



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 112352000 B

(45) 授权公告日 2025. 03. 11

(21) 申请号 201980022531.1	(73) 专利权人 天演药业公司
(22) 申请日 2019.02.02	地址 开曼群岛大开曼岛
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 112352000 A	(72) 发明人 罗培志 杜方勇 潘忠宗 刘桂中
(43) 申请公布日 2021.02.09	(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494 专利代理师 封新琴
(66) 本国优先权数据 PCT/CN2018/075064 2018.02.02 CN	(51) Int.Cl. C07K 16/42 (2006.01) C07K 14/00 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2020.09.26	(56) 对比文件 CN 108271359 A, 2018.07.10
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/CN2019/074580 2019.02.02	审查员 郝攀
(87) PCT国际申请的公布数据 W02019/149281 EN 2019.08.08	

权利要求书2页 说明书99页
序列表84页 附图95页

(54) 发明名称
抗CTLA4抗体及其制备和使用方法

(57) 摘要
本文提供了结合人CTLA4的交叉反应性抗体 (或其抗原结合片段)、结合人CTLA4的可活化抗体、编码所述抗体的核酸分子、它们的药物组合物以及它们的治疗使用方法 (例如用于治疗癌症)。

1. 一种抗CTLA4抗体,其中所述抗体包含由SEQ ID NO:23的氨基酸序列组成的HVR-H1、由SEQ ID NO:35的氨基酸序列组成的HVR-H2、由SEQ ID NO:45的氨基酸序列组成的HVR-H3、由SEQ ID NO:58的氨基酸序列组成的HVR-L1、由SEQ ID NO:66的氨基酸序列组成的HVR-L2、和由SEQ ID NO:75的氨基酸序列组成的HVR-L3,且其中所述抗体结合人CTLA4。

2. 如权利要求1所述的抗体,其中所述抗体结合食蟹猴CTLA4和小鼠CTLA4。

3. 如权利要求1或2所述的抗体,其中所述抗体以约350nM或更小的解离常数(K_D)结合人CTLA4、食蟹猴CTLA4、小鼠CTLA4、大鼠CTLA4和/或狗CTLA4。

4. 如权利要求3所述的抗体,其中所述 K_D 通过表面等离子体共振 (SPR) 测量。

5. 如权利要求1-4中任一项所述的抗体,其中所述抗CTLA4抗体的结合诱导针对CTLA4表达性人细胞或人Treg细胞的抗体依赖性细胞细胞毒性 (ADCC),其中所述抗CTLA4抗体的ADCC活性高于易普利单抗的ADCC活性。

6. 如权利要求1-5中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含:

含有SEQ ID NO:87的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:100的氨基酸序列的轻链可变区。

7. 如权利要求1-6中任一项所述的抗体,其中所述抗体是抗体片段。

8. 如权利要求7所述的抗体,其中所述抗体片段是Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv或scFv片段。

9. 如权利要求1-6中任一项所述的抗体,其中所述抗体包含人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区。

10. 一种多核苷酸,所述多核苷酸编码如权利要求1-9中任一项所述的抗体。

11. 如权利要求10所述的多核苷酸,所述多核苷酸包含如SEQ ID NO:113所示的序列。

12. 一种载体,所述载体包含如权利要求10或权利要求11所述的多核苷酸。

13. 如权利要求12所述的载体,其中所述载体是表达载体及/或展示载体。

14. 一种宿主细胞,所述宿主细胞包含如权利要求10或11所述的多核苷酸或如权利要求12或13所述的载体。

15. 如权利要求14所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是真核细胞。

16. 如权利要求14或权利要求15所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞。

17. 一种制备抗体的方法,所述方法包括在适于产生所述抗体的条件下培养如权利要求14-16中任一项所述的宿主细胞。

18. 如权利要求17所述的方法,所述方法还包括回收由所述细胞产生的所述抗体。

19. 一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求1-9中任一项所述的抗体以及药学上可接受的载体。

20. 如权利要求1-9中任一项所述的抗体在制备用于治疗结肠直肠癌、肝癌、胰腺癌或肺癌,或延迟结肠直肠癌、肝癌、胰腺癌或肺癌的进展的药物中的用途。

21. 如权利要求20所述的用途,其中所述药物用于使具有约400-1000mm³的尺寸的实体肿瘤的尺寸降低。

22. 如权利要求21所述的用途,其中所述药物与至少一种额外治疗剂组合施用。

23. 如权利要求22所述的用途,其中所述至少一种额外治疗剂选自病毒基因疗法、免

疫检查点抑制剂、靶向疗法、疫苗接种疗法和化学疗法组成的组。

24. 如权利要求22或权利要求23所述的用途,其中所述至少一种额外治疗剂选自自由以下组成的组:来那度胺、泊马度胺、沙利度胺、DNA烷基化含铂衍生物、5-氟尿嘧啶、环磷酰胺、抗CD137抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗CD20抗体、抗CD40抗体、抗DR5抗体、抗CD1d抗体、抗TIM3抗体、抗SLAMF7抗体、抗KIR受体抗体、抗OX40抗体、抗HER2抗体、抗EGFR抗体、IL-12、IFN α 、GM-CSF、嵌合抗原受体、继承性转移的T细胞、抗癌疫苗和溶瘤性病毒。

25. 如权利要求24所述的用途,其中所述至少一种额外治疗剂选自顺铂、西妥昔单抗、利妥昔单抗、曲妥珠单抗和帕母单抗。

26. 如权利要求21所述的用途,其中所述药物与放射疗法组合施用。

27. 如权利要求26所述的用途,其中所述放射疗法为单次剂量放射、分次放射、局灶性放射或全器官放射。

28. 如权利要求20-24中任一项所述的用途,其中所述药物在用以移除所述受试者中的实体肿瘤的手术之前或在所述手术之后施用。

抗CTLA4抗体及其制备和使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2018年2月2日提交的国际申请号PCT/CN2018/075064的优先权权益,所述国际申请以引用的方式整体并入本文。

[0003] 采用ASCII文本文件进行的序列列表提交

[0004] 采用ASCII文本文件进行的以下提交的内容以引用的方式整体并入本文:计算机可读形式(CRF)的序列列表(文件名称:695402000541SEQLIST.TXT,记录日期:2019年2月1日,大小:102KB)。

技术领域

[0005] 本公开涉及结合人细胞毒性T淋巴细胞蛋白4(CTLA4)的交叉反应性抗体、结合人CTLA4的精准/情形依赖性可活化抗体、编码所述抗体的核酸、它们的药物组合物以及它们的治疗用途。

背景技术

[0006] CTLA4是免疫球蛋白(Ig)蛋白质超家族的起下调T细胞活化以及维持免疫原性体内平衡的作用的成员。已显示在同种同基因鼠前列腺癌模型中,体内抗体介导的CTLA4阻断使抗癌免疫应答增强(Kwon等(1997)Proc Natl Acad Sci USA,94(15):8099-103)。此外,显示阻断CTLA4功能会在携带肿瘤的小鼠中,在各种肿瘤生长阶段下,使抗肿瘤T细胞应答增强(Yang等(1997)Cancer Res57(18):4036-41;Hurwitz等(1998)Proc Natl Acad Sci USA 95(17):10067-7)。然而,对适于人类使用的基于抗体的治疗剂的开发仍然是困难的,因为从临床前动物模型向人类安全性的转化经常是不良的。因此,存在对在不同物种诸如人和实验动物(例如小鼠、猴、大鼠等)之间具有交叉反应性的抗CTLA4抗体的需要,以并行地能够进行动物模型研究以及提供适合人治疗性候选物。此外,存在对开发仅在某些情形下诸如在富含蛋白酶的肿瘤微环境中具有活性的更安全抗CTLA4抗体的需要。

[0007] 本文引用的所有参考资料,包括专利申请、专利公布、非专利文献和UniProtKB/Swiss-Prot/GenBank登录号,都以引用的方式整体并入本文,所述引用的程度就好像已特定地和单独地指出将每个单独的参考资料以引用的方式并入一样。

发明内容

[0008] 为满足以上需要和其他需要,本文公开了结合人CTLA4的抗体(例如交叉反应性抗体)及其抗原结合片段。本公开的抗CTLA4抗体或其抗原结合片段具有以下功能性质中的至少一者(例如一者、一些或全部):(a)以500nM或更小的 K_D 结合人、食蟹猴、小鼠、大鼠和/或狗CTLA4;(b)对人CTLA4具有拮抗活性;(c)在多达100nM的浓度下不结合人PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG3、TIM3、B7-H3、CD95、CD120a、OX40、CD40、BTLA、VISTA、ICOS和/或B7-H4;(d)与猴、小鼠、大鼠和/或狗CTLA4具有交叉反应性;(e)诱导ADCC效应(例如对Treg);(f)使人PBMC活化(例如刺激IL-2和/或IFN γ 的分泌);(g)能够抑制肿瘤细胞生长以及建立针对肿瘤细胞的

免疫记忆; (h) 对癌症具有治疗作用; 和 (i) 阻断人CTLA4与人CD80和/或人CD86的结合 (参见以下实施例1-实施例5)。

[0009] 本文公开了当呈活性形式而非呈非活性形式时结合人CTLA4的精准/情形依赖性可活化抗体, 即可活化抗体仅在裂解可裂解部分 (CM) 以移除掩蔽部分 (MM) 之后结合于CTLA4 (具有活性)。在一些实施方案中, 本文所述的所发现的掩蔽部分 (MM) 能够高效掩蔽抗体活性和/或降低或完全抑制抗原结合, 同时在一些实施方案中, 没有化学不稳定残基甲硫氨酸和/或色氨酸。此外, 本文鉴定和描述的可活化抗体在治疗多种癌症类型方面与它们的亲本抗体同样高效, 同时在易感动物 (NOD小鼠) 中具有显著降低的细胞毒性。

[0010] 因此, 在一个方面, 本文提供了一种结合人CTLA4, 并且与来自至少一种选自食蟹猴、小鼠、大鼠和狗组成的组的非人动物的CTLA4多肽具有交叉反应性的抗CTLA4抗体 (例如人抗体)。在一些实施方案中, 抗体结合食蟹猴CTLA4和小鼠CTLA4。在可与任何先前实施方案组合的一些实施方案中, 抗体以约350nM或更小 (例如约300nM或更小、约200nM或更小、约100nM或更小、约50nM或更小、或约10nM或更小) 的解离常数 (K_D) 结合人CTLA4、食蟹猴CTLA4、小鼠CTLA4、大鼠CTLA4和/或狗CTLA4。在一些实施方案中, K_D 通过表面等离子体共振 (SPR) 测量。在一些实施方案中, 抗体与CTLA4的结合诱导针对CTLA4表达性细胞的抗体依赖性细胞细胞毒性 (ADCC)。在一些实施方案中, 抗体与CTLA4的结合诱导针对Treg细胞的ADCC。在一些实施方案中, 本文所述的抗CTLA4抗体的结合诱导针对CTLA4表达性人细胞或人Treg细胞的抗体依赖性细胞细胞毒性 (ADCC), 其中在体外, 抗CTLA4抗体的ADCC活性高于易普利单抗 (ipilimumab) 的ADCC活性, 并且其中两种抗体均包含野生型人IgG1 Fc区。在一些实施方案中, 本文所述的抗CTLA4抗体的结合诱导针对CTLA4表达性人细胞或人Treg细胞的抗体依赖性细胞细胞毒性 (ADCC), 其中在体外, 抗CTLA4抗体的ADCC活性是易普利单抗的ADCC活性的两倍或更高, 并且其中两种抗体均包含野生型人IgG1 Fc区。在一些实施方案中, 在体外, 抗CTLA4抗体ADCC活性的EC50是易普利单抗ADCC活性的EC50的50%或更小。用于测量ADCC活性的测定描述于实施例3和实施例15中。在一些实施方案中, 在小鼠癌症模型中, 相较于PBMC或脾, 抗CTLA4抗体选择性地使肿瘤微环境中的Treg细胞消减 (例如使肿瘤浸润性淋巴细胞中的Treg细胞的百分比降低)。参见例如实施例18。

[0011] 在可与任何先前实施方案组合的一些实施方案中, 抗体特异性结合包含在人CTLA4的配体结合位点诸如人CTLA4的CD80和/或CD86结合位点处的氨基酸残基的表位。在一些实施方案中, 抗体特异性结合与人CTLA4的配体结合位点诸如人CTLA4的CD80和/或CD86结合位点类似的表位。在一些实施方案中, 抗体特异性结合包含人CTLA4的氨基酸残基Y105和L106的表位, 其中氨基酸残基的编号根据SEQ ID NO: 207。在一些实施方案中, 抗体不结合人CTLA4的残基I108, 其中氨基酸残基的编号根据SEQ ID NO: 207。在一些实施方案中, 抗CTLA4抗体阻断CD80和/或CD86与人CTLA4的结合。在一些实施方案中, 对于阻断CD80和/或CD86与人CTLA4的结合, 抗CTLA4抗体具有的IC50高于易普利单抗的IC50。在一些实施方案中, 在用CD86或CD80进行板结合, 而CTLA4处于溶液或CTLA4展示在细胞表面上的测定中, 对于阻断CD80和/或CD86与人CTLA4的结合, 抗CTLA4抗体具有的IC50是易普利单抗的IC50的3.5倍或更高 (包括3.9倍或更高)。参见实施例13, 表23、图57A-图57D和图58。用于测试抗体的阻断活性 (配体竞争) 和IC50的测定描述于实施例3和实施例13中。

[0012] 在可与任何先前实施方案组合的一些实施方案中, 抗体包含重链可变区和轻链可

变区,a)其中所述重链可变区包含HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3,其中所述HVR-H1包含根据选自由以下组成的组的式的氨基酸序列:式(I):X1TFSX2YX3IHWV(SEQ ID NO:1),其中X1是F或Y,X2是D或G,并且X3是A、G或W;式(II):YSIX1SGX2X3WX4WI(SEQ ID NO:2),其中X1是S或T,X2是H或Y,X3是H或Y,并且X4是A、D或S;和式(III):FSLSTGGVAVX1WI(SEQ ID NO:3),其中X1是G或S;其中所述HVR-H2包含根据选自由以下组成的组的式的氨基酸序列:式(IV):IGX1IX2HSGSTYYX3SLKSRV(SEQ ID NO:4),其中X1是D或E,X2是S或Y,并且X3是P或Q;式(V):IGX1ISPSX2GX3TX4YAQKFQGRV(SEQ ID NO:5),其中X1是I或W,X2是G或S,X3是G或S,并且X4是K或N;和式(VI):VSX1ISGX2GX3X4TYYADSVKGRF(SEQ ID NO:6),其中X1是A、G或S,X2是S或Y,X3是G或S,并且X4是S或T;并且其中所述HVR-H3包含根据选自由以下组成的组的式的氨基酸序列:式(VII):ARX1X2X3X4FDX5(SEQ ID NO:7),其中X1是G、R或S,X2是A、I或Y,X3是D、V或Y,X4是A、E或Y,并且X5是I或Y;式(VIII):ARX1GX2GYFDX3(SEQ ID NO:8),其中X1是D或L,X2是F或Y,并且X3是V或Y;式(IX):ARX1X2X3X4AX5X6FDY(SEQ ID NO:9),其中X1是L或R,X2是I或P,X3是A或Y,X4是S或T,X5是T或Y,并且X6是A或Y;式(X):ARDX1X2X3GSSGYX4GFDX5(SEQ ID NO:10),其中X1是I或V,X2是A或H,X3是P或S,X4是D或Y,并且X5是F或V;并且b)其中所述轻链可变区包含HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3,其中所述HVR-L1包含根据选自由以下组成的组的式的氨基酸序列:式(XI):RASQX1X2X3SX4LX5(SEQ ID NO:11),其中X1是G或S,X2是I或V,X3是G或S,X4是S或Y,并且X5是A或N;式(XII):RASQX1VX2X3RX4LA(SEQ ID NO:12),其中X1是S或T,X2是F、R或S,X3是G或S,并且X4是F或Y;和式(XIII):RASX1SVDFX2GX3SFLX4(SEQ ID NO:13),其中X1是E或Q,X2是D、F、H或Y,X3是F、I或K,并且X4是A、D或H;其中所述HVR-L2包含根据式(XIV):X1ASX2X3X4X5GX6(SEQ ID NO:14)的氨基酸序列,其中X1是A或D,X2是N、S或T,X3是L或R,X4是A、E或Q,X5是S或T,并且X6是I或V;并且其中所述HVR-L3包含根据选自由以下组成的组的式的氨基酸序列:式(XV):YCX1X2X3X4X5X6PX7T(SEQ ID NO:15),其中X1是E、Q或V,X2是H或Q,X3是A、G、H、R或S,X4是D、L、S或Y,X5是E、G、P、Q或S,X6是L、T、V或W,并且X7是F、L、P、W或Y;式(XVI):YCQX1X2X3WPPWT(SEQ ID NO:16),其中X1是S或Y,X2是D或Y,并且X3是Q或Y;和式(XVII):YCQX1YX2SSPPX3YT(SEQ ID NO:17),其中X1是H或Q,X2是T或V,并且X3是E或V。在一些实施方案中,HVR-H1包含选自由SEQ ID NO:18-29组成的组的氨基酸序列,HVR-H2包含选自由SEQ ID NO:30-39组成的组的氨基酸序列,HVR-H3包含选自由SEQ ID NO:40-52组成的组的氨基酸序列,HVR-L1包含选自由SEQ ID NO:53-65组成的组的氨基酸序列,HVR-L2包含选自由SEQ ID NO:66-69组成的组的氨基酸序列,并且HVR-L3包含选自由SEQ ID NO:70-81组成的组的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体包含:a)含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-H2、含有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的HVR-H3、含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:66的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:70的氨基酸序列的HVR-L3;b)含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的HVR-H2、含有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的HVR-H3、含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:67的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:71的氨基酸序列的HVR-L3;c)含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的HVR-H2、含有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的HVR-H3、含有SEQ ID NO:55的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:66的氨基酸序列的

HVR-L2和含有SEQ ID NO:72的氨基酸序列的HVR-L3;d)含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的HVR-H2、含有SEQ ID NO:43的氨基酸序列的HVR-H3、含有SEQ ID NO:56的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:68的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:73的氨基酸序列的HVR-L3;e)含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的HVR-H2、含有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的HVR-H3、含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:66的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:74的氨基酸序列的HVR-L3;f)含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的HVR-H2、含有SEQ ID NO:45的氨基酸序列的HVR-H3、含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:66的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:75的氨基酸序列的HVR-L3;g)含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的HVR-H2、含有SEQ ID NO:46的氨基酸序列的HVR-H3、含有SEQ ID NO:59的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:66的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:76的氨基酸序列的HVR-L3;h)含有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的HVR-H2、含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-H3、含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:69的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:77的氨基酸序列的HVR-L3;i)含有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-H2、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-H3、含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:66的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:78的氨基酸序列的HVR-L3;j)含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的HVR-H2、含有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的HVR-H3、含有SEQ ID NO:62的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:67的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:79的氨基酸序列的HVR-L3;k)含有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-H2、含有SEQ ID NO:50的氨基酸序列的HVR-H3、含有SEQ ID NO:63的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:67的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:80的氨基酸序列的HVR-L3;l)含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的HVR-H2、含有SEQ ID NO:51的氨基酸序列的HVR-H3、含有SEQ ID NO:64的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:67的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:81的氨基酸序列的HVR-L3;或m)含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-H2、含有SEQ ID NO:52的氨基酸序列的HVR-H3、含有SEQ ID NO:65的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:68的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:77的氨基酸序列的HVR-L3。在可与任何先前实施方案组合的一些实施方案中,重链可变区包含选自由SEQ ID NO:82-94组成的组的氨基酸序列,和/或轻链可变区包含选自由SEQ ID NO:95-107组成的组的氨基酸序列。在可与任何先前实施方案组合的一些实施方案中,抗体包含:a)含有SEQ ID NO:82的氨基酸序列或其与SEQ ID NO:82的氨基酸序列具有至少约90% (例如至少约92%、95%、98%、99%或更大) 序列同一性的变体的重链可变区,以及含有SEQ ID NO:95的氨基酸序列或其与SEQ ID NO:95的氨基酸序列具有至少约90% (例如至少约92%、95%、98%、99%或更大) 序列同一性的变体的轻链可变区;b)含有SEQ ID NO:83的氨基酸序列或其与SEQ ID NO:83的氨基酸序列具有至少约90% (例如至少约92%、95%、98%、99%或更大) 序列同一性的变体的重链可变区,以及含有SEQ

ID NO:96的氨基酸序列或其与SEQ ID NO:96的氨基酸序列具有至少约90% (例如至少约92%、95%、98%、99%或更大) 序列同一性的变体的轻链可变区;c) 含有SEQ ID NO:84的氨基酸序列或其与SEQ ID NO:84的氨基酸序列具有至少约90% (例如至少约92%、95%、98%、99%或更大) 序列同一性的变体的重链可变区,以及含有SEQ ID NO:97的氨基酸序列或其与SEQ ID NO:97的氨基酸序列具有至少约90% (例如至少约92%、95%、98%、99%或更大) 序列同一性的变体的轻链可变区;d) 含有SEQ ID NO:85的氨基酸序列或其与SEQ ID NO:85的氨基酸序列具有至少约90% (例如至少约92%、95%、98%、99%或更大) 序列同一性的变体的重链可变区,以及含有SEQ ID NO:98的氨基酸序列或其与SEQ ID NO:98的氨基酸序列具有至少约90% (例如至少约92%、95%、98%、99%或更大) 序列同一性的变体的轻链可变区;e) 含有SEQ ID NO:86的氨基酸序列或其与SEQ ID NO:86的氨基酸序列具有至少约90% (例如至少约92%、95%、98%、99%或更大) 序列同一性的变体的重链可变区,以及含有SEQ ID NO:99的氨基酸序列或其与SEQ ID NO:99的氨基酸序列具有至少约90% (例如至少约92%、95%、98%、99%或更大) 序列同一性的变体的轻链可变区;f) 含有SEQ ID NO:87的氨基酸序列或其与SEQ ID NO:87的氨基酸序列具有至少约90% (例如至少约92%、95%、98%、99%或更大) 序列同一性的变体的重链可变区,以及含有SEQ ID NO:100的氨基酸序列或其与SEQ ID NO:100的氨基酸序列具有至少约90% (例如至少约92%、95%、98%、99%或更大) 序列同一性的变体的轻链可变区;g) 含有SEQ ID NO:88的氨基酸序列或其与SEQ ID NO:88的氨基酸序列具有至少约90% (例如至少约92%、95%、98%、99%或更大) 序列同一性的变体的重链可变区,以及含有SEQ ID NO:101的氨基酸序列或其与SEQ ID NO:101的氨基酸序列具有至少约90% (例如至少约92%、95%、98%、99%或更大) 序列同一性的变体的轻链可变区;h) 含有SEQ ID NO:89的氨基酸序列或其与SEQ ID NO:89的氨基酸序列具有至少约90% (例如至少约92%、95%、98%、99%或更大) 序列同一性的变体的重链可变区,以及含有SEQ ID NO:102的氨基酸序列或其与SEQ ID NO:102的氨基酸序列具有至少约90% (例如至少约92%、95%、98%、99%或更大) 序列同一性的变体的轻链可变区;i) 含有SEQ ID NO:90的氨基酸序列或其与SEQ ID NO:90的氨基酸序列具有至少约90% (例如至少约92%、95%、98%、99%或更大) 序列同一性的变体的重链可变区,以及含有SEQ ID NO:103的氨基酸序列或其与SEQ ID NO:103的氨基酸序列具有至少约90% (例如至少约92%、95%、98%、99%或更大) 序列同一性的变体的轻链可变区;j) 含有SEQ ID NO:91的氨基酸序列或其与SEQ ID NO:91的氨基酸序列具有至少约90% (例如至少约92%、95%、98%、99%或更大) 序列同一性的变体的重链可变区,以及含有SEQ ID NO:104的氨基酸序列或其与SEQ ID NO:104的氨基酸序列具有至少约90% (例如至少约92%、95%、98%、99%或更大) 序列同一性的变体的轻链可变区;k) 含有SEQ ID NO:92的氨基酸序列或其与SEQ ID NO:92的氨基酸序列具有至少约90% (例如至少约92%、95%、98%、99%或更大) 序列同一性的变体的重链可变区,以及含有SEQ ID NO:105的氨基酸序列或其与SEQ ID NO:105的氨基酸序列具有至少约90% (例如至少约92%、95%、98%、99%或更大) 序列同一性的变体的轻链可变区;l) 含有SEQ ID NO:93的氨基酸序列或其与SEQ ID NO:93的氨基酸序列具有至少约90% (例如至少约92%、95%、98%、99%或更大) 序列同一性的变体的重链可变区,以及含有SEQ ID NO:106的氨基酸序列或其与SEQ ID NO:106的氨基酸序列具有至少约90% (例如至少约92%、95%、98%、99%或更大) 序列同一性的变体的轻链可变区;或m) 含有SEQ

ID NO:94的氨基酸序列或其与SEQ ID NO:94的氨基酸序列具有至少约90% (例如至少约92%、95%、98%、99%或更大) 序列同一性的变体的重链可变区,以及含有SEQ ID NO:107的氨基酸序列或其与SEQ ID NO:107的氨基酸序列具有至少约90% (例如至少约92%、95%、98%、99%或更大) 序列同一性的变体的轻链可变区。

[0013] 在一些实施方案中,本文所述的抗CTLA4抗体包含重链可变区和轻链可变区,其中抗体的一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR包含表A中所示的HVR序列。在一些实施方案中,抗CTLA4抗体包含含有HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3的重链可变区,其中所述HVR-H1包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列,或所述HVR-H2包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列,或所述HVR-H3包含SEQ ID NO:45的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CTLA4抗体包含含有HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3的轻链可变区,其中所述HVR-L1包含SEQ ID NO:58的氨基酸序列,或所述HVR-L2包含SEQ ID NO:66的氨基酸序列,或所述HVR-L3包含SEQ ID NO:75的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体的HVR-H2包含SEQ ID NO:35的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗CTLA4抗体包含(a)重链可变区,所述重链可变区包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:45的氨基酸序列的HVR-H3,和/或轻链可变区,所述轻链可变区包含含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:66的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:75的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗体的HVR中的一者、两者、三者、四者、五者或六者可在HVR中包含一个、两个或三个保守性氨基酸取代。在一些实施方案中,抗CTLA4抗体包含(b)重链可变区,所述重链可变区包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列或与SEQ ID NO:87的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、95%、96%、97%、98%或99%) 序列同一性的氨基酸序列,和/或轻链可变区,所述轻链可变区包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列或与SEQ ID NO:100的氨基酸序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、95%、96%、97%、98%或99%) 序列同一性的氨基酸序列。

[0014] 在可与任何先前实施方案组合的一些实施方案中,抗体是抗体片段。在一些实施方案中,片段是Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv或scFv片段。在可与任何先前实施方案组合的一些实施方案中,抗体包含IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区(诸如人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4 Fc区)。在一些实施方案中,抗体包含人IgG1或具有增强的ADCC活性的变体。在一些实施方案中,抗体包含具有降低的海藻糖基化(或非海藻糖基化)的人IgG1。在一些实施方案中,抗体是人抗体。

[0015] 本公开的其他方面涉及一种与本文所述的任何抗体竞争或交叉竞争结合人CTLA4的抗体。本文还提供了与本文所述的任何抗体结合相同表位和/或基本上相同表位的抗体。

[0016] 本公开的其他方面涉及一种可活化抗体,所述可活化抗体包含:a)第一多肽,所述第一多肽从N末端至C末端包含掩蔽部分(MM)、可裂解部分(CM)和靶标结合部分(TBM),其中所述MM包含根据式(XVIII): $X_mCX_nCZ_o$ (SEQ ID NO:134)的氨基酸序列,其中m是2-10,n是3-10,并且o是1-10,其中每个X独立地是选自由A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W和Y组成的组的氨基酸,并且其中每个Z独立地是选自由D、A、Y、S、T、N、I、L、F、V、H和P组成的组的氨基酸;其中当所述CM未被裂解时,所述MM抑制所述可活化抗体与人CTLA4的结合;其中所述CM包含至少第一裂解位点;并且其中所述TBM包含抗体重链可变区(VH);和b)第二多肽,所述第二多肽包含抗体轻链可变区(VL);并且其中当所述CM被裂解时,所述可活化抗体

通过所述VH和所述VL结合人CTLA4。在一些实施方案中,m是3-10。

[0017] 本公开的其他方面涉及一种可活化抗体,所述可活化抗体包含:a)多肽,所述多肽从N末端至C末端包含掩蔽部分(MM)、可裂解部分(CM)和靶标结合部分(TBM),其中所述MM包含根据式(XVIII): $X_mCX_nCZ_o$ (SEQ ID NO:134)的氨基酸序列,其中m是2-10,n是3-10,并且o是1-10,其中每个X独立地是选自由A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W和Y组成的组的氨基酸,并且其中每个Z独立地是选自由D、A、Y、S、T、N、I、L、F、V、H和P组成的组的氨基酸;其中当所述CM未被裂解时,所述MM抑制所述可活化抗体与人CTLA4的结合;其中所述CM包含至少第一裂解位点;并且其中所述TBM包含抗体轻链可变区(VL);和b)第二多肽,所述第二多肽包含抗体重链可变区(VH);并且其中当所述CM被裂解时,所述可活化抗体通过所述VH和所述VL结合人CTLA4。在一些实施方案中,m是3-10。

[0018] 本公开的其他方面涉及一种可活化抗体,所述可活化抗体包含:多肽,所述多肽从N末端至C末端包含掩蔽部分(MM)、可裂解部分(CM)和靶标结合部分(TBM),其中所述MM包含根据式(XVIII): $X_mCX_nCZ_o$ (SEQ ID NO:134)的氨基酸序列,其中m是2-10,n是3-10,并且o是1-10,其中每个X独立地是选自由A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W和Y组成的组的氨基酸,并且其中每个Z独立地是选自由D、A、Y、S、T、N、I、L、F、V、H和P组成的组的氨基酸;其中当所述CM未被裂解时,所述MM抑制所述可活化抗体与人CTLA4的结合;其中所述CM包含至少第一裂解位点;其中所述TBM从N末端至C末端包含抗体轻链可变区(VL)和抗体重链可变区(VH);并且其中当所述CM被裂解时,所述可活化抗体通过所述VH和所述VL结合人CTLA4。在一些实施方案中,m是3-10。

[0019] 本公开的其他方面涉及一种可活化抗体,所述可活化抗体包含:多肽,所述多肽从N末端至C末端包含掩蔽部分(MM)、可裂解部分(CM)和靶标结合部分(TBM),其中所述MM包含根据式(XVIII): $X_mCX_nCZ_o$ (SEQ ID NO:134)的氨基酸序列,其中m是2-10,n是3-10,并且o是1-10,其中每个X独立地是选自由A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W和Y组成的组的氨基酸,并且其中每个Z独立地是选自由D、A、Y、S、T、N、I、L、F、V、H和P组成的组的氨基酸;其中当所述CM未被裂解时,所述MM抑制所述可活化抗体与人CTLA4的结合;其中所述CM包含至少第一裂解位点;其中所述TBM从N末端至C末端包含抗体重链可变区(VH)和抗体轻链可变区(VL);并且其中当所述CM被裂解时,所述可活化抗体通过所述VH和所述VL结合人CTLA4。

[0020] 在根据以上所述的可活化抗体中的任一者的一些实施方案中,m是2、3、4、5或6。在一些实施方案中,m是6。在一些实施方案中,n是6-8。在一些实施方案中,n是6。在一些实施方案中,o是1-2。在一些实施方案中,o是2。在可与任何先前实施方案组合的一些实施方案中,每个X不是M、W或C。在可与任何先前实施方案组合的一些实施方案中,式(XVIII)的 X_m 中的每个X独立地是选自由D、A、Y、S、T、N、I、L、F、V、H和P组成的组的氨基酸。在可与任何先前实施方案组合的一些实施方案中,式(XVIII)的 X_n 中的每个X独立地是选自由D、A、Y、S、T、N、I、L、F、V、H和P组成的组的氨基酸。在一些实施方案中,MM包含选自由 $X_mCPDHPYPCXX$ (SEQ ID NO:181)、 $X_mCDAFYPCXX$ (SEQ ID NO:182)、 $X_mCDSHPYPCXX$ (SEQ ID NO:183)和 $X_mCVPYYACXX$ (SEQ ID NO:184)组成的组的氨基酸序列,其中m是2-10,并且其中每个X独立地是选自由A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W和Y组成的组的氨基酸。在一些实施方案中,每个X不是M、W或C。在一些实施方案中,每个X独立地是选自由D、A、Y、S、T、N、I、L、F、V、H和P组成的

组的氨基酸。在可与任何先前实施方案组合的一些实施方案中,掩蔽部分(MM)包含选自SEQ ID NO:141-147的氨基酸序列。在可与任何先前实施方案组合的一些实施方案中,MM还在它的N末端包含额外氨基酸序列。在一些实施方案中,额外氨基酸序列包括SEQ ID NO:148的氨基酸序列。

[0021] 在可与任何先前实施方案组合的一些实施方案中,第一裂解位点是选自由以下组成的组的蛋白酶的蛋白酶裂解位点:尿激酶型纤维蛋白溶酶原活化因子(urokinase-type plasminogen activator,uPA)、基质金属蛋白酶-1(matrix metalloproteinase-1,MMP-1)、MMP-2、MMP-3、MMP-8、MMP-9、MMP-14、烟草蚀刻病毒(Tobacco Etch Virus,TEV)蛋白酶、纤维蛋白溶酶(plasmin)、凝血酶(Thrombin)、因子X、PSA、PSMA、组织蛋白酶D(Cathepsin D)、组织蛋白酶K、组织蛋白酶S、ADAM10、ADAM12、ADAMTS、卡斯卡酶-1(Caspase-1)、卡斯卡酶-2、卡斯卡酶-3、卡斯卡酶-4、卡斯卡酶-5、卡斯卡酶-6、卡斯卡酶-7、卡斯卡酶-8、卡斯卡酶-9、卡斯卡酶-10、卡斯卡酶-11、卡斯卡酶-12、卡斯卡酶-13、卡斯卡酶-14和TACE。在可与任何先前实施方案组合的一些实施方案中,CM还在第一裂解位点的C末端包含第一接头(L₁)。在一些实施方案中,L₁包含选自由SEQ ID NO:156-163组成的组的氨基酸序列。在可与任何先前实施方案组合的一些实施方案中,CM还包含第二裂解位点。在一些实施方案中,第二裂解位点在L₁的C末端。在一些实施方案中,第二裂解位点是选自由以下组成的组的蛋白酶的蛋白酶裂解位点:尿激酶型纤维蛋白溶酶原活化因子(uPA)、基质金属蛋白酶-1(MMP-1)、MMP-2、MMP-3、MMP-8、MMP-9、MMP-14、烟草蚀刻病毒(TEV)蛋白酶、纤维蛋白溶酶、凝血酶、因子X、PSA、PSMA、组织蛋白酶D、组织蛋白酶K、组织蛋白酶S、ADAM10、ADAM12、ADAMTS、卡斯卡酶-1、卡斯卡酶-2、卡斯卡酶-3、卡斯卡酶-4、卡斯卡酶-5、卡斯卡酶-6、卡斯卡酶-7、卡斯卡酶-8、卡斯卡酶-9、卡斯卡酶-10、卡斯卡酶-11、卡斯卡酶-12、卡斯卡酶-13、卡斯卡酶-14和TACE。在一些实施方案中,第一裂解位点和第二裂解位点是不同的。在可与任何先前实施方案组合的一些实施方案中,CM还在第二裂解位点的C末端包含第二接头(L₂)。在一些实施方案中,L₂包含选自由SEQ ID NO:156-163组成的组的氨基酸序列。在可与任何先前实施方案组合的一些实施方案中,CM还在第一裂解位点的N末端包含第三接头(L₃)。在可与任何先前实施方案组合的一些实施方案中,CM包含至少第一蛋白酶裂解位点,并且以一种或多种选自由以下组成的组的蛋白酶加以裂解:尿激酶型纤维蛋白溶酶原活化因子(uPA)、基质金属蛋白酶-1(MMP-1)、MMP-2、MMP-3、MMP-8、MMP-9、MMP-14、烟草蚀刻病毒(TEV)蛋白酶、纤维蛋白溶酶、凝血酶、因子X、PSA、PSMA、组织蛋白酶D、组织蛋白酶K、组织蛋白酶S、ADAM10、ADAM12、ADAMTS、卡斯卡酶-1、卡斯卡酶-2、卡斯卡酶-3、卡斯卡酶-4、卡斯卡酶-5、卡斯卡酶-6、卡斯卡酶-7、卡斯卡酶-8、卡斯卡酶-9、卡斯卡酶-10、卡斯卡酶-11、卡斯卡酶-12、卡斯卡酶-13、卡斯卡酶-14和TACE。

[0022] 在可与任何先前实施方案组合的一些实施方案中,可活化抗体包含含有根据式(XXIX):EVGSYX₁X₂X₃X₄X₅X₆CX₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂CX₁₃X₁₄SGRSAGGGGTENLYFQSGGS(SEQ ID NO:164)的氨基酸序列的掩蔽部分(MM)和可裂解部分(CM),其中X₁是A、D、I、N、P或Y,X₂是A、F、N、S或V,X₃是A、H、L、P、S、V或Y,X₄是A、H、S或Y,X₅是A、D、P、S、V或Y,X₆是A、D、L、S或Y,X₇是D、P或V,X₈是A、D、H、P、S或T,X₉是A、D、F、H、P或Y,X₁₀是L、P或Y,X₁₁是F、P或Y,X₁₂是A、P、S或Y,X₁₃是A、D、N、S、T或Y,并且X₁₄是A、S或Y。在可与任何先前实施方案组合的一些实施方案中,可活化抗体包含选自由SEQ ID NO:165-179组成的组的氨基酸序列

[0023] 在可与任何先前实施方案组合的一些实施方案中,VL包含含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:66的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:75的氨基酸序列的HVR-L3。在可与任何先前实施方案组合的一些实施方案中,VL包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列,或其与SEQ ID NO:100的氨基酸序列具有至少约90% (例如至少约92%、95%、98%、99%或更大) 序列同一性的变体。在可与任何先前实施方案组合的一些实施方案中,VH包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的HVR-H2和含有SEQ ID NO:45的氨基酸序列的HVR-H3。在可与任何先前实施方案组合的一些实施方案中,VH包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列,或其与SEQ ID NO:87的氨基酸序列具有至少约90% (例如至少约92%、95%、98%、99%或更大) 序列同一性的变体。

[0024] 本公开的其他方面涉及一种包含本文所述的任何抗体和/或可活化抗体以及药学上可接受的载体的药物组合物。

[0025] 本公开的其他方面涉及编码本文所述的任何抗体和/或可活化抗体的多核苷酸。在一些实施方案中,多核苷酸包含选自SEQ ID NO:108-133的序列。

[0026] 本公开的其他方面涉及一种包含本文所述的任何多核苷酸的载体。在一些实施方案中,载体是表达载体和/或展示载体。

[0027] 本公开的其他方面涉及一种包含本文所述的任何多核苷酸和/或载体的宿主细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是真核细胞。在一些实施方案中,宿主细胞是中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。

[0028] 本公开的其他方面涉及一种制备抗体或可活化抗体的方法,所述方法包括在适于产生所述抗体或可活化抗体的条件下培养本文所述的任何宿主细胞。在一些实施方案中,方法还包括回收由细胞产生的抗体或可活化抗体。

[0029] 本公开的其他方面涉及一种治疗有需要的受试者的癌症或延迟所述癌症的进展的方法,所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文所述的任何抗体、可活化抗体和/或药物组合物。在一些实施方案中,癌症是肝癌、消化系统癌症(例如结肠癌、结肠直肠癌)、肺癌、骨癌、心脏癌、脑癌、肾癌、膀胱癌、血液癌症(例如白血病)、皮肤癌、乳腺癌、甲状腺癌、胰腺癌、头部和/或颈部癌症、眼相关癌症、男性生殖系统癌症(例如前列腺癌、睾丸癌)或女性生殖系统癌症(例如子宫癌、子宫颈癌)。本公开的其他方面涉及一种使有需要的受试者中的实体肿瘤的尺寸降低的方法,其中所述实体肿瘤具有约400-1000mm³的尺寸,所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文所述的任何抗体、可活化抗体和/或药物组合物。在一些实施方案中,实体肿瘤具有约400-800mm³的尺寸。在一些实施方案中,方法还包括向受试者施用有效量的至少一种额外治疗剂。在一些实施方案中,至少一种额外治疗剂选自由病毒基因疗法、免疫检查点抑制剂、靶向疗法、放射疗法、疫苗接种疗法和化学疗法组成的组。在一些实施方案中,至少一种额外治疗剂选自由以下组成的组:泊马莱斯特(pomalyst)、雷利米德(revlimid)、来那度胺(lenalidomide)、泊马度胺(pomalidomide)、沙利度胺(thalidomide)、DNA烷基化含铂衍生物顺铂(cisplatin)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、抗CD137抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、抗CD20抗体、抗CD40抗体、抗DR5抗体、抗CD1d抗体、抗TIM3抗体、抗SLAMF7抗体、抗KIR受体抗体、抗OX40抗体、抗HER2抗体、抗ErbB-2抗体、抗EGFR抗体、西妥昔单抗(cetuximab)、利妥昔单抗(rituximab)、曲妥珠单抗(trastuzumab)、帕母单抗(pembrolizumab)、放射疗法、单次剂量

放射、分次放射、局灶性放射、全器官放射、IL-12、IFN α 、GM-CSF、嵌合抗原受体、继承性转移的T细胞、抗癌疫苗和溶瘤性病毒。在一些实施方案中,方法包括在用以移除受试者中的肿瘤的手术之前或在所述手术之后向受试者施用有效量的本文所述的抗CTLA4抗体、可活化抗体或药物组合物。在一些实施方案中,抗CD137抗体包含抗体重链可变区,所述抗体重链可变区包含含有氨基酸序列FSLSTGGVGVGWI (SEQ ID NO:223)的HVR-H1、含有氨基酸序列LALIDWADDKYYSPSLKSRL (SEQ ID NO:224)的HVR-H2和含有氨基酸序列ARGGSDTVIGDWFAY (SEQ ID NO:225)的HVR-H3,以及抗体轻链可变区,所述抗体轻链可变区包含含有氨基酸序列RASQSIGSYLA (SEQ ID NO:226)的HVR-L1、含有氨基酸序列DASNLETGV (SEQ ID NO:227)的HVR-L2和含有氨基酸序列YCQGGYYLWT (SEQ ID NO:228)的HVR-L3。在一些实施方案中,抗CD137抗体包含抗体重链可变区,所述抗体重链可变区包含SEQ ID NO:229的氨基酸序列或与SEQ ID NO:229的序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)序列同一性的序列;和/或抗体轻链可变区,所述抗体轻链可变区包含SEQ ID NO:230的氨基酸序列或与SEQ ID NO:230的序列具有至少90% (例如91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)序列同一性的序列。

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSLSSTGGVGVGWIRQAPGKGLEWLALIDWAD
DKYYSPSLKSRLTISRDN SKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCARGGSDTVIGDWFAYWG

[0030] QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 229)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSIGSYLAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQGGYYLWTFGQGTKVEIK (SEQ ID NO: 230)

[0031] 应了解,以上以及本文中所述的各种实施方案的性质中的一者、一些或全部可加以组合以形成本公开的其他实施方案。本公开的这些和其他方面将变得为本领域技术人员显而易见。本公开的这些和其他实施方案通过随后具体实施方式来进一步描述。

附图说明

[0032] 图1A-图1B显示抗体与CTLA4的结合,如通过ELISA所测定。图1A显示所指示抗体与人CTLA4的结合。图1B显示所指示抗体与犬CTLA4的结合。

[0033] 图2显示所指示抗体、同种型对照、或媒介物(PBSA)与短暂过度表达空载体(pIRES)、或小鼠或人CTLA4的HEK293F细胞的物种交叉反应性,如通过流式细胞计量术所测定。

[0034] 图3显示抗体TY21580或同种型对照与活化的人、猴和小鼠T细胞的结合,如通过流式细胞计量术所测定。

[0035] 图4A-图4C显示抗体对CTLA4的特异性,如通过流式细胞计量术所测定。图4A显示所指示抗体或同种型对照与短暂过度表达人PD-1、CTLA4、LAG3、TIM3、B7-H3或空载体(293F)的HEK293F细胞的结合。图4B显示所指示抗体、同种型对照或媒介物(PBSA)与短暂过度表达人CD95、CD120a、OX40、CD40、CTLA4或空载体(pIRES)的HEK293F细胞的结合。图4C显示所指示抗体、同种型对照或媒介物(PBSA)与短暂过度表达人TIM3、CTLA4、PD-L1、LAG3、BTLA、VISTA、PD-L2、ICOS、B7-H4、PD-1、B7-H3或空载体(pIRES)的HEK293F细胞的结合。

[0036] 图5A-图5D显示抗体的阻断能力,如通过ELISA所测定。图5A显示抗体TY21687、TY21689、TY21680和TY21691阻断人CD80与人CTLA4的结合的能力。图5B显示抗体TAC2114、

TY21585、TY21587、TY21588、TY21589、TY21580和TY21591阻断人CD80与人CTLA4的结合的能力。图5C显示抗体TY21687、TY21689、TY21680和TY21691阻断人CD86与人CTLA4的结合的能力。图5D显示抗体TAC2114、TY21585、TY21587、TY21588、TY21589、TY21580和TY21591阻断人CD86与人CTLA4的结合的能力。

[0037] 图6A-图6B显示抗体的阻断能力,如通过FACS所测定。图6A显示所指示抗体、同种型对照或媒介物(PBSA)阻断人CD80与短暂过度表达人CTLA4的HEK293F细胞的结合的能力。图6B显示所指示抗体、同种型对照或媒介物(PBSA)阻断人CD86与短暂过度表达人CTLA4的HEK293F细胞的结合的能力。

[0038] 图7显示所指示抗体结合FcRn的能力,如通过表面等离子体共振 (SPR) 所测定。

[0039] 图8A-图8B显示由抗体TY21580或同种型对照达成的人外周血液单核细胞 (PBMC) 活化,如通过ELISA所测量。图8A显示对从用抗体TY21580或同种型对照处理的CD3受刺激人PBMC进行的IL-2分泌的影响。图8B显示对从用抗体TY21580或同种型对照处理的CD3受刺激人PBMC进行的IFN γ 分泌的影响。

[0040] 图9显示在存在或不存在抗CD3抗体下,对从用抗体TY21580处理的人PBMC进行的IL-2分泌的影响,如通过ELISA所测量。

[0041] 图10显示对在用抗体TY21580、同种型对照或抗PD-1抗体处理的情况下,由人树突细胞 (DC) 与同种异体CD4⁺ T细胞共培养获得的IFN γ 分泌的影响,如通过ELISA所测量。

[0042] 图11A-图11B显示示例性抗体对短暂过度表达人CTLA4的HEK293F细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC) 活性,如通过乳酸脱氢酶 (LDH) 释放测定所测定。图11A显示抗体TY21580或同种型对照对短暂过度表达人CTLA4,并且与人天然杀伤 (NK) 细胞一起孵育的HEK293F细胞的ADCC活性。图11B显示抗体TY21580、TAC2114或同种型对照对短暂过度表达人CTLA4,并且与人NK细胞一起孵育的HEK293F细胞的ADCC活性。

[0043] 图12A-图12B显示示例性抗体对从两个供者分离的人Treg的ADCC活性,如通过钙黄绿素-AM(calcein-AM) 释放测定所测定。图12A显示抗体TY21580、TAC2114或同种型对照对与人NK细胞一起孵育的人Treg细胞(来自供者#96)的ADCC活性。图12B显示抗体TY21580、TAC2114或同种型对照对与人NK细胞一起孵育的人Treg细胞(来自供者#12)的ADCC活性。

[0044] 图13显示抗体TY21580或同种型对照对短暂过度表达人CTLA4的HEK293F细胞的补体依赖性细胞毒性 (CDC) 活性,如通过钙黄绿素-AM释放测定所测定。

[0045] 图14显示抗体TY21580或同种型对照对活化的人CD4⁺ T细胞的CDC活性,如通过钙黄绿素-AM释放测定所测定。

[0046] 图15A-图15C显示抗体TY21580或同种型对照在MC38同种同基因小鼠结肠直肠癌模型中的体内抗肿瘤功效。图15A显示携带经MC38建立肿瘤的雌性C57BL/6小鼠的不同治疗组的肿瘤生长曲线。数据点代表组平均值;误差棒代表SEM。图15B显示每个测试组的单个肿瘤生长曲线。图15C显示指示针对MC38肿瘤细胞的免疫性的持久记忆的再激发研究。

[0047] 图16显示抗体TY21580或同种型对照在CT26同种同基因小鼠结肠直肠癌模型中的体内抗肿瘤功效。显示了携带经CT26建立肿瘤的雌性C57BL/6小鼠的不同治疗组的肿瘤生长曲线。数据点代表组平均值;误差棒代表SEM。

[0048] 图17显示抗体TY21586、TY21580或同种型对照在H22同种同基因小鼠肝肿瘤模型中的体内抗肿瘤功效。显示了携带经H22建立肿瘤的雌性C57BL/6小鼠的不同治疗组的肿瘤

生长曲线。数据点代表组平均值；误差棒代表SEM。

[0049] 图18显示抗体TY21580、TY21687、TY21687、TY21691和TY21580或同种型对照在路易斯 (Lewis) 同种同基因小鼠肺肿瘤模型中的体内抗肿瘤功效。显示了携带经路易斯细胞建立肿瘤的雌性C57BL/6小鼠的不同治疗组的肿瘤生长曲线。数据点代表组平均值；误差棒代表SEM。

[0050] 图19显示抗体TY21580或同种型对照在PAN02同种同基因小鼠胰腺肿瘤模型中的体内抗肿瘤功效。显示了携带经PAN02建立肿瘤的雌性C57BL/6小鼠的不同治疗组的肿瘤生长曲线。数据点代表组平均值；误差棒代表SEM。

[0051] 图20A-图20B显示抗体TY21580、抗CD137抗体或同种型对照的单药疗法以及TY21580+抗CD137抗体组合疗法在3LL同种同基因小鼠肺肿瘤模型中的体内抗肿瘤功效。图20A显示携带经3LL建立肿瘤的雌性C57BL/6小鼠的不同治疗组的肿瘤生长曲线。数据点代表组平均值；误差棒代表SEM。图20B显示每个测试组的单个肿瘤生长曲线。

[0052] 图21显示指示针对H22小鼠肝肿瘤细胞的免疫性的持久记忆的再激发研究。在第59天用H22肿瘤细胞在相对的侧腹处对TY21580治疗组中具有完全响应的小鼠进行皮下再激发。同时还用H22肿瘤细胞接种原初小鼠。

[0053] 图22显示在10mg/kg的浓度下向雌性BALB/c小鼠静脉内施用的所指示抗体的血液浓度的时程，如通过ELISA所测定。

[0054] 图23显示在10mg/kg的浓度下在食蟹猴中静脉内施用的所指示抗体的血液浓度的时程，如通过ELISA所测定。

[0055] 图24显示在10mg/kg的浓度下在食蟹猴中静脉内施用的所指示抗体的血液浓度的时程与抗药物抗体 (ADA) 在这些猴中的出现的比较，如通过ELISA所测定。

[0056] 图25A-图25B显示在重复腹膜内施用抗体TY21580或媒介物对照之后，雄性和雌性BALB/c小鼠的平均脾重量。图25A显示在于第1、4、7和11天重复腹膜内施用抗体TY21580或媒介物对照之后，雄性BALB/c小鼠的平均脾重量。图25B显示在于第1、4、7和11天重复腹膜内施用抗体TY21580或媒介物对照之后，雌性BALB/c小鼠的平均脾重量。

[0057] 图26显示在于第1、4、7和11天重复腹膜内施用抗体TY21580或媒介物对照之后，BALB/c小鼠的组织病理学。

[0058] 图27A-图27B显示在高浓度下储存之后，示例性抗体的稳定性。图27A显示在 $>100\text{mg/mL}$ 下储存之后，抗体TY21586的尺寸排阻色谱 (SEC) 概况。图27B显示在 $>100\text{mg/mL}$ 下储存之后，抗体TY21580的SEC概况。

[0059] 图28显示在加速应激条件下，示例性抗体的SEC概况。

[0060] 图29显示使用抗CTLA4抗体的在酵母表面上展示的Fab片段进行的自阻断肽选择过程的示意图。

[0061] 图30显示使用抗CTLA4抗体的在酵母表面上展示的scFv片段进行的自阻断肽选择过程的示意图。

[0062] 图31A-图31B显示靶向CTLA4的Fab和scFv在酵母上的功能性展示，如通过流式细胞计量术所测定。图31A显示靶向CTLA4的Fab在酵母的表面的功能性展示。图31B显示靶向CTLA4的scFv在酵母的表面的功能性展示。

[0063] 图32显示对靶向人CTLA4的可活化抗体的一示例性选择过程。使展示融合蛋白的

酵母文库经受若干轮基于FACS的筛选。

[0064] 图33A-图33B显示示例性CTLA4可活化抗体克隆的CTLA4结合亲和力,如通过流式细胞计量术所测定。图33A显示相较于靶标抗体的不具有掩蔽肽的scFv片段,呈scFv形式的CTLA4可活化抗体克隆的结合亲和力,包括CTLA4可活化抗体克隆B13287的掩蔽肽保持完整的情况,或掩蔽肽由TEV蛋白酶裂解的情况。图33B显示相较于靶标抗体的不具有掩蔽肽的Fab片段,呈Fab形式的CTLA4可活化抗体克隆的CTLA4结合亲和力,包括CTLA4可活化抗体克隆B13189的掩蔽肽保持完整的情况,或掩蔽肽由TEV蛋白酶裂解的情况。

[0065] 图34A-图34B显示相较于亲本抗体TY21580,示例性CTLA4可活化抗体TY22401、TY22403、TY22402和TY22404的掩蔽效率。图34A显示相较于亲本抗体TY21580,所指示可活化抗体的缔合和解离曲线,如通过ForteBio系统所测定。图34B显示相较于亲本抗体TY21580,结合的可活化抗体的相对比率的图。

[0066] 图35A-图35B显示针对重组人CTLA4-Fc的示例性CTLA4可活化抗体的掩蔽效率,如通过ELISA所测定。图35A显示指示相较于亲本抗体TY21580,CTLA4可活化抗体TY22401、TY22402、TY22403、TY22404与重组人CTLA4-Fc的结合的第一批ELISA数据。图35B显示相较于亲本抗体TY21580,CTLA4可活化抗体TY22563、TY22564、TY22565、TY22566与重组人CTLA4-Fc的结合。

[0067] 图36A-图36B显示在移除掩蔽肽后,CTLA4可活化抗体TY22404的活性。图36A显示不进行处理,用蛋白酶uPA处理,或用5或10单位的蛋白酶MMP-9处理的可活化抗体TY22404的SDS-PAGE结果。图36B显示相较于亲本抗体TY21580,不进行处理,用蛋白酶uPA处理,或用蛋白酶MMP-9处理的可活化抗体TY22404的结合,通过ELISA所测定。

[0068] 图37A-图37C显示在加速应激条件下,示例性可活化抗体的尺寸排阻色谱(SEC)概况。图37A显示相较于对照条件,在六个冷冻和解冻循环之后,可活化抗体TY22402的SEC概况。图37B显示相较于对照条件,在50℃下七天之后,可活化抗体TY22402的SEC概况。图37C显示相较于对照条件,在50℃下七天之后,在40℃下储存多达28天之后,或在六个冷冻和解冻循环之后,示例性可活化抗体的SEC主峰面积的百分比。

[0069] 图38显示在约8mg/mL下或在>150mg/mL下储存之后,可活化抗体TY22401和TY22402的SEC主峰面积的百分比。

[0070] 图39显示在pH 3.7下孵育30分钟或在pH 3.7下孵育1小时的未处理可活化抗体TY21580、TY22401、TY22402和TY22566的掩蔽效率,如通过ForteBio系统所测定。

[0071] 图40A-图40B显示由同种型对照抗体、亲本抗体TY21580或示例性CTLA4可活化抗体TY22401、TY22402或TY22404达成的人外周血液单核细胞(PBMC)活化,如通过ELISA所测量。图40A显示对从用同种型对照抗体、亲本抗体TY21580和示例性CTLA4可活化抗体TY22401、TY22402或TY22404刺激的CD3经致敏人PBMC进行的IL-2分泌的影响。图40B显示对从用同种型对照抗体、亲本抗体TY21580和示例性CTLA4可活化抗体TY22401、TY22402或TY22404刺激的CD3经致敏人PBMC进行的IFN γ 分泌的影响。

[0072] 图41显示同种型对照抗体、亲本抗体TY21580或示例性可活化抗体TY22401、TY21580或TY22404对短暂过度表达人CTLA4的HEK293F细胞的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)活性,如通过ADCC报告基因测定所测定。

[0073] 图42A-图42B显示亲本抗体TY21580、同种型对照抗体或示例性CTLA4可活化抗体

TY22401、TY22402或TY22566在MC38同种同基因小鼠结肠直肠肿瘤模型中的体内抗肿瘤功效。图42A显示携带经MC38建立肿瘤的雌性C57BL/6小鼠的不同治疗组的肿瘤生长曲线。数据点代表组平均值；误差棒代表SEM。图42B显示用TY21580、TY22401、TY22402和TY22566治疗的组的单个肿瘤生长曲线。

[0074] 图43显示同种型对照抗体、亲本抗体TY21580或三种可活化抗体中的一者在CT26同种同基因小鼠结肠直肠肿瘤模型中的体内抗肿瘤功效。显示了携带经CT26建立肿瘤的雌性C57BL/6小鼠的不同治疗组的肿瘤生长曲线。数据点代表组平均值；误差棒代表SEM。

[0075] 图44显示同种型对照抗体、亲本抗体TY21580或三种可活化抗体中的一者在H22同种同基因小鼠肝肿瘤模型中的体内抗肿瘤功效。显示了携带经H22建立肿瘤的雌性C57BL/6小鼠的不同治疗组的肿瘤生长曲线。数据点代表组平均值；误差棒代表SEM。

[0076] 图45A-图45B显示亲本抗体TY21580、同种型对照抗体和示例性可活化抗体TY22401、TY22402或TY22566在3LL同种同基因小鼠肺肿瘤模型中的体内抗肿瘤功效。图45A显示携带经3LL建立肿瘤的雌性C57BL/6小鼠的不同治疗组的肿瘤生长曲线。数据点代表组平均值；误差棒代表SEM。图45B显示用TY21580、TY22401、TY22402和TY22566治疗的组的单个肿瘤生长曲线。

[0077] 图46A-图46C显示在10mg/kg的浓度下向雌性BALB/c小鼠静脉内施用的测试物品(TA)的血液浓度的时程,如通过ELISA所测定。图46A显示相较于亲本抗体TY21580,在10mg/kg的浓度下向雌性BALB/c小鼠静脉内施用的可活化抗体TY22401的血液浓度的时程。图46B显示相较于亲本抗体TY21580,在10mg/kg的浓度下向雌性BALB/c小鼠静脉内施用的可活化抗体TY22402的血液浓度的时程。图46C显示相较于亲本抗体TY21580,在10mg/kg的浓度下向雌性BALB/c小鼠静脉内施用的可活化抗体TY22404的血液浓度的时程。

[0078] 图47显示使用NOD小鼠模型,同种型对照抗体、亲本抗体TY21580和示例性可活化抗体TY22566、TY22401和TY22402的重复给药毒性。显示了每个处理组的历经20天的存活率百分比。

[0079] 图48A-图48C显示在重复腹膜内施用所指示可活化抗体之后,BALB/c小鼠的平均脾重量。图48A显示在于第1、4、7和11天重复腹膜内施用可活化抗体TY22402、亲本抗体TY21580或同种型对照之后,BALB/c小鼠的平均脾重量。图48B显示在于第1、4、7和11天重复腹膜内施用可活化抗体TY22566、亲本抗体TY21580或同种型对照之后,BALB/c小鼠的平均脾重量。图48C显示在于第1、4、7和11天重复腹膜内施用可活化抗体TY22401、亲本抗体TY21580或同种型对照之后,BALB/c小鼠的平均脾重量。

[0080] 图49显示相较于对照条件,在50℃下七天之后,所指示可活化抗体的尺寸排阻色谱(SEC)概况。

[0081] 图50显示相较于对照条件,在40℃下储存7、14、21或28天之后,所指示可活化抗体的尺寸排阻色谱(SEC)概况。

[0082] 图51显示相较于对照条件,在六个冷冻和解冻循环之后,所指示可活化抗体的尺寸排阻色谱(SEC)概况。

[0083] 图52显示在>115mg/mL下储存之后,所指示可活化抗体的SEC主峰比率的百分比。

[0084] 图53显示稳定性数据的概述。

[0085] 图54描绘人和小鼠CTLA4的一部分的多重序列比对,其中定位了人CTLA4与CD80、

CD86或易普利单抗(基于两个晶体结构)中的一者之间的接触残基。接触氨基酸以灰色加以阴影化,关键接触氨基酸加以框示,二聚体界面氨基酸用点指示,并且对在小鼠CTLA4与人CTLA4之间不同的氨基酸加下划线并用粗体表示。从上部至下部,所示序列由SEQ ID NO: 203-208代表。

[0086] 图55A描绘人CTLA4与它的配体CD80之间的相互作用。图55B描绘人CTLA4与它的配体CD86之间的相互作用。图55C描绘人CTLA4与小鼠CTLA4之间的结构比对。人CTLA4以黑色着色,小鼠CTLA4以白色着色。

[0087] 图56A-图56E描绘来自表位定位实验的结果,显示的是根据流式细胞计量术的TY21580(图56A)、易普利单抗(图56B)、人CD80(图56C)、人CD86(图56D)和小鼠CD86(图56E)与人CTLA4、小鼠CTLA4和CTLA4突变体的结合能力。

[0088] 图57A-图57D描绘TY21580和易普利单抗对人CTLA4与CD80或CD86之间的受体-配体结合阻断的影响。图57A和图57B显示在TY21580、易普利单抗或同种型对照抗体的连续稀释液存在下,人CD80(图57A)或CD86(图57B)与板结合的人重组CTLA4蛋白的结合曲线,如通过ELISA所测量。图57C-图57D显示在TY21580、易普利单抗或同种型对照抗体的连续稀释液存在下,人重组CTLA4蛋白与板结合的人CD80(图57C)或CD86(图57D)的结合曲线,如通过ELISA所测量。

[0089] 图58描绘由抗CTLA4抗体对CD28路径达成的CTLA4阻断介导的报告体信号传导活化。在连续稀释的抗CTLA4抗体存在下共培养Jurkat/CTLA4和aAPC/Raji细胞,其中人IgG1抗HEL抗体作为同种型对照。在过夜孵育之后,用Bio-荧光素酶底物测量发光信号,并且相对于空白对照使相对荧光素酶单位(RLU)归一化。结果表示为平均RLU倍数 $\pm$ SEM。一式三份进行实验。注意:当拟合曲线时,TY21580的最高浓度(500 μ g/mL)的数据点从分析排除,因为此时观察到明显钩状效应。

[0090] 图59描绘由抗CTLA4抗体达成的ADCC报告体信号传导活化。在连续稀释的抗CTLA4抗体存在下共培养Jurkat/NFAT-Luc/CD16细胞和HEK293F/hCTLA4细胞,其中人IgG1抗HEL抗体作为同种型对照。在孵育6小时之后,用ONE-Glo荧光素酶底物测量发光信号。相对于空白对照使相对荧光素酶单位(RLU)归一化,并且结果表示为平均RLU $\pm$ SEM。一式三份进行实验。

[0091] 图60A和图60B描绘用抗CTLA4抗体治疗的携带MC38肿瘤的小鼠的肿瘤生长曲线。图60A描绘用同种型对照抗体(1mg/kg, BIW)、TY21580(1mg/kg或0.2mg/kg, BIW)或易普利单抗(1mg/kg或0.2mg/kg, BIW)治疗的携带MC38肿瘤的小鼠中随时间的组平均肿瘤生长。数据点代表平均值;误差棒代表平均值标准误差(SEM)。图60B描绘用同种型对照抗体(组-1)、TY21580(组-2和组-3)或易普利单抗(组-4和组-5)治疗的单个携带MC38肿瘤的小鼠中随时间的肿瘤生长。

[0092] 图61A和图61B描绘TY21580和易普利单抗对来自用TY21580或易普利单抗治疗的小鼠的皮下MC38肿瘤中的肿瘤内调控性T(Treg)细胞水平的影响。图61A显示从肿瘤分离的CD4⁺ T细胞中的T调控性(Treg)细胞(CD4⁺CD25⁺)的百分比。图61B描绘从肿瘤分离的CD4⁺ T细胞子群体中细胞毒性T淋巴细胞(CD8⁺ T细胞)与Treg细胞的比率(即CD8⁺/Treg比率)。每个数据点代表来自一只小鼠的数据。用Prism 7(GraphPad Software)进行统计分析。使用多重T检验计算P值。ns:P>0.05; **:0.001<P<0.01, ***:P<0.001。

[0093] 图62A和图62B描绘TY21580和易普利单抗对来自用TY21580或易普利单抗治疗的小鼠的皮下CT26肿瘤中的肿瘤内调控性T (Treg) 细胞水平的影响。图62A显示从肿瘤分离的CD4⁺ T细胞中的T调控性 (Treg) 细胞 (CD4⁺CD25⁺) 的百分比。图62B描绘从肿瘤分离的CD4⁺ T细胞子群体中细胞毒性T淋巴细胞 (CD8⁺ T细胞) 与Treg细胞的比率 (即CD8⁺/Treg比率)。每个数据点代表来自一只小鼠的数据。用Prism 7 (GraphPad Software) 进行统计分析。使用多重T检验计算P值。ns: $P > 0.05$; **: $0.001 < P < 0.01$, ***: $P < 0.001$ 。

[0094] 图63描绘用同种型对照抗体或TY21580治疗的携带CT26肿瘤的小鼠中的FOXP3⁺ CD4⁺ Treg细胞上的通过平均荧光强度 (MFI) 度量的CTLA4表达水平。每个数据点代表来自一只小鼠的数据。用Prism 7 (GraphPad Software) 进行统计分析。使用多重T检验计算P值。ns: $P > 0.05$; **: $0.001 < P < 0.01$, ***: $P < 0.001$ 。

[0095] 图64A-图64D描绘用TY21580或同种型对照抗体治疗的携带小鼠H22肝癌的小鼠的肿瘤生长曲线。图64A描绘当肿瘤达到500mm³或800mm³时开始TY21580治疗, 或当肿瘤达到500mm³时开始同种型对照抗体治疗的组平均肿瘤生长。数据点代表来自8只小鼠/组的肿瘤的平均值, 误差棒代表平均值标准误差 (SEM)。图64B-图64D描绘每只小鼠中的单个肿瘤生长。图64B描绘用同种型对照抗体治疗的小鼠中的肿瘤生长, 其中当肿瘤达到500mm³时开始治疗; 图64C描绘用TY21580治疗的小鼠中的肿瘤生长, 其中当肿瘤达到500mm³时开始治疗; 图64D描绘用TY21580治疗的小鼠中的肿瘤生长, 其中当肿瘤达到800mm³时开始治疗。

[0096] 图65A和图65B描绘相较于亲本抗体TY21580, 含有可变长度的掩蔽肽的示例性可活化抗体的掩蔽效率。使用基于ELISA的方法测定掩蔽效率。图65A和图65B代表使用相同实验方法来测试各种可活化抗CTLA4抗体的两种实验设置。

[0097] 图66描绘相较于亲本抗体TY21580, 含有不同长度的裂解肽的示例性可活化抗体的掩蔽效率。使用基于ELISA的方法测定掩蔽效率。

具体实施方式

[0098] I. 一般性技术

[0099] 本文中描述或参考的技术和程序通常由本领域技术人员所充分了解, 并且通常由本领域技术人员使用常规方法加以采用, 所述方法诸如像以下中描述的广泛利用的方法: Sambrook等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual第3版 (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.; Current Protocols in Molecular Biology (F.M. Ausubel等人编, (2003)); 丛书Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.); PCR 2: A Practical Approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames和G.R. Taylor编 (1995)); Harlow和Lane编 (1988) Antibodies, A Laboratory Manual以及Animal Cell Culture (R.I. Freshney编 (1987)); Oligonucleotide Synthesis (M.J. Gait编, 1984); Methods in Molecular Biology, Humana Press; Cell Biology: A Laboratory Notebook (J.E. Cellis编, 1998) Academic Press; Animal Cell Culture (R.I. Freshney编, 1987); Introduction to Cell and Tissue Culture (J.P. Mather和P.E. Roberts, 1998) Plenum Press; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (A. Doyle, J.B. Griffiths和D.G. Newell编, 1993-8) J. Wiley and Sons; Handbook of Experimental Immunology (D.M. Weir和C.C. Blackwell编); Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells

(J.M.Miller和M.P.Calos编,1987);PCR:The Polymerase Chain Reaction,(Mullis等人编,1994);Current Protocols in Immunology(J.E.Coligan等人编,1991);Short Protocols in Molecular Biology(Wiley and Sons,1999);Immunobiology(C.A.Janeway和P.Travers,1997);Antibodies(P.Finch,1997);Antibodies:A Practical Approach(D.Catty.编,IRL Press,1988-1989);Monoclonal Antibodies:A Practical Approach(P.Shepherd和C.Dean编,Oxford University Press,2000);Using Antibodies:A Laboratory Manual(E.Harlow和D.Lane(Cold Spring Harbor Laboratory Press,1999);The Antibodies(M.Zanetti和J.D.Capra编,Harwood Academic Publishers,1995);以及Cancer:Principles and Practice of Oncology(V.T.DeVita等人编,J.B.Lippincott Company,1993)。

[0100] II. 定义

[0101] 在详细描述本公开之前,应了解本公开不限于毫无疑问可变化的特定组合物或生物系统。还应了解本文所用的术语仅出于描述特定实施方案的目的,并且不意图具有限制性。

[0102] 如本文所用,除非内容另外明确规定,否则单数形式“一个(种)(a/an)”和“这个(种)(the)”包括复数个(种)指示物。因此,举例来说,提及“一个(种)分子”任选地包括两个(种)或更多个(种)所述分子的组合,以此类推。

[0103] 如本文所用的术语“约”是指相应值的易于为本技术领域中的熟练人士所知的通常误差范围。在本文中提及“约”某一值或参数包括(并且描述)有关那个值或参数本身的实施方案。

[0104] 应了解,本文所述的本公开的方面和实施方案包括“包含”、“由……组成”以及“基本上由……组成”方面和实施方案。

[0105] 如本文在诸如“A和/或B”的短语中所用的术语“和/或”意图包括A与B两者;A或B;A(单独);以及B(单独)。同样地,如本文在诸如“A、B和/或C”的短语中所用的术语“和/或”意图涵盖以下实施方案中的每一者:A、B和C;A、B或C;A或C;A或B;B或C;A和C;A和B;B和C;A(单独);B(单独);以及C(单独)。

[0106] 术语“氨基酸”是指天然存在的氨基酸和合成氨基酸以及以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的那些,以及稍后被修饰的那些氨基酸,例如羟基脯氨酸、 γ -羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。术语“氨基酸类似物”是指与天然存在的氨基酸具有相同基本化学结构,但C末端羧基、N末端氨基或侧链官能团已被化学修饰成另一官能团的化合物。术语“氨基酸模拟物”是指结构不同于氨基酸的一般性化学结构,但以与天然存在的氨基酸类似的方式起作用的化合物。

[0107] 如本文所用,二十种常规氨基酸和它们的缩写遵循常规用法。参见例如Immunology-A Synthesis(第2版,E.S.Golub和D.R.Gren编,Sinauer Associates,Sunderland,Mass.(1991))。

[0108] 术语“多肽”、“蛋白质”和“肽”在本文中可互换使用,并且可指两个或更多个氨基酸的聚合物。

[0109] 如在本文中可互换使用的“多核苷酸”或“核酸”是指任何长度的核苷酸聚合物,并且包括DNA和RNA。核苷酸可为脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、经修饰核苷酸或碱基、和/或它

们的类似物或可通过DNA或RNA聚合酶或通过合成反应来并入聚合物中的任何底物。多核苷酸可包含经修饰核苷酸诸如甲基化核苷酸和它们的类似物。如果存在,那么可在聚合物的组装之前或之后赋予对核苷酸结构的修饰。核苷酸的序列可间插有非核苷酸组分。多核苷酸可包含在合成之后进行的一个或多个修饰,诸如与标记的缀合。其他类型的修饰包括例如“帽”;用类似物取代天然存在的核苷酸中的一者或多者;核苷酸间修饰诸如像具有不带电荷键联(例如甲基磷酸酯、磷酸三酯、氨基磷酸酯、氨基甲酸酯等)以及具有带电荷键联(例如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯等)的那些、含有侧挂部分诸如像蛋白质(例如核酸酶、毒素、抗体、信号肽、多L-赖氨酸等)的那些、具有嵌入剂(例如吡啶、补骨脂素(psoralen)等)的那些、含有螯合剂(例如金属、放射性金属、硼、氧化性金属等)的那些、含有烷基化剂的那些、具有经修饰键联(例如 α 端基异构核酸等)的那些;以及一种或多种多核苷酸的未修饰形式。此外,通常存在于糖中的任何羟基都可例如由磷酸酯基团、磷酸酯基团替换,由标准保护基加以保护,或被活化以制备与额外核苷酸的额外键联,或可缀合于固体或半固体载体。5'和3'末端OH可加以磷酸化,或用胺或具有1至20个碳原子的有机封端基团部分加以取代。其他羟基也可加以衍生以获得标准保护基。多核苷酸还可含有核糖或脱氧核糖的通常在本领域中是已知的类似形式,包括例如2'-O-甲基-核糖;2'-O-烯丙基-核糖;2'-氟-核糖或2'-叠氨基-核糖;碳环糖类似物; α -端基异构糖;差向异构糖诸如阿拉伯糖、木糖或来苏糖;吡喃糖;呋喃糖;景天庚酮糖;无环类似物以及无碱基核苷类似物诸如甲基核糖苷。一个或多个磷酸二酯键联可由替代性连接基团替换。这些替代性连接基团包括但不限于其中磷酸酯由P(O)S(“硫代酸酯”)、P(S)S(“二硫代酸酯”)、(O)NR₂(“酰胺化物”)、P(O)R、P(O)OR'、CO或CH₂(“甲缩醛”)替换的实施方案,其中每个R或R'独立地是H或任选地含有醚(-O-)键联、芳基、烯基、环烷基、环烯基或芳烷基的取代或未取代的烷基(1-20个C)。并非所有在多核苷酸中的键联都需要是相同的。先前描述适用于本文提及的所有多核苷酸,包括RNA和DNA。

[0110] 术语“经分离核酸”是指基因组、cDNA、或合成来源的核酸分子或它们的组合,所述核酸分子与存在于所述核酸的天然来源中的其他核酸分子分离。举例来说,关于基因组DNA,术语“经分离”包括核酸分子与基因组DNA天然地与其相伴的染色体分离。优选地,“经分离”核酸不含天然地侧接于所述核酸的序列,即位于目标核酸的5'和3'末端处的序列。

[0111] 术语“抗体”在本文中在最广泛意义上使用,并且明确涵盖单克隆抗体(包括全长单克隆抗体)、多克隆抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体、三特异性抗体)和抗体片段(例如Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv和/或单链可变片段或scFv),只要它们展现所需生物活性即可。

[0112] 在一些实施方案中,术语“抗体”是指具有由两个相同重(H)链和两个相同轻(L)链组成的基本四多肽链结构的抗原结合蛋白(即免疫球蛋白)。每个L链通过一个共价二硫键连接于H链,而两个H链视H链同种型而定通过一个或多个二硫键彼此连接。每个重链在N末端具有可变区(在本文中缩写为V_H),继之以恒定区。重链恒定区包含三个结构域,即C_{H1}、C_{H2}和C_{H3}。每个轻链在N末端具有可变区(在本文中缩写为V_L),继之以在它的另一末端的恒定区。轻链恒定区包含一个结构域,即C_L。V_L与V_H对准,并且C_L与重链的第一恒定结构域(CH1)对准。V_H和V_L一起配对形成单一抗原结合位点。IgM抗体由5个基本异四聚体单元以及称为J链的额外多肽组成,因此含有10个抗原结合位点,而分泌型IgA抗体可聚合以形成包含2-5个基本4链单元以及J链的多价集合体。

[0113] V_H 区和 V_L 区可基于结构和序列分析进一步再分成高变性区域,被称为高变区(HVR)。HVR与被称为框架区(FW)的更保守区域交替散布(参见例如Chen等(1999) J.Mol.Biol. (1999) 293,865-881)。每个 V_H 和 V_L 由从氨基末端至羧基末端按以下顺序排列的三个HVR和四个FW组成:FW-1_HVR-1_FW-2_HVR-2_FW-3_HVR-3_FW4。在整篇本公开中,重链的三个HVR被称为HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3。类似地,轻链的三个HVR被称为HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3。

[0114] 重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。抗体的恒定区可介导免疫球蛋白结合宿主组织或因子,包括免疫系统的各种细胞(例如效应细胞)和经典补体系统的第一组分(C1q)。在轻链和重链内,可变区和恒定区由具有约12个或更多个氨基酸的“J”区接合,其中重链还包括具有约10个或更多个氨基酸的“D”区(参见例如Fundamental Immunology第7章(Paul, W. 编,第2版Raven Press, N.Y.) (1989))。

[0115] 来自任何脊椎动物物种的L链都可基于它们的恒定结构域的氨基酸序列来被指定为称为 κ 和 λ 的两种明确不同类型中的一者。视抗体的重链的恒定结构域(CH)的氨基酸序列而定,抗体可被指定为不同类别或同种型。存在五个抗体类别: IgA、IgD、IgE、IgG和IgM, 分别具有指定为 α (alpha)、 δ (delta)、 ϵ (epsilon)、 γ (gamma) 和 μ (mu) 的重链。IgG抗体类别可根据 γ 重链Y1-Y4来进一步分类成四个子类,即分别是IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。。

[0116] 术语“抗体衍生物”或抗体的“衍生物”是指能够结合所述抗体结合的相同抗原(例如CTLA4),并且包含所述抗体的氨基酸序列连接于额外分子实体的分子。抗体的含于抗体衍生物中的氨基酸序列可为抗体的全长重链、全长轻链、全长重链的任何一个或多个部分、全长轻链的任何一个或多个部分、抗体的任何其他一个或多个片段、或完整抗体。额外分子实体可为化学或生物分子。额外分子实体的实例包括化学基团、氨基酸、肽、蛋白质(诸如酶、抗体)和化合物。额外分子实体可具有任何效用,诸如用作检测剂、标记、标志物、药物或治疗剂。抗体的氨基酸序列可通过化学偶联、遗传融合、非共价缔合或以其他方式附接或连接于额外分子实体。术语“抗体衍生物”还涵盖嵌合抗体、人源化抗体、以及由对CTLA4抗体的氨基酸序列的修饰诸如保守氨基酸取代、添加和插入所获得的分子。

[0117] 术语抗体的“抗原结合片段”或“抗原结合部分”是指抗体的一个或多个保留结合所述抗体结合的抗原(例如CTLA4)的能力的部分。抗体的“抗原结合片段”的实例包括(i) Fab片段,即由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_{H1} 结构域组成的单价片段;(ii) $F(ab')_2$ 片段,即包含由二硫桥在铰链区处连接的两个Fab片段的二价片段;(iii) 由 V_H 和 C_{H1} 结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体的单臂的 V_L 和 V_H 结构域组成的Fv片段,(v) dAb片段(Ward等, Nature 341:544-546 (1989)), 其由 V_H 结构域组成;和(vi) 经分离互补决定区(CDR)。

[0118] 术语“结合分子”涵盖(1) 抗体,(2) 抗体的抗原结合片段,和(3) 抗体的衍生物,各自如本文所定义。

[0119] 术语“CTLA4”在本申请中使用,并且包括人CTLA4(例如UniProt登录号P16410)以及其变体、亚型和物种同源物(例如小鼠CTLA4(UniProt登录号P09793)、大鼠CTLA4(UniProt登录号Q9Z1A7)、狗CTLA4(UniProt登录号Q9XSI1)、食蟹猴CTLA4(UniProt登录号G7PL88)等)。因此,如本文定义和公开的结合分子(例如抗体或可活化抗体)还可结合来自除人以外的物种的CTLA4。在其他情况下,结合分子可对人CTLA4具有完全特异性,并且可不展现物种交叉反应性或其他类型的交叉反应性。

[0120] 术语“CTLA4抗体”是指能够结合人CTLA4的如本文定义的抗体。

[0121] 术语“嵌合抗体”是指包含源于不同动物物种的氨基酸序列的抗体,诸如具有源于人抗体的可变区和鼠免疫球蛋白恒定区的那些。

[0122] 术语“竞争结合”是指两个抗体在它们与结合靶标结合时的相互作用。如果相较于不存在第二抗体下第一抗体的结合,在第二抗体存在下,第一抗体与它的同源表位的结合被可检测地降低,那么第一抗体与第二抗体竞争结合。其中在第一抗体存在下,第二抗体与它的表位的结合也被可检测地降低的替代方案可为但无需为事实。也就是说,第一抗体可抑制第二抗体与它的表位的结合,而不伴有第二抗体抑制第一抗体与它的相应表位的结合的情况。然而,当每个抗体可检测地抑制另一抗体与它的同源表位的结合时,无论程度相同、更大还是更小,抗体都被称为彼此“交叉竞争”结合它们的一个或多个相应表位。

[0123] 术语“表位”是指抗原的由抗体(或其抗原结合片段)结合的部分。表位可由邻接氨基酸或通过蛋白质的三级折叠而毗邻的非邻接氨基酸两者形成。由连续氨基酸形成的表位在暴露于变性溶剂时通常得以保留,而通过三级折叠形成的表位在用变性溶剂处理时通常丧失。表位可包括呈独特空间构象的各种数目的氨基酸。测定表位的空间构象的方法包括例如x射线晶体照相术、2维核磁共振、氘和氢交换与质谱测定法组合、或定点诱变、或所有方法与对抗原以及它与它的结合抗体和它的变体的复合结构的计算建模组合使用(参见例如Epitope Mapping Protocols in Methods in Molecular Biology,第66卷,G.E.Morris编(1996))。一旦确定抗原的所需表位,即可例如使用本文所述的技术产生针对那个表位的抗体。抗体的产生和表征也可阐明关于合乎需要表位的信息。根据这个信息,于是有可能竞争性筛选结合相同表位的抗体。一种用以实现此举的方法是进行交叉竞争研究以发现彼此竞争性结合的抗体,即抗体竞争结合抗原。一种用于基于它们的交叉竞争来“划分”抗体的高通量方法描述于PCT公布号WO 03/48731中。

[0124] 术语“种系”是指当抗体基因和基因区段通过生殖细胞从亲代传至后代时它们的核苷酸序列。种系序列不同于成熟B细胞中编码抗体的核苷酸序列,所述核苷酸序列已在B细胞成熟的过程期间通过重组和高突变事件而改变。

[0125] 术语“糖基化位点”是指由真核细胞识别为糖残基的连接位置的氨基酸残基。连接碳水化合物诸如寡糖所处的氨基酸通常是天冬酰胺(N连接)、丝氨酸(O连接)和苏氨酸(O连接)残基。特定连接位点通常由在本文中称为“糖基化位点序列”的氨基酸序列指示。用于N连接的糖基化的糖基化位点序列是:-Asn-X-Ser-或-Asn-X-Thr-,其中X可为除脯氨酸以外的任何常规氨基酸。术语“N连接”和“O连接”是指充当糖分子与氨基酸残基之间的连接位点的化学基团。N连接的糖通过氨基连接;O连接的糖通过羟基连接。术语“聚糖占据”是指存在连接于糖基化位点的碳水化合物部分(即聚糖位点被占据)。当在多肽上存在至少两个潜在糖基化位点时,无(0聚糖位点占据)、一个(1聚糖位点占据)或两个(2聚糖位点占据)位点可由碳水化合物部分占据。

[0126] 术语“宿主细胞”是指可被工程改造来产生目标蛋白质、蛋白质片段或肽的细胞系统。宿主细胞包括不限于培养细胞,例如源于啮齿动物(大鼠、小鼠、豚鼠或仓鼠)的哺乳动物培养细胞诸如CHO、BHK、NS0、SP2/0、YB2/0;人细胞,例如HEK293F细胞、HEK293T细胞;或人组织或杂交瘤细胞、酵母细胞、昆虫细胞(例如S2细胞)、细菌细胞(例如大肠杆菌(E.coli)细胞)以及包含在转基因动物或培养组织内的细胞。所述术语不仅涵盖特定主题细胞,而且

还涵盖这种细胞的子代。因为某些修饰可由于突变或环境影响而发生在继代中,所以所述子代可能不与亲本细胞相同,但仍然被包括在术语“宿主细胞”的范围内。

[0127] “人抗体”是具有对应于由人或人细胞产生或源于非人来源的抗体的氨基酸序列的氨基酸序列的抗体,所述非人来源利用人抗体谱系或其他人抗体编码序列。人抗体的这个定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0128] 术语“人源化抗体”是指含有源于人抗体序列的氨基酸残基的嵌合抗体。人源化抗体可含有来自非人动物或合成抗体的CDR或HVR中的一些或全部,而抗体的框架区和恒定区含有源于人抗体序列的氨基酸残基。

[0129] 术语“说明性抗体”是指本公开中描述以及指定为表A和表B中所列的那些的抗体中的任一者,以及包含表A和表B中所列的抗体的6个HVR和/或VH和VL的任何抗体。这些抗体可处于任何类别(例如IgA、IgD、IgE、IgG和IgM)。因此,以上鉴定的每种抗体涵盖处于所有五个类别的具有相同V_L区和V_H区氨基酸序列的抗体。此外,处于IgG类别的抗体可处于任何子类(例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4)。因此,处于IgG子类的以上鉴定的每种抗体涵盖处于所有四个子类的具有相同V_L区和V_H区氨基酸序列的抗体。处于五个类别以及处于四个IgG子类的人抗体的重链恒定区的氨基酸序列在本领域中是已知的。

[0130] “经分离”抗体或结合分子(例如可活化抗体)是已与它的天然环境的组分分离的抗体或结合分子。在一些实施方案中,抗体被纯化至大于95%或99%纯度,如通过例如电泳(例如SDS-PAGE、等电聚焦(IEF)、毛细管电泳)或色谱(例如离子交换或反相HPLC)所测定。对于用于评估抗体纯度的方法的综述,参见例如Flatman等,J.Chromatogr.B 848:79-87 (2007)。

[0131] 术语“K_a”是指特定结合分子-抗原相互作用的缔合速率常数,其中术语“k_d”是指特定结合分子-抗原相互作用的解离速率常数。

[0132] 术语“K_d”是指特定抗体-抗原相互作用的平衡解离常数。它由k_d与k_a的比率(即k_d/k_a)获得,并且表示为摩尔浓度(M)。K_d用作抗体与它的结合配偶体的结合的亲和力的量度。K_d越小,抗体越紧密结合,或抗体与抗原之间的亲和力越高。举例来说,相比于具有微体积摩尔浓度(μM)解离常数的抗体,具有纳体积摩尔浓度(nM)解离常数的抗体更紧密结合特定抗原。抗体的K_d值可使用本领域中完善建立的方法确定。一种用于确定抗体的K_d的方法是通过使用表面等离子体共振(SPR),通常利用生物传感器系统,诸如Biacore®系统。举例来说,使用BIACORE™系统的测定程序(BIACore测定)描述于本公开的至少实施例3中。

[0133] 术语“哺乳动物”是指哺乳纲的任何动物物种。哺乳动物的实例包括:人;实验室动物诸如大鼠、小鼠、仓鼠、兔、非人灵长类动物和豚鼠;家养动物诸如猫、狗、牛、绵羊、山羊、马和猪;以及圈养野生动物诸如狮子、老虎、大象等。

[0134] 关于哺乳动物的某一疾病状况的术语“预防(prevent/preventing)”是指防止或延迟疾病的发作,或防止疾病的临床或亚临床症状的显现。

[0135] 如本文所用,两个多肽序列之间的“序列同一性”指示在序列之间相同的氨基酸的百分比。多肽的氨基酸序列同一性可使用已知计算机程序诸如Bestfit、FASTA或BLAST加以常规确定(参见例如Pearson,Methods Enzymol.183:63-98(1990);Pearson,Methods Mol.Biol.132:185-219(2000);Altschul等,J.Mol.Biol.215:403-410(1990);Altschul等,Nucleic Acids Res.25:3389-3402(1997))。当使用Bestfit或任何其他序列比对程序

来确定特定序列是否与参考氨基酸序列例如95%同一时,设置参数以使历经所述参考氨基酸序列的全长计算同一性百分比,并且允许同源性中的空位占所述参考序列中氨基酸残基的总数的多达5%。这个在以上在确定多肽之间的同一性百分比时提及的方法可适用于本文公开的所有蛋白质、其片段或变体。

[0136] 如本文所用,术语“结合”、“特异性结合”或“对……具有特异性”是指靶标与抗体之间的可测量和可重现相互作用诸如结合,此在包括生物分子的分子的异质群体存在下,确定所述靶标的存在。举例来说,结合或特异性结合靶标(其可为表位)的抗体是相比于它结合其他靶标,以更大亲和力、亲合力,更易于和/或以更久持续时间结合这个靶标的抗体。在一个实施方案中,抗体与无关靶标结合的程度小于所述抗体与靶标结合的约10%,如例如通过放射免疫测定(RIA)所测量。在某些实施方案中,特异性结合靶标的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ 、 $\leq 100\text{nM}$ 、 $\leq 10\text{nM}$ 、 $\leq 1\text{nM}$ 或 $\leq 0.1\text{nM}$ 的解离常数(Kd)。在某些实施方案中,抗体特异性结合蛋白质上在来自不同物种的蛋白质之间保守的表位。在另一实施方案中,特异性结合可包括但不要求排他性结合。

[0137] 关于哺乳动物的某一疾病状况的术语“治疗(treat/treating/treatment)”是指在具有所述疾病状况的所述哺乳动物中导致合乎需要或有益的作用。合乎需要或有益的作用可包括疾病的一种或多种症状(即肿瘤生长和/或转移,或由免疫细胞的数目和/或活性介导的其他影响等)的频率或严重性降低,或疾病、疾患或病症的进一步发展得到遏止或抑制。在治疗哺乳动物的癌症的情形下,合乎需要或有益的作用可包括抑制癌细胞的进一步生长或扩散,使癌细胞死亡,抑制癌症的复发,减轻与癌症相关的疼痛,或改进哺乳动物的存活期。作用可为主观的或客观的。举例来说,如果哺乳动物是人,那么人可注意到精力或活力改进或疼痛减轻作为主观改进征兆或对疗法的响应。或者,临床医师可基于身体检查、实验室参数、肿瘤标志物或放射摄影研究结果察觉到肿瘤尺寸或肿瘤负荷降低。临床医师可观察到的关于对治疗的响应的一些实验室征象包括测试的正常化,所述测试诸如白血细胞计数、红血细胞计数、血小板计数、红细胞沉降速率和各种酶水平测试。另外,临床医师可观察到可检测肿瘤标志物的降低。或者,其他测试可用于评估客观改进,诸如超声波扫描图、核磁共振测试和正电子发射测试。

