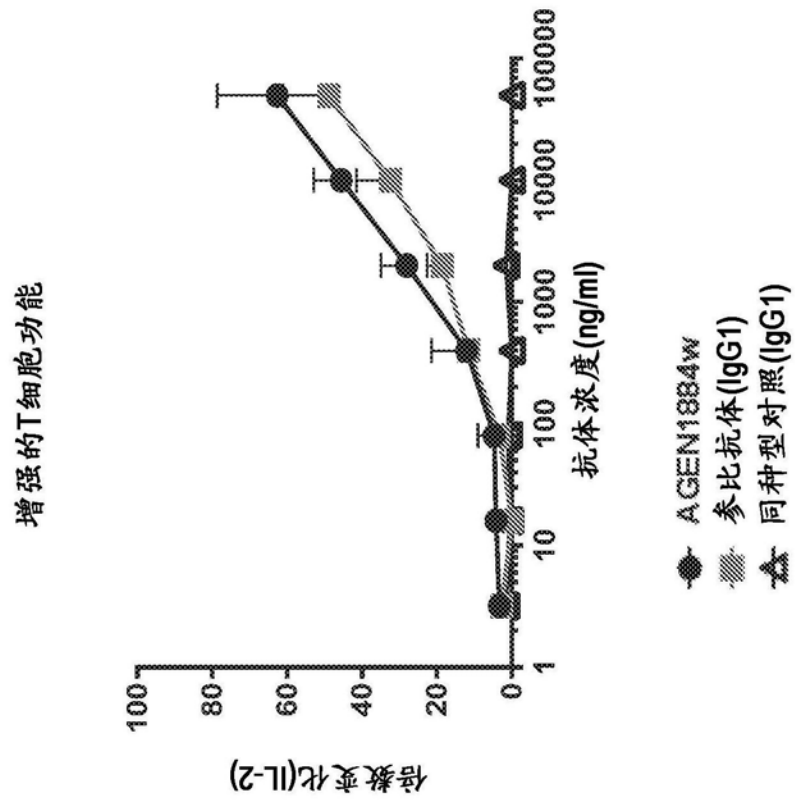


图4A

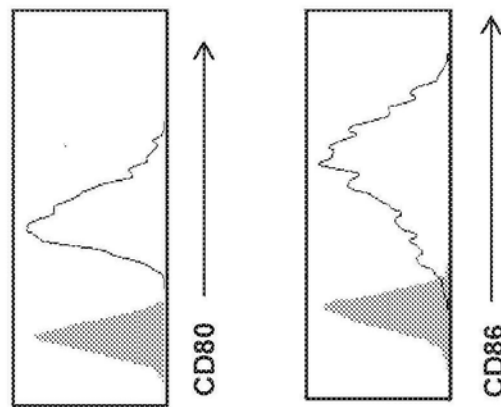


图4B

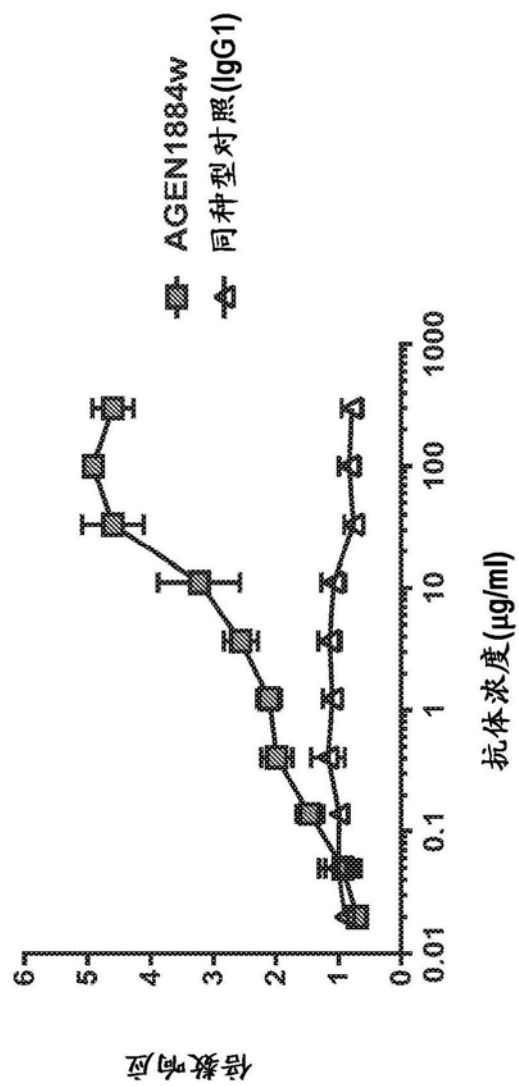


图4C

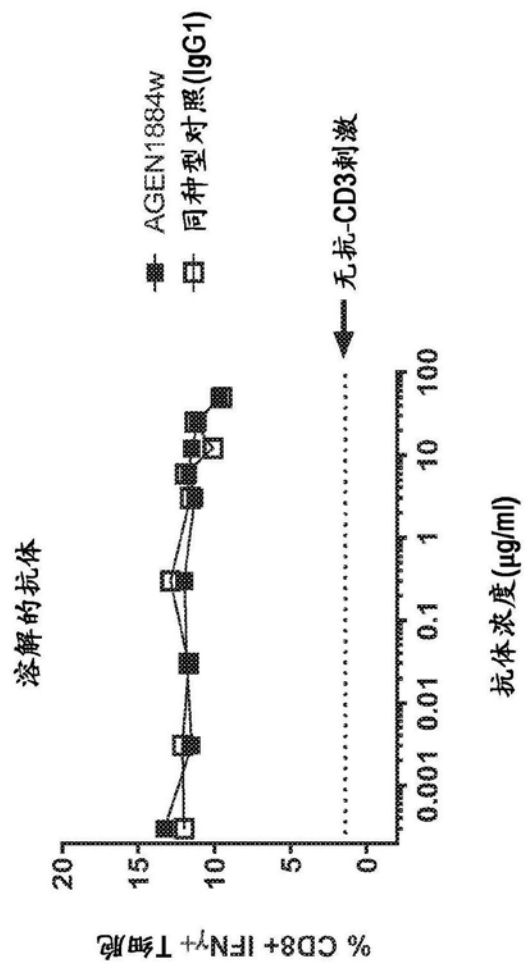


图4D

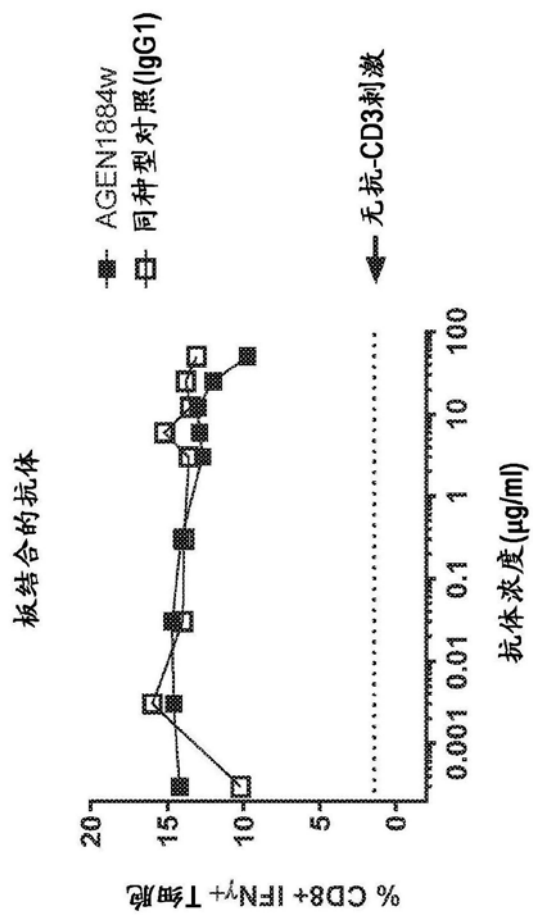


图4E

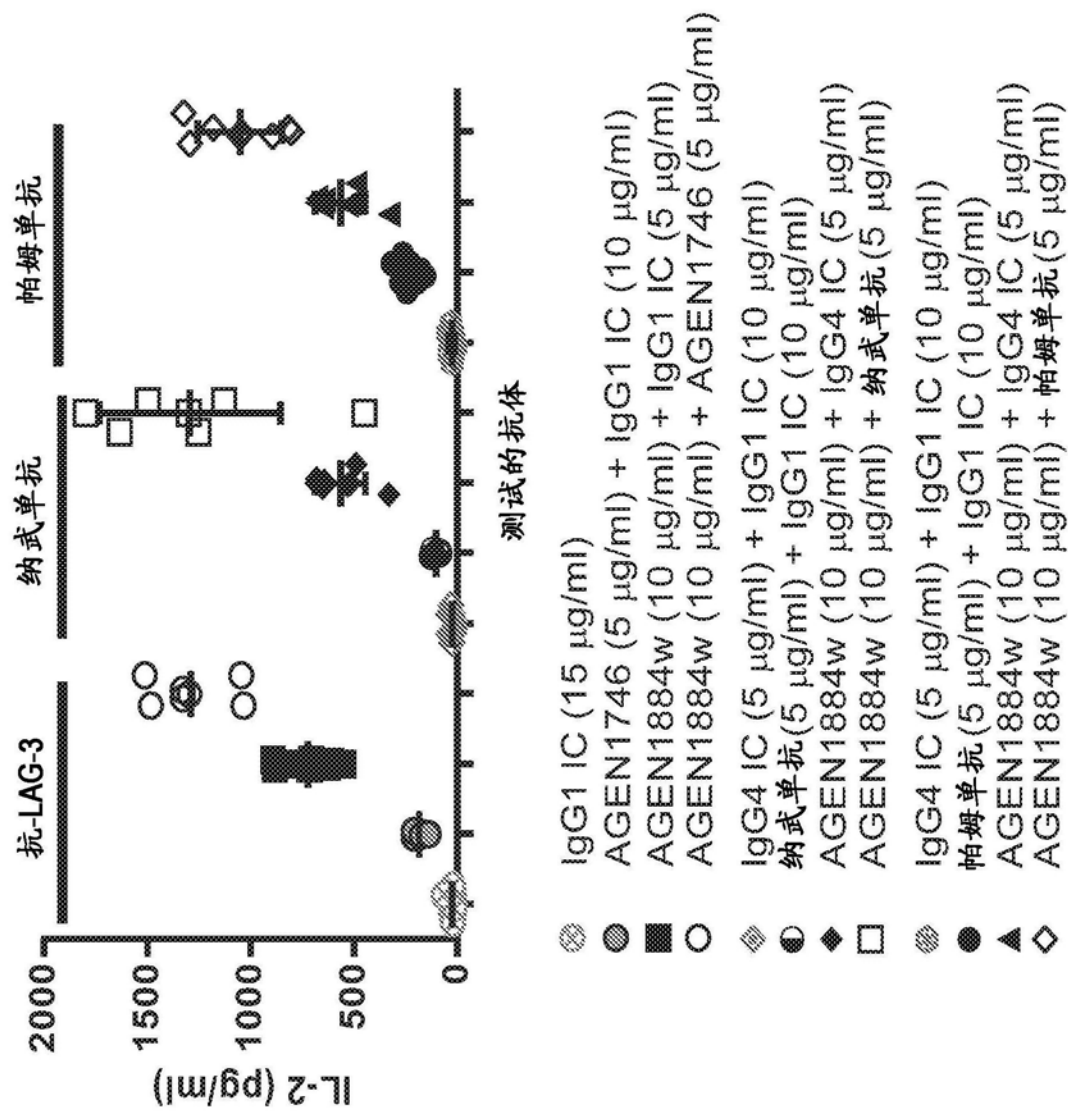


图4F

表面等离子体共振(K_D)

	人			食蟹猴		
	CTLA-4			CTLA-4		
	二聚体	单体	单体	二聚体	单体	单体
	AGEN2041w	1.7 nM	2.0 nM	4.4 nM	2.1 nM	2.1 nM
	参比抗体(IgG1)	0.5 nM	1.2 nM	1.2 nM	0.8 nM	0.8 nM
	参比抗体(IgG2)	1.5 nM	1.6 nM	3.1 nM	1.5 nM	1.5 nM

图5A

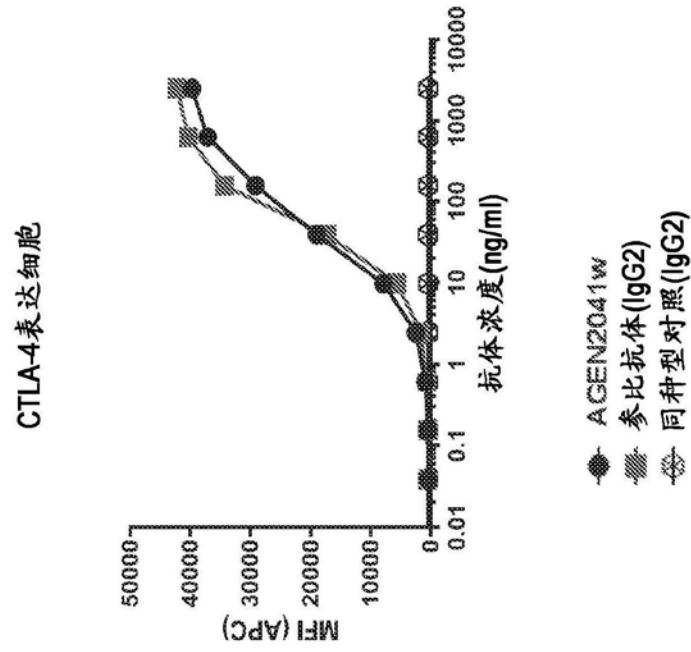


图5B

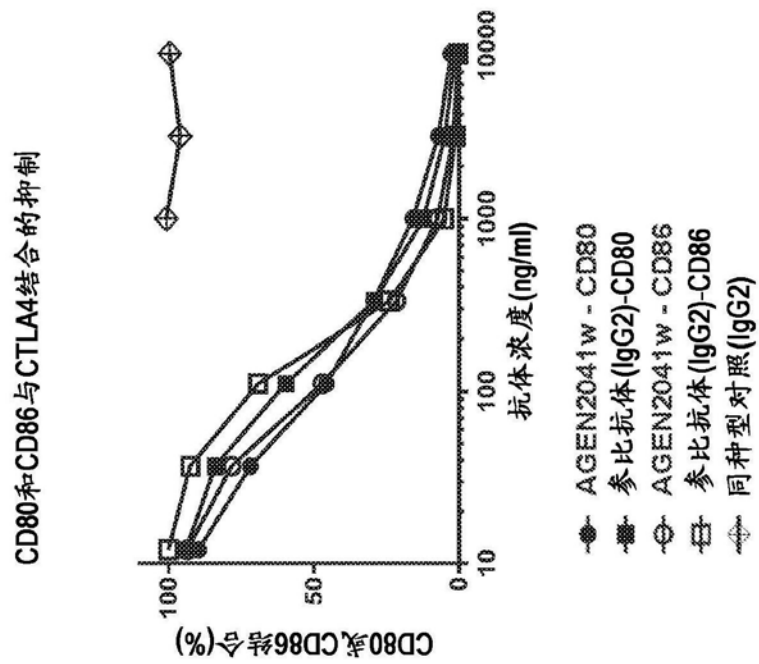


图5C

CTLA-4选择性分析

	浓度 ng/ml	rhCTLA-4 Fc (R&D)	rcCTLA-4 Fc (Sino)	rhCD28 Fc (R&D)	rhICOS Fc (R&D)	rhBTLA Fc (Sino)	rhPD-1 Fc (R&D)	rcPD-1 Fc (4AB)
AGEN2041w	1000	16693	13885	58	48	95	30	31
	100	15890	9949	42	43	104	19	27
	10	7737	3684	73	55	89	32	29
参比抗体 (IgG2)	1000	17288	16442	58	49	106	33	39
	100	13932	13721	62	47	102	43	50
	10	4846	5143	71	59	111	36	60
同种型 对照 (IgG2)	1000	79	158	64	41	93	36	41
	100	83	184	52	57	88	94	96
	10	80	187	55	58	99	79	70

图5D

相对结合亲和力

	AGEN2041w	参比抗体(IgG2)	同种型对照(IgG2)
rhCTLA-4	+++	+++	-
rcCTLA-4	+++	+++	-
rhCD28	-	-	-
rhICOS	-	-	-
rhBTLA	-	-	-
rhPD-1	-	-	-
rcPD-1	-	-	-