[0138] 术语“载体”是指能够运送外来核酸分子的核酸分子。外来核酸分子通过重组技术诸如连接或重组来连接于载体核酸分子。这允许在宿主细胞或生物体中繁殖、选择、进一步操作或表达外来核酸分子。载体可为质粒、噬菌体、转座子、粘粒、染色体、病毒或病毒粒子。一种类型的载体可在引入宿主细胞中后整合至宿主细胞的基因组中,并且由此连同宿主基因组一起复制(例如非游离型哺乳动物载体)。另一类型的载体能够在它所引入的宿主细胞中自主复制(例如具有细菌复制起点的细菌载体和游离型哺乳动物载体)。能够引导它们所操作性地连接的可表达外来核酸的表的另一特定类型的载体通常被称为“表达载体”。表达载体通常具有驱动可表达外来核酸的表的控制序列。被称为“转录载体”的较简单载体仅能够被转录而非翻译:它们可在靶标细胞中复制而非表达。术语“载体”涵盖所有类型的载体,无论它们的功能如何。能够引导它们所操作性地连接的可表达核酸的表的载体通常被称为“表达载体”。“载体”的其他实例可包括展示载体(例如引导所编码多肽在病毒或细胞(诸如细菌细胞、酵母细胞、昆虫细胞和/或哺乳动物细胞)的表面上表达和展示的载体)。

[0139] 如本文所用,“受试者”、“患者”或“个体”可指人或非人动物。“非人动物”可指不分类为人的任何动物,诸如家养动物、农场动物或动物园动物、运动动物、玩赏动物(诸如狗、马、猫、母牛等)以及研究中使用的动物。研究动物可不加限制地指代线虫、节肢动物、脊椎动物、哺乳动物、蛙、啮齿动物(例如小鼠或大鼠)、鱼(例如斑马鱼或河豚鱼)、鸟(例如鸡)、狗、猫以及非人灵长类动物(例如恒河猴、食蟹猴、黑猩猩等)。在一些实施方案中,受试者、患者或个体是人。

[0140] “有效量”是指至少以下数量:在必要剂量下以及持续必要时期,所述数量有效实现一种或多种包括治疗或防治结果的所需或所指示作用。有效量可以一次或多次施用来提供。出于本公开的目的,抗体、药物、化合物或药物组合物的有效量是足以直接或间接实现防治性或治疗性治疗的量。如在临床情形下所了解,药物、化合物或药物组合物的有效量可或可不与另一药物、化合物或药物组合物联合实现(例如如以单药疗法或组合疗法形式施用的有效量)。因此,可在施用一种或多种治疗剂的情形下考虑“有效量”,并且如果与一种或多种其他药剂联合,可实现或实现了合乎需要结果,那么单一药剂可被视为以有效量给与。

[0141] III. 结合人CTLA4的结合分子

[0142] 本公开部分地涉及结合人CTLA4的经分离结合分子,包括CTLA4抗体、CTLA4抗体的抗原结合片段、以及CTLA4抗体的衍生物。在一些实施方案中,结合分子是本文所述的任何抗体,包括关于HVR、可变区(VL、VH)以及轻链和重链(例如IgG1、IgG2、IgG4)的特定氨基酸序列所述的抗体。在一些实施方案中,抗体是人抗体。在一些实施方案中,抗体是人源化抗体和/或嵌合抗体。在一些实施方案中,本公开涉及结合人CTLA4,并且具有以下功能性质中的至少一者(例如至少一者、至少两者、至少三者、至少四者、至少五者、至少六者、至少七者、至少八者或全部九者)的结合分子:(a)以500nM或更小的 K_D 结合人、食蟹猴、小鼠、大鼠和/或狗CTLA4;(b)对人CTLA4具有拮抗活性;(c)在多达100nM的浓度下不结合人PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG3、TIM3、B7-H3、CD95、CD120a、OX40、CD40、BTLA、VISTA、ICOS和/或B7-H4;(d)与猴、小鼠、大鼠和/或狗CTLA4具有交叉反应性;(e)诱导ADCC效应(例如对Treg);(f)使人PBMC活化(例如刺激IL-2和/或IFN γ 的分泌);(g)能够抑制肿瘤细胞生长;(h)对癌症具有治疗作用;和(i)阻断人CTLA4与人CD80和/或人CD86的结合。在一些实施方案中,在其中当人CD80和/或CD86被固定(或进行板结合)时或当人CTLA4蛋白存在于细胞表面上时的测定中,相较于易普利单抗,本文所述的抗CTLA4抗体在阻断CD80和/或CD86与人CTLA4的结合方面具有较低活性。参见图57C和图57D和图58。在一些实施方案中,相较于PBMC或脾中的Treg消减,本文所述的抗CTLA4抗体选择性地使肿瘤微环境中的Treg细胞消减。在一些实施方案中,相较于易普利单抗,本文所述的抗CTLA4抗体在肿瘤微环境中具有更高Treg消减活性。参见图61A-图61B、图62A-图62B和图63。本文还提供了一种或多种与本文所述的抗体或抗原结合片段中的一者或多者交叉竞争结合人CTLA4的抗CTLA4抗体或抗原结合片段。

[0143] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段以约500nM或更小(例如约500nM或更小、约450nM或更小、约400nM或更小、约350nM或更小、约300nM或更小、约250nM或更小、约200nM或更小、约150nM或更小、约100nM或更小、约90nM或更小、约80nM或更小、约70nM或更小、约60nM或更小、约50nM或更小、约40nM或更小、约30nM或更小、约25nM或更小、约20nM或更小、约10nM或更小、约1nM或更小、约0.1nM或更小等)的 K_D 结合人、食蟹猴、小鼠、大鼠和/或狗

CTLA4。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段以约350nM或更小的 K_D 结合人、食蟹猴、小鼠、大鼠和/或狗CTLA4。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段以约100nM或更小的 K_D 结合人CTLA4。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段以约50nM或更小的 K_D 结合人CTLA4。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段以约10nM或更小的 K_D 结合人CTLA4。测量抗体或抗原结合片段的 K_D 的方法可使用本领域中已知的任何方法进行,包括例如通过表面等离子体共振、ELISA、等温滴定量热法、滤膜结合测定、EMSA等。在一些实施方案中, K_D 通过表面等离子体共振或ELISA测量(参见例如以下实施例3)。

[0144] 在一些实施方案中,本文所述的抗体或抗原结合片段对人CTLA4具有拮抗活性。在一些实施方案中,当表达人CTLA4的细胞(例如人细胞)由抗体或抗原结合片段接触时,抗体或抗原结合片段阻遏人CTLA4的一种或多种活性(例如CTLA4阻断,如使用CTLA4阻断报告基因测定,通过报告基因信号增加所度量)。

[0145] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段与猴(例如食蟹猴)、小鼠、大鼠和/或狗CTLA4具有交叉反应性。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段与猴CTLA4具有交叉反应性。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段与小鼠CTLA4具有交叉反应性。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段与大鼠CTLA4具有交叉反应性。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段与狗CTLA4具有交叉反应性。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段与猴和小鼠CTLA4;猴和大鼠CTLA4;猴和狗CTLA4;小鼠和大鼠CTLA4;小鼠和狗CTLA4;大鼠和狗CTLA4;猴、小鼠和大鼠CTLA4;猴、小鼠和狗CTLA4;猴、大鼠和狗CTLA4;小鼠、大鼠和狗CTLA4;或猴、小鼠、大鼠和狗CTLA4具有交叉反应性。在一些实施方案中,如果抗体或抗原结合片段以小于约500nM(例如小于约1nM、小于约10nM、小于约25nM、小于约50nM、小于约75nM、小于约100nM、小于约150nM、小于约200nM、小于约250nM、小于约300nM、小于约350nM等)的 K_D 结合非人CTLA4分子,那么抗体或抗原结合片段具有交叉反应性。测量抗体交叉反应性的方法在本领域中是已知的,包括不限于表面等离子体共振、ELISA、等温滴定量热法、滤膜结合测定、EMSA等。在一些实施方案中,交叉反应性通过ELISA测量(参见例如以下实施例3)。

[0146] 在一些实施方案中,在抗体结合细胞表达的CTLA4之后,抗体诱导针对CTLA4表达性细胞(例如针对CTLA4表达性人细胞诸如Treg)的ADCC效应。测量ADCC效应的方法(例如体外方法)在本领域中是已知的,包括不限于通过以下实施例3中所述的方法。在一些实施方案中,相对于对照(例如同种型对照或易普利单抗),抗体诱导ADCC效应超过约10%(例如诱导ADCC超过约10%、超过约15%、超过约20%、超过约25%、超过约30%、超过约35%、超过约40%等)。

[0147] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段能够抑制肿瘤细胞生长和/或增殖。在一些实施方案中,相对于未与抗体或抗原结合片段接触的相应肿瘤细胞(或相对于与同种型对照抗体接触的相应肿瘤细胞),当与抗体或抗原结合片段接触时,肿瘤细胞生长和/或增殖被抑制至少约5%(例如至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约99%)。在一些实施方案中,当向受试者施用抗体或抗原结合片段时,抗体或抗原结合片段能够使所述受试者中的肿瘤体积降低。在一些实施方案中,相对于受试者中的初始肿瘤体积(例如在施用抗体或抗原结合片段之前;相较于被施用同种型对照抗体的受试者中的相应肿瘤),抗体或抗原结合片段能够使所述受试者中的肿瘤体积降低至少约5%(例如至少约5%、至少约10%、

至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约99%)。监测肿瘤细胞生长/增殖、肿瘤体积和/或肿瘤抑制的方法在本领域中是已知的,包括例如通过以下实施例4中所述的方法。

[0148] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段对癌症具有治疗作用。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段使癌症的一种或多种征象或症状减轻。在一些实施方案中,当被施用抗体或抗原结合片段时,罹患癌症的受试者得到部分或完全缓解。

[0149] 在另一方面,本公开提供了与本公开的任何说明性抗体诸如TY21585、TY21586、TY21587、TY21588、TY21589、TY21580、TY21591、TY21686、TY21687、TY21689、TY21680、TY21691和/或TY21692竞争或交叉竞争结合人CTLA4的经分离抗体。在一特定实施方案中,本公开提供了与本公开的任何说明性抗体竞争或交叉竞争结合人CTLA4上的相同表位的经分离抗体。抗体与另一抗体竞争或交叉竞争结合的能力可使用本领域中已知的标准结合测定诸如BIAcore分析、ELISA测定或流式细胞计量术来测定。举例来说,可使本公开的说明性抗体在饱和条件下结合人CTLA4,接着测量测试抗体结合CTLA4的能力。如果测试抗体能够与说明性抗体同时结合CTLA4,那么测试抗体与说明性抗体结合不同表位。然而,如果测试抗体不能同时结合CTLA4,那么测试抗体结合相同表位、重叠表位、或紧密邻近于由说明性抗体结合的表位的表位。这个实验可使用各种方法诸如ELISA、RIA、FACS或表面等离子体共振来进行。

[0150] 在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段阻断CTLA4与它的结合配偶体中的一者或多者(例如人CTLA4与人CD80、人CTLA4与人CD86)之间的结合。在一些实施方案中,抗体或抗原结合片段在体外阻断CTLA4与它的配体之间的结合。在一些实施方案中,对于阻断CTLA4与CD80和/或CD86的结合,抗体或抗原结合片段具有约500nM或更小(例如约500nM或更小、约400nM或更小、约300nM或更小、约200nM或更小、约100nM或更小、约50nM或更小、约25nM或更小、约10nM或更小、约1nM或更小等)的半数最大抑制浓度(IC₅₀)。在一些实施方案中,对于阻断CTLA4与CD80和/或CD86的结合,抗体或抗原结合片段具有约100nM或更小的半数最大抑制浓度(IC₅₀)。在一些实施方案中,当在约100nM或更大(例如约100nM或更大、约500nM或更大、约1μM或更大、约10μM或更大等)的浓度下提供时,抗体或抗原结合片段完全阻断人CTLA4与CD80和/或CD86的结合。如本文所用,术语“完全阻断(complete blocking/completely blocks)”是指抗体或抗原结合片段能够使第一蛋白与第二蛋白之间的结合降低至少约80%(例如至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%等)。测量抗体或抗原结合片段阻断第一蛋白(例如人CTLA4)和第二蛋白(例如人CD80或人CD86)的结合的能力的方法在本领域中是已知的,包括不限于通过BIAcore分析、ELISA测定和流式细胞计量术(参见例如以下实施例3)。在一些实施方案中,相比于易普利单抗,本文所述的抗CTLA4抗体在阻断配体结合方面具有较低活性。

[0151] CTLA4抗体

[0152] 在一些方面,本公开提供了一种结合人CTLA4的经分离抗体。在一些实施方案中,抗体以1000nM或更小(例如50nM或更小、10nM或更小)的K_D结合人CTLA4,如通过表面等离子体共振所测量。在一些实施方案中,抗体与至少一个选自食蟹猴、小鼠、大鼠和狗的非人物种具有交叉反应性。

[0153] 在一些方面,本公开提供了一种特异性结合与人CTLA4的配体结合位点类似的表

位的经分离抗体。在一些实施方案中,抗体特异性结合与人CTLA4的CD80结合位点类似的表位。在一些实施方案中,抗体特异性结合与人CTLA4的CD86结合位点类似的表位。在一些实施方案中,抗体特异性结合包含人CTLA4的配体结合位点(例如CD80和/或CD86结合位点)中的一个或多个氨基酸残基的表位。在一些实施方案中,抗体特异性结合人CTLA4上与易普利单抗的表位不同的表位。在一些实施方案中,表位不包含人CTLA4的CC'环基序中的氨基酸残基。在一些实施方案中,表位不包含人CTLA4的氨基酸残基L106或I108。在一些实施方案中,抗体特异性结合包含人CTLA4的氨基酸残基Y105和L106而非I108的表位,其中氨基酸残基的编号根据SEQ ID NO:207。

KAMHVAQPAVVLASSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRLQ
ADSQVTEVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLR
[0154] AMDTGLYICKVELMYPPPYLGLGNGTQIYVIDPE (SEQ ID NO:
207)

[0155] 在一个方面,本公开提供了一种包含重链可变区和轻链可变区的经分离抗体,a)其中所述重链可变区包含HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3,其中所述HVR-H1包含根据选自以下的式的氨基酸序列:式(I):X1TFSX2YX3IHWV(SEQ ID NO:1),其中X1是F或Y,X2是D或G,并且X3是A、G或W;式(II):YSIX1SGX2X3WX4WI(SEQ ID NO:2),其中X1是S或T,X2是H或Y,X3是H或Y,并且X4是A、D或S;和式(III):FSLSTGGVAVX1WI(SEQ ID NO:3),其中X1是G或S;所述HVR-H2包含根据选自以下的式的氨基酸序列:式(IV):IGX1IX2HSGSTYYX3SLKSRV(SEQ ID NO:4),其中X1是D或E,X2是S或Y,并且X3是P或Q;式(V):IGX1ISPSX2GX3TX4YAQKFQGRV(SEQ ID NO:5),其中X1是I或W,X2是G或S,X3是G或S,并且X4是K或N;和式(VI):VSX1ISGX2GX3X4TYYADSVKGRF(SEQ ID NO:6),其中X1是A、G或S,X2是S或Y,X3是G或S,并且X4是S或T;并且所述HVR-H3包含根据选自以下的式的氨基酸序列:式(VII):ARX1X2X3X4FDX5(SEQ ID NO:7),其中X1是G、R或S,X2是A、I或Y,X3是D、V或Y,X4是A、E或Y,并且X5是I或Y;式(VIII):ARX1GX2GYFDX3(SEQ ID NO:8),其中X1是D或L,X2是F或Y,并且X3是V或Y;式(IX):ARX1X2X3X4AX5X6FDY(SEQ ID NO:9),其中X1是L或R,X2是I或P,X3是A或Y,X4是S或T,X5是T或Y,并且X6是A或Y;和式(X):ARDX1X2X3GSSGYX4GFDX5(SEQ ID NO:10),其中X1是I或V,X2是A或H,X3是P或S,X4是D或Y,并且X5是F或V;和/或b)其中所述轻链可变区包含HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3,其中所述HVR-L1包含根据选自以下的式的氨基酸序列:式(XI):RASQX1X2X3SX4LX5(SEQ ID NO:11),其中X1是G或S,X2是I或V,X3是G或S,X4是S或Y,并且X5是A或N;式(XII):RASQX1VX2X3RX4LA(SEQ ID NO:12),其中X1是S或T,X2是F、R或S,X3是G或S,并且X4是F或Y;和式(XIII):RASX1SVDFX2GX3SFLX4(SEQ ID NO:13),其中X1是E或Q,X2是D、F、H或Y,X3是F、I或K,并且X4是A、D或H;所述HVR-L2包含根据式(XIV):X1ASX2X3X4X5GX6(SEQ ID NO:14)的氨基酸序列,其中X1是A或D,X2是N、S或T,X3是L或R,X4是A、E或Q,X5是S或T,并且X6是I或V;并且所述HVR-L3包含根据选自以下的式的氨基酸序列:式(XV):YCX1X2X3X4X5X6PX7T(SEQ ID NO:15),其中X1是E、Q或V,X2是H或Q,X3是A、G、H、R或S,X4是D、L、S或Y,X5是E、G、P、Q或S,X6是L、T、V或W,并且X7是F、L、P、W或Y;式(XVI):YCQX1X2X3WPPWT(SEQ ID NO:16),其中X1是S或Y,X2是D或Y,并且X3是Q或Y;和式(XVII):YCQX1YX2SSPPX3YT(SEQ ID NO:17),其中X1是H或Q,X2是T或V,并且X3是E或V。

[0156] 在一些实施方案中,抗体包含:a)含有选自SEQ ID NO:18-29的氨基酸序列的HVR-H1;含有选自SEQ ID NO:30-39的氨基酸序列的HVR-H2;和含有选自SEQ ID NO:40-52的氨基酸序列的HVR-H3;和/或b)含有选自SEQ ID NO:53-65的氨基酸序列的HVR-L1;含有选自SEQ ID NO:66-69的氨基酸序列的HVR-L2;和含有选自SEQ ID NO:70-81的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗体包含对于下表A中所述的任何示例性抗体显示的HVR中的一者、两者、三者、四者、五者或全部六者。

[0157] 表A:抗CTLA4 HVR序列

抗体名	HVR-H1	HVR-H2	HVR-H3	HVR-L1	HVR-L2	HVR-L3
称:						
TY21 585	FTFSDYA IHWV (SEQ ID NO: 18)	IGIISPSSGST NYAQKFQG RV (SEQ ID NO: 30)	ARDIHSGSS GYYYGFDV (SEQ ID NO: 40)	RASESVDF GISFLA (SEQ ID NO: 53)	DASNR ATGI (SEQ ID NO: 66)	YCQHY TSSPPV YT (SEQ ID NO: 70)
TY21 586	YSITSGY YWAWI (SEQ ID NO: 19)	VSSISGSGST TYYADSVK GRF (SEQ ID NO: 31)	ARDGFGYF DY (SEQ ID NO: 41)	SASSSVSYV Y (SEQ ID NO: 54)	DASSLE SGV (SEQ ID NO: 67)	YCVQG LQTPW T (SEQ ID NO: 71)
TY21 587	FTFSDYG IHWV (SEQ ID NO: 20)	IGEIIYHSGST YYPSLKS R (SEQ ID NO: 32)	ARDVAPGS SGYYDGFD F (SEQ ID NO: 42)	RASQGIGSS LA (SEQ ID NO: 55)	DASNR ATGI (SEQ ID NO: 66)	YCQQY DQWPP WT (SEQ ID NO: 72)
TY21 588	YSISSGY HWDWI (SEQ ID NO: 21)	VSGISGYGG STYYADSVK GRF (SEQ ID NO: 33)	ARHSYYGS GNFDY (SEQ ID NO: 43)	RASESVDF GKSFLH (SEQ ID NO: 56)	DASNL ETGV (SEQ ID NO: 68)	YCQQS YSWPP T (SEQ ID NO: 73)
TY21 589	FTFSDY WIHWV (SEQ ID NO: 22)	IGWISPSGG GTKYAQKF QGRV (SEQ ID NO: 34)	ARGAYEFD Y (SEQ ID NO: 44)	RASQSVSS RFLA (SEQ ID NO: 57)	DASNR ATGI (SEQ ID NO: 66)	YCQQS YPTPLT (SEQ ID NO: 74)
TY21 580	YSISSGY HWSWI (SEQ ID NO: 23)	LARIDWDD DKYYSTSLK SRL (SEQ ID NO: 35)	ARSYVYFD Y (SEQ ID NO: 45)	RASQSVRG RFLA (SEQ ID NO: 58)	DASNR ATGI (SEQ ID NO: 66)	YCQQS SSWPPT (SEQ ID NO: 75)
TY21 591	FSLSTGG VAVSWI (SEQ ID NO: 24)	IGEIIYHSGST YYPSLKS R (SEQ ID NO: 32)	ARRIATATY FDY (SEQ ID NO: 46)	RASQTVFS RYLA (SEQ ID NO: 59)	DASNR ATGI (SEQ ID NO: 66)	YCQQS YYWPP WT (SEQ ID NO: 76)
TY21 686	FSLSTGG VAVGWI (SEQ ID NO: 25)	VSAISGYGS TTYADSVK GRF (SEQ ID NO: 36)	ARLPYSAY AFDY (SEQ ID NO: 47)	RASQGVSS YLA (SEQ ID NO: 60)	AASLT QSGV (SEQ ID NO: 69)	YCQHH YGTPLT (SEQ ID NO: 77)
TY21 687	FTFSGYA IHWV (SEQ ID NO: 26)	IGIISPSSGG TKYAQKFQ GRV (SEQ ID NO: 37)	ARHPFAY (SEQ ID NO: 48)	RASQSVDF YGISFLD (SEQ ID NO: 61)	DASNR ATGI (SEQ ID NO: 66)	YCQQY VSSPPE YT (SEQ ID NO: 78)
TY21 689	YTFSGYG IHWV (SEQ ID NO: 27)	IGEIIYHSGST YYPSLKS R (SEQ ID NO: 32)	ARRIDAFDI (SEQ ID NO: 49)	RASQSVDF DGFSFLH (SEQ ID NO: 62)	DASSLE SGV (SEQ ID NO: 67)	YCQQR DSWPY T (SEQ ID NO: 79)

[0160]

		32)				NO: 79)
TY21 680	YTFSGYA IHWV (SEQ ID NO: 28)	IGIISPSGGG TKYAQKFQ GRV (SEQ ID NO: 37)	ARLYDVAY (SEQ ID NO: 50)	RASQSVDF HGKSFLH (SEQ ID NO: 63)	DASSLE SGV (SEQ ID NO: 67)	YCEQSL EVPFT (SEQ ID NO: 80)
TY21 691	FTFSDYA IHWV (SEQ ID NO: 18)	IGIISPSGGST KYAQKFQG RV (SEQ ID NO: 38)	ARLGYYGYF DV (SEQ ID NO: 51)	RASQSVDF YGISFLH (SEQ ID NO: 64)	DASSLE SGV (SEQ ID NO: 67)	YCVQA LQLPLT (SEQ ID NO: 81)
TY21 692	YSITSGH YWSWI (SEQ ID NO: 29)	IGDISHSGST YYSQSLKSR V (SEQ ID NO: 39)	ARGSRTGY FDY (SEQ ID NO: 52)	RASQSISSY LN (SEQ ID NO: 65)	DASNL ETGV (SEQ ID NO: 68)	YCQHH YGTPLT (SEQ ID NO: 77)

[0161] 在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列的HVR-H2、含有SEQ ID NO:40的氨基酸序列的HVR-H3、含有SEQ ID NO:53的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:66的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:70的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的HVR-H2、含有SEQ ID NO:41的氨基酸序列的HVR-H3、含有SEQ ID NO:54的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:67的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:71的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID NO:20的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的HVR-H2、含有SEQ ID NO:42的氨基酸序列的HVR-H3、含有SEQ ID NO:55的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:66的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:72的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的HVR-H2、含有SEQ ID NO:43的氨基酸序列的HVR-H3、含有SEQ ID NO:56的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:68的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:73的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的HVR-H2、含有SEQ ID NO:44的氨基酸序列的HVR-H3、含有SEQ ID NO:57的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:66的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:74的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的HVR-H2、含有SEQ ID NO:45的氨基酸序列的HVR-H3、含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:66的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:75的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的HVR-H2、含有SEQ ID NO:46的氨基酸序列的HVR-H3、含有SEQ ID NO:59的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:66的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:76的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的HVR-H2、含有SEQ ID NO:47的氨基酸序列的HVR-H3、含有SEQ ID NO:60的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:69的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:77的氨基酸序列的

HVR-L3。在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-H2、含有SEQ ID NO:48的氨基酸序列的HVR-H3、含有SEQ ID NO:61的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:66的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:78的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:32的氨基酸序列的HVR-H2、含有SEQ ID NO:49的氨基酸序列的HVR-H3、含有SEQ ID NO:62的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:67的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:79的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID NO:28的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:37的氨基酸序列的HVR-H2、含有SEQ ID NO:50的氨基酸序列的HVR-H3、含有SEQ ID NO:63的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:67的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:80的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:38的氨基酸序列的HVR-H2、含有SEQ ID NO:51的氨基酸序列的HVR-H3、含有SEQ ID NO:64的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:67的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:81的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID NO:29的氨基酸序列的HVR-H1、含有SEQ ID NO:39的氨基酸序列的HVR-H2、含有SEQ ID NO:52的氨基酸序列的HVR-H3、含有SEQ ID NO:65的氨基酸序列的HVR-L1、含有SEQ ID NO:68的氨基酸序列的HVR-L2和含有SEQ ID NO:77的氨基酸序列的HVR-L3。

[0162] 在一些实施方案中,抗体包含:a)含有选自SEQ ID NO:82-94的氨基酸序列的重链可变区;和/或b)含有选自SEQ ID NO:95-107的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,抗体包含重链可变区,所述重链可变区包含与选自SEQ ID NO:82-94的序列具有至少90% (例如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%) 序列同一性的氨基酸序列,和/或轻链可变区,所述轻链可变区包含与选自SEQ ID NO:95-107的序列具有至少90% (例如至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%) 序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,抗体包含下表B中所述的任何示例性抗体的重链可变区和轻链可变区。在一些实施方案中,抗体包含对于下表B中所述的任何示例性抗体显示的重链可变区的一个、两个或全部三个HVR和/或轻链可变区的一个、两个或全部三个HVR。

[0163] 表B:抗CTLA4可变区氨基酸序列

抗 体 名称:	VH:	VL:
[0164] TY215 85	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSDYAIHWVRQAPG KGLEWIGIISPSSGSTNYAQKF	DIQLTQSPSSLSASVGDRTIT CRASESVDFFGISFLAWYQQK PGKAPKLLIYDASNRTGIPS

[0165]

	QGRVTISRDN SKNTLYLQLNSL RAEDTAVYYCARDI HSGSSGY YYGFDVWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 82)	RFSGSGSGTDFTLTISSLQPED FATYYCQHYTSSPPVYTFGQ GTKVEIKR (SEQ ID NO: 95)
TY215 86	EVQLVESGGGLVQP GGSRLRS CAASGYSITSGYYWAWIRQAP GKGLEWVSSISGSGSTTYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQLN SLRAEDTAVYYCARDGFGYFD YWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 83)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITIT CSASSSVSYVYVYQQKPGKA PKLLIYDASSLESGVPSRFSGS SGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCVQGLQTPWTFGQGGTKVEI KR (SEQ ID NO: 96)
TY215 87	EVQLVESGGGLVQP GGSRLRS CAASGFTFSDYGIHWVRQAPG KGLEWIGEIIYHSGSTYYSPSLK SRVTISRDN SKNTLYLQLNSLR AEDTAVYYCARDVAPGSSGY YDGFDFWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 84)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITIT CRASQGIGSSLAWYQQKPGK APKLLIYDASN RATGIPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATY YCQQYDQWPPWTFGQGGTKV EIKR (SEQ ID NO: 97)
TY215 88	EVQLVESGGGLVQP GGSRLRS CAASGYSISSGYHWDWIRQAP GKGLEWVSGISGYGGSTYYAD SVKGRFTISRDN SKNTLYLQLN SLRAEDTAVYYCARHSYYGSG NFDYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 85)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITIT CRASESVDFGKSFLHWYQQ KPGKAPKLLIYDASNLETGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQSYSWPPTFGQG TKVEIKR (SEQ ID NO: 98)
TY215 89	EVQLVESGGGLVQP GGSRLRS CAASGFTFSDYWIHWVRQAPG KGLEWIGWISPSGGGTKYAQK FQGRVTISRDN SKNTLYLQLNS LRAEDTAVYYCARGAYEFDY WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 86)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITIT CRASQSVSSRFLAWYQQKPG KAPKLLIYDASN RATGIPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQSYPTPLTFGQGGTKVEI KR (SEQ ID NO: 99)
TY215 80	EVQLVESGGGLVQP GGSRLRS CAASGYSISSGYHWSWIRQAP GKGLEWLARIDWDDDKYYST SLKSRLTISRDN SKNTLYLQLN SLRAEDTAVYYCARSYVYFDY WGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 87)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITIT CRASQSVRGRFLAWYQQKPG KAPKLLIYDASN RATGIPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQSSSWPPTFGQGGTKVEI KR (SEQ ID NO: 100)
TY215 91	EVQLVESGGGLVQP GGSRLRS CAASGFSLSLSTGGVAVSWIRQA PGKGLEWIGEIIYHSGSTYYSPS LKSRVTISRDN SKNTLYLQLNS LRAEDTAVYYCARRIATATYF DYWGQGLTVTVSS (SEQ ID NO: 88)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITIT CRASQTVFSRYLAWYQQKPG KAPKLLIYDASN RATGIPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQQSYYPWPPTFGQGGTK VEIKR (SEQ ID NO: 101)
TY216 86	EVQLVESGGGLVQP GGSRLRS CAASGFSLSLSTGGVAVGWIRQA PGKGLEWVSAISGYGSTTYA DSVKGRFTISRDN SKNTLYLQL	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITIT CRASQGVSSYLAWYQQKPG KAPKLLIYAAS TLQSGVPSRF SGSGSGTDFTLTISSLQPEDFA

[0166]

	NSLRAEDTAVYYCARLPYSAY AFDYWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 89)	TYYCQHHYGTPLTFGQGTKV EIKR (SEQ ID NO: 102)
TY216 87	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSGYAIHWVRQAPG KGLEWIGIISPSGGGTKYAQKF QGRVTISRDN SKNTLYLQLNSL RAEDTAVYYCARHPFAYWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO: 90)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITIT CRASQSVDFYGISFLDWYQQ KPGKAPKLLIYDASN RATGIP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQYVSSPPEYTFG QGTKVEIKR (SEQ ID NO: 103)
TY216 89	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGYTFSGYGIHWVRQAPG KGLEWIGEIIYHSGSTYYSPSLK SRVTISRDN SKNTLYLQLNSLR AEDTAVYYCARRIDAFDIWGQ GTLVTVSS (SEQ ID NO: 91)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITIT CRASQSVDFDGFSLHWYQQ KPGKAPKLLIYDASSLESGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCQQRDSWPYTFGQG TKVEIKR (SEQ ID NO: 104)
TY216 80	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGYTFSGYAIHWVRQAPG KGLEWIGIISPSGGGTKYAQKF QGRVTISRDN SKNTLYLQLNSL RAEDTAVYYCARLYDVAIWG QGTLVTVSS (SEQ ID NO: 92)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITIT CRASQSVDFHGKSFLHWYQQ KPGKAPKLLIYDASSLESGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCEQSLEVPFTFGQGT KVEIKR (SEQ ID NO: 105)
TY216 91	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSDYAIHWVRQAPG KGLEWIGIISPSGGSTKYAQKF QGRVTISRDN SKNTLYLQLNSL RAEDTAVYYCARLGYGYFDV WGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 93)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITIT CRASQSVDFYGISFLHWYQQ KPGKAPKLLIYDASSLESGVP SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE DFATYYCVQALQLPLTFGQG TKVEIKR (SEQ ID NO: 106)
TY216 92	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLS CAASGYSITSGHYWSWIRQAP GKGLEWIGDISHSGSTYYSSQL KSRVTISRDN SKNTLYLQLNSL RAEDTAVYYCARGSRTGYFD YWGQGTTLVTVSS (SEQ ID NO: 94)	DIQLTQSPSSLSASVGDRVITIT CRASQSISSYLNWYQQKPGK APKLLIYDASNLETGVPSRFS GSGSGTDFTLTISSLQPEDFAT YYCQHHYGTPLTFGQGTKVE IKR (SEQ ID NO: 107)

[0167] 在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID NO:82的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:95的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID NO:83的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:96的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID NO:84的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:97的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID NO:85的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:98的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID NO:86的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:99的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID NO:87的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:100的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,抗体包含含有

SEQ ID NO:88的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:101的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID NO:89的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:102的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID NO:90的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:103的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID NO:91的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:104的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID NO:92的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:105的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID NO:93的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:106的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,抗体包含含有SEQ ID NO:94的氨基酸序列的重链可变区和含有SEQ ID NO:107的氨基酸序列的轻链可变区。

[0168] 在一些实施方案中,本公开的抗体与包含以下的抗体交叉竞争结合人CTLA4:a) 含有选自SEQ ID NO:18-29的氨基酸序列的HVR-H1;含有选自SEQ ID NO:30-39的氨基酸序列的HVR-H2;和含有选自SEQ ID NO:40-52的氨基酸序列的HVR-H3;和/或b) 含有选自SEQ ID NO:53-65的氨基酸序列的HVR-L1;含有选自SEQ ID NO:66-69的氨基酸序列的HVR-L2;和含有选自SEQ ID NO:70-81的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,本公开的抗体与包含对于表A中所述的任何示例性抗体显示的HVR中的一者、两者、三者、四者、五者或全部六者的抗体交叉竞争结合人CTLA4。在一些实施方案中,本公开的抗体与包含以下的抗体交叉竞争结合人CTLA4:a) 含有选自SEQ ID NO:82-94的氨基酸序列的重链可变区;和/或b) 含有选自SEQ ID NO:95-107的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,本公开的抗体与包含对于表B中所述的任何示例性抗体显示的VH和/或VL的抗体交叉竞争结合人CTLA4。

[0169] 本文所述的CTLA4抗体可处于任何类别,诸如IgG、IgM、IgE、IgA或IgD。在一些实施方案中,CTLA4抗体处于IgG类别,诸如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4子类。使用本领域中已知的方法,可使CTLA4抗体从一个类别或子类转变成另一类别或子类。用于产生处于所需类别或子类的抗体的一示例性方法包括以下步骤:分离编码CTLA4抗体的重链的核酸和编码CTLA4抗体的轻链的核酸,分离编码V_H区的序列,使V_H序列连接于编码所述所需类别或子类的重链恒定区的序列,在细胞中表达轻链基因和重链构建体,以及收集CTLA4抗体。本公开的抗体可为单克隆抗体或多克隆抗体。本公开的抗体可为单特异性抗体或多特异性(例如双特异性、三特异性等)抗体。在一些实施方案中,本文所述的CTLA4抗体可包括一个或多个Fc突变(例如调节(增加或降低)ADCC或CDC活性的Fc突变)。本领域中已知的任何适合Fc突变都可用于本公开的CTLA4抗体中。

[0170] 在一些实施方案中,本公开的抗体是结合第一靶标和第二靶标的双特异性抗体,其中所述第一靶标是人CTLA4。在一些实施方案中,双特异性抗体结合第一靶标和第二靶标,其中所述第一靶标是人CTLA4,并且其中双特异性抗体包含a) 含有选自SEQ ID NO:18-29的氨基酸序列的HVR-H1;含有选自SEQ ID NO:30-39的氨基酸序列的HVR-H2;和含有选自SEQ ID NO:40-52的氨基酸序列的HVR-H3;和/或b) 含有选自SEQ ID NO:53-65的氨基酸序列的HVR-L1;含有选自SEQ ID NO:66-69的氨基酸序列的HVR-L2;和含有选自SEQ ID NO:70-81的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,双特异性抗体结合第一靶标和第二靶标,其中所述第一靶标是人CTLA4,并且其中双特异性抗体包含对于表A中所述的任何示例性抗体显示的HVR中的一者、两者、三者、四者、五者或全部六者。在一些实施方案中,双特异

性抗体结合第一靶标和第二靶标,其中所述第一靶标是人CTLA4,并且其中双特异性抗体包含:a)含有选自SEQ ID NO:82-94的氨基酸序列的重链可变区;和/或b)含有选自SEQ ID NO:95-107的氨基酸序列的轻链可变区。在一些实施方案中,双特异性抗体结合第一靶标和第二靶标,其中所述第一靶标是人CTLA4,并且其中双特异性抗体包含对于表B中所述的任何示例性抗体显示的VH和/或VL。在一些实施方案中,第二靶标是PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG3、TIM3、B7-H3、CD95、CD120a、OX40、CD40、BTLA、VISTA、ICOS、Her1、Her2、Her3或B7-H4。

[0171] 本公开的抗体可通过本领域中已知的任何技术产生,包括常规单克隆抗体方法,例如标准体细胞杂交技术(参见例如Kohler和Milstein,Nature 256:495(1975))、对B淋巴细胞的病毒性或致癌性转化、或如本文详述的重组抗体技术(参见例如实施例1和实施例2)。在一些实施方案中,本公开的抗体使用PCT申请号PCT/CN2017/098333(以引用的方式整体并入本文)和/或PCT申请号PCT/CN2017/098299(以引用的方式整体并入本文)中所述的任何文库和/或方法产生。

[0172] 杂交瘤产生是一种极其完善建立的程序。用于制备杂交瘤的常见动物系统是鼠系统。用于分离供融合用的经免疫脾细胞的免疫方案和技术在本领域中是已知的。融合配偶体(例如鼠骨髓瘤细胞)和融合程序也是已知的。一种可用于制备由本公开提供的人CTLA4抗体的熟知方法涉及使用XenoMouseTM动物系统。XenoMouseTM小鼠是包含人免疫球蛋白重链和轻链基因座的大型片段,并且在小鼠抗体产生方面有缺陷的经工程改造小鼠品系(参见例如Green等,(1994)Nature Genetics 7:13-21;WO2003/040170)。用CTLA4抗原使动物免疫。CTLA4抗原是经分离和/或经纯化CTLA4。它可为CTLA4的片段,诸如CTLA4的细胞外结构域。动物的免疫可通过本领域中已知的任何方法进行(参见例如Harlow和Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1990)。用于使非人动物诸如小鼠、大鼠、绵羊、山羊、猪、牛和马免疫的方法在本领域中是熟知的(参见例如Harlow和Lane(上文)以及美国专利号5,994,619)。CTLA4抗原可与佐剂一起施用以刺激免疫应答。示例性佐剂包括完全或不完全弗氏佐剂(Freund's adjuvant)、RIBI(胞壁酰二肽)或ISCOM(免疫刺激性复合物)。在用CTLA4抗原使动物免疫之后,从分离自经免疫动物的细胞制备抗体产生性永生细胞系。在免疫之后,将动物处死,并且使淋巴结和/或脾B细胞永生。使细胞永生化的方法包括但不限于用致癌基因对它们进行转移,用致癌病毒感染它们,在选择永生化细胞的条件下培养它们,使它们经受致癌性或突变性化合物,使它们与永生细胞例如骨髓瘤细胞融合,以及使肿瘤抑制基因失活(参见例如Harlow和Lane(上文))。如果使用与骨髓瘤细胞融合,那么骨髓瘤细胞优选地不分泌免疫球蛋白多肽(非分泌细胞系)。使用CTLA4、其一部分或表达CTLA4的细胞筛选永生细胞。选择、克隆CTLA4抗体产生性细胞例如杂交瘤,并且关于合乎需要特征加以进一步筛选,所述特征包括稳健生长、高抗体产量和合乎需要抗体特征,如以下进一步所讨论。杂交瘤可在体内在同种同基因动物中,在缺乏免疫系统的动物例如裸小鼠中,或在体外在细胞培养中扩增。选择、克隆和扩增杂交瘤的方法为本领域普通技术人员所熟知。

[0173] 本公开的抗体还可使用噬菌体展示或酵母展示方法制备。本领域中建立了用于分离人抗体的所述展示方法(参见例如Knappik等(2000)J.Mol.Biol.296,57-86;Feldhaus等(2003)Nat Biotechnol21:163-170;也参见以下实施例1和实施例2的方法)。

[0174] 抗原结合片段

[0175] 在一些其他方面,本公开提供了本文所述的任何CTLA4抗体的抗原结合片段。

[0176] 抗原结合片段可包含本文所述的任何抗体的任何序列。在一些实施方案中,抗原结合片段包含(1)CTLA4抗体的轻链;(2)CTLA4抗体的重链;(3)来自CTLA4抗体的轻链的可变区;(4)来自CTLA4抗体的重链的可变区;(5)CTLA4抗体的一个或多个HVR(例如一个、两个、三个、四个、五个或六个HVR);或(6)来自CTLA4抗体的轻链的三个HVR和来自CTLA4抗体的重链的三个HVR的氨基酸序列。

[0177] 在一些实施方案中,本公开提供了选自表A和表B中所列的那些抗体的抗体的抗原结合片段。

[0178] 在一些实施方案中,CTLA4抗体的抗原结合片段包括:(i)Fab片段,其是由 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_H1 结构域组成的单价片段;(ii) $F(ab')_2$ 片段,其是包含由二硫桥在铰链区处连接的两个Fab片段的二价片段;(iii)由 V_H 和 C_H1 结构域组成的Fd片段;(iv)由抗体的单臂的 V_L 和 V_H 结构域组成的Fv片段;(v)dAb片段(Ward等,(1989)Nature341:544-546),其由 V_H 结构域组成;(vi)经分离CDR,和(vii)单链抗体(scFv),其是包含抗体的 V_L 区连接于抗体的 V_H 区的多肽(参见例如Bird等(1988)Science 242:423-426;Huston等(1988)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883)。

[0179] 抗体衍生物

[0180] 在一些其他方面,本公开提供了本文所述的任何CTLA4抗体的衍生物。

[0181] 在一些实施方案中,抗体衍生物由修饰本公开的说明性抗体(例如“亲本抗体”)的氨基酸序列,同时保持亲本抗体氨基酸序列的总体分子结构来获得。可修饰亲本抗体链的任何区域的氨基酸序列,诸如框架区、HVR区或恒定区。修饰的类型包括对亲本抗体的一个或多个氨基酸进行的取代、插入、缺失或它们的组合。

[0182] 在一些实施方案中,抗体衍生物包含与如以SEQ ID NO:82-107中的任一者阐述的氨基酸序列至少65%、至少75%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的 V_L 或 V_H 区。在一些实施方案中,抗体衍生物包含与如以SEQ ID NO:18-29中的任一者阐述的氨基酸序列至少65%、至少75%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的HVR-H1氨基酸序列区域。在一些实施方案中,抗体衍生物包含与如以SEQ ID NO:30-39中的任一者阐述的氨基酸序列至少65%、至少75%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的HVR-H2氨基酸序列区域。在一些实施方案中,抗体衍生物包含与如以SEQ ID NO:40-52中的任一者阐述的氨基酸序列至少65%、至少75%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的HVR-H3氨基酸序列区域。在一些实施方案中,抗体衍生物包含与如以SEQ ID NO:53-65中的任一者阐述的氨基酸序列至少65%、至少75%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的HVR-L1氨基酸序列区域。在一些实施方案中,抗体衍生物包含与如以SEQ ID NO:66-69中的任一者阐述的氨基酸序列至少65%、至少75%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的HVR-L2氨基酸序列区域。在一些实施方案中,抗体衍生物包含与如以SEQ

ID NO:70-81中的任一者阐述的氨基酸序列至少65%、至少75%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一的HVR-L3氨基酸序列区域。

[0183] 在一些特定实施方案中,衍生物包含对如以SEQ ID NO:18-107中的任一者阐述的氨基酸序列的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个保守性或非保守性取代,和/或1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个添加和/或缺失。

[0184] 氨基酸取代涵盖保守性取代与非保守性取代两者。术语“保守性氨基酸取代”意指一个氨基酸被另一氨基酸替换,其中两个氨基酸在某些物理化学性质方面具有类似性,所述物理化学性质诸如所涉及残基的极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性和/或两亲性质。举例来说,取代通常可在以下群组中的每一者内进行:(a)非极性(疏水性)氨基酸,诸如丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和甲硫氨酸;(b)极性中性氨基酸,诸如甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺;(c)带正电荷(碱性)氨基酸,诸如精氨酸、赖氨酸和组氨酸;和(d)带负电荷(酸性)氨基酸,诸如天冬氨酸和谷氨酸。

[0185] 修饰可在抗体的氨基酸序列的任何位置中进行,包括HVR、框架区或恒定区。在一个实施方案中,本公开提供了一种含有本公开的说明性抗体的 V_H 和 V_L HVR序列,但含有与所述说明性抗体的那些框架序列不同的框架序列的抗体衍生物。所述框架序列可从包括种系抗体基因序列的公共DNA数据库或公开参考文献获得。举例来说,人重链和轻链可变区基因的种系DNA序列可见于Genbank数据库中或“VBase”人种系序列数据库中(Kaba等, Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,U.S.Department of Health and Human Services,NIH出版号91-3242(1991);Tomlinson等,J.Mol.Biol.227:776-798(1992);以及Cox等,Eur.J.Immunol.24:827-836(1994))。可用于构建抗体衍生物的框架序列包括在结构上与由本公开的说明性抗体使用的框架序列类似的那些。举例来说,可将说明性抗体的HVR-H1、HVR-H2和HVR-H3序列以及HVR-L1、HVR-L2和HVR-L3序列移植于与见于框架序列所源于的种系免疫球蛋白基因中的框架区具有相同序列的框架区上,或可将HVR序列移植于相较于种系序列含有一个或多个突变的框架区上。

[0186] 在一些实施方案中,抗体衍生物是包含本公开的说明性抗体的氨基酸序列的嵌合抗体。在一个实例中,来自一种或多种说明性抗体的一个或多个HVR与来自非人动物诸如小鼠或大鼠的抗体的HVR组合。在另一实例中,嵌合抗体的HVR全都源于一种或多种说明性抗体。在一些特定实施方案中,嵌合抗体包含一个、两个或三个来自说明性抗体的重链可变区的HVR和/或一个、两个或三个来自说明性抗体的轻链可变区的HVR。嵌合抗体可使用本领域中已知的常规方法产生。

[0187] 另一类型的修饰是使 V_H 和/或 V_L 链的HVR区内的氨基酸残基突变。可进行定点诱变或PCR介导的诱变以引入一个或多个突变,并且可在本领域中已知的体外或体内测定中评估对抗体结合或其他目标功能性质的影响。通常,引入保守性取代。突变可为氨基酸添加和/或缺失。此外,通常改变HVR区内的至多一个、两个、三个、四个或五个残基。在一些实施方案中,抗体衍生物在重链HVR中和/或在轻链HVR中包含1、2、3或4个氨基酸取代。在另一实施方案中,氨基酸取代是使抗体中的一个或多个半胱氨酸变为另一残基,诸如不限于丙氨酸或丝氨酸。半胱氨酸可为典型或非典型半胱氨酸。在一个实施方案中,相对于说明性抗体

的氨基酸序列,抗体衍生物在重链HVR区中具有1、2、3或4个保守性氨基酸取代。

[0188] 还可对V_H和/或V_L区内的框架残基进行修饰。通常,制备所述框架变体以降低抗体的免疫原性。一种方法是使一个或多个框架残基“回复突变”成相应种系序列。已经受体细胞突变的抗体可含有不同于抗体所源于的种系序列的框架残基。可通过将抗体框架序列与抗体所源于的种系序列进行比较来鉴定所述残基。为使框架区序列返回至它们的种系配置,可通过例如定点诱变或PCR介导的诱变使体细胞突变“回复突变”成种系序列。

[0189] 此外,还可在说明性抗体的Fc区内进行修饰,通常用以改变抗体的一种或多功能性性质,诸如血清半衰期、补体固定、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞性细胞毒性。在一个实例中,修饰CH1的铰链区以使铰链区中半胱氨酸残基的数目被改变,例如增加或降低。这个方法进一步描述于美国专利号5,677,425中。改变CH1的铰链区中半胱氨酸残基的数目以例如有助于轻链和重链的组装或以增加或降低抗体的稳定性。在另一情况下,使抗体的Fc铰链区突变以降低所述抗体的生物半衰期。

[0190] 此外,可根据本领域中已知的常规实验来修饰本公开的抗体以改变它的潜在糖基化位点或样式。在另一方面,本公开提供了CTLA4抗体的在轻链或重链的可变区中含有至少一个改变所述可变区中的糖基化样式的突变的衍生物。这种抗体衍生物就结合抗原来说可具有增加的亲和力和/或改变的特异性。突变可在V区中添加新糖基化位点,改变一个或多个V区糖基化位点的位置,或移除预先存在的V区糖基化位点。在一个实施方案中,本公开提供了在重链可变区中在天冬酰胺处具有潜在N连接的糖基化位点的CTLA4抗体的衍生物,其中在一个重链可变区中的所述潜在N连接的糖基化位点被移除。在另一实施方案中,本公开提供了在重链可变区中在天冬酰胺处具有潜在N连接的糖基化位点的CTLA4抗体的衍生物,其中在两个重链可变区中的所述潜在N连接的糖基化位点被移除。改变抗体的糖基化样式的方法在本领域中是已知的,诸如美国专利号6,933,368中所述的那些方法,所述美国专利的公开内容以引用的方式并入本文。

[0191] 在另一方面,本公开提供了一种包含如本文所述的CTLA4抗体或其抗原结合片段连接于额外分子实体的抗体衍生物。额外分子实体的实例包括药物制剂、肽或蛋白质、检测剂或标记、以及抗体。

[0192] 在一些实施方案中,抗体衍生物包含本公开的抗体连接于药物制剂。药物制剂的实例包括细胞毒性剂或其他癌症治疗剂以及放射性同位素。细胞毒性剂的特定实例包括紫杉醇(taxol)、细胞松弛素B(cytochalasin B)、短杆菌肽D(gramicidin D)、溴化乙锭(ethidium bromide)、吐根碱(emetine)、丝裂霉素(mitomycin)、依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(tenoposide)、长春新碱(vincristine)、长春花碱(vinblastine)、秋水仙碱(colchicin)、多柔比星(doxorubicin)、柔红霉素(daunorubicin)、二羟基蒽蒽菌素二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌(mitoxantrone)、米拉霉素(mithramycin)、放线菌素D(actinomycin D)、1-脱氢睾酮(1-dehydrotestosterone)、糖皮质激素(glucocorticoids)、普鲁卡因(procaine)、四卡因(tetracaine)、利多卡因(lidocaine)、普萘洛尔(propranolol)和嘌呤霉素(puromycin)以及它们的类似物或同源物。治疗剂还包括例如抗代谢剂(antimetabolite)(例如甲氨蝶呤(methotrexate)、6-巯基嘌呤(6-mercaptapurine)、6-硫鸟嘌呤(6-thioguanine)、阿糖胞苷(cytarabine)、5-氟尿嘧啶(5-fluorouracil)、达卡巴嗪(decarbazine))、烷基化剂(例如二氯甲基二乙胺

(mechlorethamine)、塞替派(thioepa)、苯丁酸氮芥(chlorambucil)、美法仑(melphalan)、卡莫司汀(carmustine)(BSNU)和洛莫司汀(lomustine)(CCNU)、环磷酰胺(cyclophosphamide)、白消安(busulfan)、二溴甘露醇(dibromomannitol)、链脲佐菌素(streptozotocin)、丝裂霉素C(mitomycin C)和顺式二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂、蒽环霉素(anthracycline)(例如柔红霉素(先前称为道诺霉素)和多柔比星)、抗生素(例如更生霉素(dactinomycin)(先前称为放线菌素(actinomycin))、博莱霉素(bleomycin)、米拉霉素(mithramycin)和安曲霉素(anthracycline)(AMC))、以及抗有丝分裂剂(例如长春新碱和长春花碱)。可缀合于抗体以进行诊断或治疗使用的放射性同位素的实例包括但不限于碘¹³¹、铟¹¹¹、钇⁹⁰和镱¹⁷⁷。用于使抗体连接于药物制剂的方法在本领域中是已知的,诸如使用各种接头技术。接头类型的实例包括脲、硫醚、酯、二硫醚和含肽接头。对于用于使治疗剂连接于抗体的接头和方法的进一步讨论,参见例如Saito等,Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215 (2003); Trail等, Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337 (2003); Payne, Cancer Cell 3:207-212 (2003); Allen, Nat. Rev. Cancer 2:750-763 (2002); Pastan和Kreitman, Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091 (2002); Senter和Springer (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264。

[0193] 在一些实施方案中,抗体衍生物是作为CTLA4抗体的多聚形式的CTLA4抗体多聚体,诸如抗体二聚体、三聚体、或单体抗体的更高级寡聚物。抗体多聚体内的单个单体可为相同的或不同的。此外,多聚体内的单个抗体可具有相同或不同结合特异性。抗体的多聚化可通过抗体的天然聚集来实现。举例来说,一定百分比的纯化抗体制剂(例如纯化IgG4分子)自发地形成含有抗体同二聚体以及其他更高级抗体多聚体的蛋白质聚集物。或者,抗体同二聚体可通过本领域中已知的化学连接技术,诸如通过使用交联剂来形成。适合交联剂包括具有异双官能性,即具有由适当间隔体分隔的两个独特反应性基团的那些(诸如间顺丁烯二酰亚胺基苯甲酰基-N-羟基丁二酰亚胺酯、4-(顺丁烯二酰亚胺基甲基)环己烷-1-甲酸丁二酰亚胺酯、以及S-乙酰基硫基-乙酸N-丁二酰亚胺酯),或具有同双官能性的那些(诸如辛二酸二丁二酰亚胺酯)。所述接头可从例如Pierce Chemical Company, Rockford, IL商购获得。还可通过本领域中已知的重组DNA技术使抗体多聚化。

[0194] 由本公开提供的其他抗体衍生物的实例包括单链抗体、微型双功能抗体、结构域抗体、纳米抗体和单抗体。“单链抗体”(scFv)由包含V_L结构域连接于V_H结构域的单一多肽链组成,其中V_L结构域和V_H结构域配对以形成单价分子。单链抗体可根据本领域中已知的方法制备(参见例如Bird等,(1988) Science 242:423-426以及Huston等,(1988) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883)。“微型双功能抗体”由两个链组成,每个链在同一多肽链上包含重链可变区连接于轻链可变区,由短肽接头连接,其中在同一链上的两个区域不彼此配对,而是与在另一链上的互补性结构域配对以形成双特异性分子。制备微型双功能抗体的方法在本领域中是已知的(参见例如Holliger P.等,(1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448以及Poljak R. J.等,(1994) Structure 2:1121-1123)。结构域抗体(dAb)是抗体的小型功能性结合单元,对应于抗体的重链或轻链的可变区。结构域抗体在细菌、酵母和哺乳动物细胞系统中良好表达。结构域抗体及其产生方法的其他细节在本领域中是已知的(参见例如美国专利号6,291,158;6,582,915;6,593,081;6,172,197;6,696,245;欧洲专利0368684和0616640;W005/035572、W004/101790、W004/

081026、W004/058821、W004/003019和W003/002609)。纳米抗体源于抗体的重链。纳米抗体通常包含单一可变结构域和两个恒定结构域(CH2和CH3),并且保留原始抗体的抗原结合能力。纳米抗体可通过本领域中已知的方法制备(参见例如美国专利号6,765,087、美国专利号6,838,254、W0 06/079372)。单抗体由IgG4抗体的一个轻链和一个重链组成。单抗体可通过移除IgG4抗体的铰链区来制备。单抗体以及制备它们的方法的其他细节可见于W02007/059782中。

[0195] IV. 靶向CTLA4的可活化结合多肽

[0196] 本公开还部分地涉及结合人CTLA4的精准/情形依赖性可活化结合多肽(即可活化抗体),包括包含本文所述的任何抗CTLA4抗体(例如抗CTLA4抗体、抗CTLA4抗体结合片段和/或抗CTLA4抗体衍生物)的可活化抗体;可活化抗CTLA4抗体的抗原结合片段和/或可活化抗CTLA4抗体的衍生物。在一些实施方案中,本文所述的可活化抗CTLA4抗体可具有改进的安全性概况。举例来说,本文所述的抗CTLA4抗体可具有更好的安全界限,如通过脾重量变化所评估。脾尺寸随着所施用药物剂量的增加而发生的变化被用作用以评估所用药物候选物的安全界限的基准。如图48A-图48B中所示,相对于亲本抗体(不具有掩蔽部分的抗体),本文所述的可活化抗CTLA4抗体具有更好安全界限。

[0197] 在一些实施方案中,本公开的可活化抗体包含:(a)掩蔽部分(MM);(b)可裂解部分(CM);和(c)靶标结合部分(TBM)。在一些实施方案中,MM是本文所述的任何掩蔽部分。在一些实施方案中,CM是本文所述的任何可裂解部分。在一些实施方案中,TBM是本文所述的任何靶标结合部分(例如包含抗体轻链可变区和/或抗体重链可变区诸如本文所述的任何抗CTLA4抗体的VH和/或VL的靶标结合部分(TBM))。在一些实施方案中,当CM未被裂解时,MM干扰和/或抑制可活化抗体与它的靶标(例如人CTLA4或人CD137)的结合。在一些实施方案中,当CM被裂解时,可活化抗体能够结合它的靶标(例如人CTLA4或人CD137)。

[0198] 在一些实施方案中,可活化抗体包含:(a)多肽,所述多肽从N末端至C末端包含掩蔽部分(MM)、可裂解部分(CM)和靶标结合部分(TBM),其中所述MM是本文所述的任何掩蔽部分,所述CM是本文所述的任何可裂解部分,并且其中所述TBM包含抗体轻链可变区(VL);和(b)抗体重链可变区(VH)。

[0199] 在一些实施方案中,可活化抗体包含:(a)多肽,所述多肽从N末端至C末端包含掩蔽部分(MM)、可裂解部分(CM)和靶标结合部分(TBM),其中所述MM是本文所述的任何掩蔽部分,所述CM是本文所述的任何可裂解部分,并且其中所述TBM包含抗体重链可变区(VH);和(b)抗体轻链可变区(VL)。

[0200] 在一些实施方案中,可活化抗体包含:多肽,所述多肽从N末端至C末端包含掩蔽部分(MM)、可裂解部分(CM)和靶标结合部分(TBM),其中所述MM是本文所述的任何掩蔽部分,所述CM是本文所述的任何可裂解部分,并且其中所述TBM包含抗体重链可变区(VH)和抗体轻链可变区(VL)。

[0201] 术语“可活化结合多肽”、“ABP”或“可活化抗体”包括包含靶标结合部分(TBM)、可裂解部分(CM)和掩蔽部分(MM)的多肽。在一些实施方案中,TBM包含结合靶标的氨基酸序列。在一些实施方案中,TBM包含抗体或其抗体片段(例如本文所述的任何抗体或抗原结合片段)的抗原结合结构域(ABD)。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含含有本文所述的重链可变区HVR中的一者、两者或三者的重链可变区,以及含有本文所述的轻链可变区HVR

中的一者、两者或三者的轻链可变区(例如如表A中所示的重链可变区HVR序列中的一者、两者或三者,和/或轻链可变区HVR序列中的一者、两者或三者,包括如表A中所示的任何示例性抗体的全部六个HVR)。在一些实施方案中,抗原结合结构域包含含有本文所述的任何重链可变区序列的重链可变区,以及含有本文所述的任何轻链可变区序列的轻链可变区(例如如表B中所示的重链可变区序列和/或轻链可变区序列)。在一些实施方案中,TBM(例如包含ABD)包含抗体轻链可变区(VL)和抗体重链可变区(VH),其中所述VH和所述VL形成在不存在于MM下结合靶标的结合结构域。在一些实施方案中,VH和VL共价连接,例如在scFv中。在一些实施方案中,VH和VL不共价连接。在一些实施方案中,VH和VL形成Fab片段。在一些实施方案中,VH连接于抗体重链恒定区,并且VL连接于抗体轻链恒定区。

[0202] 在一些实施方案中,可活化抗体包含从N末端至C末端包含以下结构的多肽:掩蔽部分(MM)-可裂解部分(CM)-VL,并且可活化抗体还包含第二多肽,所述第二多肽包含VH(例如Fab片段)。在一些实施方案中,可活化抗体包含从N末端至C末端包含以下结构的多肽:掩蔽部分(MM)-可裂解部分(CM)-VL-VH(例如scFv)。在一些实施方案中,可活化抗体包含从N末端至C末端包含以下结构的多肽:掩蔽部分(MM)-可裂解部分(CM)-VH,并且可活化抗体还包含第二多肽,所述第二多肽包含VL(例如Fab片段)。在一些实施方案中,可活化抗体包含从N末端至C末端包含以下结构的多肽:掩蔽部分(MM)-可裂解部分(CM)-VH-VL(例如scFv)。

[0203] CM通常包括可裂解的,例如充当酶的底物的氨基酸序列,和/或能够形成可还原二硫键的半胱氨酸-半胱氨酸配对。因此,当术语“裂解”、“可裂解”、“经裂解”等与CM关联使用时,所述术语涵盖例如由蛋白酶达成的酶促裂解,以及通过可由暴露于还原剂所致的二硫键还原来破坏半胱氨酸-半胱氨酸配对之间的二硫键。

[0204] MM是指当可活化抗体的CM是完整的(例如未由相应酶裂解,和/或含有未还原半胱氨酸-半胱氨酸二硫键)时,MM干扰或抑制TBM与它的靶标的结合的氨基酸序列。在一些实施方案中,MM如此高效地干扰或抑制TBM与它的靶标的结合,以致TBM与它的靶标的结合是极低的和/或在检测限以下(例如结合不能在ELISA或流式细胞计量术测定中检测到)。CM的氨基酸序列可与MM重叠,或包括在MM内。应注意,为方便起见,“ABP”或“可活化抗体”在本文中用于指代处于它们的未裂解(或“天然”)状态以及处于它们的经裂解状态的ABP或可活化抗体。将为普通技术人员显而易见的是,在一些实施方案中,经裂解ABP可由于例如由蛋白酶对CM的裂解而缺乏MM,所述裂解导致释放至少所述MM(例如当所述MM不通过共价键(例如半胱氨酸残基之间的二硫键)接合于ABP时)。示例性ABP在以下更详细描述。

[0205] 在一些实施方案中,掩蔽部分(MM)干扰、阻碍靶标结合部分结合它的靶标,降低靶标结合部分结合它的靶标的能力,阻止、抑制靶标结合部分结合它的靶标,或与靶标结合部分竞争结合它的靶标(例如“非活性”可活化抗体)。在一些实施方案中,掩蔽部分(MM)仅当多肽尚未被活化(例如通过pH变化(增加或降低)而活化,通过温度变动(增加或降低)而活化,在与第二分子(诸如小分子或蛋白质配体)接触之后而活化等)时干扰、阻碍、降低、阻止、抑制靶标结合部分结合它的靶标,或与靶标结合部分竞争结合它的靶标。在一些实施方案中,活化诱导在裂解部分内对多肽的裂解。在一些实施方案中,活化诱导多肽的构象变化(例如掩蔽部分(MM)的移位),从而导致掩蔽部分不再阻止可活化抗体结合它的靶标。在一些实施方案中,掩蔽部分(MM)仅当可裂解部分(CM)尚未由一种或多种在可裂解部分(CM)内进行裂解的蛋白酶裂解时干扰、阻碍靶标结合部分结合它的靶标,降低靶标结合部分结合

它的靶标的能力,阻止、抑制靶标结合部分结合它的靶标,或与靶标结合部分竞争结合它的靶标。在一些实施方案中,在活化之前,掩蔽部分(MM)具有至少约2.0(例如至少约2.0、至少约3.0、至少约4.0、至少约5.0、至少约6.0、至少约7.0、至少约8.0、至少约9.0、至少约10、至少约25、至少约50、至少约75、至少约100、至少约150、至少约200、至少约300、至少约400、至少约500等)的掩蔽效率。在一些实施方案中,掩蔽效率测量为包含掩蔽部分(MM)的可活化抗体结合它的靶标的亲和力(在活化之前)相对于缺乏掩蔽部分的多肽结合它的靶标的亲和力的差异(例如包含掩蔽部分(MM)的可活化抗体(在活化之前)相对于缺乏掩蔽部分(MM)的亲本抗体,在对靶标抗原(诸如CTLA4)的亲和力方面的差异,或包含掩蔽部分(MM)的可活化抗体对靶标抗原(诸如CTLA4)的亲和力(在活化之前)相对于所述可活化抗体在活化之后对所述靶标抗原的亲和力的差异。)。在一些实施方案中,掩蔽效率通过用包含掩蔽部分(MM)的可活化抗体的结合的 EC_{50} (在活化之前)除以亲本抗体的 EC_{50} 来测量(例如通过用ELISA测量 EC_{50} ;参见例如实施例8的方法)。在一些实施方案中,掩蔽效率测量为包含掩蔽部分(MM)的可活化抗体在活化之前结合它的靶标的亲和力相对于包含掩蔽部分(MM)的可活化抗体在活化之后结合它的靶标的亲和力的差异(例如可活化抗体在活化之前相对于所述可活化抗体在活化之后,在对靶标抗原(诸如CTLA4)的亲和力方面的差异)。在一些实施方案中,掩蔽部分(MM)结合靶标结合部分(TBM),并且阻止可活化抗体结合它的靶标(例如“非活性”可活化抗体)。在一些实施方案中,掩蔽部分(MM)具有的关于结合靶标结合部分(TBM)的解离常数大于靶标结合部分(TBM)关于它的靶标的解离常数。

[0206] 在一些实施方案中,在可活化抗体已被活化(例如通过用一种或多种在可裂解部分(CM)内进行裂解的蛋白酶处理而活化,通过pH变化(增加或降低)而活化,通过温度变动(增加或降低)而活化,在与第二分子(诸如酶或蛋白质配体)接触之后而活化等)之后,掩蔽部分(MM)不干扰、阻碍靶标结合部分(TBM)结合它的靶标,降低靶标结合部分(TBM)结合它的靶标的能力,阻止、抑制靶标结合部分(TBM)结合它的靶标,或与靶标结合部分(TBM)竞争结合它的靶标。在一些实施方案中,在可裂解部分(CM)已由一种或多种在可裂解部分(CM)内进行裂解的蛋白酶裂解之后,掩蔽部分(MM)不干扰、阻碍靶标结合部分(TBM)结合它的靶标,降低靶标结合部分(TBM)结合它的靶标的能力,阻止、抑制靶标结合部分(TBM)结合它的靶标,或与靶标结合部分(TBM)竞争结合它的靶标。在一些实施方案中,在活化之后,掩蔽部分(MM)具有至多约1.75(例如至多约1.75、至多约1.5、至多约1.4、至多约1.3、至多约1.2、至多约1.1、至多约1.0、至多约0.9、至多约0.8、至多约0.7、至多约0.6或至多约0.5等)的掩蔽效率(例如相较于亲本抗体的亲和力,可活化抗体在活化之后的相对亲和力)。

[0207] 在一些实施方案中,本公开的可活化抗体含有在固定位置处包含一对半胱氨酸残基以确保可活化抗体具有受约束构象,和/或具有少许或不具有化学不稳定残基(诸如甲硫氨酸或色氨酸)的掩蔽部分(MM)。有利的是,在固定位置处包括一对半胱氨酸残基确保了可活化抗体具有受约束构象,从而倾向于展现增加的结合亲和力和/或特异性。此外,本公开的可活化抗体包括具有少许乃至不具有不利于制造过程的残基诸如甲硫氨酸或色氨酸的掩蔽部分。

[0208] 在一些实施方案中,本公开的可活化抗体具有情形依赖性(例如在某些情形下(诸如在富含蛋白酶的肿瘤微环境中)是活化的(仅能够结合它们的靶标))。在一些实施方案中,本公开的可活化抗体提供优于更加传统的非可活化抗体的改进的安全性(例如显示毒

性降低,不诱导对许多器官的体重的显著改变,不改变肝组织病理学、血液学和/或血液生物化学等)。在一些实施方案中,相较于更加传统的非可活化抗体,本公开的可活化抗体具有改进的药物代谢动力学性质(例如具有更久体内半衰期)。

[0209] 抗CTLA4可活化抗体活性

[0210] 在一些实施方案中,本公开涉及当呈活性形式时结合人CTLA4的可活化抗体(例如可活化抗体在可裂解部分中裂解(例如被一种或多种蛋白酶)之后具有活性,但在可裂解部分中裂解(例如被一种或多种蛋白酶)之前是非活性的)。在一些实施方案中,当呈活性形式时,可活化抗体具有以下功能性质中的至少一者(例如至少一者、至少两者、至少三者、至少四者、至少五者、至少六者、至少七者、至少八者或全部九者): (a) 以500nM或更小例如约10nM或更小的 K_D 结合人、食蟹猴、小鼠、大鼠和/或狗CTLA4; (b) 对人CTLA4具有拮抗活性; (c) 在多达100nM的浓度下不结合人PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG3、TIM3、B7-H3、CD95、CD120a、OX40、CD40、BTLA、VISTA、ICOS和/或B7-H4; (d) 与猴、小鼠、大鼠和/或狗CTLA4具有交叉反应性; (e) 诱导ADCC效应(例如对Treg); (f) 使人PBMC活化(例如刺激IL-2和/或IFN γ 的分泌); (g) 能够抑制肿瘤细胞生长; (h) 对癌症具有治疗作用;和(i) 抑制人CTLA4与人CD80和/或人CD86的结合。本文还提供了一种或多种与本文所述的靶向CTLA4的可活化抗体和/或抗CTLA4抗体中的一者或多者竞争或交叉竞争结合人CTLA4的可活化抗体。

[0211] 在一些实施方案中,当呈非活性形式时,可活化抗体以约500nM或更大的 K_D 结合人、食蟹猴、小鼠、大鼠和/或狗CTLA4。在一些实施方案中,当呈活性形式时,可活化抗体以约500nM或更小(例如约500nM或更小、约450nM或更小、约400nM或更小、约350nM或更小、约300nM或更小、约250nM或更小、约200nM或更小、约150nM或更小、约100nM或更小、约90nM或更小、约80nM或更小、约70nM或更小、约60nM或更小、约50nM或更小、约40nM或更小、约30nM或更小、约25nM或更小、约20nM或更小、约10nM或更小、约1nM或更小、约0.1nM或更小等)的 K_D 结合人、食蟹猴、小鼠、大鼠和/或狗CTLA4。在一些实施方案中,当呈活性形式时,可活化抗体以约350nM或更小的 K_D 结合人、食蟹猴、小鼠、大鼠和/或狗CTLA4。在一些实施方案中,当呈活性形式时,可活化抗体以约100nM或更小的 K_D 结合人CTLA4。在一些实施方案中,当呈活性形式时,可活化抗体以约50nM或更小的 K_D 结合人CTLA4。在一些实施方案中,当呈活性形式时,可活化抗体以约10nM或更小的 K_D 结合人CTLA4。测量可活化抗体的 K_D 的方法可使用本领域中已知的任何方法进行,包括例如通过表面等离子体共振、ELISA、等温滴定量热法、滤膜结合测定、EMSA等。在一些实施方案中, K_D 通过ELISA测量(参见例如以下实施例)。

[0212] 在一些实施方案中,当呈非活性形式时,可活化抗体不对人CTLA4具有拮抗活性。在一些实施方案中,当呈活性形式时,可活化抗体对人CTLA4具有拮抗活性(例如诱导ADCC效应(诸如针对Treg),使PBMC活化(诸如通过对IL-2和/或IFN γ 分泌进行活化、诱导和/或刺激),阻断人CTLA4与人CD80和/或人CD86的结合等)。在一些实施方案中,当呈活性形式时,可活化抗体阻遏人CTLA4的一种或多种活性(例如当表达人CTLA4的细胞(诸如人细胞)由可活化抗体接触时,阻遏人CTLA4的一种或多种活性)。

[0213] 在一些实施方案中,当呈非活性形式时,可活化抗体不与猴(例如食蟹猴)、小鼠、大鼠和/或狗CTLA4具有交叉反应性。在一些实施方案中,当呈活性形式时,可活化抗体与猴(例如食蟹猴)、小鼠、大鼠和/或狗CTLA4具有交叉反应性。在一些实施方案中,当呈活性形式时,可活化抗体与猴CTLA4具有交叉反应性。在一些实施方案中,当呈活性形式时,可活化

抗体与小鼠CTLA4具有交叉反应性。在一些实施方案中,当呈活性形式时,可活化抗体与大鼠CTLA4具有交叉反应性。在一些实施方案中,当呈活性形式时,可活化抗体与狗CTLA4具有交叉反应性。在一些实施方案中,当呈活性形式时,可活化抗体与猴和小鼠CTLA4;猴和大鼠CTLA4;猴和狗CTLA4;小鼠和大鼠CTLA4;小鼠和狗CTLA4;大鼠和狗CTLA4;猴、小鼠和大鼠CTLA4;猴、小鼠和狗CTLA4;猴、大鼠和狗CTLA4;小鼠、大鼠和狗CTLA4;或猴、小鼠、大鼠和狗CTLA4具有交叉反应性。在一些实施方案中,当呈活性形式时,可活化结合多肽在约350nM下(例如在约1nM下,在约10nM下,在约25nM下,在约50nM下,在约75nM下,在约100nM下,在约150nM下,在约200nM下,在约250nM下,在约300nM下,在约350nM下)具有交叉反应性。测量交叉反应性的方法在本领域中是已知的,包括但不限于表面等离子体共振、ELISA、等温滴定量热法、滤膜结合测定、EMSA等。

[0214] 在一些实施方案中,当呈非活性形式时,可活化抗体不诱导ADCC效应(例如针对CTLA4表达性人细胞诸如Treg)。在一些实施方案中,相较于对照结合多肽(例如亲本抗体),当呈非活性形式时,可活化抗体具有降低的ADCC效应(例如针对CTLA4表达性人细胞诸如Treg)。在一些实施方案中,当呈活性形式时,可活化抗体诱导ADCC效应(例如针对CTLA4表达性细胞诸如Treg)。测量ADCC效应的方法(例如体外方法)在本领域中是已知的,包括但不限于通过以下实施例所述的方法。在一些实施方案中,相对于对照(例如亲本抗体),当呈非活性形式时,可活化抗体诱导ADCC效应小于约10%(例如诱导ADCC小于约10%、小于约5%、小于约1%等)。在一些实施方案中,相对于对照(例如同种型对照),当呈活性形式时,可活化抗体诱导ADCC效应超过约10%(例如诱导ADCC超过约10%、超过约15%、超过约20%、超过约25%、超过约30%、超过约35%、超过约40%等)。

[0215] 在一些实施方案中,可活化抗体能够抑制肿瘤细胞生长和/或增殖。在一些实施方案中,相对于未与可活化抗体接触的相应肿瘤细胞(或相对于与同种型对照抗体接触的相应肿瘤细胞),当与可活化抗体接触时,肿瘤细胞生长和/或增殖被抑制至少约5%(例如至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约99%)。在一些实施方案中,当向受试者施用可活化抗体时,可活化抗体能够使所述受试者中的肿瘤体积降低。在一些实施方案中,相对于受试者中的初始肿瘤体积(例如在施用可活化抗体之前;相较于被施用同种型对照抗体的受试者中的相应肿瘤),可活化抗体能够使所述受试者中的肿瘤体积降低至少约5%(例如至少约5%、至少约10%、至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%或至少约99%)。监测肿瘤细胞生长/增殖、肿瘤体积和/或肿瘤抑制的方法在本领域中是已知的,包括例如通过以下实施例所述的方法。

[0216] 在一些实施方案中,可活化抗体对癌症具有治疗作用。在一些实施方案中,可活化抗体使癌症的一种或多种征象或症状减轻。在一些实施方案中,当被施用可活化抗体时,罹患癌症的受试者得到部分或完全缓解。

[0217] 在一些实施方案中,本公开提供了当呈活性形式时,与包含以下的抗体竞争或交叉竞争结合人CTLA4的经分离可活化抗体:a)含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的HVR-H1;含有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的HVR-H2;和含有SEQ ID NO:45的氨基酸序列的HVR-H3;和/或b)含有SEQ ID NO:58的氨基酸序列的HVR-L1;含有SEQ ID NO:66的氨基酸序列的HVR-L2;和含有SEQ ID NO:75的氨基酸序列的HVR-L3。在一些实施方案中,本公开提供了当呈活

性形式时,与包含以下的抗体竞争或交叉竞争结合人CTLA4的经分离可活化抗体:a)含有SEQ ID NO:87的氨基酸序列的重链可变区;和/或b)含有SEQ ID NO:100的氨基酸序列的轻链可变区。可活化抗体与抗体竞争或交叉竞争结合的能力可使用本领域中已知的标准结合测定诸如BIAcore分析、ELISA测定或流式细胞计量术来测定。举例来说,可使抗体(例如如上所述)在饱和条件下结合人CTLA4,接着测量测试可活化抗体(当呈活性形式时)结合CTLA4的能力。如果测试可活化抗体能够与抗体同时结合CTLA4,那么测试可活化抗体与抗体结合不同表位。然而,如果测试可活化抗体不能同时结合CTLA4,那么测试可活化抗体结合相同表位、重叠表位、或紧密邻近于由抗体结合的表位的表位。这个实验可使用各种方法诸如ELISA、RIA、FACS或表面等离子体共振来进行。

[0218] 在一些实施方案中,可活化抗体(当呈非活性形式时)不抑制CTLA4与它的结合配偶体中的一者或多者(例如人CTLA4与人CD80、人CTLA4与人CD86)之间的结合。在一些实施方案中,可活化抗体(当呈活性形式时)抑制CTLA4与它的结合配偶体中的一者或多者(例如人CTLA4与人CD80、人CTLA4与人CD86)之间的结合。在一些实施方案中,可活化抗体在体外抑制CTLA4与它的配体之间的结合。在一些实施方案中,对于抑制CTLA4与CD80和/或CD86的结合,可活化抗体具有约500nM或更小(例如约500nM或更小、约400nM或更小、约300nM或更小、约200nM或更小、约100nM或更小、约50nM或更小、约25nM或更小、约10nM或更小、约1nM或更小等)的半数最大抑制浓度(IC₅₀)。在一些实施方案中,对于抑制CTLA4与CD80和/或CD86的结合,可活化抗体具有约100nM或更小的半数最大抑制浓度(IC₅₀)。在一些实施方案中,当在约100nM或更大(例如约100nM或更大、约500nM或更大、约1μM或更大、约10μM或更大等)的浓度下提供时,可活化抗体完全抑制人CTLA4与CD80和/或CD86的结合。如本文所用,术语“完全抑制(complete inhibiting/completely inhibits)”是指可活化抗体能够使第一蛋白与第二蛋白之间的结合降低至少约80%(例如至少约80%、至少约85%、至少约90%、至少约95%、至少约99%等)。测量多肽抑制第一蛋白(例如人CTLA4)和第二蛋白(例如人CD80或人CD86)的的结合的能力的方法在本领域中是已知的,包括但不限于通过BIAcore分析、ELISA测定和流式细胞计量术。

[0219] 掩蔽部分(MM)

[0220] 在一些实施方案中,本公开涉及包含掩蔽部分(MM)的可活化抗体。在一些实施方案中,掩蔽部分(MM)包含根据式(XVIII):X_mCX_nCZ_o(SEQ ID NO:134)的氨基酸序列,其中m是2-10,n是3-10,并且o是1-10,其中每个X独立地是选自由A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W和Y组成的组的氨基酸,并且其中每个Z独立地是选自由D、A、Y、S、T、N、I、L、F、V、H和P组成的组的氨基酸。在一些实施方案中,X不是W、M和/或C。在一些实施方案中,式(XVIII)的X_m中的每个X独立地是选自由D、A、Y、S、T、N、I、L、F、V、H和P组成的组的氨基酸,和/或式(XVIII)的X_n中的每个X独立地是选自由D、A、Y、S、T、N、I、L、F、V、H和P组成的组的氨基酸。在一些实施方案中,MM包含由根据式(XX):(NNK)_mTGY(NNK)_nTGY(NHC)_o(SEQ ID NO:136)的多核苷酸序列编码的多肽,其中每个N独立地是A、G、T或C,其中每个K独立地是T或G,其中每个Y独立地是T或C,并且其中每个H独立地是A、T或C。

[0221] 在一些实施方案中,掩蔽部分(MM)包含根据式(XIX):Z_mCZ_nCZ_o(SEQ ID NO:135)的氨基酸序列,其中m是2-10,n是3-10,并且o是1-10,并且每个Z独立地是选自由D、A、Y、S、T、N、I、L、F、V、H和P组成的组的氨基酸。

[0222] 在一些实施方案中,m是2-10、2-9、2-8、2-7、2-6、2-5、2-4、2-3、3-10、3-9、3-8、3-7、3-6、3-5、3-4、4-10、4-9、4-8、4-7、4-6、4-5、5-10、5-9、5-8、5-7、5-6、6-10、6-9、6-8、6-7、7-10、7-9、7-8、8-10、8-9、或9-10。在一些实施方案中,m是6-8。在一些实施方案中,m是3、4、5、6、7、8、9或10。在一些实施方案中,m是6。

[0223] 在一些实施方案中,n是3-10、3-9、3-8、3-7、3-6、3-5、3-4、4-10、4-9、4-8、4-7、4-6、4-5、5-10、5-9、5-8、5-7、5-6、6-10、6-9、6-8、6-7、7-10、7-9、7-8、8-10、8-9、或9-10。在一些实施方案中,n是6-8。在一些实施方案中,n是3、4、5、6、7、8、9或10。在一些实施方案中,n是6。在一些实施方案中,n是8。

[0224] 在一些实施方案中,o是1-10、1-9、1-8、1-7、1-6、1-5、1-4、1-3、1-2、2-10、2-9、2-8、2-7、2-6、2-5、2-4、2-3、3-10、3-9、3-8、3-7、3-6、3-5、3-4、4-10、4-9、4-8、4-7、4-6、4-5、5-10、5-9、5-8、5-7、5-6、6-10、6-9、6-8、6-7、7-10、7-9、7-8、8-10、8-9、或9-10。在一些实施方案中,o是1-2。在一些实施方案中,o是1、2、3、4、5、6、7、8、9或10。在一些实施方案中,o是2。

[0225] 在一些实施方案中,掩蔽部分(MM)包含根据式(XXI): $Z_6CX_6CZ_2$ (SEQ ID NO:137)的氨基酸序列,其中每个X独立地是选自由A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W和Y组成的组的氨基酸,并且其中每个Z独立地是选自由D、A、Y、S、T、N、I、L、F、V、H和P组成的组的氨基酸。

[0226] 在一些实施方案中,掩蔽部分(MM)包含根据式(XXII): $Z_6CX_8CZ_2$ (SEQ ID NO:138)的氨基酸序列,其中每个X独立地是选自由A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W和Y组成的组的氨基酸,并且其中每个Z独立地是选自由D、A、Y、S、T、N、I、L、F、V、H和P组成的组的氨基酸。

[0227] 在一些实施方案中,第一肽(FP)包含根据式(XXIII): $(Z_6)_C(Z_6)_C(Z_2)$ (SEQ ID NO:139)的氨基酸序列,其中每个Z独立地是选自由D、A、Y、S、T、N、I、L、F、V、H和P组成的组的氨基酸。

[0228] 在一些实施方案中,掩蔽部分(MM)包含根据式(XXIV): $(Z_6)_C(Z_8)_C(Z_2)$ (SEQ ID NO:140)的氨基酸序列,其中每个Z独立地是选自由D、A、Y、S、T、N、I、L、F、V、H和P组成的组的氨基酸。在一些实施方案中,可活化抗体包含含有选自由 $X_{\text{m}}\text{CPDHPYPCXX}$ (SEQ ID NO:181)、 $X_{\text{m}}\text{CDAFYPCXX}$ (SEQ ID NO:182)、 $X_{\text{m}}\text{CDSHPYPCXX}$ (SEQ ID NO:183)和 $X_{\text{m}}\text{CVPYYYACXX}$ (SEQ ID NO:184)组成的组的序列的掩蔽部分(MM),其中m是2-10,并且其中每个X独立地是选自由A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W和Y组成的组的氨基酸。在一些实施方案中,可活化抗体包含含有序列EVGSYNFVADSCPDHPYPCSA (SEQ ID NO:189)、EVGSYIVHSDCDAFYPCDS (SEQ ID NO:190)、EVGSYYSAYPACDSHPYPCNS (SEQ ID NO:191)、EVGSYPNPSSDCVPYYYACAY (SEQ ID NO:192)、EVGSYYSAYPACDSHPYPCQS (SEQ ID NO:193)、EVGSYPQPSSDCVPYYYACAY (SEQ ID NO:195)或EVGSYPNPASDCVPYYYACAY (SEQ ID NO:196)的掩蔽部分(MM)。在一些实施方案中,MM包含序列EDCVPYYYACAY (SEQ ID NO:213)、EVGSSDCVPYYYACAY (SEQ ID NO:214)、EDCDAFYPCDS (SEQ ID NO:215)或EVGHSDCDAFYPCDS (SEQ ID NO:216)。

[0229] 在一些实施方案中,掩蔽部分(MM)包含选自NFVADSCPDHPYPCSA (SEQ ID NO:141)、IVHSDCDAFYPCDS (SEQ ID NO:142)、YSAYPACDSHPYPCNS (SEQ ID NO:143)、PNPSSDCVPYYYACAY (SEQ ID NO:144)、YSAYPACDSHPYPCQS (SEQ ID NO:145)、

PQPSSDCVPYYACAY (SEQ ID NO:146) 和 PNPASDCVPYYACAY (SEQ ID NO:147) 的氨基酸序列。

[0230] 在一些实施方案中,本文所述的任何掩蔽部分 (MM) 都可还包含一个或多个额外氨基酸序列 (例如一个或多个多肽标签)。适合额外氨基酸序列的实例可包括不限于纯化标签 (诸如his标签、flag标签、麦芽糖结合蛋白和谷胱甘肽-S-转移酶标签)、检测标签 (诸如可以光度测量方式检测的标签 (例如红色或绿色荧光蛋白等))、具有可检测酶活性的标签 (例如碱性磷酸酶等)、含有分泌序列、前导序列和/或稳定化序列的标签、蛋白酶裂解位点 (例如弗林蛋白酶 (furin) 裂解位点、TEV裂解位点、凝血酶裂解位点) 等。在一些实施方案中,一个或多个额外氨基酸序列在掩蔽部分 (MM) 的N末端。在一些实施方案中,额外氨基酸序列包含序列EVGSY (SEQ ID NO:148) 或由序列EVGSY (SEQ ID NO:148) 组成。

[0231] 在一些实施方案中,在活化之前 (例如在用一种或多种在可裂解部分 (CM) 内进行裂解的蛋白酶处理之前,在经受 (局部) pH变化 (增加或降低) 之前,在温度变动 (增加或降低) 之前,在与第二分子 (诸如小分子或蛋白质配体) 接触之前,等),掩蔽部分结合靶标结合部分 (TBM),并且抑制可活化抗体结合它的靶标,但在活化之后 (例如在用一种或多种在可裂解部分 (CM) 内进行裂解的蛋白酶处理之后,在经受 (局部) pH变化 (增加或降低) 之后,在温度变动 (增加或降低) 之后,在与第二分子 (诸如小分子或蛋白质配体) 接触之后,等),不结合TBM和/或抑制可活化抗体结合它的靶标。在一些实施方案中,当CM未被裂解时,掩蔽部分 (MM) 抑制可活化抗体与它的靶标的结合,但当CM被裂解时,不抑制可活化抗体与它的靶标的结合。在一些实施方案中,掩蔽部分 (MM) 具有的关于结合TBM的解离常数大于可活化抗体关于它的靶标的解离常数 (当呈活性形式时) (例如是至少约1.5倍大、至少约2倍大、至少约2.5倍大、至少约3倍大、至少约3.5倍大、至少约4倍大、至少约4.5倍大、至少约5倍大、至少约10倍大、至少约100倍大、至少约500倍大等)。

[0232] 可裂解部分 (CM)

[0233] 在一些实施方案中,本公开涉及包含可裂解部分 (CM) 的可活化抗体。在一些实施方案中,通过用一种或多种在可裂解部分 (CM) 内进行裂解的蛋白酶处理,通过pH变化 (增加或降低),通过温度变动 (增加或降低),和/或通过与第二分子 (诸如小分子或蛋白质配体) 接触等来裂解和/或破坏可裂解部分 (CM)。

[0234] 在一些实施方案中,可裂解部分 (CM) 包含至少第一裂解位点 (CS₁) (例如第一蛋白酶裂解位点)。在一些实施方案中,第一裂解位点是第一蛋白酶裂解位点。可使用由本领域中已知的任何蛋白酶 (例如已知与包含CM的可活化抗体的靶标共定位的蛋白酶) 识别和/或裂解的任何适合蛋白酶裂解位点,包括例如由以下识别和/或裂解的蛋白酶裂解位点:尿激酶型纤维蛋白溶酶原活化因子 (uPA);基质金属蛋白酶 (例如MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-7、MMP-8、MMP-9、MMP-10、MMP-11、MMP-12、MMP-13、MMP-14、MMP-15、MMP-16、MMP-17、MMP-19、MMP-20、MMP-23、MMP-24、MMP-26和/或MMP-27);烟草蚀刻病毒 (TEV) 蛋白酶;纤维蛋白溶酶;凝血酶;PSA;PSMA;ADAMS/ADAMTS (例如ADAM8、ADAM9、ADAM10、ADAM12、ADAM15、ADAM17/TACE、ADAMDEC1、ADAMTS1、ADAMTS4和/或ADAMTS5);卡斯帕酶 (例如卡斯帕酶-1、卡斯帕酶-2、卡斯帕酶-3、卡斯帕酶-4、卡斯帕酶-5、卡斯帕酶-6、卡斯帕酶-7、卡斯帕酶-8、卡斯帕酶-9、卡斯帕酶-10、卡斯帕酶-11、卡斯帕酶-12、卡斯帕酶-13和/或卡斯帕酶-14);天冬氨酸蛋白酶 (例如RACE和/或肾素 (Renin));天冬氨酸组织蛋白酶 (例如组织蛋白酶D和/或组织蛋白酶E);半胱氨酸组织蛋白酶 (例如组织蛋白酶B、组织蛋白酶C、组织蛋白酶K、组织蛋白酶