图5E

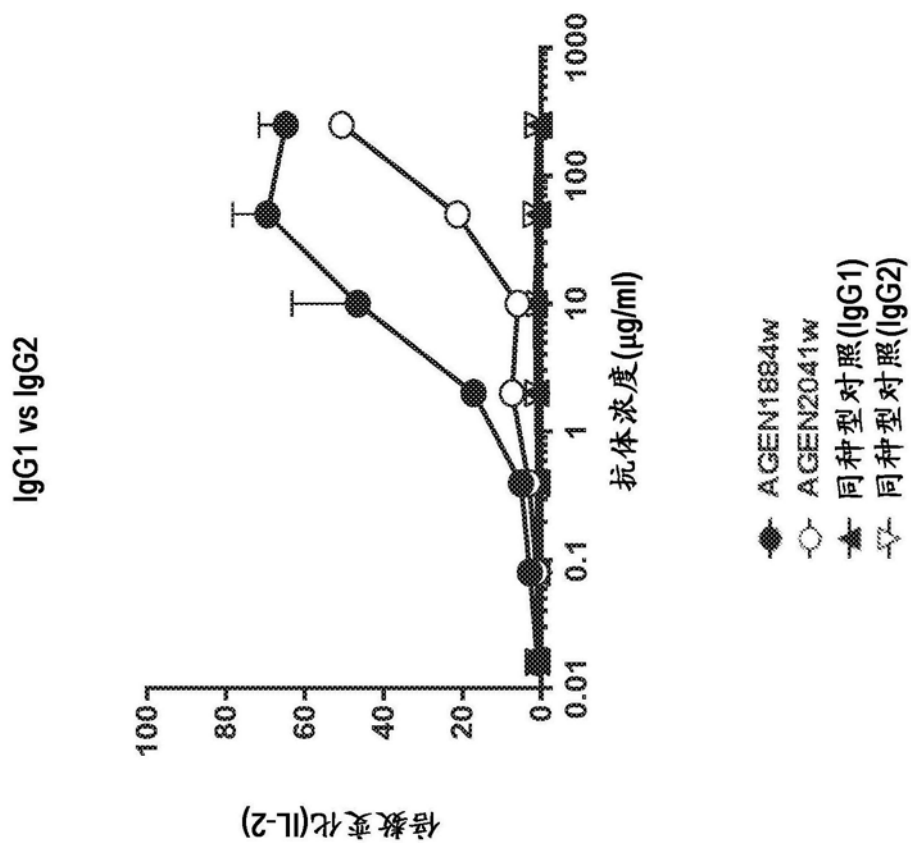


图6A

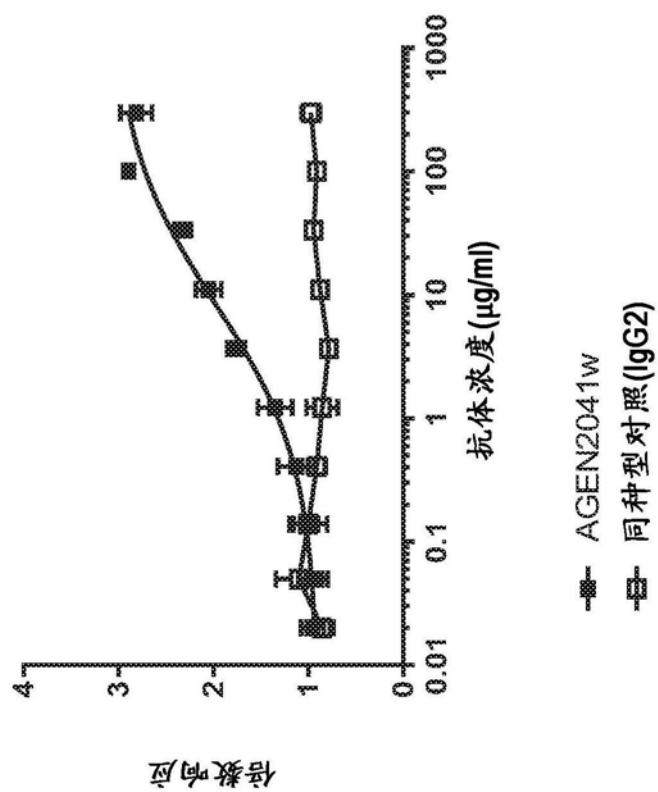


图6B

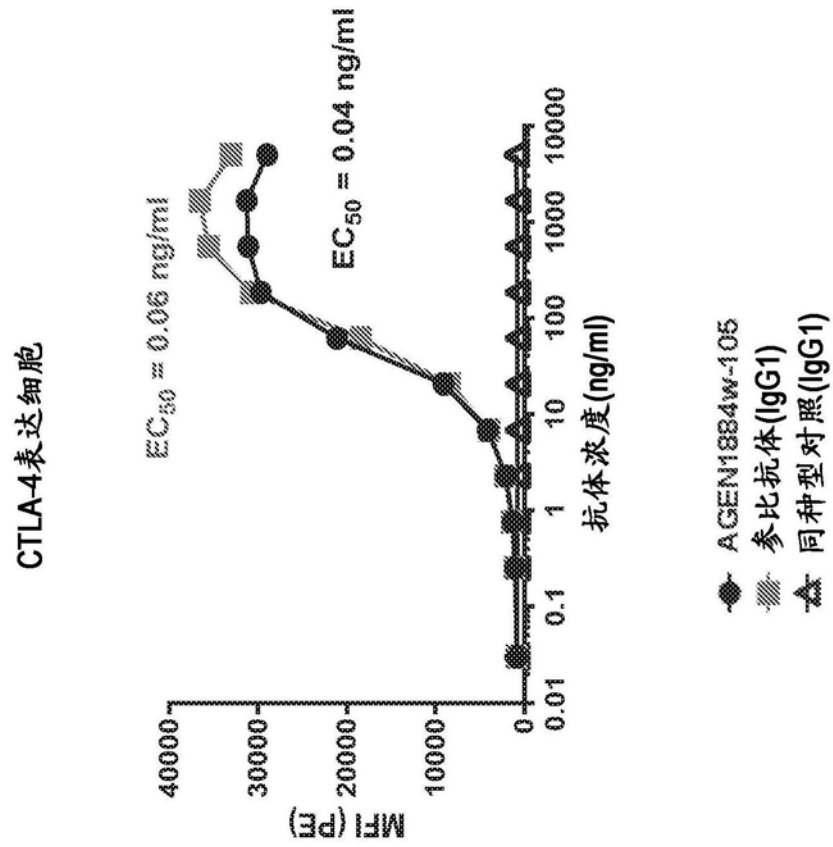


图7A

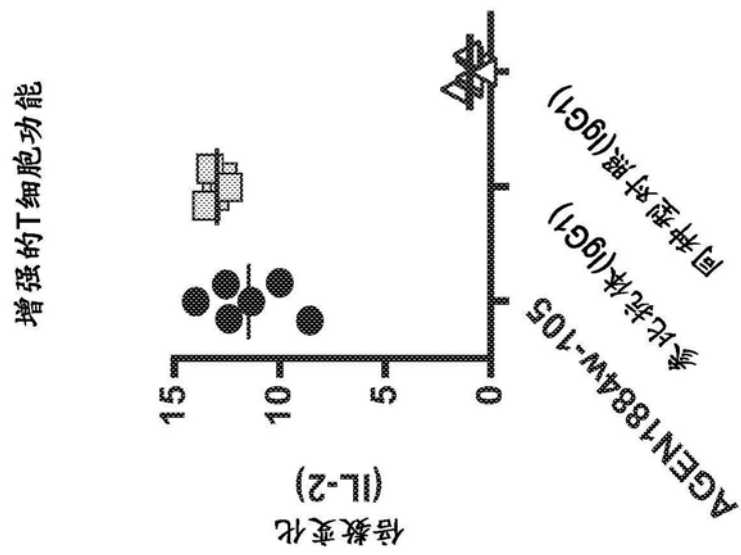


图7B

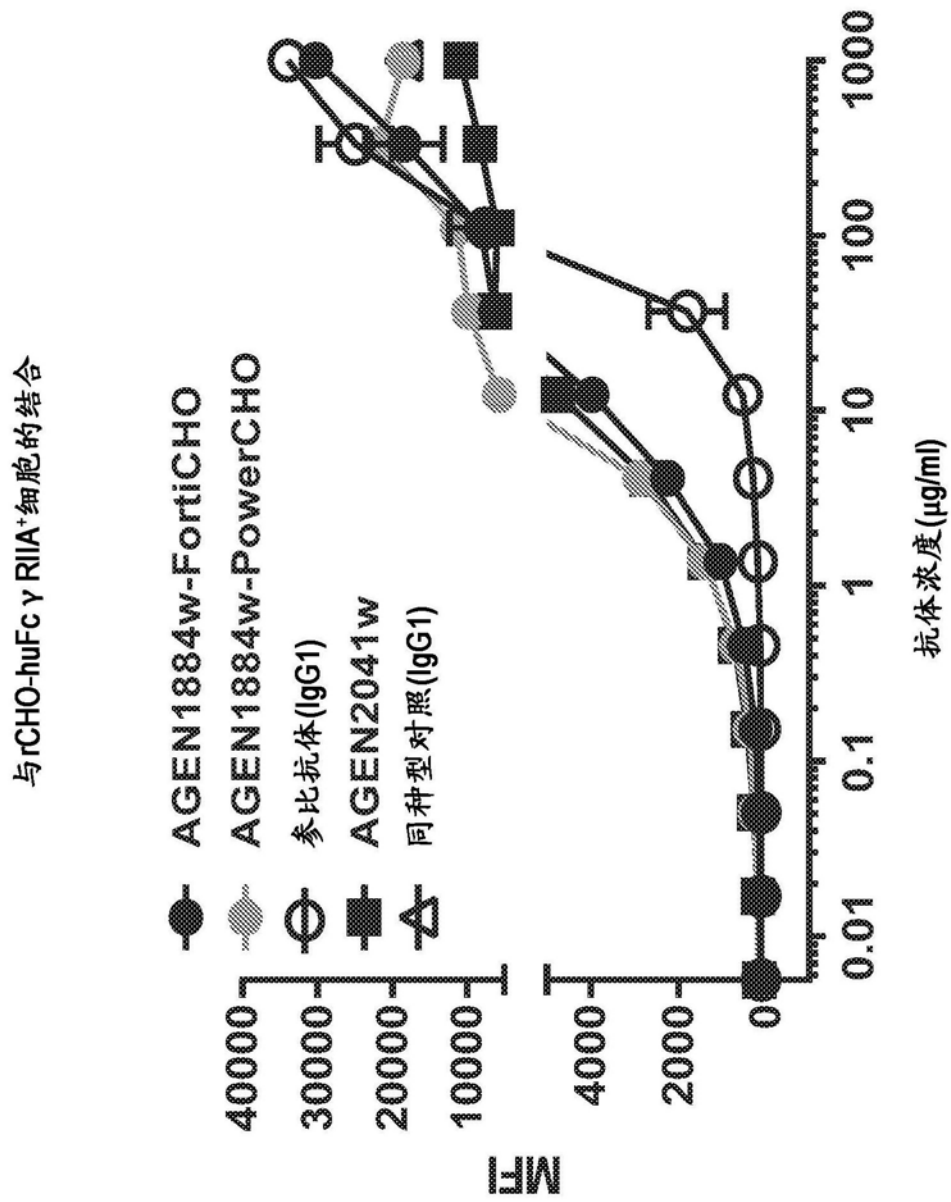


图8A

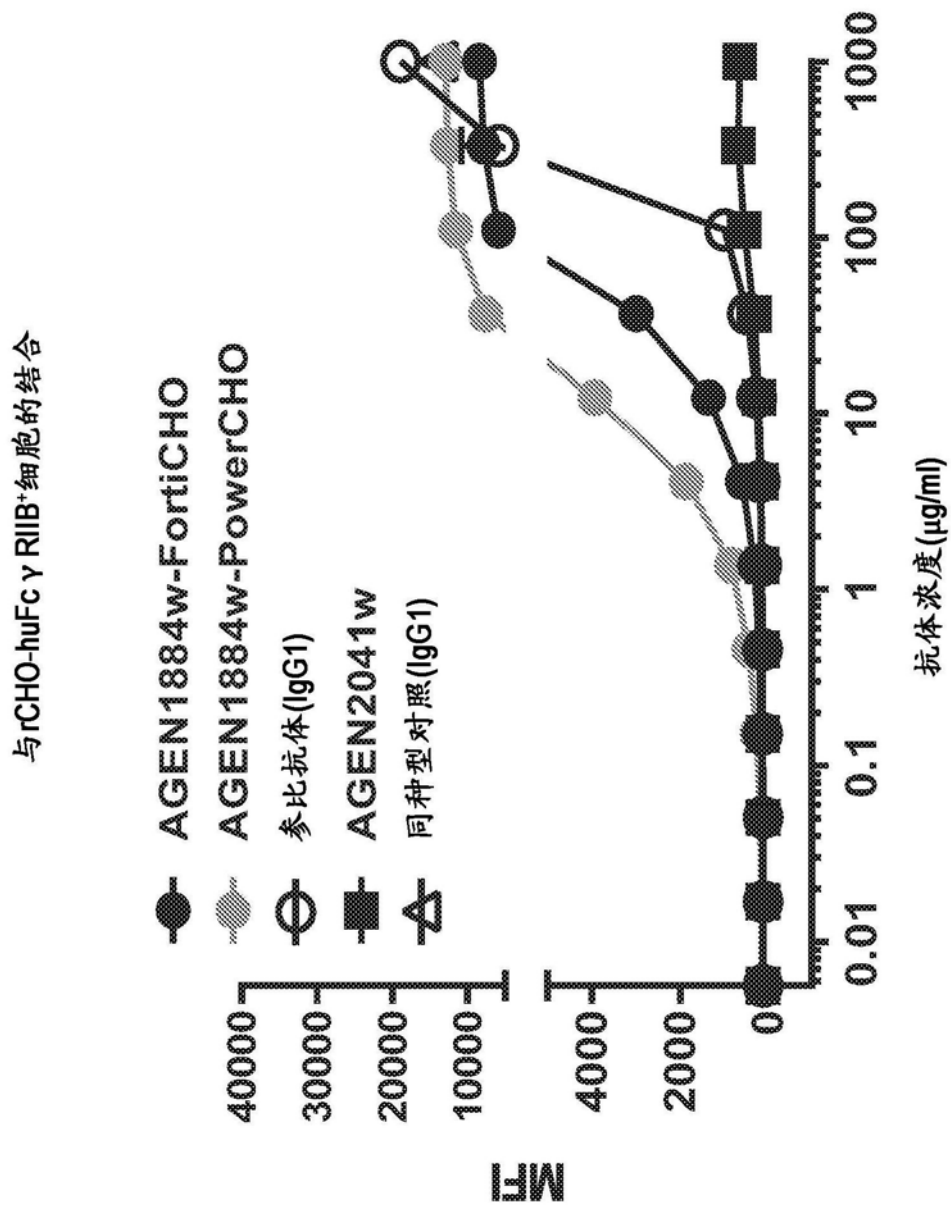


图8B

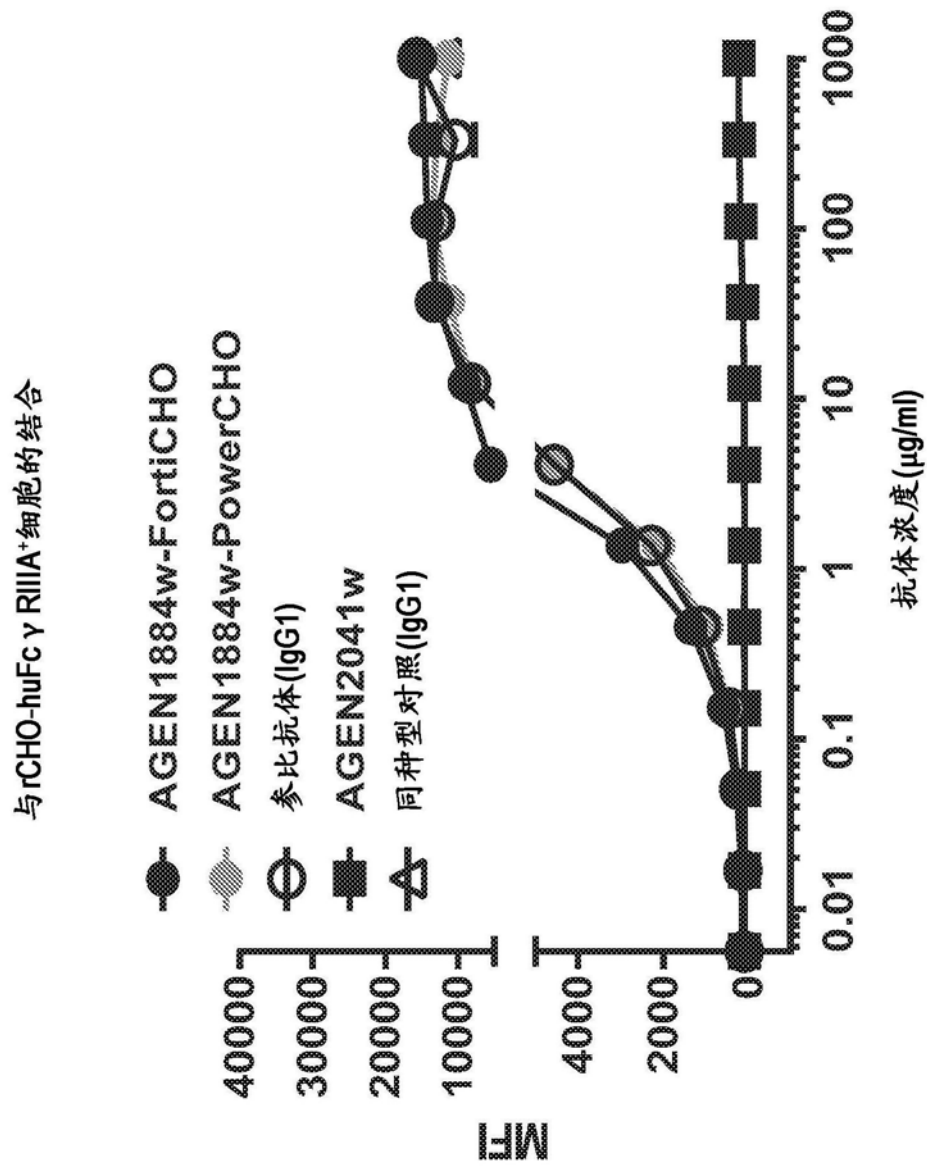


图8C

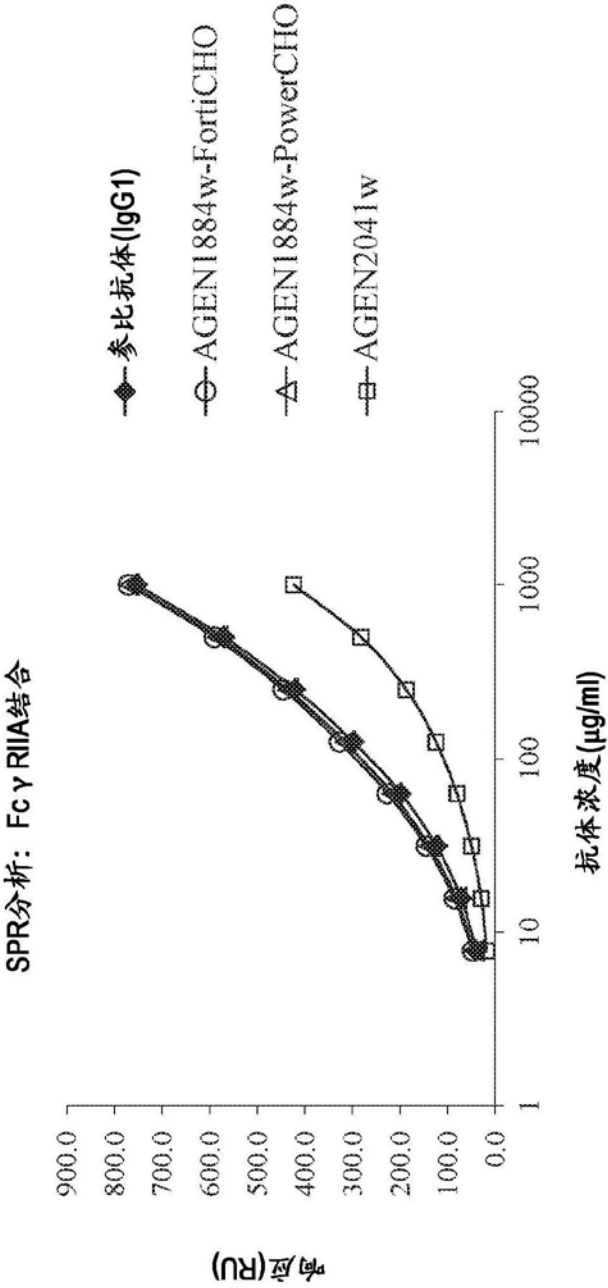


图9A

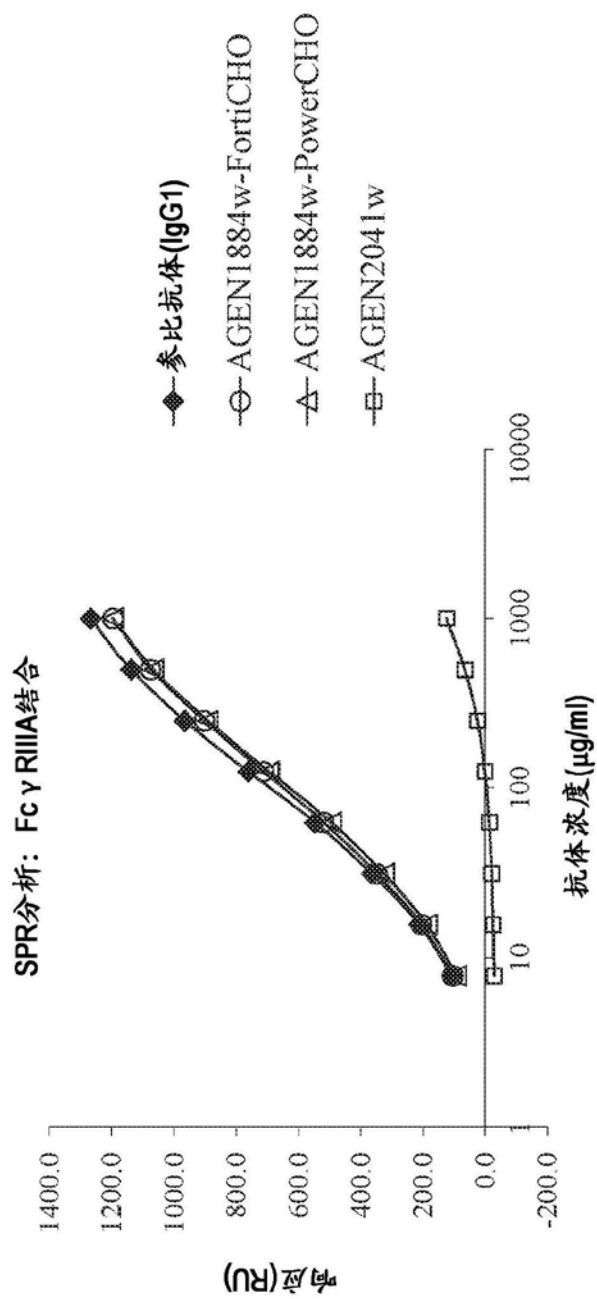


图9B

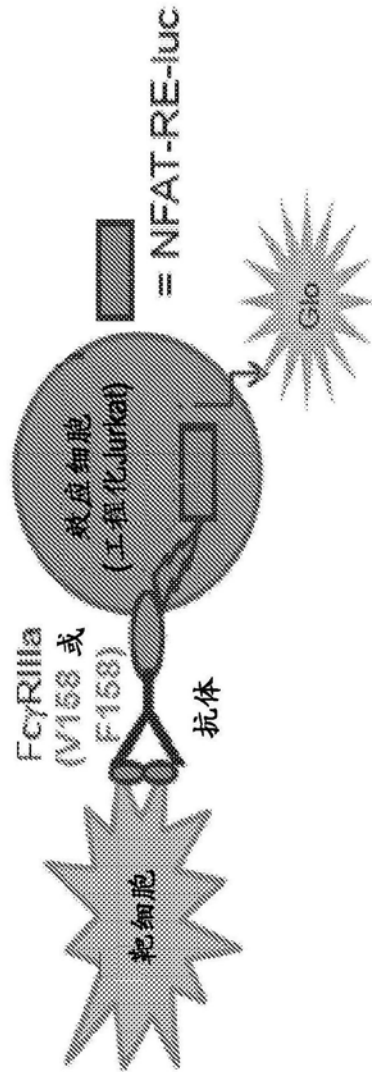


图10A

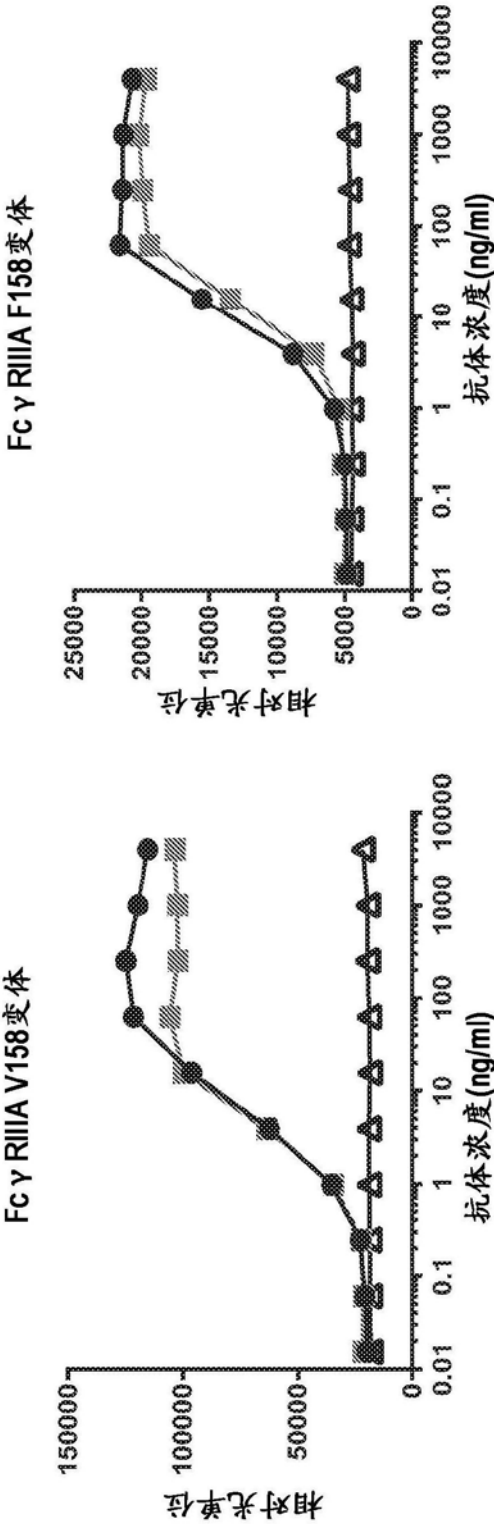


图10C

● AGEN1884w-105
▨ 参比抗体(IgG1)
△ 同种型对照(IgG1)

图10B

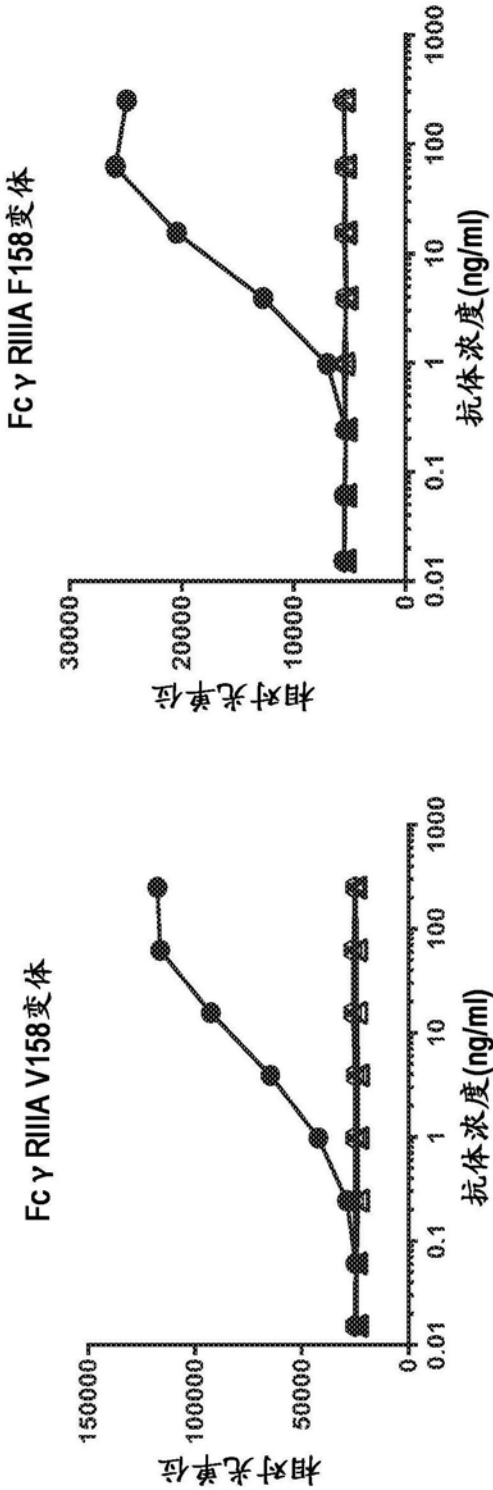
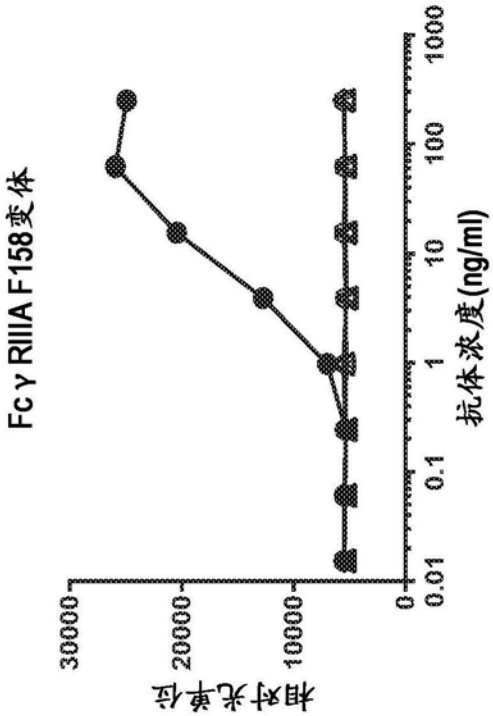


图10D

● AGEN1884W
○ AGEN2041W
△ 同种型对照(IgG1)