L、组织蛋白酶S、组织蛋白酶V/L2和/或组织蛋白酶X/Z/P)；半胱氨酸蛋白酶(例如Cruzipain、豆荚蛋白(Legumain)和/或Otubain-2)；KLK(例如KLK4、KLK5、KLK6、KLK7、KLK8、KLK10、KLK11、KLK13和/或KLK14)；金属蛋白酶(例如穿膜肽酶(Mepprin)、中性溶酶(Neprilysin)、PSMA和/或BMP-1)；丝氨酸蛋白酶(例如经活化蛋白C、组织蛋白酶A、组织蛋白酶G、胃促胰酶(Chymase)和/或凝血因子蛋白酶(诸如FVIIa、FIXa、FXa、FXIa、FXIIa))；弹性蛋白酶(elastase)；粒酶B；胍基苯甲酸酶；HtrA1；人嗜中性白细胞弹性蛋白酶；乳铁传递蛋白(lactoferrin)；marapsin；NS3/4A；PACE4；tPA；类胰蛋白酶(tryptase)；II型跨膜丝氨酸蛋白酶(TTSP)(例如DESC1、DPP-4、FAP、肝丝酶(Hepsin)、基质蛋白酶-2(Matriptase-2)、MT-SP1/基质蛋白酶、TMPRSS2、TMPRSS3和/或TMPRSS4)；等。在一些实施方案中，第一蛋白酶裂解位点是选自以下的蛋白酶的裂解位点：uPA、MMP-1、MMP-2、MMP-3、MMP-8、MMP-9、MMP-14、TEV蛋白酶、纤维蛋白溶酶、凝血酶、因子X、PSA、PSMA、组织蛋白酶D、组织蛋白酶K、组织蛋白酶S、ADAM10、ADAM12、ADAMTS、卡斯帕酶-1、卡斯帕酶-2、卡斯帕酶-3、卡斯帕酶-4、卡斯帕酶-5、卡斯帕酶-6、卡斯帕酶-7、卡斯帕酶-8、卡斯帕酶-9、卡斯帕酶-10、卡斯帕酶-11、卡斯帕酶-12、卡斯帕酶-13、卡斯帕酶-14和TACE。在一些实施方案中，第一蛋白酶裂解位点是选自以下的蛋白酶的裂解位点：uPA、MMP-2、MMP-9和/或TEV蛋白酶。在一些实施方案中，蛋白酶裂解位点包含选自SGRSA(SEQ ID NO:149)、PLGLAG(SEQ ID NO:150)和ENLYFQG(SEQ ID NO:151)的氨基酸序列。

[0235] 在一些实施方案中，可活化抗体包含含有根据式(XXV)：EVGSY(Z₆)C(Z₆)C(Z₂)SGRSA(SEQ ID NO:152)的氨基酸序列的掩蔽部分(MM)和可裂解部分(CM)，其中每个Z独立地是选自D、A、Y、S、T、N、I、L、F、V、H和P的氨基酸。

[0236] 在一些实施方案中，可活化抗体包含含有根据式(XXVI)：EVGSY(Z₆)C(X₆)C(Z₂)SGRSA(SEQ ID NO:153)的氨基酸序列的掩蔽部分(MM)和可裂解部分(CM)，其中每个X独立地是选自A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W和Y的氨基酸，并且其中每个Z独立地是选自由D、A、Y、S、T、N、I、L、F、V、H和P组成的组的氨基酸。

[0237] 在一些实施方案中，可活化抗体包含含有根据式(XXVII)：EVGSY(Z₆)C(Z₈)C(Z₂)SGRSA(SEQ ID NO:154)的氨基酸序列的掩蔽部分(MM)和可裂解部分(CM)，其中每个Z独立地是选自D、A、Y、S、T、N、I、L、F、V、H和P的氨基酸。

[0238] 在一些实施方案中，可活化抗体包含含有根据式(XXVIII)：EVGSY(Z₆)C(X₈)C(Z₂)SGRSA(SEQ ID NO:155)的氨基酸序列的掩蔽部分(MM)和可裂解部分(CM)，其中每个X独立地是选自由A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W和Y组成的组的氨基酸，并且其中每个Z独立地是选自由D、A、Y、S、T、N、I、L、F、V、H和P组成的组的氨基酸。

[0239] 在一些实施方案中，可裂解部分(CM)还包含第一接头(L₁)。在一些实施方案中，第一接头(L₁)在第一裂解位点(CS₁) (例如第一蛋白酶裂解位点)的C末端。在一些实施方案中，可裂解部分(CM)从N末端至C末端包含以下结构：(CS₁)-L₁。

[0240] 可使用本领域中已知的任何适合接头(例如柔性接头)，包括例如：甘氨酸聚合物(G)_n，其中n是至少1(例如至少一、至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10等)的整数；甘氨酸-丝氨酸聚合物(GS)_n，其中n是至少1(例如至少一、至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9、至少10等)的整数，诸如GGGS(SEQ ID NO:156)、SGGS(SEQ ID NO:157)、GGSG(SEQ ID NO:158)、GGSGG(SEQ ID NO:159)、GSGSG(SEQ ID NO:

160)、GSGGG (SEQ ID NO:161)、GGGSG (SEQ ID NO:162) 和/或GSSSG (SEQ ID NO:163); 甘氨酸-丙氨酸聚合物; 丙氨酸-丝氨酸聚合物; 等。接头序列可具有任何长度, 诸如约1个氨基酸 (例如甘氨酸或丝氨酸) 至约20个氨基酸 (例如20氨基酸甘氨酸聚合物或甘氨酸-丝氨酸聚合物)、约1个氨基酸至约15个氨基酸、约3个氨基酸至约12个氨基酸、约4个氨基酸至约10个氨基酸、约5个氨基酸至约9个氨基酸、约6个氨基酸至约8个氨基酸等。在一些实施方案中, 接头的长度是约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸中的任一者。在一些实施方案中, 接头包含选自SEQ ID NO:159-163的氨基酸序列。在一些实施方案中, 接头包含SEQ ID NO:156或157的氨基酸序列。

[0241] 在一些实施方案中, 可裂解部分 (CM) 还包含至少第二裂解位点 (例如至少第二、至少第三、至少第四、至少第五, 等)。在一些实施方案中, 可裂解部分 (CM) 还包含第二裂解位点 (CS₂)。在一些实施方案中, 第二裂解位点是第二蛋白酶裂解位点。第二蛋白酶裂解位点可为由以上所述的任何蛋白酶识别和/或裂解的任何适合蛋白酶裂解位点。在一些实施方案中, 第一 (CS₁) 和第二 (CS₂) 裂解位点是由相同蛋白酶识别和/或裂解的蛋白酶裂解位点。在一些实施方案中, 第一 (CS₁) 和第二 (CS₂) 裂解位点是由不同蛋白酶识别和/或裂解的蛋白酶裂解位点 (例如第一蛋白酶裂解位点由uPA识别和/或裂解, 而第二蛋白酶裂解位点由MMP-2识别和/或裂解; 第一蛋白酶裂解位点由uPA识别和/或裂解, 而第二蛋白酶裂解位点由MMP-9识别和/或裂解; 第一蛋白酶裂解位点由uPA识别和/或裂解, 而第二蛋白酶裂解位点由TEV蛋白酶识别和/或裂解; 等)。在一些实施方案中, 至少第二裂解位点 (CS₂) 在第一接头 (L₁) 的C末端。在一些实施方案中, 可裂解部分 (CM) 从N末端至C末端包含以下结构: (CS₁) - L₁ - (CS₂)。

[0242] 在一些实施方案中, 可裂解部分 (CM) 还包含至少第二接头 (例如至少第二、至少第三、至少第四、至少第五, 等)。在一些实施方案中, 可裂解部分 (CM) 还包含第二接头 (L₂)。第二接头 (L₂) 可为以上所述的任何适合接头。在一些实施方案中, 第二接头包含选自SEQ ID NO:156-163的氨基酸序列。在一些实施方案中, 第一 (L₁) 和第二 (L₂) 接头是相同的 (例如两个接头均包含SEQ ID NO:156或157的序列)。在一些实施方案中, 第一 (L₁) 和第二 (L₂) 接头是不同的 (例如第一接头 (L₁) 包含SEQ ID NO:156的氨基酸序列, 而第二接头 (L₂) 包含SEQ ID NO:157的氨基酸序列, 等)。在一些实施方案中, 至少第二接头 (L₂) 在第二裂解位点 (CS₂) 的C末端。在一些实施方案中, 可裂解部分 (CM) 从N末端至C末端包含以下结构: (CS₁) - L₁ - (CS₂) - L₂。

[0243] 示例性MM-CM序列

[0244] 在一些实施方案中, 本公开的可活化抗体从N末端至C末端包含以下结构: (FP) - (PCS₁) - L₁ - (PCS₂) - L₂。在一些实施方案中, 可活化抗体包含根据式 (XXIX) EVGSYX₁X₂X₃X₄X₅X₆CX₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂CX₁₃X₁₄SGRSAGGGGTENLYFQGSGGS (SEQ ID NO:164) 的氨基酸序列, 其中X₁是A、D、I、N、P或Y, X₂是A、F、N、S或V, X₃是A、H、L、P、S、V或Y, X₄是A、H、S或Y, X₅是A、D、P、S、V或Y, X₆是A、D、L、S或Y, X₇是D、P或V, X₈是A、D、H、P、S或T, X₉是A、D、F、H、P或Y, X₁₀是L、P或Y, X₁₁是F、P或Y, X₁₂是A、P、S或Y, X₁₃是A、D、N、S、T或Y, 并且X₁₄是A、S或Y。在一些实施方案中, 本公开的可活化抗体包含以下氨基酸序列: EVGSYDALHYACPPDYIACYISGRSAGGGGTENLYFQGSGGS (SEQ ID NO:165); EVGSYNSYHAYCPHPLYPCTASGRSAGGGGTENLYFQGSGGS (SEQ ID NO:166); EVGSYASSAVLCVTAYFSCNSSGRSAGGGGTENLYFQGSGGS (SEQ ID NO:167); EVGSYNFVADSCPDHPYPCS

ASGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (SEQ ID NO:168); EVGSYNFVADSCDPHPYPCASGRSAGGGGTENLYFQSGGS (SEQ ID NO:169); EVGSYIVHSDCAFYPCDSSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (SEQ ID NO:170); EVGSYIVHSDCAFYPCDSSGRSAGGGGTENLYFQSGSGGS (SEQ ID NO:171); EVGSYYSAYPACDSHPYCNSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (SEQ ID NO:172); EVGSYYSAYPACDSHPYPCNSGRSAGGGGTENLYFQSGSGGS (SEQ ID NO:173); EVGSYPNPSSDCVPYYYACAYSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (SEQ ID NO:174); EVGSYPNPSSDCVPYYYACAYSGRSAGGGGTENLYFQSGSGGS (SEQ ID NO:175); EVGSYYSAYPACDSHPYPCQSSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (SEQ ID NO:176); EVGSYYSAYPACDSHPYPCNSAGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (SEQ ID NO:177); EVGSYPQPSSDCVPYYYACAYSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (SEQ ID NO:178); 和/或 EVGSYPNPASDCVPYYYACAYSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (SEQ ID NO:179)。在一些实施方案中,本公开的多肽从N末端至C末端包含以下结构: (FP) - (PCS₁) - L₁ - (PCS₂) - L₂ - (TBM)。

[0245] 在一些实施方案中,可活化抗体包含氨基酸序列SGRSAGGGGTENLYFQSGSGGS (SEQ ID NO:220)、SGRSAGGGGTPLGLAGSGGS (SEQ ID NO:221) 或SGRSAPLGLA (SEQ ID NO:222)。在一些实施方案中,可活化抗体包含序列EV (Zn) C (X₈) C (Z₂) SGRSA (SEQ ID NO:217)、EDC (Z₆) C (Z₂) SGRSA (SEQ ID NO:218) 或EDC (Z₆) C (Z₂) PLGLA (SEQ ID NO:219), 其中每个X独立地是选自A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W和Y组成的组的氨基酸,其中n是1-11,并且其中每个Z独立地是选自D、A、Y、S、T、N、I、L、F、V、H和P组成的组的氨基酸。

[0246] 靶标结合部分 (TBM)

[0247] 在一些实施方案中,本公开涉及包含靶标结合部分 (TBM) 的可活化抗体。在一些实施方案中,靶标结合部分 (TBM) 包含抗体轻链可变区和/或抗体重链可变区。在一些实施方案中,靶标结合部分 (TBM) 包含抗体轻链可变区。在一些实施方案中,靶标结合部分 (TBM) 包含抗体重链可变区。在一些实施方案中,靶标结合部分 (TBM) 包含抗体轻链可变区和抗体重链可变区。

[0248] 在一些实施方案中,靶标结合部分 (TBM) 包含全长抗体轻链和/或全长抗体重链。抗体轻链可为κ或λ轻链。抗体重链可处于任何类别,诸如IgG、IgM、IgE、IgA或IgD。在一些实施方案中,抗体重链处于IgG类别,诸如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4子类。使用本领域中已知的方法,可使本文所述的抗体重链从一个类别或子类转变成另一类别或子类。

[0249] 本文所述的靶标结合部分 (TBM) 中的任何一者或多者可并有:本文所述的任何HVR序列 (例如如上表A中所示的重链可变区HVR序列中的一者、两者或三者,和/或轻链可变区HVR序列中的一者、两者或三者); 本文所述的任何重链可变区序列和/或轻链可变区序列 (例如如上表B中所示的重链可变区序列和/或轻链可变区序列); 和/或本文所述的任何抗体。

[0250] 在一些实施方案中,靶标结合部分 (TBM) 包含本文所述的抗CTLA4抗体中的一者或多者的序列,所述抗CTLA4抗体包括关于HVR、可变区 (VL、VH) 和/或轻链和重链 (例如IgG1、IgG2、IgG4) 的特定氨基酸序列所述的抗体。在一些实施方案中,靶标结合部分 (TBM) 包含抗体轻链可变区,所述抗体轻链可变区包含含有氨基酸序列RASQSVRGRFLA (SEQ ID NO:58) 的HVR-L1、含有氨基酸序列DASNRTGI (SEQ ID NO:66) 的HVR-L2和/或含有氨基酸序列YCQQSSSWPPT (SEQ ID NO:75) 的HVR-L3。在一些实施方案中,靶标结合部分 (TBM) 包含抗体轻链可变区,所述抗体轻链可变区包含SEQ ID NO:100的氨基酸序列或与SEQ ID NO:100的序列具有至少90% (例如95%、96%、97%、98%或99%) 序列同一性的序列。在一些实施方

案中,靶标结合部分(TBM)包含抗体重链可变区,所述抗体重链可变区包含含有氨基酸序列YSISSGYHWSWI(SEQ ID NO:23)的HVR-H1、含有氨基酸序列LARIDWDDDKYYSTSLKSRL(SEQ ID NO:35)的HVR-H2和/或含有氨基酸序列ARSYVYFDY(SEQ ID NO:45)的HVR-H3。在一些实施方案中,靶标结合部分(TBM)包含抗体重链可变区,所述抗体重链可变区包含SEQ ID NO:87的氨基酸序列或与SEQ ID NO:87的序列具有至少90%(例如95%、96%、97%、98%或99%)序列同一性的序列。在一些实施方案中,靶标结合部分(TBM)包含:a)抗体轻链可变区,所述抗体轻链可变区包含含有氨基酸序列RASQSVRGRFLA(SEQ ID NO:58)的HVR-L1、含有氨基酸序列DASNRATGI(SEQ ID NO:66)的HVR-L2和/或含有氨基酸序列YCQQSSSWPPT(SEQ ID NO:75)的HVR-L3;和b)抗体重链可变区,所述抗体重链可变区包含含有氨基酸序列YSISSGYHWSWI(SEQ ID NO:23)的HVR-H1、含有氨基酸序列LARIDWDDDKYYSTSLKSRL(SEQ ID NO:35)的HVR-H2和/或含有氨基酸序列ARSYVYFDY(SEQ ID NO:45)的HVR-H3。在一些实施方案中,靶标结合部分(TBM)包含含有SEQ ID NO:100的氨基酸序列的抗体轻链可变区,以及含有SEQ ID NO:87的氨基酸序列的抗体重链可变区。

[0251] 可活化结合多肽性质

[0252] 在一些实施方案中,本公开的可活化结合多肽(即可活化抗体)包含:(a)掩蔽部分(MM), (b)可裂解部分,和(c)靶标结合部分。在一些实施方案中,掩蔽部分(MM)结合可活化抗体的靶标结合部分(TBM),并且相较于缺乏掩蔽部分的相应结合多肽与CTLA4(例如人CTLA4)的结合,和/或相较于亲本抗体与CTLA4(例如人CTLA4)的结合,降低或抑制可活化结合部分与CTLA4(例如人CTLA4)的结合。

[0253] 在一些实施方案中,“可活化”结合多肽是指以下结合多肽:当处于抑制、掩蔽和/或未裂解状态时展现与CTLA4的第一结合水平,并且在处于未抑制、未掩蔽和/或裂解状态时展现与CTLA4的第二结合水平,其中所述第二CTLA4结合水平大于所述第一CTLA4结合水平。在一些实施方案中,在可裂解部分内裂解(例如由一种或多种蛋白酶)之后,可活化结合多肽接近CTLA4的机会增大。

[0254] 在一些实施方案中,当相较于在可活化抗体的活化之前,在可活化抗体的活化之后(例如在通过用一种或多种在可裂解部分(CM)内进行裂解的蛋白酶处理来活化之后,在通过pH变化(增加或降低)来活化之后,在通过温度变动(增加或降低)来活化之后,在通过与第二分子(诸如小分子)接触来活化之后,等),多肽对CTLA4(例如人CTLA4)的结合亲和力增加至至少约2倍(例如至少约2倍、至少约2.5倍、至少约3、至少约3.5倍、至少约4倍、至少约4.5倍、至少约5倍、至少约5.5倍、至少约6倍、至少约6.5倍、至少约7倍、至少约7.5倍、至少约8倍、至少约8.5倍、至少约9倍、至少约9.5倍、至少约10倍、至少约25倍、至少约50倍、至少约75倍、至少约100倍、至少约250倍、至少约500倍、至少约750倍或至少约1000倍或更多倍)时,本公开的可活化抗体通常被视为是“可活化”结合多肽。在一些实施方案中,如果在“活化”之后,可活化抗体的 EC_{50} 降低至至少约1/2(例如至少约1/2,至少约1/2.5,至少约1/3,至少约1/3.5,至少约1/4,至少约1/4.5,至少约1/5,至少约1/5.5,至少约1/6,至少约1/6.5,至少约1/7,至少约1/7.5,至少约1/8,至少约1/8.5,至少约1/9,至少约1/9.5,至少约1/10,至少约1/25,至少约1/50,至少约1/75,至少约1/100,至少约1/250,至少约1/500,至少约1/750或至少约1/1000,或降低至更小)(例如如通过ELISA或FACS测定所测量;参见以下实施例),那么本公开的可活化抗体通常被视为“可活化”。在一些实施方案中,如果在用

在可裂解部分 (CM) 内进行裂解的蛋白酶处理之后,多肽的 EC_{50} 降低至至少约1/2 (例如如通过ELISA或FACS测定所测量;参见以下实施例),那么本公开的可活化抗体通常被视为“可活化”。

[0255] 在一些实施方案中,当掩蔽部分 (MM) 结合于可活化抗体的靶标结合部分 (TBM) 时,可活化抗体关于CTLA4的 K_D 是掩蔽部分 (MM) 未结合于靶标结合部分 (TBM) 时 (例如在可活化抗体的“活化”之后 (诸如在进行蛋白酶处理以在可裂解部分 (CM) 内进行裂解之后)) 和/或是亲本抗体关于CTLA4的 K_D 的约2 (例如约2、约2.5、约3、约3.5约4、约4.5、约5、约5.5、约6、约6.5、约7、约7.5、约8、约8.5、约9、约9.5、约10、约25、约50、约75、约100、约250、约500、约750或约1000或更多) 倍大。测量亲和力的方法在本领域中是已知的,包括例如通过以下实施例中所述的方法。

[0256] 在一些实施方案中,相对于当掩蔽部分未结合于靶标结合部分时 (例如在可活化抗体的“活化”之后 (诸如在进行蛋白酶处理以在可裂解部分 (CM) 内进行裂解之后)),和/或相对于亲本抗体关于CTLA4的 K_D ,当掩蔽部分结合于可活化抗体的靶标结合部分时,可活化抗体关于CTLA4的 K_D 降低至少约25% (例如至少约25%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约99%)。测量亲和力的方法在本领域中是已知的,包括例如通过以下实施例中所述的方法。

[0257] 在一些实施方案中,掩蔽部分在空间上阻碍可活化抗体与CTLA4的结合,和/或变构阻碍可活化抗体与CTLA4的结合。在一些实施方案中,掩蔽部分不包含可活化抗体和/或亲本抗体的天然结合配偶体的氨基酸序列。

[0258] 在一些实施方案中,掩蔽部分关于靶标结合部分的解离常数大于可活化抗体关于CTLA4的解离常数 (当活化时)。在一些实施方案中,掩蔽部分关于靶标结合部分的解离常数是可活化抗体关于CTLA4的解离常数 (当活化时) 的约2 (例如约2、约2.5、约3、约3.5约4、约4.5、约5、约5.5、约6、约6.5、约7、约7.5、约8、约8.5、约9、约9.5、约10、约25、约50、约75、约100、约250、约500、约750或约1000或更多) 倍大。在一些实施方案中,掩蔽部分关于靶标结合部分的解离常数约等于可活化抗体关于CTLA4的解离常数 (当活化时)。

[0259] 可进一步修饰本文所述的可活化抗体。在一些实施方案中,可活化抗体连接于额外分子实体。额外分子实体的实例包括药物制剂、肽或蛋白质、检测剂或标记、以及抗体。

[0260] 在一些实施方案中,本公开的可活化抗体连接于药物制剂。药物制剂的实例包括细胞毒性剂或其他癌症治疗剂以及放射性同位素。细胞毒性剂的特定实例包括紫杉醇、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春花碱、秋水仙碱、多柔比星、柔红霉素、二羟基蒽蒽菌素二酮、米托蒽醌、米拉霉素、放线菌素D、1-脱氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、四卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素以及它们的类似物或同源物。治疗剂还包括例如抗代谢剂 (例如甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶、达卡巴嗪)、烷基化剂 (例如二氯甲基二乙胺、塞替派、苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀 (BSNU) 和洛莫司汀 (CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲佐菌素、丝裂霉素C和顺式二氯二胺铂 (II) (DDP) 顺铂)、蒽环霉素 (例如柔红霉素 (先前称为道诺霉素) 和多柔比星)、抗生素 (例如更生霉素 (先前称为放线菌素)、博来霉素、米拉霉素和安曲霉素 (AMC))、以及抗有丝分裂剂 (例如长春新碱和长春花碱)。可缀合于抗体以进行诊断或治疗使用的放射性同位素的实例包括但不限于碘¹³¹、铟¹¹¹、钇⁹⁰和镱¹⁷⁷。用于使多肽连接于药物

制剂的方法在本领域中是已知的,诸如使用各种接头技术。接头类型的实例包括脰、硫醚、酯、二硫醚和含肽接头。对于用于使治疗剂连接于抗体的接头和方法的进一步讨论,参见例如Saito等,Adv. Drug Deliv. Rev. 55:199-215 (2003); Trail等, Cancer Immunol. Immunother. 52:328-337 (2003); Payne, Cancer Cell 3:207-212 (2003); Allen, Nat. Rev. Cancer 2:750-763 (2002); Pastan和Kreitman, Curr. Opin. Investig. Drugs 3:1089-1091 (2002); Senter和Springer (2001) Adv. Drug Deliv. Rev. 53:247-264。

[0261] V.产生CTLA4抗体和/或精准/情形依赖性可活化抗体的核酸、载体、宿主细胞和重组方法

[0262] 本公开的另一方面提供了一种包含编码本文提供的结合分子(例如抗体或可活化抗体)的氨基酸序列的核苷酸序列的经分离核酸分子。由核苷酸序列编码的氨基酸序列可为抗体的任何部分,诸如HVR、包含一个、两个或三个HVR的序列、重链的可变区、轻链的可变区,或可为全长重链或全长轻链。本公开的核酸可为例如DNA或RNA,并且可或可不含有内含子序列。通常,核酸是cDNA分子。

[0263] 在一些实施方案中,本公开提供了一种包含编码选自以下组成的组的氨基酸序列的核苷酸序列或由所述核苷酸序列组成的经分离核酸分子:(1)本文所述的说明性抗体的HVR-H1、HVR-H2、HVR-H3、HVR-L1、HVR-L2和/或HVR-L3的氨基酸序列;(2)本文所述的说明性抗体的重链的可变区和/或轻链的可变区;或(3)说明性抗体的全长重链或全长轻链。

[0264] 在一些实施方案中,核酸分子包含编码如以SEQ ID NO:18-107中的任一者阐述的氨基酸序列的核苷酸序列或由所述核苷酸序列组成。

[0265] 在一些实施方案中,核酸分子包含下表C中所述的核苷酸序列或由所述核苷酸序列组成。

[0266] 表C:抗CTLA4可变区多核苷酸序列

[0267]

抗体名称:	VH:	VL:
TY21585	GAGGTTTCAGCTGGTGGAGTC TGGCGGTGGCCTGGTGCAGC CAGGGGGGCTCACTCCGTTTG TCCTGTGCAGCTTCCGGATT CACCTTCTCCGACTACGCTA TTCCTGAGTCTGTGGACTTC TTTCTGATCTACGACGCTC CCTGGTATCAACAGAAAC CAGGAAAAGCTCCGAAGC TTCTGATCTACGACGCTC TAACCGTGCCACCGGTAT CCCATCTCGCTTCTCTGGA TCCGGTTCCGGGACGGAT TTCCTGATCTACGACGCTC GTCTGCAGCCGGAAGACT TCGCAACTTATTACTGCCA GCACTACACCTCTTCGCCA CCAGTGTACACCTTCGGA CAGGGTACCAAGGTGGAG ATCAAACGA (SEQ ID NO: 108)	GATATCCAGTTGACCCAG TCCCCGAGTTCCCTGTCCG CCTCTGTGGGCGATCGGG TCACCATCACCTGCCGTGC CTCTGAGTCTGTGGACTTC TTTCTGATCTACGACGCTC CCTGGTATCAACAGAAAC CAGGAAAAGCTCCGAAGC TTCTGATCTACGACGCTC TAACCGTGCCACCGGTAT CCCATCTCGCTTCTCTGGA TCCGGTTCCGGGACGGAT TTCCTGATCTACGACGCTC GTCTGCAGCCGGAAGACT TCGCAACTTATTACTGCCA GCACTACACCTCTTCGCCA CCAGTGTACACCTTCGGA CAGGGTACCAAGGTGGAG ATCAAACGA (SEQ ID NO: 121)
TY21586	GAGGTTTCAGCTGGTGGAGTC TGGCGGTGGCCTGGTGCAGC CAGGGGGGCTCACTCCGTTTG TCCTGTGCAGCTTCCGGATA CTCTATCACCTCTGGTACT ACTGGGCCTGGATTTCGTCAG GCCCCGGGTAAGGGCCTCG AGTGGGTGTCTTCCATCTCT GGTTCCGGTTCTACTACCTA CTACGCCGACTCTGTCAAGG GCCGTTTCACTATAAGTCGC GACAATTCGAAAAACACAC TGTACCTACAACGAACAGC TTAAGAGCTGAGGACACTG CCGTCTATTATTGCGCCAGA GATGGTTTCGGCTACTTCGA CTACTGGGGTCAAGGAACA CTAGTCACCGTCTCCTCG (SEQ ID NO: 109)	GATATCCAGTTGACCCAG TCCCCGAGTTCCCTGTCCG CCTCTGTGGGCGATCGGG TCACCATCACCTGCTCTGC CTCTTCTAGCGTGAGCTAC GTGTACTGGTATCAACAG AAACCAGGAAAAGCTCCG AAGCTTCTGATCTACGAC GCCTCTTCTCTGGAATCTG GTGTGCCATCTCGCTTCTC TGGATCCGGTTCCGGGAC GGATTTCACTCTGACCATC AGCAGTCTGCAGCCGGA GACTTCGCAACTTATTACT GCGTGCAGGGTCTTCAGA CCCCTTGGACCTTCGGAC AGGGTACCAAGGTGGAGA TCAAACGA (SEQ ID NO: 122)
TY21587	GAGGTTTCAGCTGGTGGAGTC TGGCGGTGGCCTGGTGCAGC CAGGGGGGCTCACTCCGTTTG TCCTGTGCAGCTTCCGGATT CACCTTCTCCGACTACGGTA TTCCTGAGTCTGTGGACTTC TTTCTGATCTACGACGCTC CCTGGTATCAACAGAAAC CAGGAAAAGCTCCGAAGC TTCTGATCTACGACGCTC TAACCGTGCCACCGGTAT CCCATCTCGCTTCTCTGGA TCCGGTTCCGGGACGGAT TTCCTGATCTACGACGCTC GTCTGCAGCCGGAAGACT TCGCAACTTATTACTGCCA GCACTACACCTCTTCGCCA CCAGTGTACACCTTCGGA CAGGGTACCAAGGTGGAG ATCAAACGA (SEQ ID NO: 108)	GATATCCAGTTGACCCAG TCCCCGAGTTCCCTGTCCG CCTCTGTGGGCGATCGGG TCACCATCACCTGCCGTGC CTCTGAGTCTGTGGACTTC TTTCTGATCTACGACGCTC CCTGGTATCAACAGAAAC CAGGAAAAGCTCCGAAGC TTCTGATCTACGACGCTC TAACCGTGCCACCGGTAT CCCATCTCGCTTCTCTGGA TCCGGTTCCGGGACGGAT TTCCTGATCTACGACGCTC GTCTGCAGCCGGAAGACT TCGCAACTTATTACTGCCA GCACTACACCTCTTCGCCA CCAGTGTACACCTTCGGA CAGGGTACCAAGGTGGAG ATCAAACGA (SEQ ID NO: 121)

[0268]

	GGATCGGTGAAATCTACCAC TCTGGTTCTACCTACTACTC TCCATCTCTGAAGTCTCGTG TGACTATAAGTCGCGACAAT TCGAAAAACACACTGTACCT ACAACTGAACAGCTTAAGA GCTGAGGACACTGCCGTCTA TTATTGCGCCAGAGACGTTG CCCCTGGTTCTTCTGGTTAC TACGACGGTTTCGACTTCTG GGGTCAAGGAACACTAGTC ACCGTCTCCTCG (SEQ ID NO: 110)	CGAAGCTTCTGATCTACG ACGCCTCTAACCGTGCCA CCGGTATCCCATCTCGCTT CTCTGGATCCGGTTCCGG GACGGATTTCACTCTGAC CATCAGCAGTCTGCAGCC GGAAGACTTCGCAACTTA TTACTGCCAGCAGTACGA CCAATGGCCACCTTGGAC CTTCGGACAGGGTACCAA GGTGGAGATCAAACGA (SEQ ID NO: 123)
TY21588	GAGGTTTCAGCTGGTGGAGTC TGGCGGTGGCCTGGTGCAGC CAGGGGGCTCACTCCGTTTG TCCTGTGCAGCTTCCGGATA CTCTATCTCCTCTGGTTACC ACTGGGACTGGATTTCGTCAG GCCCCGGGTAAGGGCCTCG AGTGGGTGTCTGGTATCTCT GGTTACGGTGGTTCTACCTA CTACGCCGACTCTGTCAAGG GCCGTTTCACTATAAGTCGC GACAATTCGAAAAACACAC TGTACCTACAACCTGAACAGC TTAAGAGCTGAGGACACTG CCGTCTATTATTGCGCCAGA CACAGTTATTACGGTTCGGG TAATTTGCACTACTGGGGTC AAGGAACACTAGTCACCGT CTCCTCG (SEQ ID NO: 111)	GATATCCAGTTGACCCAG TCCCCGAGTTCCCTGTCCG CCTCTGTGGGCGATCGGG TCACCATCACCTGCCGTGC CTCTGAGTCTGTGGACTTC TTCGGTAAGTCTTTCCTGC ACTGGTATCAACAGAAAC CAGGAAAAGCTCCGAAGC TTCTGATCTACGACGCCTC TAACCTGGAAACCGGTGT GCCATCTCGCTTCTCTGGA TCCGGTTCCGGGACGGAT TTCATCTGACCATCAGCA GTCTGCAGCCGGAAGACT TCGCAACTTATTACTGCCA GCAGTCCTACTCCTGGCCT CCGACCTTCGGACAGGGT ACCAAGGTGGAGATCAAA CGA (SEQ ID NO: 124)
TY21589	GAGGTTTCAGCTGGTGGAGTC TGGCGGTGGCCTGGTGCAGC CAGGGGGCTCACTCCGTTTG TCCTGTGCAGCTTCCGGATT CACCTTCTCCGACTACTGGA TTCATGCGGTGCGTCAGGCC CCGGGTAAGGGCCTCGAGT GGATCGGTTGGATCTCCCCA TCTGGCGGTGGTACTAAGTA CGCCCAGAAGTTCCAGGGTC GTGTGACTATAAGTCGCGAC AATTCGAAAAACACACTGT ACCTACAACCTGAACAGCTTA AGAGCTGAGGACACTGCCG TCTATTATTGCGCCAGAGGG GCTTACGAATTTGACTACTG GGGTCAAGGAACACTAGTC	GATATCCAGTTGACCCAG TCCCCGAGTTCCCTGTCCG CCTCTGTGGGCGATCGGG TCACCATCACCTGCCGTGC CTCTCAGTCTGTGAGCAG CCGTTTCCTGGCCTGGTAT CAACAGAAACCAGGAAAA GCTCCGAAGCTTCTGATCT ACGACGCCTCTAACCGTG CCACCGGTATCCCATCTCG CTTCTCTGGATCCGGTTCC GGGACGGATTTCACTCTG ACCATCAGCAGTCTGCAG CCGGAAGACTTCGCAACT TATTACTGCCAGCAGTCCT ACCCACCCCTCTTACCTT CGGACAGGGTACCAAGGT

[0269]

	ACCGTCTCCTCG (SEQ ID NO: 112)	GGAGATCAAACGA (SEQ ID NO: 125)
TY21580	GAGGTTTCAGCTGGTGGAGTC TGGCGGTGGCCTGGTGCAGC CAGGGGGCTCACTCCGTTTG TCCTGTGCAGCTTCCGGATA CTCTATCTCCTCTGGTTACC ACTGGAGCTGGATTTCGTCAG GCCCCGGGTAAGGGCCTCG AGTGGCTGGCCCGGATCGA CTGGGACGATGACAAGTAC TACTCTACCTCTCTGAAGTC TCGTCTGACTATAAGTCGCG ACAATTCGAAAAACACACT GTACCTACAACCTGAACAGCT TAAGAGCTGAGGACACTGC CGTCTATTATTGCGCCAGAT CGTACGTGTACTTCGACTAC TGGGGTCAAGGAACACTAG TCACCGTCTCCTCG (SEQ ID NO: 113)	GATATCCAGTTGACCCAG TCCCCGAGTTCCTGTCCG CCTCTGTGGGCGATCGGG TCACCATCACCTGCCGTGC CTCTCAGTCTGTGCGCGGC CGTTTCCTGGCCTGGTATC AACAGAAACCAGGAAAA GCTCCGAAGCTTCTGATCT ACGACGCCTCTAACCGTG CCACCGGTATCCCATCTCG CTTCTCTGGATCCGGTTCC GGGACGGATTTCACTCTG ACCATCAGCAGTCTGCAG CCGGAAGACTTCGCAACT TATTACTGCCAGCAGTCCT CCTCCTGGCCTCCGACCTT CGGACAGGGTACCAAGGT GGAGATCAAACGA (SEQ ID NO: 126)
TY21591	GAGGTTTCAGCTGGTGGAGTC TGGCGGTGGCCTGGTGCAGC CAGGGGGCTCACTCCGTTTG TCCTGTGCAGCTTCCGGATT CTCTCTGTCTACCGGCGGTG TGGCTGTGAGCTGGATTTCG CAGGCCCCGGGTAAGGGCC TCGAGTGGATCGGTGAAATC TACCACTCTGGTTCTACCTA CTACTCTCCATCTCTGAAGT CTCGTGTGACTATAAGTCGC GACAATTCGAAAAACACAC TGTACCTACAACCTGAACAGC TTAAGAGCTGAGGACACTG CCGTCTATTATTGCGCCCGT CGTATCGCCACCGCTACTTA CTTCGACTACTGGGGTCAAG GAACACTAGTCACCGTCTCC TCG (SEQ ID NO: 114)	GATATCCAGTTGACCCAG TCCCCGAGTTCCTGTCCG CCTCTGTGGGCGATCGGG TCACCATCACCTGCCGTGC CTCTCAGACCGTGTTCTCT CGTTACCTGGCTTGGTATC AACAGAAACCAGGAAAA GCTCCGAAGCTTCTGATCT ACGACGCCTCTAACCGTG CCACCGGTATCCCATCTCG CTTCTCTGGATCCGGTTCC GGGACGGATTTCACTCTG ACCATCAGCAGTCTGCAG CCGGAAGACTTCGCAACT TATTACTGCCAGCAGTCCT ACTACTGGCCACCTTGGA CCTTCGGACAGGGTACCA AGGTGGAGATCAAACGA (SEQ ID NO: 127)
TY21686	GAGGTTTCAGCTGGTGGAGTC TGGCGGTGGCCTGGTGCAGC CAGGGGGCTCACTCCGTTTG TCCTGTGCAGCTTCCGGATT CTCTCTGTCTACCGGCGGTG TGGCTGTGGGCTGGATTTCG CAGGCCCCGGGTAAGGGCC TCGAGTGGGTGTCTGCTATC TCTGGTTACGGTTCTACTAC	GATATCCAGTTGACCCAG TCCCCGAGTTCCTGTCCG CCTCTGTGGGCGATCGGG TCACCATCACCTGCCGTGC CTCTCAGGGTGTGTCTTCT TACCTGGCCTGGTATCAA CAGAAACCAGGAAAAGCT CCGAAGCTTCTGATCTAC GCCGCCTCTACCTTGCAGT

[0270]

	CTACTACGCCGACTCTGTCA AGGGCCGTTTCACTATAAGT CGCGACAATTCGAAAAACA CACTGTACCTACAACCTGAAC AGCTTAAGAGCTGAGGACA CTGCCGTCTATTATTGCGCC AGATTGCCATACTCCGCCTA CGCTTTCGACTACTGGGGTC AAGGAACACTAGTCACCGT CTCCTCG (SEQ ID NO: 115)	CTGGTGTGCCATCTCGCTT CTCTGGATCCGGTTCCGG GACGGATTTCACTCTGAC CATCAGCAGTCTGCAGCC GGAAGACTTCGCAACTTA CTACTGCCAGCACCCTA CGGCACCCCACTGACCTT CGGTCAGGGTACCAAGGT GGAGATCAAACGA (SEQ ID NO: 128)
TY21687	GAGGTTTCAGCTGGTGGAGTC TGGCGGTGGCCTGGTGCAGC CAGGGGGCTCACTCCGTTTG TCCTGTGCAGCTTCCGGATT CACCTTCTCCGGCTACGCTA TTCAGTGGGTGCGTCAGGCC CCGGGTAAAGGGCCTCGAGT GGATCGGTATCATCTCCCA TCTGGCGGTGGTACTAAGTA CGCCCAGAAGTTCCAGGGTC GTGTGACTATAAGTCGCGAC AATTCGAAAAACACACTGT ACCTACAACCTGAACAGCTTA AGAGCTGAGGACACTGCCG TCTATTATTGCGCCAGACAC CCATTCGCCTACTGGGGTCA AGGAACACTAGTCACCGTCT CCTCG (SEQ ID NO: 116)	GATATCCAGTTGACCCAG TCCCCGAGTTCCCTGTCCG CCTCTGTGGGCGATCGGG TCACCATCACCTGCCGTGC CTCTCAGTCTGTGGACTTC TACGGTATCTCTTTCCTGG ACTGGTATCAACAGAAAC CAGGAAAAGCTCCGAAGC TTCTGATCTACGACGCCTC TAACCGTGCCACCGGTAT CCCATCTCGCTTCTCTGGA TCCGGTTCCGGGACGGAT TTCAGTCTGACCATCAGCA GTCTGCAGCCGGAAGACT TCGCAACTTATTACTGCCA GCAGTACGTCTCTTCGCCA CCAGAGTACACCTTCGGA CAGGGTACCAAGGTGGAG ATCAAACGA (SEQ ID NO: 129)
TY21689	GAGGTTTCAGCTGGTGGAGTC TGGCGGTGGCCTGGTGCAGC CAGGGGGCTCACTCCGTTTG TCCTGTGCAGCTTCCGGATA CACCTTCTCCGGCTACGGTA TTCAGTGGGTGCGTCAGGCC CCGGGTAAAGGGCCTCGAGT GGATCGGTGAAATCTACCAC TCTGGTTCTACCTACTACTC TCCATCTCTGAAGTCTCGTG TGACTATAAGTCGCGACAAT TCGAAAAACACACTGTACCT ACAACCTGAACAGCTTAAGA GCTGAGGACACTGCCGTCTA TTATTGCGCCAGAAGAATTG ACGCCTTCGACATCTGGGGT CAAGGAACACTAGTCACCG TCTCCTCG (SEQ ID NO: 117)	GATATCCAGTTGACCCAG TCCCCGAGTTCCCTGTCCG CCTCTGTGGGCGATCGGG TCACCATCACCTGCCGTGC CTCTCAGTCTGTGGACTTC GACGGTTTCTCTTTCCTGC ACTGGTATCAACAGAAAC CAGGAAAAGCTCCGAAGC TTCTGATCTACGACGCCTC TTCTCTGGAATCTGGTGTG CCATCTCGCTTCTCTGGAT CCGGTTCCGGGACGGATT TCACTCTGACCATCAGCA GTCTGCAGCCGGAAGACT TCGCAACTTATTACTGCCA GCAGCGTGACTCCTGGCC TTACACCTTCGGACAGGG TACCAAGGTGGAGATCAA ACGA

[0271]

		(SEQ ID NO: 130)
TY21680	GAGGTTTCAGCTGGTGGAGTC TGGCGGTGGCCTGGTGCAGC CAGGGGGCTCACTCCGTTTG TCCTGTGCAGCTTCCGGATA CACCTTCTCCGGCTACGCTA TTCAGTGGGTGCGTCAGGCC CCGGGTAAGGGCCTCGAGT GGATCGGTATCATCTCCCA TCTGGCGGTGGTACTAAGTA CGCCCAGAAGTTCCAGGGTC GTGTGACTATAAGTCGCGAC AATTCGAAAAACACACTGT ACCTACAACCTGAACAGCTTA AGAGCTGAGGACACTGCCG TCTATTATTGCGCCAGACTC TATGACGTTGCCTACTGGGG TCAAGGAACACTAGTCACC GTCTCCTCG (SEQ ID NO: 118)	GATATCCAGTTGACCCAG TCCCCGAGTTCCTGTCCG CCTCTGTGGGCGATCGGG TCACCATCACCTGCCGTGC CTCTCAGTCTGTGGACTTC CACGGTAAGTCTTTCCTGC ACTGGTATCAACAGAAAC CAGGAAAAGCTCCGAAGC TTCTGATCTACGACGCCTC TTCTCTGGAATCTGGTGTG CCATCTCGCTTCTCTGGAT CCGGTTCCGGGACGGATT TCACTCTGACCATCAGCA GTCTGCAGCCGGAAGACT TCGCAACTTATTACTGCGA GCAATCCCTGGAAGTCCC ATTCACCTTCGGACAGGG TACCAAGGTGGAGATCAA ACGA (SEQ ID NO: 131)
TY21691	GAGGTTTCAGCTGGTGGAGTC TGGCGGTGGCCTGGTGCAGC CAGGGGGCTCACTCCGTTTG TCCTGTGCAGCTTCCGGATT CACCTTCTCCGACTACGCTA TTCAGTGGGTGCGTCAGGCC CCGGGTAAGGGCCTCGAGT GGATCGGTATCATCTCCCA TCTGGCGGTCTACTAAGTA CGCCCAGAAGTTCCAGGGTC GTGTGACTATAAGTCGCGAC AATTCGAAAAACACACTGT ACCTACAACCTGAACAGCTTA AGAGCTGAGGACACTGCCG TCTATTATTGCGCCAGACTC GGTTACGGGTACTTCGACGT CTGGGGTCAAGGAACACTA GTCACCGTCTCCTCG (SEQ ID NO: 119)	GATATCCAGTTGACCCAG TCCCCGAGTTCCTGTCCG CCTCTGTGGGCGATCGGG TCACCATCACCTGCCGTGC CTCTCAGTCTGTGGACTTC TACGGTATCTCTTTCCTGC ACTGGTATCAACAGAAAC CAGGAAAAGCTCCGAAGC TTCTGATCTACGACGCCTC TTCTCTGGAATCTGGTGTG CCATCTCGCTTCTCTGGAT CCGGTTCCGGGACGGATT TCACTCTGACCATCAGCA GTCTGCAGCCGGAAGACT TCGCAACTTATTACTGCGT GCAGGCTCTTCAGTTGCCT CTTACCTTCGGACAGGGT ACCAAGGTGGAGATCAAA CGA (SEQ ID NO: 132)
TY21692	GAGGTTTCAGCTGGTGGAGTC TGGCGGTGGCCTGGTGCAGC CAGGGGGCTCACTCCGTTTG TCCTGTGCAGCTTCCGGATA CTCTATCACCTCTGGTCACT ACTGGAGCTGGATTTCGTCAG GCCCCGGGTAAGGGCCTCG AGTGGATCGGTGACATCTCC CACTCTGGTTCTACCTACTA	GATATCCAGTTGACCCAG TCCCCGAGTTCCTGTCCG CCTCTGTGGGCGATCGGG TCACCATCACCTGCCGTGC CTCTCAGTCTATCTCTTCT TACCTGAACTGGTATCAA CAGAAACCAGGAAAAGCT CCGAAGCTTCTGATCTAC GACGCCTCTAACCTGGAA

[0272]	CTCTCAATCTCTGAAGTCTC GTGTGACTATAAGTCGCGAC AATTCGAAAAACACACTGT ACCTACAACCTGAACAGCTTA AGAGCTGAGGACACTGCCG TCTATTATTGCGCGCGTGGT AGTAGGACCGGCTACTTCGA CTATTGGGGTCAAGGAACA CTAGTCACCGTCTCCTCG (SEQ ID NO: 120)	ACCGGTGTGCCATCTCGCT TCTCTGGATCCGGTTCCGG GACGGATTTCACTCTGAC CATCAGCAGTCTGCAGCC GGAAGACTTCGCAACTTA CTACTGCCAGCACCCTA CGGCACCCCACTGACCTT CGGTCAGGGTACCAAGGT GGAGATCAAACGA (SEQ ID NO: 133)
--------	--	--

[0273] 本公开的核酸可使用任何适合分子生物学技术获得。对于由杂交瘤表达的抗体，编码通过杂交瘤制备的抗体的轻链和重链的cDNA可通过PCR扩增或cDNA克隆技术来获得。对于从免疫球蛋白基因文库(例如使用噬菌体展示技术)获得的抗体，编码抗体的核酸可从所述文库回收。

[0274] 编码 V_H 区的经分离DNA可通过使 V_H 编码DNA操作性地连接于编码重链恒定区(CH1、CH2和CH3)的另一DNA分子来转变成全长重链基因。人重链恒定区基因的序列在本领域中是已知的(参见例如Kabat等(1991)NIH出版号91-3242)，并且涵盖这些区域的DNA片段可通过标准PCR扩增来获得。重链恒定区可为IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgE、IgM或IgD恒定区。对于Fab片段重链基因， V_H 编码DNA可操作性地连接于仅编码重链CH1恒定区的另一DNA分子。

[0275] 编码 V_L 区的经分离DNA可通过使 V_L 编码DNA操作性地连接于编码轻链恒定区CL的另一DNA分子来转变成全长轻链基因(以及Fab轻链基因)。人轻链恒定区基因的序列在本领域中是已知的(参见例如Kabat等(1991)NIH出版号91-3242)，并且涵盖这些区域的DNA片段可通过标准PCR扩增来获得。轻链恒定区可为 κ 或 λ 恒定区。

[0276] 为创建scFv基因，使 V_H 编码DNA片段和 V_L 编码DNA片段操作性地连接于编码柔性接头例如编码氨基酸序列(Gly₄-Ser)₃的另一片段，以使 V_H 和 V_L 序列可被表达为连续单链蛋白，其中 V_L 区和 V_H 区由所述柔性接头接合(参见例如Bird等，Science 242:423-426(1988)；Huston等，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883(1988)；以及McCafferty等，Nature 348:552-554(1990))。

[0277] 本公开还提供了一种包含本文所述的核酸分子的载体。在一些实施方案中，载体是表达载体或展示载体(例如病毒展示载体、细菌展示载体、酵母展示载体、昆虫展示载体、哺乳动物展示载体等)。核酸分子可编码轻链或重链的一部分(诸如CDR或HVR；轻链可变区或重链可变区)、全长轻链或重链、包含重链或轻链的一部分或全长的多肽、或抗体衍生物或抗原结合片段的氨基酸序列。在一些实施方案中，载体是可用于表达结合分子诸如抗体或其抗原结合片段的表达载体。在一些实施方案中，本文提供了载体，其中第一载体包含编码如本文所述的重链可变区的多核苷酸序列，并且第二载体包含编码如本文所述的轻链可变区的多核苷酸序列。在一些实施方案中，单一载体包含编码如本文所述的重链可变区和如本文所述的轻链可变区的多核苷酸。

[0278] 为表达本公开的结合分子，将编码部分或全长轻链和重链的DNA插入表达载体中，以使DNA分子操作性地连接于转录和翻译控制序列。在这个情形下，术语“操作性地连接”意指将抗体基因连接至载体中以使所述载体内的转录和翻译控制序列发挥它们调控DNA分子的转录和翻译的预定功能。选择表达载体和表达控制序列以可与所用表达宿主细胞相容。

可将抗体轻链基因和抗体重链基因插入单独载体中,或可将两个基因插入同一表达载体中。通过任何适合方法(例如抗体基因片段和载体上的互补限制位点的连接,或基于同源性重组的DNA连接)来将抗体基因插入表达载体中。本文所述的抗体的轻链可变区和重链可变区可用于通过以下方式来创建任何抗体同种型和子类的全长抗体基因:将它们插入已编码所需同种型和子类的重链恒定区和轻链恒定区的表达载体中,以使 V_H 区段操作性地连接于载体内的一个或多个 C_H 区段,并且 V_L 区段操作性地连接于载体内的 C_L 区段。另外或替代地,重组表达载体可编码有助于抗体链从宿主细胞分泌的信号肽。可将抗体链基因克隆至载体中以使信号肽同框连接于抗体链基因的氨基末端。信号肽可为免疫球蛋白信号肽或异源性信号肽(即来自非免疫球蛋白的信号肽)。

[0279] 除抗体序列之外,本公开的表达载体通常还携带控制抗体序列在宿主细胞中的表达的调控序列。术语“调控序列”意图包括启动子、增强子和控制抗体链基因的转录或翻译的其他表达控制元件(例如多腺苷酸化信号)。所述调控序列例如描述于Goeddel (Gene Expression Technology. Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990))中。本领域技术人员应了解,对表达载体的设计,包括对调控序列的选择,可取决于诸如对待转化的宿主细胞的选择、所需蛋白质表达水平等的因素。用于哺乳动物宿主细胞表达的调控序列的实例包括引导在哺乳动物细胞中进行高水平蛋白质表达的病毒元件,诸如源于巨细胞病毒(CMV)、猿猴病毒40(SV40)、腺病毒(例如腺病毒主要晚期启动子(AdMLP))和多瘤病毒的启动子和/或增强子。或者,可使用非病毒调控序列,诸如泛素启动子或 β -球蛋白启动子。此外,调控元件由来自不同来源的序列组成,诸如SR启动子系统,其含有来自SV40早期启动子和1型人T细胞白血病病毒的长末端重复序列的序列(Takebe, Y. 等(1988) Mol. Cell. Biol. 8:466-472)。

[0280] 除抗体链基因和调控序列之外,表达载体还可携带额外序列,诸如调控载体在宿主细胞中的复制的序列(例如复制起点)和可选择标记基因。可选择标记基因有助于选择已向其中引入载体的宿主细胞(参见例如美国专利号4,399,216、4,634,665和5,179,017,全都由Axel等人完成)。举例来说,通常,可选择标记基因对已向其中引入载体的宿主细胞赋予对药物诸如G418、潮霉素或甲氨蝶呤的抗性。可选择标记基因包括二氢叶酸还原酶(DHFR)基因(联合甲氨蝶呤选择/扩增一起用于dhfr-宿主细胞中)和neo基因(用于G418选择)。

[0281] 对于轻链和重链的表达,通过任何适合技术来将一种或多种编码重链和轻链的表达载体转染至宿主细胞中。术语“转染”的各种形式意图涵盖通常用于将外源性DNA引入原核或真核宿主细胞中的广泛多种技术,例如电穿孔、磷酸钙沉淀、DEAE-右旋糖酐转染等。尽管有可能在原核或真核宿主细胞中表达本公开的抗体,但在真核细胞中,并且通常在哺乳动物宿主细胞中表达抗体是最典型的。

[0282] 本公开还提供了一种含有由本公开提供的核酸分子的宿主细胞。宿主细胞可实际上是有表达载体可用的任何细胞。它可为例如高等真核宿主细胞诸如哺乳动物细胞、低等真核宿主细胞诸如酵母细胞,并且可为原核细胞诸如细菌细胞。将重组核酸引入宿主细胞中的方法在本领域中是已知的,包括例如通过磷酸钙转染、DEAE右旋糖酐介导的转染、电穿孔或噬菌体感染。

[0283] 适于转化的原核宿主包括大肠杆菌、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)、鼠伤寒

沙门氏菌 (*Salmonella typhimurium*) 以及假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、链霉菌属 (*Streptomyces*) 和葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 内的各种物种。

[0284] 适于转化的真核宿主包括酵母、昆虫 (例如S2细胞) 和哺乳动物细胞。用于表达本公开的结合分子的哺乳动物宿主细胞包括例如中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞 (包括dhfr-CHO细胞, 描述于Urlaub和Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216-4220 (1980); Sharp, *J. Mol. Biol.* 159:601-621 (1982) 中)、NS0骨髓瘤细胞、COS细胞、HEK293F细胞、HEK293T细胞和Sp2细胞。特别地, 对于与NS0骨髓瘤或CHO细胞一起使用, 另一表达系统是W0 87/04462、W0 89/01036和EP338,841中公开的GS (谷氨酰胺合成酶) 基因表达系统。在一些实施方案中, 本公开的抗体在CHO细胞中产生。在一些实施方案中, 本公开的抗体被修饰, 并且不包括C末端赖氨酸残基 (例如本文所述的抗体重链的C末端赖氨酸残基被移除 (诸如在抗体产生之前或期间))。当将编码抗体基因的表达载体引入哺乳动物宿主细胞中时, 通过持续足以允许抗体在宿主细胞中表达或抗体向宿主细胞生长于其中的培养基中分泌的时期培养宿主细胞来产生抗体。可使用本领域中已知的任何适合蛋白质纯化方法 (例如蛋白A色谱法和/或离子交换色谱法) 从培养基回收抗体。

[0285] VI. 组合物

[0286] 在其他方面, 本公开提供了一种含有由本公开提供的结合分子 (例如抗体或可活化抗体) 的组合物。在一个方面, 组合物是包含结合分子 (例如抗体或可活化抗体) 和药学上可接受的载体的药物组合物。组合物可通过本领域中已知的常规方法制备。

[0287] 在一些实施方案中, 本公开提供了一种包含由本公开提供的结合分子 (例如抗体或可活化抗体) 和药学上可接受的载体的组合物, 其中所述结合分子包含含有本文公开的HVR氨基酸序列的可变结构域, 并且其中相较于存在于所述组合物中的结合分子 (例如抗体或可活化抗体) 的总量, 所述组合物包含至多约11%、10%、8%、5%、3%或2%的所述结合分子 (例如抗体或可活化抗体) 在所述氨基酸序列的天冬酰胺处被糖基化。在另一实施方案中, 相较于存在于所述组合物中的结合分子 (例如抗体或可活化抗体) 的总量, 组合物包含至少约2%的所述结合分子 (例如抗体或可活化抗体) 在所述氨基酸序列的天冬酰胺处被糖基化。

[0288] 术语“药学上可接受的载体”是指适合在用于递送结合分子的制剂中使用的任何非活性物质。载体可为防粘剂、粘合剂、包覆剂、崩解剂、填充剂或稀释剂、防腐剂 (诸如抗氧化剂、抗细菌剂或抗真菌剂)、甜味剂、吸收延迟剂、湿润剂、乳化剂、缓冲剂等。适合药学上可接受的载体的实例包括水、乙醇、多元醇 (诸如甘油、丙二醇、聚乙二醇等)、右旋糖、植物油 (诸如橄榄油)、盐水、缓冲剂、缓冲盐水、以及等张剂诸如糖、多元醇、山梨糖醇和氯化钠。

[0289] 组合物可呈任何适合形式, 诸如液体、半固体和固体剂型。液体剂型的实例包括溶液 (例如可注射和可输注溶液)、微乳液、脂质体、分散液或混悬液。固体剂型的实例包括片剂、丸剂、胶囊、微胶囊和粉剂。适于递送结合分子 (例如抗体或可活化抗体) 的组合物的一特定形式是无菌液体, 诸如用于注射或输注的溶液、混悬液或分散液。无菌溶液可通过将抗体以所需量并入适当载体中, 继之以灭菌微滤来制备。通常, 通过将结合分子 (例如抗体或可活化抗体) 并入含有基本分散介质和其他载体的无菌媒介物中来制备分散液。在用于制备无菌液体的无菌粉剂的情况下, 制备方法包括真空干燥和冷冻干燥 (冻干), 以产生活性成分加来自其先前无菌过滤溶液的任何额外所需成分的粉末。组合物的各种剂型可通过本

领域中已知的常规技术制备。

[0290] 包括在组合物中的结合分子(例如抗体或可活化抗体)的相对量将视许多因素而变化,诸如所用特定结合分子和载体、剂型、以及所需释放和药物效应动力学特征。结合分子(例如抗体或可活化抗体)在单一剂型中的量将通常是产生治疗作用的那个量,但还可为更小量。通常,相对于剂型的总重量,这个量将在约0.01%至约99%、约0.1%至约70%、或约1%至约30%的范围内。

[0291] 除结合分子(例如抗体或可活化抗体)之外,还可在组合物中包括一种或多种额外治疗剂。本文在以下描述额外治疗剂的实例。待包括在组合物中的额外治疗剂的适合量可易于由本领域技术人员选择,并且将视许多因素而变化,诸如所用特定药剂和载体、剂型、以及所需释放和药物效应动力学特征。包括在单一剂型中的额外治疗剂的量将通常是药剂的产生治疗作用的那个量,但也可更小量。

[0292] 本文所述的任何结合分子(例如抗体或可活化抗体)和/或组合物(例如药物组合物)都可用于制备药剂(例如用于治疗有需要的受试者的癌症或延迟所述癌症的进展的药剂)。

[0293] VII. 结合分子和药物组合物的用途

[0294] 由本公开提供的结合分子(例如抗体或可活化抗体)和药物组合物可用于治疗、诊断或其他目的,诸如调节免疫应答,治疗癌症,使其他癌症疗法的功效增强,使疫苗功效增强,或治疗自体免疫疾病。因此,在其他方面,本公开提供了使用结合分子(例如抗体或可活化抗体)或药物组合物的方法。在一个方面,本公开提供了一种治疗哺乳动物的病症的方法,所述方法包括向需要治疗的所述哺乳动物施用有效量的由本公开提供的结合分子(例如抗体或可活化抗体)或组合物。结合分子(例如抗体或可活化抗体)可为CTLA4抗体(例如人抗人CTLA4抗体)或CTLA4可活化抗体。在一些实施方案中,哺乳动物是人。

[0295] 在一些实施方案中,病症是癌症。多种癌症可用由本公开提供的方法、用途、组合物或药剂治疗或预防。所述癌症的实例包括肺癌诸如支气管癌(例如鳞状细胞癌、小细胞癌、大细胞癌和腺癌)、肺泡细胞癌、支气管腺瘤、软骨瘤性错构瘤(非癌性)和肉瘤(癌性);心脏癌诸如黏液瘤、纤维瘤和横纹肌瘤;骨癌诸如骨软骨瘤、软骨瘤、软骨母细胞瘤、软骨粘液样纤维瘤、骨样骨瘤、巨细胞肿瘤、软骨肉瘤、多发性骨髓瘤、骨肉瘤、纤维肉瘤、恶性纤维组织细胞瘤、尤因氏肿瘤(Ewing's tumor)(尤因氏肉瘤(Ewing's sarcoma))和网状细胞肉瘤;脑癌诸如神经胶质瘤(例如多形性胶质母细胞瘤)、间变性星形细胞瘤、星形细胞瘤、寡树突神经胶质细胞瘤、神经管母细胞瘤、脊索瘤、神经鞘瘤、室管膜瘤、脑脊髓膜瘤、垂体腺瘤、松果体瘤、骨瘤、血管母细胞瘤、颅咽管瘤、脊索瘤、生殖细胞瘤、畸胎瘤、皮样囊肿和血管瘤;消化系统中的癌症诸如平滑肌瘤、表皮样癌、腺癌、平滑肌肉瘤、胃腺癌、肠脂肪瘤、肠神经纤维瘤、肠纤维瘤、大肠息肉和结肠直肠癌;肝癌诸如肝细胞腺瘤、血管瘤、肝细胞癌、纤维板层癌、胆管癌、肝母细胞瘤和血管肉瘤;肾癌诸如肾腺癌、肾细胞癌、肾上腺样瘤和肾盂移行细胞癌;膀胱癌;血液癌症诸如急性淋巴细胞性(淋巴母细胞性)白血病、急性骨髓性(髓细胞性、骨髓源性、髓母细胞性、髓单核细胞性)白血病、慢性淋巴细胞性白血病(例如西泽里综合征(Sezary syndrome)和毛细胞白血病)、慢性髓细胞性(骨髓性、骨髓源性、粒细胞性)白血病、霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)、非霍奇金氏淋巴瘤、B细胞淋巴瘤、蕈样真菌病和骨髓增生性病症(包括诸如真性红细胞增多症、骨髓纤维化、血小板增多症和

慢性髓细胞性白血病的骨髓增生性病症)；皮肤癌诸如基底细胞癌、鳞状细胞癌、黑素瘤、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)和佩吉特氏病(Paget's disease)；头颈部癌；眼相关癌诸如视网膜母细胞瘤和眼内黑素癌；男性生殖系统癌诸如良性前列腺肥大、前列腺癌和睾丸癌(例如精原细胞瘤、畸胎瘤、胚性癌和绒毛膜癌)；乳腺癌；雌性生殖系统癌诸如子宫癌(子宫内膜癌)、子宫颈癌(宫颈癌)、卵巢癌(卵巢癌)、外阴癌、阴道癌、输卵管癌和葡萄胎；甲状腺癌(包括乳头状、滤泡性、间变性或髓样癌)；嗜铬细胞瘤(肾上腺)；甲状旁腺的非癌性生长物；胰腺癌；以及血液癌症诸如白血病、骨髓瘤、非霍奇金氏淋巴瘤和霍奇金氏淋巴瘤。

[0296] 在另一方面，本公开提供了一种使哺乳动物中的免疫应答增强的方法，所述方法包括向所述哺乳动物施用有效量的由本公开提供的结合分子(例如抗体或可活化抗体)或组合物。在一些实施方案中，结合分子是CTLA4抗体或其抗原结合片段，并且哺乳动物是人。在一些实施方案中，结合分子是CTLA4可活化抗体，并且哺乳动物是人。术语“使免疫应答增强”或它的语法变化形式意指刺激、激起、增加、改进或加强哺乳动物的免疫系统的任何应答。免疫应答可为细胞应答(即由细胞介导，诸如由细胞毒性T淋巴细胞介导)或体液应答(即由抗体介导)，并且可为初级或次级免疫应答。使免疫应答增强的实例包括使PBMC和/或T细胞活化(包括使一种或多种细胞因子诸如IL-2和/或IFN γ 的分泌增加)。免疫应答的增强可使用为本领域技术人员所知的许多体外或体内测量来评估，包括但不限于细胞毒性T淋巴细胞测定、细胞因子的释放、肿瘤的消退、携带肿瘤的动物的存活期、抗体产生、免疫细胞增殖、细胞表面标志物的表达、以及细胞毒性。通常，当相较于由未治疗哺乳动物或未使用所叙述方法治疗的哺乳动物达成的免疫应答时，本公开的方法使由哺乳动物达成的免疫应答增强。

[0297] 在实施治疗方法时，结合分子(例如抗体或可活化抗体)可作为单药疗法单独施用，或与一种或多种额外治疗剂或疗法组合施用。因此，在另一方面，本公开提供了一种包含结合分子(例如抗体或可活化抗体)与一种或多种用于分开、依序或同时施用的额外疗法或治疗剂组合的组合疗法。术语“额外治疗剂”可指除由本公开提供的结合分子(例如抗体或可活化抗体)以外的任何治疗剂。在一个特定方面，本公开提供了一种用于治疗哺乳动物的癌症的组合疗法，所述组合疗法包括向所述哺乳动物施用有效量的本文提供的结合分子(例如抗体或可活化抗体)与一种或多种额外治疗剂组合。在另一实施方案中，哺乳动物是人。

[0298] 广泛多种癌症治疗剂可与由本公开提供的结合分子(例如抗体或可活化抗体)组合使用。本领域普通技术人员将认识到可与本公开的方法和结合分子例如抗体或可活化抗体组合使用的其他癌症疗法的存在和发展，并且将不限于本文阐述的那些疗法形式。可用于用以治疗癌症的组合疗法中的额外治疗剂的种类的实例包括(1)化学治疗剂，(2)免疫治疗剂，和(3)激素治疗剂。在一些实施方案中，额外治疗剂是病毒基因疗法、免疫检查点抑制剂、靶向疗法、放射疗法、疫苗接种疗法和/或化学治疗剂。

[0299] 术语“化学治疗剂”是指可导致癌细胞死亡，或干扰癌细胞的生长、分裂、修复和/或功能的化学或生物物质。化学治疗剂的实例包括WO 2006/129163和US 20060153808中公开的那些，所述专利的公开内容以引用的方式并入本文。特定化学治疗剂的实例包括：(1)烷基化剂，诸如苯丁酸氮芥(chlorambucil)(瘤克宁(LEUKERAN))、环磷酰胺(癌得星(CYTOXAN))、异环磷酰胺(ifosfamide)(伊弗克斯(IFEX))、盐酸二氯甲基二乙胺

(mechlorethamine hydrochloride) (盐酸氮芥 (MUSTARGEN))、噻替派 (thiotepa) (噻普勒斯 (THIOPLEX))、链脲佐菌素 (streptozotocin) (链佐星 (ZANOSAR))、卡莫司汀 (carmustine) (比克组 (BICNU)、格立得糯米纸囊剂 (GLIADEL WAFER))、洛莫司汀 (lomustine) (斯思尤 (CEENU)) 和达卡巴嗪 (dacarbazine) (甲氮咪胺 (DTIC-DOME)); (2) 生物碱或植物长春花生物碱, 包括细胞毒性抗生素, 诸如多柔比星 (doxorubicin) (阿霉素 (ADRIAMYCIN))、表柔比星 (epirubicin) (艾棱斯 (ELLENCE)、泛艾霉素 (PHARMORUBICIN))、柔红霉素 (daunorubicin) (司比定 (CERUBIDINE)、柔红霉素脂质体 (DAUNOXOME))、奈莫柔比星 (nemombicin)、伊达比星 (idarubicin) (伊达霉素无防腐剂溶液 (IDAMYCIN PFS)、善唯达 (ZAVEDOS))、米托蒽醌 (mitoxantrone) (DHAD、诺凡特龙 (NOVANTRONE))、更生霉素 (dactinomycin) (放线菌素 D (actinomycin D)、可美净 (COSMEGEN))、光神霉素 (plicamycin) (光辉霉素 (MITHRACIN))、丝裂霉素 (mitomycin) (突变霉素 (MUTAMYCIN)) 和博莱霉素 (bleomycin) (布兰诺克塞 (BLENOXANE))、酒石酸长春瑞滨 (vinorelbine tartrate) (诺维本 (NAVELBINE))、长春花碱 (vinblastine) (维尔班 (VELBAN))、长春新碱 (vincristine) (昂可文 (ONCOVIN)) 和长春地辛 (vindesine) (癌的散 (ELDISINE)); (3) 抗代谢剂, 诸如卡培他滨 (capecitabine) (希罗达 (XELODA))、阿糖胞苷 (cytarabine) (塞特沙-U (CYTOSAR-U))、氟达拉滨 (fludarabine) (福达华 (FLUDARA))、吉西他滨 (gemcitabine) (健择 (GEMZAR))、羟基脲 (hydroxyurea) (海卓 (HYDRA))、甲氨蝶呤 (methotrexate) (福勒克斯 (FOLEX)、麦沙特 (MEXATE)、曲夏尔 (Trexall))、奈拉滨 (nelarabine) (阿仑恩 (ARRANON))、三甲曲沙 (trimetrexate) (宁赐新 (NEUTREXIN)) 和培美曲塞 (pemetrexed) (爱宁达 (ALIMTA)); (4) 嘧啶拮抗剂, 诸如 5-氟尿嘧啶 (5-FU); 卡培他滨 (希罗达)、雷替曲塞 (raltitrexed) (图姆戴克斯 (TOMUDEX))、替加氟-尿嘧啶 (tegafur-uracil) (优服托拉 (UFTORAL)) 和吉西他滨 (健择); (5) 紫杉烷, 诸如多西他赛 (docetaxel) (泰索帝 (TAXOTERE))、太平洋紫杉醇 (paclitaxel) (泰素 (TAXOL)); (6) 铂药物, 诸如顺铂 (cisplatin) (帕拉汀洛 (PLATINOL)) 和卡铂 (carboplatin) (伯尔定 (PARAPLATIN)) 以及奥沙利铂 (oxaliplatin) (乐沙定 (ELOXATIN)); (7) 拓扑异构酶抑制剂, 诸如伊立替康 (irinotecan) (开普拓沙 (CAMPTOSAR))、拓扑替康 (topotecan) (癌康定 (HYCAMTIN))、依托泊苷 (etoposide) (凡毕复 (ETOPOPHOS)、灭必治 (VEPESSID)、托普萨 (TOPOSAR)) 和替尼泊苷 (teniposide) (威猛 (VUMON)); (8) 表鬼臼毒素 (epipodophyllotoxin) (鬼臼毒素 (podophyllotoxin) 衍生物), 诸如依托泊苷 (凡毕复、灭必治、托普萨); (9) 叶酸衍生物, 诸如甲酰四氢叶酸 (leucovorin) (维尔卡伏 (WELLCOVORIN)); (10) 亚硝基脲 (nitrosourea), 诸如卡莫司汀 (比克组)、洛莫司汀 (斯思尤); (11) 包括表皮生长因子受体 (EGFR)、血管内皮生长因子 (VEGF)、胰岛素受体、胰岛素样生长因子受体 (IGFR)、肝细胞生长因子受体 (HGFR) 和血小板源性生长因子受体 (PDGFR) 的受体酪氨酸激酶的抑制剂, 诸如吉非替尼 (gefitinib) (易瑞沙 (IRESSA))、埃罗替尼 (erlotinib) (塔西瓦 (TARCEVA))、硼替佐米 (bortezomib) (维尔科德 (VELCADE))、甲磺酸伊马替尼 (imatinib mesylate) (格列卫 (GLEEVEC))、吉非替尼 (genefitinib)、拉帕替尼 (lapatinib)、索拉非尼 (sorafenib)、沙利度胺 (thalidomide)、舒尼替尼 (sunitinib) (舒腾特 (SUTENT))、阿西替尼 (axitinib)、利妥昔单抗 (rituximab) (利妥星 (RITUXAN)、美罗华 (MABTHERA))、曲妥珠单抗 (trastuzumab) (赫赛汀 (HERCEPTIN))、西妥昔单抗 (cetuximab) (爱必妥 (ERBITUX))、贝伐单抗 (bevacizumab)

(阿伐斯汀 (AVASTIN)) 和雷珠单抗 (ranibizumab) (诺适得 (LUCENTIS))、lym-1 (安可临 (ONCOLYM))、W02002/053596 中公开的针对胰岛素样生长因子-1 受体 (IGF-1R) 的抗体; (12) 血管生成抑制剂, 诸如贝伐单抗 (阿伐斯汀)、苏拉明 (suramin) (各莫素 (GERMANIN))、血管抑素 (angiostatin)、SU5416、沙利度胺和基质金属蛋白酶抑制剂 (诸如巴马司他 (batimastat) 和马立马司他 (marimastat)) 以及 W02002055106 中公开的那些; 和 (13) 蛋白酶体抑制剂, 诸如硼替佐米 (维尔科德)。

[0300] 术语“免疫治疗剂”是指可使哺乳动物的免疫应答增强的化学或生物物质。免疫治疗剂的实例包括: 卡介苗 (BCG); 细胞因子, 诸如干扰素; 疫苗, 诸如 MyVax 个性化免疫疗法、Onyvax-P、安可菲 (Oncophage)、GRNVAC1、法维得 (Favld)、普罗温基 (Provenge)、吉瓦克斯 (GVAX)、洛瓦新 C (Lovaxin C)、拜瓦希得 (BiovaxID)、吉姆克斯 (GMXX) 和纽瓦克斯 (NeuVax); 以及抗体, 诸如阿来珠单抗 (alemtuzumab) (坎帕斯 (CAMPATH))、贝伐单抗 (阿伐斯汀)、西妥昔单抗 (爱必妥)、奥佐米星吉妥单抗 (gemtuzunab ozogamicin) (米洛他 (MYLOTARG))、替坦异贝莫单抗 (ibritumomab tiuxetan) (泽瓦林 (ZEVALIN))、帕尼单抗 (panitumumab) (维克替比 (VECTIBIX))、利妥昔单抗 (利妥星、美罗华)、曲妥珠单抗 (赫赛汀)、托西莫单抗 (tositumomab) (百克沙 (BEXXAR))、易普利单抗 (叶沃 (YERVOY))、曲美本单抗 (tremelimumab)、CAT-3888、针对 OX40 受体的激动抗体 (诸如 W02009/079335 中公开的那些)、针对 CD40 受体的激动抗体 (诸如 W02003/040170 中公开的那些) 和 TLR-9 激动剂 (诸如 W02003/015711、W02004/016805 和 W02009/022215 中公开的那些)。

[0301] 术语“激素治疗剂”是指抑制或消除激素的产生, 或抑制或抵抗激素对癌性细胞的生长和/或存活的影响的化学或生物物质。适于本文方法的所述药剂的实例包括 US20070117809 中公开的那些。特定激素治疗剂的实例包括他莫昔芬 (tamoxifen) (洛尔瓦德 (NOLVADEX))、托瑞米芬 (toremifene) (法乐通 (Fareston))、氟维司群 (fulvestrant) (法斯洛德 (FASLODEX))、阿那曲唑 (anastrozole) (安美达 (ARIMIDEX))、依西美坦 (exemestane) (阿诺新 (AROMASIN))、来曲唑 (letrozole) (弗隆 (FEMARA))、乙酸甲地孕酮 (megestrol acetate) (美格思 (MEGACE))、戈舍瑞林 (goserelin) (诺雷德 (ZOLADEX)) 和亮脯利特 (leuprolide) (利普安 (LUPRON))。本公开的结合分子还可与非药物激素疗法组合使用, 所述非药物激素疗法诸如 (1) 移除参与产生激素的器官或腺体诸如卵巢、睾丸、肾上腺和垂体腺的全部或一部分的手术方法, 和 (2) 放射治疗, 其中使患者的器官或腺体经受数量足以抑制或消除所靶向激素的产生的放射。

[0302] 在一些实施方案中, 额外治疗剂是以下中的一者或多者: 泊马莱斯特、雷利米德、来那度胺、泊马度胺、沙利度胺、DNA 烷基化含铂衍生物顺铂、5-氟尿嘧啶、环磷酰胺、抗 CD137 抗体、抗 PD-1 抗体、抗 PD-L1 抗体、抗 CD20 抗体、抗 CD40 抗体、抗 DR5 抗体、抗 CD1d 抗体、抗 TIM3 抗体、抗 SLAMF7 抗体、抗 KIR 受体抗体、抗 OX40 抗体、抗 HER2 抗体、抗 ErbB-2 抗体、抗 EGFR 抗体、西妥昔单抗、利妥昔单抗、曲妥珠单抗、帕母单抗、放射疗法、单次剂量放射、分次放射、局灶性放射、全器官放射、IL-12、IFN α 、GM-CSF、嵌合抗原受体、继承性转移的 T 细胞、抗癌疫苗和溶瘤性病毒。

[0303] 用于治疗癌症的组合疗法还涵盖结合分子 (例如抗体或可活化抗体) 与用以移除肿瘤的手术的组合。结合分子 (例如抗体或可活化抗体) 可在手术之前、期间或之后向哺乳动物施用。

[0304] 用于治疗癌症的组合疗法还涵盖结合分子(例如抗体或可活化抗体)与放射疗法诸如离子化(电磁)放射疗法(例如X射线或 γ 射线)和粒子束放射疗法(例如高线性能量放射)的组合。放射源可在哺乳动物的外部或内部。结合分子(例如抗体或可活化抗体)可在放射疗法之前、期间或之后向哺乳动物施用。

[0305] 由本公开提供的结合分子(例如抗体或可活化抗体)和组合物可通过任何适合经肠施用途或胃肠外施用途施用。术语“经肠施用途”是指通过胃肠道的任何部分来施用。经肠途径的实例包括口服、经粘膜、经颊和经直肠途径,或胃内途径。“胃肠外施用途”是指除经肠途径以外的施用途。胃肠外施用途的实例包括静脉内、肌肉内、真皮内、腹膜内、肿瘤内、膀胱内、动脉内、鞘内、囊内、眶内、心内、经气管、关节内、囊下、蛛网膜下、脊柱内、硬膜外以及胸骨内、皮下或经表面施用。本公开的结合分子(例如抗体或可活化抗体)和组合物可使用任何适合方法施用,诸如通过口服摄取、鼻饲管、胃造口管、注射、输注、可植入输注泵和渗透泵。适合施用途和方法可视许多因素而变化,诸如所用特定结合分子(例如抗体或可活化抗体)、所需吸收速率、所用特定制剂或剂型、所治疗病症的类型或严重性、特定作用部位以及患者的状况,并且可易于由本领域技术人员选择。

[0306] 术语结合分子(例如抗体或可活化抗体)的“有效量”可指有效达成预定治疗目的的量。举例来说,在使免疫应答增强的情形下,“有效量”可为有效刺激、激起、增加、改进或加强哺乳动物的免疫系统的任何应答的任何量。在治疗疾病的情形下,“有效量”可为足以在所治疗哺乳动物中导致任何合乎需要或有益的作用的任何量。特别地,在治疗癌症的情况下,合乎需要或有益的作用的实例包括抑制癌细胞的进一步生长或扩散,使癌细胞死亡,抑制癌症的复发,减轻与癌症相关的疼痛,或改进哺乳动物的存活期。结合分子(例如抗体或可活化抗体)的治疗有效量通常在哺乳动物的每kg体重约0.001至约500mg,并且更通常在约0.01至约100mg/kg的范围内。举例来说,量可为哺乳动物的每kg体重约0.3mg、1mg、3mg、5mg、10mg、50mg或100mg。在一些实施方案中,结合分子(例如抗体或可活化抗体)的治疗有效量在哺乳动物的每kg体重约0.01-30mg的范围内。在一些其他实施方案中,结合分子(例如抗体或可活化抗体)的治疗有效量在哺乳动物的每kg体重约0.05-15mg的范围内。待施用的精确剂量水平可易于由本领域技术人员确定,并且将取决于许多因素,诸如待治疗病症的类型和严重性、采用的特定结合分子(例如抗体或可活化抗体)、施用途、施用时间、治疗的持续时间、采用的特定额外疗法、所治疗患者的年龄、性别、重量、状况、总体健康状况和先前医学史,以及医学领域中熟知的类似因素。

[0307] 通常在多个时刻施用结合分子(例如抗体或可活化抗体)或组合物。单一剂量之间的间隔可为例如每日、每周、每月、每三个月或每年。一示例性治疗方案需要每周一次,每两周一次,每三周一次,每四周一次,一个月一次,每三个月一次或每三至六个月一次进行施用。用于结合分子(例如抗体或可活化抗体)的典型剂量方案包括通过静脉内施用,每kg体重1mg或每kg体重3mg,使用以下给药时程中的一者:(i)每四周,持续六次剂量,接着每三个月;(ii)每三周;(iii)每kg体重3mg,1次,继之以每三周,每kg体重1mg。

[0308] VIII. 药盒

[0309] 在另一方面,本文提供了一种包含本公开的结合分子(例如抗体或可活化抗体)和/或组合物的药盒。在一些实施方案中,药盒还包括包含关于使用结合分子(例如抗体或可活化抗体)和/或组合物的说明的包装插页。在一些实施方案中,药盒还包括一种或多种

例如用于储存、转移、施用或以其他方式使用结合分子(例如抗体或可活化抗体)和/或组合物的缓冲液。在一些实施方案中,药盒还包括一个或多个用于储存结合分子(例如抗体或可活化抗体)和/或组合物的容器。

[0310] 先前书面描述被视为足以使得本领域技术人员能够实施本公开。以下实施例仅出于说明性目的而提供,并且不意图以任何方式限制本公开的范围。实际上,除本文显示和描述的那些修改之外,根据先前描述,本公开的各种修改将变得为本领域技术人员显而易见,并且落在随附权利要求的范围内。

[0311] 实施例

[0312] 实施例1:产生特异性结合人CTLA4的初级Fab

[0313] 专有噬菌粒文库(参见以引用的方式整体并入本文的PCT申请号PCT/CN2017/098333,也参见以引用的方式整体并入本文的PCT申请号PCT/CN2017/098299)用于针对人CTLA4抗原进行淘选。进行了总计3-5轮淘选。在最后一轮淘选之后,进行单菌落上清液ELISA以鉴定特异性识别人CTLA4(参见例如UniProt登录号P16410)的初级命中物。初级命中物定义为其ELISA信号是背景的ELISA信号的至少两倍的那些命中物。接着对命中物测序,并且在大肠杆菌中表达独特克隆并加以纯化。它们针对人CTLA4的亲和力通过ForteBio Octet RED96系统来测量。简要说, AHC传感器(抗人IgG Fc捕集浸渍和读取生物传感器)用于捕集重组人CTLA4-Fc(Sino Biological, 11159-H03H),并且浸入含有在动力学缓冲液(含0.02%吐温20、0.1%BSA的PBS缓冲液)中稀释至10 μ g/mL的纯化Fab的孔中。获取的ForteBio数据用Data Acquisition软件7.1处理,并且将动力学数据相对于1:1朗缪尔(Langmuir)结合模型加以拟合。候选物清单被精选成234个具有ELISA阳性命中与独特序列两者的Fab命中物。遵循 K_D 响应信号 $R > 0.1$ 、 $R^2 > 0.9$ 的准则,清单被进一步精选成43个目标命中物。这些命中物的亲和力和动力学参数(减除了背景)显示于下表1中。

[0314] 表1:所选Fab对人CTLA4的亲和力

[0315]

命中物标识符:	K _D (M):	k 缔合(1/Ms):	k 解离(1/s):
B18153	5.96E-09	8.93E+04	5.32E-04
B15719	6.93E-09	3.21E+05	2.22E-03
B15746	7.15E-09	3.07E+05	2.20E-03
B15734	7.63E-09	3.05E+05	2.33E-03
B15710	8.01E-09	3.51E+05	2.81E-03
B13874	1.06E-08	1.19E+05	1.26E-03
B13898	1.07E-08	1.09E+05	1.16E-03
B15728	1.18E-08	4.24E+05	4.99E-03
B15705	1.20E-08	1.94E+05	2.33E-03
B15716	1.21E-08	3.91E+04	4.71E-04
B15672	1.23E-08	6.83E+04	8.39E-04
B15738	1.24E-08	3.76E+05	4.67E-03
B15694	1.28E-08	1.52E+05	1.94E-03
B15754	1.35E-08	2.76E+05	3.71E-03
B15749	1.38E-08	2.69E+05	3.72E-03
B15740	1.45E-08	1.78E+05	2.58E-03
B15489	1.46E-08	6.08E+04	8.87E-04
B13880	1.59E-08	1.04E+05	1.66E-03
B15699	1.66E-08	4.42E+05	7.35E-03
B15745	1.73E-08	2.58E+05	4.47E-03
B18174	1.82E-08	5.16E+04	9.38E-04
B15739	1.86E-08	4.24E+05	7.86E-03
B15721	2.21E-08	5.31E+05	1.17E-02
B15673	2.44E-08	6.95E+04	1.70E-03
B15737	2.75E-08	4.77E+05	1.31E-02

[0316]

B15696	2.79E-08	1.44E+05	4.03E-03
B15491	2.98E-08	6.24E+04	1.86E-03
B15724	3.01E-08	5.52E+05	1.66E-02
B15741	3.08E-08	2.09E+05	6.44E-03
B15757	3.72E-08	1.05E+05	3.91E-03
B15759	5.36E-08	2.46E+05	1.32E-02
B15756	5.55E-08	1.20E+05	6.63E-03
B15722	6.12E-08	7.09E+04	4.34E-03
B15750	6.23E-08	9.37E+04	5.84E-03
B15702	6.92E-08	3.61E+05	2.50E-02
B14242	7.58E-08	3.36E+05	2.55E-02
B13878	8.59E-08	3.08E+04	2.64E-03
B15717	1.05E-07	1.77E+05	1.85E-02
B15187	1.37E-07	2.73E+04	3.75E-03
B15695	1.52E-07	1.81E+05	2.76E-02
B15189	1.70E-07	2.04E+04	3.47E-03
B15762	1.85E-07	4.60E+04	8.49E-03
B15730	2.59E-07	3.45E+04	8.93E-03

[0317] 接着,通过ELISA来测定各种Fab命中物的物种交叉反应性。简要说来,将100 μ L 1.25 μ g/mL抗人IgG (Fab特异性) 抗体 (Sigma, I5260) 在4 $^{\circ}$ C下在Maxisorp微板 (Thermo Scientific 446469) 上包被过夜。在封闭之后,添加100 μ L Fab命中物 (2 μ g/mL), 并且孵育1小时。在将孔洗涤3-4次之后,添加与人FC片段融合的人、食蟹猴或小鼠CTLA4抗原的连续稀释液,并且孵育1小时。在洗涤之后,用PBS以1:2000稀释经HRP标记山羊抗人FC抗体,并且添加至每个孔中以进行1小时孵育。将板洗涤三次,并且在室温下与TMB底物一起孵育3-5分钟。在使反应终止之后测量在450nm下的吸光度。测试的Fab中的每一者的物种交叉反应性概述于下表2中。引起关注的是,这个分析鉴定了具有不同交叉反应性的Fab:结果指示命中物B13873、B15700、B15704、B15706、B15709、B15711、B15712、B15715、B15720、B15725、B15723、B15731、B15732、B15735、B15736、B15744、B15760、B16083和B15188结合于人、猴和小鼠CTLA4;命中物B15188、B15190、B15701、B15729、B15733、B15742、B15747、B15743、B15751、B15752、B15753和B18157结合于人和猴CTLA4,并且微弱结合于小鼠CTLA4;命中物B13878、B14242、B15189、B15491、B15673、B15694、B15696、B15699、B15702、B15705、B15710、B15716、B15717、B15719、B15721、B15722、B15724、B15728、B15734、B15737、B15738、B15739、B15740、B15745、B15746、B15749、B15750、B15754、B15756、B15757、B15759和B15762结合于人CTLA4,但不结合于小鼠CTLA4;命中物B15688结合于人和小鼠CTLA4,但不结合于猴CTLA4;并且命中物B13874、B13880、B13898、B15187、B15489、B15672、B15695、B15730、B15741、B18153和B18174结合于人CTLA4,但不结合于猴或小鼠CTLA4。

[0318] 表2:Fab与人、猴和小鼠CTLA4的交叉反应性

[0319]

命中物标识符:	结合人 CTLA?	结合猴 CTLA4?	结合小鼠 CTLA4?
B13873	是	是	是
B15688	是	否	是
B15700	是	是	是
B15704	是	是	是
B15706	是	是	是
B15709	是	是	是
B15711	是	是	是
B15712	是	是	是
B15715	是	是	是
B15720	是	是	是
B15723	是	是	是
B15725	是	是	是
B15731	是	是	是
B15732	是	是	是
B15735	是	是	是
B15736	是	是	是
B15744	是	是	是
B15760	是	是	是
B16083	是	是	是
B15188	是	是	微弱
B15190	是	是	微弱
B15701	是	是	微弱
B15729	是	是	微弱
B15733	是	是	微弱

[0320]

B15742	是	是	微弱
B15743	是	是	微弱
B15747	是	是	微弱
B15751	是	是	微弱
B15752	是	是	微弱
B15753	是	是	微弱
B18157	是	是	微弱
B13874	是	否	否
B13878	是	是	否
B13880	是	否	否
B13898	是	否	否
B14242	是	是	否
B15187	是	否	否
B15189	是	是	否
B15489	是	否	否
B15491	是	是	否
B15672	是	否	否
B15673	是	是	否
B15694	是	是	否
B15695	是	否	否
B15696	是	是	否
B15699	是	是	否
B15702	是	是	否
B15705	是	是	否
B15710	是	是	否
B15716	是	是	否
B15717	是	是	否
B15719	是	是	否
B15721	是	是	否
B15722	是	是	否
B15724	是	是	否
B15728	是	是	否
B15730	是	否	否
B15734	是	是	否
B15737	是	是	否
B15738	是	是	否
B15739	是	是	否
B15740	是	是	否
B15741	是	否	否
B15745	是	是	否
B15746	是	是	否
B15749	是	是	否

[0321]

B15750	是	是	否
B15754	是	是	否
B15756	是	是	否
B15757	是	是	否
B15759	是	是	否
B15762	是	是	否
B18153	是	否	否
B18174	是	否	否

[0322] 实施例2: IgG转变和表达

[0323] 接着使来自以上实施例1的精选命中物中的13个命中物转变成人IgG1抗体以进行详细生物物理学和功能性表征(表3)。将Fab命中物B15709、B15716、B15722、B15732、B15740、B15744、B15756、B15700、B15711、B15717、B15735、B15736和B16083的重链和轻链分别克隆至哺乳动物表达载体pTT5-SPB中。还将参考抗体的重链和轻链克隆至pTT5-SPB中。

[0324] 表3: 以IgG1抗体形式克隆的Fab命中物

[0325]

抗体 (AB) 名称:	Fab命中物标识符:	同种型:
TY21585	B15709	hIgG1
TY21586	B15716	hIgG1
TY21587	B15722	hIgG1
TY21588	B15732	hIgG1
TY21589	B15740	hIgG1
TY21580	B15744	hIgG1
TY21591	B15756	hIgG1
TY21687	B15700	hIgG1
TY21688	B15711	hIgG1
TY21689	B15717	hIgG1
TY21680	B15735	hIgG1
TY21691	B15736	hIgG1
TY21692	B16083	hIgG1
TAC2114	参考	hIgG1