图10E



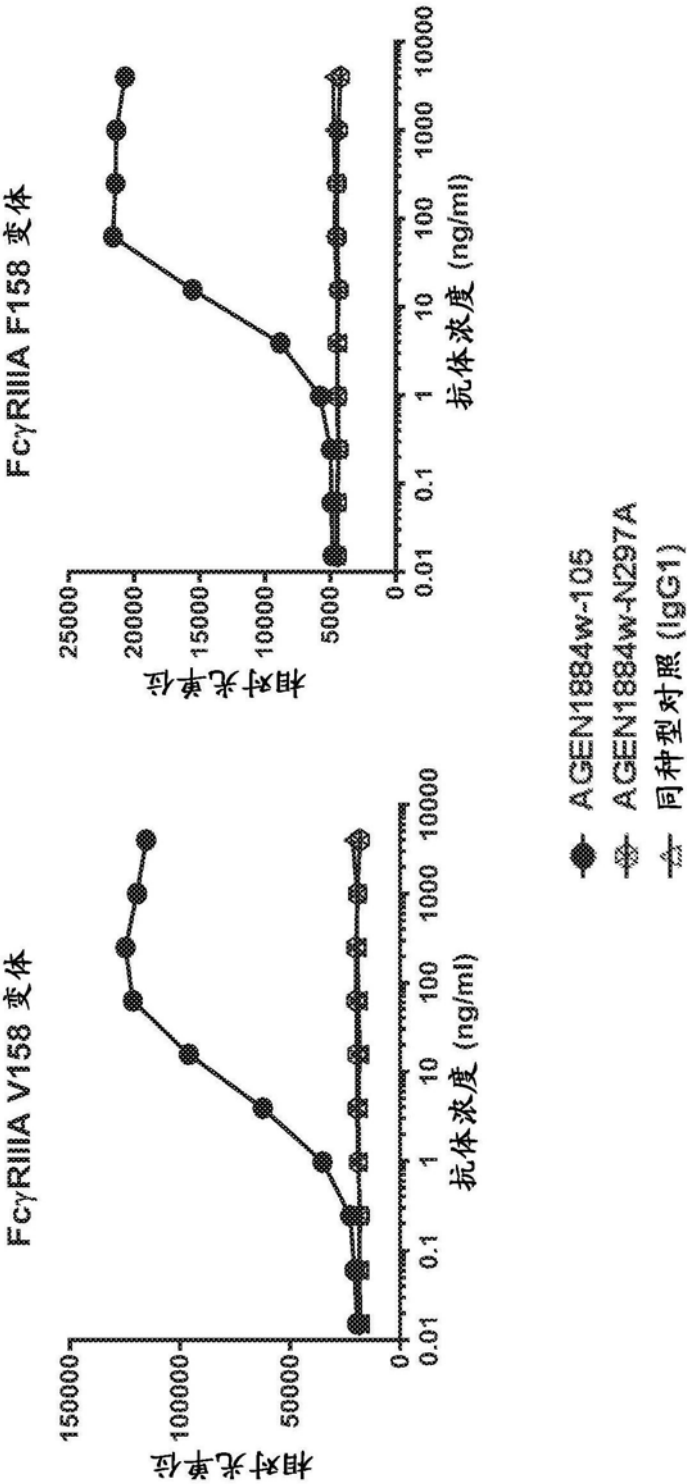


图 10F

图 10G

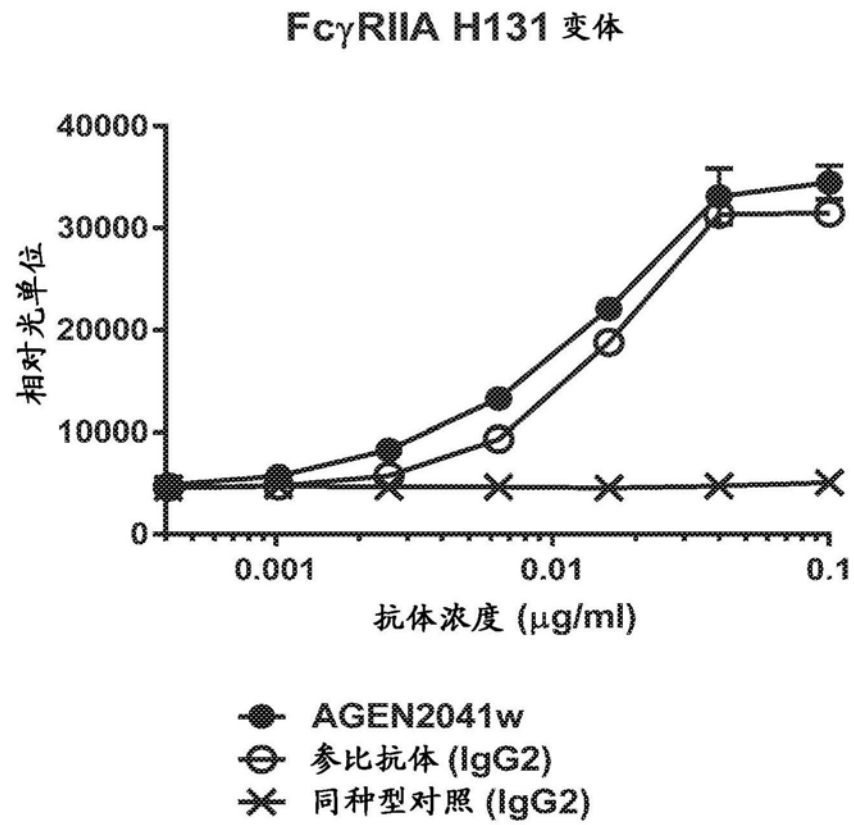


图11

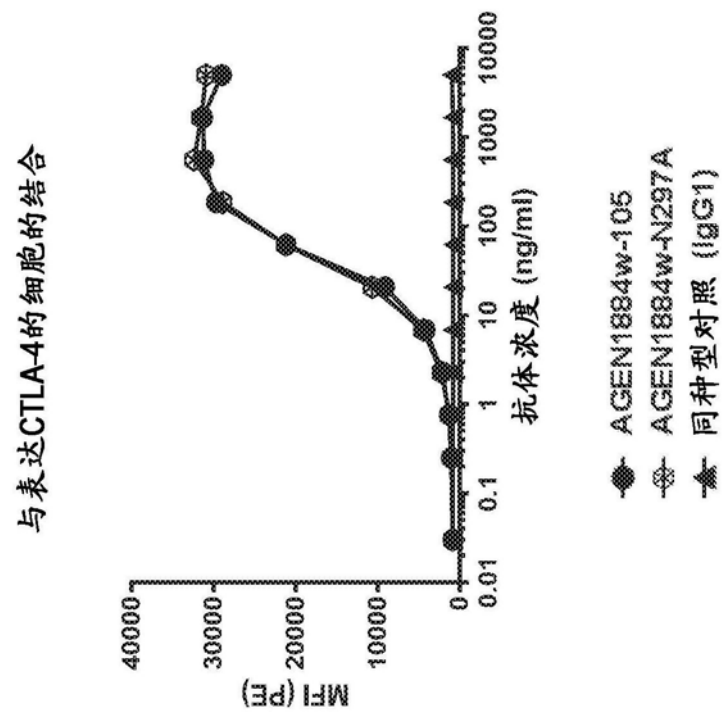


图12A

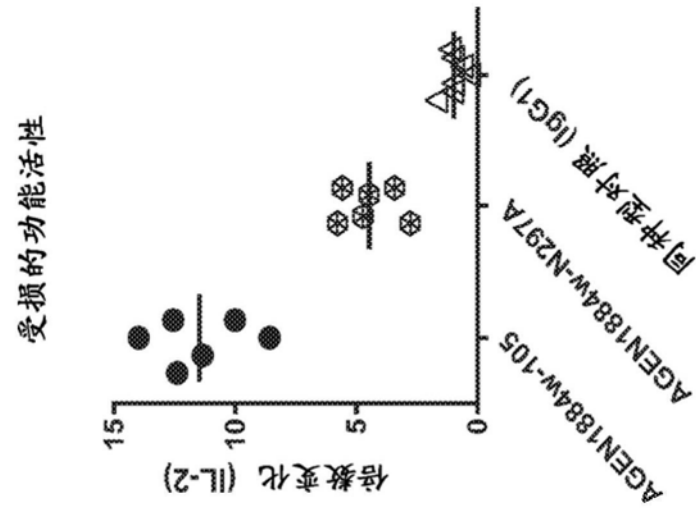


图12B

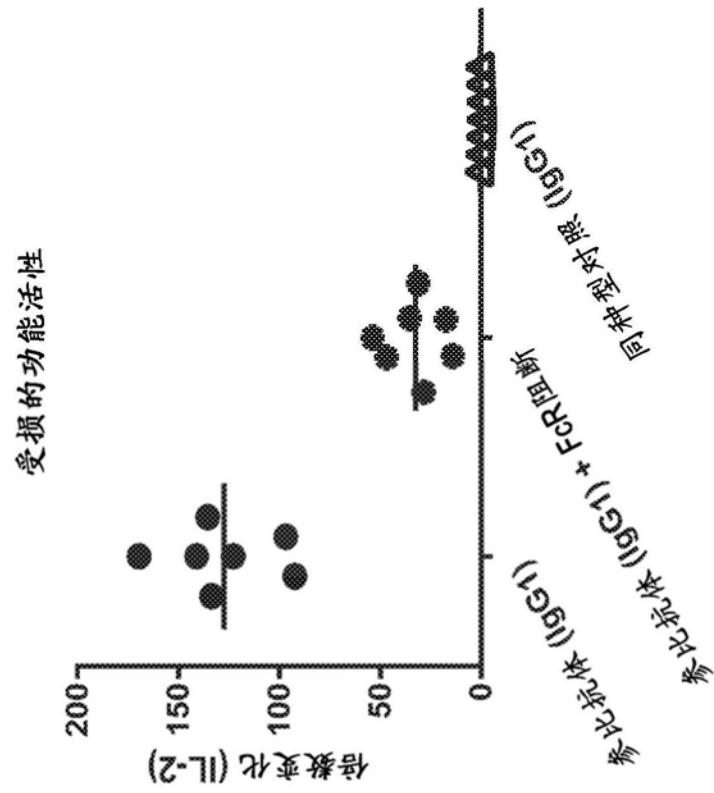


图13A

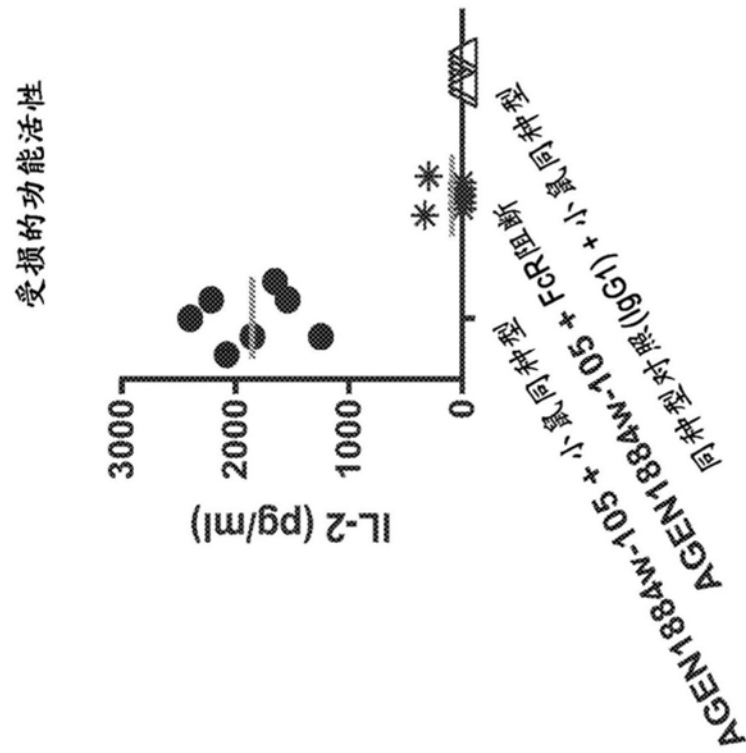


图13B

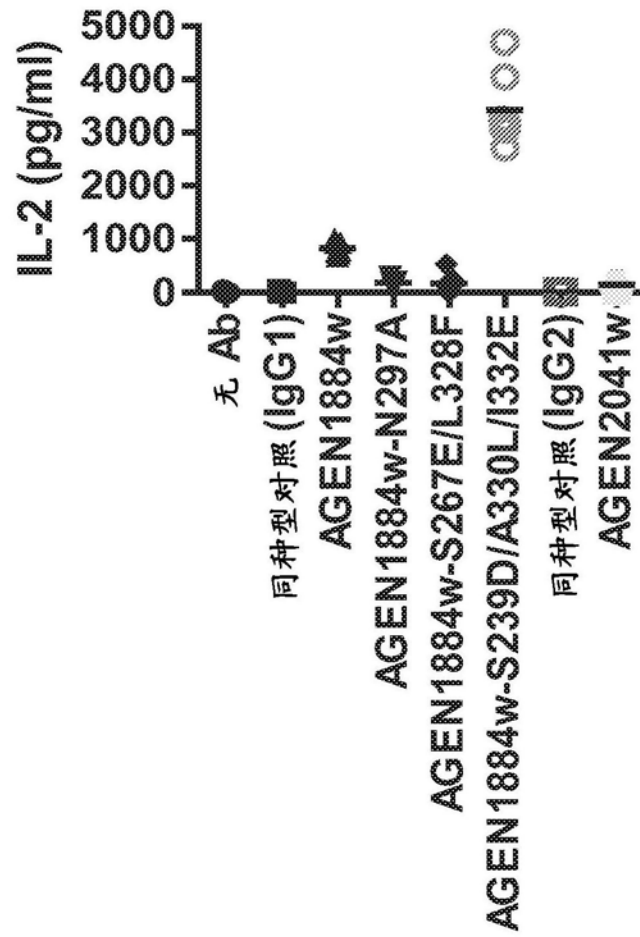


图14

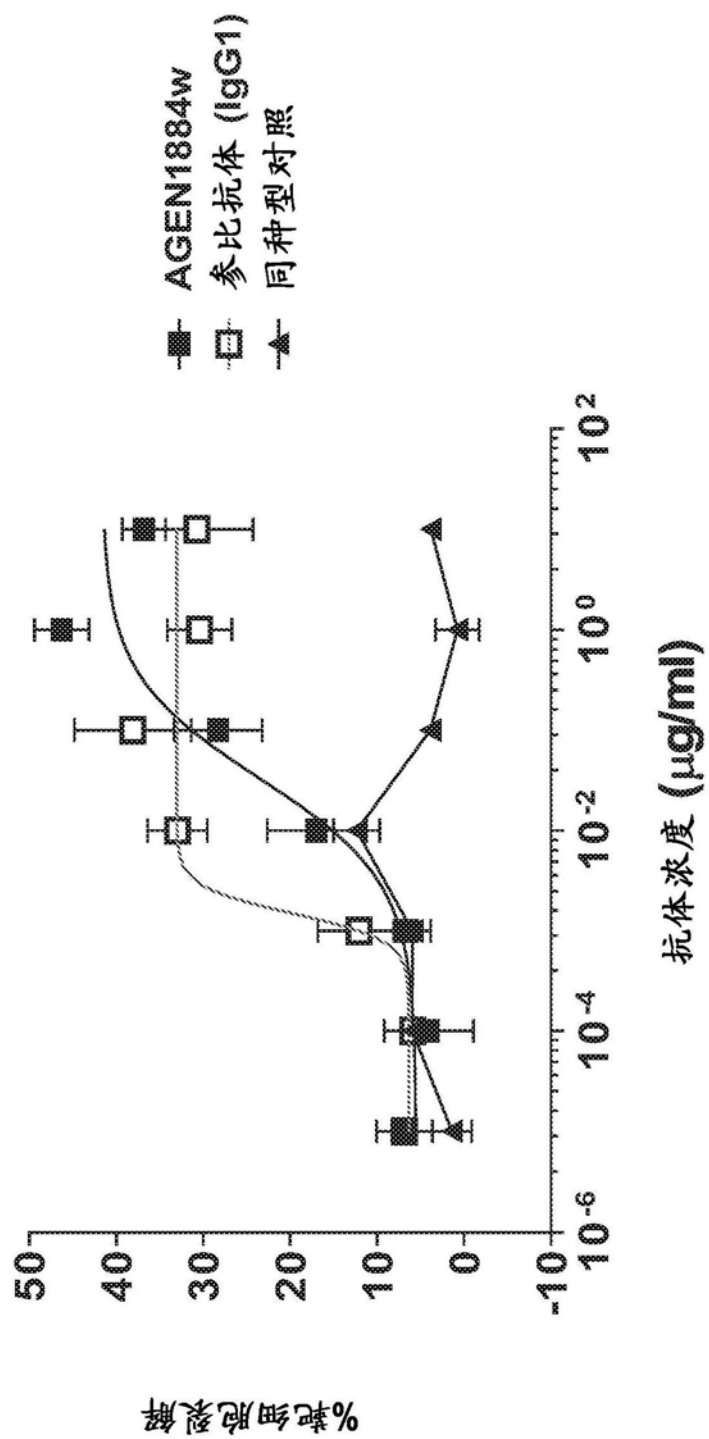
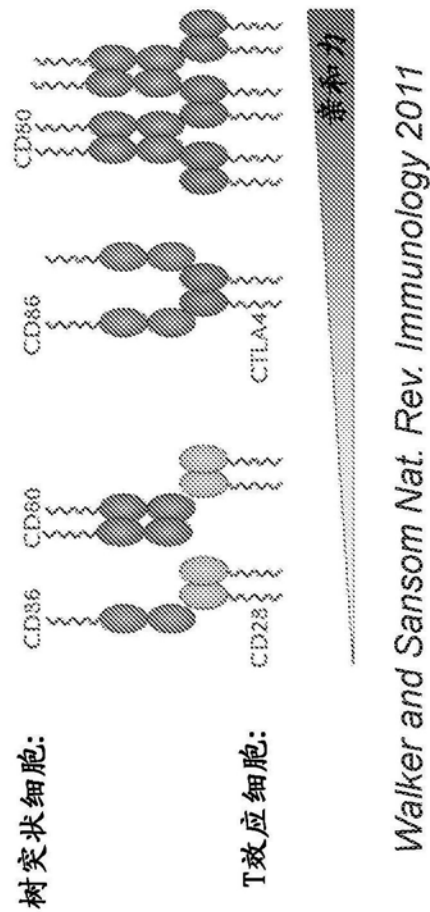


图15



CTLA-4-Ig	K_D (nM)
CD80-Fc-His*	0.3 nM
CD86-Fc-His*	3.6 nM
参比抗体 (IgG1)	0.5 nM
AGEN1884	0.6 nM

*改进自: Xu et al., JI 2012

图16

[illegible]

图17A

-NGTQIYVIDP	-----EPCPDS	-----DFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSL	-----S-KML	190		
-NGTQIYVIDP	-----EPCPDS	-----DFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSL	-----S-KML	190		
SNGTIIHVKGK	-----HLCPSPLFPGPSKPFVVLVVGGVLACYSLLVTVAFI	-----IFWVR		180		
--GGYLHIYES	-----QLCCQL	-----KFWLPIGCAA	-----FVVVCILGCIL	165		
SHSTTLVYTDVKASERPSKDEMASR	-----PWLLYRLLPLGG	-----LPLLITTCFCLFCCLRR		180		