[0326] 遵循制造商方案, 将编码抗体重链和轻链的各对质粒短暂转染至293F细胞中。收集用编码抗体TY21585、TY21586、TY21587、TY21588、TY21589、TY21580或TY21591的质粒转染的细胞的上清液, 通过离心和过滤加以澄清化, 并且所得IgG用标准蛋白A亲和色谱法(MabSelect SuRe, GE Healthcare)纯化。将蛋白质洗脱并中和, 并且进行缓冲液交换以进入20mM PB缓冲液(20mM NaH₂PO₄、150mM NaCl, pH 7.0)中。蛋白质浓度通过紫外分光光度测定法来测定, 并且在变性、还原性和非还原性条件下通过SDS-PAGE或SEC-HPLC来分析IgG纯度。

[0327] 收集用编码抗体TY21687、TY21689、TY21680、TY21691或TY21692的质粒转染的细胞的上清液, 通过离心和过滤加以澄清化, 并且所得IgG用标准蛋白A亲和色谱法(MabSelect SuRe, GE Healthcare)纯化。将蛋白质洗脱并中和, 并且进行缓冲液交换以进

入20mM组氨酸缓冲液(20mM组氨酸、3.5mL 6M HCl, pH 5.5)中。蛋白质浓度通过紫外分光光度测定法来测定,并且在变性、还原性和非还原性条件下通过SDS-PAGE或SEC-HPLC来分析IgG纯度。

[0328] 实施例3:对IgG转变抗体的体外功能性表征

[0329] 根据制造商的指导方针,使用Biacore™ T200仪器(Biacore AB, Uppsala, Sweden),通过表面等离子体共振(SPR)分析来考查抗体针对人、猴和小鼠CTLA4的结合亲和力和动力学(表4)。根据胺偶联试剂盒(GE Biacore#BR-1000-50)的说明书,来自人抗体捕集试剂盒(GE BR-1008-39)的抗人IgG (Fc) 抗体通过它的胺基团偶联于传感器芯片的羧化表面上来固定在CM5芯片上。固定化抗人IgG (Fc) 抗体用于捕集抗体TY21585、TY21586、TY21580、TY21591、TY21687、TY21689、TY21680、TY21691、TY21692和TAC2114。TAC2114与商业抗体易普利单抗具有相同氨基酸序列。在六种不同浓度(于运行缓冲液中稀释的3.13、6.25、12.5、25、50和100nM)下测量结合,并且使用30μl/min的流速。所用运行缓冲液是HBS-EP(100mM HEPES、1.5M氯化钠、0.05%表面活性剂P20, pH 7.6)。根据制造商的指导方针,使用Biacore T200评估软件(Biacore AB),将缔合和解离曲线相对于1:1朗缪尔结合模型加以拟合。如下表4中所示,所有测试抗体都能够结合人和猴CTLA4,并且除TY21591、TY21689和TAC2114之外的所有抗体还能够结合小鼠CTLA4。

[0330] 表4: IgG1抗体对人、猴和小鼠CTLA4的结合亲和力

抗体名称:	K _D (nM)		
	人 CTLA4:	猴 CTLA4:	小鼠 CTLA4:
TY21585	8.15	8.26	1.71
TY21586	7.80	15.00	303
TY21580	2.58	0.44	0.51
TY21591	9.68	3.27	NC
TY21687	1.82	1.52	2.76
TY21689	0.95	0.91	NC
TY21680	1.48	1.29	0.67
TY21691	2.08	2.44	1.46
TY21692	3.95	2.76	1.12
TAC2114	6.68	1.98	NC

[0332] NC=不具有交叉反应性

[0333] 接着测试某些IgG抗体结合可溶性人(图1A、表5A)或犬(图1B、表5B)CTLA4的能力。制备1μg/mL与人FC片段融合的人CTLA4,或与His标签融合的犬CTLA4,并且用于在2-8℃下将ELISA板包被过夜。在封闭之后,添加100μL连续稀释的IgG抗体,并且在37℃下孵育1小时。将板洗涤四次,接着与HRP-抗人IgG (Fab特异性) 抗体(1:6000稀释)一起在37℃下孵育1小时。再次将板洗涤四次,并且与TMB底物一起在室温下孵育15分钟。在使反应终止之后测量在450nm下的吸光度。通过Graphpad Prism 6,采用非线性拟合来分析数据。如图1A-图1B和表5A-表5B中所示,所有测试抗体都结合于人CTLA4,并且除抗体TY21586和TAC2114之外,还结合于犬CTLA4。引起关注的是, TY21580以最高亲和力结合人CTLA4与狗CTLA4两者,其中K_D分别是0.27和0.49。

[0334] 表5A: 针对人CTLA4的ELISA

[0335]	抗体名称:	LogEC ₅₀ :	EC ₅₀ :		K _D
			M	nM	nM
	TY21585	-9.256	5.552E-10	0.5552	0.56
	TY21586	-8.896	1.27E-09	1.2710	1.27

[0336]	TY21580	-9.571	2.685E-10	0.2685	0.27
	TY21591	-9.080	8.309E-10	0.8309	0.83
	TY21687	-9.495	3.201E-10	0.3201	0.32
	TAC2114	-9.482	3.296E-10	0.3296	0.33

[0337] 表5B: 针对犬CTLA4的ELISA

[0338]	抗体名称:	LogEC ₅₀ :	EC ₅₀ :		K _D
			M	nM	nM
	TY21585	-8.219	6.045E-09	6.0450	6.05
	TY21586	ND	ND	ND	ND
	TY21580	-9.313	4.86E-10	0.4860	0.49
	TY21591	-9.151	7.066E-10	0.7066	0.71
	TY21687	-9.128	7.451E-10	0.7451	0.75
	TAC2114	ND	ND	ND	ND

[0339] ND=未测出

[0340] 还评估了抗体针对在HEK293F细胞的表面上短暂表达的人和小鼠CTLA4的亲合力(图2)。简要来说,用从还编码EGFP的双顺反子IRES载体表达全长人、猴或小鼠CTLA4的质粒转染HEK293F细胞,并且EGFP表达用于鉴定经转染细胞。在48小时之后,将哺乳动物细胞混悬液(2×10^5 /孔)转移至Eppendorf管中,离心,丢弃上清液,将细胞用1mL PBSA再混悬(以达到密度是 4×10^6 个细胞/毫升),并且添加至96孔板中。将测试抗体的3倍连续稀释液(15 μ g/mL、5 μ g/mL、1.67 μ g/mL、0.55 μ g/mL、0.185 μ g/mL、0.062 μ g/mL和0.0309 μ g/mL,加上0 μ g/mL空白对照)吸移至96孔板中,在冰上孵育1小时(避光),用预冷却1xPBSA缓冲液洗涤细胞,并且随后与Alexa Fluor® 647缀合的小鼠抗人FC抗体一起在冰上孵育30分钟。接着将细胞洗涤一次,随后通过流式细胞计量术(Beckman® CytoFlex)来分析。如图2中所示,所有测试抗体都能够结合在HEK293F细胞的表面上表达的人CTLA4,并且除TY21589之外,所有抗体都结合于小鼠细胞表面暴露的小鼠CTLA4。TY21580以低nM亲合力结合于在细胞表面上表达的人和小鼠CTLA4,而抗体TY21585和TY21586以高nM亲合力结合于在细胞表面上表达的人CTLA4。

[0341] 还使用ForteBio red 96仪器(Pa11,USA)测试了抗体TY21580、TY21687、TY21680和TY21691针对大鼠CTLA4蛋白的结合亲和力和动力学。SA传感器(Pa11,185019)用于固定与人FC融合的生物素化大鼠CTLA4蛋白,并且接着使传感器与在15 μ g/mL的浓度(用KB缓冲液即补充以0.02%吐温20和0.1%BSA的PBS缓冲液稀释)下的IgG转变命中物接触300秒,接着在KB缓冲液中解离300秒。根据制造商的指导方针,使用ForteBio数据分析7.1(Pa11,USA),将缔合和解离曲线相对于1:1朗缪尔结合模型加以拟合。如下表6中所示,所有测试抗体都能够结合大鼠CTLA4。

[0342] 表6: 测试抗体对大鼠CTLA4的结合亲和力

[0343]	抗体名称:	K_D (nM) :
	TY21580	0.38
	TY21687	0.78
	TY21680	0.21
	TY21691	0.58

[0344] IgG与活化的T细胞的结合

[0345] 接着,测试IgG结合活化的人、猴和小鼠T细胞的能力。使用Histopaque-1077 (Sigma),通过密度梯度离心从健康供者(#106)的血液新鲜分离人PBMC。使用人T细胞富集试剂盒(StemCell Technologies)从PBMC分离人T细胞,随后用抗CD3抗体和抗CD28抗体刺激。简要说,在4℃下将抗CD3抗体(克隆:0KT3,BioLegend)以每孔0.2μg处于200μL中来在96孔板中包被过夜。在洗涤之后,将混悬于含有10%FBS和1%青霉素/链霉素的RPMI-1640中的T细胞添加至板中。将处于200μL中的5x10E5个T细胞添加至96孔板的每个孔中。接着,添加1μL抗人CD28抗体(克隆:28.2,BD)以达到5μg/mL的最终浓度。将T细胞孵育96小时,接着通过流式细胞计量分析来测定TY21580与T细胞的结合(图3)。将T细胞用经APC标记TY21580或人IgG1(同种型对照)在37℃下染色2小时。在洗涤之后,在CytoFLEX流式细胞仪(Beckman Coulter)上分析细胞,并且用FlowJo软件分析数据。如图3中所示,TY21580结合于活化的CD4⁺和CD8⁺人T细胞,而对照IgG显示不结合。此外,APC-TY21580显示不结合静息T细胞(数据未显示)。

[0346] 使用Histopaque-1077 (Sigma),通过密度梯度离心从原初食蟹猴的血液新鲜分离猴PBMC。使用非人灵长类动物全T细胞分离试剂盒(Miltenyi Biotec)从PBMC分离猴T细胞,随后用抗CD3抗体和抗CD28抗体刺激。简要说,在4℃下将抗CD3抗体(克隆:SP34,BD)以每孔0.2μg处于200μL中来在96孔板中包被过夜。在洗涤之后,将混悬于含有10%FBS和1%青霉素/链霉素的RPMI-1640中的T细胞添加至板中。将处于200μL中的2x10E5个T细胞添加至96孔板的每个孔中。接着,添加1μL抗人CD28抗体(克隆:28.2,BD)以达到5μg/mL的最终浓度。将T细胞孵育72小时,并且通过流式细胞计量分析来测定TY21580与T细胞的结合(图3)。将T细胞用经APC标记TY21580或人IgG1(同种型对照)在37℃下染色2小时。在洗涤之后,在CytoFLEX流式细胞仪(Beckman Coulter)上分析细胞,并且用FlowJo软件分析数据。如图3中所示,TY21580结合于活化的CD4⁺和CD8⁺猴T细胞,而对照IgG显示不结合。此外,APC-TY21580显示不结合静息T细胞(数据未显示)。

[0347] 从成年BALB/c小鼠脾分离的小鼠T细胞用于诱导CTLA-4表达。来自新鲜小鼠脾的脾细胞用于用EasySep™小鼠T细胞分离试剂盒(StemCell Technologies)分离T细胞,随后用抗小鼠CD3抗体和抗CD28抗体刺激。简要说,在4℃下将抗小鼠CD3ε抗体(Biolegend)以每孔0.2μg处于200μL中来在96孔板中包被过夜。在洗涤之后,将混悬于含有10%FBS和1%青霉素/链霉素的RPMI-1640中的小鼠T细胞以5x10E5个T细胞处于200μL中来添加至板的每个孔中。接着,添加1μL抗小鼠CD28抗体(eBioscience)以达到5μg/mL的最终浓度。将小鼠T细胞孵育72小时,接着通过流式细胞计量分析来测定TY21580与T细胞的结合(图3)。将T细胞用经APC标记TY21580或人IgG1(同种型对照)在37℃下染色2小时。在洗涤之后,在CytoFLEX流式细胞仪(Beckman Coulter)上分析细胞,并且用FlowJo软件分析数据。如图3中所示,TY21580结合于活化的小鼠CD4⁺和CD8⁺ T细胞,而对照IgG显示不结合。

[0348] 抗体对人CTLA4的结合选择性

[0349] 接着考查抗体选择性。在HEK293F细胞的表面上短暂过度表达人CTLA4、PD1、LAG3、Tim3、B7H3、CD95、TNFR1、OX40、CD40、PD-L1、BLTA、VISTA、PDL2、ICOS和B7H4。将经转染细胞于预冷却1xPBSA缓冲液(1.76mM KH₂PO₄、10.14mM Na₂HPO₄ • 12H₂O、2.68mM KCl、136.89mM NaCl和1% BSA)中洗涤,接着与100nM测试抗体一起在冰上孵育1小时。将细胞用染色缓冲液洗涤一次,并且添加Alexa Fluor® 647缀合的小鼠抗人FC抗体并在冰上避光孵育30分钟。将样品用染色缓冲液洗涤一次,随后通过流式细胞计量术来分析。在人CTLA4、PD1、LAG3、Tim3和B7-H3的情况下测试TY21585、TY21586、TY21580、TY21687、TY21689、TY21680和TY21691(图4A);在人CD95、TNFR1、OX40和CD40的情况下进一步测试TY21585、TY21586、TY21580(图4B);此外,在人PD-L1、BLTA、VISTA、PDL2、ICOS和B7-H4的情况下测试TY21586、TY21580(图4C)。如图4A-图4C中所示,所有测试抗体都专门结合于人CTLA4而非任何其他测试抗原(或用空载体转染的亲本细胞)。

[0350] 根据ELISA的配体竞争结合

[0351] 接着通过ELISA来测试抗体阻断CTLA4与它的同源配体CD80和CD86的结合的能力。将重组人CTLA4(与人Fc和His标签融合)于碳酸盐缓冲溶液(pH 9.4)中稀释至1μg/mL,并且在4℃下在Maxisorp板上包被过夜。将板用补充以2% (w/v) 脱脂奶的PBS在37℃下封闭1小时。在洗涤之后,将50uL生物素化CD80(4μg/mL)和50uL各种浓度的测试抗体(在200μg/mL至1.56μg/mL的范围内的2倍连续稀释液)相继添加至每个孔中,并且在37℃下孵育1小时。将板洗涤四次,并且将100μL HRP-中性亲和素(1:1000)添加至每个孔中并在37℃下孵育1小时。如先前所述将板洗涤,并且添加50μL TMB底物溶液并在室温下孵育5分钟,随后通过50μL硫酸(2M)来终止反应。如图5A-图5B中所示,除TY21589之外,所有测试抗体都阻断CTLA4与CD80的结合。

[0352] 将与Fc融合的人CD86于碳酸盐缓冲溶液(pH 9.4)中稀释至1μg/mL,并且在4℃下在Maxisorp板上包被过夜。将板用补充以2% (w/v) 脱脂奶的PBS在37℃下封闭1小时。在洗涤之后,将50uL与人Fc和His标签融合的生物素化人CTLA4(2.8μg/mL)和50uL各种浓度的测试抗体(在100μg/mL至0.78μg/mL的范围内的2倍连续稀释液)相继添加至每个孔中,并且在37℃下孵育1小时。将板洗涤四次,并且将100μL HRP-中性亲和素(1:1000)添加至每个孔中并在37℃下孵育1小时。如先前所述将板洗涤,并且添加50μL TMB底物溶液并在室温下孵育5分钟,随后通过50μL硫酸(2M)来终止反应。如图5C-图5D中所示,所有测试抗体都阻断CTLA4与CD86的结合。

[0353] 根据流式细胞计量术的配体竞争结合

[0354] 还通过流式细胞计量术来测试抗体阻断CTLA4与它的同源配体CD80和CD86的结合的能力。在HEK293F细胞中短暂表达编码全长人CTLA4的质粒。将细胞用染色缓冲液(包括1.76mM KH₂PO₄、10.14mM Na₂HPO₄ • 12H₂O、2.68mM KCl、136.89mM NaCl和1% BSA的PBSA缓冲液)洗涤,并且再混悬于含有100nM测试抗体的染色缓冲液中。在冰上孵育60分钟之后,将100nM生物素化人CD80-Fc-Bio或CD86-Fc-Bio添加至每个孔中,并且在冰上再孵育1小时。将细胞用染色缓冲液洗涤一次,并且添加100μL含有Alexa fluor 633缀合的链霉亲和素的染色缓冲液并在冰上避光孵育30分钟。将细胞洗涤一次,并且通过CytoFlex流式细胞计量术来分析。如图6A中所示,所有测试抗体都以浓度依赖性方式阻断CTLA4与CD80的结合。

TY21588显示最强阻断能力,继之以TY21580和TAC2114达成显著阻断;以及TY21585、TY21587、TY21589、TY21591达成有效性较小的阻断。TY21589显示少许阻断乃至不阻断。如图6B中所示,所有测试抗体都以浓度依赖性方式阻断CTLA4与CD86的结合。TY21588、TY21589、TY21580、TY21591和TAC2114显示最强阻断能力;TY21585和TY21587达成有效性较小的阻断。

[0355] 与Fc γ R的结合

[0356] 接着测试TY21586、TY21580和TAC2114针对CD16a (176Phe) (Sino Biological Inc,10389-H08H)、CD16a (176Val,10389-H08H1)、CD32a (Sino Biological Inc,10374-H08H)、CD32b (Sino Biological Inc,10259-H08H) 和CD64 (Sino Biological Inc,10256-H08H) 的结合亲和力。根据制造商的指导方针,使用Biacore™ T200仪器 (Biacore AB, Uppsala, Sweden),通过表面等离子体共振 (SPR) 分析来考查蛋白质结合。根据胺偶联试剂盒 (GE Biacore#BR-1000-50) 的说明书,蛋白L (Sino Biological Inc.11044-H07E) 通过它的胺基团偶联于传感器芯片的羧化表面上来固定在CM5芯片上。固定化抗人IgG (Fc) 抗体用于捕集TY21586、TY21580和TAC2114。在30 μ l/min的流速下注射在运行缓冲液中稀释的连续浓度 (12.5、25、50、25、100和200nM) 的Fc γ R蛋白。所用运行缓冲液是HBS-EP (100mM HEPES、1.5M氯化钠、0.05%表面活性剂P20, pH7.6)。根据制造商的指导方针,使用Biacore T200评估软件 (Biacore AB, Uppsala, Sweden),将缔合和解离曲线相对于1:1朗缪尔结合模型加以拟合。如下表7中所示,相较于参考抗体 (TAC2114),TY21586和TY21580关于与Fc γ R的结合显示类似亲和力。

[0357] 表7:抗体与Fc γ R的结合

[0358]

K _D (nM)					
抗体名称	CD16a (176Phe)	CD16a (176Val)	CD32a	CD32b	CD64
[0359] TY21586	143.000	453.000	884.000	1340.000	0.214
TY21580	145.000	624.000	884.000	1110.000	0.202
TAC2114	237.000	577.000	706.000	735.000	0.255

[0360] 与FcRn的结合

[0361] 根据制造商的指导方针,使用Biacore™ T200仪器 (Biacore AB, Uppsala, Sweden),通过表面等离子体共振 (SPR) 分析来考查测试抗体对重组人FcRn的结合亲和力。根据胺偶联试剂盒 (GE Biacore#BR-1000-50) 的说明书,人FcRn蛋白 (Sino Biological Inc.11044-H07E) 通过它的胺基团偶联于传感器芯片的羧化表面上来固定在CM5芯片上。将100nM的每种抗体在运行缓冲液 (50mM NaPO4、150mM NaCl和0.05% (v/v) 表面活性剂20, pH 6.0) 中稀释,并且在30 μ l/min的流速下持续120秒注射样品。如图7中所示,相比于TAC2114,抗体TY21585、TY21580、TY21591、TY21687和TY21691展现与FcRn的更高结合%,此指示相较于参考抗体 (TAC2114),Biacore芯片上的IgG-FcRn复合物可经受使复合物稳定的构象变化。抗体TY21586、TY21587、TY21589、TY21689和TY21680显示低结合%。

[0362] 人PBMC活化

[0363] 初步研究显示TY21580不刺激人T细胞活化或增殖。因为T细胞上的CTLA4活性与第一信号 (TCR/CD3) 和涉及B7-CD28/CTLA-4的第二信号相关,所以选择人PBMC,并且测定在低

浓度的抗CD3抗体存在下, TY21580的活性。将抗CD3抗体 (OKT-3) 在4℃下在96孔板上包被过夜。在洗涤之后, 将 1×10^5 个新鲜分离的人PBMC添加至每个孔中, 随后在不同浓度下添加测试物品。在刺激之后48小时, 使用人IL-2 ELISA Ready-SET-Go (Invitrogen) 试剂盒测量对IL-2的诱导。使用人IFN γ ELISA Ready-SET-Go (Invitrogen) 试剂盒测量上清液中的IFN γ 。如图8A和图9中所示, 在抗CD3抗体存在下, 抗体TY21580使人PBMC活化显著增加, 而单独TY21580不具有活性。

[0364] 树突细胞MLR测定

[0365] 在以下三对供者的情况下, 使用单核细胞源性DC和CD4⁺ T淋巴细胞进行DC-MLR测定: D42/D109、D32/D104和D104/D42 (图10)。为获得DC细胞, 通过密度梯度离心来从健康供者分离PBMC, 并且使用正性选择商业试剂盒 (StemCell) 从PBMC纯化CD14⁺单核细胞。通过在补充以10%热失活FBS、1%青霉素/链霉素、20ng/mL rhGM-CSF和20ng/mL rhIL-4的RPMI-1640中体外培养6天, 使CD14⁺单核细胞偏斜以成为DC。在第3天, 培养基用新鲜培养基更换。在第6天, 在补充以10%热失活FBS、1%青霉素/链霉素和50ng/mL rhTNF- α 的RPMI-1640培养基中持续24小时诱导DC成熟。CD4⁺ T细胞通过负性分离来从另一健康供者纯化。将测试物品滴定成相应浓度 (如图10中所示)。使收集的DC (1×10^4) 与同种异体CD4⁺ T细胞 (1×10^5) 在有或无经滴定测试物品下共培养。抗PD1抗体用作DC-MLR测定的阳性对照。在共培养之后第5天, 使用人IFN γ Ready-SET-Go ELISA试剂盒, 通过ELISA来测量上清液中的IFN γ 。如图10中所示, 抗体TY21580在使用人CD4⁺ T细胞和DC进行的DC-MLR测定中显示微弱活性。

[0366] 抗体TY21580的ADCC活性

[0367] 过度表达人CTLA-4的HEK293F细胞作为靶标细胞用于评估TY21580介导的ADCC活性。使用人NK分离试剂盒 (StemCell), 从人PBMC新鲜分离人NK细胞。使 1×10^5 个NK细胞和 1×10^4 个HEK293F/hCTLA-4细胞 (E:T比率10:1) 与不同浓度的抗体混合。在孵育4小时之后, 测量LDH以确定ADCC活性。接着使用下式计算溶解%: 溶解% = [(实验释放值) - 平均(靶标+NK)] / [平均(靶标最大释放值) - 平均(仅靶标)] $\times 100\%$ 。如图11A-图11B中所示, 相比于参考抗体 (TAC2114), TY21580显示更强ADCC活性。同种型对照无论如何都显示无ADCC活性。

[0368] 还使用人Treg细胞 (A, 供者#96; B, 供者#12) 和NK细胞 (A, 供者#99; B, 供者#05) 评估了ADCC活性。为获得人Treg细胞, 从健康供者新鲜分离人PBMC, 并且使用EASYSEP™人调控性T细胞富集试剂盒 (StemCell Technologies) 负性选择Treg细胞。经富集人Treg细胞通过在IL-2存在下进行CD3/CD28刺激来进一步扩增, 并且通过CD25和FOXP3染色和FACS分析加以确认。为获得人NK细胞, 从另一健康供者新鲜分离人PBMC, 并且使用人NK分离试剂盒 (StemCell Technologies) 分离NK细胞。将人Treg细胞用10 μ M钙黄绿素-AM (Invitrogen) 在37℃下标记30分钟。在洗涤三次之后, 使经标记Treg细胞与不同浓度的测试物品混合, 随后添加NK细胞。将 1×10^5 个NK细胞和 1×10^4 个经标记人Treg细胞添加至96孔板的孔中, 并且混合以产生E:T比率10:1。在孵育4小时之后, 测量上清液中的钙黄绿素-AM浓度以使用下式确定ADCC活性: 溶解% = [(实验释放值) - 平均(靶标+NK)] / [平均(靶标最大释放值) - 平均(仅靶标)] $\times 100\%$ 。如图12A-图12B中所示, 相比于参考抗体 (TAC2114), 抗体TY21580显示更强ADCC活性。同种型对照显示无ADCC活性。

[0369] TY21580的CDC活性

[0370] 将过度表达人CTLA-4的HEK293F细胞用10 μ M钙黄绿素-AM (Invitrogen) 在37℃下

标记30分钟。在96孔板的孔中,使不同浓度的抗体与 1×10^4 个经标记细胞和5%正常人血清补体(NHSC,Quidel)混合。在孵育5小时之后,测量上清液中的钙黄绿素-AM以确定CDC活性(图13)。

[0371] 从健康供者(供者#57)新鲜分离人PBMC。使用EasySep人CD4⁺ T细胞富集试剂盒(StemCell)分离CD4⁺ T细胞,并且用PMA (50ng/mL)+离子霉素(1 μ M)刺激20小时以诱导CTLA-4在细胞表面上表达。接着用10 μ M钙黄绿素-AM(Invitrogen)在37°C下持续30分钟标记活化的人CD4⁺ T细胞。在96孔板的孔中,使不同浓度的抗体与 1×10^4 个经标记人CD4⁺ T细胞和5%正常人血清补体(NHSC,Quidel)混合。在孵育5小时之后,测量上清液中的钙黄绿素-AM以确定CDC活性(图14)。TY21580显示针对HEK293F/hCTLA-4细胞或活化的人T细胞无CDC活性。

[0372] 总之,这些结果指示本文所述的抗体能够以高亲和力和特异性结合人CTLA4,并且所述抗体高效阻断CTLA4与它的同源配体CD86和CD80的相互作用。还显示抗体与来自多个物种的CTLA4具有交叉反应性。此外,与CTLA4的结合可调节T细胞活化,并且诱导针对CTLA4表达性细胞诸如Treg的ADCC活性。

[0373] 实施例4:对IgG转变抗体的体内表征

[0374] 如以上实施例中所述,抗体的物种交叉反应性(人和小鼠)允许测定抗体在多个同种同基因肿瘤模型中的抗肿瘤效能,所述模型包括MC38和CT26结肠直肠肿瘤模型、H22肝肿瘤模型、PAN02胰腺肿瘤模型和3LL肺肿瘤模型。

[0375] 在MC38结肠直肠肿瘤模型中的抗肿瘤功效

[0376] 用MC38(NTCC-MC38)鼠结肠癌细胞对C57BL/6小鼠(n=8/组,雌性,6-8周龄)进行皮下接种。当建立了肿瘤(80mm³)时,通过一周两次持续三周进行腹膜内注射,以同种型对照抗体和三种不同剂量的抗体TY21580开始治疗。一周两次监测肿瘤生长,并且报告为随时间的平均肿瘤体积 $\pm$ s.e.m.(图15A-图15C)。如图15A中所示,相较于同种型对照抗体,TY21580展现强力体内抗肿瘤活性,其中在所有三种剂量下,肿瘤都完全消退。如图15B中所示,直至治疗后六十天,10mg/kg TY21580组中8只小鼠中的8只,2.5mg/kg TY21580组中7/8,0.5mg/kg TY21580组中6/8保持无肿瘤。当对10mg/kg TY21580组中的小鼠进行再激发时,针对MC38肿瘤细胞的免疫性的持久记忆得到证明,如图15C中所示。

[0377] 在CT26结肠直肠肿瘤模型中的抗肿瘤功效

[0378] 用CT26(Shanghai Institutes for Biological Sciences)鼠结肠癌细胞对BALB/c小鼠(n=8/组,雌性,7-8周龄)进行皮下接种。当建立了肿瘤(70mm³)时,通过一周两次进行腹膜内注射,以同种型对照抗体和两种不同剂量的抗体TY21580开始治疗。一周两次监测肿瘤生长,并且报告为随时间的平均肿瘤体积 $\pm$ s.e.m.。如图16中所示,相较于同种型对照抗体,TY21580展现强力体内抗肿瘤活性,其中在低至0.1-1mg/kg的剂量下达成几乎100%抑制。

[0379] 在H22肝肿瘤模型中的抗肿瘤功效

[0380] 用H22(China Center for Type Culture Collection)鼠肝癌细胞对BALB/c小鼠(n=5/组,雌性,7-8周龄)进行皮下接种。当建立了肿瘤(60mm³)时,通过一周两次进行腹膜内注射,以同种型对照抗体、在三种不同剂量(0.1mg/kg、1mg/kg、5mg/kg)下的抗体TY21586、或在两种不同剂量(0.1mg/kg、1mg/kg)下的抗体TY21580开始治疗。一周两次监测

肿瘤生长,并且报告为随时间的平均肿瘤体积 $\pm$ s.e.m.。如图17中所示,相较于同种型对照抗体,TY21580与TY21586两者均以剂量依赖性方式展现强力体内抗肿瘤活性。当在相同剂量下比较时,在这个肿瘤模型中,TY21580比TY21586更加强有力。此外,在1mg/kg下施用TY21580导致肿瘤消退。

[0381] 在路易斯肺肿瘤模型中的抗肿瘤功效

[0382] 用路易斯(JenNio Bio,Guandong,China)鼠肺癌细胞对C57BL/6小鼠(n=6/组,雌性,8周龄)进行皮下接种。当建立了肿瘤(70mm³)时,通过一周两次进行腹膜内注射,以同种型对照抗体或全都在5mg/kg的剂量下的抗体TY21580、TY21687、TY21680或TY21691开始治疗。一周两次监测肿瘤生长,并且报告为随时间的平均肿瘤体积 $\pm$ s.e.m.。如图18中所示,相较于同种型对照抗体,抗体TY21580、TY21687和TY21680显示显著抑制肿瘤生长,而抗体TY21691不显示强力抗肿瘤活性。

[0383] 在PAN02胰腺肿瘤模型中的抗肿瘤功效

[0384] 用PAN-02(CAMS Cell Culture Center)鼠胰腺癌细胞对C57BL/6小鼠(n=8/组,雌性,6周龄)进行皮下接种。当建立了肿瘤(85mm³)时,通过一周两次进行腹膜内注射,以同种型对照抗体或在三种不同剂量(0.5mg/kg、2mg/kg、0.5mg/kg)下的抗体TY21580开始治疗。一周两次监测肿瘤生长,并且报告为随时间的平均肿瘤体积 $\pm$ s.e.m.。如图19中所示,相较于同种型对照抗体,TY21580以剂量依赖性方式显示强力抗肿瘤活性。

[0385] 抗体TY21580单药疗法或与抗CD137抗体组合在3LL肺肿瘤模型中的抗肿瘤功效

[0386] 用3LL(JCRB)鼠肺癌细胞对C57BL/6小鼠(n=10/组,雌性,6-8周龄)进行皮下接种。当建立了肿瘤(75mm³)时,通过一周两次进行腹膜内注射,以同种型对照抗体、TY21580(10mg/kg)、抗CD137抗体(10mg/kg)、或TY21580和抗CD137抗体的组合开始治疗。抗CD137抗体是一种所开发的具有结合人CD137与鼠CD137两者的能力的专有单克隆抗体(参见以引用的方式整体并入本文的PCT申请号PCT/CN2017/098332)。一周两次监测肿瘤生长,并且报告为随时间的平均肿瘤体积 $\pm$ s.e.m.。如图20A-图20B中所示,相较于同种型对照抗体,TY21580与抗CD137抗体两者均显示强力抗肿瘤活性,并且组合比任一单独单药疗法更大程度抑制肿瘤生长。

[0387] 对完全响应于TY21580的小鼠的再激发

[0388] 用H22(China Center for Type Culture Collection)鼠肝癌细胞对BALB/c小鼠(n=8/组,雌性,7-8周龄)进行皮下接种。当建立了肿瘤(60mm³)时,通过一周两次持续三周进行腹膜内注射,以同种型对照抗体或在两种不同剂量(1mg/kg、10mg/kg)下的抗体TY21580开始治疗。一周两次监测肿瘤生长,并且报告为随时间的平均肿瘤体积 $\pm$ s.e.m.。相较于同种型对照抗体,TY21580在两种剂量下在末次剂量之后数天均导致完全肿瘤消退,并且在治疗后60天,小鼠保持无肿瘤。接着在第60天用H22肿瘤细胞在相对的侧腹中对10mg/kgTY21580治疗组中的小鼠进行皮下再激发,并且监测肿瘤生长。如图21中所示,在用相同肿瘤细胞再激发之后,这些小鼠保持无肿瘤,从而表明在这些小鼠中产生了特异性抗肿瘤记忆。同时,以采用相同数目的H22肿瘤细胞接种的原初小鼠建立再激发对照组,并且它们的肿瘤快速长出。

[0389] 抗体药物代谢动力学

[0390] 在BALB/c雌性小鼠(在约8周龄下)中对抗体TY21585、TY21586、TY21580和TY21591

进行药物代谢动力学研究。通过尾部静脉注射,用测试抗体在10mg/kg下静脉内注射每组三只小鼠。在给药后1小时、8小时、48小时、168小时、336小时和500小时收集血液样品(每个样品约20 μ L)。从三只未进行抗体施用的原初雌性小鼠收集空白对照血液。每种测试抗体的血清浓度通过ELISA来测定,其中CTLA4-His-Fc用于捕集,并且经HRP标记抗人IgG (Fab特异性) 抗体 (Sigma) 用于检测。如图22中所示,在小鼠中, TY21586与TAC2114展现类似药物代谢动力学,而TY21585、TY21580和TY21591被清除则快得多。

[0391] 还在原初食蟹猴中对TY21586和TY21580进行药物代谢动力学研究。每种抗体通过静脉内团式注射在10mg/kg下向一只雌性猴和一只雄性猴施用。在给药前(0小时)以及给药后0.25小时、1小时、8小时、24小时、72小时、120小时、168小时、240小时、336小时、504小时和672小时收集血清样品。TY21586和TY21580的血清浓度通过ELISA来测定,其中CTLA4-His-Fc用于捕集,并且经HRP标记抗人IgG (Fab特异性) 抗体 (Sigma) 用于检测。如图23和图24中所示,相较于TY21586, TY21580在猴中被更加快速地清除,可能是归因于在这些动物中观察到的抗药物抗体的快速增加。

[0392] 重复给药毒性研究

[0393] 在正常BALB/c小鼠中对TY21580进行重复给药毒性研究。在第1天、第4天、第7天和第11天在腹膜内施用(10mL/kg) 媒介物对照或抗体TY21580(在25mg/kg或50mg/kg下)。每个组中包括五只雌性小鼠和五只雄性小鼠(5周龄)。每日监测小鼠的异常行为和症状,并且每日测量食物摄取和体重。在第14天,使动物安乐死以进行死后检查和其他分析。从每个动物收集血液,其中每组收集多达六个血液样品(三个雄性,三个雌性)用于血液学(RBC、血小板、WBC、WBC分类)和/或血液生物化学(ALT、AST、GLB、ALP和LDH等)分析。收集来自每只小鼠的以下器官并称重量:心脏、肺、胸腺、肝、脾、肾、睾丸和卵巢。将来自每组6个动物(三个雄性,三个雌性)的肝样品以FFPE固定。制备肝组织的FFPE块,切片,并且加以H&E染色以进行组织病理学分析。

[0394] 在整个研究的有生命时期期间,未观察到异常行为,或不存在非预定动物死亡。相较于媒介物处理, TY21580不影响动物的食物摄取和体重。此外,死后检查未显示在两种剂量水平下处理组的小鼠中的任何明显病变,例外之处是在经TY21580处理组中脾重量增加(图25A-图25B)。血液学分析未显示任何显著变化,如由在用TY21580处理的小鼠中测试的血液生物化学参数所指示。未在来自小鼠的肝的组织病理学切片中发现明显异常(图26)。总之,在这个研究中, TY21580得以良好耐受,其中在小鼠中未观察到显著毒性。

[0395] 总之,这些结果指示本文所述的CTLA4抗体对小鼠极其安全,具有强力抗肿瘤活性,并且可诱导针对肿瘤细胞的持久免疫记忆。

[0396] 实施例5:抗体可开发性概况

[0397] 对于可开发性评估,使纯化TY21586和TY21580交换至储存缓冲液(20mM组氨酸, pH 5.5)中。所有实验都在储存缓冲液中进行,包括溶解性、在加速应激条件下的稳定性、以及差示扫描荧光(DSF)测试。对于所有SEC-HPLC分析,使用TSKgel管柱(Tosoh Bioscience G3000SWx1)。

[0398] 抗体溶解性

[0399] 在储存缓冲液中在大于100mg/mL的浓度下配制含有抗体TY21586或TY21580的样品,并且测试高分子量(HMW)蛋白质聚集物的量(表8)。接着将抗体在储存缓冲液中调整至

约12mg/mL。接着通过SEC-HPLC来测定样品 (每个12μg) 以检测高分子量蛋白质聚集物。如图27中所示,在以高浓度 (高于100mg/mL) 配制的抗体的情况下,持续30分钟,未观察到HMW聚集物的显著增加。

[0400] 表8:抗体溶解性

[0401]	抗体名称	浓度 (mg/mL)	聚集 (HMW%)
	TY21586	197.8	0
	TY21580	126.0	+0.10

[0402] 在加速应激条件下的抗体稳定性

[0403] 还在加速应激条件下考查抗体稳定性。这些实验的结果概述于表9和图28中。在6个冷冻 (-80℃) 和解冻 (室温) 循环之后, TY21586和TY21580保持稳定。在50℃下七天之后, HMW聚集物或低分子量 (LMW) 片段存在少许变化。在更久时程实验 (40℃持续多达28天) 中, TY21586和TY21580保持稳定, 并且HMW聚集物或LMW片段不存在显著增加。

[0404] 表9:在加速应激条件下的HMX %变化

[0405]	抗体名称	冷冻-解冻 6个循环	50℃ 7天	50℃ 7天 LMW%	40℃ 28天	40℃ 28天 LMW%
	TY21586	5.34	0	2.14	-0.22	1.37
	TY21580	0.49	0	2.02	0.02	0.43

[0406] 此外,热稳定性 (如通过差示扫描荧光 (DSF) 所测量) 显示TY21586与TY21580两者均稳定直至至少约55℃。转变中点 (T_m), 即几乎所有蛋白质结构域都发生展开转变所处的特征温度, 显示于下表10中。

[0407] 表10:根据DSF的热稳定性

[0408]	抗体名称	T _m 起始 (℃)	T _{m1} (℃)	T _{m2} (℃)
	TY21586-16Z01	55	67.26	76.40
	TY21580-16Z01	55	67.64	76.50

[0409] 最后,发现在离心之后,抗体TY21586和TY21580的最高可实现浓度分别是超过197.8mg/mL和126.0mg/mL。

[0410] 总之,这些结果指示即使未进行配制优化,CTLA4抗体TY21586和TY21580也具有卓越可开发性概况。

[0411] 实施例6:鉴定用于TY21580源性CTLA4可活化抗体的自阻断肽的方法

[0412] 本文描述一种已被设计和执行以高效发现具有良好可开发性的掩蔽部分的新系统。在这个系统中,首先使靶标抗体片段Fab (图29) 或scFv (图30) 展示在酵母表面上,并且确认在结合它的抗原方面具有功能性。接着,使改进的肽文库直接融合于CTLA4抗体 (TY21580) 的轻链的N末端,并且构建在酵母表面上展示融合蛋白的酵母文库。酵母文库接着经受若干轮基于FACS的筛选:首先,使与抗原具有低结合的酵母克隆富集,接着用蛋白酶处理经富集酵母克隆以移除N末端肽,并且选择与抗原具有高结合的克隆 (图29和图30)。在4-5轮分选之后,从这些克隆提取质粒,并且通过DNA测序来确认掩蔽肽序列。

[0413] 实施例7:对用于CTLA4可活化抗体的受约束肽文库 (CPL) 的设计

[0414] 设计了四个示例性受约束肽文库 (CPL) (表11)。

[0415] 表11:设计的CPL

[0416]	CPL 名称:	氨基酸序列:
	CPL010	EVGSY(Z ₆)C(Z ₆)C(Z ₂)SGRSA (SEQ ID NO: 152)
	CPL011	EVGSY(Z ₆)C(X ₆)C(Z ₂)SGRSA (SEQ ID NO: 153)
	CPL012	EVGSY(Z ₆)C(Z ₈)C(Z ₂)SGRSA (SEQ ID NO: 154)
	CPL013	EVGSY(Z ₆)C(X ₈)C(Z ₂)SGRSA (SEQ ID NO: 155)

[0417] 每个X独立地是选自由A、C、D、E、F、G、H、I、K、L、M、N、P、Q、R、S、T、V、W和Y组成的组的氨基酸;每个Z独立地是选自由D、A、Y、S、T、N、I、L、F、V、H和P组成的组的氨基酸

[0418] 在它们的核心处的是序列Z₆CX₆CZ₂ (SEQ ID NO:137) 或Z₆CX₈CZ₂ (SEQ ID NO:138), 并且两个固定半胱氨酸残基形成二硫键以使肽构象受约束。在所合成寡核苷酸中, 在除环内部之外的所有位置都采用简并密码子NHC, 其中在CPL011和CPL013中还采用NNK密码子。与NNK或NNS密码子相比, NHC密码子编码12种残基(表12), 从而涵盖显著多样性, 但缺乏化学不稳定残基甲硫氨酸、色氨酸和半胱氨酸。此外, 相较于NNK或NNS密码子, 理论多样性降低使得能够构建具有更好覆盖度的文库。

[0419] 表12:NHC密码子

[0420]	NHC:	AAC	ACC	ATC	TAC	TCC	TTC	GAC	GCC	GTC	CAC	CCC	CTC
	氨基酸:	N	T	I	Y	S	F	D	A	V	H	P	L

[0421] 在这些掩蔽肽序列之后是不变的裂解肽序列 (SGRSAGGGGSPGLAGSGGS, SEQ ID NO:180), 含有两个蛋白酶识别位点: 供蛋白酶尿激酶型纤维蛋白溶酶原活化因子 (uPA) 使用的SGRSA (SEQ ID NO:149), 以及供蛋白酶基质金属蛋白酶-2 (MMP-2) 和基质金属蛋白酶-9 (MMP-9) 使用的PLGLAG (SEQ ID NO:150)。这些识别位点已由许多团体用于靶向剂的体内肿瘤细胞特异性活化中 (参见例如Ke等 (1997) J Biol Chem 272 (33):20456-62; Gerspach等 (2006) Cancer Immunol Immunother 55 (12):1590-600; 以及Jiang等 (2004) Proc Natl Acad Sci USA 101 (51):17867-72)。在基于酵母的筛选期间, 由于TEV蛋白酶的可用性和特异性, 所以MMP-9识别序列用烟草蚀刻病毒 (TEV) 蛋白酶识别序列 (ENLYFQG, SEQ ID NO:151) 替换。

[0422] 使CPL和不变的裂解肽融合于呈scFv或Fab形式的靶标抗体 (TY21580) 的轻链的N末端, 所述靶标抗体连接于酵母表面展示的Aga2蛋白。对替代TEV蛋白酶识别位点的包括在鉴定正确类型的掩蔽肽序列方面是重要的, 即抗原结合在蛋白酶裂解之前被阻断, 并且抗原结合在蛋白酶裂解之后能够实现。以下描述的实施例证明初始在酵母的情况下显示的可活化抗体的裂解活化机制在哺乳动物细胞中表达的完全IgG分子的情况下得以重现。

[0423] 实施例8: 靶向CTLA4的TY21580源性可活化抗体的构建和验证

[0424] 在酵母表面上展示功能性靶标抗体

[0425] 低拷贝数的基于CEN/ARS的载体用于在诱导型GAL1-10启动子的控制下在酵母酿酒酵母 (*S.cerevisiae*) 中表达靶标抗体 (靶向人CTLA4的抗体TY21580)。scFv的表面展示在

GAL1启动子的控制下通过融合在它的C末端的Aga2蛋白来实现,这类似于先前公开的排列(Boder和Wittrup(1997) *Nat Biotechnol* 15(6):553-7)。对于Fab,它们的表面展示在GAL1启动子的控制下通过融合于重链(VH和CH1的融合)的N末端的Aga2蛋白来实现,而轻链(VL和CL的融合)在GAL10启动子的控制下。Fab通过轻链与膜锚定重链的缔合的来展示在酵母表面上。

[0426] Fab或scFv的表面展示通过用识别融合亲和和标签的抗体进行染色来验证,并且使用生物素化人CTLA4考查展示在酵母上的Fab或scFv的功能性。简要来说,在半乳糖培养基中诱导之后48小时,收集酵母细胞(1×10^6),用PBSA缓冲液洗涤一次,接着与10nM生物素化抗原一起在室温下孵育1小时。酵母细胞接着用PBSA缓冲液洗涤两次,并且与PE缀合的链霉亲和素(1:500稀释)(eBioscience#2-4317-87)一起在4℃下孵育30分钟。接着通过流式细胞计量术分析酵母细胞。如图31A-图31B中所示,靶向CTLA4的Fab(图31A)与scFv(图31B)两者均成功展示在酵母表面上,并且均能够强烈结合它们的抗原。

[0427] 含有CPL的酵母文库的构建

[0428] 通过5个PCR循环来使编码CPL的所合成寡核苷酸与编码裂解肽的寡核苷酸融合。PCR反应的组合物是:1X PrimeSTAR缓冲液、2.5mM dNTP、各100 μ M的F引物和R引物、以及各100 μ M模板1(CPL寡核苷酸)和模板2(编码裂解肽的寡核苷酸)、以及2.5U PrimeSTAR HS DNA聚合酶。所用PCR程序是:a) 1个循环的96℃持续5分钟;2) 5个循环的96℃(15秒)、60℃(15秒)、72℃(6秒);和3) 1个循环的72℃持续3分钟。核酸外切酶I用于消化单链DNA,随后通过凝胶电泳来纯化PCR产物。纯化PCR产物接着用BamHI和KpnI消化,并且克隆至用相同两种限制酶消化的细菌过滤载体中。在过滤载体中,CPL和裂解肽被放置在细菌分泌信号肽的下游,并且在缺乏信号序列的 β -内酰胺酶的上游。在氨苄青霉素板上选择的功能性 β -内酰胺酶指示CPL和裂解肽的同框融合,由此消除引入所合成简并寡核苷酸中的任何框外错误(N-1或N-2)。此外,还从汇合物减少一些不良折叠的序列。将连接产物转化至电感受态细菌细胞中,并且CPL文库的多样性通常在 5×10^9 与 1×10^{10} 之间。对单个克隆的测序指示通过这个方法实现了极高同框率(在许多情况下,几乎100%)。

[0429] 为制备含有CPL的酵母文库,从细菌文库提取质粒,并且作为模板用于PCR扩增编码CPL和裂解肽的DNA片段。所扩增PCR片段通过凝胶电泳来纯化,并且连同表达融合于Aga2的靶标抗体的线性化质粒一起转化至电感受态酵母细胞中。在PCR片段和质粒的两个末端上的同源序列确保在酵母细胞内部的高效同源性重组。所构建酵母文库的多样性通常在 1×10^9 至 2×10^9 之间。

[0430] 基于FACS的对针对CTLA4抗体的掩蔽肽的筛选

[0431] 来自CPL酵母文库的总计 1×10^8 个酵母细胞用于筛选针对靶标抗体的掩蔽肽。对于通过MoFlo XDP进行的每轮分选,收集在半乳糖培养基中诱导的酵母细胞,用PBSA缓冲液洗涤一次,接着与10nM(在稍后各轮中降低至1nM)生物素化抗原一起在室温下孵育1小时。酵母细胞接着用PBSA缓冲液洗涤两次,并且与PE缀合的链霉亲和素(1:500稀释)(eBioscience#2-4317-87)一起在4℃下孵育30分钟。在用PBSA缓冲液再洗涤两次之后,将酵母细胞调整至2-30D/mL,并且经受分选。如图32中所示,在第1轮中,使用10nM生物素化CTLA4-Fc,并且使微弱结合剂富集。来自第1轮的酵母细胞在葡萄糖培养基中生长之后,在半乳糖培养基中诱导并用AcTEV蛋白酶(6U/OD细胞)(Thermo Fisher Scientific#

12575015) 在30℃下处理2小时,并且纯化强力结合剂。从第3轮分选开始,生物素化CTLA4-Fc的浓度降低至1nM,并且收集微弱结合剂。在第4轮,还用AcTEV并行处理各个酵母细胞部分,以验证蛋白酶裂解介导的对靶标抗体的活化。如图32中所示,明显的是AcTEV裂解导致强烈结合于抗原的细胞群体的显著增加,从而表明筛选策略是有效的。将来自第5轮分选的单克隆涂铺在选择性培养基上,并且使其单个地生长以进一步确认裂解介导的抗原结合活化。

[0432] 如图33A-图33B中所示,呈scFv (图33A) 或Fab (图33B) 形式的所选CTLA4可活化抗体克隆在掩蔽肽存在下展现少许与抗原的结合。然而,当用TEV蛋白酶处理酵母细胞以移除掩蔽肽时,与抗原的结合显著增加。在裂解肽中并入TEV识别位点与应用TEV蛋白酶来验证所选克隆的组合使选择掩蔽肽的成功率显著增加。

[0433] 为鉴定掩蔽肽序列,从所选酵母克隆提取穿梭质粒 (Generay#GK2002-200),并且转化至感受态大肠杆菌细胞中。制备质粒,并且对编码掩蔽肽的区域测序并加以比对。如所预期,这些序列可分成若干组,从而指示通过各轮分选达成的明确富集。四组掩蔽肽序列连同不变的裂解肽序列一起列于表13中。

[0434] 表13:掩蔽肽序列

样品标识:	肽名:	掩蔽肽+裂解肽序列:
TY22401	B13189	EVGSYNFVADSCPDHPYPCASGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (SEQ ID NO: 168)
TY22402	B13180	EVGSYIVHHSDCDAFYPCDSSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (SEQ ID NO: 170)
TY22403	B13192	EVGSYYSAYPACDSHYPYCNSSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (SEQ ID NO: 172)
TY22404	B13197	EVGSYPNPSSDCVPYYYACAYSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (SEQ ID NO: 174)

[0436] IgG转化和表达

[0437] 使表13中所列的四组掩蔽肽以及源于它们中的两者 (B13192和B13197) 的用以消除潜在糖基化位点的额外四种掩蔽肽序列 (表14) 转化至IgG1中。

[0438] 表14:额外掩蔽肽序列

样品标识:	掩蔽肽+裂解肽序列:
TY22563	EVGSYYSAYPACDSHYPYCQSSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (SEQ ID NO: 177)
TY22564	EVGSYYSAYPACDSHYPYCNSAGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (SEQ ID NO: 178)
TY22565	EVGSYPQPSSDCVPYYYACAYSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (SEQ ID NO: 179)
TY22566	EVGSYPNPASDCVPYYYACAYSGRSAGGGGSPLGLAGSGGS (SEQ ID NO: 180)

[0441] 将重链和轻链分别克隆至哺乳动物表达载体pCDNA3.3 (Thermo Fisher Scientific, 目录号K830001) 中,并且使掩蔽肽和不变的裂解肽以与在酵母表面上展示相

同的方式融合于轻链的N末端。以下列出亲本CTLA4抗体(TY21580)的VH和VL序列:

[0442] 抗CTLA4重链可变区(SEQ ID NO:87):

[0443] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSISSGYHWSWIRQAPGKGLEWLARIDWDDDKYYSTSLKSRLTISRDN SKNTLYLQLNSLRAEDTAVYYCARSYVYFDYWGQGT LTVTVSS

[0444] 抗CTLA4轻链可变区(SEQ ID NO:100):

[0445] DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSVRGRFLAWYQQKPGKAPKLLIYDASNRATGIPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSSSWPPTFGQGTKVEIKR。

[0446] 将各对质粒短暂转染至HEK293F细胞中。在六天之后,收集上清液,通过离心和过滤加以澄清化,并且IgG用标准蛋白A亲和色谱法(MabSelect SuRe,GE Healthcare)纯化。将IgG洗脱并中和,并且进行缓冲液交换以进入PB缓冲液(20mM磷酸钠、150mM NaCl,pH7.0)中。蛋白质浓度通过紫外分光光度测定法来测定,并且在变性、还原性和非还原性条件下通过SDS-PAGE或SEC-HPLC来分析IgG纯度。重要的是,可活化抗体在HEK293细胞中的表达水平类似于它们的亲本抗体,并且它们在蛋白A树脂之后的纯化产率也类似,从而表明掩蔽肽和裂解肽的存在不对抗体在哺乳动物细胞中的表达具有负性影响。

[0447] 对掩蔽效率的测量

[0448] ForteBio Octet RED96系统(Pa11,USA)用于快速评估掩蔽肽的效率。简要说,以并行方式将可活化抗体(以及它们的亲本抗体TY21580)在KB缓冲液(补充以0.02%吐温20和0.1%BSA的PBS缓冲液)中稀释至30 μ g/mL,并且由抗人IgG捕集(AHC)生物传感器(Pa11,USA)捕集。接着使传感器与His标签化CTLA4蛋白(25nM)缔合300秒,接着在KB缓冲液中解离又300秒。根据制造商的指导方针,使用ForteBio数据分析7.1(Pa11,USA),将缔合和解离曲线相对于1:1朗缪尔结合模型加以拟合。如图34A-图34B中所示,以可活化抗体实现的响应显著低于以亲本抗体实现的响应,从而表明掩蔽肽有效阻断抗体与它的抗原的结合。然而,在四种可活化抗体之中,TY22401的有效性较小,这与来自以下讨论的ELISA测定的结果一致。

[0449] 将重组人CTLA4-Fc在PBS中稀释至1 μ g/mL,并且在4 $^{\circ}$ C下在Maxisorp板上包被过夜。将板用补充以3%脱脂奶的PBS在37 $^{\circ}$ C下封闭1小时。在洗涤之后,将100 μ L3倍连续稀释的抗体添加至每个孔中。在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时之后,将板洗涤四次,并且将100 μ LHRP缀合的抗人IgG(Fab特异性)抗体(1:6000稀释)添加至每个孔中。将板在37 $^{\circ}$ C下孵育1小时,洗涤四次,接着将50 μ L TMB底物溶液添加至每个孔中,并且将板在室温下孵育。在用每孔50 μ L H₂SO₄使反应终止之后测量在450nm下的吸光度。通过使用GraphPad Prism 6软件的不对称S形(五参数逻辑方程)模型拟合ELISA数据来评估EC₅₀。对可活化抗体TY22401、TY22402和TY22404进行两次实验,从而导致获得了这些可活化抗体中的每一者的两个计算掩蔽效率。每种可活化抗体的掩蔽效率通过用关于可活化抗体的结合的EC₅₀除以亲本抗体(TY21580)的EC₅₀来计算。如图35A-图35B以及表15中所示,相较于亲本抗体,所有可活化抗体都显示与它的抗原的结合显著降低,并且计算掩蔽效率在48至2213的范围内。掩蔽效率的差异可能由在对EC₅₀值的测量和数据拟合方面的变化所致,并且每种可活化抗体的掩蔽效率可能落在计算范围内(例如可活化抗体TY22402的掩蔽效率在377与2213之间)。这些结果指示当在哺乳动物细胞中并且作为完全IgG分子的一部分表达时,从CPL鉴定的多种掩蔽肽维持了它们的掩蔽效率。

[0450] 表15:在蛋白酶裂解之前的可活化抗体ELISA

[0451]

样品标识符:	LogEC ₅₀ :	EC ₅₀			掩蔽效率:
		M:	nM:	R ² :	
第 1 批数据					
TY21580	-9.665	2.161E-10	0.216	0.999	1.0
TY22401	-7.623	2.382E-08	23.82	0.997	110
TY22402	-6.321	4.779E-07	477.9	0.997	2213
TY22404	-6.749	178.4E-07	178.4	0.998	826
第 2 批数据					
TY21580	-9.478	3.324E-10	0.3324	0.998	1.0
TY22401	-7.800	1.586E-08	15.86	0.994	48
TY22402	-6.902	1.254E-07	125.4	0.998	377
TY22404	-6.892	1.281E-07	128.1	0.998	385
TY21580	-9.48	3.3E-10	0.33		1.0
TY22563	-7.32	4.771E-08	47.71		143.5
TY22564	-7.41	3.898E-08	38.98		117.3
TY22565	-6.68	2.099E-07	209.9		631.5
TY22566	-6.79	1.6264E-07	162.6		489.2

[0452] 移除掩蔽肽使抗体活性恢复

[0453] 用识别裂解序列的蛋白酶处理纯化可活化抗体,并且接着加以测试以确定移除掩蔽肽是否使它们的活性恢复。作为一实例,用1 μ g重组人uPA(Acrobiosystems, #PLU-H5229)在反应缓冲液(50mM Tris-HCl、0.01%吐温20, pH 8.5)中处理20 μ g TY22404(0.5mg/mL);或用5或10单位的重组人MMP-9(BioVision, #7867-500)在反应缓冲液(50mM Tris、150mM NaCl、5mM CaCl₂、20 μ M ZnCl₂, pH7.5)中处理TY22404。在37℃下进行反应21小时。通过SDS-PAGE分析确认掩蔽肽从轻链移除,图36A。接着如上所述通过ELISA来测量掩蔽效率。如图36B和表16中所示,在移除掩蔽肽之后,可活化抗体在它与抗原的结合方面变得不可与亲本抗体区分。

[0454] 表16:在蛋白酶裂解之后的可活化抗体ELISA

样品标识符:	LogEC ₅₀ :	EC ₅₀	
		nM:	掩蔽效率:
TY21580	-9.35	0.447	1.0
TY22404	-7.01	96.8	216
TY22404-uPA	-9.40	0.402	0.9
TY22404-MMP-9	-9.39	0.412	0.9

[0456] 可活化抗体可开发性概况

[0457] 出于制造目的,关键的是所发现的可活化抗体具有良好可开发性概况。用在哺乳动物细胞中表达的纯化可活化抗体进行若干不同测试。将可活化抗体在20mM组氨酸(pH 5.5)中调整至1mg/mL,并且利用Waters 2695以及Waters 2996UV检测器和TSKgel g3000SWXL管柱(300mm×7.8mm)(Tosoh Bioscience),使用分析型尺寸排阻色谱法进行抗体品质分析。对于每个测定,注射10 μ g抗体,并且用缓冲液(200mM磷酸钠,在pH 7.0下)在

0.5mL/min的流速下进行分级分离。

[0458] 进行了三个加速应激测试：在50℃下孵育可活化抗体7天，在40℃下孵育可活化抗体28天，以及六个冷冻-解冻循环。通过以下方式来进行冷冻-解冻测试：使100μL样品（1mg/mL于20mM组氨酸（pH 5.5）中）在-80℃下冷冻30分钟，随后在室温下解冻60分钟。如图37A-图37C中所示，在50℃下储存7天或在40℃下储存28天之后，所有可活化抗体都保持稳定，并且展现少许聚集。在六个冷冻-解冻循环之后，它们显示略微恶化；然而，主要单体峰保持约95%，从而指示这些可活化抗体在这些加速应激测试下极其稳定。在不希望受理论束缚下，值得注意的是可活化抗体尚未经受广泛缓冲液优化过程，因此，采用优化缓冲液和赋形剂，可活化抗体的稳定性可能进一步改进。

[0459] 接着，使可活化抗体在20mM组氨酸（pH 5.5）中浓缩至超过150mg/mL（表17）。未观察到可活化抗体沉淀，并且样品的粘度是十分可管理的。接着将浓缩可活化抗体稀释至20mg/mL或1mg/mL以分析高分子量（HMW）物质。如图38和表17中所示，未观察到HMW物质的明显增加，从而表明这些可活化抗体直至高浓度都在测试缓冲液中极其可溶和稳定。

[0460] 表17：可活化抗体的>150mg/mL的浓度

[0461]

样品标识符：	起始浓度（mg/mL）：	高浓度（mg/mL）：
TY22401	10.9	187.2
TY22402	8.4	160.0

[0462] 为研究可活化抗体在低pH下的稳定性，用柠檬酸将纯化可活化抗体（于20mM组氨酸（pH 5.5）中，在10mg/mL下）滴定至1mg/mL，并且将pH调整至3.7并在室温下保持30和60分钟。之后，用1M Tris碱将样品中和至pH 7.0。如上所述用ForteBio测量可活化抗体的掩蔽效率。如图39中所示，在低pH孵育30或60分钟之后，掩蔽效率保持不变，从而表明在低pH孵育之后，掩蔽肽保留它们的阻断功效。

[0463] 总之，数据指示所发现的可活化抗体在各种应激条件下保持稳定，因此，它们具有良好可开发性概况。

[0464] 实施例9：对靶向CTLA4的可活化抗体的体外和体内表征

[0465] 已知的是T细胞上的CTLA-4活性与第一（TCR/CD3）信号和涉及B7-CD28/CTLA-4的第二信号相关。

[0466] 体外功能性表征

[0467] 在此处，在低浓度的抗CD3抗体存在下评估靶向CTLA4的可活化抗体关于人PBMC活化的活性。使用Histopaque-1077（Sigma），通过密度梯度离心从健康供者（#44）的血液新鲜分离人PBMC。将抗CD3（OKT-3）抗体在4℃下在96孔板上包被过夜。在洗涤之后，将1x10⁵个新鲜分离的人PBMC添加至每个孔中，随后在不同浓度下添加测试物品。在刺激之后48小时，使用人IL-2ELISA Ready-SET-Go（Invitrogen）试剂盒测量对IL-2的诱导。使用人IFN-γ ELISA Ready-SET-Go（Invitrogen）试剂盒测量上清液中的IFN-γ。如图40A-图40B中所显示，在高浓度下，TY22404诱导IL-2产生，并且TY22401诱导IFN-γ产生。然而，可活化抗体的活性显著低于亲本TY21580抗体的活性。

[0468] 接着，测试可活化抗体的抗体依赖性细胞细胞毒性活性，并且与亲本抗体TY21580的抗体依赖性细胞细胞毒性活性进行比较。ADCC报告基因测定用于评估可活化抗体的ADCC活性。过度表达人CTLA4的HEK293F细胞（HEK293F/hCTLA-4细胞）用作靶标细胞；过度表达

CD16a和NFAT-Luc的Jurkat细胞系(Jurkat/CD16a细胞)用作效应细胞。使 1×10^5 个Jurkat/CD16a细胞和 1×10^4 个HEK293F/hCTLA-4细胞(E:T比率10:1)与不同浓度的抗体混合。在孵育6小时之后,将100 μ L One-Glo试剂添加至细胞中,并且使细胞溶解10分钟。移除上清液以使用SpectraMax i3x板读取器进行发光测量。如图41中所示,相比于亲本抗体TY21580,可活化抗体显示ADCC活性低若干个对数。TY22401的ADCC活性高于TY22402和TY22404的ADCC活性。总之,体外数据指示得到更好掩蔽的可活化抗体具有较小ADCC活性。

[0469] 接着在多个同种同基因小鼠肿瘤模型中评估可活化抗体的抗肿瘤活性,并且与亲本抗体TY21580的抗肿瘤活性进行比较,所述模型包括MC38结肠直肠肿瘤模型、CT26结肠直肠肿瘤模型、H22肝肿瘤模型和3LL肺肿瘤模型。

[0470] 在MC38结肠直肠肿瘤模型中的抗肿瘤功效

[0471] 用MC38(NTCC-MC38)鼠结肠癌细胞对C57BL/6小鼠($n=8$ /组,雌性,6-8周龄)进行皮下接种。当建立了肿瘤(70mm³)时,通过一周两次进行腹膜内注射,以同种型对照抗体、亲本抗体TY21580、或三种可活化抗体中的一者开始治疗。一周两次监测肿瘤生长,评估随时间的平均肿瘤体积 $\pm$ s.e.m.(图42A)和单个肿瘤生长曲线(图42B)。如图42A-图42B中所示,在MC38同种同基因小鼠肿瘤模型中,类似于亲本抗体TY21580,所有三种可活化抗体都显示强力抗肿瘤活性。

[0472] 在CT26结肠直肠肿瘤模型中的抗肿瘤功效

[0473] 用CT26(Shanghai Institutes for Biological Sciences)鼠结肠癌细胞对BALB/c小鼠($n=8$ /组,雌性,7-8周龄)进行皮下接种。当建立了肿瘤(100mm³)时,通过一周两次进行腹膜内注射,以同种型对照抗体、亲本抗体TY21580、或三种可活化抗体中的一者在5mg/kg下开始治疗。一周两次监测肿瘤生长,并且报告为随时间的平均肿瘤体积 $\pm$ s.e.m.。如图43中所示,在CT26同种同基因小鼠肿瘤模型中,类似于亲本抗体TY21580,所有三种可活化抗体都显示强力抗肿瘤活性。

[0474] 在H22肝肿瘤模型中的抗肿瘤功效

[0475] 用H22(China Center for Type Culture Collection)鼠肝癌细胞对BALB/c小鼠($n=8$ /组,雌性,7-8周龄)进行皮下接种。当建立了肿瘤(100mm³)时,通过一周两次进行腹膜内注射,以同种型对照抗体、亲本抗体TY21580、或三种可活化抗体中的一者在5mg/kg下开始治疗。一周两次监测肿瘤生长,并且报告为随时间的平均肿瘤体积 $\pm$ s.e.m.。如图44中所示,在H22同种同基因小鼠肿瘤模型中,类似于亲本抗体TY21580,所有三种可活化抗体都显示强力抗肿瘤活性。

[0476] 在3LL肺癌模型中的抗肿瘤功效

[0477] 用3LL(JCRB)鼠肺癌细胞对C57BL/6小鼠($n=10$ /组,雌性,6-8周龄)进行皮下接种。当建立了肿瘤(75mm³)时,通过一周两次进行腹膜内注射,以同种型对照抗体、亲本抗体TY21580、或三种可活化抗体中的一者开始治疗。一周两次监测肿瘤生长,评估随时间的平均肿瘤体积 $\pm$ s.e.m.(图45A)和单个肿瘤生长曲线(图45B)。如图45A-图45B中所示,在3LL同种同基因小鼠肿瘤模型中,类似于亲本抗体TY21580,所有三种可活化抗体都显示强力抗肿瘤活性。

[0478] 药物代谢动力学分析

[0479] 在处于约8周龄下的BALB/c雌性小鼠中进行药物代谢动力学研究。每组三只小鼠

用测试物品在10mg/kg下在腹膜内注射。在给药后3、6、24、48、96和168小时收集血液样品(每个样品约50 μ l)。从三只未进行抗体施用的原初雌性小鼠收集空白对照血液。每种测试抗体的血清浓度通过ELISA来测定,其中抗人IgG Fc抗体用于捕集,并且经HRP标记抗人IgG (Fab特异性)抗体(Sigma)用于检测(图46A-图46C)。相较于对亲本抗体TY21580收集的先前数据,可活化抗体TY22401(图46A)、TY22402(图46B)和TY22404(图46C)具有慢得多的清除时间和长得多的半衰期。TY22401具有196小时的半衰期,并且在168小时时的药物浓度是约55 μ g/mL。TY22402具有134小时的半衰期,并且在168小时时的药物浓度是约40 μ g/mL。TY22404具有254小时的半衰期,并且在168小时时的药物浓度是约45 μ g/mL。相比较来说,亲本抗体TY21580具有107小时的半衰期,并且在168小时时的药物浓度是约17 μ g/mL。

[0480] 重复给药毒性研究

[0481] 当在NOD小鼠中评估TY21580对糖尿病发作年龄的影响时,发现高剂量的TY21580可导致NOD小鼠而非正常BALB/c小鼠的动物死亡。在此处,NOD小鼠模型用于相较于TY21580的安全性来评估可活化抗体的安全性。通过在第0、3、7和12天在50mg/kg下进行腹膜内注射,用同种型对照抗体、亲本抗体TY21580、或三种可活化抗体中的一者处理NOD小鼠(n=5/组,雌性,6周龄)。在TY21580处理组中,1个动物在第三次给药之后死亡,并且3个动物在第四次给药之后死亡。如图47中所示,在研究终止时,用同种型对照或三种可活化抗体中的任一者处理的所有动物都存活并处于良好健康状况。这些数据指示可活化抗体在小鼠中具有可接受的安全性/毒性概况,并且在NOD小鼠中,可活化抗体比亲本抗体TY21580要安全得多。

[0482] 实施例10:对靶向CTLA4的可活化抗体的额外体内表征

[0483] 在对亲本抗体TY21580的先前研究中,发现用TY21580重复给药在雌性正常BALB/c小鼠与雄性正常BALB/c小鼠两者中均导致脾尺寸增加。除那个以外,TY21580不显示关于其他评估参数的任何显著副作用,所述参数包括许多器官的重量、肝组织病理学、血液学和血液生物化学。因此,评估若干可活化抗体对脾尺寸的影响,并且与亲本抗体TY21580的影响进行比较。

[0484] 如下在正常BALB/c小鼠中对可活化抗体进行重复给药毒性研究:在第1、4、7和11天在腹膜内施用(10mL/kg) 50mg/kg的同种型对照抗体、TY21580亲本抗体、或可活化抗体TY22402、TY22566或TY22401。每个组中包括五只雌性小鼠(5周龄)。每日监测小鼠的异常行为和症状,并且每日测量食物摄取和体重。在第14天,使动物安乐死以进行死后检查和其他分析。引起关注的是,尽管相较于同种型对照,施用可活化抗体TY22402(图48A)或TY22566(图48B)使小鼠的脾尺寸略微增加,但相较于施用亲本抗体TY21580,这些可活化抗体显示对脾尺寸的影响显著更小。相较于同种型对照,施用可活化抗体TY22401使脾尺寸显著增加,但程度仍然小于使用亲本抗体TY21580所观察到的程度(图48C)。

[0485] 因为CTLA4在Treg细胞上组成性表达,所以评估可活化抗体TY22402、TY22566或TY22401对全血与脾两者中的Treg细胞、CD4⁺ T细胞和CD8⁺ T细胞的影响,并且与亲本抗体TY21580进行比较。来自全血的单核细胞或脾细胞使用以下抗体加以染色和门控:抗CD45抗体-BV421、抗CD3抗体-AF488、抗CD4抗体-BV510、抗CD8a抗体-PerCP-cy5.5、抗CD25抗体-APC和抗FoxP3抗体-PE。Treg细胞定义为CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺。如表18中所示,相较于同种型对照,亲本抗体TY21580使脾中Treg细胞的百分比增加;然而,可活化抗体TY22402和

TY22566不影响脾Treg的百分比。在全血中,当相较于同种型对照时,TY21580、TY22402和TY22566使Treg细胞的百分比略微增加。可活化抗体TY22401使脾和全血中的Treg细胞的百分比增加。 $CD4^+$ 和 $CD8^+$ T细胞的百分比不由TY21580、TY22402、TY22566或TY22401显著改变(数据未显示)。

[0486] 表18:显示可活化抗体对脾Treg和血液Treg细胞的影响的FACS分析

[0487]	群组:	样品:	脾: $CD4^+$ T 细胞 中的 Treg%	血液: $CD4^+$ T 细 胞中的 Treg%
	同种型对照 (50 mg/kg, BIW)	6-1	10.50	1.71
		6-2	8.25	0.70
		6-3	8.04	0.67
		6-4	6.81	0.90
		平均值	8.40	1.00
		SD	1.54	0.49
	TY21580 (50 mg/kg, BIW)	5-1	11.55	2.14
		5-2	8.52	1.56
		5-3	10.64	1.84
		5-4	11.69	1.40
		平均值	10.60	1.74
		SD	1.47	0.32
	TY22402 (50 mg/kg, BIW)	3-1	7.10	1.42
		3-2	7.08	1.00
		3-3	10.77	1.70
		3-4	10.25	1.98
		平均值	8.80	1.53
		SD	1.99	0.42
	TY22566	4-1	11.31	3.07
		4-2	6.42	1.04

[0488]	(50 mg/kg, BIW)	4-3	11.31	2.70
		4-4	5.26	1.48
		平均值	8.58	2.07
		SD	3.19	0.97
	TY22401 (50 mg/kg, BIW)	2-1	10.39	2.23
		2-2	11.12	4.09
		2-3	10.63	1.71
		2-4	11.96	2.76
		平均值	11.03	2.70
		SD	0.69	1.02

[0489] 实施例11:额外可活化抗体可开发性测定

[0490] 用在哺乳动物细胞中表达的纯化可活化抗体进行若干不同测试以确定它们的可开发性概况。进行三种加速应激测试。首先,将可活化抗体TY22401、TY22402或TY22566在50℃下孵育7天,并且通过SEC来测定它们的稳定性并与同种型对照进行比较(图49)。在50℃下孵育7天之后,对于可活化抗体,观察到高分子量(HMW)聚集物或低分子量(LMW)片段的仅略微增加(如果有的话)(表19)。

[0491] 表19:在50℃下持续7天的可活化抗体稳定性

样品:	HMW% (对照)	LMW% (对照)	HMW% (50℃, 7天)	LMW% (50℃, 7天)
TY22566	1.35	0.33	1.24	2.78
TY22401	2.15	0.20	2.13	1.97
TY22402	2.46	0	0.45	2.57

[0493] 接着,将可活化抗体TY22401、TY22402或TY22566在40℃下孵育7、14、21或28天,并且通过SEC来测定它们的稳定性并与同种型对照进行比较(图50)。在40℃下在各种时间点下孵育之后,对于可活化抗体,观察到高分子量(HMW)聚集物或低分子量(LMW)片段的仅略微增加(如果有的话)(表20)。

[0494] 表20:在40℃下持续28天的可活化抗体稳定性

样品:	HMW% (对照)	LMW% (对照)	HMW% (40℃, 28天)	LMW% (40℃, 28天)
TY22566	1.02	0.00	1.86	1.64
TY22401	1.57	0.00	2.03	1.19
TY22402	1.02	0.00	1.86	1.64

[0497] 此外,使可活化抗体TY22401、TY22402或TY22566经受六个冷冻-解冻循环。通过以下方式进行冷冻-解冻测试:使100μL样品(1mg/mL于20mM组氨酸(pH 5.5)中)在-80℃下冷冻30分钟,随后在室温下解冻60分钟,并且通过SEC来测量稳定性并与同种型对照进行比较(图51)。在这些冷冻-解冻循环之后,对于可活化抗体,观察到高分子量(HMW)聚集物的仅略微增加(如果有的话)(表21)。

[0498] 表21:在6个冷冻-解冻循环之后的可活化抗体稳定性

样品:	HMW% (对照)	HMW% (6个循环)
TY22566	1.35	4.36
TY22401	2.15	4.96
TY22402	2.46	3.48

[0500] 接着,使可活化抗体在20mM组氨酸(pH 5.5)中浓缩至超过115mg/mL。接着将浓缩可活化抗体稀释至20mg/mL以分析高分子量(HMW)物质。如图52和表22中所示,未观察到HMW物质的明显增加,从而表明这些可活化抗体直至高浓度都在测试缓冲液中极其可溶和稳定。

[0501] 表22:可活化抗体的>150mg/mL的浓度

样品:	浓缩 (mg/mL)	HMW% (对照)	HMW% (浓缩)
TY22566	125.73	2.35	3.69
TY22401	115.98	1.47	1.80
TY22402	128.87	1.82	4.04

[0503] 总之,数据指示所发现的可活化抗体在各种应激条件下保持稳定,因此,即使未进行配制优化,它们也具有良好可开发性概况(图53)。

[0504] 实施例12:TY21580和易普利单抗与CTLA4的表位结合和交叉反应性

[0505] 人CTLA4的F片层、FG环和G片层含有对于CTLA4与它的配体CD80和CD86的相互作用重要的接触残基中的大多数(图54;图55A和图55B)。举例来说,人CTLA-4/CD86界面由CTLA4的前 β 片层上的残基E33、R35、T53、E97、M99、Y100、P101、P102、P103、Y104、Y105、L106形成(Schwartz等(2001) *Nature* 410 (6828):604-608),并且用丙氨酸取代CTLA4的FG环(99MYPPPY105)中的残基会使与CD80的结合降低或消除(Stamper等(2001) *Nature* 410 (6828):608-611)。

[0506] 易普利单抗作为一种抗CTLA4抗体也与CTLA4在F折叠股和G折叠股(残基193、K95、E97、L106和I108)、FG环(残基99MYPPPY104)和CC'环(残基L39、V46和I93;位于FG环的对面)处在CTLA4的前 β 片层上对接。先前研究显示人CTLA4的残基S20、R35、R40、Q76、D88、K95、E97、Y104、L106和I108的突变导致显著丧失易普利单抗结合,其中残基R35、K95、E97、Y104和I108的突变显示重度丧失CTLA4结合。此外,显示在易普利单抗-CTLA4晶体结构中,易普利单抗直接接触CTLA4的残基R35、K95、E97、Y104、L106和I108(Ramagopal等(2017) *Proc Natl Acad Sci USA* 114 (21):4223-4232)。此外,晶体结构已揭示易普利单抗表位部分地占据CTLA4的CD80/CD86结合位点,其中界面面积(对于CTLA4/易普利单抗是1,880 Å²)大于受体-配体界面(对于CTLA-4/CD80是1,255 Å²,并且对于CTLA-4/CD86是1,212 Å²)(Ramagopal等(2017) *Proc Natl Acad Sci USA* 114 (21):4223-4232;Lee等(2016) *Nat Commun* 7 (13354);He等(2017) *Oncotarget* 8:67129-67139)。

[0507] 探究了抗CTLA4抗体TY21580和易普利单抗的表位结合特征。采用一种系统性方法来使对于TY21580和易普利单抗与CTLA4的结合重要的CTLA4表位基序和残基缩窄。首先,低拷贝数的基于CEN/ARS的载体用于在诱导型GAL1-10启动子的控制下表达小鼠CTLA4、人CTLA4或各种人CTLA4突变蛋白以在酵母酿酒酵母中进行细胞表面展示(Boder和Witttrup(1997) *Nat Biotechnol* 15 (6):553-7)。在突变CTLA4载体中,使人CTLA4的特定基序或残基突变成丙氨酸或小鼠CTLA4的相应残基。将TY21580或易普利单抗添加至展示CTLA4的细胞中,并且通过流式细胞计量术来评估抗体结合。

[0508] 为进行比较,来自CTLA4-CD80(PDBID:1I8L)、CTLA4-CD86(PDBID:1I85)和CTLA4-易普利单抗(PDBID:5XJ3、5TRU)晶体结构的CTLA4上的接触残基(在来自分子间界面的C- α 原子的4 Å内)显示于图54中。由它们的相互作用性C- α 原子确定的接触残基在它们的源于它们的相应X射线结构的人序列中被标记为灰色残基。

[0509] 如图56A和图56B中所示,TY21580和易普利单抗的交叉反应性差异是惊人的,其中TY21580结合人CTLA4与小鼠CTLA4两者,而易普利单抗结合人CTLA4而非小鼠CTLA4。比较来说,人CD80(图56C)、人CD86(图56D)和小鼠CD86(图56E)与人CTLA4和小鼠CTLA4两者相互作用。

[0510] 为进一步探究易普利单抗和TY21580与CTLA4的表位结合概况,使人CTLA4的各种基序突变,并且评估结合。相较于野生型CTLA4,TY21580、易普利单抗、人CD80、人CD86和小鼠CD86维持类似的与ADS42AAA CTLA4突变体的结合能力(图56A-图56E)。然而,当使人CTLA4 CC'环基序(42ADSQVT47)突变成小鼠CTLA4 CC'环基序(42TNDQMT47)时,相较于易普利单抗、人CD80、人CD86和小鼠CD86与突变体的结合,TY21580与突变体的结合是两倍强烈

(图56A-图56E)。一致地观察到CD80和CD86不直接结合这个CC'环基序(参见例如图54)。尽管易普利单抗与人CTLA4中的这个基序直接接触(图54; Ramagopal等(2017) Proc Natl Acad Sci USA 114(21):4223-4232),但在突变改变CC'环后对人CTLA4结合的影响是最小的(参见图56B中人野生型相对于ADSQVT42TNDQMT)。总之,这些结果表明CC'环基序不显著促进易普利单抗或TY21580对人CTLA4的结合亲和力。

[0511] 由表位定位数据获得的一个最引起关注的观察结果是当在人CTLA4中从残基105至108引入突变时,易普利单抗与TY21580之间在结合CTLA4方面具有惊人差异。举例来说,当将YL105AA和LGI106AAA引入人CTLA4中时,易普利单抗丧失它结合CTLA4的能力(图56B),这与图54中所示的对于易普利单抗与人CTLA4的结合重要的已知接触氨基酸一致。此外,如图56A以及图56C-图56E中所示,TY21580、人CD80、人CD86和小鼠CD86对CTLA4YL105AA突变体的结合亲和力减弱。尽管在LGI106AAA的情况下人CD80、人CD86和小鼠CD86的结合亲和力也减弱,但在LGI106AAA的情况下,TY21580的结合亲和力显著增强。这不同于在LGI106AAA的情况下易普利单抗的结合亲和力完全丧失。

[0512] 对于CTLA4的TY21580和易普利单抗结合位点的表位定位,将突变引入人CTLA4的特定位点中。选择用于诱变的位点是由易普利单抗、CD80和CD86接触CTLA4的已知位点(基于它们的晶体结构,参见图54),所述位点在人CTLA4序列与小鼠CTLA4序列之间具有重大序列变异。举例来说,图55A和图55B显示CD80和CD86与人CTLA4的复合结构的前视图,其中I108被突出显示,并且显示为球体。I108是与易普利单抗接触的最关键位点中的一者,然而,它远离CD80和CD86接触区。G折叠股含有接触易普利单抗、CD80和CD86的在人CTLA4与小鼠CTLA4之间显著不同的残基中的大多数,如图54中所示。CC'环基序也含有与易普利单抗的在人CTLA4与小鼠CTLA4之间相异的接触残基,然而,图56A-图56E中的结果指示引入CC'环基序中的突变体不显著促进易普利单抗、TY21580、CD80或CD86与CTLA4的总体结合。因此,为进一步评估G折叠股基序对易普利单抗、TY21580、CD80和CD86的结合影响,使人CTLA4的G折叠股(105YLGIG109)突变成小鼠CTLA4(105FVGMG109)。

[0513] 如图56B中所示,易普利单抗遭受重度丧失对YLGIG105FVGMG突变体的结合亲和力。相比之下,当引入这个突变时,TY21580、人CD80、人CD86和小鼠CD86保留结合能力(图56A、图56C-图56E)。这指示由于在人CTLA4与小鼠CTLA4之间在G折叠股结合方面具有这个差异,所以TY21580与易普利单抗具有不同结合表位。

[0514] 此外,用相应小鼠序列或其他氨基酸替换人CTLA4的G折叠股中的其他氨基酸以探测它们与易普利单抗、TY21580、CD80和CD86的相互作用。已知I108是对于易普利单抗结合极其重要的氨基酸。与这个预期一致,易普利单抗丧失了它对I108A、I108S、I108E、I108K和I108R CTLA4突变体的结合亲和力(图56B)。相比之下,I108突变体(I108A、I108S、I108E、I108K和I108R)对TY21580、CD80或CD86的结合亲和力不具有影响,从而强调TY21580、CD80和CD86相较于易普利单抗在结合表位方面具有重要差异,如由作为易普利单抗的最关键结合位点中的一者的I108所示(Ramagopal等(2017) Proc Natl Acad Sci USA 114(21):4223-4232)。图55A和图55B中的复合结构显示I108实际上在物理上远离CTLA4与它的配体CD80和CD86之间的结合位点,因此,可不对CD80/CD86与CTLA4之间的结合具有显著影响。我们的观察结果确认TY21580在它的结合表位方面与CD80/CD86更类似,与由易普利单抗结合的表位有差异。因此,认为TY21580特异性结合包含人CTLA4的氨基酸残基Y105和L106而非

I108的表位。

[0515] 实施例13:TY21580和易普利单抗对CTLA4配体结合阻断的影响

[0516] 通过基于ELISA的实验来测试TY21580和易普利单抗阻断CTLA4与它的同源配体CD80和CD86的结合的能力,如实施例3(根据ELISA的配体竞争结合)中所述。简要说,在一个实验中,ELISA微板用重组人CTLA4蛋白(1 μ g/mL)包被,并且将生物素化CTLA4配体(在1 μ g/mL下的CD80或在2 μ g/mL下的CD86)连同TY21580、易普利单抗或同种型对照抗体的连续稀释液一起添加至每个孔中(图57A和图57B)。在另一实验中,ELISA微板用重组CD80或CD86蛋白(1 μ g/mL)包被,并且将生物素化人CTLA4(0.2 μ g/mL或1 μ g/mL)连同TY21580、易普利单抗或同种型对照抗体的连续稀释液一起添加至每个孔中(图57C和图57D)。在两个实验中,人CTLA4与CD80或CD86之间的结合水平均使用经HRP标记中性亲和素检测,如实施例3(根据ELISA的配体竞争结合)中所述。

[0517] 如图57A和图57B中所示,当将CTLA4固定于微板上时,TY21580和易普利单抗以剂量依赖性方式阻断CD80和CD86与CTLA4的结合,而同种型对照抗体显示无阻断活性,从而指示测定特异性。如图57C和图57D中所示,当将CD80或CD86固定于微板上时,TY21580或易普利单抗再次以剂量依赖性方式阻断CD80或CD86与CTLA4的结合,而同种型对照抗体显示无阻断活性。如表23中所示,尽管TY21580与易普利单抗均阻断配体与CTLA4的结合,但相较于当将CD80或CD86固定于微板上时,当将人CTLA4固定于微板上时,TY21580和易普利单抗的剂量依赖性阻断活性是惊人地不同的。这些结果指示在CTLA4固定化条件下,TY21580和易普利单抗以类似IC₅₀展现类似配体阻断活性。然而,在CD80或CD86配体固定化条件下,对于CD80与CD86两者,相比于TY21580,易普利单抗展现强烈得多的配体阻断活性,如图57C和图57D以及表23中所示。然而,额外实验表明在饱和浓度下添加抗CTLA4抗体后完全阻断CTLA4与它的配体的相互作用不为达成肿瘤排斥所必需,这意味着TY21580在不完全阻断CD80或CD86的情况下可仍然使T细胞活化,并且具有强力抗肿瘤功效。实际上,类似于易普利单抗,TY21586显示完全阻断CD80和CD86,如图58中所示。然而,相比于其他测试抗体,TY21586和易普利单抗具有低得多的ADCC报告体活性(图59),并且因此在通过ADCC效应使Treg细胞消减方面的有效性较小(也参见Tang等(2018)Cell Biosci.8(30):1-3)。在不希望受理论束缚下,据信CD28依赖性T细胞活化(例如通过阻断CTLA4活性)对于达成有效肿瘤排斥是重要的,然而,过度刺激T细胞可为有害的。因此,对于TY21580观察到的较微弱配体阻断可为优于易普利单抗的较强烈配体阻断活性的优势。

[0518] 表23:TY21580和易普利单抗关于CTLA4配体结合阻断的IC₅₀

[0519]

测试抗体 IC ₅₀ (nM)	CTLA4 结合在板上		CTLA4 在溶液中	
	CD80 在溶液中	CD86 在溶液中	CD80 结合在板上	CD86 结合在板上
TY21580	3.809	0.4806	59.08	5.583
易普利单抗	4.116	0.5873	1.789	1.429

[0520] 尽管这些差异的潜伏机制当前不明确,但结果指示在TY21580和易普利单抗的性质之间存在固有差异。总之,这些结果表明TY21580可通过破坏CD80和CD86与它的抑制性受体CTLA4的结合来充当配体阻断剂。在不希望受理论束缚下,认为通过微弱配体阻断使CD80

和CD86从CTLA4整合作用中解脱允许这些配体在T细胞活化期间通过共刺激性受体CD28来进行信号传导,此可导致在T细胞免疫活化期间的有效性和安全性增加。

[0521] 实施例14:TY21580和易普利单抗对CTLA4阻断CD28路径活化的影响

[0522] 使用由Promega (目录号JA3001和JA3005) 开发的基于细胞的CTLA4阻断生物测定,评估了TY21580和易普利单抗的CTLA4阻断功能。这个测定涉及在存在或不存在TY21580或易普利单抗下共培养两种经遗传工程改造细胞系,接着使用Bio-Glo™荧光素酶测定系统测量通过荧光素酶报告基因产生的生物发光信号。共培养的两种细胞系是(1) CTLA4效应细胞-表达人CTLA4和由对TCR/CD28活化起响应的天然启动子驱动的荧光素酶报告体的Jurkat T细胞;和(2) aAPC/Raji细胞-内源性表达CTLA4配体CD80和CD86,并且另外表达被设计来以抗原非依赖性方式使TCR活化的细胞表面蛋白的Raji细胞。当共培养这两种细胞类型时,CTLA4与CD28竞争结合CD80和CD86,此抑制CD28路径的活化,并且导致较低的由启动子介导的发光。向这个系统中添加抗CTLA4抗体可阻断CTLA4与它的配体CD80和CD86的相互作用,从而导致较高TCR/CD28活化以及后续的由启动子介导的发光。

[0523] 如图58中所示,所有测试抗体都以剂量依赖性方式使TCR/CD28路径活化,如通过报告基因信号(即发光)随抗体浓度增加而增加所证实。相比较来说,同种型对照抗体显示无活性。这些结果证明由这些不同抗CTLA4抗体达成一定范围的CTLA4功能性阻断活性。尽管抗体的EC50有点类似(表24),但由这些抗体刺激的功能性信号传导活化的量值指示易普利单抗和TY21586是测试的最强力CTLA4阻断剂,继之以TY21680、TY21580和TY21687(图58)。作为CTLA4阻断剂,TY21691在测试的抗体之中具有最弱活性。这些结果证明所有测试抗体都可阻断CTLA4与CD80和CD86的相互作用,从而导致以剂量依赖性方式达成下游TCR/CD28路径活性。在不希望受理论束缚下,结果表明所有测试抗体都可使T细胞活化增加,此对于治疗癌症可为有利的。如上所讨论,较微弱配体阻断剂诸如TY21580可特别有效治疗癌症,因为相较于强力结合剂,它们过度刺激T细胞的风险降低。

[0524] 表24:抗CTLA4抗体关于TCR/CD28路径活化的EC50

[0525]		易普利 单抗	TY21580	TY21586	TY21687	TY21680	TY21691
	EC ₅₀ (μg/mL)	1.62	5.06	4.66	5.01	8.21	2.64

[0526] 实施例15:抗CTLA4抗体的ADCC活性

[0527] 测试易普利单抗、TY21580、TY21586、TY21687、TY21680和TY21691的抗体依赖性细胞细胞毒性(ADCC)活性,并且进行比较。ADCC报告基因测定用于评估可活化抗体的ADCC活性。过度表达人CTLA4的HEK293F细胞(HEK293F/hCTLA4细胞)用作靶标细胞;过度表达CD16和NFAT-Luc的Jurkat细胞系(Jurkat/CD16a细胞)用作效应细胞。在存在或不存在连续稀释的抗CTLA4抗体下,在96孔组织培养微板中混合 1.2×10^5 个Jurkat/CD16a细胞和 2×10^4 个HEK293F/hCTLA4细胞(E:T比率6:1)。在孵育6小时之后,将One-Glo试剂添加至细胞中,并且使细胞溶解。为测量报告基因活性,移除上清液以使用SpectraMax i3x板读取器进行发光测量。人IgG1同种型对照抗体用作阴性对照。