VTERRAEVPTA	-----HPSPSPRPAG	-----QFQTLVVGVGGLLSVLVWVLAV	-----ICSRA	195		
; ;						
KKRSP	-----LTTGVYVKMPpte	-----PEC-EKQFQPYFIPIN	-----	223		
KKRSP	-----LTTGVYVKMPpte	-----PEC-EKQFQPYFIPIN	-----	223		
SKRSR	-----LLHSDYMNMTPRR	-----PGPTRKHYQPYAPP RD	-----FAAYRS	220		
KKKYSSSVHDPNGEYMFMRVN	-----TAKKSRLTDVTL	-----	-----	199		
HQKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTEASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMOEGS				240		
ARG	-----TIG	-----ARR	-----TGQP	-----LKEDPSAVPVF	-----SVDYGELDFQWREKT	234
:						
SP	P16410 CTLA4	HUMAN				
TR	G7PL88 G7PL88	MACFA				
SP	P10747 CD28	HUMAN				
SP	Q9Y6W8 ICOS	HUMAN				
SP	Q7Z6A9 BTLA	HUMAN				
SP	Q15116 PDCD1	HUMAN				
SP	P16410 CTLA4	HUMAN				
TR	G7PL88 G7PL88	MACFA				
SP	P10747 CD28	HUMAN				
SP	Q9Y6W8 ICOS	HUMAN				
SP	Q7Z6A9 BTLA	HUMAN				
SP	Q15116 PDCD1	HUMAN				
EVYSNPCLLEENKP	-----GIVYASLNHSHVIGPNRSLARNVKEAPTEYASI	-----CVRS			289	
PEPPVPCVPEQTEYATIVFP	-----SGMTSSPARRGSADGERSAQPLRPEDGHCSWPL				288	