[0528] 如图59中所示,所有测试抗体都以剂量依赖性方式显示各种程度的ADCC信号传导活化,而同种型对照无论如何都显示无ADCC活性。这些结果证明由这些不同抗CTLA4抗体达

成一定范围的ADCC信号传导/刺激性活性。如由信号传导活化的量值(图59)与EC50(表25)两者所证明, TY21580诱导所有测试抗体的最强力ADCC信号传导活性。TY21691在诱导ADCC信号传导方面是活性最小的抗体。尽管较早数据证明这些抗体具有类似的对人CTLA4的结合亲和力, 其中KD处于个位数nM, 但这些ADCC报告体结果表明相比于它们的结合亲和力, 测试抗体的结合表位可能更显著影响ADCC活性。应注意, 尽管TY21586、TY21680、TY21580、TY21687和TY21691具有交叉反应性, 但以上结果显示它们在配体阻断和ADCC活性方面的有效性是显著不同的, 从而表明抗体表位结合位点的细微差异可导致抗肿瘤活性的显著差异。

[0529] 表25: 抗CTLA4抗体关于ADCC报告体信号传导的EC50

[0530]		易普利单抗	TY21580	TY21586	TY21687	TY21680	TY21691
	EC50 (μg/ml)	1.08	0.174	4.69	9.5	6.76	>10

[0531] 实施例16: TY21580和易普利单抗在鼠MC38结肠直肠肿瘤模型中的抗肿瘤功效

[0532] 为确定TY21580和易普利单抗的抗肿瘤功效, 用MC38鼠结肠癌细胞对人CTLA4敲入C57BL/6小鼠(n=6/组, 雌性, 5-9周龄)进行皮下接种。当建立了肿瘤(99mm³)时, 通过一周两次持续两周进行腹膜内注射, 用同种型对照抗体(1mg/kg)、TY21580(1mg/kg或0.2mg/kg)、或易普利单抗(1mg/kg或0.2mg/kg)治疗小鼠。一周两次监测组平均肿瘤生长(图60A)和不同组中每个小鼠的单个肿瘤生长(图60B), 并且报告为随时间的平均肿瘤体积±SEM。如图60A和图60B中所示, TY21580在1mg/kg(组-2)和0.2mg/kg(组-3)的剂量下显示完全抗肿瘤作用, 并且除在首次给药后第32天时在一只小鼠中留有极小肿瘤之外, 这些小鼠中的所有肿瘤都被完全消除。易普利单抗在1mg/kg(组-4)的剂量下也显示完全抗肿瘤作用; 然而, 在首次给药后第32天时, 用较低剂量的易普利单抗(0.2mg/kg, 组-5)治疗的肿瘤中的一半(3/6)逃脱了肿瘤抑制。这显示相比于易普利单抗, TY21580在抗肿瘤活性方面是更有效的。TY21580与易普利单抗两者均得以良好耐受, 无动物在研究期间死亡, 并且在测试的剂量水平下, 未观察到小鼠的显著体重减轻。总之, 这些结果表明TY21580是一种安全和有效的抗癌剂, 相比于易普利单抗, 具有更强力抗癌活性。

[0533] 实施例17: TY21580和易普利单抗在鼠MC38结肠癌模型中对肿瘤内调控性T(Treg)细胞水平的影响

[0534] 在皮下MC38鼠结肠癌同种同基因模型中评估在用TY21580或易普利单抗治疗之后, CD4⁺ T细胞子群体中T调控性(Treg)细胞(CD4⁺CD25⁺)的百分比(图61A)。用TY21580或易普利单抗在1mg/kg(Q3d×3剂)下治疗携带肿瘤的动物。从肿瘤分离CD4⁺ T细胞, 接着从这些CD4⁺ T细胞将肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)和外周细胞(即PBMC和脾细胞)分离为子群体。

[0535] 在TIL中, 在TY21580治疗之后, Treg细胞的百分比显著降低(15.2%(对于TY21580治疗组)相对于41.6%(对于同种型对照组), P<0.001)。在易普利单抗治疗之后, 不存在Treg细胞的显著降低(28.4%(对于易普利单抗)相对于41.6%(对于同种型对照), P=ns)。这与易普利单抗不使微肿瘤环境内的FOXP3⁺ Treg细胞显著变化或消减的观察结果一致(Sharma等(2018) Clin. Cancer Res. 仅在线发表, PMID 30054281; Ferrara等(2018) Clin. Cancer Res.)。在PBMC中, 在TY21580治疗之后, Treg细胞的百分比略微增加(6.2%

(对于TY21580组)相对于3.9% (对于同种型对照组), $P=0.01$), 但这个影响未在易普利单抗治疗之后观察到(4.8% (对于易普利单抗组)相对于3.9% (对于同种型对照组))。也参见Ha等PNAS (2019) 116 (2) :609-618。在脾细胞中, TY21580治疗与易普利单抗治疗两者均对Treg细胞的百分比不具有影响(8.6% (对于同种型对照组); 7.8% (对于TY21580组); 9.4% (对于易普利单抗组))。

[0536] 还评估了细胞毒性T淋巴细胞($CD8^+$ T细胞)与Treg细胞的比率(即 $CD8^+$ /Treg比率)(图61B)。在TIL中, 在用TY21580治疗之后, $CD8^+$ /Treg比率增加(18.7 (对于TY21580)相对于3.7 (对于同种型对照); $P=0.0517$, 接近于0.05)。相较于同种型对照, 易普利单抗治疗对 $CD8^+$ /Treg比率的影响不显著, 并且在最好的情况下也弱于TY21580的影响。在PBMC和脾细胞中, 在TY21580或易普利单抗治疗之后, $CD8^+$ /Treg比率不显著变化。这些结果证明TY21580展现特异性地在肿瘤浸润性细胞(即TIL)中而非在外周细胞(即PBMC和脾细胞)中诱导Treg细胞消减以及使 $CD8^+$ /Treg比率增加的活性。

[0537] TY21580抗CTLA4抗体对T细胞的调控活性提供一种了解TY21580的体内抗肿瘤功效的机理。在不希望受理论束缚下, 结果表明TY21580在肿瘤微环境中使免疫抑制性Treg活性降低以及使细胞毒性T淋巴细胞($CD8^+$ T细胞)活性增强以介导抗肿瘤应答。TY21580与易普利单抗之间在肿瘤Treg消减方面以及在 $CD8^+$ /Treg比率方面的数量差异还显示TY21580比易普利单抗在体内展现更好抗肿瘤活性。

[0538] 实施例18: TY21580在鼠CT26结肠癌模型中对肿瘤内调控性T (Treg) 细胞水平的影响

[0539] 在皮下CT26鼠结肠癌同种同基因模型中评估在用TY21580治疗之后, $CD4^+$ T细胞子群体中T调控性(Treg)细胞的百分比(图62A)。用TY21580(5mg/kg, 在第0和3天)治疗携带肿瘤的动物。从肿瘤分离 $CD4^+$ T细胞, 接着从这些 $CD4^+$ T细胞将肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)和外周细胞(即PBMC和淋巴结(LN)细胞)分离为子群体。

[0540] 如图62A中所示, 相较于同种型对照, TY21580使TIL中Treg细胞的百分比显著降低(12.6% (对于TY21580)相对于38.5% (对于同种型对照), $P<0.001$)。然而, 相较于同种型对照, TY21580不影响外周淋巴细胞(即PBMC和淋巴结(LN)细胞)中Treg细胞的百分比。相对于在同种型对照治疗之后的4.9%, 在TY21580治疗之后, PBMC中Treg细胞的百分比是5.8% ($P>0.05$)。相对于在同种型对照治疗之后的7.7%, 在TY21580治疗之后, 淋巴结细胞中Treg细胞的百分比是8.1% ($P>0.05$)。

[0541] 还评估了细胞毒性T淋巴细胞($CD8^+$ T细胞)与Treg细胞的比率(即 $CD8^+$ /Treg比率)。如图62B中所示, 相较于同种型对照, TY21580还使TIL中的 $CD8^+$ T/Treg比率显著增加(8.0% (对于TY21580)相对于0.6% (对于同种型对照), $P<0.01$)。然而, TY21580对外周淋巴细胞中的 $CD8^+$ T/Treg比率不具有显著影响。在PBMC中, 相对于在同种型对照治疗之后的6.3, 在TY21580治疗之后, $CD8^+$ T/Treg比率是5.3 ($P>0.05$)。在淋巴结细胞中, 相对于在同种型对照治疗之后的4.7, 在TY21580治疗之后, $CD8^+$ T/Treg比率是4.9 ($P>0.05$)。

[0542] 此外, 在TIL中, 来自TY21580治疗组的Foxp3 $^+$ CD4 $^+$ Treg细胞中的CTLA4表达水平显著低于同种型对照组的那些CTLA4表达水平(8985.2MFI (对于TY21580)相对于20948.0MFI (对于同种型对照); 图63)。然而, 在PBMC(2046.7MFI (对于TY21580)相对于2740.9MFI (对于同种型对照))或淋巴结(3062.0MFI (对于TY21580)相对于3247.9MFI (对于同种型对照))

中,CTLA4表达水平不变化。相比于外周细胞(即PBMC和LN)中的Treg细胞,TIL中的Treg细胞还显示高得多的CTLA4表达水平,并且在TY21580治疗之后,TIL Treg细胞中的CTLA4表达是显著较低的。

[0543] 总之,这些结果证明TY21580展现特异性地在肿瘤细胞(即TIL)中而非在外周细胞(即PBMC或淋巴结细胞)中诱导Treg消减以及使CD8⁺/Treg比率增加的活性。TY21580对T细胞的所述调控活性提供一种了解TY21580的强力体内抗肿瘤功效的机理。在不希望受理论束缚下,这些结果表明TY21580在肿瘤微环境中使免疫抑制性Treg活性降低以及使细胞毒性T淋巴细胞(CD8⁺ T细胞)活性增强以介导抗肿瘤应答。

[0544] 实施例19:TY21580在大型经建立H22肝肿瘤模型中的抗肿瘤功效

[0545] 为确定TY21580在大型经建立肿瘤中的抗肿瘤功效,用小鼠H22肝癌细胞对雌性BALB/c小鼠进行皮下接种。当在约500mm³或约800mm³下建立了相对大型肿瘤时,通过一周两次(BIW)持续4次剂量进行腹膜内注射,用TY21580在5mg/kg下治疗小鼠。同种型抗体用作对照。一周两次监测组平均肿瘤生长(图64A)和不同组中每个小鼠的单个肿瘤生长(图64B-图64D),并且报告为随时间的平均肿瘤体积±SEM。

[0546] 如关于组平均肿瘤生长的图64A以及关于单个肿瘤生长的图64B-图64D中所示,相较于同种型对照抗体治疗组(图64A和图64B),在两个TY21580治疗组(即如图64A和图64C中描绘的其中治疗在肿瘤达到约500mm³的尺寸时开始,或如图64A和图64D中描绘的其中治疗在肿瘤达到约800mm³的尺寸时开始的组)中均观察到经建立大型H22肿瘤的显著消退。这些结果证明TY21580在抑制大型经建立肿瘤方面具有惊人的功效。

[0547] 实施例20:掩蔽肽的长度对掩蔽效率的影响

[0548] 选择两种可活化抗体TY22402和TY22404以测试掩蔽效率对掩蔽肽的长度的依赖性以适合它们的特定应用。通过从N末端移除残基,从而在掩蔽肽中的第一半胱氨酸残基之前仅保留5或2个残基来使TY22402和TY22404的掩蔽肽从21个残基缩短至16或12个残基(表26)。从哺乳动物细胞表达和纯化这些可活化抗体,并且如实施例8中所述测量它们的掩蔽效率并与亲本抗体TY21580进行比较。来自两个实验的结果指示这些可活化抗体可使用在第一半胱氨酸残基之前的长度在2至11个残基的范围内的不同掩蔽肽制备以调节抗体掩蔽效率(图65A和图65B;表27和表28)。这似乎表明核心掩蔽基序含有半胱氨酸环以及它的紧邻残基,并且足以维持掩蔽效率。

[0549] 表26:具有不同肽长度的掩蔽肽

[0550]	样品标识符:	掩蔽肽+裂解肽序列(加下划线):
	TY22402	EVGSYIVHHSDCDAFYPCDSS <u>SGRSAGGGGTPLGLAGSGGS</u> (SEQ ID NO: 197)
	TY22775	EVGHSDCDAFYPCDSS <u>SGRSAGGGGTPLGLAGSGGS</u> (SEQ ID NO: 198)
	TY22864	EDCDAFYPCDSS <u>SGRSAGGGGTPLGLAGSGGS</u> (SEQ ID NO: 199)
	TY22404	EVGSYPNPSSDCVPYYYACAYS <u>SGRSAGGGGTPLGLAGSGGS</u> (SEQ ID NO: 200)
	TY22776	EVGSSDCVPYYYACAYS <u>SGRSAGGGGTPLGLAGSGGS</u> (SEQ ID NO: 201)
	TY22871	EDCVPYYYACAYS <u>SGRSAGGGGTPLGLAGSGGS</u> (SEQ ID NO: 202)

[0551] 表27显示图65A中的抗体的掩蔽效率。表28显示图65B中的抗体的掩蔽效率。

[0552] 表27:具有不同掩蔽肽长度的抗体的掩蔽效率

[0553]	样品标识符	EC50 (nM)	掩蔽效率
	TY21580	0.2223	
	TY22402	53.99	243
	TY22775	37.31	168
	TY22404	68.40	308
	TY22776	65.90	296

[0554] 表28:具有不同掩蔽肽长度的抗体的掩蔽效率

[0555]	样品标识符	EC50 (nM)	掩蔽效率
	TY21580	0.2125	
	TY22402	115.6	554
	TY22864	117	550
	TY22404	121.5	572
	TY22871	88.09	414

[0556] 实施例21:裂解肽的长度对掩蔽效率的影响

[0557] 选择TY22404以测试掩蔽效率对裂解肽的长度的依赖性以适合它们的特定应用。使TY22404的裂解肽缩短至各种长度(表29)。从哺乳动物细胞表达和纯化可活化抗体,并且如实施例8中所述测量它们的掩蔽效率并与亲本抗体TY21580进行比较。如图66和表30中所示,结果指示这些可活化抗体可使用它们的长度在5至20个残基的范围内的不同裂解肽制备以调节抗体掩蔽效率。掩蔽基序与裂解基序之间的强烈关联是惊人的;当肽长度从41个氨基酸截短至17个氨基酸时,相较于TY22404, TY23291的掩蔽效率增强至至少30倍。这些结果指示可设计和工程改造若干新型掩蔽肽。此外,可进一步探究掩蔽基序与裂解基序之间

的偶联。

[0558] 表29:具有不同裂解肽长度的掩蔽肽

[0559]

样品标识符	肽名称	掩蔽肽+裂解肽序列(加下划线):
TY22404		EVGSYPNPSSDCVPY ~~YYY~~ ACAY <u>SGRSAGGG</u> <u>GTPLGLAGSGGS</u> (SEQ ID NO: 200)
TY23286		EVGSYPNPSSDCVPY ~~YYY~~ ACAY <u>SGRSAPLG</u> <u>LA</u> (SEQ ID NO: 209)
TY23289		EDCVPY ~~YYY~~ ACAY <u>SGRSAPLGLA</u> (SEQ ID NO: 210)
TY23280		EDCVPY ~~YYY~~ ACAY <u>SGRSA</u> (SEQ ID NO: 211)
TY23291		EDCVPY ~~YYY~~ ACAY <u>PLGLA</u> (SEQ ID NO: 212)

[0560] 表30显示图66中的抗体的掩蔽效率。

[0561] 表30:具有不同裂解肽长度的抗体的掩蔽效率

[0562]

样品标识符	EC50 (nM)	掩蔽效率
TY21580	0.2505	
TY22404	117.4	469
TY23286	1496	5972
TY23289	133.2	532
TY23280	2952	11784
TY23291	3656	14595

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 天演药业有限公司(Adagene Inc.)
- [0003] 罗, 彼得培志(LU0, Peter Peizhi)
- [0004] 杜, 方勇(DU, Fangyong)
- [0005] 潘, 忠宗(PAN, Zhongzong)
- [0006] 刘, 贵中(LIU, Guizhong)
- [0007] <120> 抗CTLA4抗体及其制备和使用方法
- [0008] <130> 69540-20005.41
- [0009] <140> 尚未分配
- [0010] <141> 同时随同提交
- [0011] <150> PCT/CN2018/075064
- [0012] <151> 2018-02-02
- [0013] <160> 230
- [0014] <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
- [0015] <210> 1
- [0016] <211> 11
- [0017] <212> PRT
- [0018] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0019] <220>
- [0020] <223> 合成构建体
- [0021] <220>
- [0022] <221> 变体
- [0023] <222> 1
- [0024] <223> Xaa = Phe或Tyr
- [0025] <220>
- [0026] <221> 变体
- [0027] <222> 5
- [0028] <223> Xaa = Asp或Gly
- [0029] <220>
- [0030] <221> 变体
- [0031] <222> 7
- [0032] <223> Xaa = Ala、Gly或Trp
- [0033] <400> 1
- [0034] Xaa Thr Phe Ser Xaa Tyr Xaa Ile His Trp Val
- [0035] 1 5 10
- [0036] <210> 2
- [0037] <211> 12
- [0038] <212> PRT

[0039]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0040]	<220>	
[0041]	<223>	合成构建体
[0042]	<220>	
[0043]	<221>	变体
[0044]	<222>	4
[0045]	<223>	Xaa = Ser或Thr
[0046]	<220>	
[0047]	<221>	变体
[0048]	<222>	7, 8
[0049]	<223>	Xaa = His或Tyr
[0050]	<220>	
[0051]	<221>	变体
[0052]	<222>	10
[0053]	<223>	Xaa = Ala、Asp或Ser
[0054]	<400>	2
[0055]	Tyr Ser Ile Xaa Ser Gly Xaa Xaa Trp Xaa Trp Ile	
[0056]	1	5 10
[0057]	<210>	3
[0058]	<211>	13
[0059]	<212>	PRT
[0060]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0061]	<220>	
[0062]	<223>	合成构建体
[0063]	<220>	
[0064]	<221>	变体
[0065]	<222>	11
[0066]	<223>	Xaa = Gly或Ser
[0067]	<400>	3
[0068]	Phe Ser Leu Ser Thr Gly Gly Val Ala Val Xaa Trp Ile	
[0069]	1	5 10
[0070]	<210>	4
[0071]	<211>	20
[0072]	<212>	PRT
[0073]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0074]	<220>	
[0075]	<223>	合成构建体
[0076]	<220>	
[0077]	<221>	变体

[0078]	<222> 3
[0079]	<223> Xaa = Asp或Glu
[0080]	<220>
[0081]	<221> 变体
[0082]	<222> 5
[0083]	<223> Xaa = Ser或Tyr
[0084]	<220>
[0085]	<221> 变体
[0086]	<222> 14
[0087]	<223> Xaa = Pro或Gln
[0088]	<400> 4
[0089]	Ile Gly Xaa Ile Xaa His Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Xaa Ser Leu
[0090]	1 5 10 15
[0091]	Lys Ser Arg Val
[0092]	20
[0093]	<210> 5
[0094]	<211> 21
[0095]	<212> PRT
[0096]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0097]	<220>
[0098]	<223> 合成构建体
[0099]	<220>
[0100]	<221> 变体
[0101]	<222> 3
[0102]	<223> Xaa = Ile或Trp
[0103]	<220>
[0104]	<221> 变体
[0105]	<222> 8, 10
[0106]	<223> Xaa = Gly或Ser
[0107]	<220>
[0108]	<221> 变体
[0109]	<222> 12
[0110]	<223> Xaa = Lys或Asn
[0111]	<400> 5
[0112]	Ile Gly Xaa Ile Ser Pro Ser Xaa Gly Xaa Thr Xaa Tyr Ala Gln Lys
[0113]	1 5 10 15
[0114]	Phe Gln Gly Arg Val
[0115]	20
[0116]	<210> 6

[0117]	<211>	21
[0118]	<212>	PRT
[0119]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0120]	<220>	
[0121]	<223>	合成构建体
[0122]	<220>	
[0123]	<221>	变体
[0124]	<222>	3
[0125]	<223>	Xaa = Ala、Gly或Ser
[0126]	<220>	
[0127]	<221>	变体
[0128]	<222>	7
[0129]	<223>	Xaa = Ser或Tyr
[0130]	<220>	
[0131]	<221>	变体
[0132]	<222>	9
[0133]	<223>	Xaa = Gly或Ser
[0134]	<220>	
[0135]	<221>	变体
[0136]	<222>	10
[0137]	<223>	Xaa = Ser或Thr
[0138]	<400>	6
[0139]	Val Ser Xaa Ile Ser Gly Xaa Gly Xaa Xaa Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser	
[0140]	1 5 10 15	
[0141]	Val Lys Gly Arg Phe	
[0142]	20	
[0143]	<210>	7
[0144]	<211>	9
[0145]	<212>	PRT
[0146]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0147]	<220>	
[0148]	<223>	合成构建体
[0149]	<220>	
[0150]	<221>	变体
[0151]	<222>	3
[0152]	<223>	Xaa = Gly、Arg或Ser
[0153]	<220>	
[0154]	<221>	变体
[0155]	<222>	4

[0156]	<223>	Xaa = Ala、Ile或Tyr
[0157]	<220>	
[0158]	<221>	变体
[0159]	<222>	5
[0160]	<223>	Xaa = Asp、Val或Tyr
[0161]	<220>	
[0162]	<221>	变体
[0163]	<222>	6
[0164]	<223>	Xaa = Ala、Glu或Tyr
[0165]	<220>	
[0166]	<221>	变体
[0167]	<222>	9
[0168]	<223>	Xaa = Ile或Tyr
[0169]	<400>	7
[0170]		Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Asp Xaa
[0171]	1	5
[0172]	<210>	8
[0173]	<211>	10
[0174]	<212>	PRT
[0175]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0176]	<220>	
[0177]	<223>	合成构建体
[0178]	<220>	
[0179]	<221>	变体
[0180]	<222>	3
[0181]	<223>	Xaa = Asp或Leu
[0182]	<220>	
[0183]	<221>	变体
[0184]	<222>	5
[0185]	<223>	Xaa = Phe或Tyr
[0186]	<220>	
[0187]	<221>	变体
[0188]	<222>	10
[0189]	<223>	Xaa = Val或Tyr
[0190]	<400>	8
[0191]		Ala Arg Xaa Gly Xaa Gly Tyr Phe Asp Xaa
[0192]	1	5 10
[0193]	<210>	9
[0194]	<211>	12

[0195]	<212>	PRT
[0196]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0197]	<220>	
[0198]	<223>	合成构建体
[0199]	<220>	
[0200]	<221>	变体
[0201]	<222>	3
[0202]	<223>	Xaa = Leu或Arg
[0203]	<220>	
[0204]	<221>	变体
[0205]	<222>	4
[0206]	<223>	Xaa = Ile或Pro
[0207]	<220>	
[0208]	<221>	变体
[0209]	<222>	5
[0210]	<223>	Xaa = Ala或Tyr
[0211]	<220>	
[0212]	<221>	变体
[0213]	<222>	6
[0214]	<223>	Xaa = Ser或Thr
[0215]	<220>	
[0216]	<221>	变体
[0217]	<222>	8
[0218]	<223>	Xaa = Thr或Tyr
[0219]	<220>	
[0220]	<221>	变体
[0221]	<222>	9
[0222]	<223>	Xaa = Ala或Tyr
[0223]	<400>	9
[0224]	Ala Arg Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Phe Asp Tyr	
[0225]	1	5 10
[0226]	<210>	10
[0227]	<211>	17
[0228]	<212>	PRT
[0229]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0230]	<220>	
[0231]	<223>	合成构建体
[0232]	<220>	
[0233]	<221>	变体

[0234]	<222> 4
[0235]	<223> Xaa = Ile或Val
[0236]	<220>
[0237]	<221> 变体
[0238]	<222> 5
[0239]	<223> Xaa = Ala或His
[0240]	<220>
[0241]	<221> 变体
[0242]	<222> 6
[0243]	<223> Xaa = Pro或Ser
[0244]	<220>
[0245]	<221> 变体
[0246]	<222> 13
[0247]	<223> Xaa = Asp或Tyr
[0248]	<220>
[0249]	<221> 变体
[0250]	<222> 17
[0251]	<223> Xaa = Phe或Val
[0252]	<400> 10
[0253]	Ala Arg Asp Xaa Xaa Xaa Gly Ser Ser Gly Tyr Tyr Xaa Gly Phe Asp
[0254]	1 5 10 15
[0255]	Xaa
[0256]	<210> 11
[0257]	<211> 11
[0258]	<212> PRT
[0259]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0260]	<220>
[0261]	<223> 合成构建体
[0262]	<220>
[0263]	<221> 变体
[0264]	<222> 5, 7
[0265]	<223> Xaa = Gly或Ser
[0266]	<220>
[0267]	<221> 变体
[0268]	<222> 6
[0269]	<223> Xaa = Ile或Val
[0270]	<220>
[0271]	<221> 变体
[0272]	<222> 9

[0273]	<223> Xaa = Ser或Tyr
[0274]	<220>
[0275]	<221> 变体
[0276]	<222> 11
[0277]	<223> Xaa = Ala或Asn
[0278]	<400> 11
[0279]	Arg Ala Ser Gln Xaa Xaa Xaa Ser Xaa Leu Xaa
[0280]	1 5 10
[0281]	<210> 12
[0282]	<211> 12
[0283]	<212> PRT
[0284]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0285]	<220>
[0286]	<223> 合成构建体
[0287]	<220>
[0288]	<221> 变体
[0289]	<222> 5
[0290]	<223> Xaa = Ser或Thr
[0291]	<220>
[0292]	<221> 变体
[0293]	<222> 7
[0294]	<223> Xaa = Phe、Arg或Ser
[0295]	<220>
[0296]	<221> 变体
[0297]	<222> 8
[0298]	<223> Xaa = Gly或Ser
[0299]	<220>
[0300]	<221> 变体
[0301]	<222> 10
[0302]	<223> Xaa = Phe或Tyr
[0303]	<400> 12
[0304]	Arg Ala Ser Gln Xaa Val Xaa Xaa Arg Xaa Leu Ala
[0305]	1 5 10
[0306]	<210> 13
[0307]	<211> 15
[0308]	<212> PRT
[0309]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0310]	<220>
[0311]	<223> 合成构建体

[0312]	<220>
[0313]	<221> 变体
[0314]	<222> 4
[0315]	<223> Xaa = Glu或Gln
[0316]	<220>
[0317]	<221> 变体
[0318]	<222> 9
[0319]	<223> Xaa = Asp、Phe、His或Tyr
[0320]	<220>
[0321]	<221> 变体
[0322]	<222> 11
[0323]	<223> Xaa = Phe、Ile或Lys
[0324]	<220>
[0325]	<221> 变体
[0326]	<222> 15
[0327]	<223> Xaa = Ala、Asp或His
[0328]	<400> 13
[0329]	Arg Ala Ser Xaa Ser Val Asp Phe Xaa Gly Xaa Ser Phe Leu Xaa
[0330]	1 5 10 15
[0331]	<210> 14
[0332]	<211> 9
[0333]	<212> PRT
[0334]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0335]	<220>
[0336]	<223> 合成构建体
[0337]	<220>
[0338]	<221> 变体
[0339]	<222> 1
[0340]	<223> Xaa = Ala或Asp
[0341]	<220>
[0342]	<221> 变体
[0343]	<222> 4
[0344]	<223> Xaa = Asn、Ser或Thr
[0345]	<220>
[0346]	<221> 变体
[0347]	<222> 5
[0348]	<223> Xaa = Leu或Arg
[0349]	<220>
[0350]	<221> 变体

- [0351] <222> 6
- [0352] <223> Xaa = Ala、Glu或Gln
- [0353] <220>
- [0354] <221> 变体
- [0355] <222> 7
- [0356] <223> Xaa = Ser或Thr
- [0357] <220>
- [0358] <221> 变体
- [0359] <222> 9
- [0360] <223> Xaa = Ile或Val
- [0361] <400> 14
- [0362] Xaa Ala Ser Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Xaa
- [0363] 1 5
- [0364] <210> 15
- [0365] <211> 11
- [0366] <212> PRT
- [0367] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [0368] <220>
- [0369] <223> 合成构建体
- [0370] <220>
- [0371] <221> 变体
- [0372] <222> 3
- [0373] <223> Xaa = Glu、Gln或Val
- [0374] <220>
- [0375] <221> 变体
- [0376] <222> 4
- [0377] <223> Xaa = His或Gln
- [0378] <220>
- [0379] <221> 变体
- [0380] <222> 5
- [0381] <223> Xaa = Ala、Gly、His、Arg或Ser
- [0382] <220>
- [0383] <221> 变体
- [0384] <222> 6
- [0385] <223> Xaa = Asp、Leu、Ser或Tyr
- [0386] <220>
- [0387] <221> 变体
- [0388] <222> 7
- [0389] <223> Xaa = Glu、Gly、Pro、Gln或Ser

[0390]	<220>
[0391]	<221> 变体
[0392]	<222> 8
[0393]	<223> Xaa = Leu,Thr,Val或Trp
[0394]	<220>
[0395]	<221> 变体
[0396]	<222> 10
[0397]	<223> Xaa = Phe,Leu,Pro,Trp或Tyr
[0398]	<400> 15
[0399]	Tyr Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Xaa Thr
[0400]	1 5 10
[0401]	<210> 16
[0402]	<211> 12
[0403]	<212> PRT
[0404]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0405]	<220>
[0406]	<223> 合成构建体
[0407]	<220>
[0408]	<221> 变体
[0409]	<222> 5
[0410]	<223> Xaa = Ser或Tyr
[0411]	<220>
[0412]	<221> 变体
[0413]	<222> 6
[0414]	<223> Xaa = Asp或Tyr
[0415]	<220>
[0416]	<221> 变体
[0417]	<222> 7
[0418]	<223> Xaa = Gln或Tyr
[0419]	<400> 16
[0420]	Tyr Cys Gln Gln Xaa Xaa Xaa Trp Pro Pro Trp Thr
[0421]	1 5 10
[0422]	<210> 17
[0423]	<211> 13
[0424]	<212> PRT
[0425]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0426]	<220>
[0427]	<223> 合成构建体
[0428]	<220>

[0429]	<221> 变体
[0430]	<222> 4
[0431]	<223> Xaa = His或Gln
[0432]	<220>
[0433]	<221> 变体
[0434]	<222> 6
[0435]	<223> Xaa = Thr或Val
[0436]	<220>
[0437]	<221> 变体
[0438]	<222> 11
[0439]	<223> Xaa = Glu或Val
[0440]	<400> 17
[0441]	Tyr Cys Gln Xaa Tyr Xaa Ser Ser Pro Pro Xaa Tyr Thr
[0442]	1 5 10
[0443]	<210> 18
[0444]	<211> 11
[0445]	<212> PRT
[0446]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0447]	<220>
[0448]	<223> 合成构建体
[0449]	<400> 18
[0450]	Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Ala Ile His Trp Val
[0451]	1 5 10
[0452]	<210> 19
[0453]	<211> 12
[0454]	<212> PRT
[0455]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0456]	<220>
[0457]	<223> 合成构建体
[0458]	<400> 19
[0459]	Tyr Ser Ile Thr Ser Gly Tyr Tyr Trp Ala Trp Ile
[0460]	1 5 10
[0461]	<210> 20
[0462]	<211> 11
[0463]	<212> PRT
[0464]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0465]	<220>
[0466]	<223> 合成构建体
[0467]	<400> 20

[0468]	Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Gly Ile His Trp Val
[0469]	1 5 10
[0470]	<210> 21
[0471]	<211> 12
[0472]	<212> PRT
[0473]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0474]	<220>
[0475]	<223> 合成构建体
[0476]	<400> 21
[0477]	Tyr Ser Ile Ser Ser Gly Tyr His Trp Asp Trp Ile
[0478]	1 5 10
[0479]	<210> 22
[0480]	<211> 11
[0481]	<212> PRT
[0482]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0483]	<220>
[0484]	<223> 合成构建体
[0485]	<400> 22
[0486]	Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Ile His Trp Val
[0487]	1 5 10
[0488]	<210> 23
[0489]	<211> 12
[0490]	<212> PRT
[0491]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0492]	<220>
[0493]	<223> 合成构建体
[0494]	<400> 23
[0495]	Tyr Ser Ile Ser Ser Gly Tyr His Trp Ser Trp Ile
[0496]	1 5 10
[0497]	<210> 24
[0498]	<211> 13
[0499]	<212> PRT
[0500]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0501]	<220>
[0502]	<223> 合成构建体
[0503]	<400> 24
[0504]	Phe Ser Leu Ser Thr Gly Gly Val Ala Val Ser Trp Ile
[0505]	1 5 10
[0506]	<210> 25

[0507]	<211>	13
[0508]	<212>	PRT
[0509]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0510]	<220>	
[0511]	<223>	合成构建体
[0512]	<400>	25
[0513]	Phe Ser Leu Ser Thr Gly Gly Val Ala Val Gly Trp Ile	
[0514]	1	5 10
[0515]	<210>	26
[0516]	<211>	11
[0517]	<212>	PRT
[0518]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0519]	<220>	
[0520]	<223>	合成构建体
[0521]	<400>	26
[0522]	Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ala Ile His Trp Val	
[0523]	1	5 10
[0524]	<210>	27
[0525]	<211>	11
[0526]	<212>	PRT
[0527]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0528]	<220>	
[0529]	<223>	合成构建体
[0530]	<400>	27
[0531]	Tyr Thr Phe Ser Gly Tyr Gly Ile His Trp Val	
[0532]	1	5 10
[0533]	<210>	28
[0534]	<211>	11
[0535]	<212>	PRT
[0536]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0537]	<220>	
[0538]	<223>	合成构建体
[0539]	<400>	28
[0540]	Tyr Thr Phe Ser Gly Tyr Ala Ile His Trp Val	
[0541]	1	5 10
[0542]	<210>	29
[0543]	<211>	12
[0544]	<212>	PRT
[0545]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)

[0546]	<220>		
[0547]	<223>	合成构建体	
[0548]	<400>	29	
[0549]	Tyr Ser Ile Thr Ser Gly His Tyr Trp Ser Trp Ile		
[0550]	1	5	10
[0551]	<210>	30	
[0552]	<211>	21	
[0553]	<212>	PRT	
[0554]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0555]	<220>		
[0556]	<223>	合成构建体	
[0557]	<400>	30	
[0558]	Ile Gly Ile Ile Ser Pro Ser Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Gln Lys		
[0559]	1	5	10 15
[0560]	Phe Gln Gly Arg Val		
[0561]		20	
[0562]	<210>	31	
[0563]	<211>	21	
[0564]	<212>	PRT	
[0565]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0566]	<220>		
[0567]	<223>	合成构建体	
[0568]	<400>	31	
[0569]	Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser		
[0570]	1	5	10 15
[0571]	Val Lys Gly Arg Phe		
[0572]		20	
[0573]	<210>	32	
[0574]	<211>	20	
[0575]	<212>	PRT	
[0576]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
[0577]	<220>		
[0578]	<223>	合成构建体	
[0579]	<400>	32	
[0580]	Ile Gly Glu Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Pro Ser Leu		
[0581]	1	5	10 15
[0582]	Lys Ser Arg Val		
[0583]		20	
[0584]	<210>	33	

[0585]	<211>	21
[0586]	<212>	PRT
[0587]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0588]	<220>	
[0589]	<223>	合成构建体
[0590]	<400>	33
[0591]	Val Ser Gly Ile Ser Gly Tyr Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser	
[0592]	1 5 10 15	
[0593]	Val Lys Gly Arg Phe	
[0594]	20	
[0595]	<210>	34
[0596]	<211>	21
[0597]	<212>	PRT
[0598]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0599]	<220>	
[0600]	<223>	合成构建体
[0601]	<400>	34
[0602]	Ile Gly Trp Ile Ser Pro Ser Gly Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys	
[0603]	1 5 10 15	
[0604]	Phe Gln Gly Arg Val	
[0605]	20	
[0606]	<210>	35
[0607]	<211>	20
[0608]	<212>	PRT
[0609]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0610]	<220>	
[0611]	<223>	合成构建体
[0612]	<400>	35
[0613]	Leu Ala Arg Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser Leu	
[0614]	1 5 10 15	
[0615]	Lys Ser Arg Leu	
[0616]	20	
[0617]	<210>	36
[0618]	<211>	21
[0619]	<212>	PRT
[0620]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0621]	<220>	
[0622]	<223>	合成构建体
[0623]	<400>	36

[0624]	Val Ser Ala Ile Ser Gly Tyr Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser
[0625]	1 5 10 15
[0626]	Val Lys Gly Arg Phe
[0627]	20
[0628]	<210> 37
[0629]	<211> 21
[0630]	<212> PRT
[0631]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0632]	<220>
[0633]	<223> 合成构建体
[0634]	<400> 37
[0635]	Ile Gly Ile Ile Ser Pro Ser Gly Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys
[0636]	1 5 10 15
[0637]	Phe Gln Gly Arg Val
[0638]	20
[0639]	<210> 38
[0640]	<211> 21
[0641]	<212> PRT
[0642]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0643]	<220>
[0644]	<223> 合成构建体
[0645]	<400> 38
[0646]	Ile Gly Ile Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys
[0647]	1 5 10 15
[0648]	Phe Gln Gly Arg Val
[0649]	20
[0650]	<210> 39
[0651]	<211> 20
[0652]	<212> PRT
[0653]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0654]	<220>
[0655]	<223> 合成构建体
[0656]	<400> 39
[0657]	Ile Gly Asp Ile Ser His Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Gln Ser Leu
[0658]	1 5 10 15
[0659]	Lys Ser Arg Val
[0660]	20
[0661]	<210> 40
[0662]	<211> 17

[0663]	<212>	PRT
[0664]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0665]	<220>	
[0666]	<223>	合成构建体
[0667]	<400>	40
[0668]	Ala Arg Asp Ile His Ser Gly Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Gly Phe Asp	
[0669]	1	5 10 15
[0670]	Val	
[0671]	<210>	41
[0672]	<211>	10
[0673]	<212>	PRT
[0674]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0675]	<220>	
[0676]	<223>	合成构建体
[0677]	<400>	41
[0678]	Ala Arg Asp Gly Phe Gly Tyr Phe Asp Tyr	
[0679]	1	5 10
[0680]	<210>	42
[0681]	<211>	17
[0682]	<212>	PRT
[0683]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0684]	<220>	
[0685]	<223>	合成构建体
[0686]	<400>	42
[0687]	Ala Arg Asp Val Ala Pro Gly Ser Ser Gly Tyr Tyr Asp Gly Phe Asp	
[0688]	1	5 10 15
[0689]	Phe	
[0690]	<210>	43
[0691]	<211>	13
[0692]	<212>	PRT
[0693]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0694]	<220>	
[0695]	<223>	合成构建体
[0696]	<400>	43
[0697]	Ala Arg His Ser Tyr Tyr Gly Ser Gly Asn Phe Asp Tyr	
[0698]	1	5 10
[0699]	<210>	44
[0700]	<211>	9
[0701]	<212>	PRT

[0702]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0703]	<220>	
[0704]	<223>	合成构建体
[0705]	<400>	44
[0706]	Ala Arg Gly Ala Tyr Glu Phe Asp Tyr	
[0707]	1	5
[0708]	<210>	45
[0709]	<211>	9
[0710]	<212>	PRT
[0711]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0712]	<220>	
[0713]	<223>	合成构建体
[0714]	<400>	45
[0715]	Ala Arg Ser Tyr Val Tyr Phe Asp Tyr	
[0716]	1	5
[0717]	<210>	46
[0718]	<211>	12
[0719]	<212>	PRT
[0720]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0721]	<220>	
[0722]	<223>	合成构建体
[0723]	<400>	46
[0724]	Ala Arg Arg Ile Ala Thr Ala Thr Tyr Phe Asp Tyr	
[0725]	1	5 10
[0726]	<210>	47
[0727]	<211>	12
[0728]	<212>	PRT
[0729]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0730]	<220>	
[0731]	<223>	合成构建体
[0732]	<400>	47
[0733]	Ala Arg Leu Pro Tyr Ser Ala Tyr Ala Phe Asp Tyr	
[0734]	1	5 10
[0735]	<210>	48
[0736]	<211>	7
[0737]	<212>	PRT
[0738]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0739]	<220>	
[0740]	<223>	合成构建体

[0741]	<400> 48
[0742]	Ala Arg His Pro Phe Ala Tyr
[0743]	1 5
[0744]	<210> 49
[0745]	<211> 9
[0746]	<212> PRT
[0747]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0748]	<220>
[0749]	<223> 合成构建体
[0750]	<400> 49
[0751]	Ala Arg Arg Ile Asp Ala Phe Asp Ile
[0752]	1 5
[0753]	<210> 50
[0754]	<211> 8
[0755]	<212> PRT
[0756]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0757]	<220>
[0758]	<223> 合成构建体
[0759]	<400> 50
[0760]	Ala Arg Leu Tyr Asp Val Ala Tyr
[0761]	1 5
[0762]	<210> 51
[0763]	<211> 10
[0764]	<212> PRT
[0765]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0766]	<220>
[0767]	<223> 合成构建体
[0768]	<400> 51
[0769]	Ala Arg Leu Gly Tyr Gly Tyr Phe Asp Val
[0770]	1 5 10
[0771]	<210> 52
[0772]	<211> 11
[0773]	<212> PRT
[0774]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0775]	<220>
[0776]	<223> 合成构建体
[0777]	<400> 52
[0778]	Ala Arg Gly Ser Arg Thr Gly Tyr Phe Asp Tyr
[0779]	1 5 10

[0780]	<210>	53
[0781]	<211>	15
[0782]	<212>	PRT
[0783]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0784]	<220>	
[0785]	<223>	合成构建体
[0786]	<400>	53
[0787]		Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Phe Phe Gly Ile Ser Phe Leu Ala
[0788]		1 5 10 15
[0789]	<210>	54
[0790]	<211>	10
[0791]	<212>	PRT
[0792]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0793]	<220>	
[0794]	<223>	合成构建体
[0795]	<400>	54
[0796]		Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Val Tyr
[0797]		1 5 10
[0798]	<210>	55
[0799]	<211>	11
[0800]	<212>	PRT
[0801]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0802]	<220>	
[0803]	<223>	合成构建体
[0804]	<400>	55
[0805]		Arg Ala Ser Gln Gly Ile Gly Ser Ser Leu Ala
[0806]		1 5 10
[0807]	<210>	56
[0808]	<211>	15
[0809]	<212>	PRT
[0810]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0811]	<220>	
[0812]	<223>	合成构建体
[0813]	<400>	56
[0814]		Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Phe Phe Gly Lys Ser Phe Leu His
[0815]		1 5 10 15
[0816]	<210>	57
[0817]	<211>	12
[0818]	<212>	PRT

[0819]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0820]	<220>	
[0821]	<223>	合成构建体
[0822]	<400>	57
[0823]	Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Arg Phe Leu Ala	
[0824]	1	5 10
[0825]	<210>	58
[0826]	<211>	12
[0827]	<212>	PRT
[0828]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0829]	<220>	
[0830]	<223>	合成构建体
[0831]	<400>	58
[0832]	Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Gly Arg Phe Leu Ala	
[0833]	1	5 10
[0834]	<210>	59
[0835]	<211>	12
[0836]	<212>	PRT
[0837]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0838]	<220>	
[0839]	<223>	合成构建体
[0840]	<400>	59
[0841]	Arg Ala Ser Gln Thr Val Phe Ser Arg Tyr Leu Ala	
[0842]	1	5 10
[0843]	<210>	60
[0844]	<211>	11
[0845]	<212>	PRT
[0846]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0847]	<220>	
[0848]	<223>	合成构建体
[0849]	<400>	60
[0850]	Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Ser Tyr Leu Ala	
[0851]	1	5 10
[0852]	<210>	61
[0853]	<211>	15
[0854]	<212>	PRT
[0855]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0856]	<220>	
[0857]	<223>	合成构建体

[0858]	<400> 61
[0859]	Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Tyr Gly Ile Ser Phe Leu Asp
[0860]	1 5 10 15
[0861]	<210> 62
[0862]	<211> 15
[0863]	<212> PRT
[0864]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0865]	<220>
[0866]	<223> 合成构建体
[0867]	<400> 62
[0868]	Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp Gly Phe Ser Phe Leu His
[0869]	1 5 10 15
[0870]	<210> 63
[0871]	<211> 15
[0872]	<212> PRT
[0873]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0874]	<220>
[0875]	<223> 合成构建体
[0876]	<400> 63
[0877]	Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe His Gly Lys Ser Phe Leu His
[0878]	1 5 10 15
[0879]	<210> 64
[0880]	<211> 15
[0881]	<212> PRT
[0882]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0883]	<220>
[0884]	<223> 合成构建体
[0885]	<400> 64
[0886]	Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Tyr Gly Ile Ser Phe Leu His
[0887]	1 5 10 15
[0888]	<210> 65
[0889]	<211> 11
[0890]	<212> PRT
[0891]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0892]	<220>
[0893]	<223> 合成构建体
[0894]	<400> 65
[0895]	Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn
[0896]	1 5 10

[0897] <210> 66
[0898] <211> 9
[0899] <212> PRT
[0900] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0901] <220>
[0902] <223> 合成构建体
[0903] <400> 66
[0904] Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile
[0905] 1 5
[0906] <210> 67
[0907] <211> 9
[0908] <212> PRT
[0909] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0910] <220>
[0911] <223> 合成构建体
[0912] <400> 67
[0913] Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val
[0914] 1 5
[0915] <210> 68
[0916] <211> 9
[0917] <212> PRT
[0918] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0919] <220>
[0920] <223> 合成构建体
[0921] <400> 68
[0922] Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val
[0923] 1 5
[0924] <210> 69
[0925] <211> 9
[0926] <212> PRT
[0927] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0928] <220>
[0929] <223> 合成构建体
[0930] <400> 69
[0931] Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val
[0932] 1 5
[0933] <210> 70
[0934] <211> 13
[0935] <212> PRT

[0936]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0937]	<220>	
[0938]	<223>	合成构建体
[0939]	<400>	70
[0940]	Tyr Cys Gln His Tyr Thr Ser Ser Pro Pro Val Tyr Thr	
[0941]	1	5 10
[0942]	<210>	71
[0943]	<211>	11
[0944]	<212>	PRT
[0945]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0946]	<220>	
[0947]	<223>	合成构建体
[0948]	<400>	71
[0949]	Tyr Cys Val Gln Gly Leu Gln Thr Pro Trp Thr	
[0950]	1	5 10
[0951]	<210>	72
[0952]	<211>	12
[0953]	<212>	PRT
[0954]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0955]	<220>	
[0956]	<223>	合成构建体
[0957]	<400>	72
[0958]	Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Gln Trp Pro Pro Trp Thr	
[0959]	1	5 10
[0960]	<210>	73
[0961]	<211>	11
[0962]	<212>	PRT
[0963]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0964]	<220>	
[0965]	<223>	合成构建体
[0966]	<400>	73
[0967]	Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Trp Pro Pro Thr	
[0968]	1	5 10
[0969]	<210>	74
[0970]	<211>	11
[0971]	<212>	PRT
[0972]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[0973]	<220>	
[0974]	<223>	合成构建体

[0975]	<400> 74
[0976]	Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Pro Thr Pro Leu Thr
[0977]	1 5 10
[0978]	<210> 75
[0979]	<211> 11
[0980]	<212> PRT
[0981]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0982]	<220>
[0983]	<223> 合成构建体
[0984]	<400> 75
[0985]	Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Ser Trp Pro Pro Thr
[0986]	1 5 10
[0987]	<210> 76
[0988]	<211> 12
[0989]	<212> PRT
[0990]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0991]	<220>
[0992]	<223> 合成构建体
[0993]	<400> 76
[0994]	Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Tyr Trp Pro Pro Trp Thr
[0995]	1 5 10
[0996]	<210> 77
[0997]	<211> 11
[0998]	<212> PRT
[0999]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1000]	<220>
[1001]	<223> 合成构建体
[1002]	<400> 77
[1003]	Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Leu Thr
[1004]	1 5 10
[1005]	<210> 78
[1006]	<211> 13
[1007]	<212> PRT
[1008]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1009]	<220>
[1010]	<223> 合成构建体
[1011]	<400> 78
[1012]	Tyr Cys Gln Gln Tyr Val Ser Ser Pro Pro Glu Tyr Thr
[1013]	1 5 10

[1014]	<210> 79
[1015]	<211> 11
[1016]	<212> PRT
[1017]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1018]	<220>
[1019]	<223> 合成构建体
[1020]	<400> 79
[1021]	Tyr Cys Gln Gln Arg Asp Ser Trp Pro Tyr Thr
[1022]	1 5 10
[1023]	<210> 80
[1024]	<211> 11
[1025]	<212> PRT
[1026]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1027]	<220>
[1028]	<223> 合成构建体
[1029]	<400> 80
[1030]	Tyr Cys Glu Gln Ser Leu Glu Val Pro Phe Thr
[1031]	1 5 10
[1032]	<210> 81
[1033]	<211> 11
[1034]	<212> PRT
[1035]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1036]	<220>
[1037]	<223> 合成构建体
[1038]	<400> 81
[1039]	Tyr Cys Val Gln Ala Leu Gln Leu Pro Leu Thr
[1040]	1 5 10
[1041]	<210> 82
[1042]	<211> 124
[1043]	<212> PRT
[1044]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1045]	<220>
[1046]	<223> 合成构建体
[1047]	<400> 82
[1048]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1049]	1 5 10 15
[1050]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
[1051]	20 25 30
[1052]	Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

[1053]	35	40	45
[1054]	Gly Ile Ile Ser Pro Ser Ser Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe		
[1055]	50	55	60
[1056]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[1057]	65	70	75
[1058]	80		
[1058]	Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[1059]	85	90	95
[1060]	Ala Arg Asp Ile His Ser Gly Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Gly Phe Asp		
[1061]	100	105	110
[1062]	Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[1063]	115	120	
[1064]	<210> 83		
[1065]	<211> 118		
[1066]	<212> PRT		
[1067]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[1068]	<220>		
[1069]	<223> 合成构建体		
[1070]	<400> 83		
[1071]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[1072]	1	5	10
[1073]	15		
[1073]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly		
[1074]	20	25	30
[1075]	Tyr Tyr Trp Ala Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp		
[1076]	35	40	45
[1077]	Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser		
[1078]	50	55	60
[1079]	Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu		
[1080]	65	70	75
[1081]	80		
[1081]	Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		
[1082]	85	90	95
[1083]	Cys Ala Arg Asp Gly Phe Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
[1084]	100	105	110
[1085]	Leu Val Thr Val Ser Ser		
[1086]	115		
[1087]	<210> 84		
[1088]	<211> 123		
[1089]	<212> PRT		
[1090]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[1091]	<220>		

[1092]	<223> 合成构建体															
[1093]	<400> 84															
[1094]	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
[1095]	1				5					10					15	
[1096]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Asp	Tyr
[1097]				20					25					30		
[1098]	Gly	Ile	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
[1099]			35					40					45			
[1100]	Gly	Glu	Ile	Tyr	His	Ser	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ser	Pro	Ser	Leu	Lys
[1101]		50					55					60				
[1102]	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu
[1103]	65					70					75				80	
[1104]	Gln	Leu	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
[1105]					85					90					95	
[1106]	Arg	Asp	Val	Ala	Pro	Gly	Ser	Ser	Gly	Tyr	Tyr	Asp	Gly	Phe	Asp	Phe
[1107]				100					105					110		
[1108]	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser					
[1109]				115					120							
[1110]	<210> 85															
[1111]	<211> 121															
[1112]	<212> PRT															
[1113]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)															
[1114]	<220>															
[1115]	<223> 合成构建体															
[1116]	<400> 85															
[1117]	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
[1118]	1				5					10					15	
[1119]	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ile	Ser	Ser	Gly
[1120]				20					25					30		
[1121]	Tyr	His	Trp	Asp	Trp	Ile	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp
[1122]			35					40					45			
[1123]	Val	Ser	Gly	Ile	Ser	Gly	Tyr	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser
[1124]		50					55					60				
[1125]	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu
[1126]	65					70				75					80	
[1127]	Tyr	Leu	Gln	Leu	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr
[1128]					85					90					95	
[1129]	Cys	Ala	Arg	His	Ser	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Gly	Asn	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly
[1130]				100					105					110		

[1131]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[1132]	115 120
[1133]	<210> 86
[1134]	<211> 116
[1135]	<212> PRT
[1136]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1137]	<220>
[1138]	<223> 合成构建体
[1139]	<400> 86
[1140]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1141]	1 5 10 15
[1142]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
[1143]	20 25 30
[1144]	Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
[1145]	35 40 45
[1146]	Gly Trp Ile Ser Pro Ser Gly Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
[1147]	50 55 60
[1148]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[1149]	65 70 75 80
[1150]	Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1151]	85 90 95
[1152]	Ala Arg Gly Ala Tyr Glu Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
[1153]	100 105 110
[1154]	Thr Val Ser Ser
[1155]	115
[1156]	<210> 87
[1157]	<211> 116
[1158]	<212> PRT
[1159]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1160]	<220>
[1161]	<223> 合成构建体
[1162]	<400> 87
[1163]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1164]	1 5 10 15
[1165]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Ile Ser Ser Gly
[1166]	20 25 30
[1167]	Tyr His Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
[1168]	35 40 45
[1169]	Leu Ala Arg Ile Asp Trp Asp Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Thr Ser Leu

[1170]	50	55	60
[1171]	Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[1172]	65	70	75
[1173]	Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		80
[1174]	85	90	95
[1175]	Ala Arg Ser Tyr Val Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val		
[1176]	100	105	110
[1177]	Thr Val Ser Ser		
[1178]	115		
[1179]	<210> 88		
[1180]	<211> 120		
[1181]	<212> PRT		
[1182]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[1183]	<220>		
[1184]	<223> 合成构建体		
[1185]	<400> 88		
[1186]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
[1187]	1	5	10
[1188]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Gly		15
[1189]	20	25	30
[1190]	Gly Val Ala Val Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu		
[1191]	35	40	45
[1192]	Trp Ile Gly Glu Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Pro Ser		
[1193]	50	55	60
[1194]	Leu Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu		
[1195]	65	70	75
[1196]	Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr		80
[1197]	85	90	95
[1198]	Cys Ala Arg Arg Ile Ala Thr Ala Thr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln		
[1199]	100	105	110
[1200]	Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser		
[1201]	115	120	
[1202]	<210> 89		
[1203]	<211> 121		
[1204]	<212> PRT		
[1205]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[1206]	<220>		
[1207]	<223> 合成构建体		
[1208]	<400> 89		

[1209]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1210]	1 5 10 15
[1211]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Gly
[1212]	20 25 30
[1213]	Gly Val Ala Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
[1214]	35 40 45
[1215]	Trp Val Ser Ala Ile Ser Gly Tyr Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp
[1216]	50 55 60
[1217]	Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
[1218]	65 70 75 80
[1219]	Leu Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr
[1220]	85 90 95
[1221]	Tyr Cys Ala Arg Leu Pro Tyr Ser Ala Tyr Ala Phe Asp Tyr Trp Gly
[1222]	100 105 110
[1223]	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[1224]	115 120
[1225]	<210> 90
[1226]	<211> 114
[1227]	<212> PRT
[1228]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1229]	<220>
[1230]	<223> 合成构建体
[1231]	<400> 90
[1232]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1233]	1 5 10 15
[1234]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
[1235]	20 25 30
[1236]	Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
[1237]	35 40 45
[1238]	Gly Ile Ile Ser Pro Ser Gly Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
[1239]	50 55 60
[1240]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[1241]	65 70 75 80
[1242]	Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1243]	85 90 95
[1244]	Ala Arg His Pro Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
[1245]	100 105 110
[1246]	Ser Ser
[1247]	<210> 91

[1248]	<211>	115
[1249]	<212>	PRT
[1250]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1251]	<220>	
[1252]	<223>	合成构建体
[1253]	<400>	91
[1254]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
[1255]	1 5 10 15	
[1256]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Gly Tyr	
[1257]	20 25 30	
[1258]	Gly Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile	
[1259]	35 40 45	
[1260]	Gly Glu Ile Tyr His Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Pro Ser Leu Lys	
[1261]	50 55 60	
[1262]	Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu	
[1263]	65 70 75 80	
[1264]	Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala	
[1265]	85 90 95	
[1266]	Arg Arg Ile Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr	
[1267]	100 105 110	
[1268]	Val Ser Ser	
[1269]	115	
[1270]	<210>	92
[1271]	<211>	115
[1272]	<212>	PRT
[1273]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1274]	<220>	
[1275]	<223>	合成构建体
[1276]	<400>	92
[1277]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly	
[1278]	1 5 10 15	
[1279]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Gly Tyr	
[1280]	20 25 30	
[1281]	Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile	
[1282]	35 40 45	
[1283]	Gly Ile Ile Ser Pro Ser Gly Gly Gly Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe	
[1284]	50 55 60	
[1285]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr	
[1286]	65 70 75 80	

[1287]	Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1288]	85 90 95
[1289]	Ala Arg Leu Tyr Asp Val Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
[1290]	100 105 110
[1291]	Val Ser Ser
[1292]	115
[1293]	<210> 93
[1294]	<211> 117
[1295]	<212> PRT
[1296]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1297]	<220>
[1298]	<223> 合成构建体
[1299]	<400> 93
[1300]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1301]	1 5 10 15
[1302]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
[1303]	20 25 30
[1304]	Ala Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
[1305]	35 40 45
[1306]	Gly Ile Ile Ser Pro Ser Gly Gly Ser Thr Lys Tyr Ala Gln Lys Phe
[1307]	50 55 60
[1308]	Gln Gly Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[1309]	65 70 75 80
[1310]	Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[1311]	85 90 95
[1312]	Ala Arg Leu Gly Tyr Gly Tyr Phe Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu
[1313]	100 105 110
[1314]	Val Thr Val Ser Ser
[1315]	115
[1316]	<210> 94
[1317]	<211> 118
[1318]	<212> PRT
[1319]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1320]	<220>
[1321]	<223> 合成构建体
[1322]	<400> 94
[1323]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[1324]	1 5 10 15
[1325]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Ile Thr Ser Gly

[1326]	20	25	30
[1327]	His Tyr Trp Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp		
[1328]	35	40	45
[1329]	Ile Gly Asp Ile Ser His Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Ser Gln Ser Leu		
[1330]	50	55	60
[1331]	Lys Ser Arg Val Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr		
[1332]	65	70	75
[1333]	Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[1334]	85	90	95
[1335]	Ala Arg Gly Ser Arg Thr Gly Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr		
[1336]	100	105	110
[1337]	Leu Val Thr Val Ser Ser		
[1338]	115		
[1339]	<210> 95		
[1340]	<211> 114		
[1341]	<212> PRT		
[1342]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[1343]	<220>		
[1344]	<223> 合成构建体		
[1345]	<400> 95		
[1346]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
[1347]	1	5	10
[1348]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Phe Phe		
[1349]	20	25	30
[1350]	Gly Ile Ser Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro		
[1351]	35	40	45
[1352]	Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ser		
[1353]	50	55	60
[1354]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser		
[1355]	65	70	75
[1356]	Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Thr		
[1357]	85	90	95
[1358]	Ser Ser Pro Pro Val Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile		
[1359]	100	105	110
[1360]	Lys Arg		
[1361]	<210> 96		
[1362]	<211> 107		
[1363]	<212> PRT		
[1364]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		

[1365]	<220>
[1366]	<223> 合成构建体
[1367]	<400> 96
[1368]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[1369]	1 5 10 15
[1370]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Val
[1371]	20 25 30
[1372]	Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
[1373]	35 40 45
[1374]	Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
[1375]	50 55 60
[1376]	Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
[1377]	65 70 75 80
[1378]	Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Gly Leu Gln Thr Pro Trp Thr
[1379]	85 90 95
[1380]	Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
[1381]	100 105
[1382]	<210> 97
[1383]	<211> 109
[1384]	<212> PRT
[1385]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1386]	<220>
[1387]	<223> 合成构建体
[1388]	<400> 97
[1389]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[1390]	1 5 10 15
[1391]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Ile Gly Ser Ser
[1392]	20 25 30
[1393]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[1394]	35 40 45
[1395]	Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[1396]	50 55 60
[1397]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[1398]	65 70 75 80
[1399]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Gln Trp Pro Pro
[1400]	85 90 95
[1401]	Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
[1402]	100 105
[1403]	<210> 98

[1404]	<211> 112
[1405]	<212> PRT
[1406]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1407]	<220>
[1408]	<223> 合成构建体
[1409]	<400> 98
[1410]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[1411]	1 5 10 15
[1412]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Phe Phe
[1413]	20 25 30
[1414]	Gly Lys Ser Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
[1415]	35 40 45
[1416]	Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser
[1417]	50 55 60
[1418]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
[1419]	65 70 75 80
[1420]	Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr
[1421]	85 90 95
[1422]	Ser Trp Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
[1423]	100 105 110
[1424]	<210> 99
[1425]	<211> 109
[1426]	<212> PRT
[1427]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1428]	<220>
[1429]	<223> 合成构建体
[1430]	<400> 99
[1431]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[1432]	1 5 10 15
[1433]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Arg
[1434]	20 25 30
[1435]	Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
[1436]	35 40 45
[1437]	Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser
[1438]	50 55 60
[1439]	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
[1440]	65 70 75 80
[1441]	Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Pro Thr Pro
[1442]	85 90 95

[1443]	Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
[1444]	100 105
[1445]	<210> 100
[1446]	<211> 109
[1447]	<212> PRT
[1448]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1449]	<220>
[1450]	<223> 合成构建体
[1451]	<400> 100
[1452]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[1453]	1 5 10 15
[1454]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Arg Gly Arg
[1455]	20 25 30
[1456]	Phe Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
[1457]	35 40 45
[1458]	Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser
[1459]	50 55 60
[1460]	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln
[1461]	65 70 75 80
[1462]	Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Ser Ser Trp Pro
[1463]	85 90 95
[1464]	Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
[1465]	100 105
[1466]	<210> 101
[1467]	<211> 110
[1468]	<212> PRT
[1469]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1470]	<220>
[1471]	<223> 合成构建体
[1472]	<400> 101
[1473]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[1474]	1 5 10 15
[1475]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Thr Val Phe Ser Arg
[1476]	20 25 30
[1477]	Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu
[1478]	35 40 45
[1479]	Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser
[1480]	50 55 60
[1481]	Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln

[1482]	65	70	75	80
[1483]	Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Tyr Trp Pro			
[1484]		85	90	95
[1485]	Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg			
[1486]		100	105	110
[1487]	<210> 102			
[1488]	<211> 108			
[1489]	<212> PRT			
[1490]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[1491]	<220>			
[1492]	<223> 合成构建体			
[1493]	<400> 102			
[1494]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
[1495]	1	5	10	15
[1496]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Gly Val Ser Ser Tyr			
[1497]		20	25	30
[1498]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile			
[1499]		35	40	45
[1500]	Tyr Ala Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly			
[1501]	50	55	60	
[1502]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro			
[1503]	65	70	75	80
[1504]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Leu			
[1505]		85	90	95
[1506]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg			
[1507]		100	105	
[1508]	<210> 103			
[1509]	<211> 114			
[1510]	<212> PRT			
[1511]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[1512]	<220>			
[1513]	<223> 合成构建体			
[1514]	<400> 103			
[1515]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly			
[1516]	1	5	10	15
[1517]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Tyr			
[1518]		20	25	30
[1519]	Gly Ile Ser Phe Leu Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro			
[1520]		35	40	45

[1521]	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Ala	Ser	Asn	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Ser
[1522]	50						55					60				
[1523]	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
[1524]	65					70				75					80	
[1525]	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Tyr	Val
[1526]					85					90					95	
[1527]	Ser	Ser	Pro	Pro	Glu	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile
[1528]				100					105					110		
[1529]	Lys	Arg														
[1530]	<210>	104														
[1531]	<211>	112														
[1532]	<212>	PRT														
[1533]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)														
[1534]	<220>															
[1535]	<223>	合成构建体														
[1536]	<400>	104														
[1537]	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
[1538]	1			5					10					15		
[1539]	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	Phe	Asp
[1540]			20					25					30			
[1541]	Gly	Phe	Ser	Phe	Leu	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro
[1542]			35				40					45				
[1543]	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Asp	Ala	Ser	Ser	Leu	Glu	Ser	Gly	Val	Pro	Ser
[1544]	50					55					60					
[1545]	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser
[1546]	65					70				75					80	
[1547]	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Arg	Asp
[1548]					85					90					95	
[1549]	Ser	Trp	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg
[1550]				100					105					110		
[1551]	<210>	105														
[1552]	<211>	112														
[1553]	<212>	PRT														
[1554]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)														
[1555]	<220>															
[1556]	<223>	合成构建体														
[1557]	<400>	105														
[1558]	Asp	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
[1559]	1			5					10					15		

[1560]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe His
[1561]	20 25 30
[1562]	Gly Lys Ser Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
[1563]	35 40 45
[1564]	Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
[1565]	50 55 60
[1566]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
[1567]	65 70 75 80
[1568]	Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Glu Gln Ser Leu
[1569]	85 90 95
[1570]	Glu Val Pro Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
[1571]	100 105 110
[1572]	<210> 106
[1573]	<211> 112
[1574]	<212> PRT
[1575]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1576]	<220>
[1577]	<223> 合成构建体
[1578]	<400> 106
[1579]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[1580]	1 5 10 15
[1581]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Tyr
[1582]	20 25 30
[1583]	Gly Ile Ser Phe Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
[1584]	35 40 45
[1585]	Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
[1586]	50 55 60
[1587]	Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
[1588]	65 70 75 80
[1589]	Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Ala Leu
[1590]	85 90 95
[1591]	Gln Leu Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
[1592]	100 105 110
[1593]	<210> 107
[1594]	<211> 108
[1595]	<212> PRT
[1596]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1597]	<220>
[1598]	<223> 合成构建体

[1599]	<400> 107
[1600]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
[1601]	1 5 10 15
[1602]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
[1603]	20 25 30
[1604]	Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
[1605]	35 40 45
[1606]	Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
[1607]	50 55 60
[1608]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
[1609]	65 70 75 80
[1610]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Leu
[1611]	85 90 95
[1612]	Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
[1613]	100 105
[1614]	<210> 108
[1615]	<211> 372
[1616]	<212> DNA
[1617]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1618]	<220>
[1619]	<223> 合成构建体
[1620]	<400> 108
[1621]	gaggttcagc tgggtggagtc tggcgggtggc ctggtgcagc cagggggctc actccgtttg 60
[1622]	tcctgtgcag cttccggatt caccttctcc gactacgcta ttactgggt gcgtcaggcc 120
[1623]	ccgggtaagg gactcgagtg gatcggtatc atctcccat ctagcggttc tactaactac 180
[1624]	gcccagaagt tccagggtcg tgtgactata agtcgcgaca attcgaaaaa cacactgtac 240
[1625]	ctacaactga acagcttaag agctgaggac actgccgtct attattgcgc cagagacatt 300
[1626]	cactctgggt cttctggtta ctactacggt ttcgacgtct ggggtcaagg aacactagtc 360
[1627]	accgtctcct cg 372
[1628]	<210> 109
[1629]	<211> 354
[1630]	<212> DNA
[1631]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1632]	<220>
[1633]	<223> 合成构建体
[1634]	<400> 109
[1635]	gaggttcagc tgggtggagtc tggcgggtggc ctggtgcagc cagggggctc actccgtttg 60
[1636]	tcctgtgcag cttccggata ctctatcacc tctggttact actgggcctg gattcgtcag 120
[1637]	gccccgggta agggcctcga gtgggtgtct tccatctctg gttccggttc tactacctac 180

[1638]	tacgccgact ctgtcaaggg ccgtttcact ataagtcgcg acaattcgaa aaacacactg	240
[1639]	tacctacaac tgaacagctt aagagctgag gacactgccg tctattattg cgccagagat	300
[1640]	ggtttcggct acttcgacta ctgggggtcaa ggaacactag tcaccgtctc ctcg	354
[1641]	<210>	110
[1642]	<211>	369
[1643]	<212>	DNA
[1644]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1645]	<220>	
[1646]	<223>	合成构建体
[1647]	<400>	110
[1648]	gaggttcagc tgggtggagtc tggcgggtggc ctggtgcagc cagggggctc actccgtttg	60
[1649]	tcctgtgcag cttccggatt caccttctcc gactacggta ttcactgggt gcgtcaggcc	120
[1650]	ccgggtaagg gcctcgagtg gatcggtgaa atctaccact ctggttctac ctactactct	180
[1651]	ccatctctga agtctcgtgt gactataagt cgcgacaatt cgaaaaacac actgtacct	240
[1652]	caactgaaca gcttaagagc tgaggacact gccgtctatt attgcgccag agacgttgcc	300
[1653]	cctggttctt ctggttacta cgacggtttc gacttctggg gtcaaggaac actagtcacc	360
[1654]	gtctcctcg	369
[1655]	<210>	111
[1656]	<211>	363
[1657]	<212>	DNA
[1658]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1659]	<220>	
[1660]	<223>	合成构建体
[1661]	<400>	111
[1662]	gaggttcagc tgggtggagtc tggcgggtggc ctggtgcagc cagggggctc actccgtttg	60
[1663]	tcctgtgcag cttccggata ctctatctcc tctggttacc actgggactg gattcgtcag	120
[1664]	gccccgggta agggcctcga gtgggtgtct ggtatctctg gttacggtgg ttctacctac	180
[1665]	tacgccgact ctgtcaaggg ccgtttcact ataagtcgcg acaattcgaa aaacacactg	240
[1666]	tacctacaac tgaacagctt aagagctgag gacactgccg tctattattg cgccagacac	300
[1667]	agttattacg gttccggtaa tttegactac tgggggtcaag gaacactagt caccgtctcc	360
[1668]	tcg	363
[1669]	<210>	112
[1670]	<211>	348
[1671]	<212>	DNA
[1672]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1673]	<220>	
[1674]	<223>	合成构建体
[1675]	<400>	112
[1676]	gaggttcagc tgggtggagtc tggcgggtggc ctggtgcagc cagggggctc actccgtttg	60

[1677] tcctgtgcag cttccggatt caccttctcc gactactgga ttcactgggt gcgtcaggcc 120
 [1678] ccgggtaagg gcctcgagtg gatcggttgg atctcccat ctggcgggtg tactaagtac 180
 [1679] gcccagaagt tccagggtcg tgtgactata agtcgcgaca attcgaaaaa cacactgtac 240
 [1680] ctacaactga acagcttaag agctgaggac actgccgtct attattgcgc cagaggggct 300
 [1681] tacgaatttg actactgggg tcaaggaaca ctagtcaccg tctcctcg 348
 [1682] <210> 113
 [1683] <211> 348
 [1684] <212> DNA
 [1685] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [1686] <220>
 [1687] <223> 合成构建体
 [1688] <400> 113
 [1689] gaggttcagc tgggtggagtc tggcgggtggc ctggtgcagc cagggggctc actccgtttg 60
 [1690] tcctgtgcag cttccggata ctctatctcc tctggttacc actggagctg gattcgtcag 120
 [1691] gccccgggta agggcctcga gtggctggcc cggatcgact gggacgatga caagtactac 180
 [1692] tctacctctc tgaagtctcg tctgactata agtcgcgaca attcgaaaaa cacactgtac 240
 [1693] ctacaactga acagcttaag agctgaggac actgccgtct attattgcgc cagatcgtac 300
 [1694] gtgtacttcg actactgggg tcaaggaaca ctagtcaccg tctcctcg 348
 [1695] <210> 114
 [1696] <211> 360
 [1697] <212> DNA
 [1698] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [1699] <220>
 [1700] <223> 合成构建体
 [1701] <400> 114
 [1702] gaggttcagc tgggtggagtc tggcgggtggc ctggtgcagc cagggggctc actccgtttg 60
 [1703] tcctgtgcag cttccggatt ctctctgtct accggcgggtg tggctgtgag ctggattcgt 120
 [1704] caggccccgg gtaaggcct cgagtggatc ggtgaaatct accactctgg ttctacctac 180
 [1705] tactctccat ctctgaagtc tcgtgtgact ataagtcgcg acaattcgaa aaacacactg 240
 [1706] tacctacaac tgaacagctt aagagctgag gacactgccg tctattattg cgcccgtcgt 300
 [1707] atgccaccg ctacttactt cgactactgg ggtcaaggaa cactagtcac cgtctcctcg 360
 [1708] <210> 115
 [1709] <211> 363
 [1710] <212> DNA
 [1711] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [1712] <220>
 [1713] <223> 合成构建体
 [1714] <400> 115
 [1715] gaggttcagc tgggtggagtc tggcgggtggc ctggtgcagc cagggggctc actccgtttg 60

[1716]	tcctgtgcag cttccggatt ctctctgtct accggcggtg tggctgtggg ctggattcgt	120
[1717]	caggccccgg gtaagggcct cgagtgggtg tctgctatct ctggttacgg ttctactacc	180
[1718]	tactacgccg actctgtcaa gggccgtttc actataagtc gcgacaattc gaaaaacaca	240
[1719]	ctgtacctac aactgaacag ctttaagagct gaggacactg ccgtctatta ttgcgccaga	300
[1720]	ttgccatact ccgcctacgc ttctgactac tggggtaag gaacactagt caccgtctcc	360
[1721]	tcg	363
[1722]	<210>	116
[1723]	<211>	342
[1724]	<212>	DNA
[1725]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1726]	<220>	
[1727]	<223>	合成构建体
[1728]	<400>	116
[1729]	gaggttcagc tgggtggagtc tggcggtggc ctggtgcagc cagggggctc actccgtttg	60
[1730]	tcctgtgcag cttccggatt caccttctcc ggctacgcta ttcactgggt gcgtcaggcc	120
[1731]	ccgggtaagg gcctcgagtg gatcggtatc atctcccat ctggcggtgg tactaagtac	180
[1732]	gccagaagt tccagggtcg tgtgactata agtcgcgaca attcgaaaaa cacactgtac	240
[1733]	ctacaactga acagcttaag agctgaggac actgccgtct attattgcgc cagacacca	300
[1734]	ttcgctact ggggtcaagg aacactagtc accgtctcct cg	342
[1735]	<210>	117
[1736]	<211>	345
[1737]	<212>	DNA
[1738]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1739]	<220>	
[1740]	<223>	合成构建体
[1741]	<400>	117
[1742]	gaggttcagc tgggtggagtc tggcggtggc ctggtgcagc cagggggctc actccgtttg	60
[1743]	tcctgtgcag cttccggata caccttctcc ggctacgcta ttcactgggt gcgtcaggcc	120
[1744]	ccgggtaagg gcctcgagtg gatcggtgaa atctaccact ctggttctac ctactactct	180
[1745]	ccatctctga agtctcgtgt gactataagt cgcgacaatt cgaaaaacac actgtacct	240
[1746]	caactgaaca gcttaagagc tgaggacact gccgtctatt attgcgccag aagaattgac	300
[1747]	gccttcgaca tctggggta aggaacacta gtcaccgtct cctcg	345
[1748]	<210>	118
[1749]	<211>	345
[1750]	<212>	DNA
[1751]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[1752]	<220>	
[1753]	<223>	合成构建体
[1754]	<400>	118

[1755]	gaggttcagc tgggtggagtc tggcggtggc ctggtgcagc cagggggctc actccgtttg 60
[1756]	tcctgtgcag cttccggata caccttctcc ggctacgcta ttcactgggt gcgtcaggcc 120
[1757]	ccgggtaagg gcctcgagtg gatcggtatc atctcccat ctggcggttg tactaagtac 180
[1758]	gcccagaagt tccagggtcg tgtgactata agtcgcgaca attcgaaaaa cacactgtac 240
[1759]	ctacaactga acagcttaag agctgaggac actgccgtct attattgcgc cagactctat 300
[1760]	gacgttgccct actgggggtca aggaacacta gtcaccgtct cctcg 345
[1761]	<210> 119
[1762]	<211> 351
[1763]	<212> DNA
[1764]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1765]	<220>
[1766]	<223> 合成构建体
[1767]	<400> 119
[1768]	gaggttcagc tgggtggagtc tggcggtggc ctggtgcagc cagggggctc actccgtttg 60
[1769]	tcctgtgcag cttccggatt caccttctcc gactacgcta ttcactgggt gcgtcaggcc 120
[1770]	ccgggtaagg gcctcgagtg gatcggtatc atctcccat ctggcggttc tactaagtac 180
[1771]	gcccagaagt tccagggtcg tgtgactata agtcgcgaca attcgaaaaa cacactgtac 240
[1772]	ctacaactga acagcttaag agctgaggac actgccgtct attattgcgc cagactcggt 300
[1773]	tacgggtact tcgacgtctg gggtaagga aactagtca ccgtctctc g 351
[1774]	<210> 120
[1775]	<211> 354
[1776]	<212> DNA
[1777]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1778]	<220>
[1779]	<223> 合成构建体
[1780]	<400> 120
[1781]	gaggttcagc tgggtggagtc tggcggtggc ctggtgcagc cagggggctc actccgtttg 60
[1782]	tcctgtgcag cttccggata ctctatcacc tctgggtact actggagctg gattcgtcag 120
[1783]	gccccgggta agggcctcga gtggatcggg gacatctccc actctggttc tacctactac 180
[1784]	tctcaatctc tgaagtctcg tgtgactata agtcgcgaca attcgaaaaa cacactgtac 240
[1785]	ctacaactga acagcttaag agctgaggac actgccgtct attattgcgc gcgtggtagt 300
[1786]	aggaccggct acttcgacta ttgggggtcaa ggaacactag tcaccgtctc ctcg 354
[1787]	<210> 121
[1788]	<211> 342
[1789]	<212> DNA
[1790]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1791]	<220>
[1792]	<223> 合成构建体
[1793]	<400> 121

[1794]	gatatccagt tgacccagtc cccgagttcc ctgtccgcct ctgtgggcga tcgggtcacc 60
[1795]	atcacctgcc gtgcctctga gtctgtggac ttcttcggta tctctttcct gccctggat 120
[1796]	caacagaaac caggaaaagc tccgaagctt ctgatctacg acgcctctaa ccgtgccacc 180
[1797]	ggtatcccat ctgccttctc tggatccggt tccgggacgg atttcactct gaccatcagc 240
[1798]	agtctgcagc cggaagactt cgcaacttat tactgccagc actacacctc ttcgccacca 300
[1799]	gtgtacacct tcggacaggg taccaaggtg gagatcaaac ga 342
[1800]	<210> 122
[1801]	<211> 321
[1802]	<212> DNA
[1803]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1804]	<220>
[1805]	<223> 合成构建体
[1806]	<400> 122
[1807]	gatatccagt tgacccagtc cccgagttcc ctgtccgcct ctgtgggcga tcgggtcacc 60
[1808]	atcacctgct ctgcctcttc tagcgtgagc tacgtgtact ggtatcaaca gaaaccagga 120
[1809]	aaagctccga agcttctgat ctacgacgcc tcttctctgg aatctggtgt gccatctcgc 180
[1810]	ttctctggat ccggttccgg gacggatttc actctgacca tcagcagtct gcagccggaa 240
[1811]	gacttcgcaa cttattactg cgtgcagggt cttcagacct cttggacctt cggacagggt 300
[1812]	accaaggtgg agatcaaacg a 321
[1813]	<210> 123
[1814]	<211> 327
[1815]	<212> DNA
[1816]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1817]	<220>
[1818]	<223> 合成构建体
[1819]	<400> 123
[1820]	gatatccagt tgacccagtc cccgagttcc ctgtccgcct ctgtgggcga tcgggtcacc 60
[1821]	atcacctgcc gtgcctctca gggatttggc tcttccttgg cttggtatca acagaaacca 120
[1822]	ggaaaagctc cgaagcttct gatctacgac gcctctaacc gtgccaccgg tatcccatct 180
[1823]	cgcttctctg gatccggttc cgggacggat ttcactctga ccatcagcag tctgcagccg 240
[1824]	gaagacttcg caacttatta ctgccagcag tacgaccaat ggccaccttg gaccttcgga 300
[1825]	cagggtacca aggtggagat caaacga 327
[1826]	<210> 124
[1827]	<211> 336
[1828]	<212> DNA
[1829]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1830]	<220>
[1831]	<223> 合成构建体
[1832]	<400> 124

[1833]	gatatccagt tgacccagtc cccgagttcc ctgtccgcct ctgtgggcga tcgggtcacc 60
[1834]	atcacctgcc gtgcctctga gtctgtggac ttcttcggta agtctttcct gcactggtat 120
[1835]	caacagaaac caggaaaagc tccgaagctt ctgatctacg acgcctctaa cctggaaacc 180
[1836]	ggtgtgccat ctgccttctc tggatccggt tccgggacgg atttcactct gaccatcagc 240
[1837]	agtctgcagc cggaagactt cgcaacttat tactgccagc agtcctactc ctggcctccg 300
[1838]	accttcggac aggttaccaa ggtggagatc aaacga 336
[1839]	<210> 125
[1840]	<211> 327
[1841]	<212> DNA
[1842]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1843]	<220>
[1844]	<223> 合成构建体
[1845]	<400> 125
[1846]	gatatccagt tgacccagtc cccgagttcc ctgtccgcct ctgtgggcga tcgggtcacc 60
[1847]	atcacctgcc gtgcctctca gtctgtgagc agccgtttcc tggcctggta tcaacagaaa 120
[1848]	ccaggaaaag ctccgaagct tctgatctac gacgcctcta accgtgccac cggatatcca 180
[1849]	tctcgcttct ctggatccgg ttccgggacg gatttcactc tgaccatcag cagtctgcag 240
[1850]	ccggaagact tcgcaactta ttactgccag cagtcctacc ccacccctct taccttcgga 300
[1851]	cagggtacca aggtggagat caaacga 327
[1852]	<210> 126
[1853]	<211> 327
[1854]	<212> DNA
[1855]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1856]	<220>
[1857]	<223> 合成构建体
[1858]	<400> 126
[1859]	gatatccagt tgacccagtc cccgagttcc ctgtccgcct ctgtgggcga tcgggtcacc 60
[1860]	atcacctgcc gtgcctctca gtctgtgcgc ggccgtttcc tggcctggta tcaacagaaa 120
[1861]	ccaggaaaag ctccgaagct tctgatctac gacgcctcta accgtgccac cggatatcca 180
[1862]	tctcgcttct ctggatccgg ttccgggacg gatttcactc tgaccatcag cagtctgcag 240
[1863]	ccggaagact tcgcaactta ttactgccag cagtcctcct cctggcctcc gaccttcgga 300
[1864]	cagggtacca aggtggagat caaacga 327
[1865]	<210> 127
[1866]	<211> 330
[1867]	<212> DNA
[1868]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1869]	<220>
[1870]	<223> 合成构建体
[1871]	<400> 127

[1872]	gatatccagt tgacccagtc cccgagttcc ctgtccgcct ctgtgggcga tcgggtcacc 60
[1873]	atcacctgcc gtgcctctca gaccgtgttc tctcgttacc tggcttggtat tcaacagaaa 120
[1874]	ccaggaaaag ctccgaagct tctgatctac gacgcctcta accgtgccac cggatatccca 180
[1875]	tctcgcttct ctggatccgg ttccgggacg gatttcactc tgaccatcag cagtctgcag 240
[1876]	ccggaagact tcgcaactta ttactgccag cagtcctact actggccacc ttggaccttc 300
[1877]	ggacagggtta ccaaggtgga gatcaaacga 330
[1878]	<210> 128
[1879]	<211> 324
[1880]	<212> DNA
[1881]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1882]	<220>
[1883]	<223> 合成构建体
[1884]	<400> 128
[1885]	gatatccagt tgacccagtc cccgagttcc ctgtccgcct ctgtgggcga tcgggtcacc 60
[1886]	atcacctgcc gtgcctctca ggggtgtgtct tcttacctgg cctggtatca acagaaacca 120
[1887]	ggaaaagctc cgaagcttct gatctacgcc gcctctacct tgcagtctgg tgtgccatct 180
[1888]	cgcttctctg gatccggttc cgggacggat ttactctga ccatcagcag tctgcagccg 240
[1889]	gaagacttcg caacttacta ctgccagcac cactacggca cccactgac cttcggtcag 300
[1890]	ggtaccaagg tggagatcaa acga 324
[1891]	<210> 129
[1892]	<211> 342
[1893]	<212> DNA
[1894]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1895]	<220>
[1896]	<223> 合成构建体
[1897]	<400> 129
[1898]	gatatccagt tgacccagtc cccgagttcc ctgtccgcct ctgtgggcga tcgggtcacc 60
[1899]	atcacctgcc gtgcctctca gtctgtggac ttctacggta tctctttcct ggactgggtat 120
[1900]	caacagaaac caggaaaagc tccgaagctt ctgatctacg acgcctctaa ccggtgccacc 180
[1901]	ggtatcccat ctgccttctc tggatccggg tccgggacgg atttcactct gaccatcagc 240
[1902]	agtctgcagc cggaagactt cgcaacttat tactgccagc agtacgtctc ttgccacca 300
[1903]	gagtacacct tcggacaggg taccaagggt gagatcaaac ga 342
[1904]	<210> 130
[1905]	<211> 336
[1906]	<212> DNA
[1907]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1908]	<220>
[1909]	<223> 合成构建体
[1910]	<400> 130

[1911]	gatatccagt tgacccagtc cccgagttcc ctgtccgcct ctgtgggcga tcgggtcacc 60
[1912]	atcacctgcc gtgcctctca gtctgtggac ttccacgggt tctctttcct gcactggtat 120
[1913]	caacagaaac caggaagaagc tccgaagctt ctgatctacg acgcctcttc tctggaatct 180
[1914]	ggtgtgccat ctgccttctc tggatccggt tccgggacgg atttcactct gaccatcagc 240
[1915]	agtctgcagc cggaagactt cgcaacttat tactgccagc agcgtgactc ctggccttac 300
[1916]	accttcggac agggtaccaa ggtggagatc aaacga 336
[1917]	<210> 131
[1918]	<211> 336
[1919]	<212> DNA
[1920]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1921]	<220>
[1922]	<223> 合成构建体
[1923]	<400> 131
[1924]	gatatccagt tgacccagtc cccgagttcc ctgtccgcct ctgtgggcga tcgggtcacc 60
[1925]	atcacctgcc gtgcctctca gtctgtggac ttccacggta agtctttcct gcactggtat 120
[1926]	caacagaaac caggaagaagc tccgaagctt ctgatctacg acgcctcttc tctggaatct 180
[1927]	ggtgtgccat ctgccttctc tggatccggt tccgggacgg atttcactct gaccatcagc 240
[1928]	agtctgcagc cggaagactt cgcaacttat tactgcgagc aatccctgga agtcccattc 300
[1929]	accttcggac agggtaccaa ggtggagatc aaacga 336
[1930]	<210> 132
[1931]	<211> 336
[1932]	<212> DNA
[1933]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1934]	<220>
[1935]	<223> 合成构建体
[1936]	<400> 132
[1937]	gatatccagt tgacccagtc cccgagttcc ctgtccgcct ctgtgggcga tcgggtcacc 60
[1938]	atcacctgcc gtgcctctca gtctgtggac ttctacggta tctctttcct gcactggtat 120
[1939]	caacagaaac caggaagaagc tccgaagctt ctgatctacg acgcctcttc tctggaatct 180
[1940]	ggtgtgccat ctgccttctc tggatccggt tccgggacgg atttcactct gaccatcagc 240
[1941]	agtctgcagc cggaagactt cgcaacttat tactgcgtgc aggtctcttca gttgcctctt 300
[1942]	accttcggac agggtaccaa ggtggagatc aaacga 336
[1943]	<210> 133
[1944]	<211> 324
[1945]	<212> DNA
[1946]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[1947]	<220>
[1948]	<223> 合成构建体
[1949]	<400> 133

- [1950] gatatccagt tgacccagtc cccgagttcc ctgtccgcct ctgtgggcga tcgggtcacc 60
- [1951] atcacctgcc gtgcctctca gtctatctct tcttacctga actggtatca acagaaacca 120
- [1952] ggaaaagctc cgaagcttct gatctacgac gcctctaacc tggaaccgg tgtgccatct 180
- [1953] cgcttctctg gatccggttc cgggacggat ttcactctga ccatcagcag tctgcagccg 240
- [1954] gaagacttcg caacttacta ctgccagcac cactacggca cccactgac cttcggtcag 300
- [1955] ggtaccaagg tggagatcaa acga 324
- [1956] <210> 134
- [1957] <211> 5
- [1958] <212> PRT
- [1959] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1960] <220>
- [1961] <223> 合成构建体
- [1962] <220>
- [1963] <221> 变体
- [1964] <222> 1
- [1965] <223> 以重复至少两次并且直至十次存在
- [1966] <220>
- [1967] <221> 变体
- [1968] <222> 3
- [1969] <223> 以重复至少三次并且直至十次存在
- [1970] <220>
- [1971] <221> 变体
- [1972] <222> 1, 3
- [1973] <223> Xaa = Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr
- [1974] <220>
- [1975] <221> 变体
- [1976] <222> 5
- [1977] <223> 以重复至少一次并且直至十次存在
- [1978] <220>
- [1979] <221> 变体
- [1980] <222> 5
- [1981] <223> Xaa = Asp、Ala、Tyr、Ser、Thr、Asn、Ile、Leu、Phe、Val、His或Pro
- [1982] <400> 134
- [1983] Xaa Cys Xaa Cys Xaa
- [1984] 1 5
- [1985] <210> 135
- [1986] <211> 5
- [1987] <212> PRT

- [1988] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [1989] <220>
- [1990] <223> 合成构建体
- [1991] <220>
- [1992] <221> 变体
- [1993] <222> 1
- [1994] <223> 以重复至少两次并且直至十次存在
- [1995] <220>
- [1996] <221> 变体
- [1997] <222> 3
- [1998] <223> 以重复至少三次并且直至十次存在
- [1999] <220>
- [2000] <221> 变体
- [2001] <222> 5
- [2002] <223> 以重复至少一次并且直至十次存在
- [2003] <220>
- [2004] <221> 变体
- [2005] <222> 1, 3, 5
- [2006] <223> Xaa = Asp、Ala、Tyr、Ser、Thr、Asn、Ile、Leu、Phe、Val、His或Pro
- [2007] <400> 135
- [2008] Xaa Cys Xaa Cys Xaa
- [2009] 1 5
- [2010] <210> 136
- [2011] <211> 15
- [2012] <212> DNA
- [2013] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [2014] <220>
- [2015] <223> 合成构建体
- [2016] <220>
- [2017] <221> misc_feature
- [2018] <222> 1, 2, 3
- [2019] <223> 以重复至少两次并且直至十次存在
- [2020] <220>
- [2021] <221> misc_feature
- [2022] <222> 7, 8, 9
- [2023] <223> 以重复至少三次并且直至十次存在
- [2024] <220>
- [2025] <221> misc_feature
- [2026] <222> 13, 14, 15