图17C

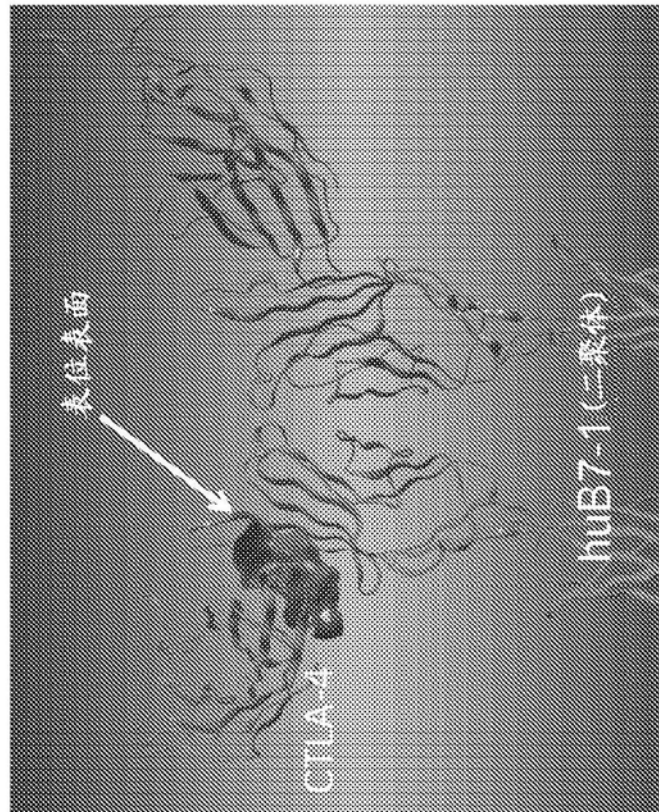


图17D

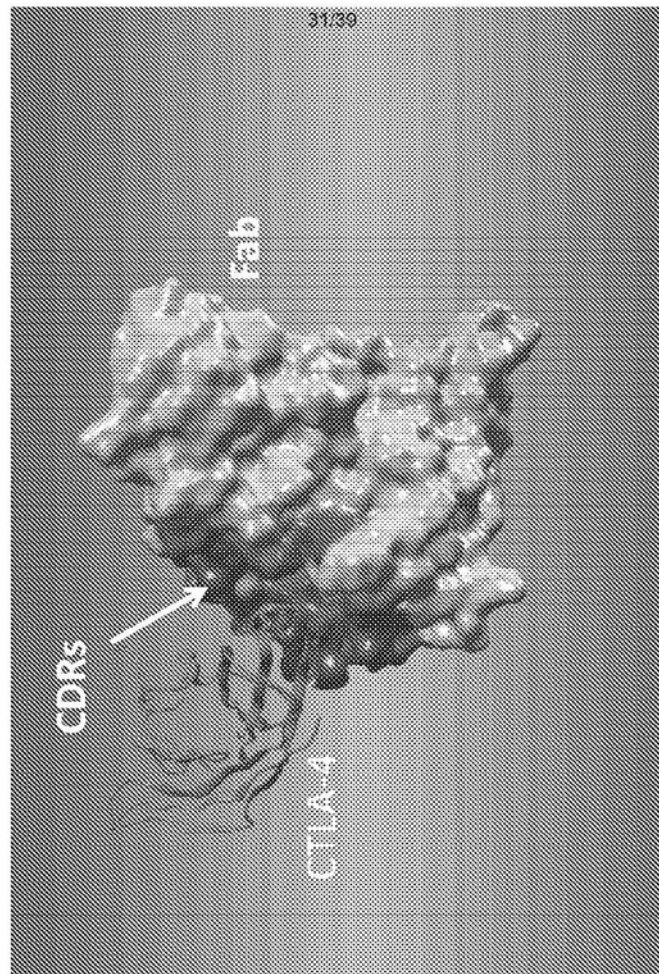


图17E

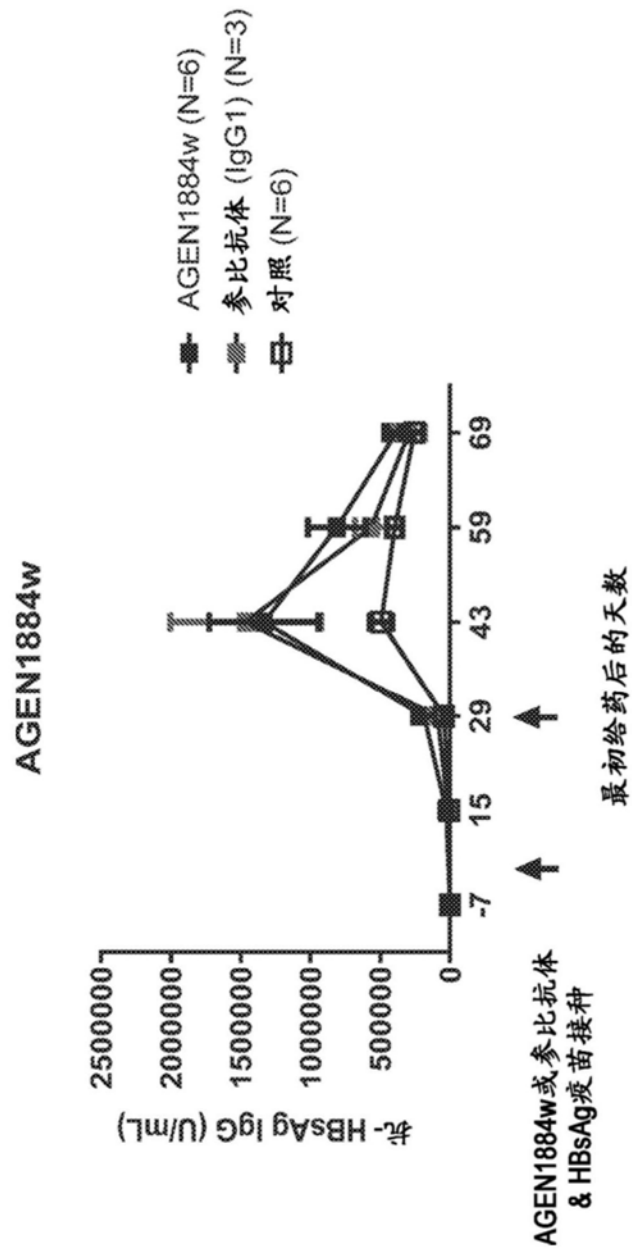


图18A

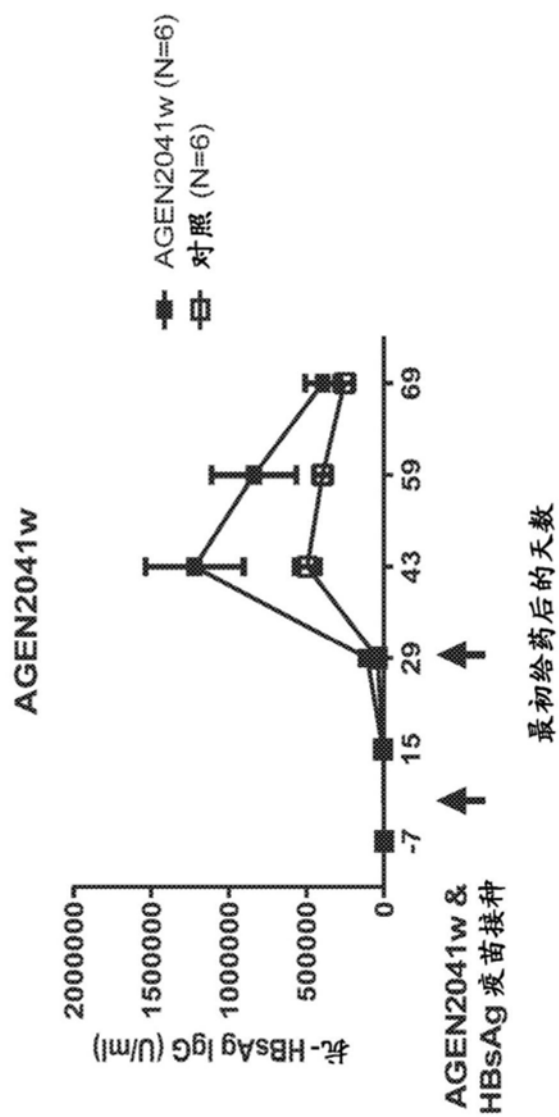


图18B

	10	20	30	40	50	60
	+	+	+	+	+	+
CDRH1						
CDRH2						
BADD411-2354	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFS	SYSMNWVRQAPGKLEWVSSISS	SSYIYY			60
BADD412-2356	...L...	Q...	...A...	...V...		60
BADD412-2357		60
BADD412-2358	...L...		60
BADD412-2359	...L...	Q...	...A...	...V...		60
BADD412-2360	...	Q...	T...	...		60

	70	80	90	100	110	
	+	+	+	+	+	
CDRH3						
BADD411-2354	ADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN	SLRAEDTAVYYCARVGLMGPF	DIWGQGMVTVSS			118
BADD412-2356		118
BADD412-2357	...T...		118
BADD412-2358		118
BADD412-2359	N...		118
BADD412-2360		118

图19A

	CDRL1										CDRL2									
	10	20	30	40	50	60														
BADD412-2376	EIVLTQSPG	TLSPGERATL	SCRASQSV	SRYLGWYQQ	KPGQAPRL	LIYGASTRA	TGIPD													
BADD412-2367A.GT.A.H.V.R.														
BADD412-2382A.S.A.S.AT.S.														
BADD412-2384A.	F.....S.A.S.														
BADD412-2390A.	V.....S.A.A.														
BADD412-2393A.S.A.N.A														

	CDRL3										
	70	80	90	100							
BADD412-2376	RFSGSGGTD	FTLTITRLE	PEDEFAVY	QCQQYGSS	PWTFGQ	GTKVEIK					
BADD412-2367S.						
BADD412-2382	V.....	S.....T.						
BADD412-2384F.	S.....F.	P.....D.						
BADD412-2390A.S.						
BADD412-2393	SS.....F.	P.....D.						