- [2027] <223> 以重复至少一次并且直至十次存在
- [2028] <220>
- [2029] <221> misc_feature
- [2030] <222> 1, 2, 7, 8, 13
- [2031] <223> n = A、T、C或G
- [2032] <220>
- [2033] <221> misc_feature
- [2034] <222> 3, 9
- [2035] <223> n = T或G
- [2036] <220>
- [2037] <221> misc_feature
- [2038] <222> 6, 12
- [2039] <223> n = T或C
- [2040] <220>
- [2041] <221> misc_feature
- [2042] <222> 14
- [2043] <223> n = A、T或C
- [2044] <400> 136
- [2045] nnntggnnnnt gnnnc 15
- [2046] <210> 137
- [2047] <211> 16
- [2048] <212> PRT
- [2049] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [2050] <220>
- [2051] <223> 合成构建体
- [2052] <220>
- [2053] <221> 变体
- [2054] <222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 15, 16
- [2055] <223> Xaa = Asp、Ala、Tyr、Ser、Thr、Asn、Ile、Leu、Phe、Val、His或Pro
- [2056] <220>
- [2057] <221> 变体
- [2058] <222> 8, 9, 10, 11, 12, 13
- [2059] <223> Xaa = Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr
- [2060] <400> 137
- [2061] Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa
- [2062] 1 5 10 15
- [2063] <210> 138
- [2064] <211> 18

- [2065] <212> PRT
- [2066] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [2067] <220>
- [2068] <223> 合成构建体
- [2069] <220>
- [2070] <221> 变体
- [2071] <222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 17, 18
- [2072] <223> Xaa = Asp、Ala、Tyr、Ser、Thr、Asn、Ile、Leu、Phe、Val、His或Pro
- [2073] <220>
- [2074] <221> 变体
- [2075] <222> 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15
- [2076] <223> Xaa = Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr
- [2077] <400> 138
- [2078] Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
- [2079] 1 5 10 15
- [2080] Xaa Xaa
- [2081] <210> 139
- [2082] <211> 16
- [2083] <212> PRT
- [2084] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [2085] <220>
- [2086] <223> 合成构建体
- [2087] <220>
- [2088] <221> 变体
- [2089] <222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 15, 16
- [2090] <223> Xaa = Asp、Ala、Tyr、Ser、Thr、Asn、Ile、Leu、Phe、Val、His或Pro
- [2091] <400> 139
- [2092] Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa
- [2093] 1 5 10 15
- [2094] <210> 140
- [2095] <211> 18
- [2096] <212> PRT
- [2097] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [2098] <220>
- [2099] <223> 合成构建体
- [2100] <220>
- [2101] <221> 变体
- [2102] <222> 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18

[2103]	<223>	Xaa = Asp、Ala、Tyr、Ser、Thr、Asn、Ile、Leu、Phe、Val、His或Pro
[2104]	<400>	140
[2105]		Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys
[2106]		1 5 10 15
[2107]		Xaa Xaa
[2108]	<210>	141
[2109]	<211>	16
[2110]	<212>	PRT
[2111]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)
[2112]	<220>	
[2113]	<223>	合成构建体
[2114]	<400>	141
[2115]		Asn Phe Val Ala Asp Ser Cys Pro Asp His Pro Tyr Pro Cys Ser Ala
[2116]		1 5 10 15
[2117]	<210>	142
[2118]	<211>	16
[2119]	<212>	PRT
[2120]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)
[2121]	<220>	
[2122]	<223>	合成构建体
[2123]	<400>	142
[2124]		Ile Val His His Ser Asp Cys Asp Ala Phe Tyr Pro Tyr Cys Asp Ser
[2125]		1 5 10 15
[2126]	<210>	143
[2127]	<211>	16
[2128]	<212>	PRT
[2129]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)
[2130]	<220>	
[2131]	<223>	合成构建体
[2132]	<400>	143
[2133]		Tyr Ser Ala Tyr Pro Ala Cys Asp Ser His Tyr Pro Tyr Cys Asn Ser
[2134]		1 5 10 15
[2135]	<210>	144
[2136]	<211>	16
[2137]	<212>	PRT
[2138]	<213>	人工序列 (Artificial Sequence)
[2139]	<220>	
[2140]	<223>	合成构建体
[2141]	<400>	144

[2142]	Pro Asn Pro Ser Ser Asp Cys Val Pro Tyr Tyr Tyr Ala Cys Ala Tyr
[2143]	1 5 10 15
[2144]	<210> 145
[2145]	<211> 16
[2146]	<212> PRT
[2147]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2148]	<220>
[2149]	<223> 合成构建体
[2150]	<400> 145
[2151]	Tyr Ser Ala Tyr Pro Ala Cys Asp Ser His Tyr Pro Tyr Cys Gln Ser
[2152]	1 5 10 15
[2153]	<210> 146
[2154]	<211> 16
[2155]	<212> PRT
[2156]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2157]	<220>
[2158]	<223> 合成构建体
[2159]	<400> 146
[2160]	Pro Gln Pro Ser Ser Asp Cys Val Pro Tyr Tyr Tyr Ala Cys Ala Tyr
[2161]	1 5 10 15
[2162]	<210> 147
[2163]	<211> 16
[2164]	<212> PRT
[2165]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2166]	<220>
[2167]	<223> 合成构建体
[2168]	<400> 147
[2169]	Pro Asn Pro Ala Ser Asp Cys Val Pro Tyr Tyr Tyr Ala Cys Ala Tyr
[2170]	1 5 10 15
[2171]	<210> 148
[2172]	<211> 5
[2173]	<212> PRT
[2174]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2175]	<220>
[2176]	<223> 合成构建体
[2177]	<400> 148
[2178]	Glu Val Gly Ser Tyr
[2179]	1 5
[2180]	<210> 149

[2181]	<211> 5
[2182]	<212> PRT
[2183]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2184]	<220>
[2185]	<223> 合成构建体
[2186]	<400> 149
[2187]	Ser Gly Arg Ser Ala
[2188]	1 5
[2189]	<210> 150
[2190]	<211> 6
[2191]	<212> PRT
[2192]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2193]	<220>
[2194]	<223> 合成构建体
[2195]	<400> 150
[2196]	Pro Leu Gly Leu Ala Gly
[2197]	1 5
[2198]	<210> 151
[2199]	<211> 7
[2200]	<212> PRT
[2201]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2202]	<220>
[2203]	<223> 合成构建体
[2204]	<400> 151
[2205]	Glu Asn Leu Tyr Phe Gln Gly
[2206]	1 5
[2207]	<210> 152
[2208]	<211> 26
[2209]	<212> PRT
[2210]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2211]	<220>
[2212]	<223> 合成构建体
[2213]	<220>
[2214]	<221> 变体
[2215]	<222> 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21
[2216]	<223> Xaa = Asp、Ala、Tyr、Ser、Thr、Asn、Ile、Leu、Phe、Val、His或Pro
[2217]	<400> 152
[2218]	Glu Val Gly Ser Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa
[2219]	1 5 10 15

[2220]	Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Ser Gly Arg Ser Ala
[2221]	20 25
[2222]	<210> 153
[2223]	<211> 26
[2224]	<212> PRT
[2225]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2226]	<220>
[2227]	<223> 合成构建体
[2228]	<220>
[2229]	<221> 变体
[2230]	<222> 6, 7, 8, 9, 10, 11, 20, 21
[2231]	<223> Xaa = Asp、Ala、Tyr、Ser、Thr、Asn、Ile、Leu、Phe、Val、His或Pro
[2232]	<220>
[2233]	<221> 变体
[2234]	<222> 13, 14, 15, 16, 17, 18
[2235]	<223> Xaa = Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr
[2236]	<400> 153
[2237]	Glu Val Gly Ser Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa
[2238]	1 5 10 15
[2239]	Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Ser Gly Arg Ser Ala
[2240]	20 25
[2241]	<210> 154
[2242]	<211> 28
[2243]	<212> PRT
[2244]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2245]	<220>
[2246]	<223> 合成构建体
[2247]	<220>
[2248]	<221> 变体
[2249]	<222> 6, 7, 8, 9, 10, 11, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 22, 23
[2250]	<223> Xaa = Asp、Ala、Tyr、Ser、Thr、Asn、Ile、Leu、Phe、Val、His或Pro
[2251]	<400> 154
[2252]	Glu Val Gly Ser Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa
[2253]	1 5 10 15
[2254]	Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Ser Gly Arg Ser Ala
[2255]	20 25
[2256]	<210> 155
[2257]	<211> 28

- [2258] <212> PRT
- [2259] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [2260] <220>
- [2261] <223> 合成构建体
- [2262] <220>
- [2263] <221> 变体
- [2264] <222> 6, 7, 8, 9, 10, 11, 22, 23
- [2265] <223> Xaa = Asp、Ala、Tyr、Ser、Thr、Asn、Ile、Leu、Phe、Val、His或Pro
- [2266] <220>
- [2267] <221> 变体
- [2268] <222> 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20
- [2269] <223> Xaa = Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr
- [2270] <400> 155
- [2271] Glu Val Gly Ser Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa
- [2272] 1 5 10 15
- [2273] Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Ser Gly Arg Ser Ala
- [2274] 20 25
- [2275] <210> 156
- [2276] <211> 5
- [2277] <212> PRT
- [2278] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [2279] <220>
- [2280] <223> 合成构建体
- [2281] <400> 156
- [2282] Gly Gly Gly Gly Ser
- [2283] 1 5
- [2284] <210> 157
- [2285] <211> 4
- [2286] <212> PRT
- [2287] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [2288] <220>
- [2289] <223> 合成构建体
- [2290] <400> 157
- [2291] Ser Gly Gly Ser
- [2292] 1
- [2293] <210> 158
- [2294] <211> 4
- [2295] <212> PRT

- [2296] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2297] <220>
[2298] <223> 合成构建体
[2299] <400> 158
[2300] Gly Gly Ser Gly
[2301] 1
[2302] <210> 159
[2303] <211> 5
[2304] <212> PRT
[2305] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2306] <220>
[2307] <223> 合成构建体
[2308] <400> 159
[2309] Gly Gly Ser Gly Gly
[2310] 1 5
[2311] <210> 160
[2312] <211> 5
[2313] <212> PRT
[2314] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2315] <220>
[2316] <223> 合成构建体
[2317] <400> 160
[2318] Gly Ser Gly Ser Gly
[2319] 1 5
[2320] <210> 161
[2321] <211> 5
[2322] <212> PRT
[2323] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2324] <220>
[2325] <223> 合成构建体
[2326] <400> 161
[2327] Gly Ser Gly Gly Gly
[2328] 1 5
[2329] <210> 162
[2330] <211> 5
[2331] <212> PRT
[2332] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2333] <220>
[2334] <223> 合成构建体

- [2335] <400> 162
[2336] Gly Gly Gly Ser Gly
[2337] 1 5
[2338] <210> 163
[2339] <211> 5
[2340] <212> PRT
[2341] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2342] <220>
[2343] <223> 合成构建体
[2344] <400> 163
[2345] Gly Ser Ser Ser Gly
[2346] 1 5
[2347] <210> 164
[2348] <211> 42
[2349] <212> PRT
[2350] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2351] <220>
[2352] <223> 合成构建体
[2353] <220>
[2354] <221> 变体
[2355] <222> 6
[2356] <223> Xaa = Ala、Asp、Ile、Asn、Pro或Tyr
[2357] <220>
[2358] <221> 变体
[2359] <222> 7
[2360] <223> Xaa = Ala、Phe、Asn、Ser或Val
[2361] <220>
[2362] <221> 变体
[2363] <222> 8
[2364] <223> Xaa = Ala、His、Leu、Pro、Ser、Val或Tyr
[2365] <220>
[2366] <221> 变体
[2367] <222> 9
[2368] <223> Xaa = Ala、His、Ser或Tyr
[2369] <220>
[2370] <221> 变体
[2371] <222> 10
[2372] <223> Xaa = Ala、Asp、Pro、Ser、Val或Tyr
[2373] <220>

[2374]	<221> 变体
[2375]	<222> 11
[2376]	<223> Xaa = Ala、Asp、Leu、Ser或Tyr
[2377]	<220>
[2378]	<221> 变体
[2379]	<222> 13
[2380]	<223> Xaa = Asp、Pro或Val
[2381]	<220>
[2382]	<221> 变体
[2383]	<222> 14
[2384]	<223> Xaa = Ala、Asp、His、Pro、Ser或Thr
[2385]	<220>
[2386]	<221> 变体
[2387]	<222> 15
[2388]	<223> Xaa = Ala、Asp、Phe、His、Pro或Tyr
[2389]	<220>
[2390]	<221> 变体
[2391]	<222> 16
[2392]	<223> Xaa = Leu、Pro或Tyr
[2393]	<220>
[2394]	<221> 变体
[2395]	<222> 17
[2396]	<223> Xaa = Phe、Pro或Tyr
[2397]	<220>
[2398]	<221> 变体
[2399]	<222> 18
[2400]	<223> Xaa = Ala、Pro、Ser或Tyr
[2401]	<220>
[2402]	<221> 变体
[2403]	<222> 20
[2404]	<223> Xaa = Ala、Asp、Asn、Ser、Thr或Tyr
[2405]	<220>
[2406]	<221> 变体
[2407]	<222> 21
[2408]	<223> Xaa = Ala、Ser或Tyr
[2409]	<400> 164
[2410]	Glu Val Gly Ser Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa
[2411]	1 5 10 15
[2412]	Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Thr Glu

[2413]	20	25	30
[2414]	Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ser Gly Gly Ser		
[2415]	35	40	
[2416]	<210> 165		
[2417]	<211> 42		
[2418]	<212> PRT		
[2419]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[2420]	<220>		
[2421]	<223> 合成构建体		
[2422]	<400> 165		
[2423]	Glu Val Gly Ser Tyr Asp Ala Leu His Tyr Ala Cys Pro Pro Asp Tyr		
[2424]	1 5 10 15		
[2425]	Tyr Ala Cys Tyr Tyr Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Thr Glu		
[2426]	20 25 30		
[2427]	Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ser Gly Gly Ser		
[2428]	35 40		
[2429]	<210> 166		
[2430]	<211> 42		
[2431]	<212> PRT		
[2432]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[2433]	<220>		
[2434]	<223> 合成构建体		
[2435]	<400> 166		
[2436]	Glu Val Gly Ser Tyr Asn Ser Tyr His Ala Tyr Cys Pro His Pro Leu		
[2437]	1 5 10 15		
[2438]	Tyr Pro Cys Thr Ala Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Thr Glu		
[2439]	20 25 30		
[2440]	Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ser Gly Gly Ser		
[2441]	35 40		
[2442]	<210> 167		
[2443]	<211> 42		
[2444]	<212> PRT		
[2445]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[2446]	<220>		
[2447]	<223> 合成构建体		
[2448]	<400> 167		
[2449]	Glu Val Gly Ser Tyr Ala Ser Ser Ala Val Leu Cys Val Thr Ala Tyr		
[2450]	1 5 10 15		
[2451]	Phe Ser Cys Asn Ser Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Thr Glu		

[2452]	20	25	30
[2453]	Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ser Gly Gly Ser		
[2454]	35	40	
[2455]	<210> 168		
[2456]	<211> 41		
[2457]	<212> PRT		
[2458]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[2459]	<220>		
[2460]	<223> 合成构建体		
[2461]	<400> 168		
[2462]	Glu Val Gly Ser Tyr Asn Phe Val Ala Asp Ser Cys Pro Asp His Pro		
[2463]	1	5	10 15
[2464]	Tyr Pro Cys Ser Ala Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Pro		
[2465]	20	25	30
[2466]	Leu Gly Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser		
[2467]	35	40	
[2468]	<210> 169		
[2469]	<211> 42		
[2470]	<212> PRT		
[2471]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[2472]	<220>		
[2473]	<223> 合成构建体		
[2474]	<400> 169		
[2475]	Glu Val Gly Ser Tyr Asn Phe Val Ala Asp Ser Cys Pro Asp His Pro		
[2476]	1	5	10 15
[2477]	Tyr Pro Cys Ser Ala Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Thr Glu		
[2478]	20	25	30
[2479]	Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ser Gly Gly Ser		
[2480]	35	40	
[2481]	<210> 170		
[2482]	<211> 41		
[2483]	<212> PRT		
[2484]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[2485]	<220>		
[2486]	<223> 合成构建体		
[2487]	<400> 170		
[2488]	Glu Val Gly Ser Tyr Ile Val His His Ser Asp Cys Asp Ala Phe Tyr		
[2489]	1	5	10 15
[2490]	Pro Tyr Cys Asp Ser Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Pro		

[2491]	20	25	30
[2492]	Leu Gly Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser		
[2493]	35	40	
[2494]	<210> 171		
[2495]	<211> 42		
[2496]	<212> PRT		
[2497]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[2498]	<220>		
[2499]	<223> 合成构建体		
[2500]	<400> 171		
[2501]	Glu Val Gly Ser Tyr Ile Val His His Ser Asp Cys Asp Ala Phe Tyr		
[2502]	1 5 10 15		
[2503]	Pro Tyr Cys Asp Ser Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Thr Glu		
[2504]	20 25 30		
[2505]	Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ser Gly Gly Ser		
[2506]	35 40		
[2507]	<210> 172		
[2508]	<211> 41		
[2509]	<212> PRT		
[2510]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[2511]	<220>		
[2512]	<223> 合成构建体		
[2513]	<400> 172		
[2514]	Glu Val Gly Ser Tyr Tyr Ser Ala Tyr Pro Ala Cys Asp Ser His Tyr		
[2515]	1 5 10 15		
[2516]	Pro Tyr Cys Asn Ser Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Pro		
[2517]	20 25 30		
[2518]	Leu Gly Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser		
[2519]	35 40		
[2520]	<210> 173		
[2521]	<211> 42		
[2522]	<212> PRT		
[2523]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[2524]	<220>		
[2525]	<223> 合成构建体		
[2526]	<400> 173		
[2527]	Glu Val Gly Ser Tyr Tyr Ser Ala Tyr Pro Ala Cys Asp Ser His Tyr		
[2528]	1 5 10 15		
[2529]	Pro Tyr Cys Asn Ser Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Thr Glu		

[2530]	20	25	30
[2531]	Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ser Gly Gly Ser		
[2532]	35	40	
[2533]	<210> 174		
[2534]	<211> 41		
[2535]	<212> PRT		
[2536]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[2537]	<220>		
[2538]	<223> 合成构建体		
[2539]	<400> 174		
[2540]	Glu Val Gly Ser Tyr Pro Asn Pro Ser Ser Asp Cys Val Pro Tyr Tyr		
[2541]	1	5	10 15
[2542]	Tyr Ala Cys Ala Tyr Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Pro		
[2543]	20	25	30
[2544]	Leu Gly Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser		
[2545]	35	40	
[2546]	<210> 175		
[2547]	<211> 42		
[2548]	<212> PRT		
[2549]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[2550]	<220>		
[2551]	<223> 合成构建体		
[2552]	<400> 175		
[2553]	Glu Val Gly Ser Tyr Pro Asn Pro Ser Ser Asp Cys Val Pro Tyr Tyr		
[2554]	1	5	10 15
[2555]	Tyr Ala Cys Ala Tyr Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Thr Glu		
[2556]	20	25	30
[2557]	Asn Leu Tyr Phe Gln Gly Ser Gly Gly Ser		
[2558]	35	40	
[2559]	<210> 176		
[2560]	<211> 41		
[2561]	<212> PRT		
[2562]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[2563]	<220>		
[2564]	<223> 合成构建体		
[2565]	<400> 176		
[2566]	Glu Val Gly Ser Tyr Tyr Ser Ala Tyr Pro Ala Cys Asp Ser His Tyr		
[2567]	1	5	10 15
[2568]	Pro Tyr Cys Gln Ser Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Pro		

[2569]	20	25	30
[2570]	Leu Gly Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser		
[2571]	35	40	
[2572]	<210> 177		
[2573]	<211> 41		
[2574]	<212> PRT		
[2575]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[2576]	<220>		
[2577]	<223> 合成构建体		
[2578]	<400> 177		
[2579]	Glu Val Gly Ser Tyr Tyr Ser Ala Tyr Pro Ala Cys Asp Ser His Tyr		
[2580]	1 5 10 15		
[2581]	Pro Tyr Cys Asn Ser Ala Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Pro		
[2582]	20 25 30		
[2583]	Leu Gly Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser		
[2584]	35 40		
[2585]	<210> 178		
[2586]	<211> 41		
[2587]	<212> PRT		
[2588]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[2589]	<220>		
[2590]	<223> 合成构建体		
[2591]	<400> 178		
[2592]	Glu Val Gly Ser Tyr Pro Gln Pro Ser Ser Asp Cys Val Pro Tyr Tyr		
[2593]	1 5 10 15		
[2594]	Tyr Ala Cys Ala Tyr Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Pro		
[2595]	20 25 30		
[2596]	Leu Gly Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser		
[2597]	35 40		
[2598]	<210> 179		
[2599]	<211> 41		
[2600]	<212> PRT		
[2601]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[2602]	<220>		
[2603]	<223> 合成构建体		
[2604]	<400> 179		
[2605]	Glu Val Gly Ser Tyr Pro Asn Pro Ala Ser Asp Cys Val Pro Tyr Tyr		
[2606]	1 5 10 15		
[2607]	Tyr Ala Cys Ala Tyr Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Pro		

[2608]	20	25	30
[2609]	Leu Gly Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser		
[2610]	35	40	
[2611]	<210> 180		
[2612]	<211> 20		
[2613]	<212> PRT		
[2614]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[2615]	<220>		
[2616]	<223> 合成构建体		
[2617]	<400> 180		
[2618]	Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Ser Pro Leu Gly Leu Ala Gly		
[2619]	1	5	10
[2620]	Ser Gly Gly Ser		15
[2621]	20		
[2622]	<210> 181		
[2623]	<211> 11		
[2624]	<212> PRT		
[2625]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[2626]	<220>		
[2627]	<223> 合成构建体		
[2628]	<220>		
[2629]	<221> 变体		
[2630]	<222> 1		
[2631]	<223> 以重复至少两次并且直至十次存在		
[2632]	<220>		
[2633]	<221> 变体		
[2634]	<222> 1, 10, 11		
[2635]	<223> Xaa = Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr		
[2636]	<400> 181		
[2637]	Xaa Cys Pro Asp His Pro Tyr Pro Cys Xaa Xaa		
[2638]	1	5	10
[2639]	<210> 182		
[2640]	<211> 11		
[2641]	<212> PRT		
[2642]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[2643]	<220>		
[2644]	<223> 合成构建体		
[2645]	<220>		

- [2646] <221> 变体
- [2647] <222> 1
- [2648] <223> 以重复至少两次并且直至十次存在
- [2649] <220>
- [2650] <221> 变体
- [2651] <222> 1, 10, 11
- [2652] <223> Xaa = Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr
- [2653] <400> 182
- [2654] Xaa Cys Asp Ala Phe Tyr Pro Tyr Cys Xaa Xaa
- [2655] 1 5 10
- [2656] <210> 183
- [2657] <211> 11
- [2658] <212> PRT
- [2659] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [2660] <220>
- [2661] <223> 合成构建体
- [2662] <220>
- [2663] <221> 变体
- [2664] <222> 1
- [2665] <223> 以重复至少两次并且直至十次存在
- [2666] <220>
- [2667] <221> 变体
- [2668] <222> 1, 10, 11
- [2669] <223> Xaa = Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr
- [2670] <400> 183
- [2671] Xaa Cys Asp Ser His Tyr Pro Tyr Cys Xaa Xaa
- [2672] 1 5 10
- [2673] <210> 184
- [2674] <211> 11
- [2675] <212> PRT
- [2676] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [2677] <220>
- [2678] <223> 合成构建体
- [2679] <220>
- [2680] <221> 变体
- [2681] <222> 1
- [2682] <223> 以重复至少两次并且直至十次存在

- [2683] <220>
- [2684] <221> 变体
- [2685] <222> 1, 10, 11
- [2686] <223> Xaa = Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr
- [2687] <400> 184
- [2688] Xaa Cys Val Pro Tyr Tyr Tyr Ala Cys Xaa Xaa
- [2689] 1 5 10
- [2690] <210> 185
- [2691] <400> 185
- [2692] 000
- [2693] <210> 186
- [2694] <400> 186
- [2695] 000
- [2696] <210> 187
- [2697] <400> 187
- [2698] 000
- [2699] <210> 188
- [2700] <400> 188
- [2701] 000
- [2702] <210> 189
- [2703] <211> 21
- [2704] <212> PRT
- [2705] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [2706] <220>
- [2707] <223> 合成构建体
- [2708] <400> 189
- [2709] Glu Val Gly Ser Tyr Asn Phe Val Ala Asp Ser Cys Pro Asp His Pro
- [2710] 1 5 10 15
- [2711] Tyr Pro Cys Ser Ala
- [2712] 20
- [2713] <210> 190
- [2714] <211> 21
- [2715] <212> PRT
- [2716] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [2717] <220>
- [2718] <223> 合成构建体
- [2719] <400> 190
- [2720] Glu Val Gly Ser Tyr Ile Val His His Ser Asp Cys Asp Ala Phe Tyr

[2721]	1	5	10	15
[2722]	Pro Tyr Cys Asp Ser			
[2723]	20			
[2724]	<210> 191			
[2725]	<211> 21			
[2726]	<212> PRT			
[2727]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[2728]	<220>			
[2729]	<223> 合成构建体			
[2730]	<400> 191			
[2731]	Glu Val Gly Ser Tyr Tyr Ser Ala Tyr Pro Ala Cys Asp Ser His Tyr			
[2732]	1	5	10	15
[2733]	Pro Tyr Cys Asn Ser			
[2734]	20			
[2735]	<210> 192			
[2736]	<211> 21			
[2737]	<212> PRT			
[2738]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[2739]	<220>			
[2740]	<223> 合成构建体			
[2741]	<400> 192			
[2742]	Glu Val Gly Ser Tyr Pro Asn Pro Ser Ser Asp Cys Val Pro Tyr Tyr			
[2743]	1	5	10	15
[2744]	Tyr Ala Cys Ala Tyr			
[2745]	20			
[2746]	<210> 193			
[2747]	<211> 21			
[2748]	<212> PRT			
[2749]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[2750]	<220>			
[2751]	<223> 合成构建体			
[2752]	<400> 193			
[2753]	Glu Val Gly Ser Tyr Tyr Ser Ala Tyr Pro Ala Cys Asp Ser His Tyr			
[2754]	1	5	10	15
[2755]	Pro Tyr Cys Gln Ser			
[2756]	20			
[2757]	<210> 194			
[2758]	<400> 194			
[2759]	000			

[2799]	<220>
[2800]	<223> 合成构建体
[2801]	<400> 198
[2802]	Glu Val Gly His Ser Asp Cys Asp Ala Phe Tyr Pro Tyr Cys Asp Ser
[2803]	1 5 10 15
[2804]	Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Thr Pro Leu Gly Leu Ala Gly
[2805]	20 25 30
[2806]	Ser Gly Gly Ser
[2807]	35
[2808]	<210> 199
[2809]	<211> 32
[2810]	<212> PRT
[2811]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2812]	<220>
[2813]	<223> 合成构建体
[2814]	<400> 199
[2815]	Glu Asp Cys Asp Ala Phe Tyr Pro Tyr Cys Asp Ser Ser Gly Arg Ser
[2816]	1 5 10 15
[2817]	Ala Gly Gly Gly Gly Thr Pro Leu Gly Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser
[2818]	20 25 30
[2819]	<210> 200
[2820]	<211> 41
[2821]	<212> PRT
[2822]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2823]	<220>
[2824]	<223> 合成构建体
[2825]	<400> 200
[2826]	Glu Val Gly Ser Tyr Pro Asn Pro Ser Ser Asp Cys Val Pro Tyr Tyr
[2827]	1 5 10 15
[2828]	Tyr Ala Cys Ala Tyr Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Thr Pro
[2829]	20 25 30
[2830]	Leu Gly Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser
[2831]	35 40
[2832]	<210> 201
[2833]	<211> 36
[2834]	<212> PRT
[2835]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2836]	<220>
[2837]	<223> 合成构建体

[2838]	<400> 201
[2839]	Glu Val Gly Ser Ser Asp Cys Val Pro Tyr Tyr Tyr Ala Cys Ala Tyr
[2840]	1 5 10 15
[2841]	Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Thr Pro Leu Gly Leu Ala Gly
[2842]	20 25 30
[2843]	Ser Gly Gly Ser
[2844]	35
[2845]	<210> 202
[2846]	<211> 32
[2847]	<212> PRT
[2848]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2849]	<220>
[2850]	<223> 合成构建体
[2851]	<400> 202
[2852]	Glu Asp Cys Val Pro Tyr Tyr Tyr Ala Cys Ala Tyr Ser Gly Arg Ser
[2853]	1 5 10 15
[2854]	Ala Gly Gly Gly Gly Thr Pro Leu Gly Leu Ala Gly Ser Gly Gly Ser
[2855]	20 25 30
[2856]	<210> 203
[2857]	<211> 118
[2858]	<212> PRT
[2859]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2860]	<220>
[2861]	<223> 合成构建体
[2862]	<400> 203
[2863]	Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
[2864]	1 5 10 15
[2865]	Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val
[2866]	20 25 30
[2867]	Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
[2868]	35 40 45
[2869]	Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser
[2870]	50 55 60
[2871]	Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
[2872]	65 70 75 80
[2873]	Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
[2874]	85 90 95
[2875]	Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Ala Gln Ile
[2876]	100 105 110

[2877]	Tyr Val Ile Asp Pro Glu
[2878]	115
[2879]	<210> 204
[2880]	<211> 118
[2881]	<212> PRT
[2882]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2883]	<220>
[2884]	<223> 合成构建体
[2885]	<400> 204
[2886]	Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
[2887]	1 5 10 15
[2888]	Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val
[2889]	20 25 30
[2890]	Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
[2891]	35 40 45
[2892]	Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser
[2893]	50 55 60
[2894]	Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
[2895]	65 70 75 80
[2896]	Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
[2897]	85 90 95
[2898]	Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
[2899]	100 105 110
[2900]	Tyr Val Ile Asp Pro Glu
[2901]	115
[2902]	<210> 205
[2903]	<211> 115
[2904]	<212> PRT
[2905]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[2906]	<220>
[2907]	<223> 合成构建体
[2908]	<400> 205
[2909]	Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg
[2910]	1 5 10 15
[2911]	Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr
[2912]	20 25 30
[2913]	Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu
[2914]	35 40 45
[2915]	Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Ile Cys

[2916]	50	55	60
[2917]	Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu		
[2918]	65	70	75
[2919]	Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr		80
[2920]		85	90
[2921]	Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val		95
[2922]		100	105
[2923]	Ile Asp Pro		110
[2924]		115	
[2925]	<210> 206		
[2926]	<211> 114		
[2927]	<212> PRT		
[2928]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[2929]	<220>		
[2930]	<223> 合成构建体		
[2931]	<400> 206		
[2932]	Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly		
[2933]	1	5	10
[2934]	Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu		15
[2935]		20	25
[2936]	Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val		30
[2937]		35	40
[2938]	Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Asp Ser Ile		45
[2939]	50	55	60
[2940]	Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly		
[2941]	65	70	75
[2942]	Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met		80
[2943]		85	90
[2944]	Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr		95
[2945]		100	105
[2946]	Val Ile		110
[2947]	<210> 207		
[2948]	<211> 120		
[2949]	<212> PRT		
[2950]	<213> 智人(Homo sapiens)		
[2951]	<400> 207		
[2952]	Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg		
[2953]	1	5	10
[2954]	Gly Ile Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr		15

[2955]	20	25	30
[2956]	Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu		
[2957]	35	40	45
[2958]	Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp		
[2959]	50	55	60
[2960]	Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr		
[2961]	65	70	75
[2962]	Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val		
[2963]	85	90	95
[2964]	Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr		
[2965]	100	105	110
[2966]	Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu		
[2967]	115	120	
[2968]	<210> 208		
[2969]	<211> 120		
[2970]	<212> PRT		
[2971]	<213> 小家鼠 (Mus musculus)		
[2972]	<400> 208		
[2973]	Glu Ala Ile Gln Val Thr Gln Pro Ser Val Val Leu Ala Ser Ser His		
[2974]	1	5	10
[2975]	Gly Val Ala Ser Phe Pro Cys Glu Tyr Ser Pro Ser His Asn Thr Asp		
[2976]	20	25	30
[2977]	Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Thr Asn Asp Gln Met Thr Glu		
[2978]	35	40	45
[2979]	Val Cys Ala Thr Thr Phe Thr Glu Lys Asn Thr Val Gly Phe Leu Asp		
[2980]	50	55	60
[2981]	Tyr Pro Phe Cys Ser Gly Thr Phe Asn Glu Ser Arg Val Asn Leu Thr		
[2982]	65	70	75
[2983]	Ile Gln Gly Leu Arg Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr Leu Cys Lys Val		
[2984]	85	90	95
[2985]	Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Phe Val Gly Met Gly Asn Gly Thr		
[2986]	100	105	110
[2987]	Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu		
[2988]	115	120	
[2989]	<210> 209		
[2990]	<211> 31		
[2991]	<212> PRT		
[2992]	<213> 人工序列 (Artificial Sequence)		
[2993]	<220>		

[2994]	<223> 合成构建体
[2995]	<400> 209
[2996]	Glu Val Gly Ser Tyr Pro Asn Pro Ser Ser Asp Cys Val Pro Tyr Tyr
[2997]	1 5 10 15
[2998]	Tyr Ala Cys Ala Tyr Ser Gly Arg Ser Ala Pro Leu Gly Leu Ala
[2999]	20 25 30
[3000]	<210> 210
[3001]	<211> 22
[3002]	<212> PRT
[3003]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3004]	<220>
[3005]	<223> 合成构建体
[3006]	<400> 210
[3007]	Glu Asp Cys Val Pro Tyr Tyr Tyr Ala Cys Ala Tyr Ser Gly Arg Ser
[3008]	1 5 10 15
[3009]	Ala Pro Leu Gly Leu Ala
[3010]	20
[3011]	<210> 211
[3012]	<211> 17
[3013]	<212> PRT
[3014]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3015]	<220>
[3016]	<223> 合成构建体
[3017]	<400> 211
[3018]	Glu Asp Cys Val Pro Tyr Tyr Tyr Ala Cys Ala Tyr Ser Gly Arg Ser
[3019]	1 5 10 15
[3020]	Ala
[3021]	<210> 212
[3022]	<211> 17
[3023]	<212> PRT
[3024]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3025]	<220>
[3026]	<223> 合成构建体
[3027]	<400> 212
[3028]	Glu Asp Cys Val Pro Tyr Tyr Tyr Ala Cys Ala Tyr Pro Leu Gly Leu
[3029]	1 5 10 15
[3030]	Ala
[3031]	<210> 213
[3032]	<211> 12

[3033]	<212>	PRT
[3034]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[3035]	<220>	
[3036]	<223>	合成构建体
[3037]	<400>	213
[3038]	Glu Asp Cys Val Pro Tyr Tyr Tyr Ala Cys Ala Tyr	
[3039]	1	5 10
[3040]	<210>	214
[3041]	<211>	16
[3042]	<212>	PRT
[3043]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[3044]	<220>	
[3045]	<223>	合成构建体
[3046]	<400>	214
[3047]	Glu Val Gly Ser Ser Asp Cys Val Pro Tyr Tyr Tyr Ala Cys Ala Tyr	
[3048]	1	5 10 15
[3049]	<210>	215
[3050]	<211>	12
[3051]	<212>	PRT
[3052]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[3053]	<220>	
[3054]	<223>	合成构建体
[3055]	<400>	215
[3056]	Glu Asp Cys Asp Ala Phe Tyr Pro Tyr Cys Asp Ser	
[3057]	1	5 10
[3058]	<210>	216
[3059]	<211>	16
[3060]	<212>	PRT
[3061]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[3062]	<220>	
[3063]	<223>	合成构建体
[3064]	<400>	216
[3065]	Glu Val Gly His Ser Asp Cys Asp Ala Phe Tyr Pro Tyr Cys Asp Ser	
[3066]	1	5 10 15
[3067]	<210>	217
[3068]	<211>	20
[3069]	<212>	PRT
[3070]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[3071]	<220>	

- [3072] <223> 合成构建体
- [3073] <220>
- [3074] <221> 变体
- [3075] <222> 3
- [3076] <223> 以重复至少一次并且直至11次存在
- [3077] <220>
- [3078] <221> 变体
- [3079] <222> 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12
- [3080] <223> Xaa = Ala、Cys、Asp、Glu、Phe、Gly、His、Ile、Lys、Leu、Met、Asn、Pro、Gln、Arg、Ser、Thr、Val、Trp或Tyr
- [3081] <220>
- [3082] <221> 变体
- [3083] <222> 3, 14, 15
- [3084] <223> Xaa = Asp、Ala、Tyr、Ser、Thr、Asn、Ile、Leu、Phe、Val、His或Pro
- [3085] <400> 217
- [3086] Glu Val Xaa Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Ser
- [3087] 1 5 10 15
- [3088] Gly Arg Ser Ala
- [3089] 20
- [3090] <210> 218
- [3091] <211> 17
- [3092] <212> PRT
- [3093] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [3094] <220>
- [3095] <223> 合成构建体
- [3096] <220>
- [3097] <221> 变体
- [3098] <222> 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12
- [3099] <223> Xaa = Asp、Ala、Tyr、Ser、Thr、Asn、Ile、Leu、Phe、Val、His或Pro
- [3100] <400> 218
- [3101] Glu Asp Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Ser Gly Arg Ser
- [3102] 1 5 10 15
- [3103] Ala
- [3104] <210> 219
- [3105] <211> 17
- [3106] <212> PRT
- [3107] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- [3108] <220>
- [3109] <223> 合成构建体

[3110]	<220>
[3111]	<221> 变体
[3112]	<222> 4, 5, 6, 7, 8, 9, 11, 12
[3113]	<223> Xaa = Asp、Ala、Tyr、Ser、Thr、Asn、Ile、Leu、Phe、Val、His或Pro
[3114]	<400> 219
[3115]	Glu Asp Cys Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Cys Xaa Xaa Pro Leu Gly Leu
[3116]	1 5 10 15
[3117]	Ala
[3118]	<210> 220
[3119]	<211> 21
[3120]	<212> PRT
[3121]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3122]	<220>
[3123]	<223> 合成构建体
[3124]	<400> 220
[3125]	Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Thr Glu Asn Leu Tyr Phe Gln
[3126]	1 5 10 15
[3127]	Gly Ser Gly Gly Ser
[3128]	20
[3129]	<210> 221
[3130]	<211> 20
[3131]	<212> PRT
[3132]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3133]	<220>
[3134]	<223> 合成构建体
[3135]	<400> 221
[3136]	Ser Gly Arg Ser Ala Gly Gly Gly Gly Thr Pro Leu Gly Leu Ala Gly
[3137]	1 5 10 15
[3138]	Ser Gly Gly Ser
[3139]	20
[3140]	<210> 222
[3141]	<211> 10
[3142]	<212> PRT
[3143]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3144]	<220>
[3145]	<223> 合成构建体
[3146]	<400> 222
[3147]	Ser Gly Arg Ser Ala Pro Leu Gly Leu Ala
[3148]	1 5 10

[3149]	<210>	223
[3150]	<211>	13
[3151]	<212>	PRT
[3152]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[3153]	<220>	
[3154]	<223>	合成构建体
[3155]	<400>	223
[3156]		Phe Ser Leu Ser Thr Gly Gly Val Gly Val Gly Trp Ile
[3157]	1	5 10
[3158]	<210>	224
[3159]	<211>	20
[3160]	<212>	PRT
[3161]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[3162]	<220>	
[3163]	<223>	合成构建体
[3164]	<400>	224
[3165]		Leu Ala Leu Ile Asp Trp Ala Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Pro Ser Leu
[3166]	1	5 10 15
[3167]		Lys Ser Arg Leu
[3168]		20
[3169]	<210>	225
[3170]	<211>	15
[3171]	<212>	PRT
[3172]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[3173]	<220>	
[3174]	<223>	合成构建体
[3175]	<400>	225
[3176]		Ala Arg Gly Gly Ser Asp Thr Val Ile Gly Asp Trp Phe Ala Tyr
[3177]	1	5 10 15
[3178]	<210>	226
[3179]	<211>	11
[3180]	<212>	PRT
[3181]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)
[3182]	<220>	
[3183]	<223>	合成构建体
[3184]	<400>	226
[3185]		Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Tyr Leu Ala
[3186]	1	5 10
[3187]	<210>	227

[3188]	<211> 9
[3189]	<212> PRT
[3190]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3191]	<220>
[3192]	<223> 合成构建体
[3193]	<400> 227
[3194]	Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val
[3195]	1 5
[3196]	<210> 228
[3197]	<211> 10
[3198]	<212> PRT
[3199]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3200]	<220>
[3201]	<223> 合成构建体
[3202]	<400> 228
[3203]	Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Tyr Leu Trp Thr
[3204]	1 5 10
[3205]	<210> 229
[3206]	<211> 123
[3207]	<212> PRT
[3208]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[3209]	<220>
[3210]	<223> 合成构建体
[3211]	<400> 229
[3212]	Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[3213]	1 5 10 15
[3214]	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Gly
[3215]	20 25 30
[3216]	Gly Val Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu
[3217]	35 40 45
[3218]	Trp Leu Ala Leu Ile Asp Trp Ala Asp Asp Lys Tyr Tyr Ser Pro Ser
[3219]	50 55 60
[3220]	Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
[3221]	65 70 75 80
[3222]	Tyr Leu Gln Leu Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
[3223]	85 90 95
[3224]	Cys Ala Arg Gly Gly Ser Asp Thr Val Ile Gly Asp Trp Phe Ala Tyr
[3225]	100 105 110
[3226]	Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[3227]	115	120
[3228]	<210> 230	
[3229]	<211> 106	
[3230]	<212> PRT	
[3231]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[3232]	<220>	
[3233]	<223> 合成构建体	
[3234]	<400> 230	
[3235]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly	
[3236]	1 5 10 15	
[3237]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Ser Tyr	
[3238]	20 25 30	
[3239]	Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile	
[3240]	35 40 45	
[3241]	Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly	
[3242]	50 55 60	
[3243]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro	
[3244]	65 70 75 80	
[3245]	Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Tyr Tyr Leu Trp Thr	
[3246]	85 90 95	
[3247]	Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys	
[3248]	100 105	

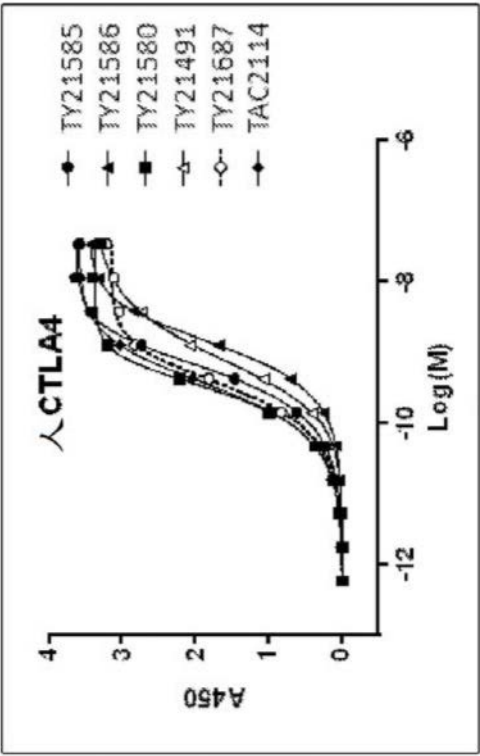


图1A

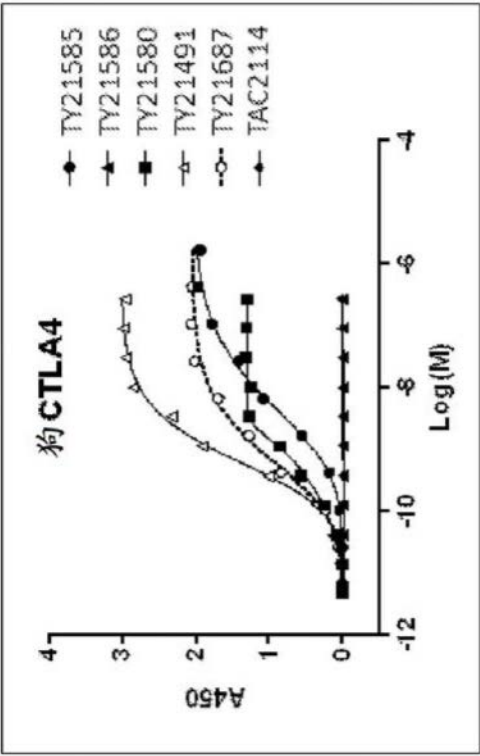


图1B

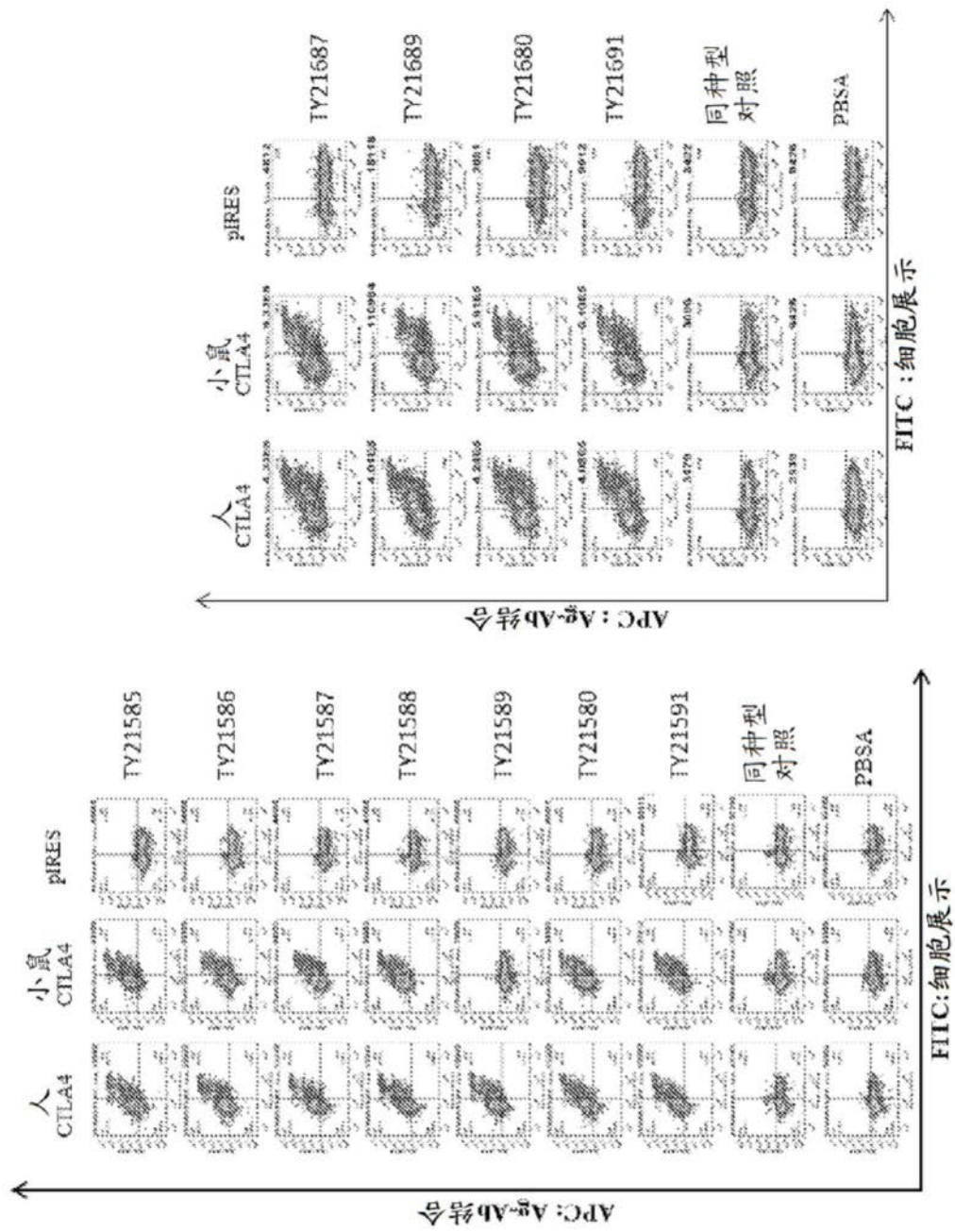


图2

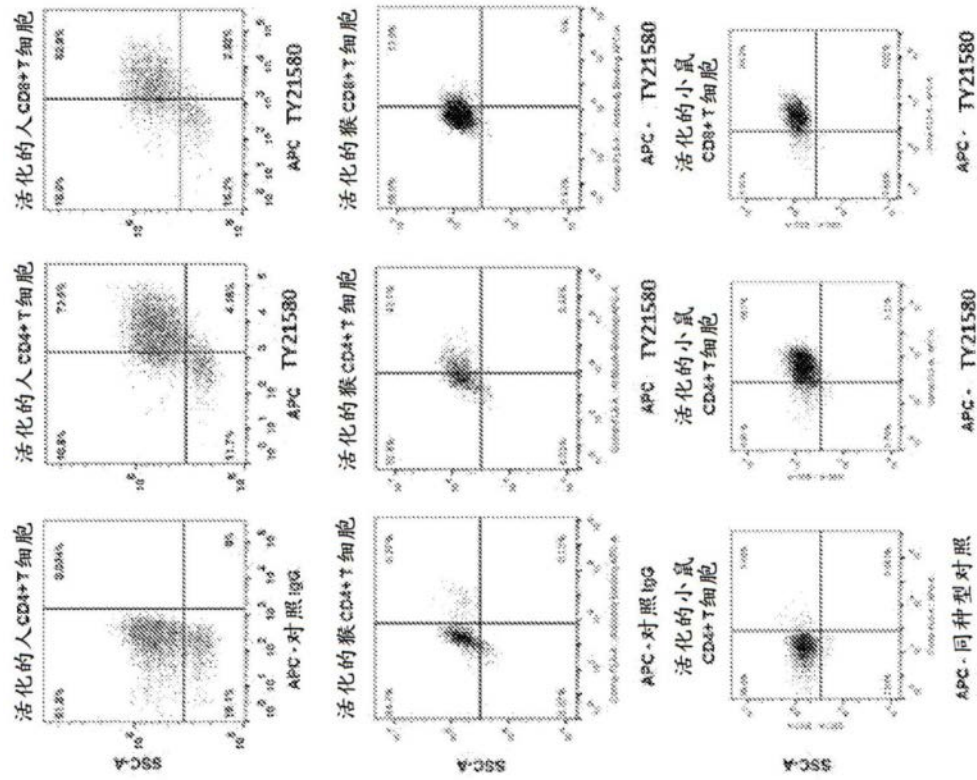


图3

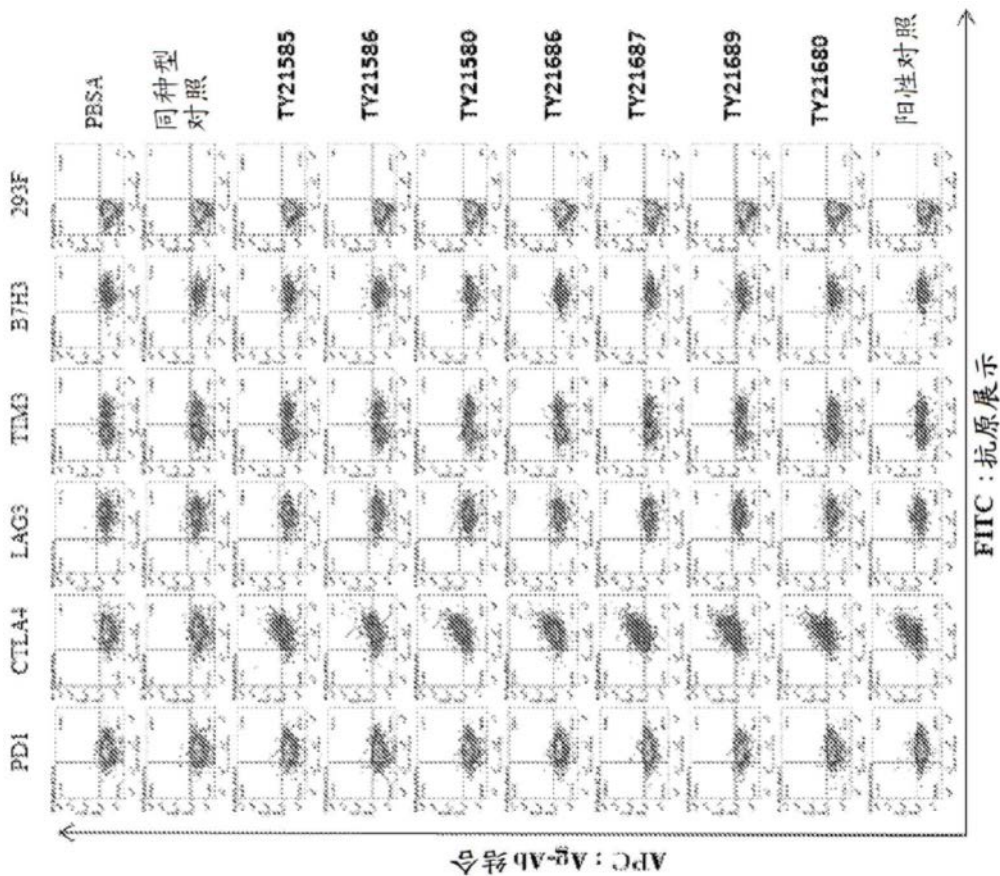


图4A

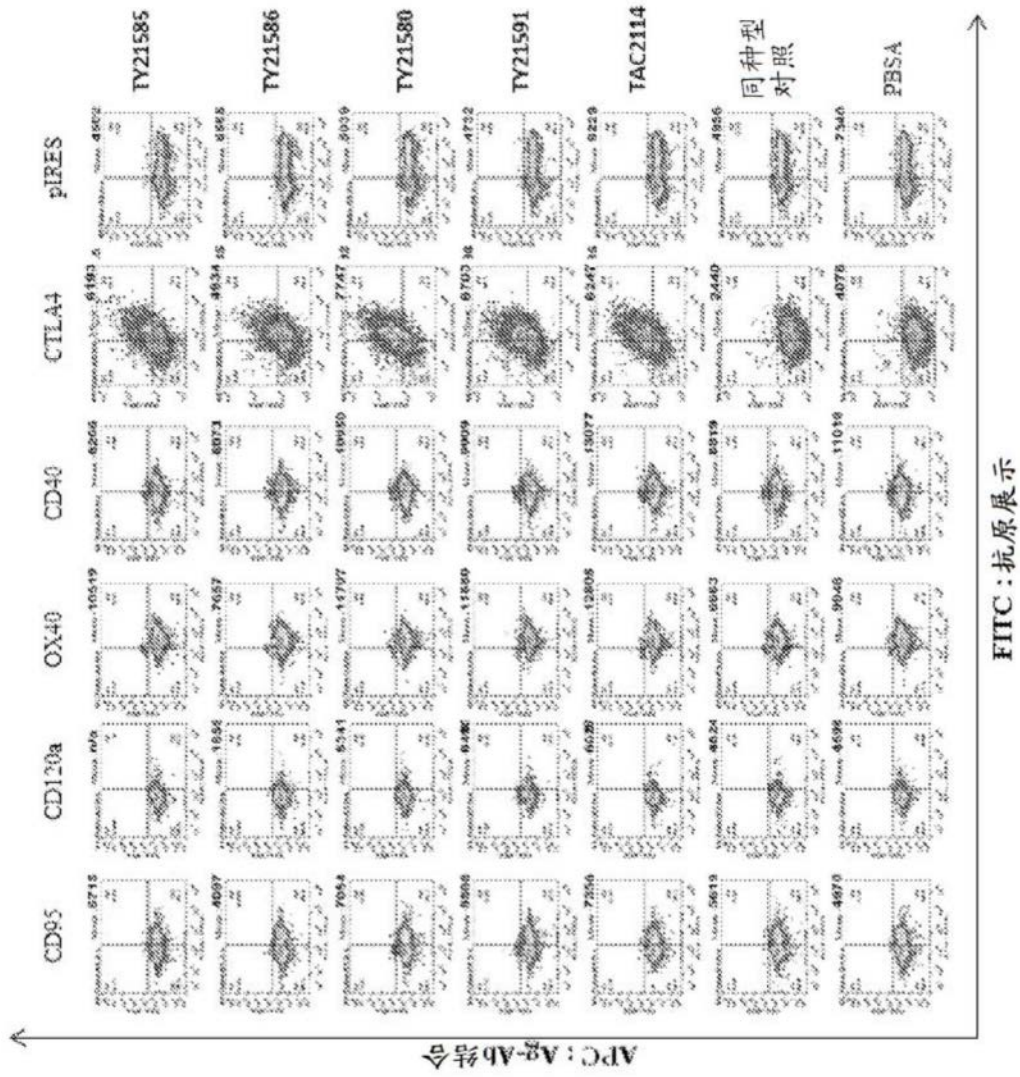


图4B

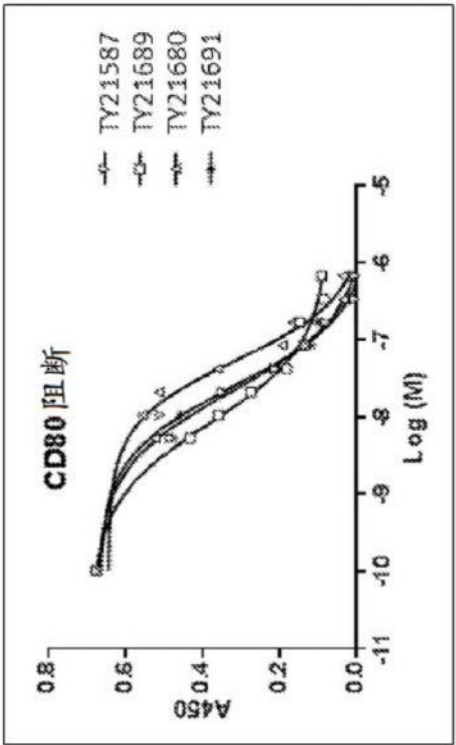


图5A

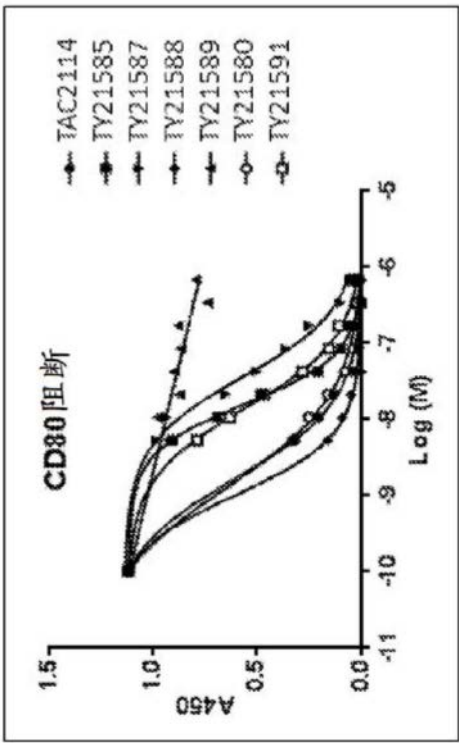


图5B

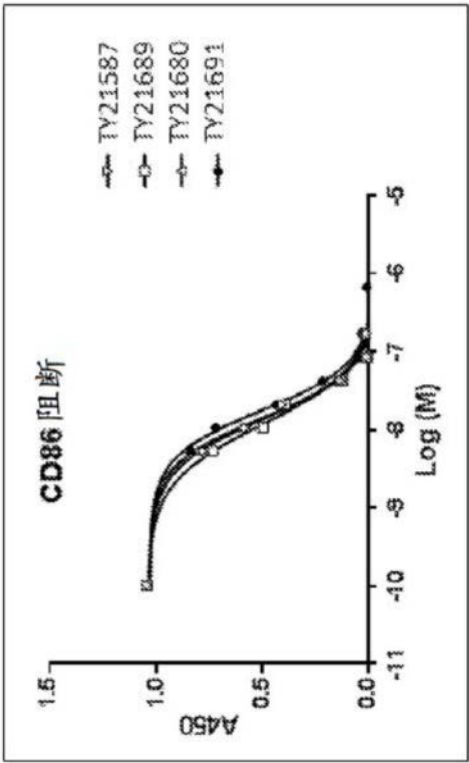


图5C

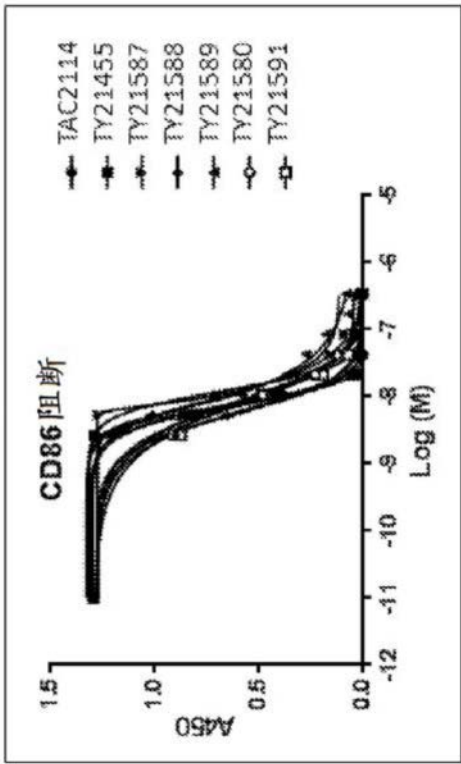


图5D

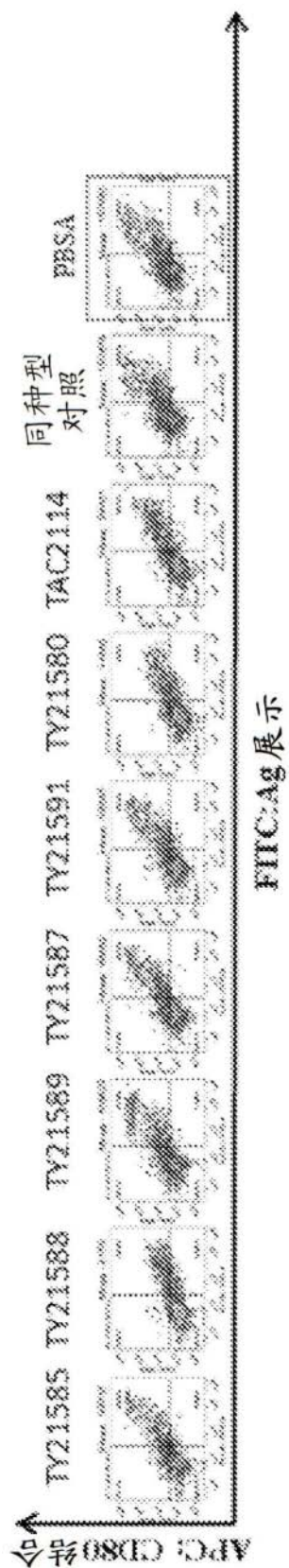


图6A

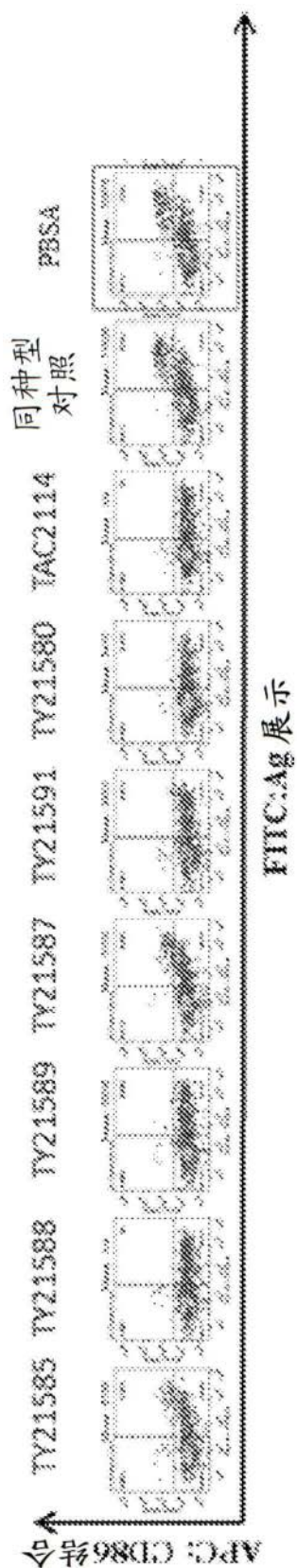


图6B

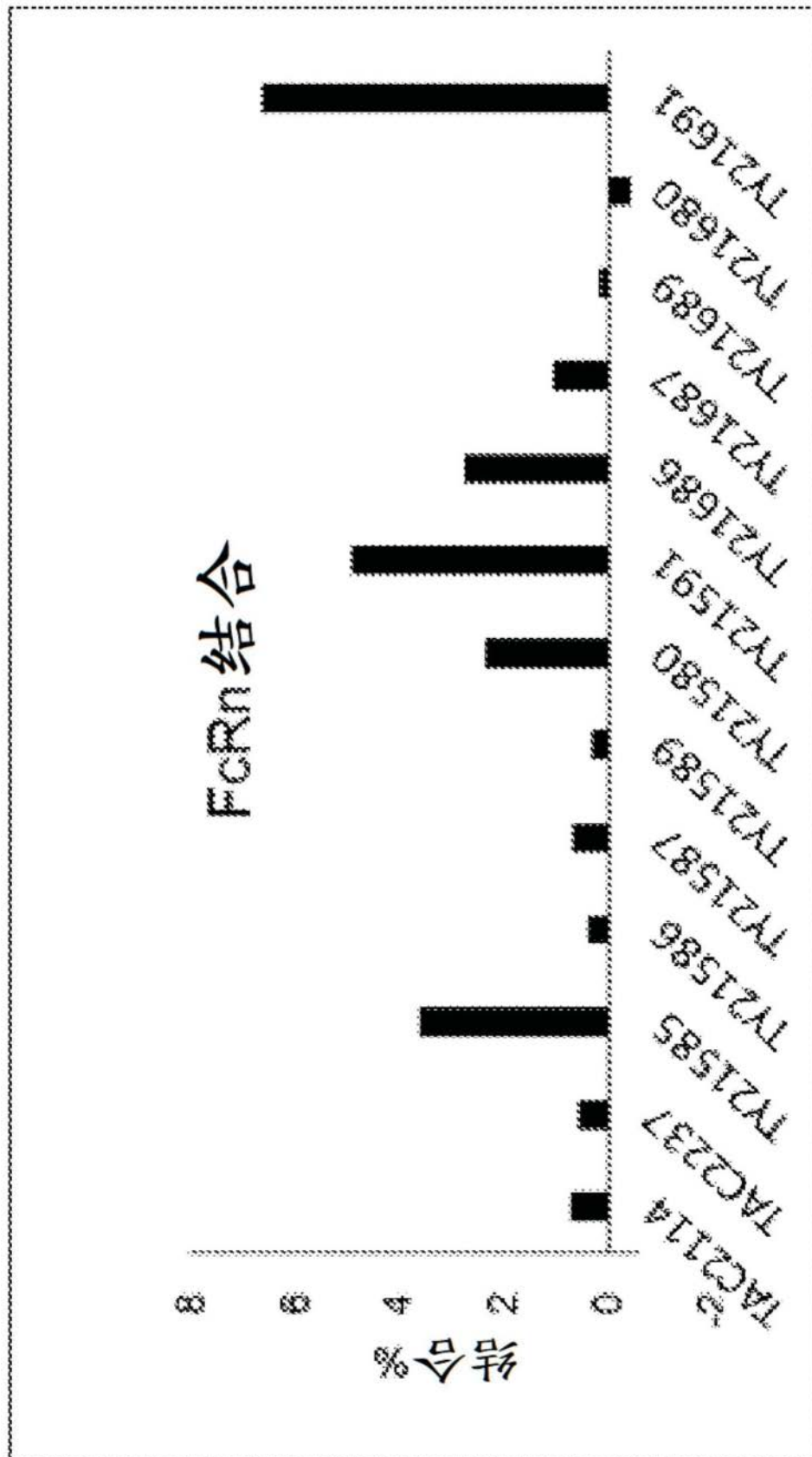


图7

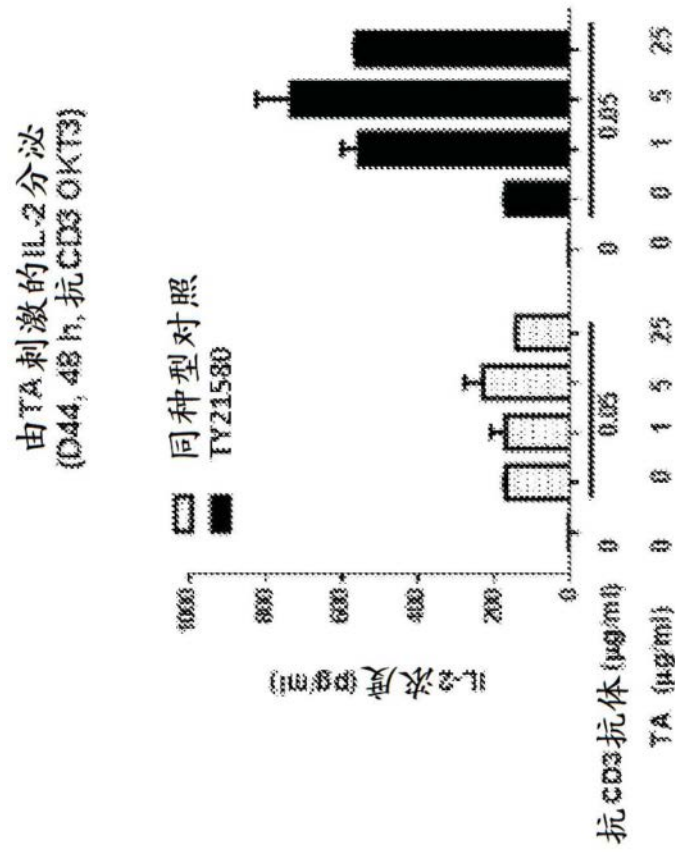


图8A

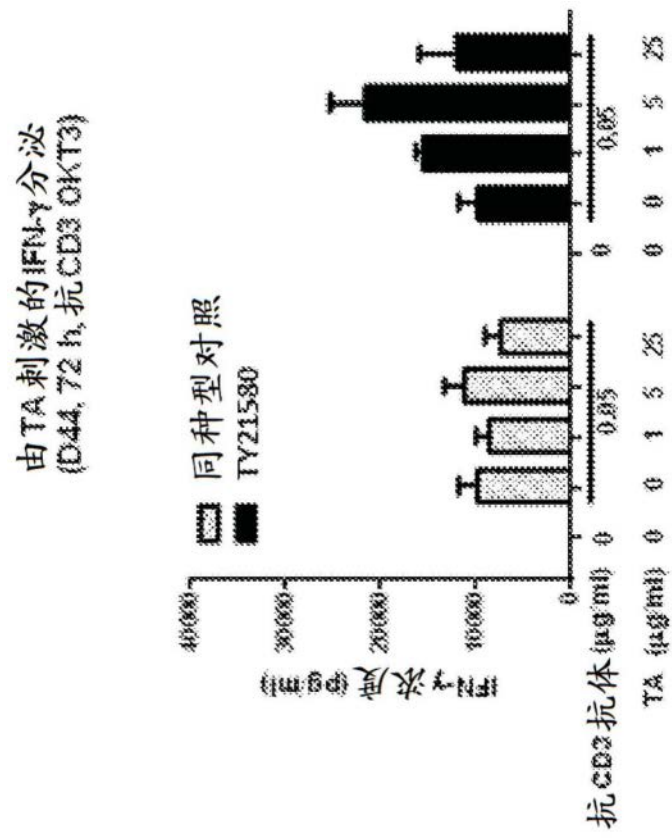


图8B

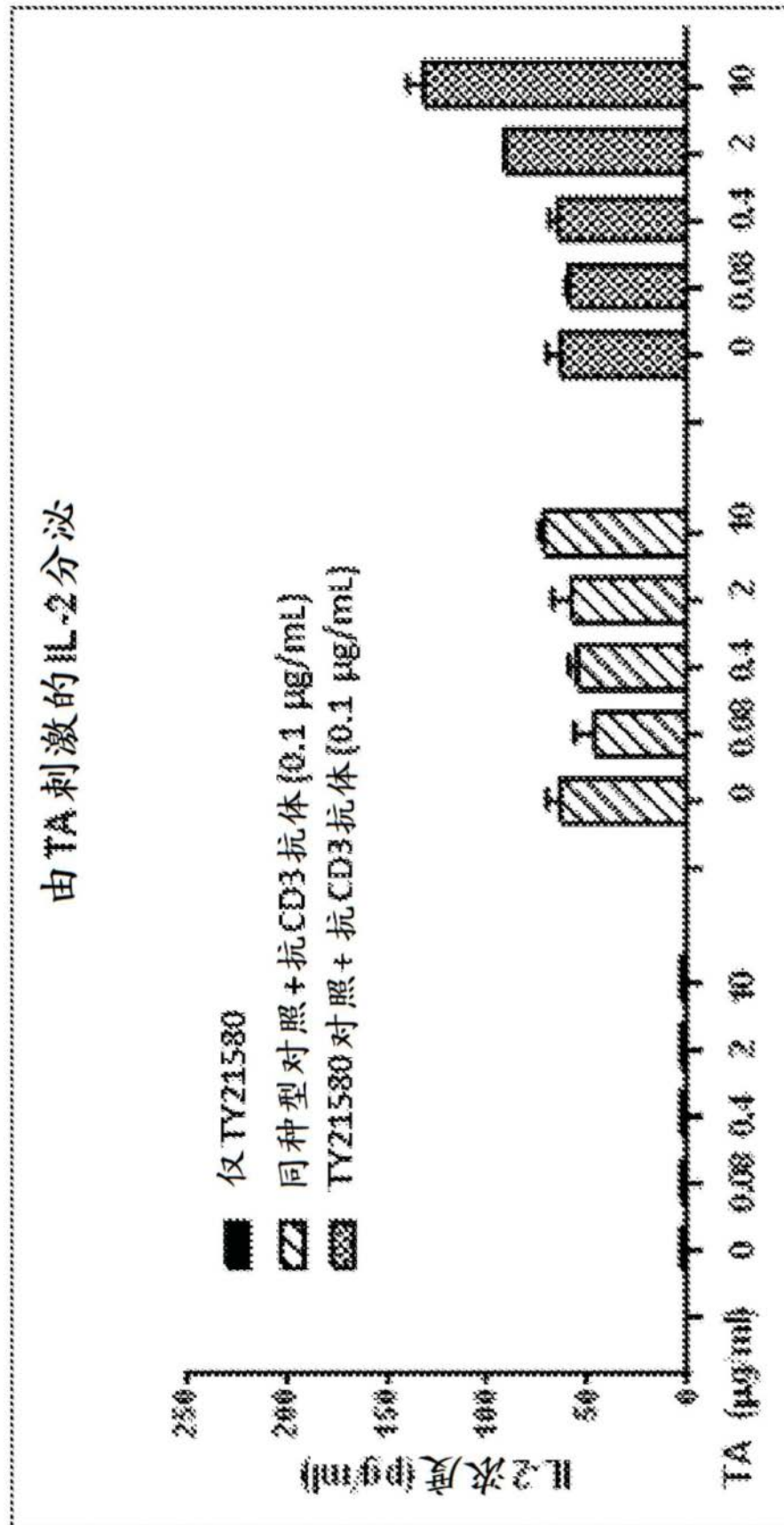


图9

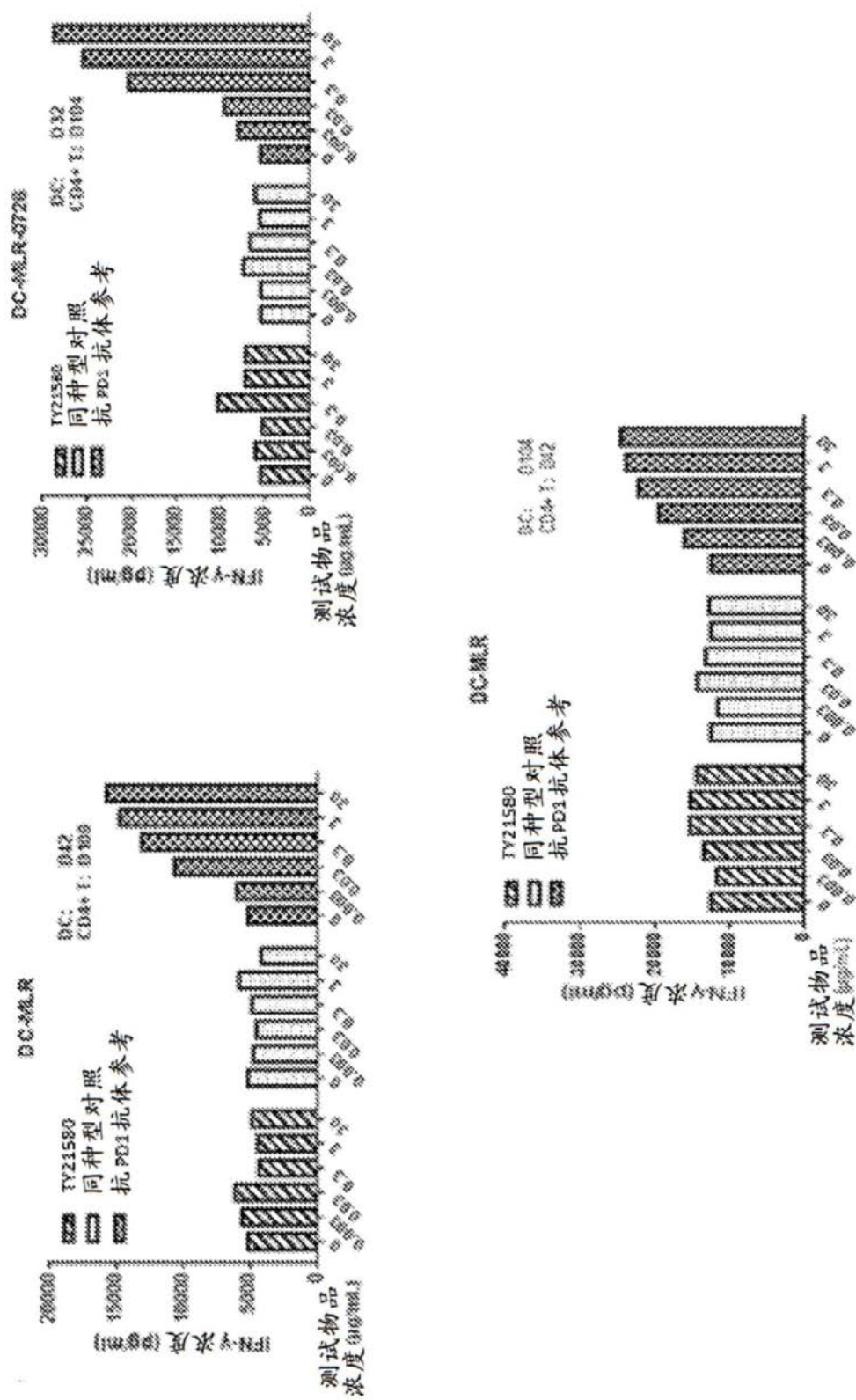


图10

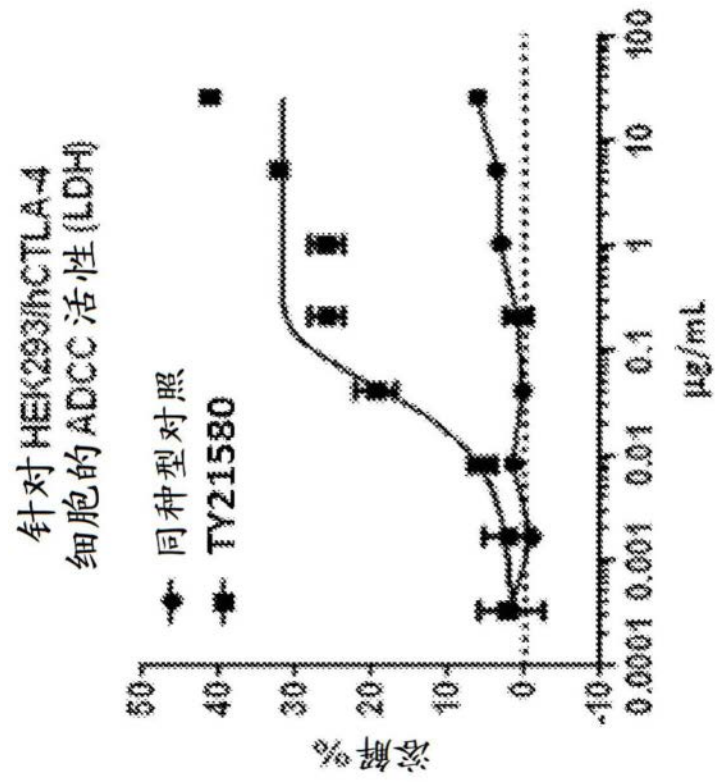


图11A

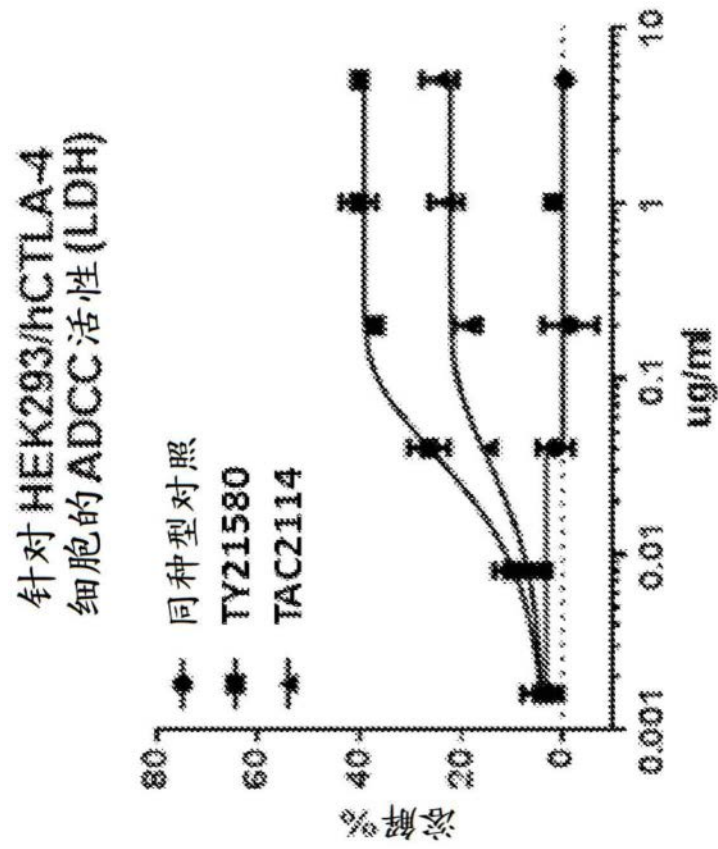


图11B

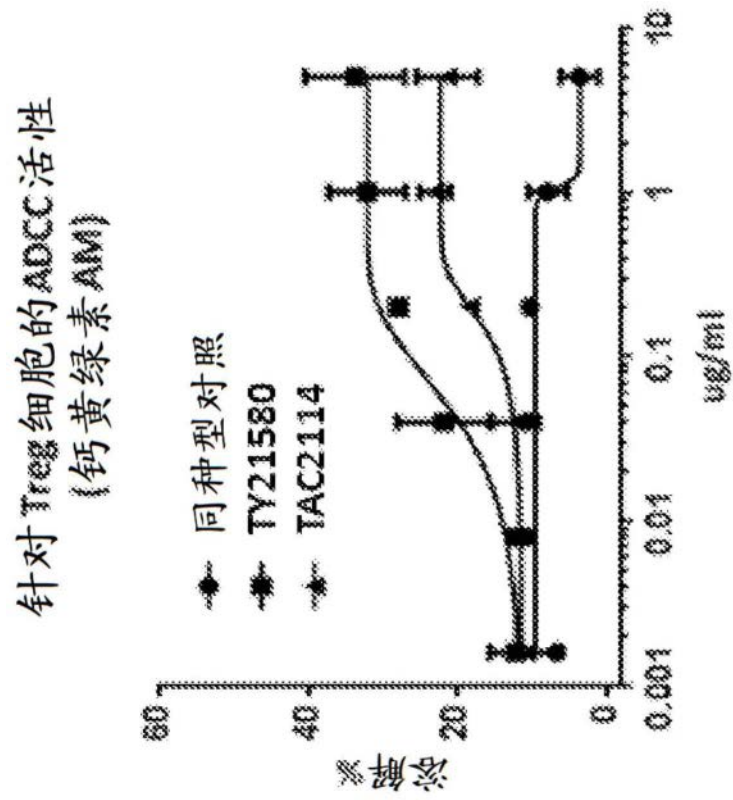


图12A

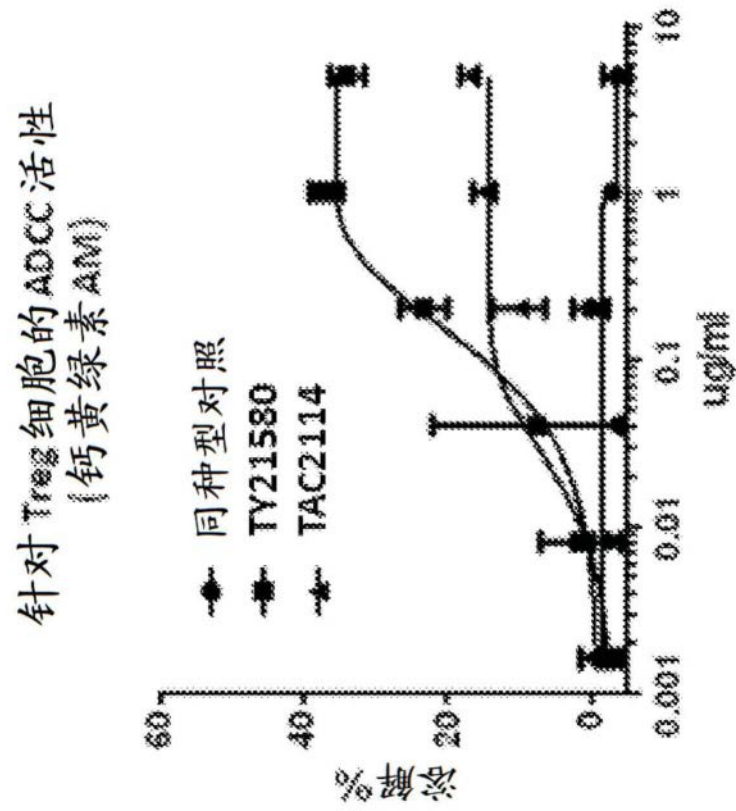


图12B

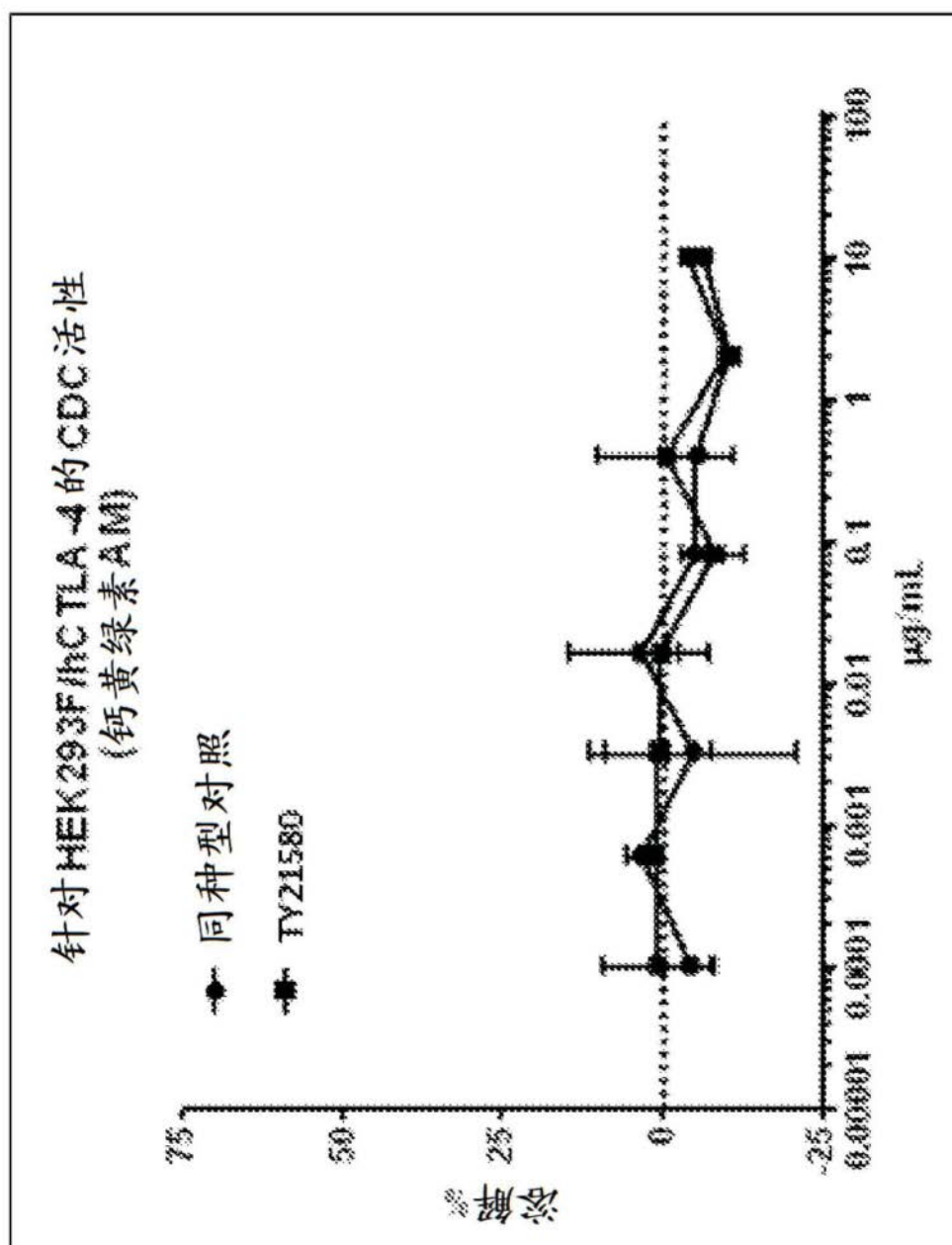


图13

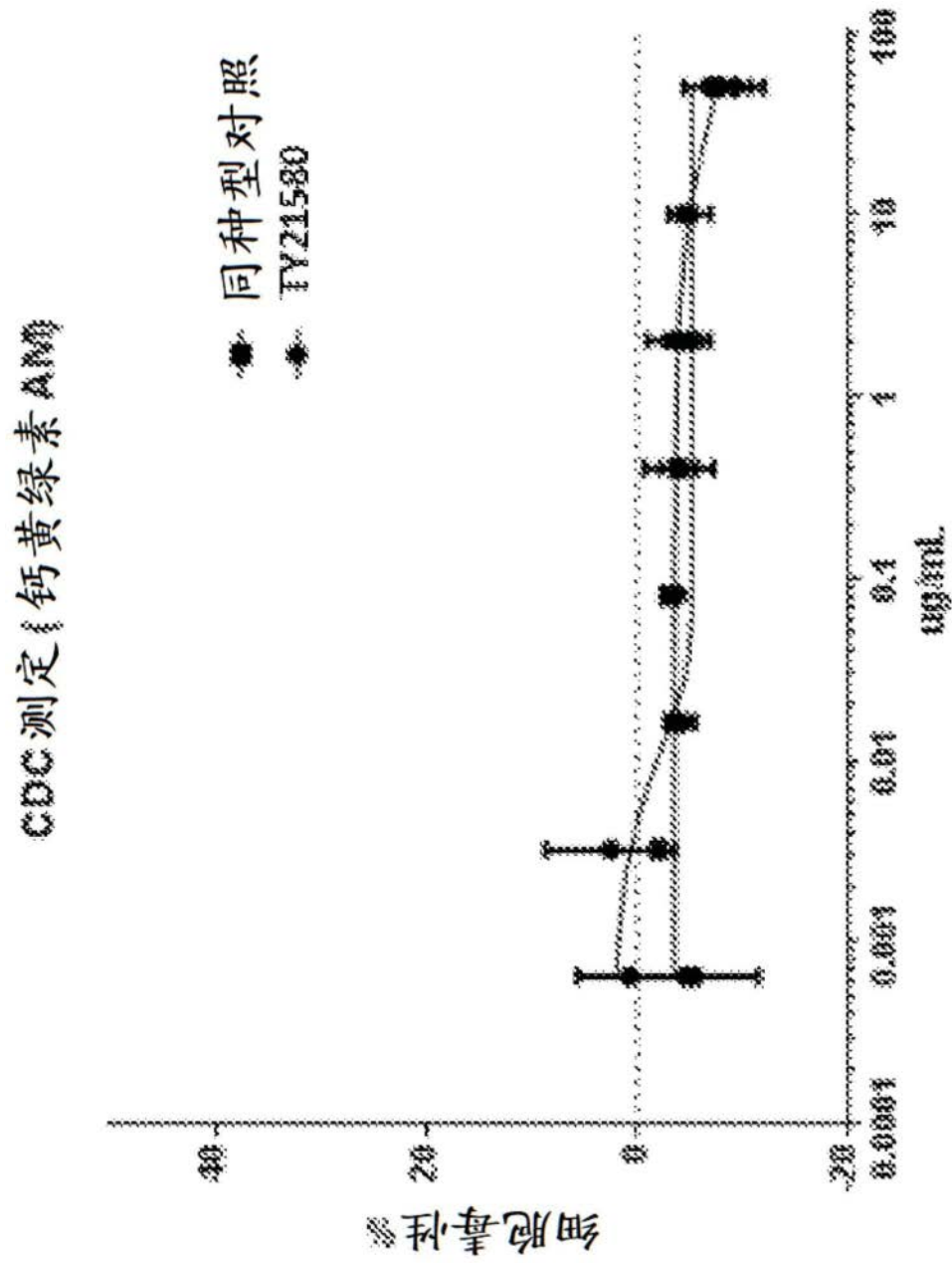


图14

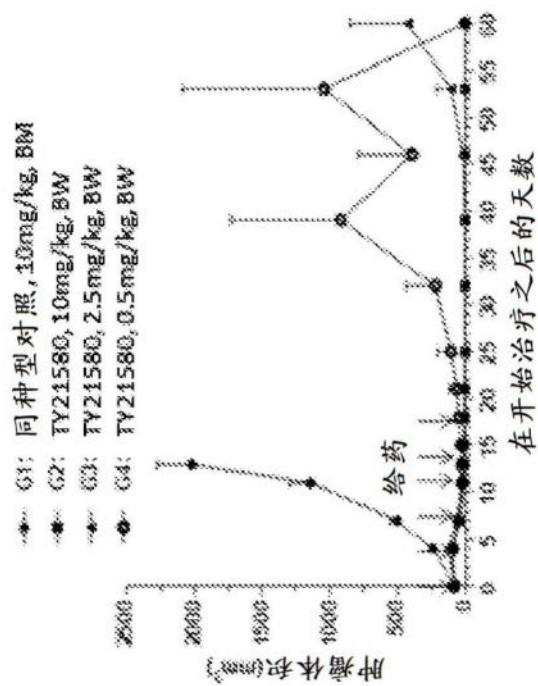


图15A



图15B

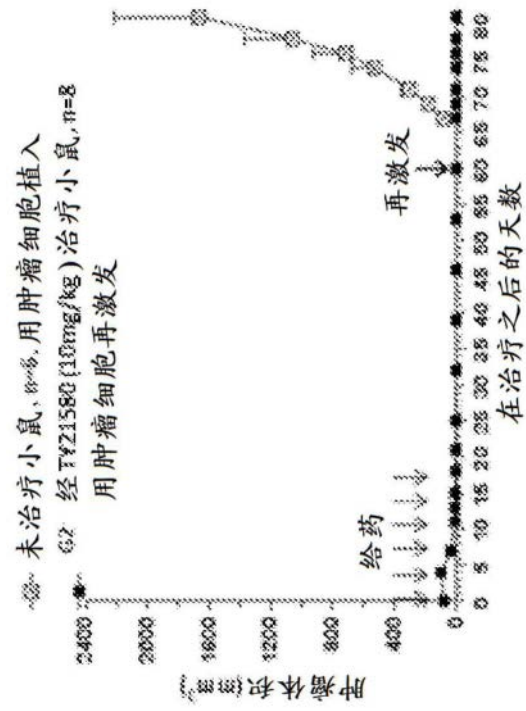


图15C

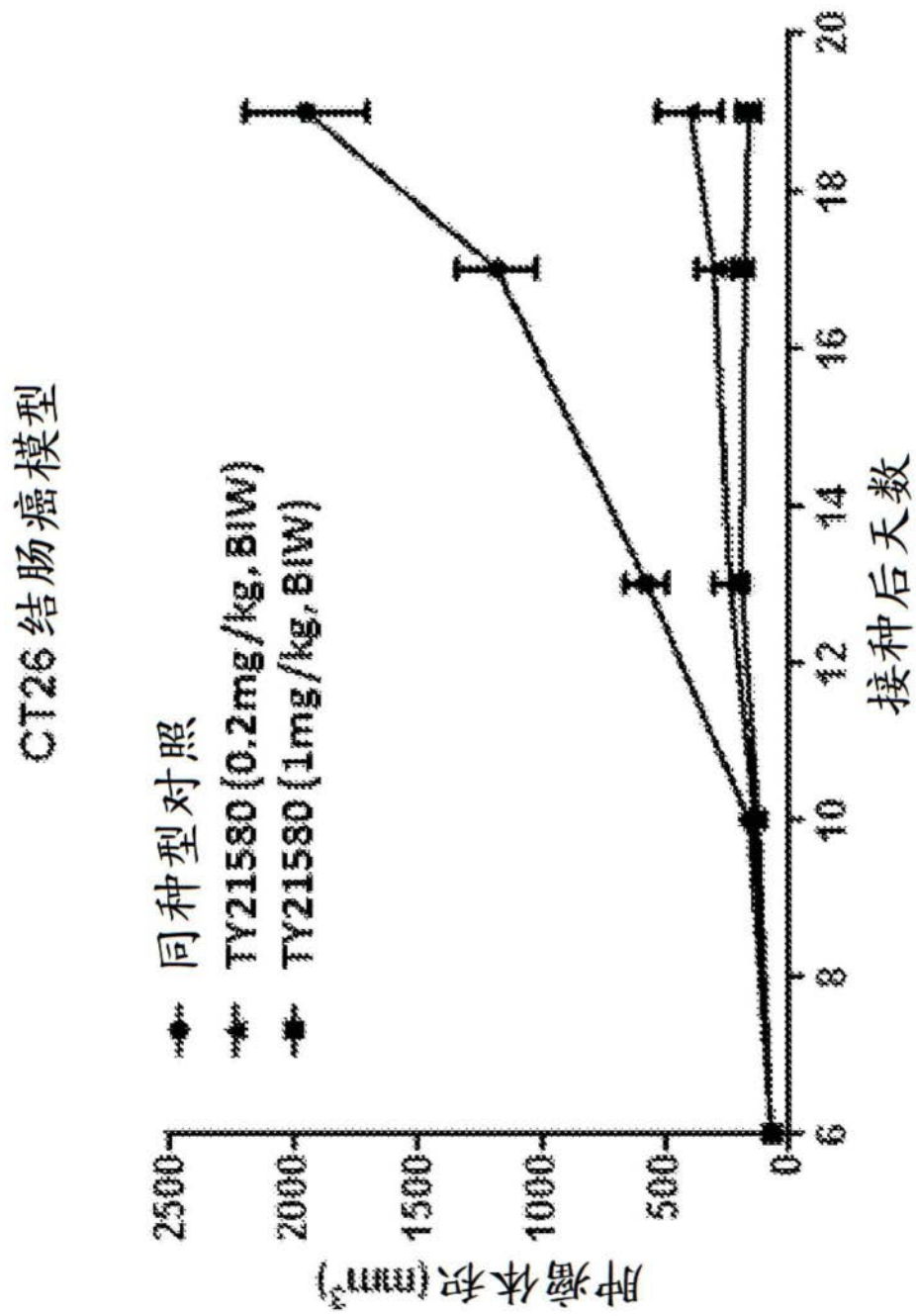


图16

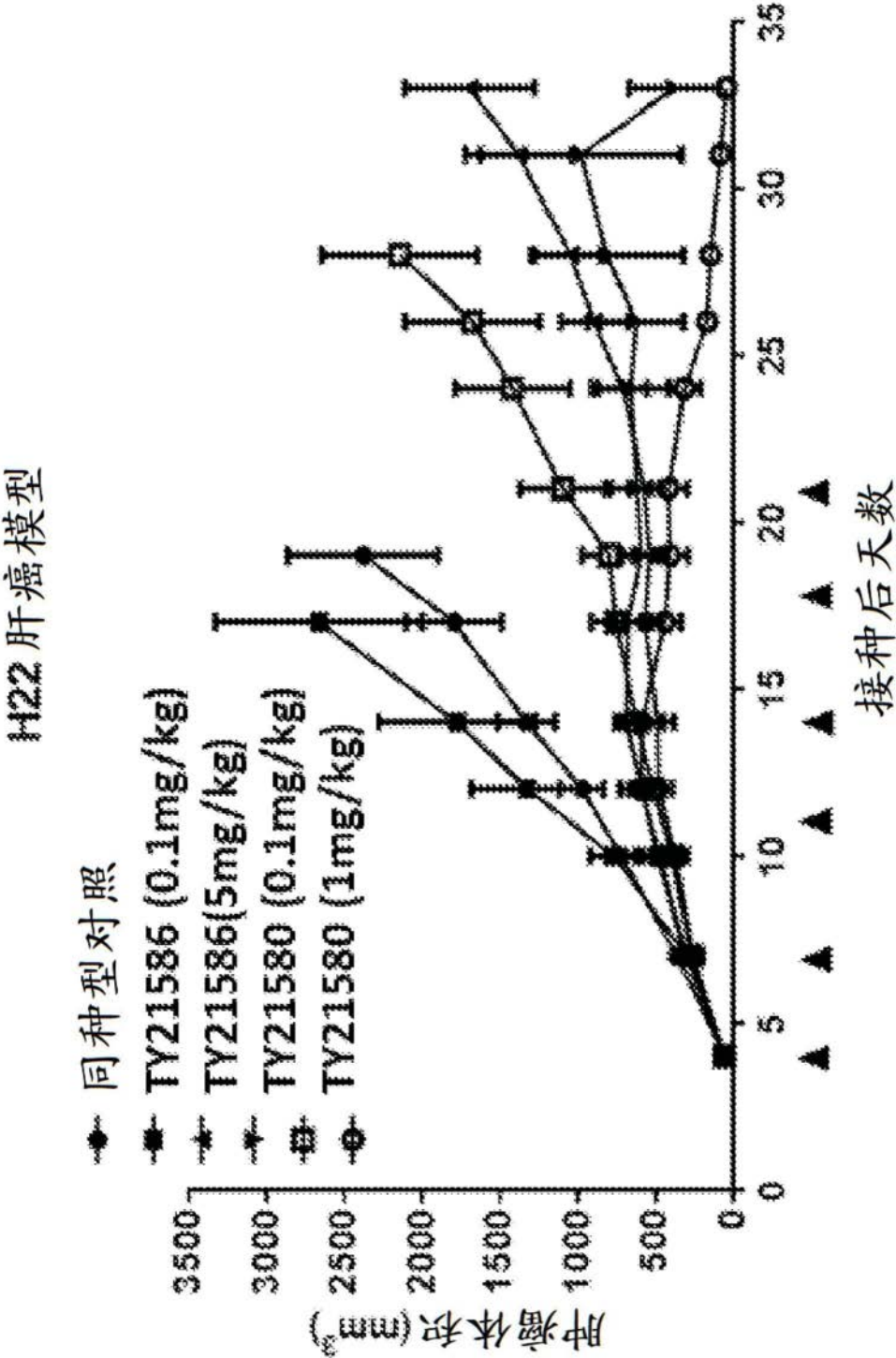


图17

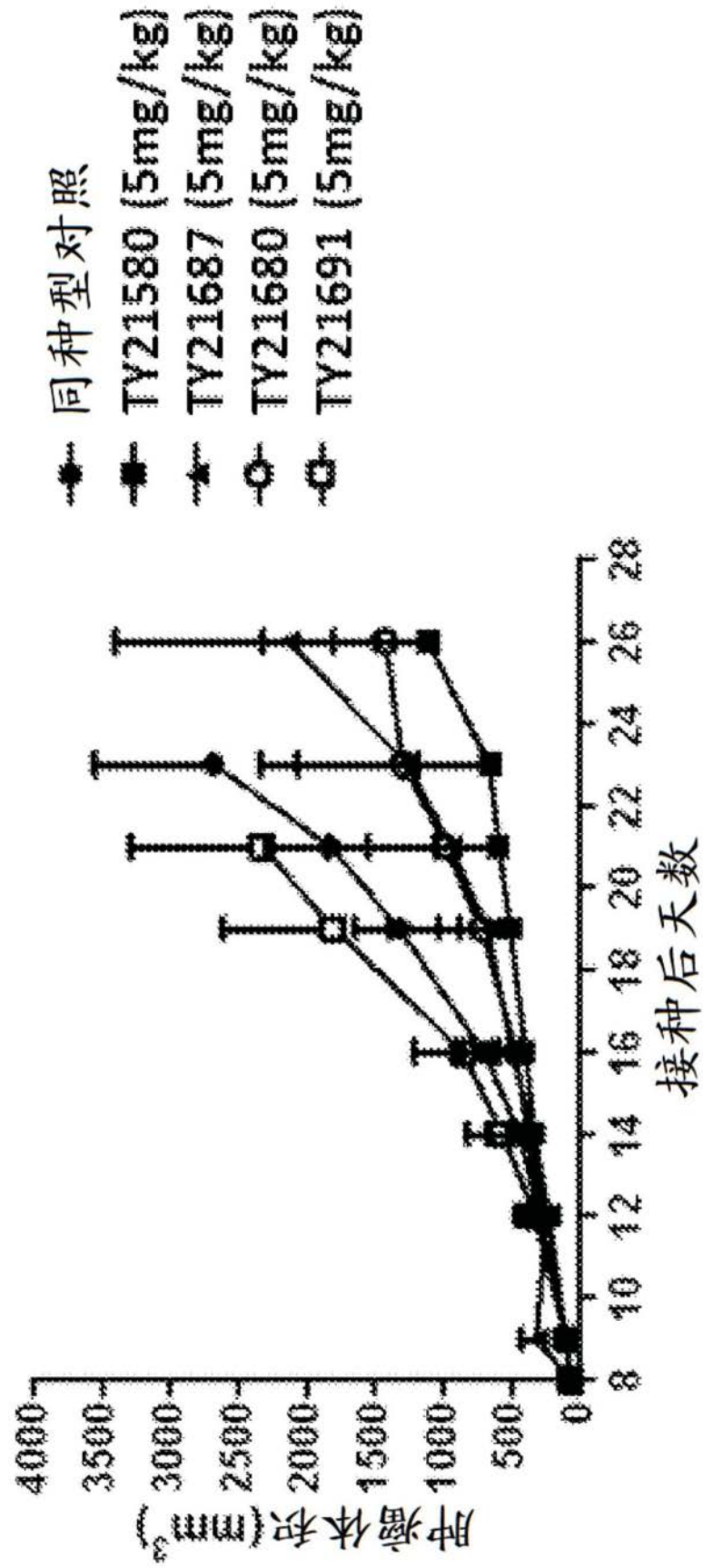


图18

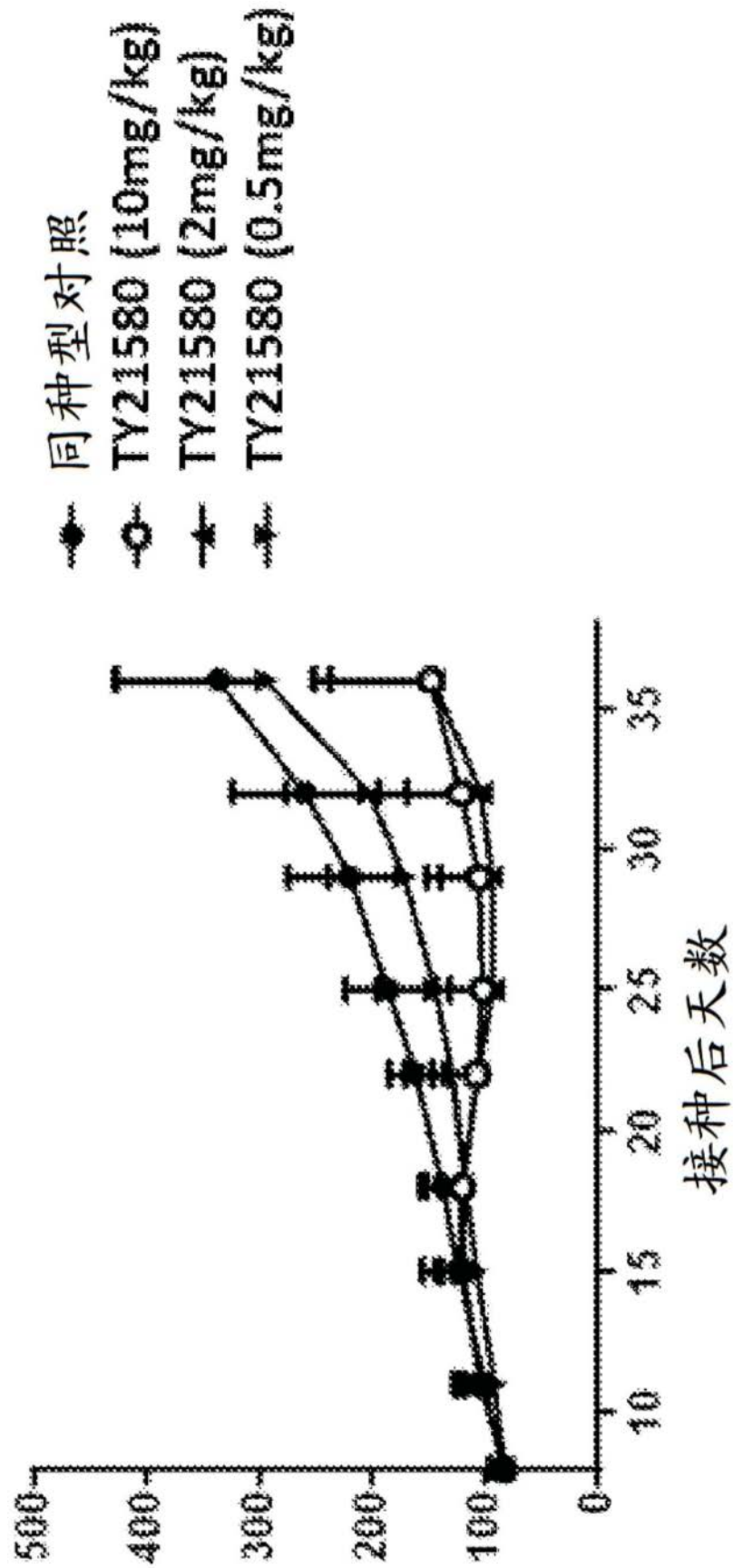


图19

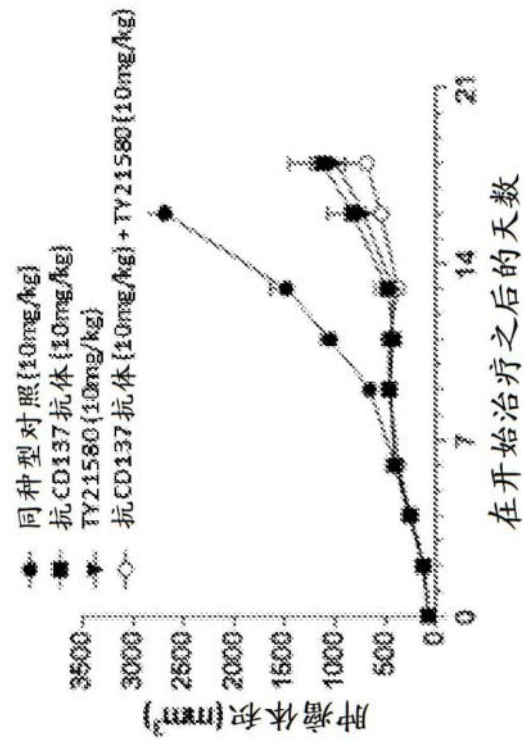


图20A

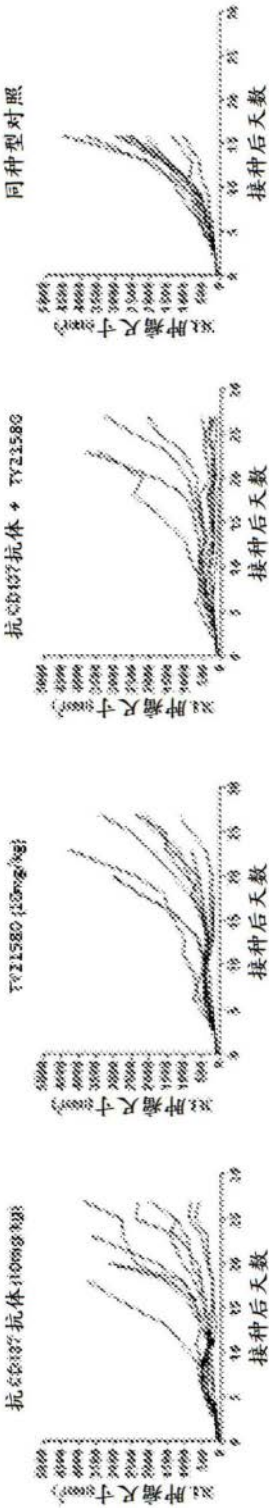


图20B

H22 肝癌模型

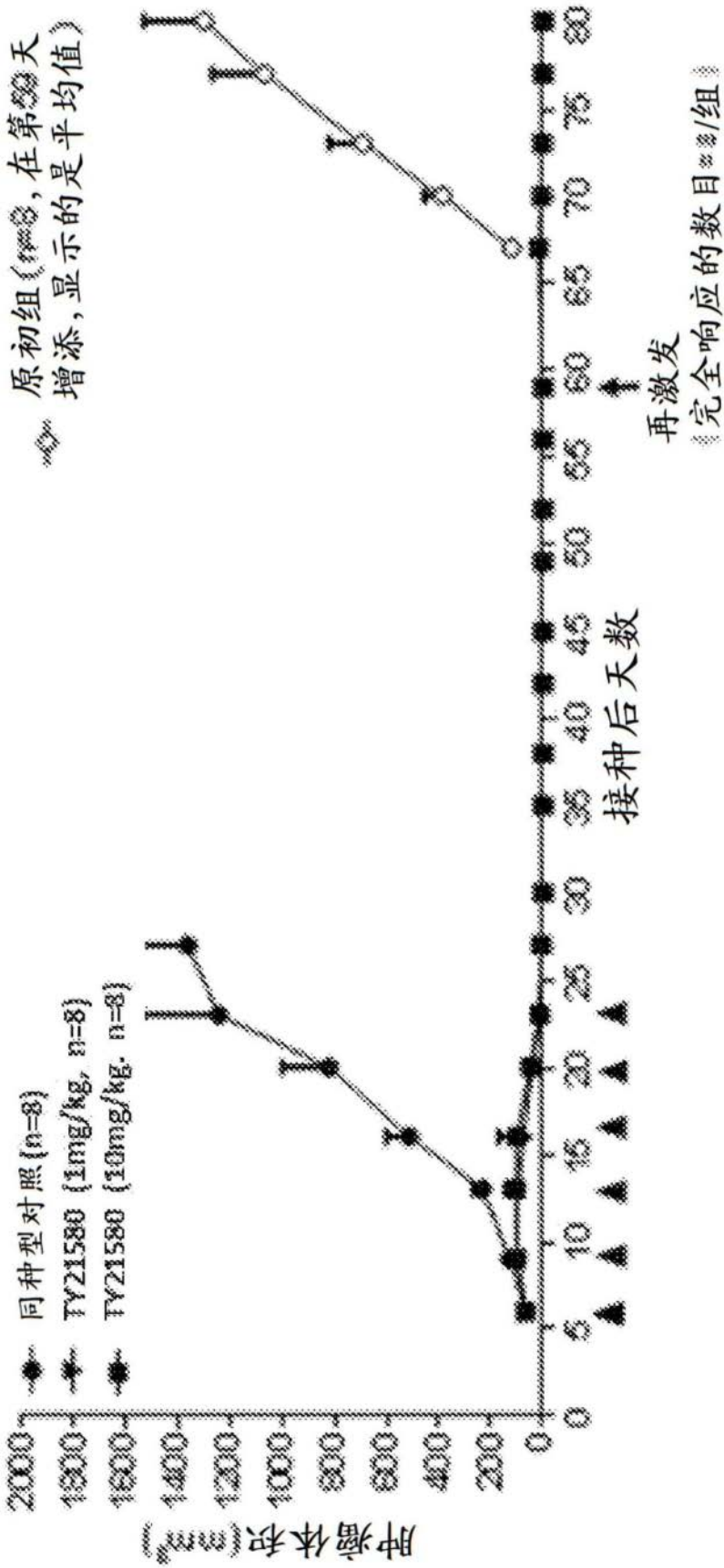


图21

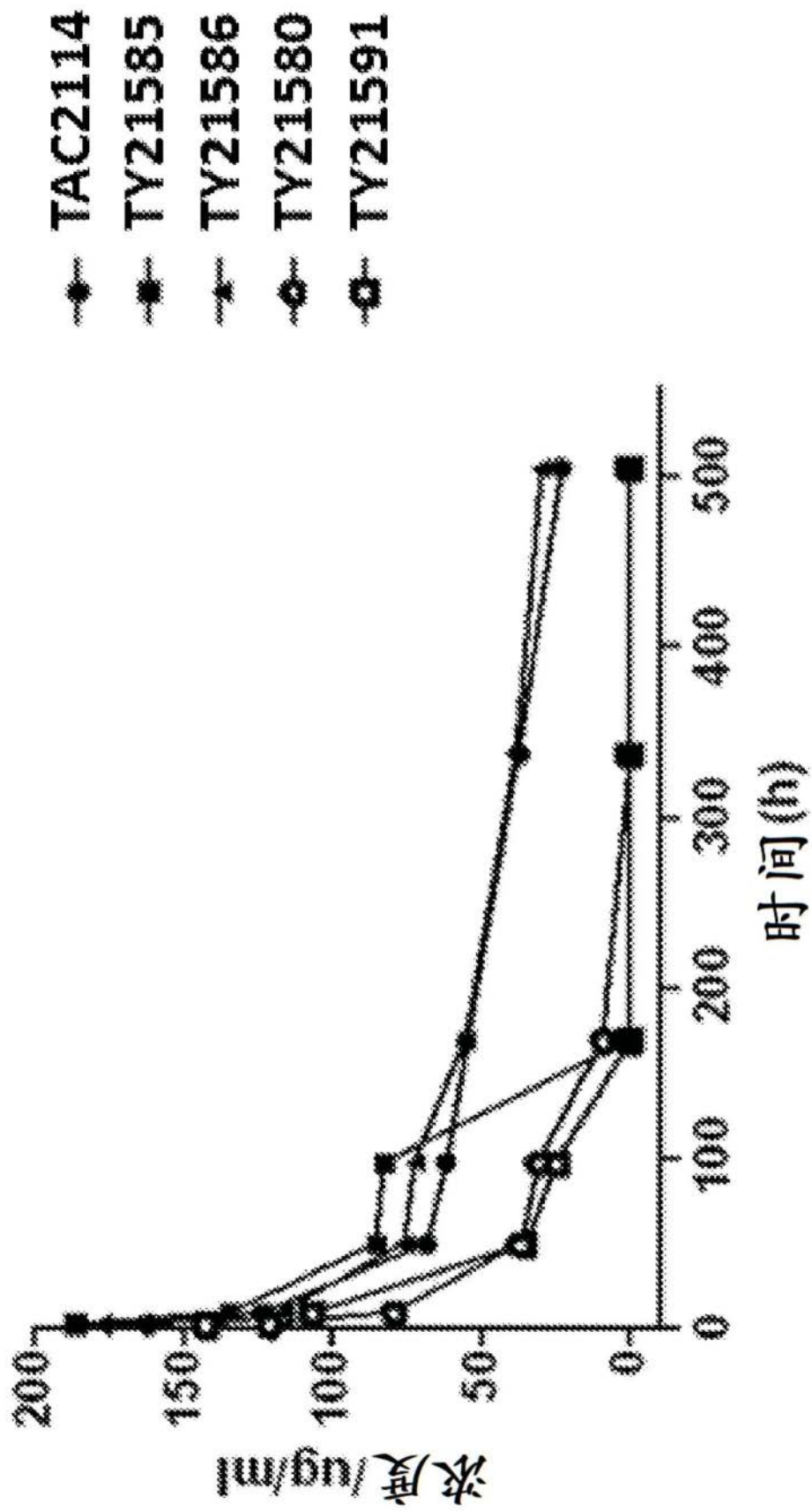


图22

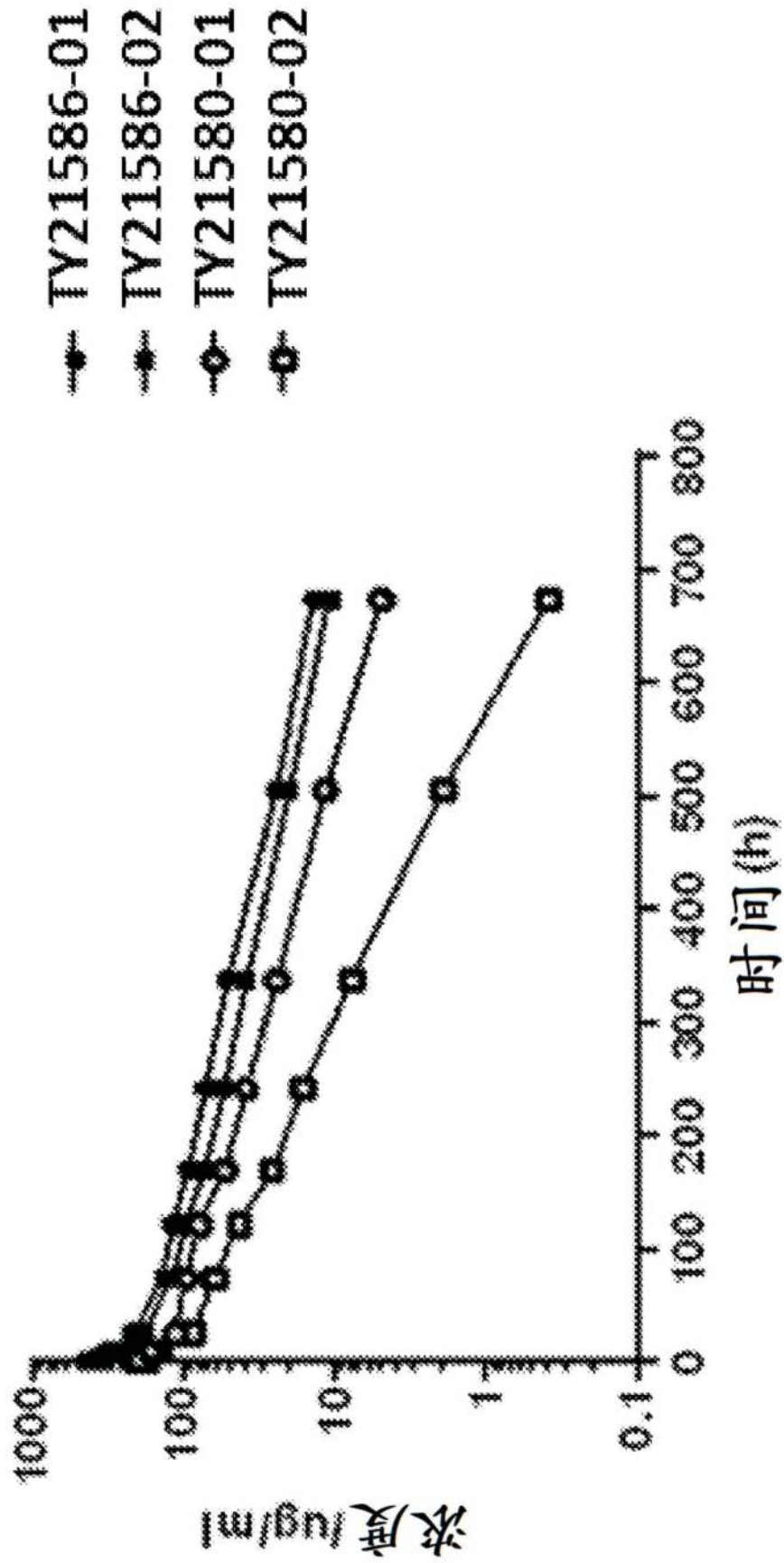


图23

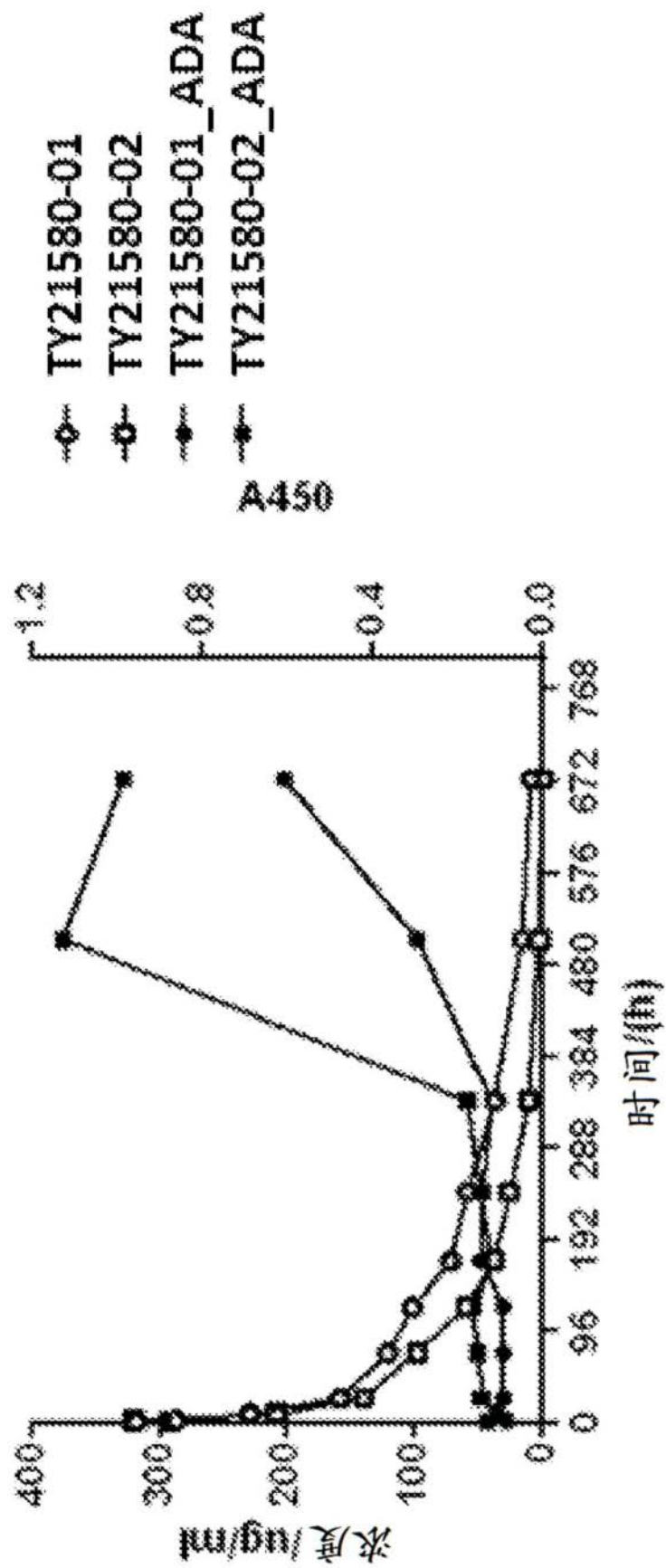


图24

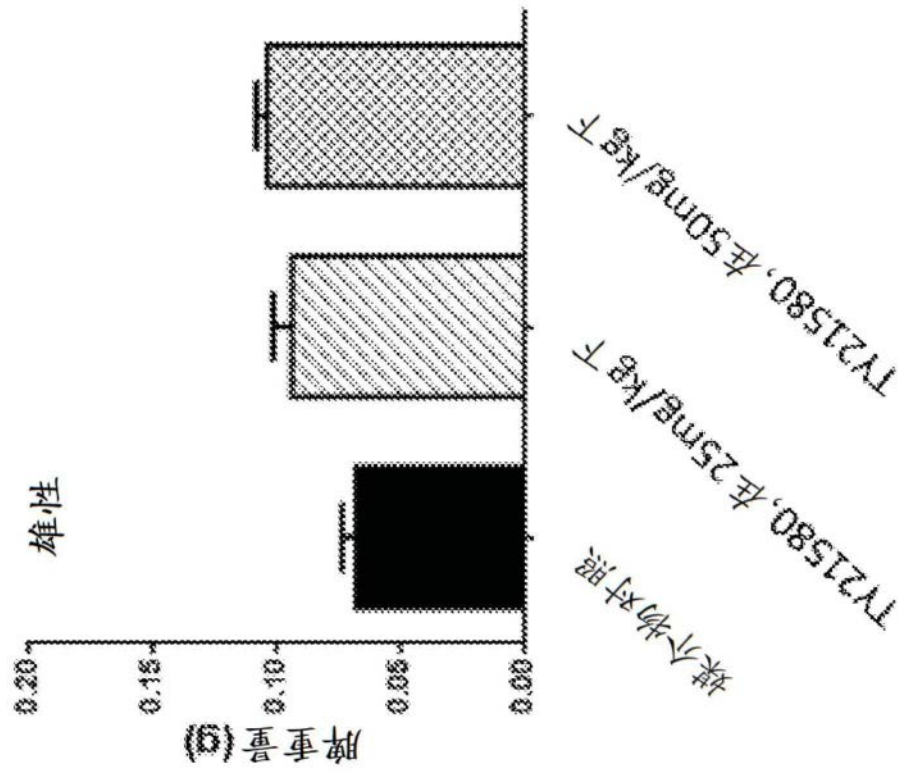


图25A

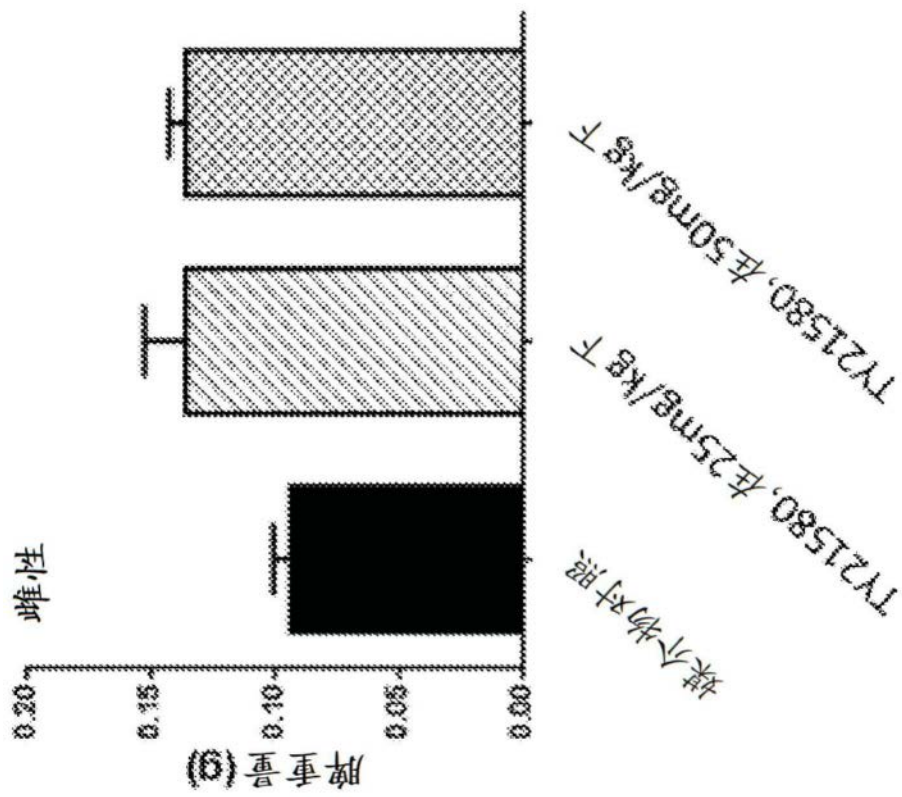


图25B

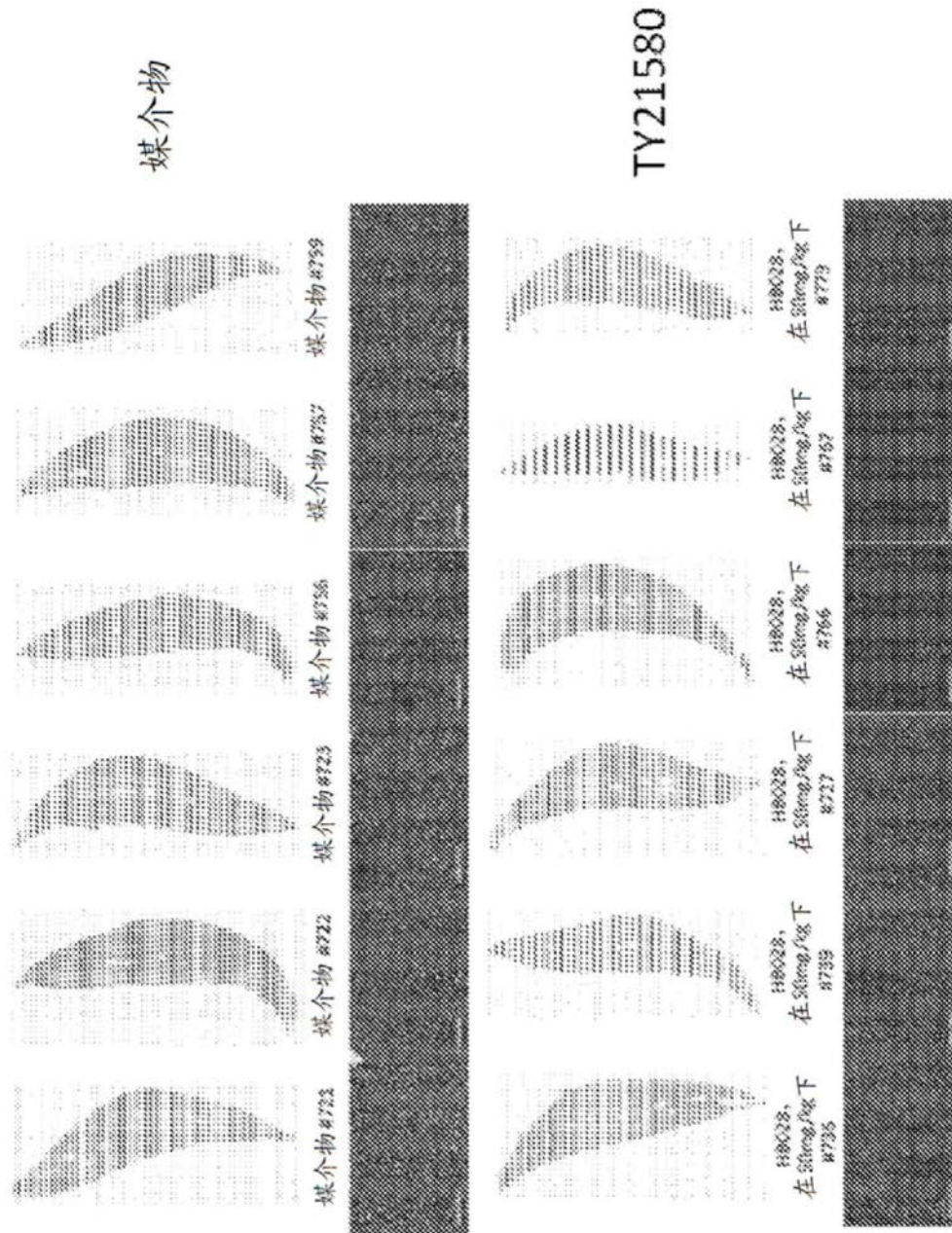


图26

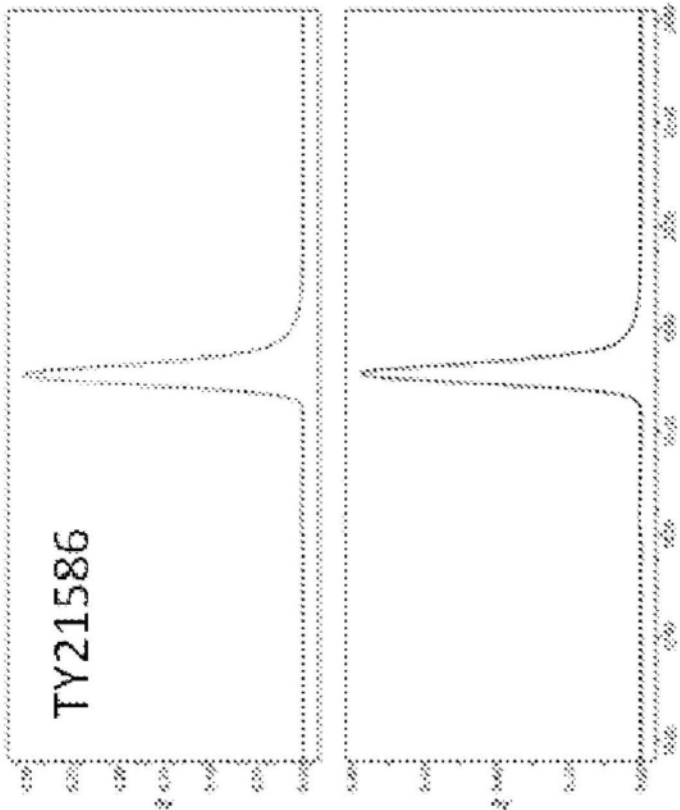


图27A

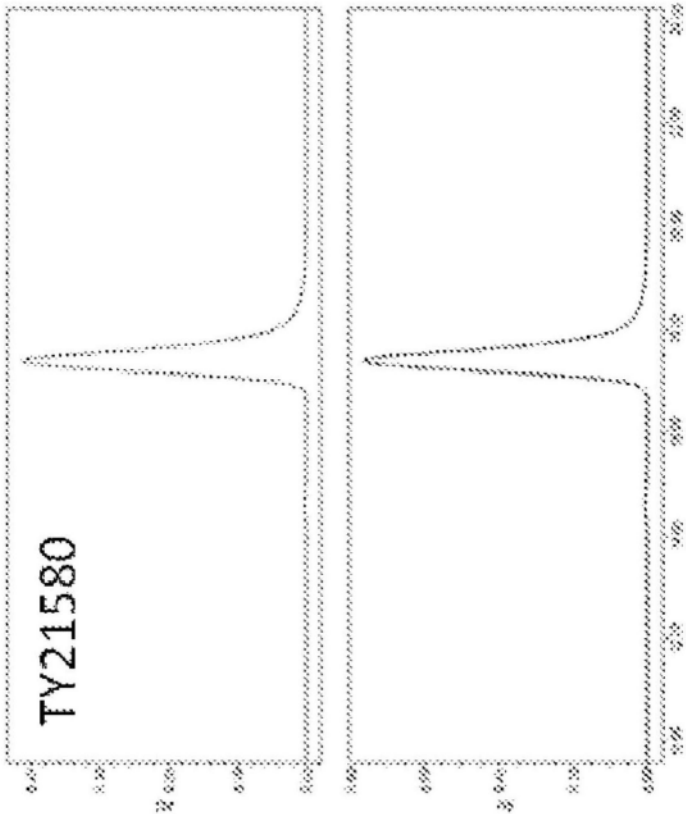


图27B

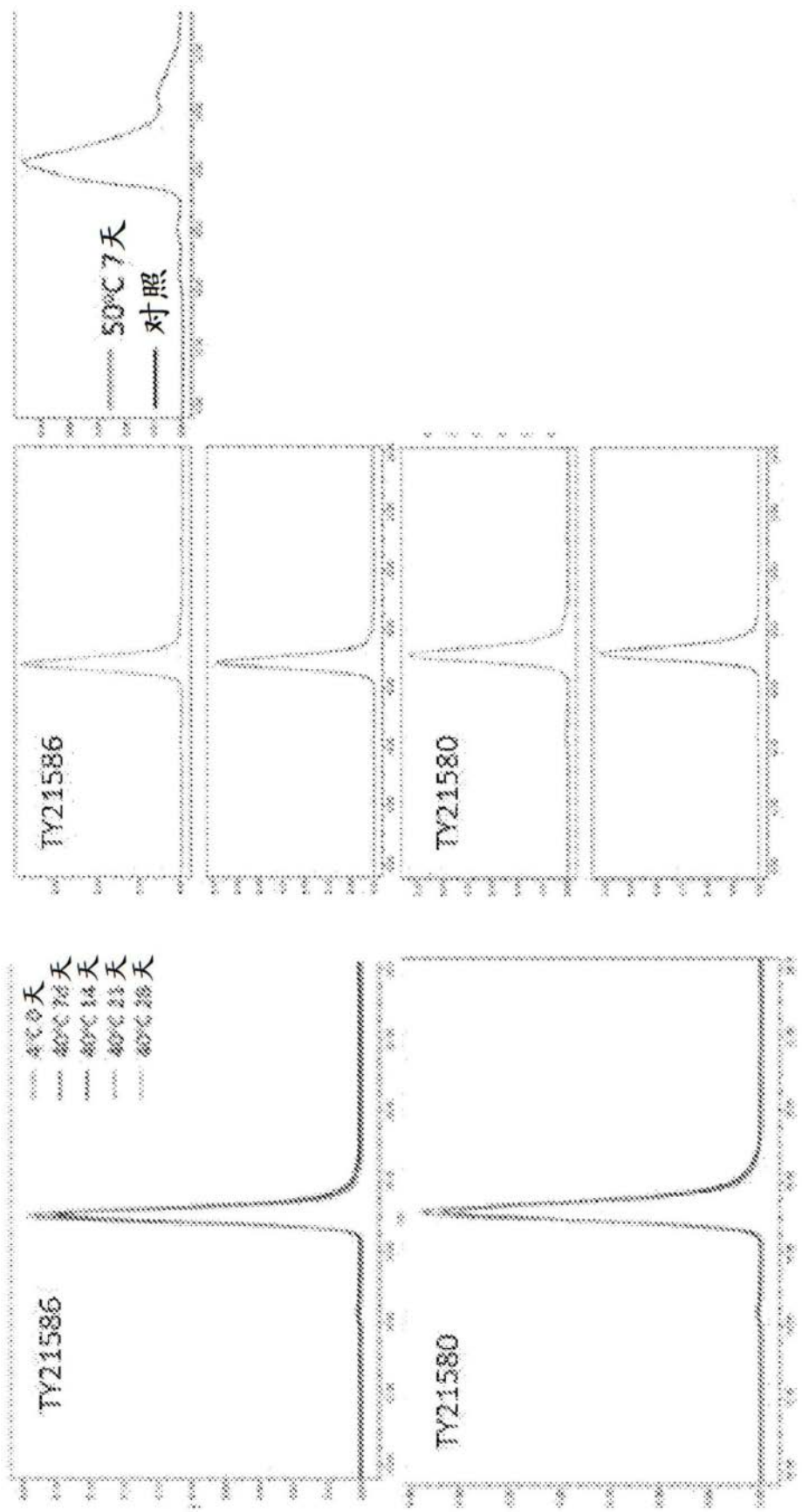


图28

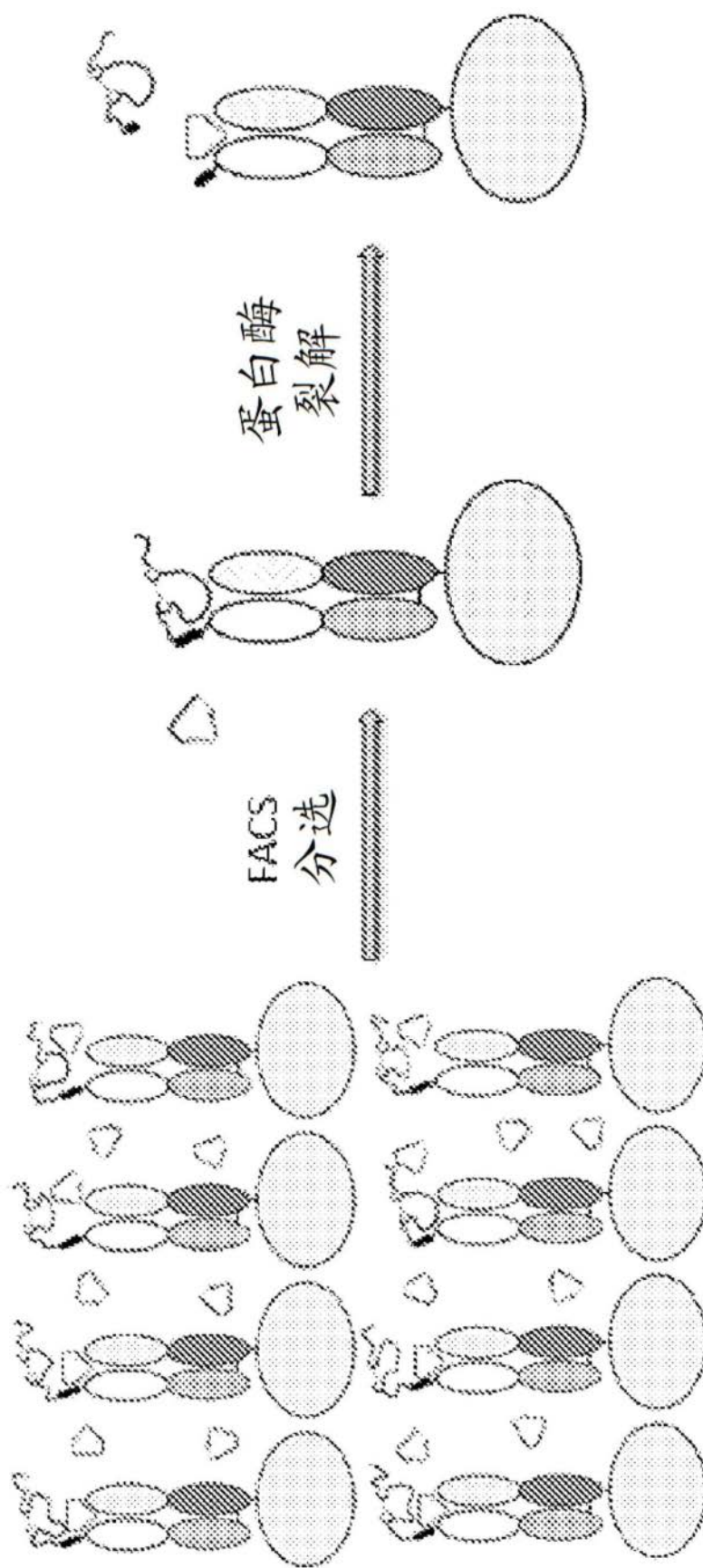


图29

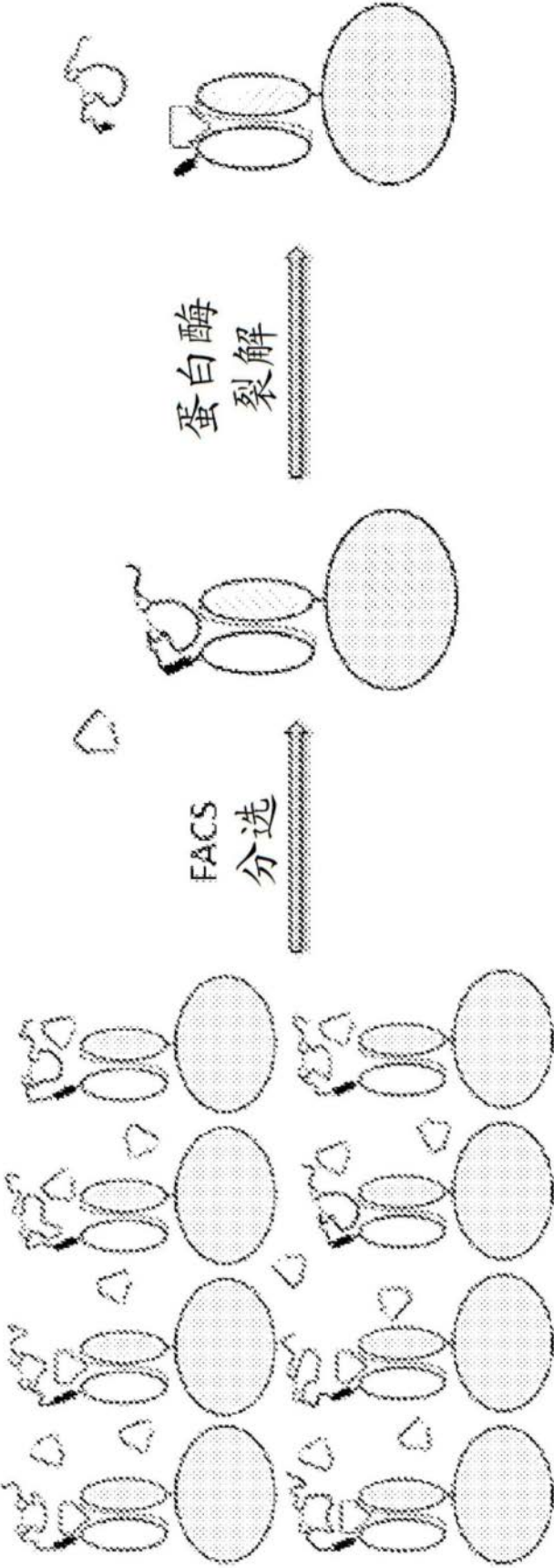


图30

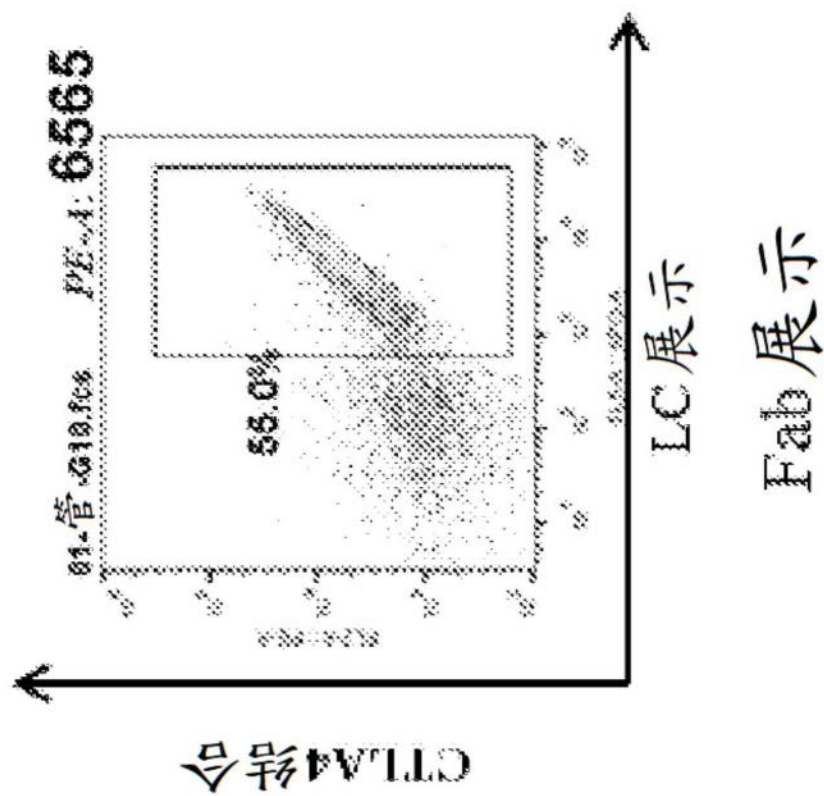


图31A

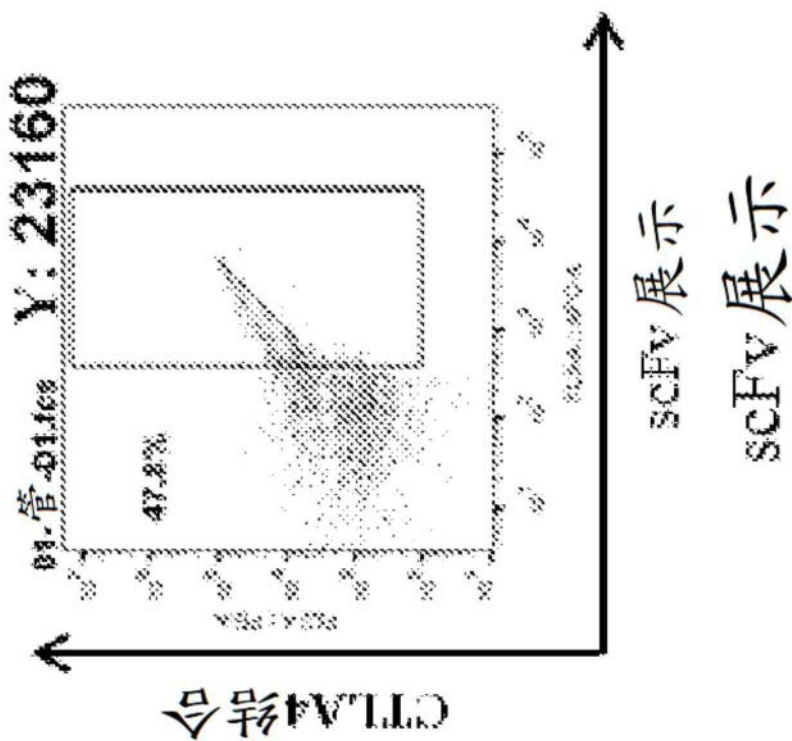


图31B

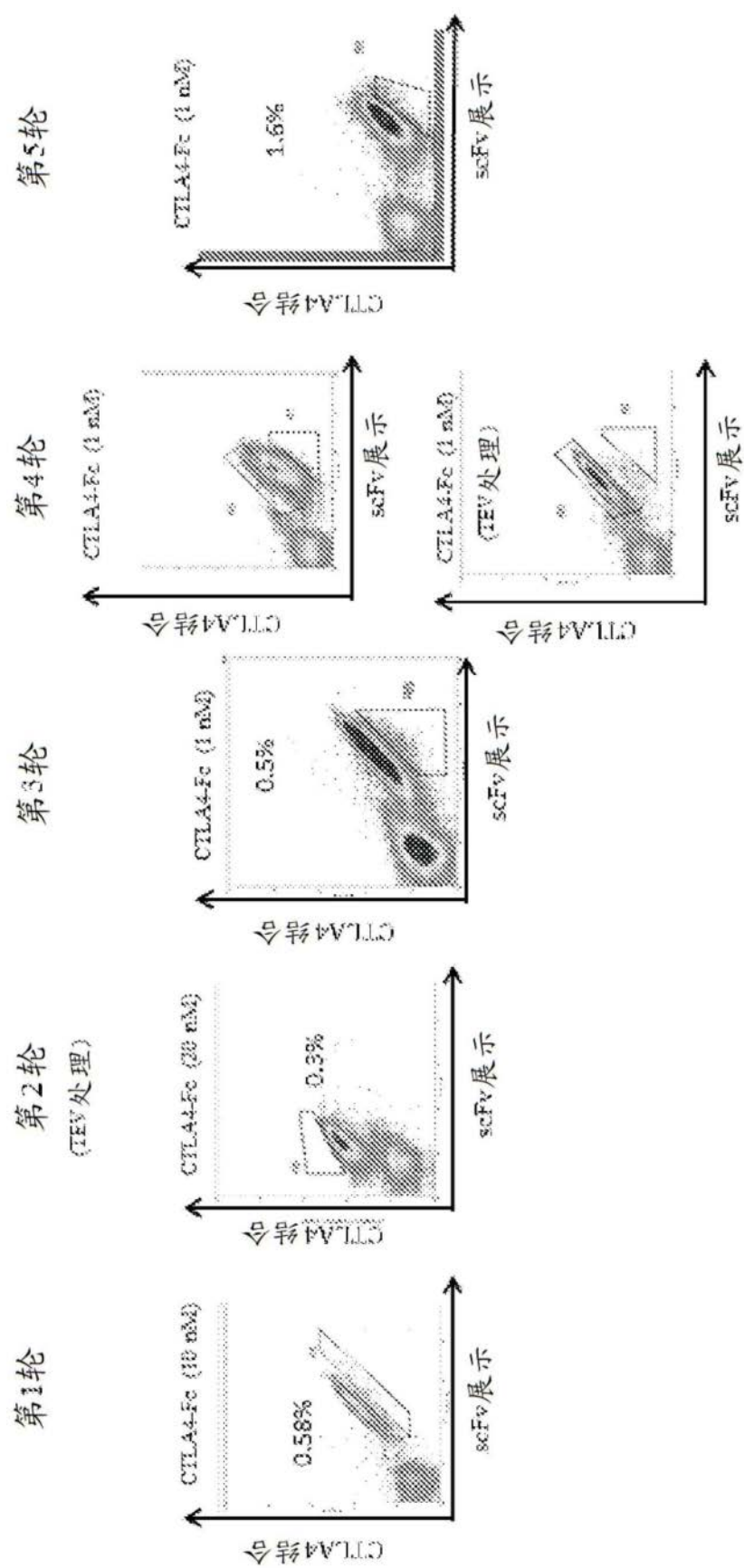


图32

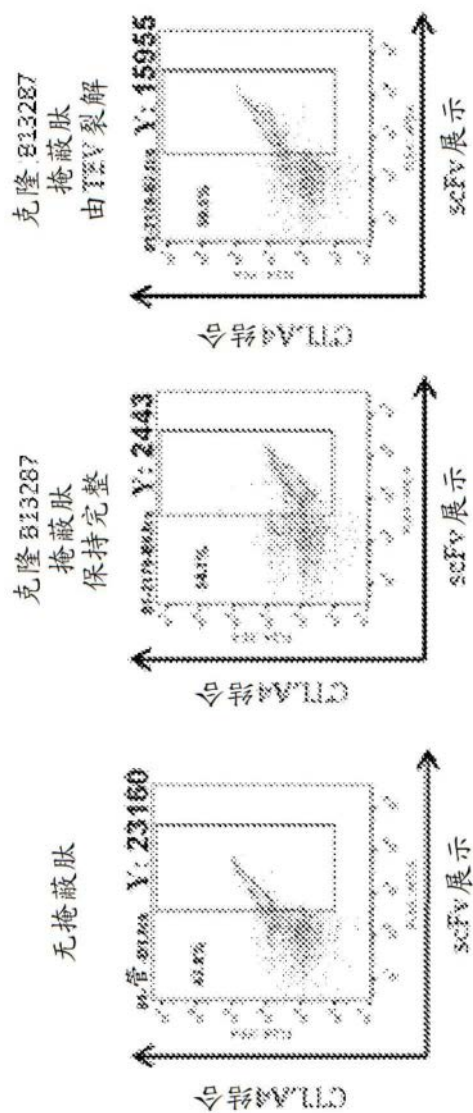


图33A

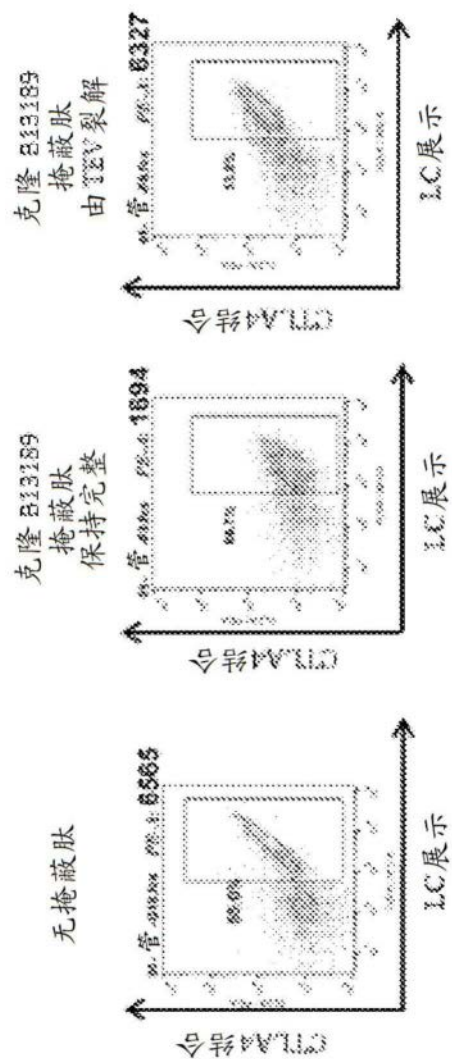


图33B

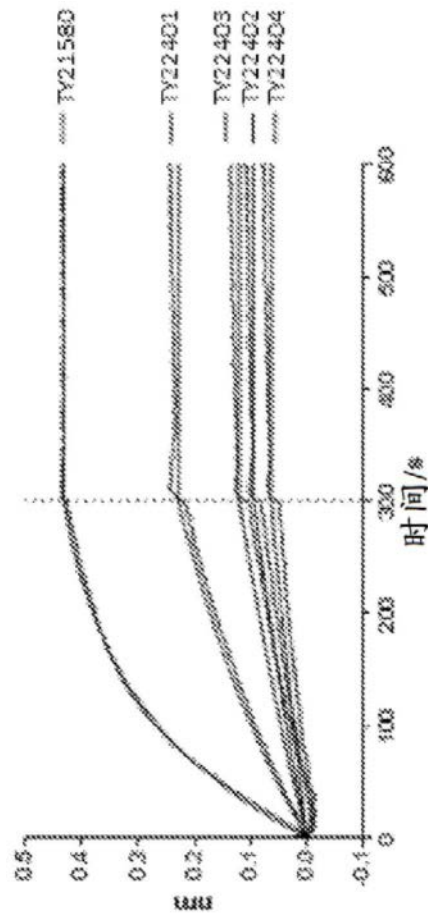


图34A

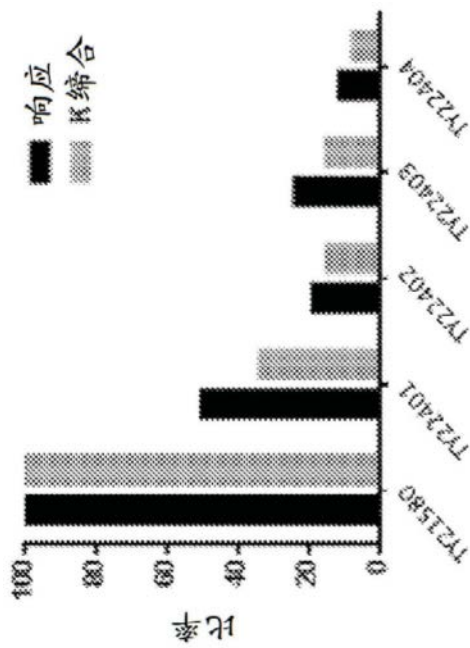


图34B

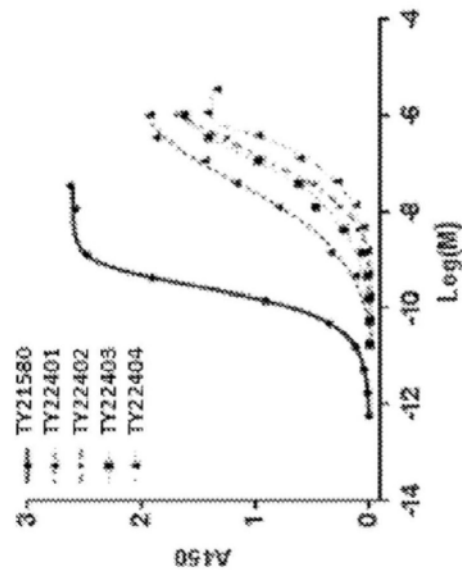


图35A

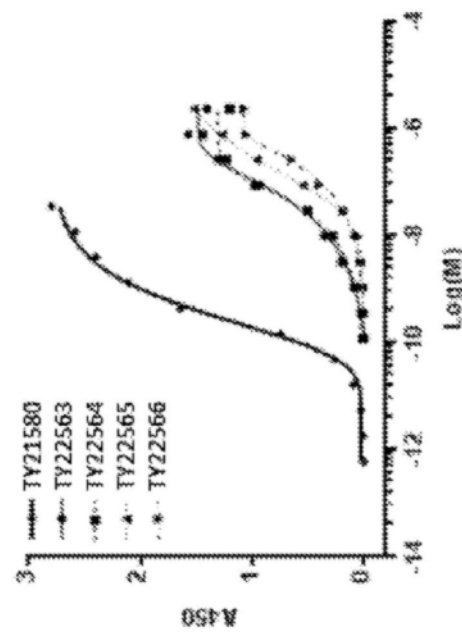


图35B

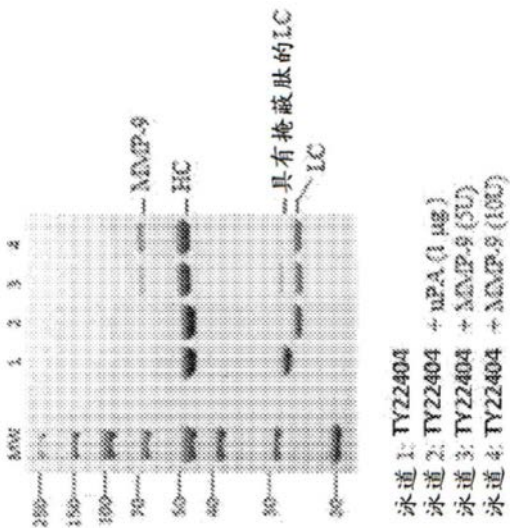


图36A

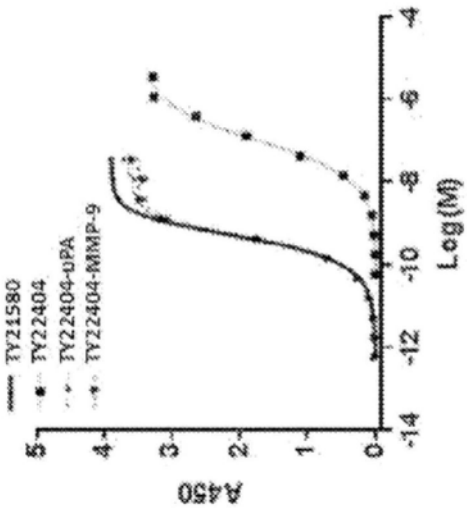


图36B

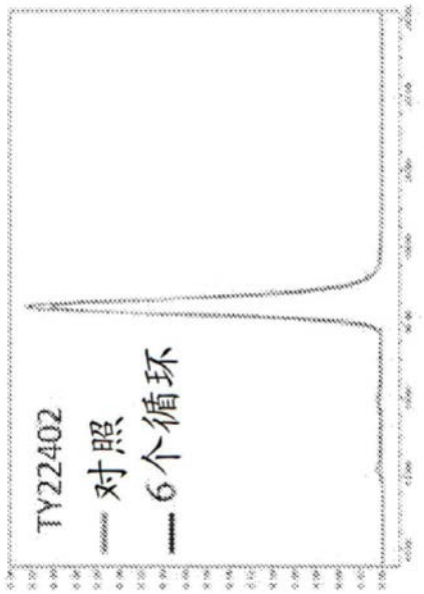


图37A

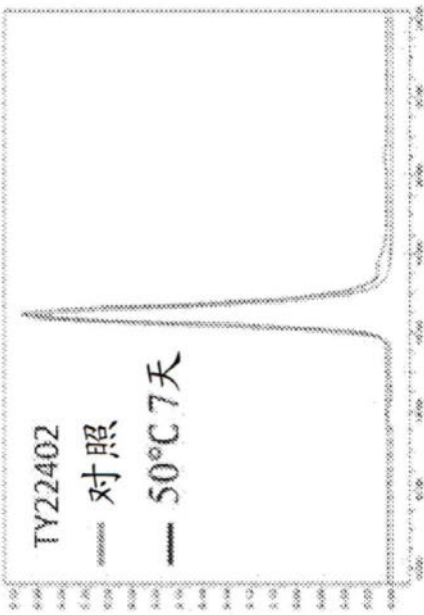


图37B

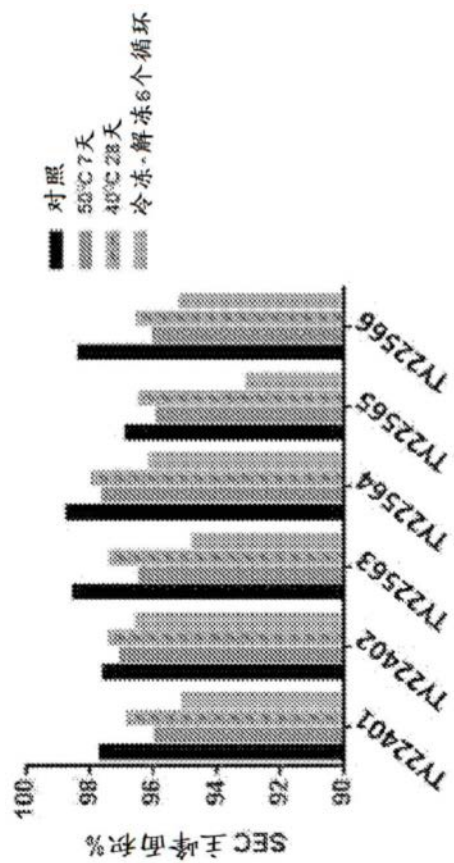


图37C

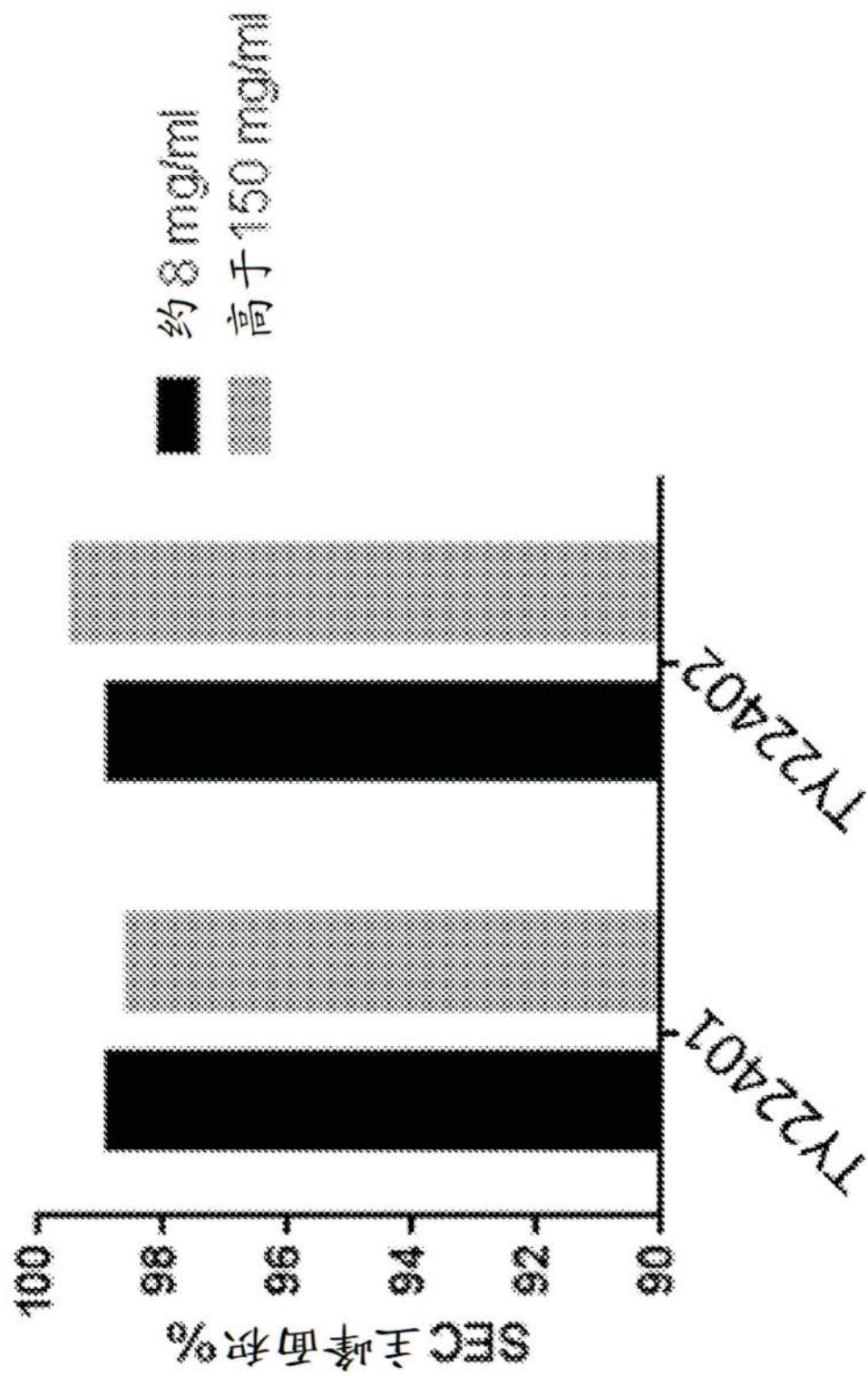


图38

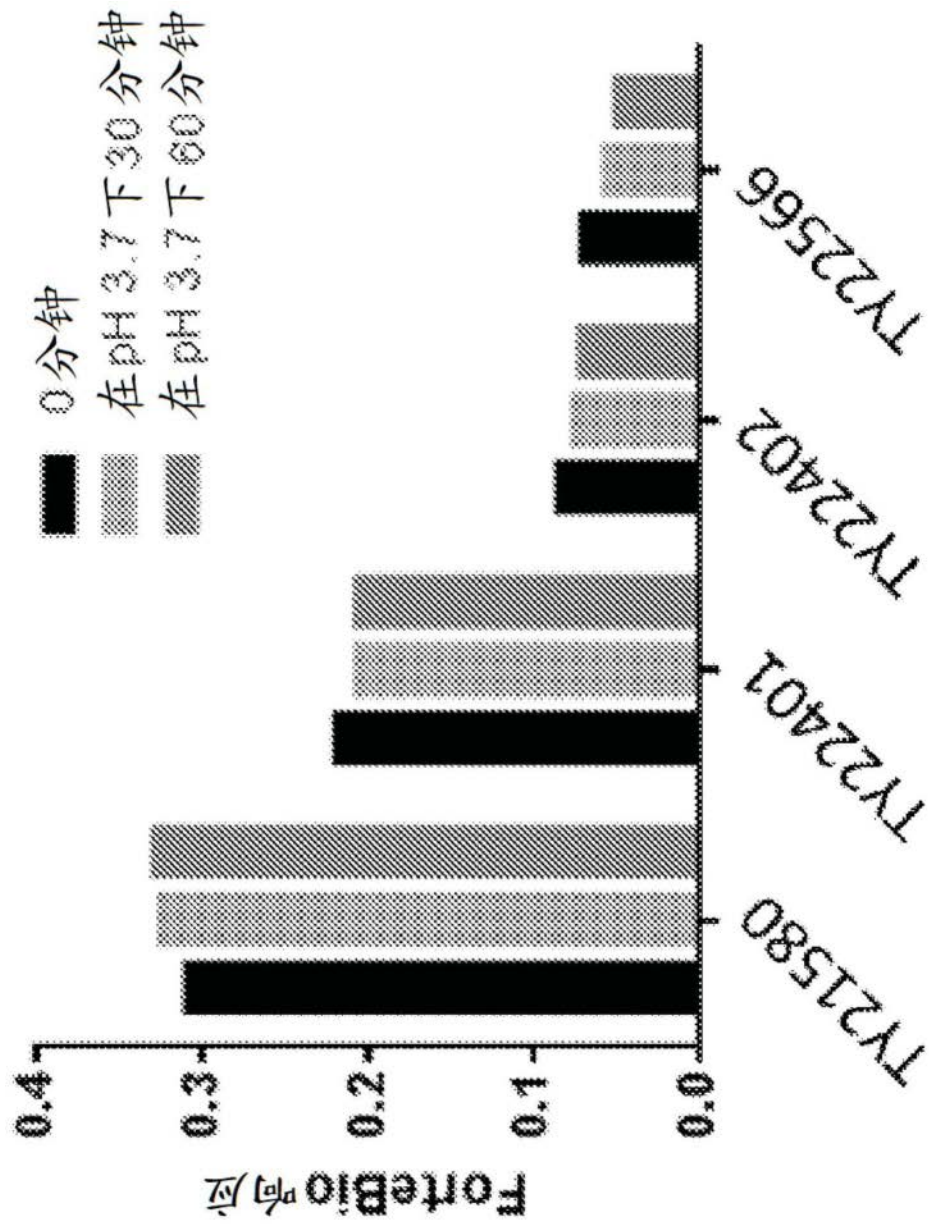


图39

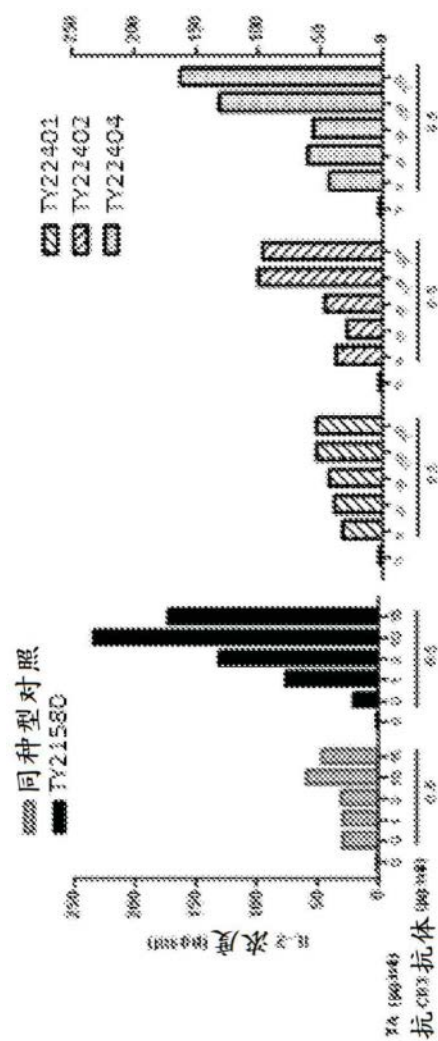


图40A

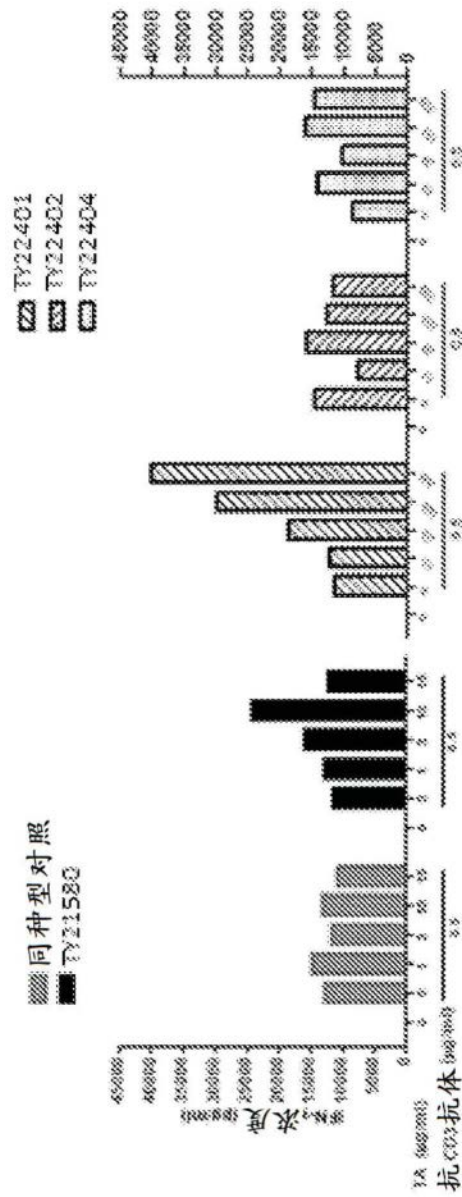


图40B

针对293F/BN2074细胞的ADCC活性
(ADCC报告基因测定)