图19B

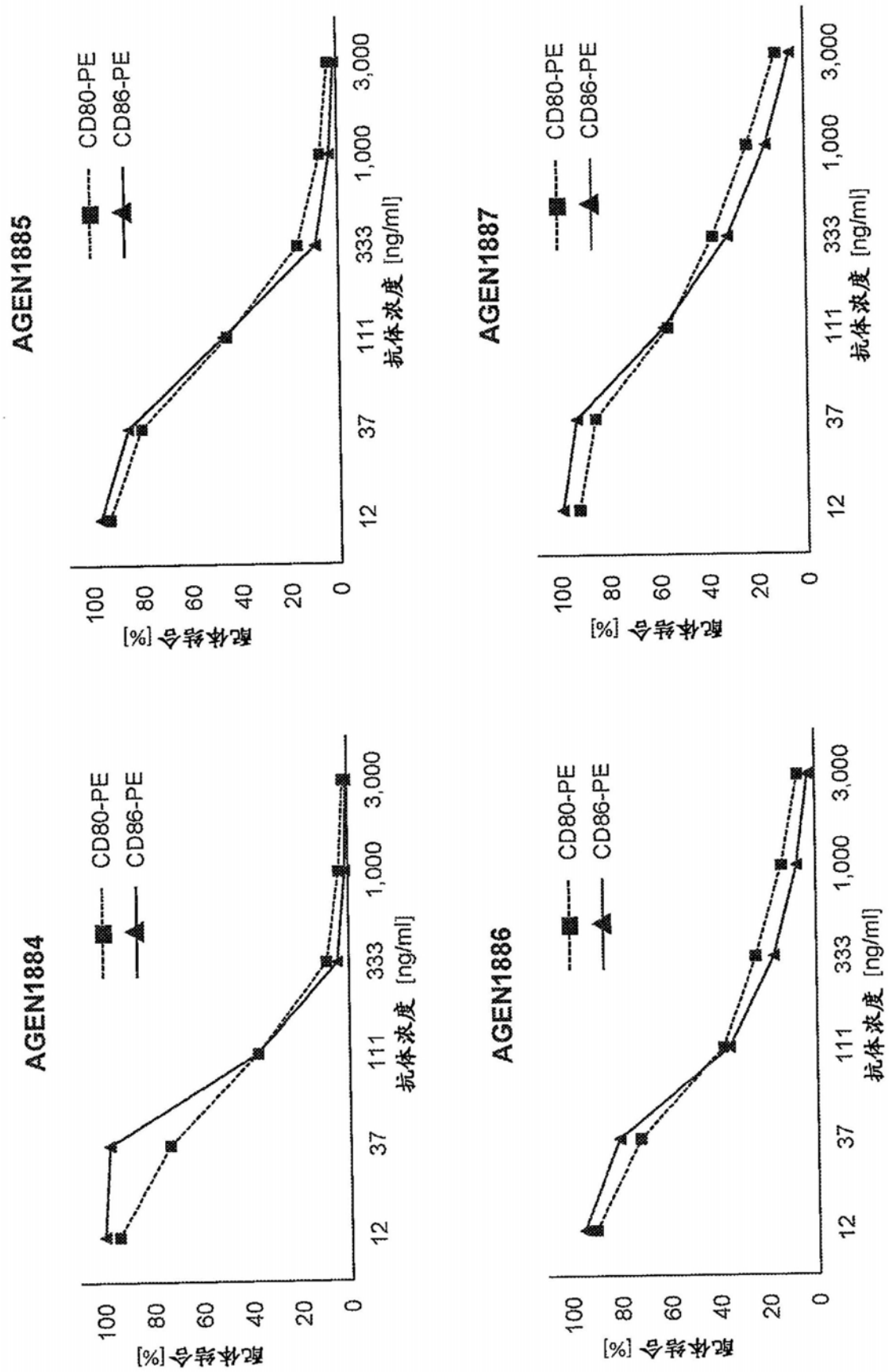


图20A

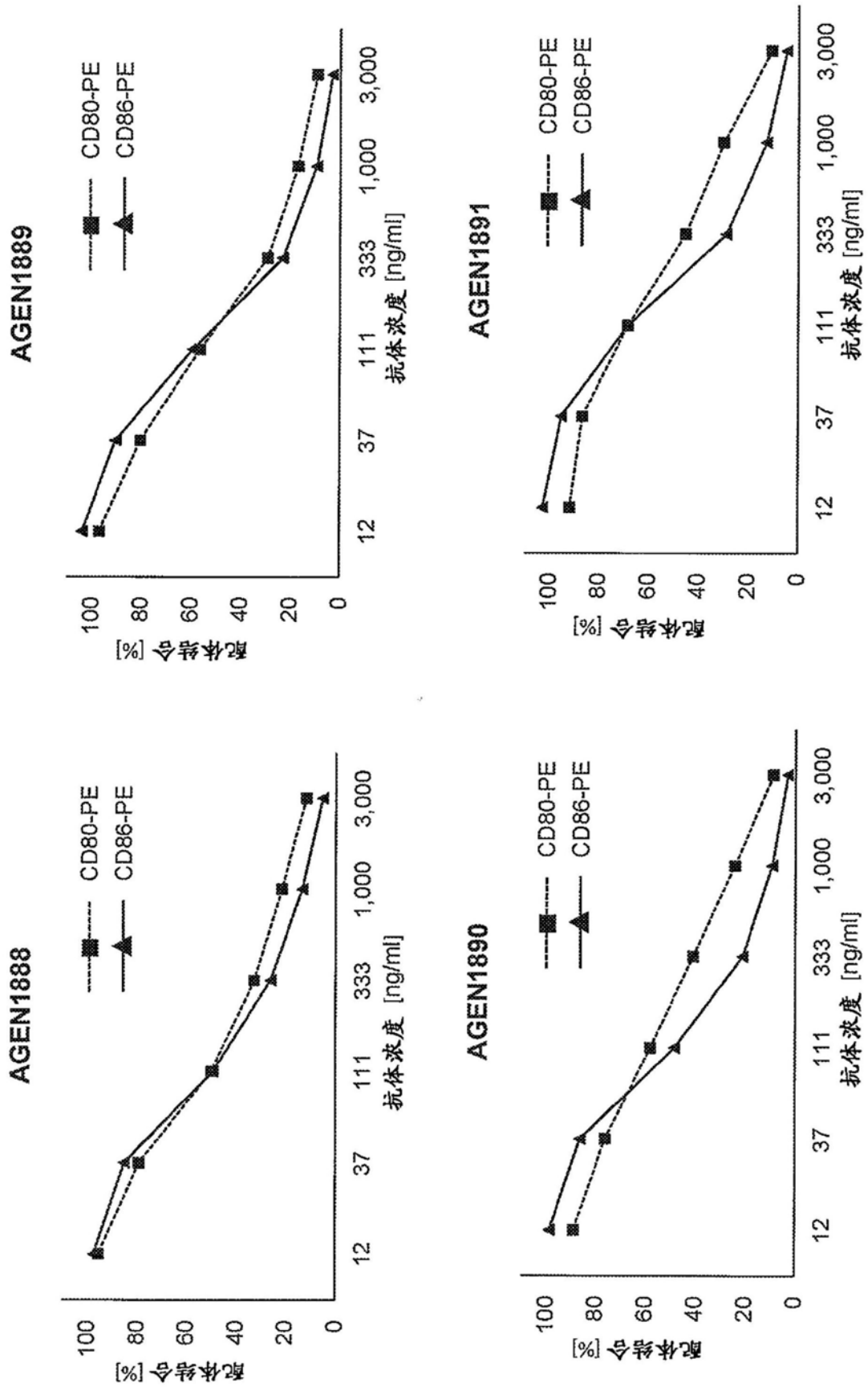


图20B

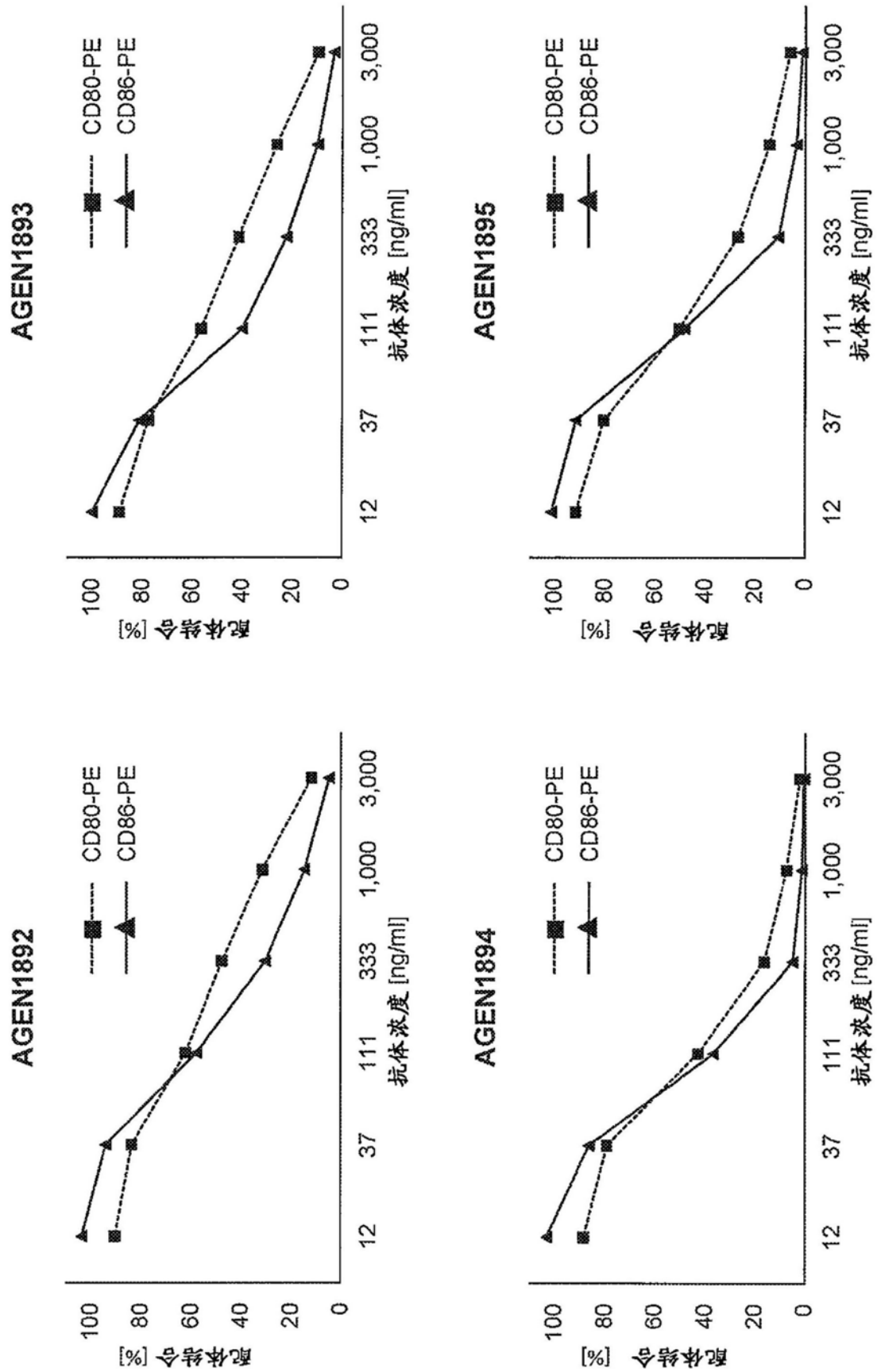


图20C

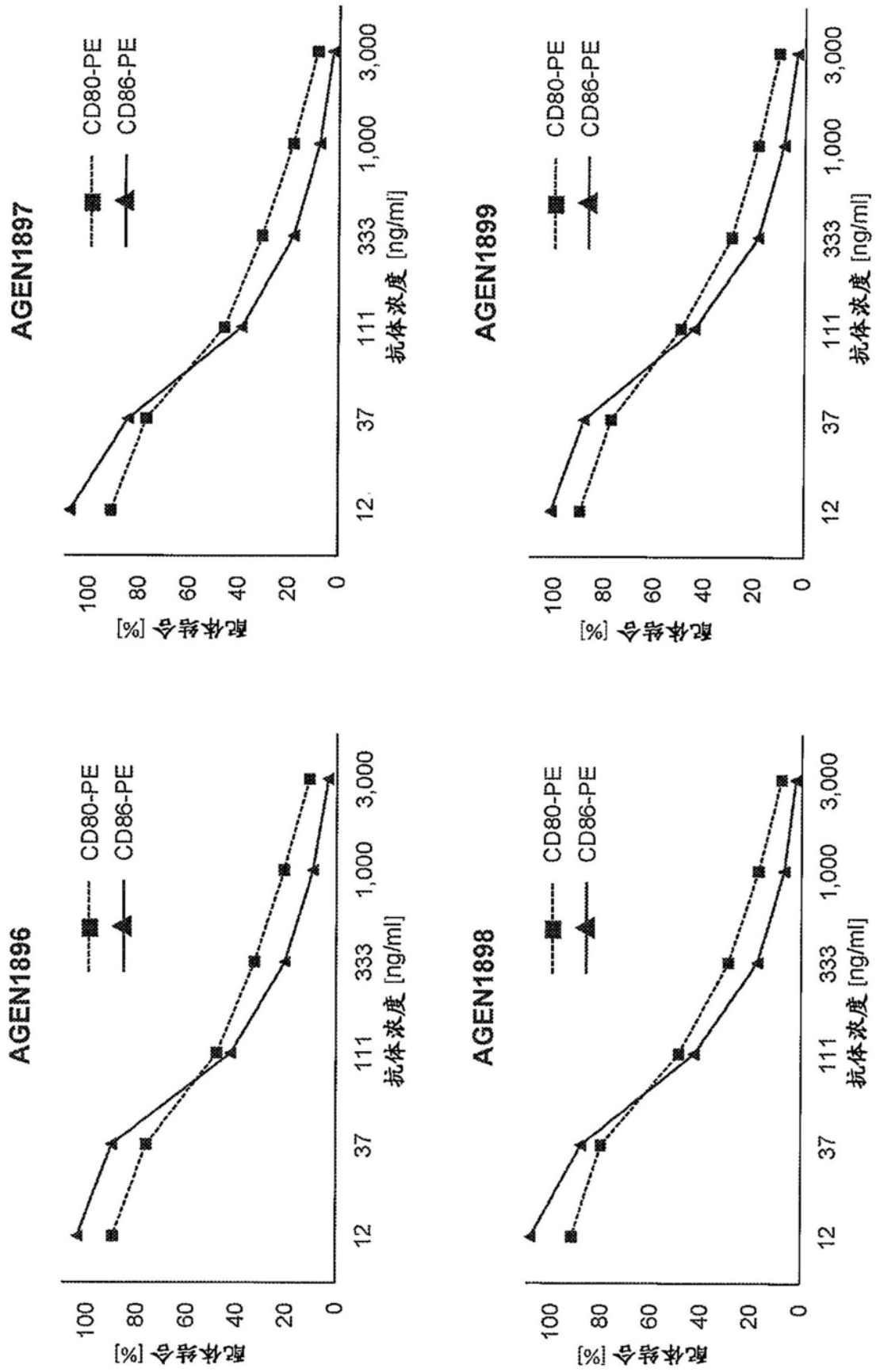


图20D

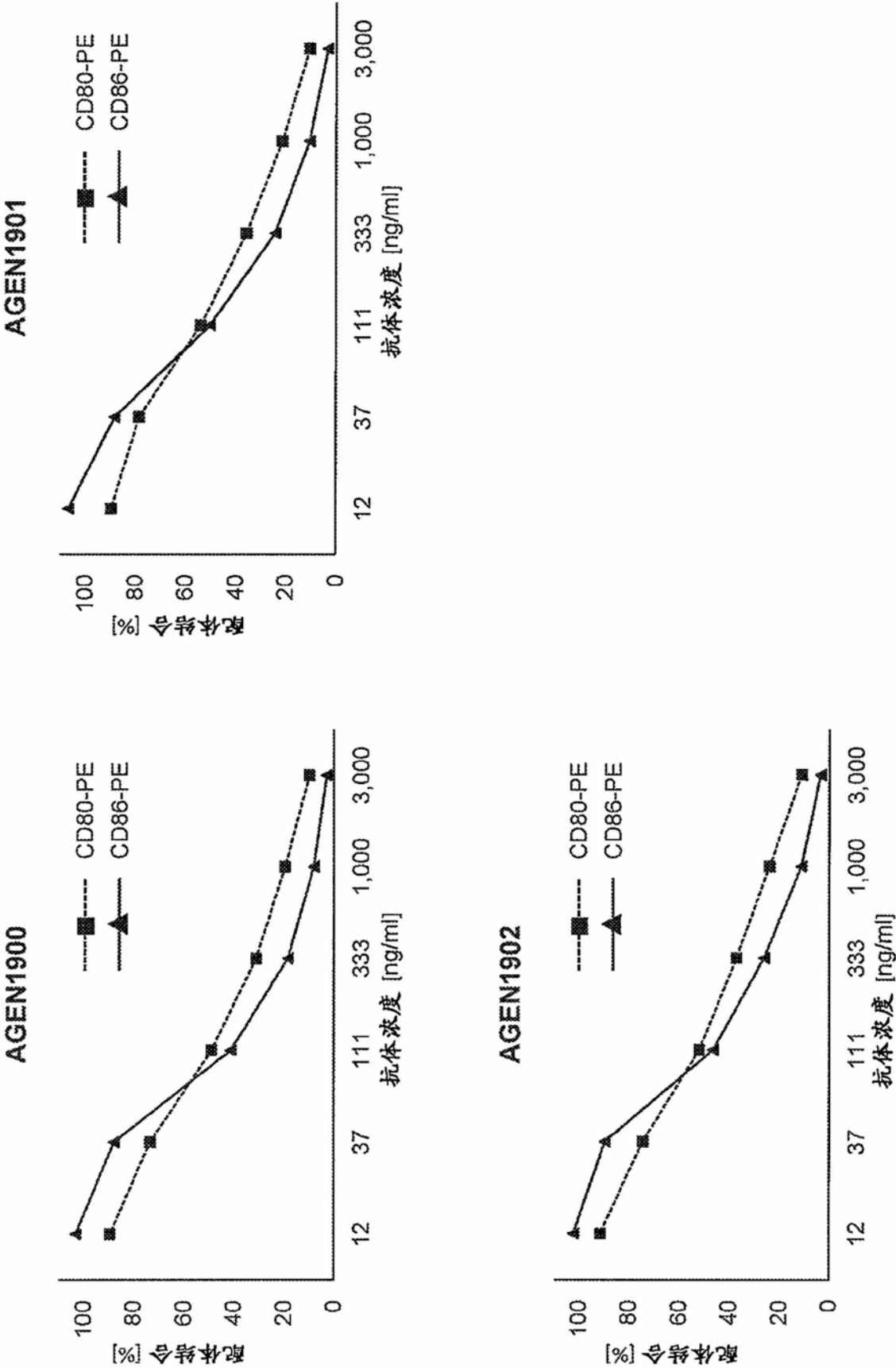


图20E