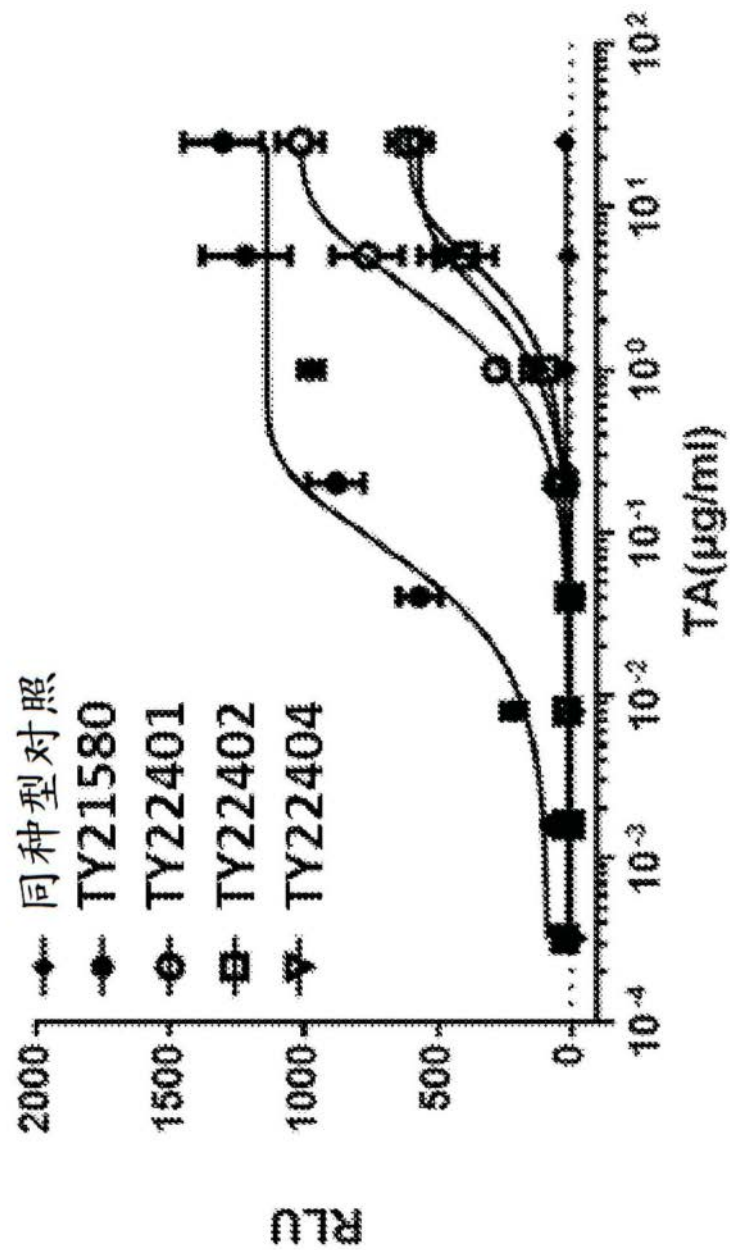


图41

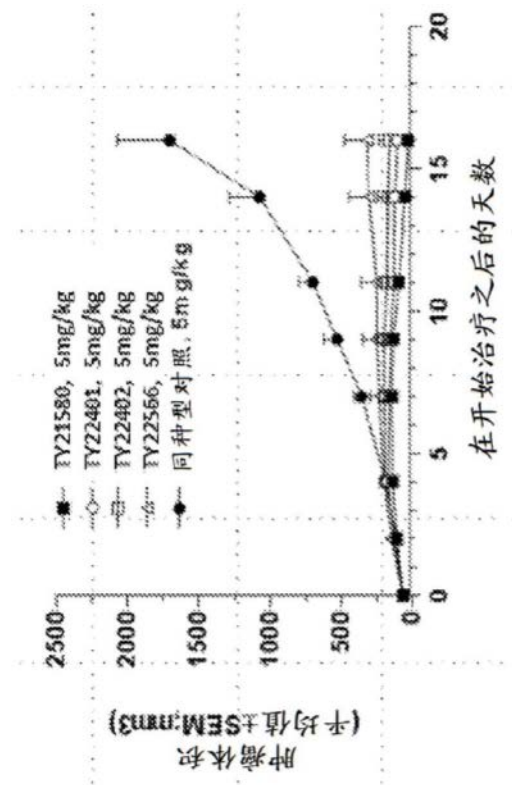


图42A

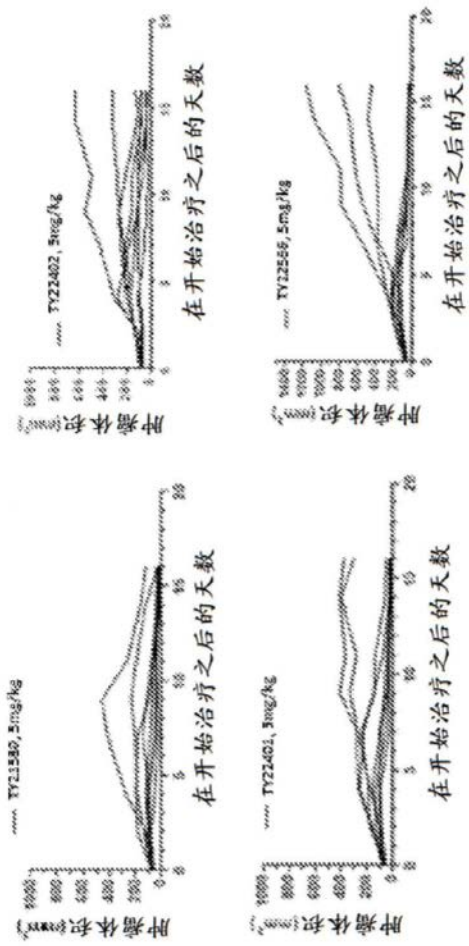


图42B

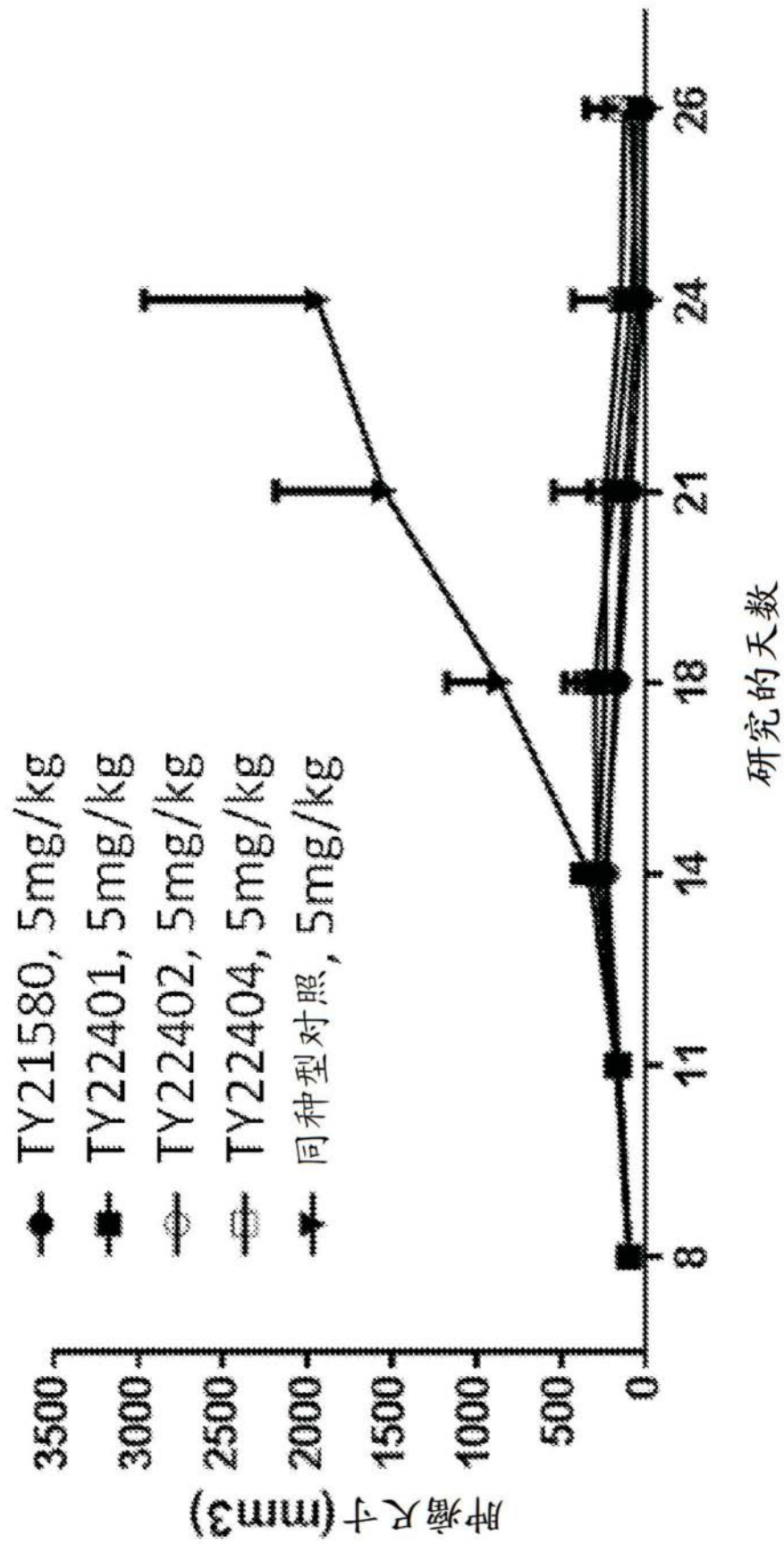


图43

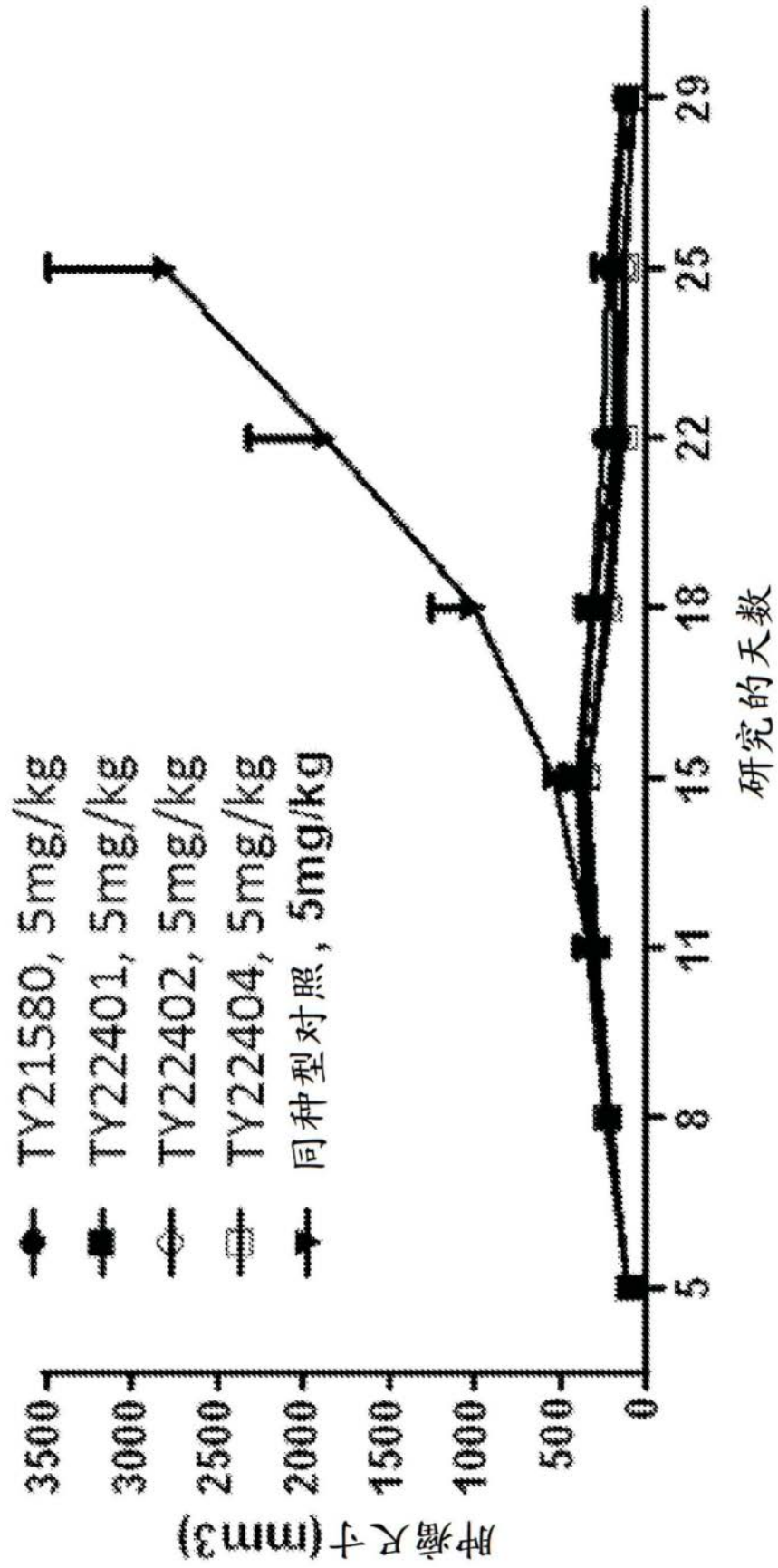


图44

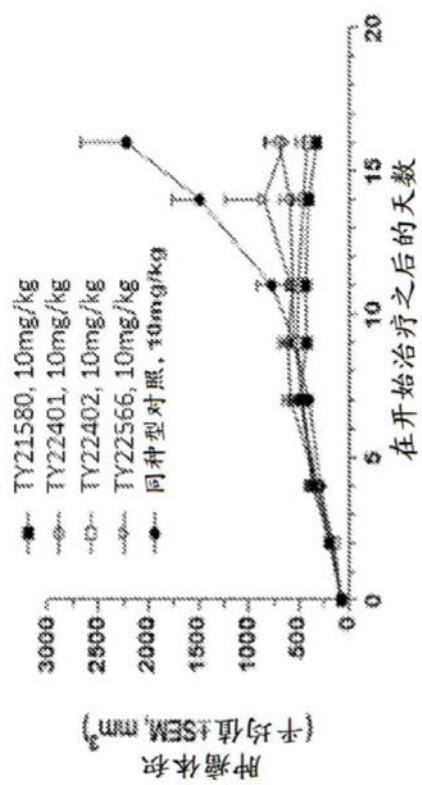


图45A

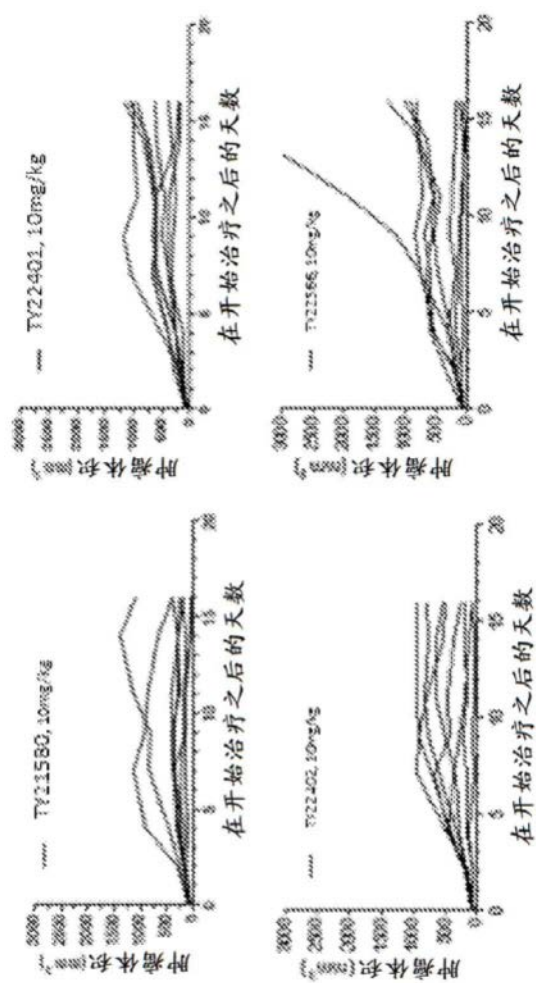


图45B

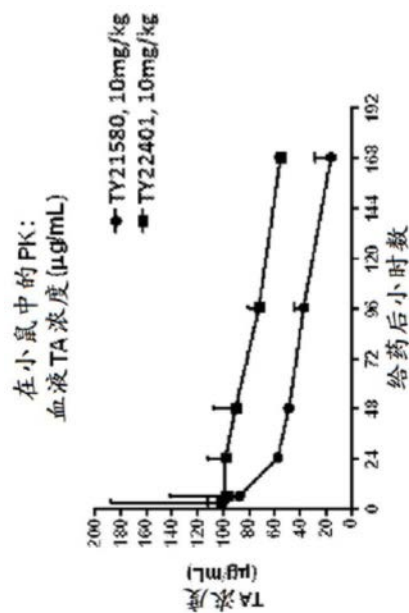


图46A

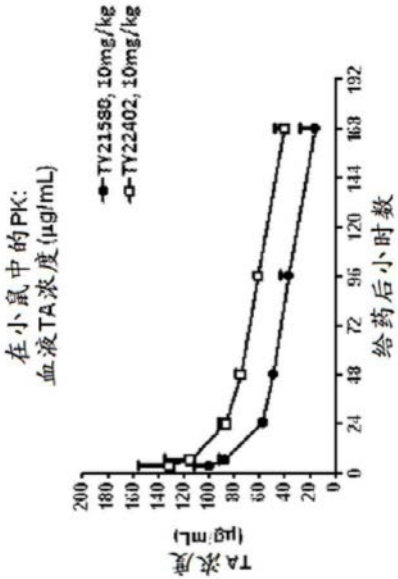


图46B

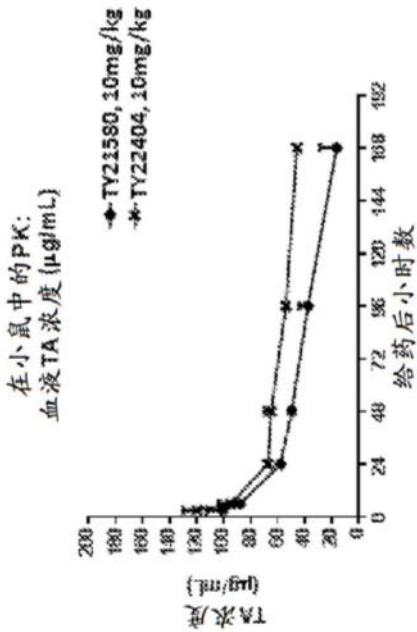


图46C

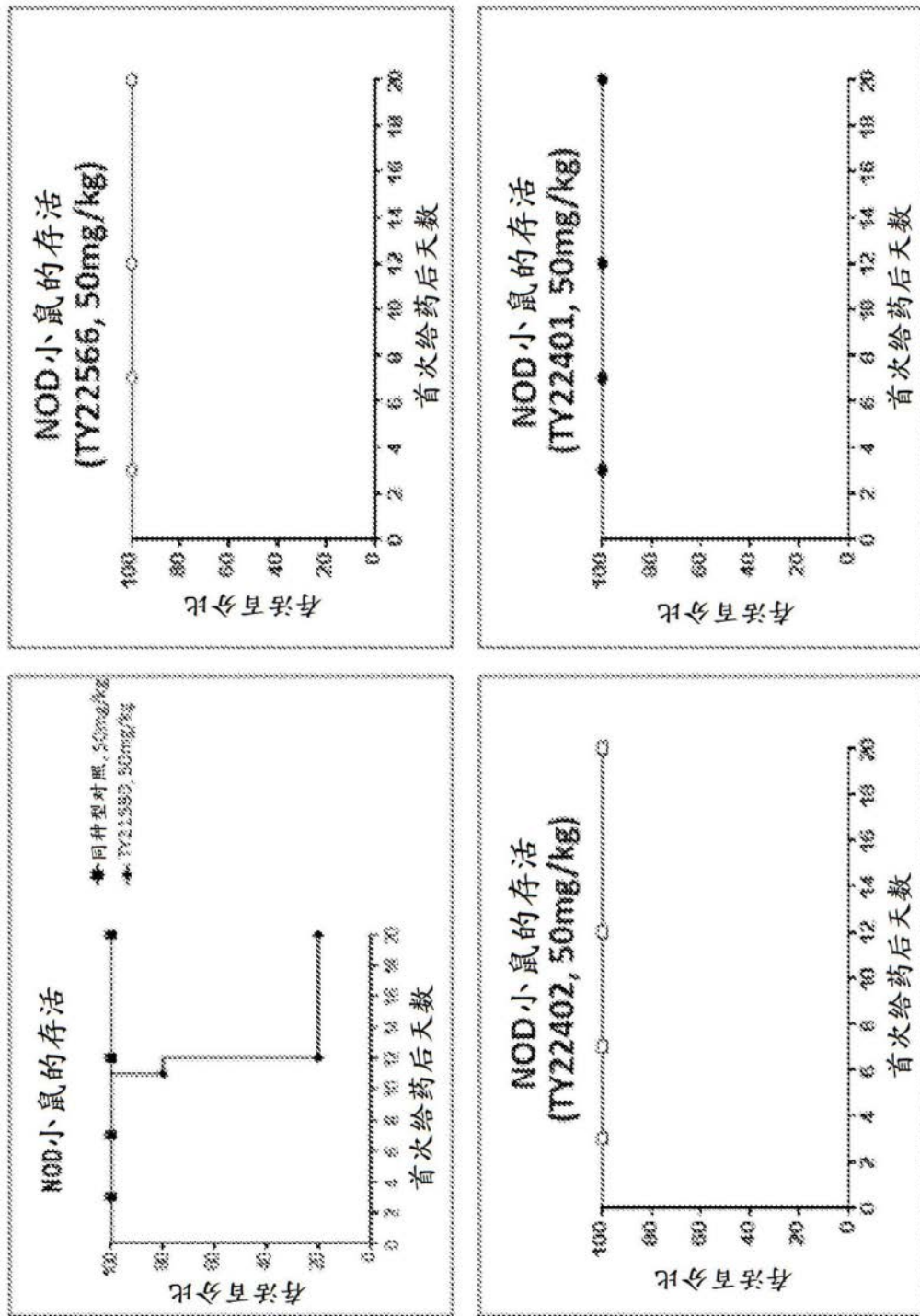


图47

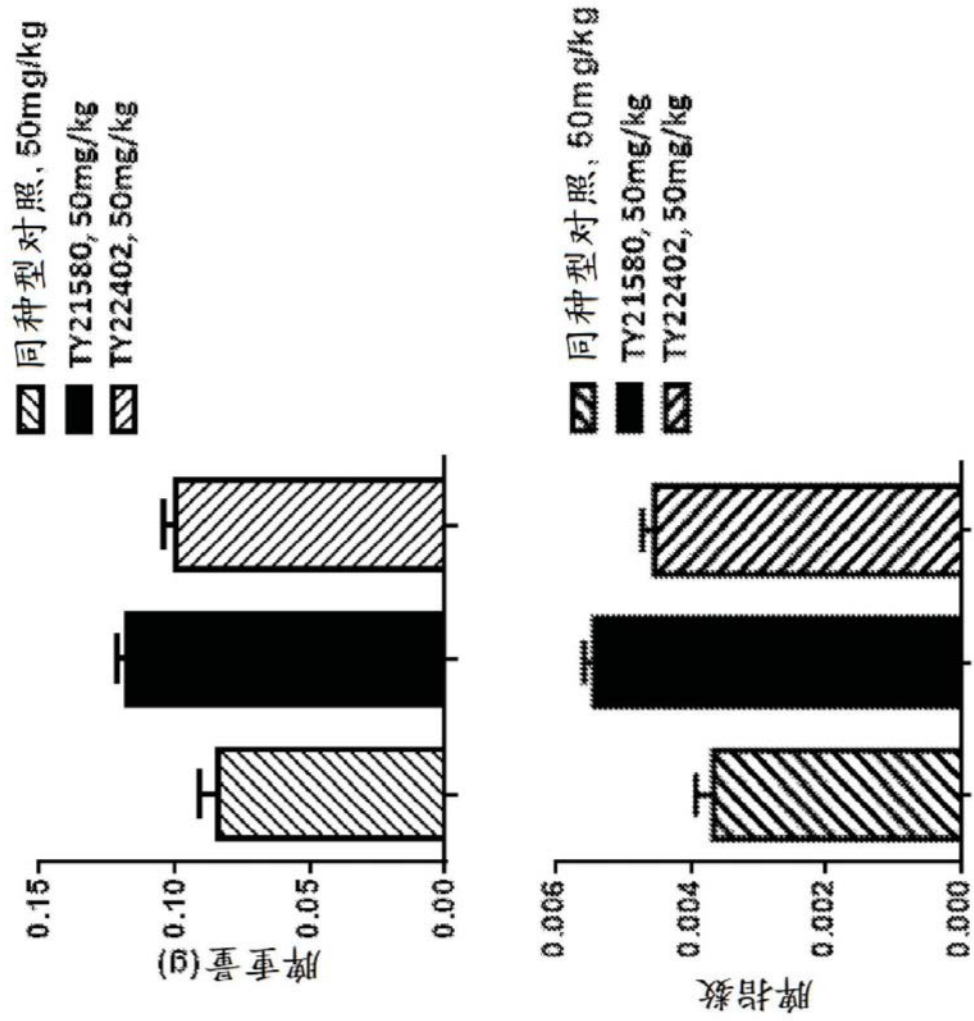


图48A

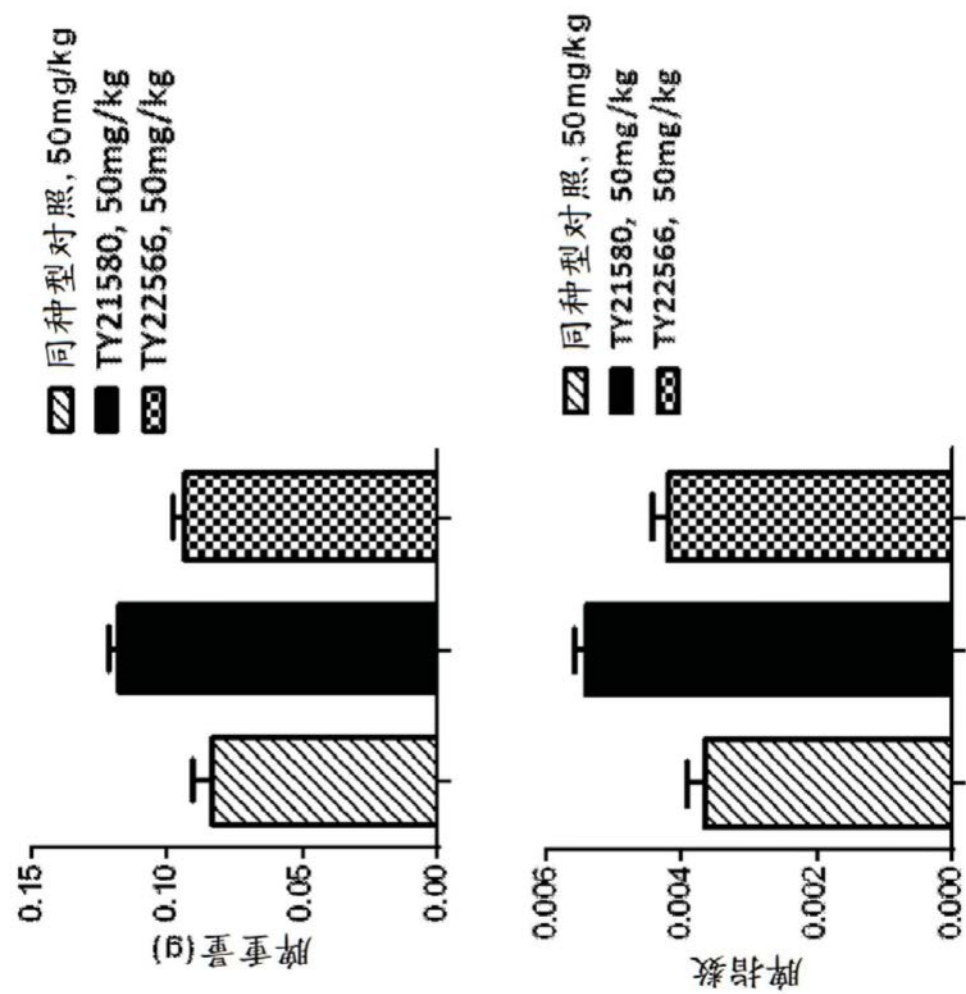


图48B

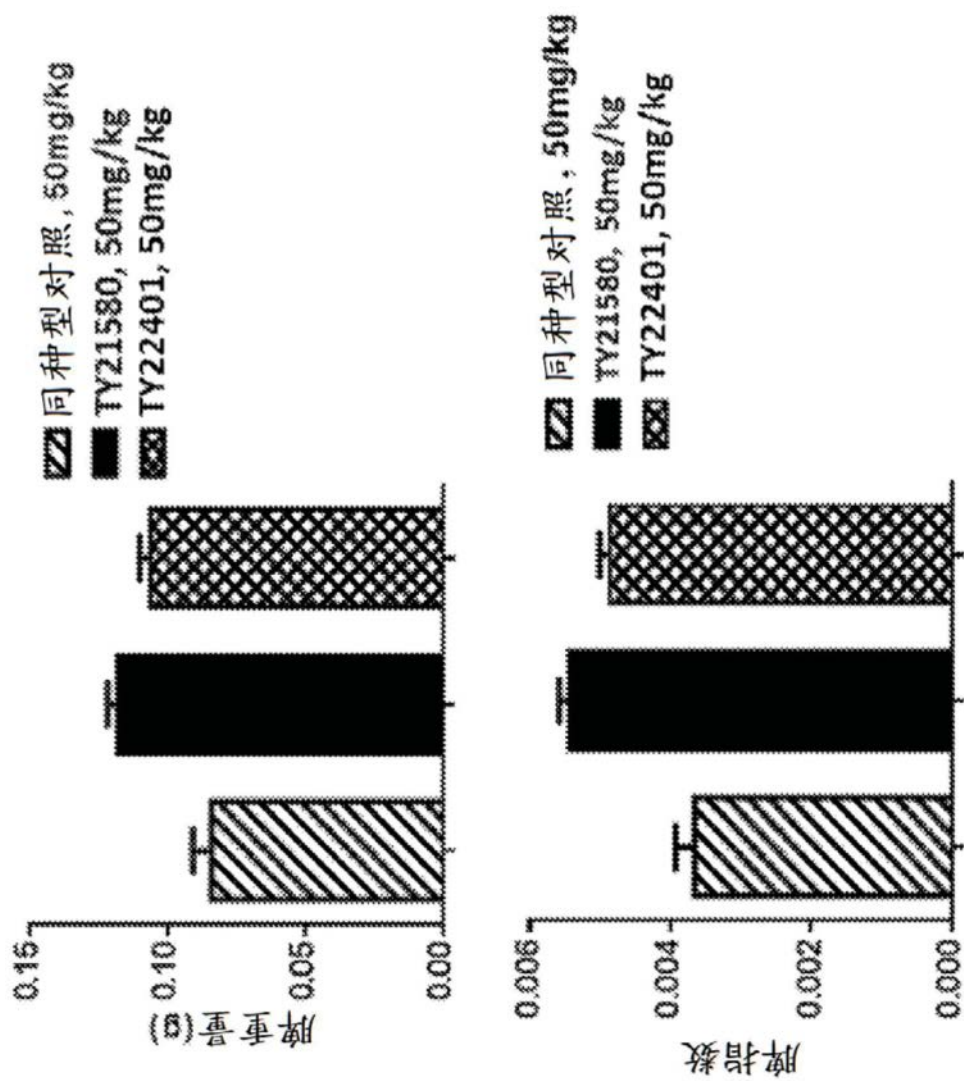


图48C

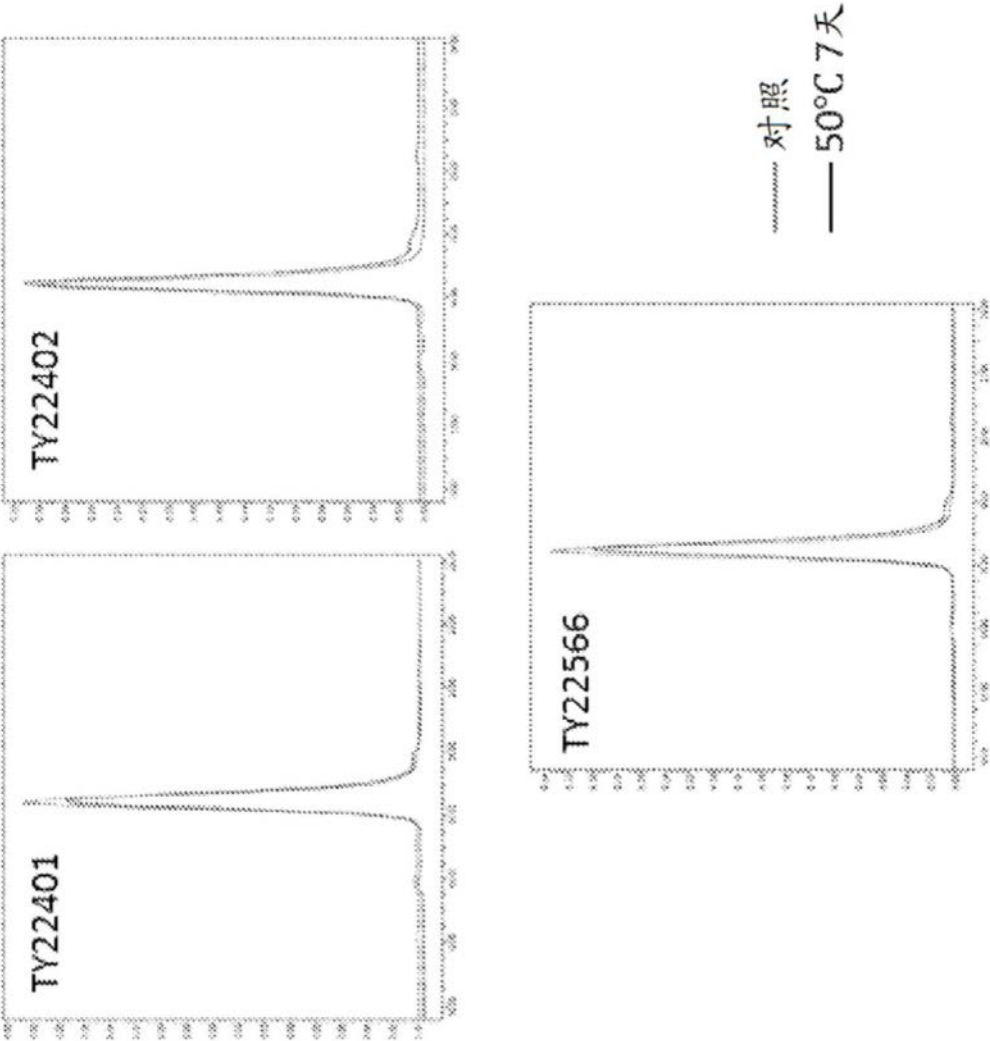


图49

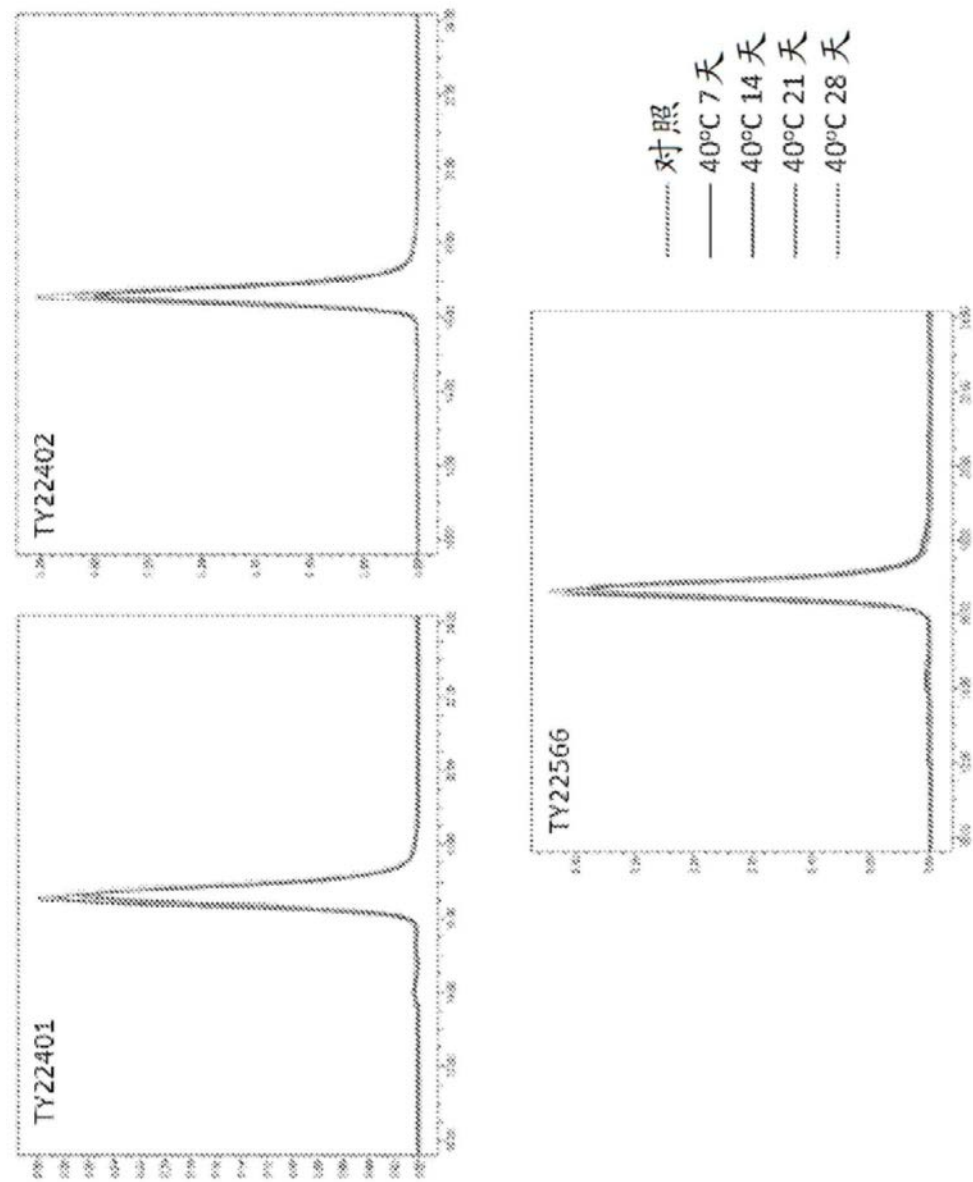


图50

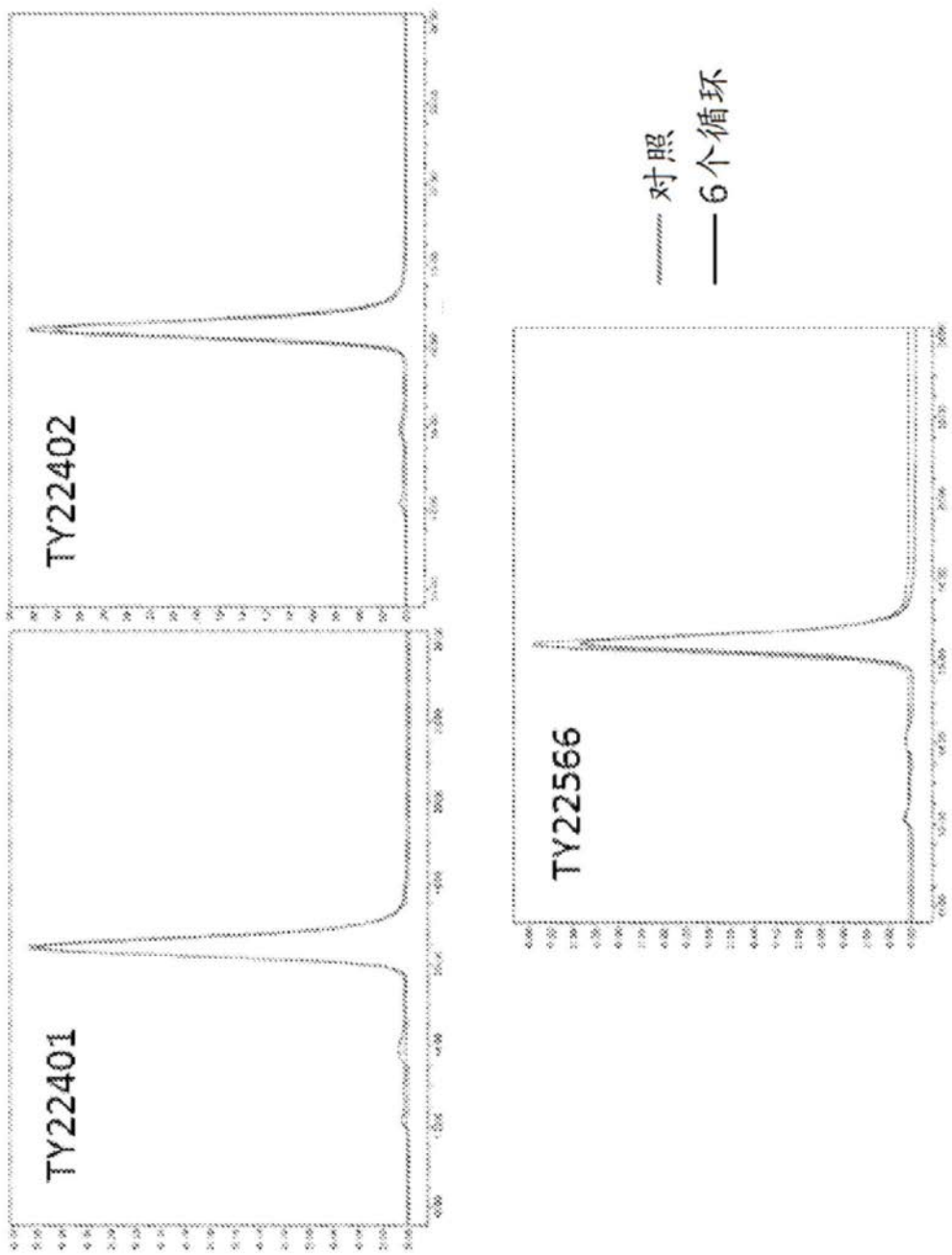


图51

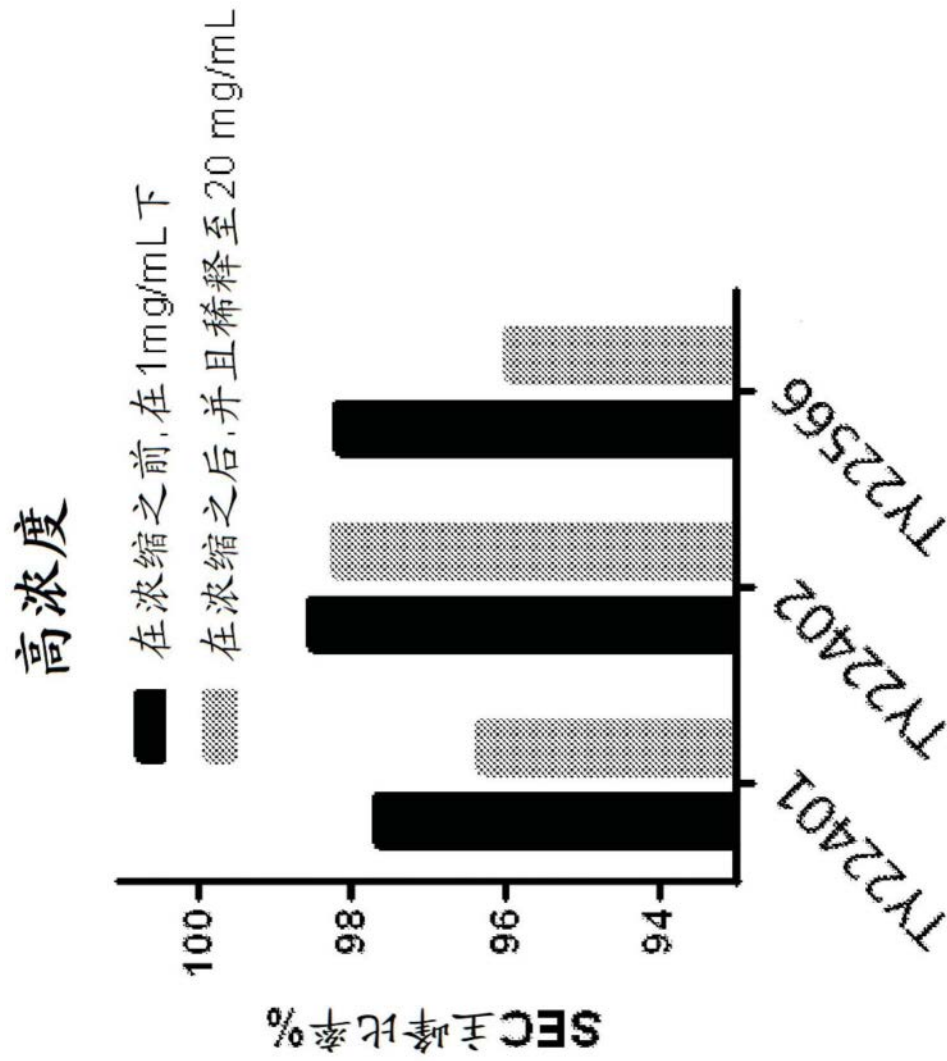


图52

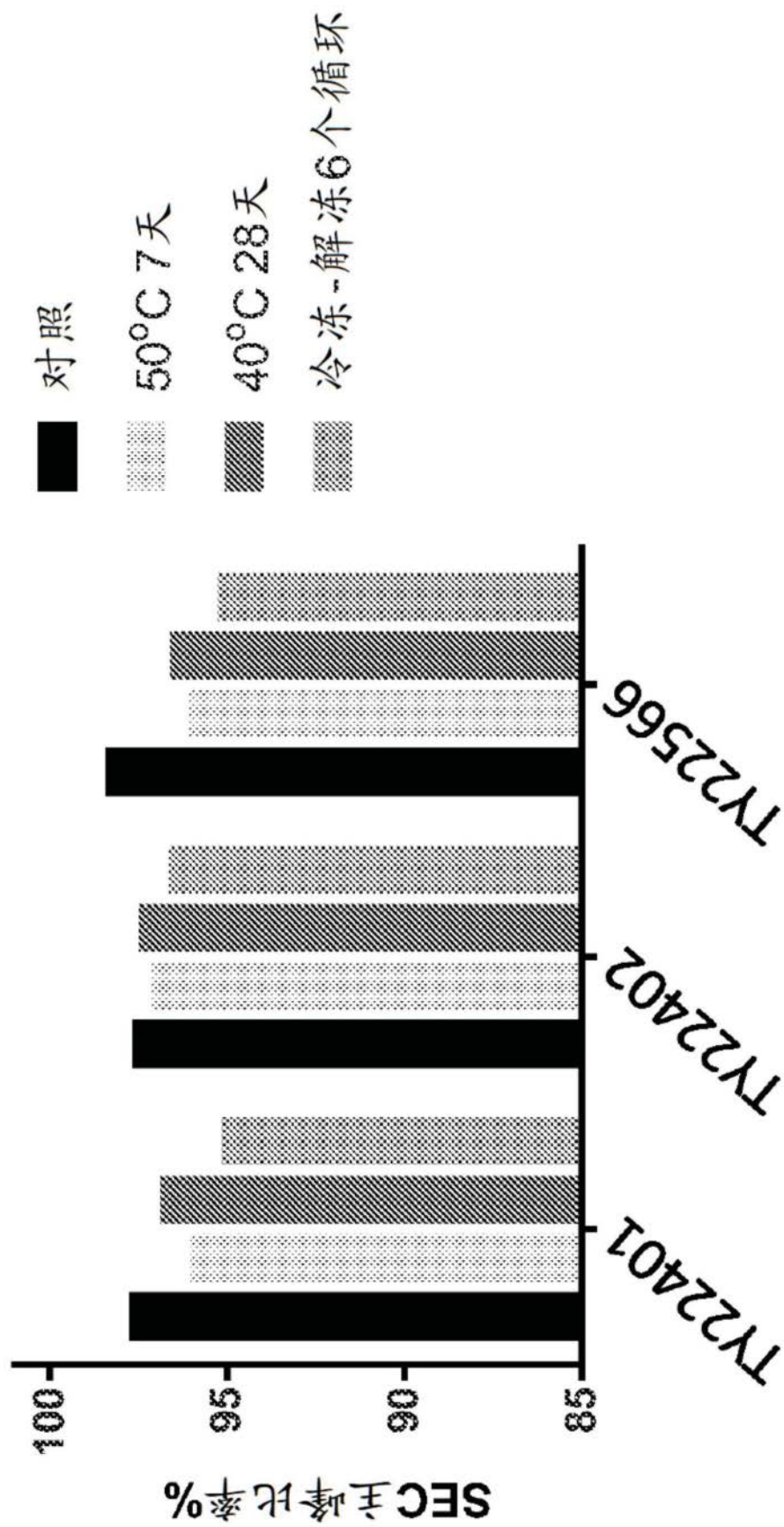


图53

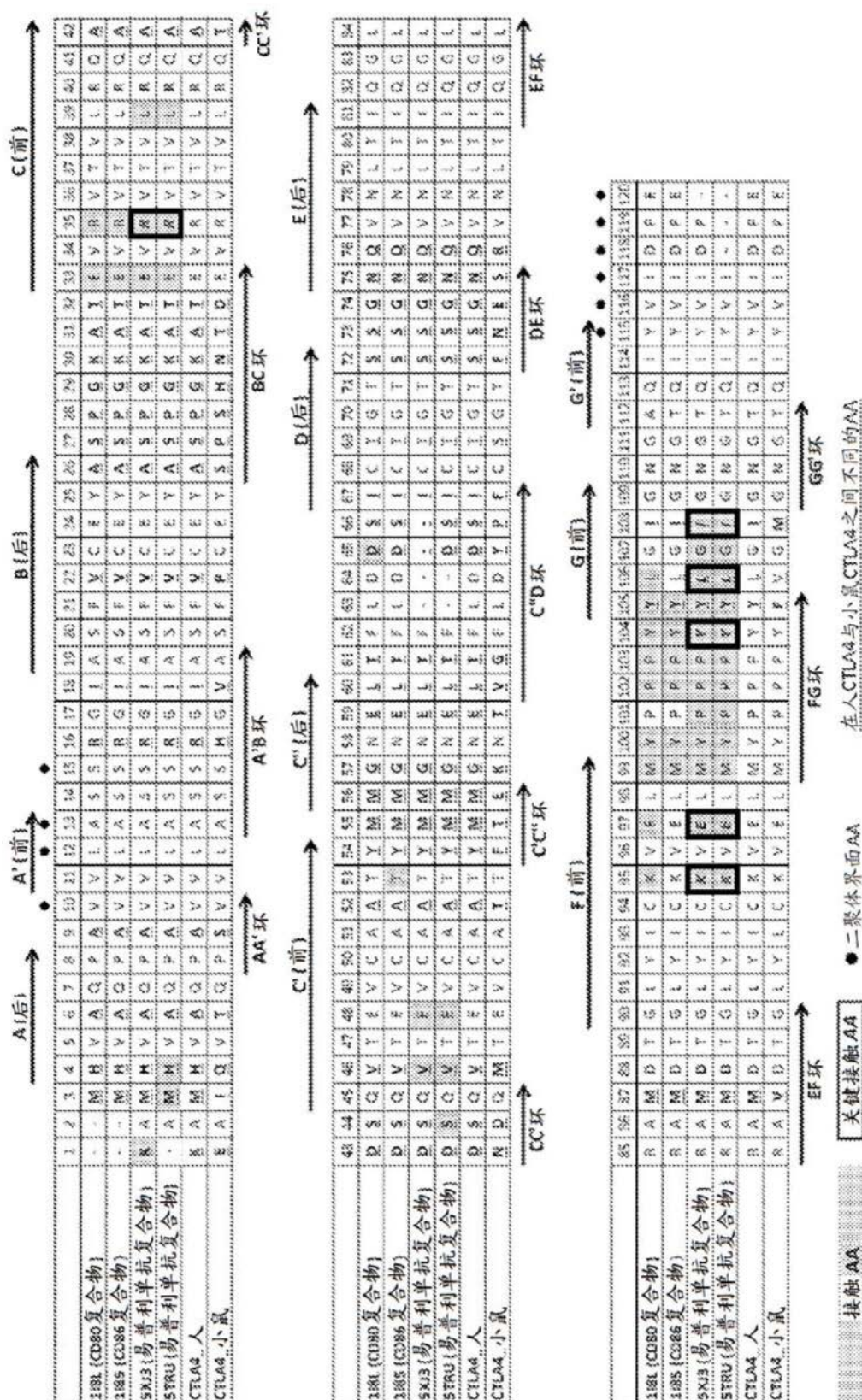


图54

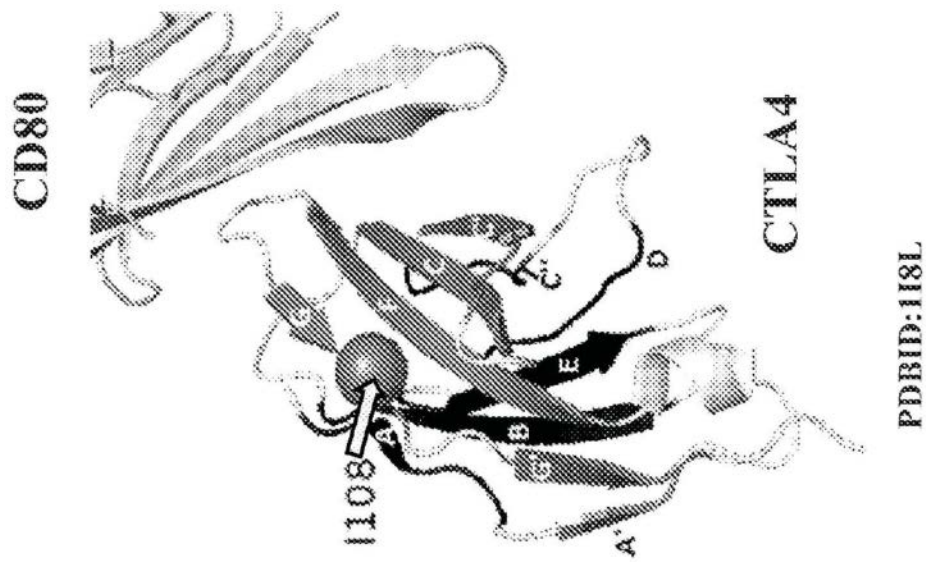


图55A

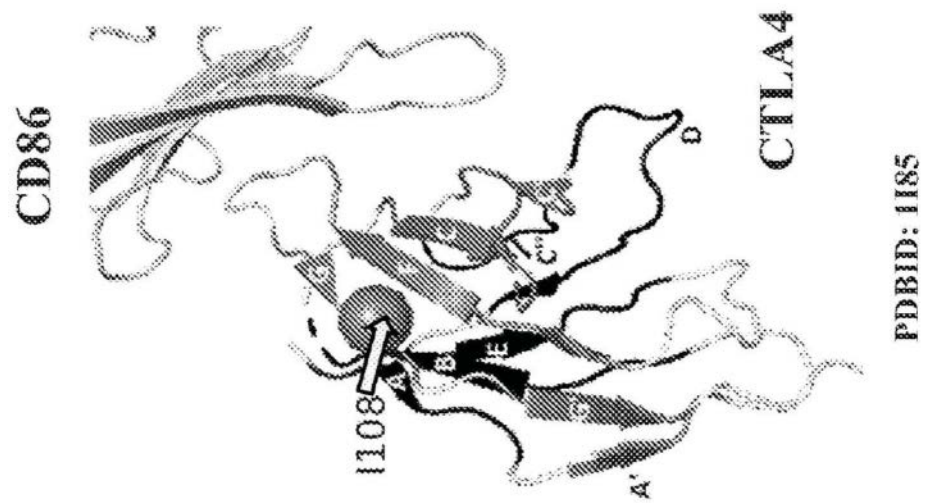


图55B

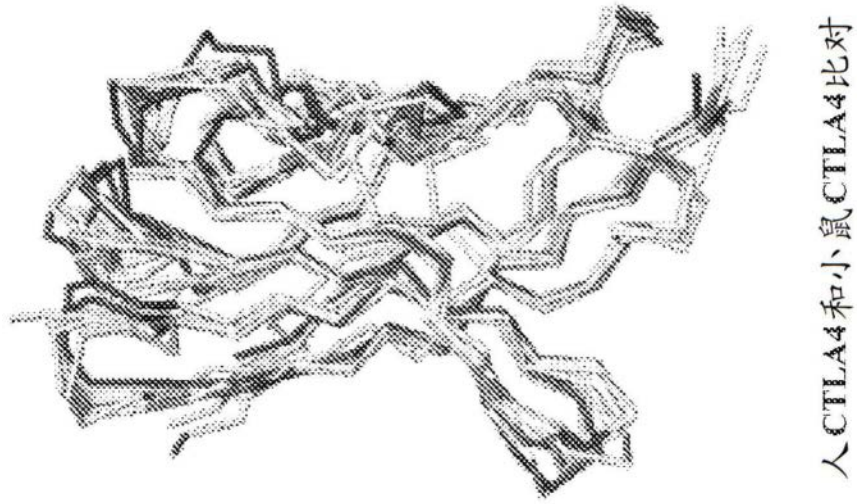


图55C

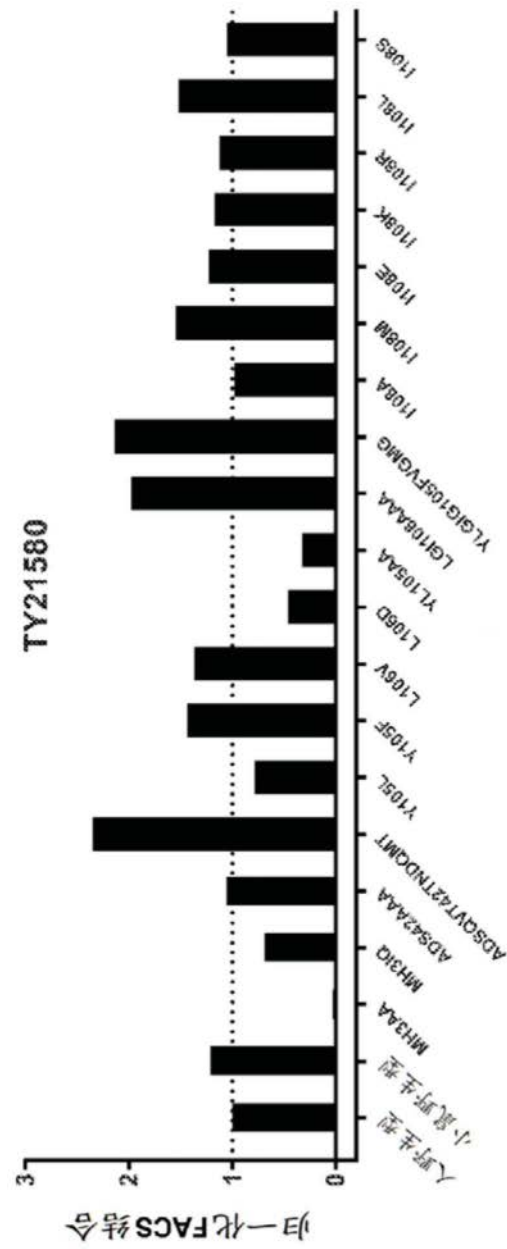


图56A

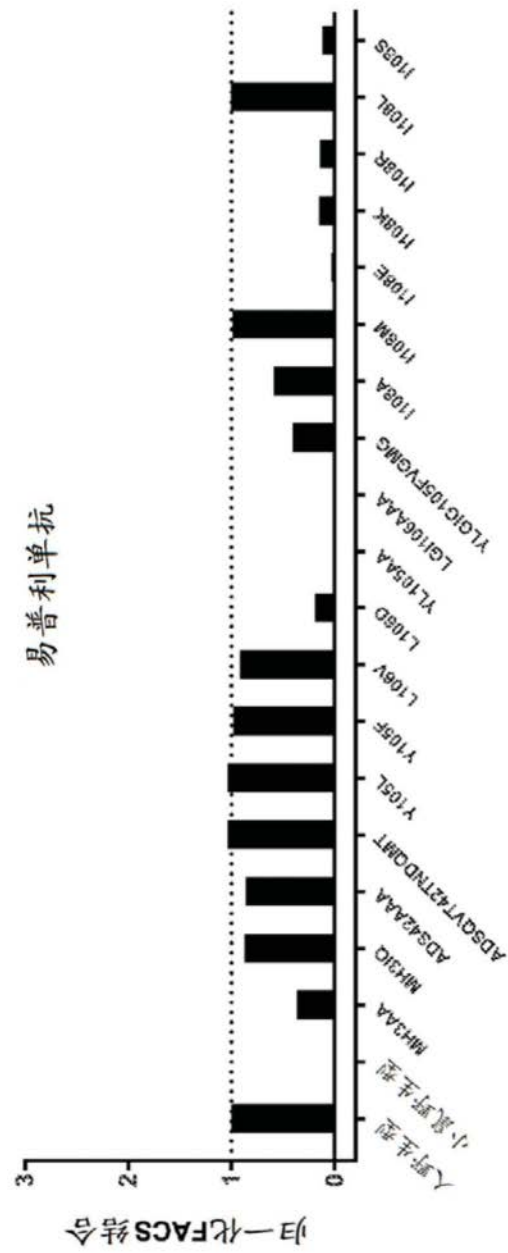


图56B

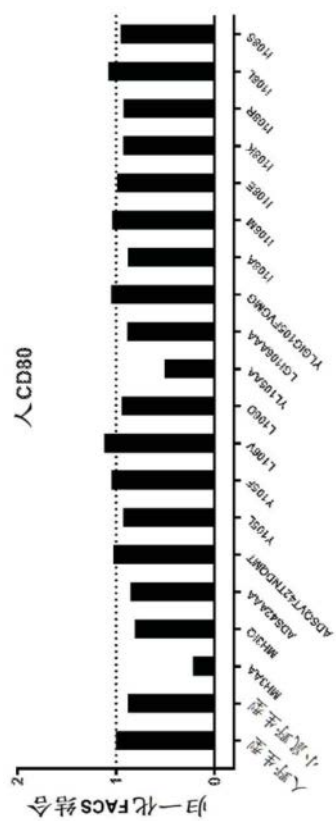


图56C

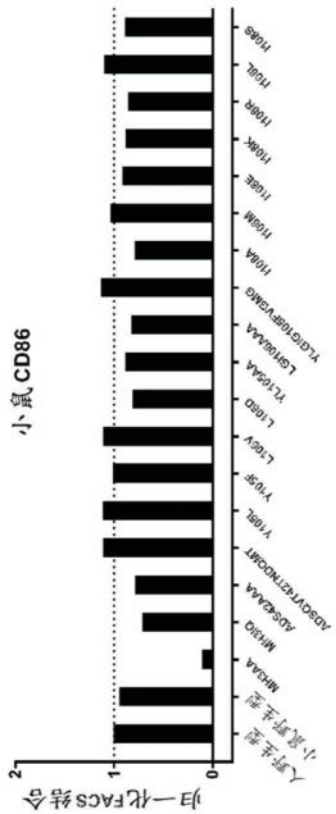


图56E

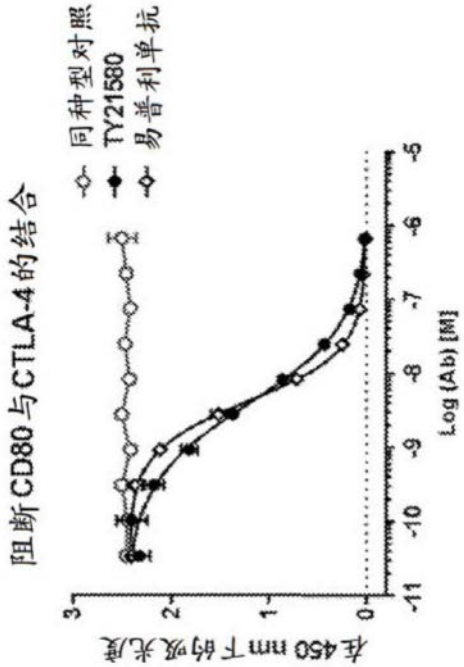


图57A

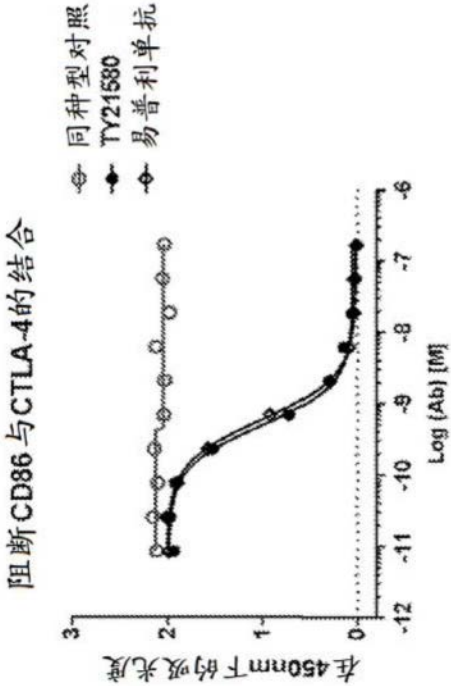


图57B

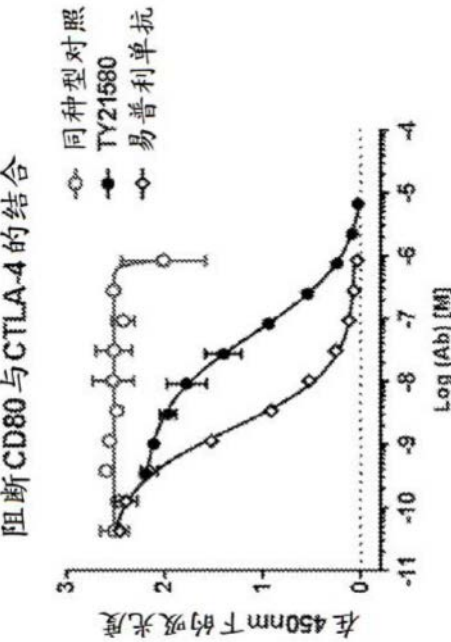


图57C

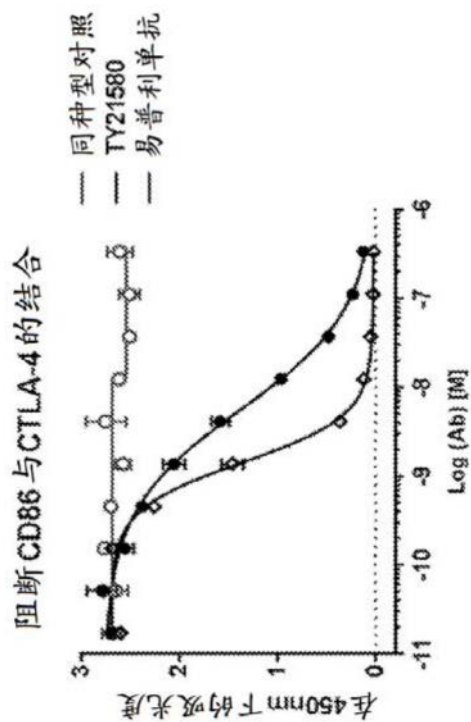


图57D

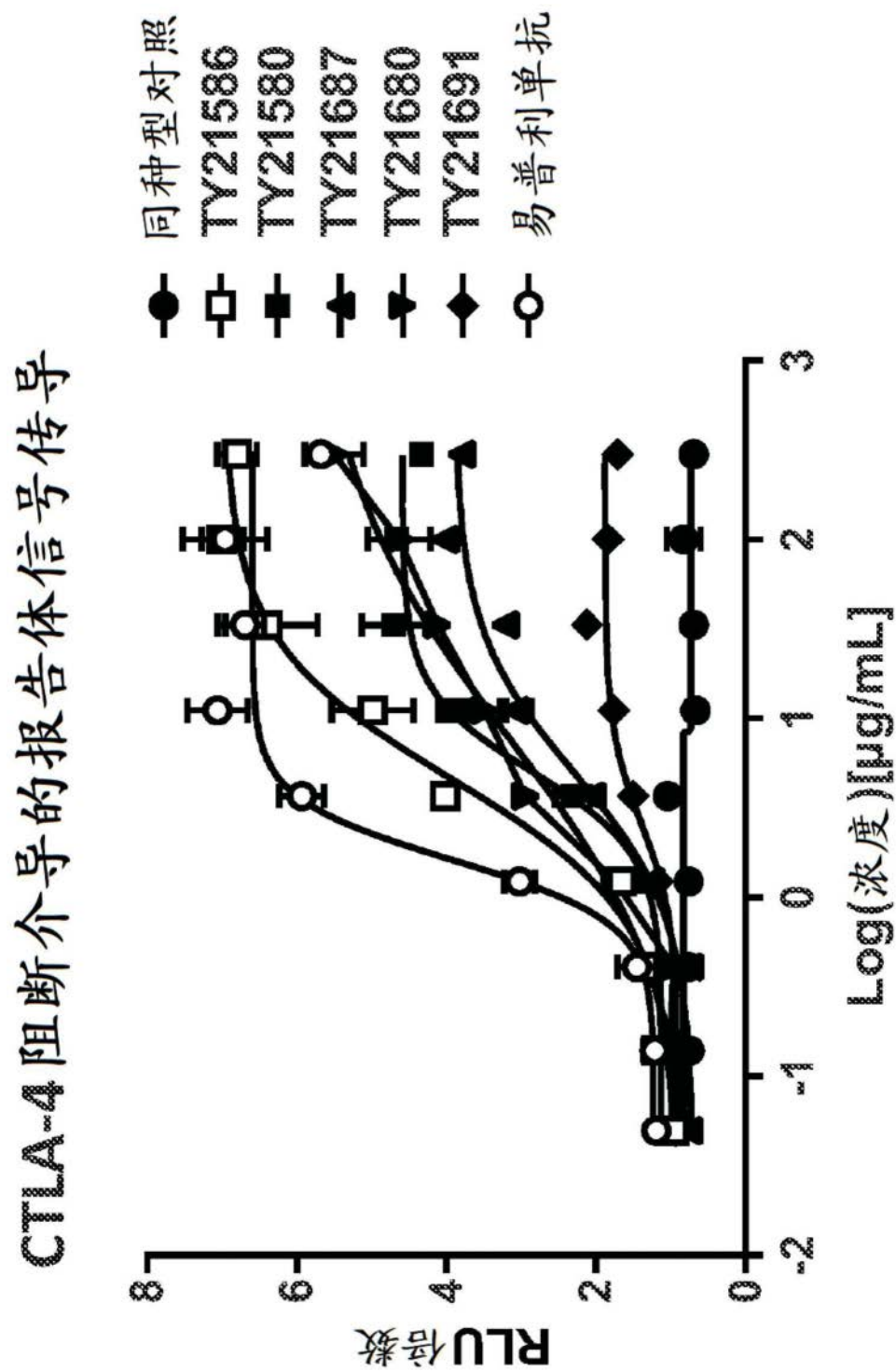


图58

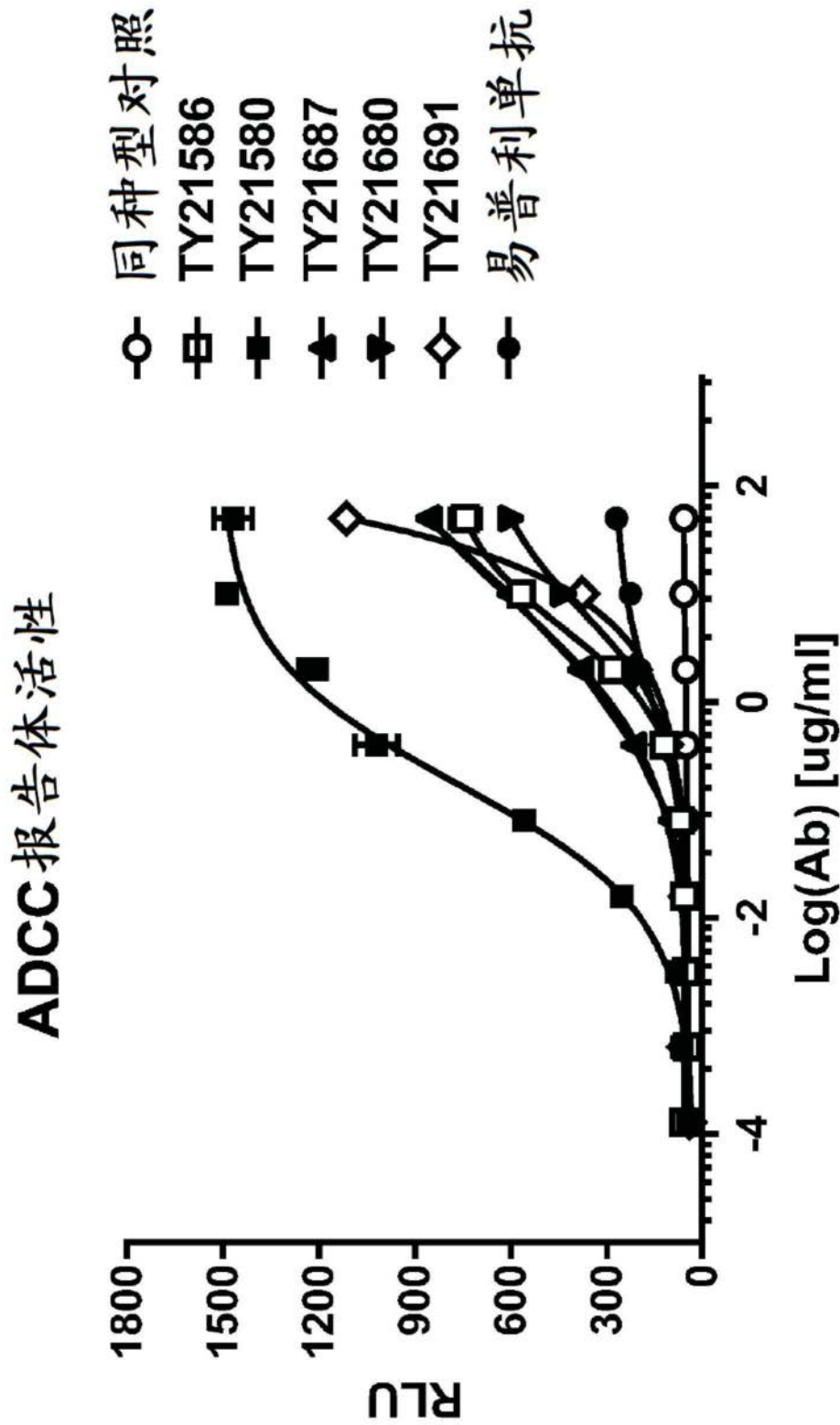


图59

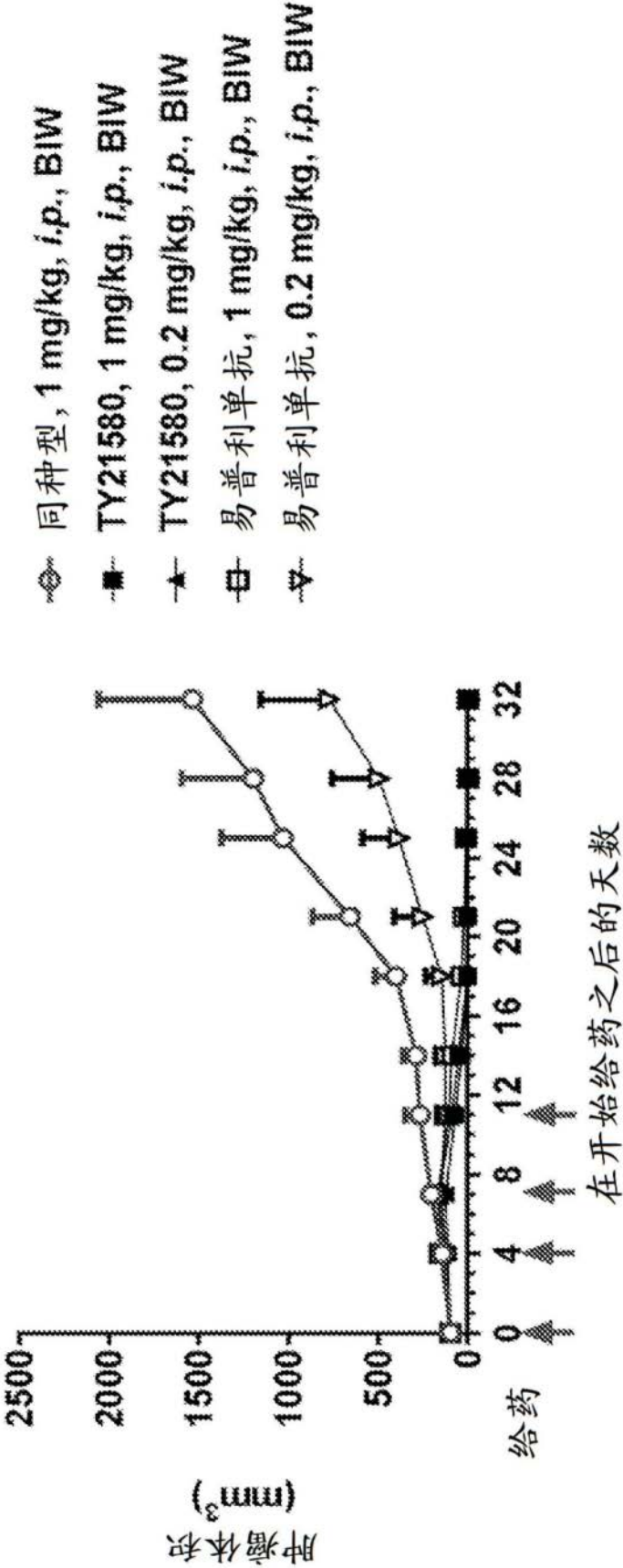


图60A

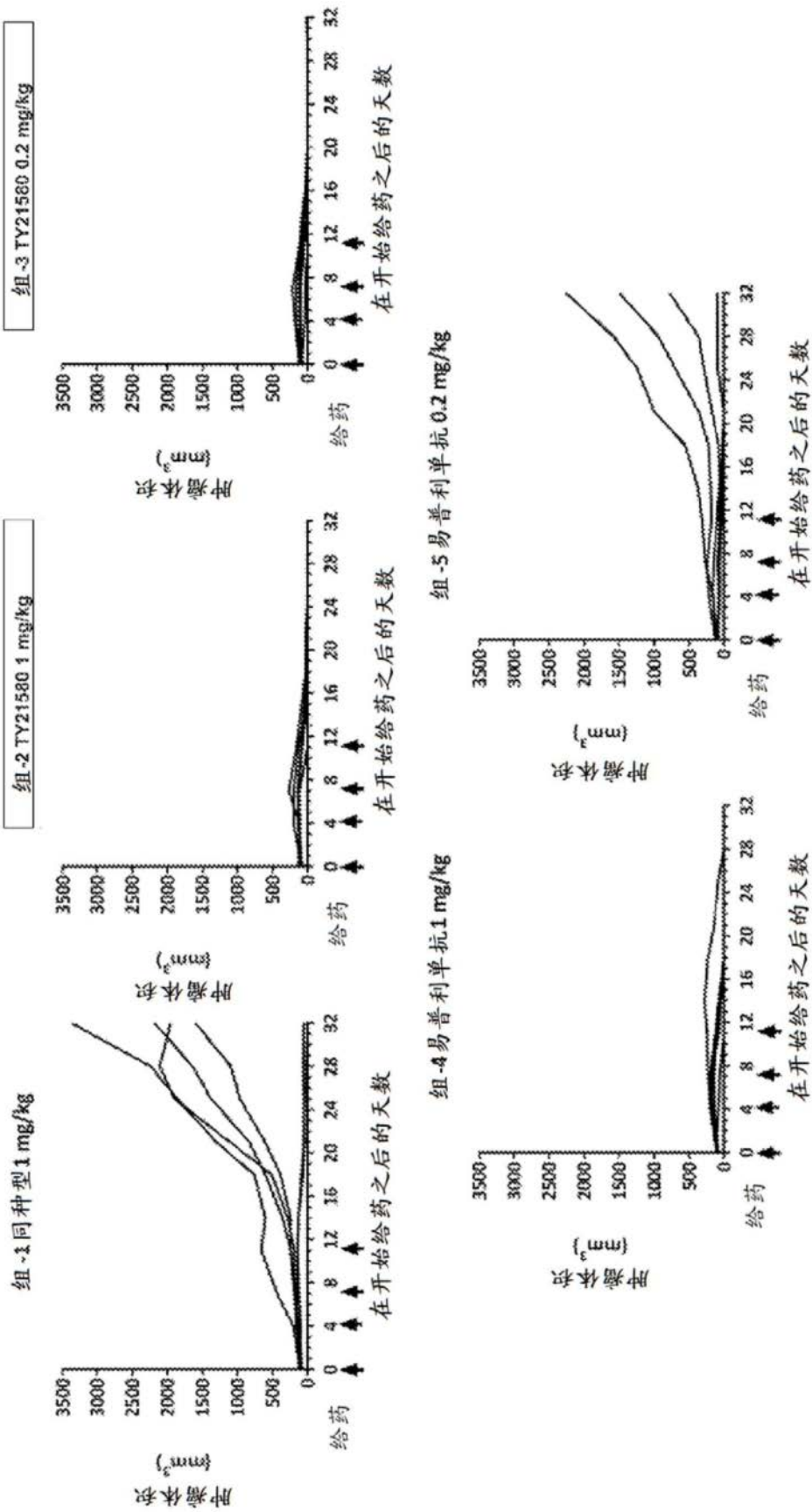


图60B

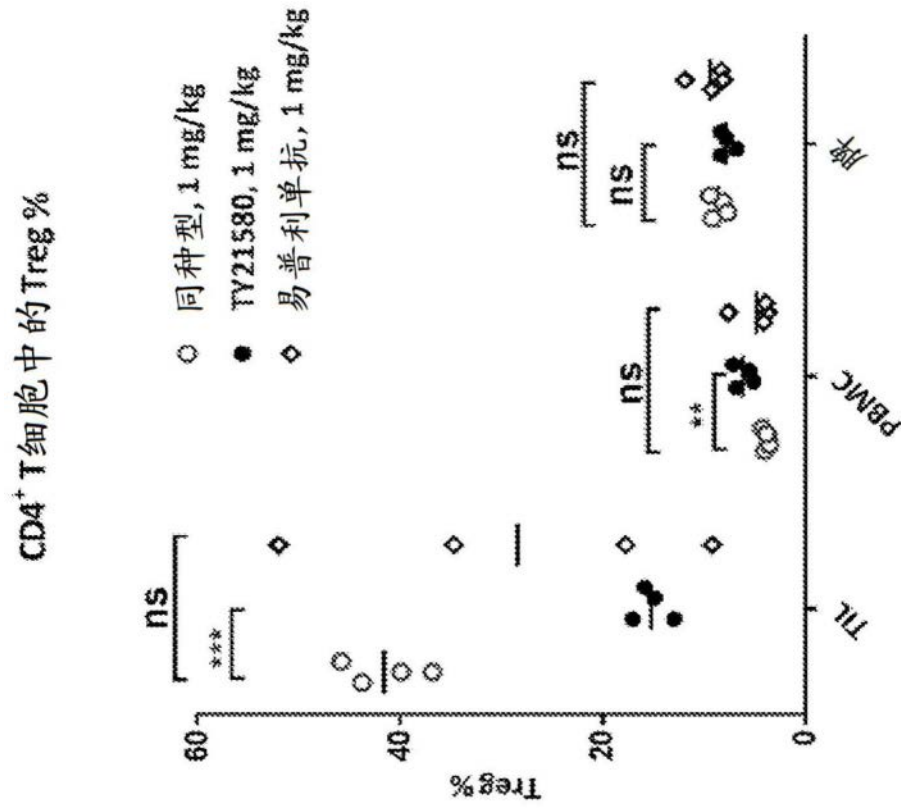


图61A

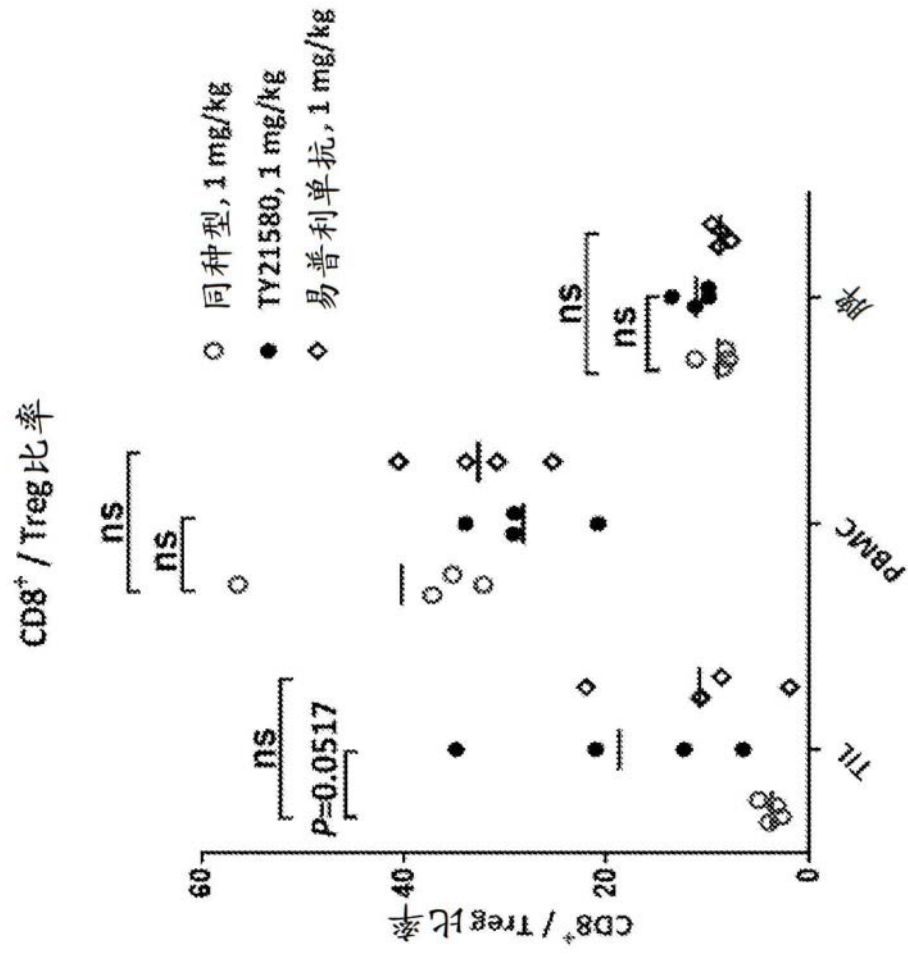


图61B

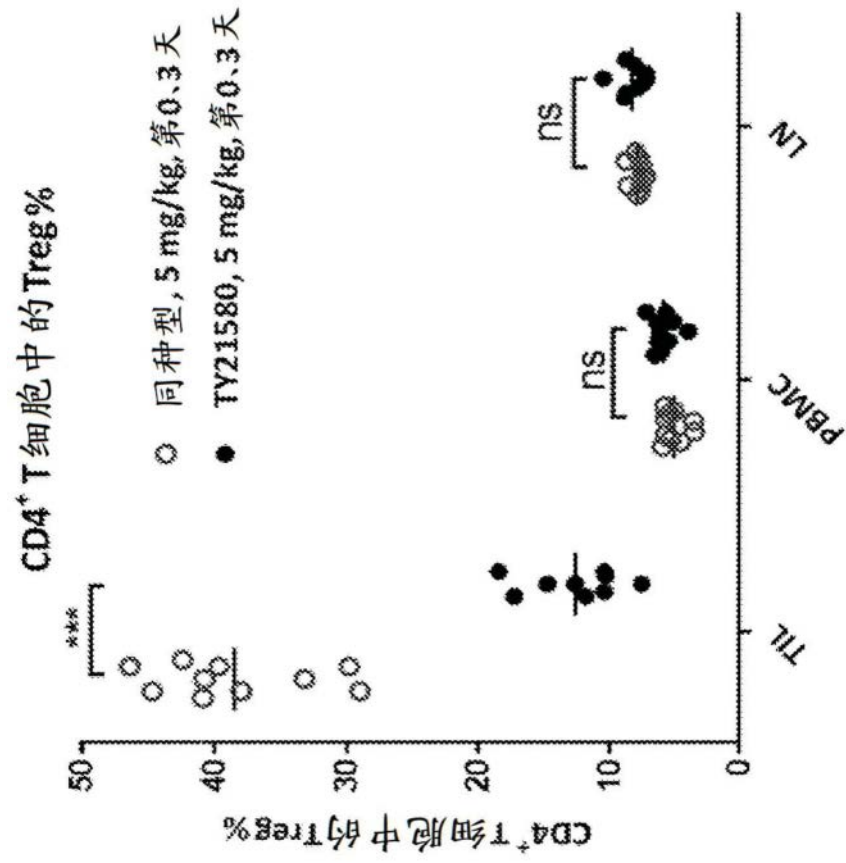


图62A

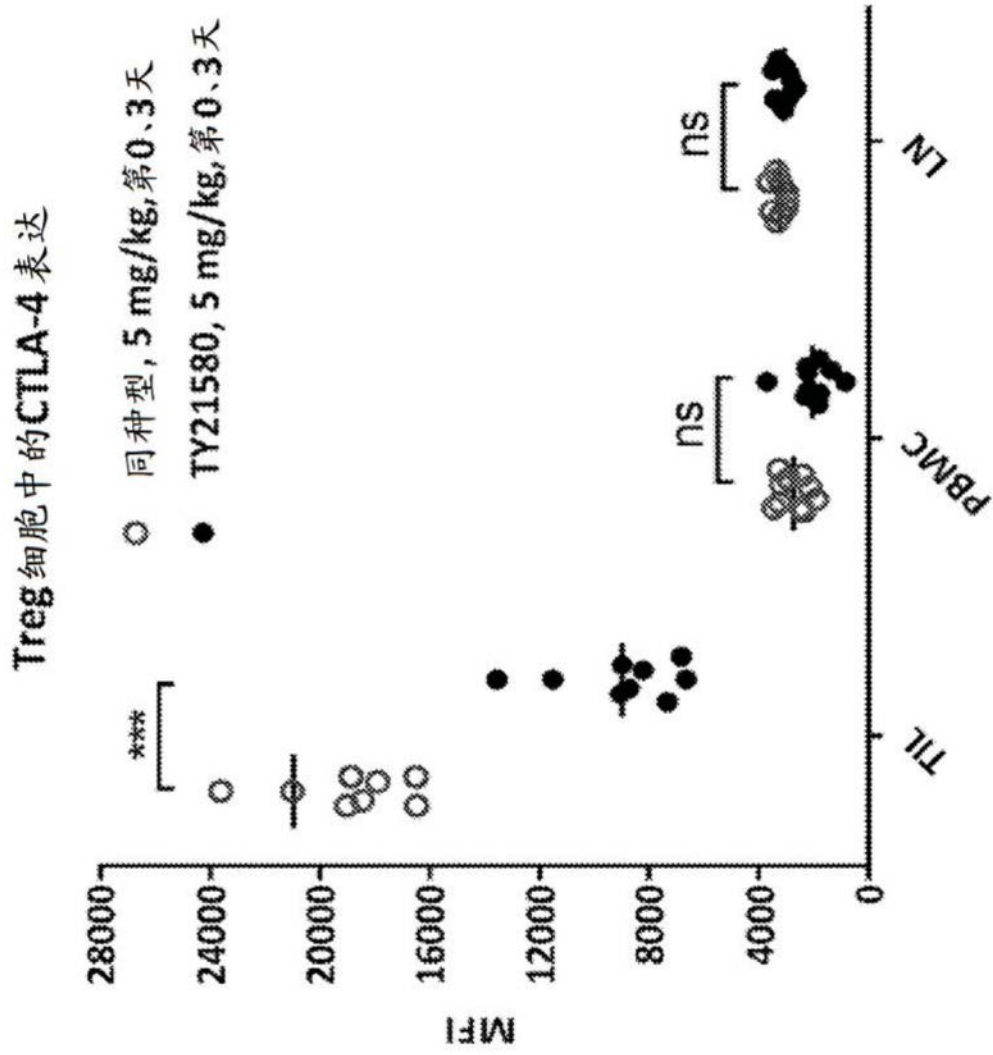


图63

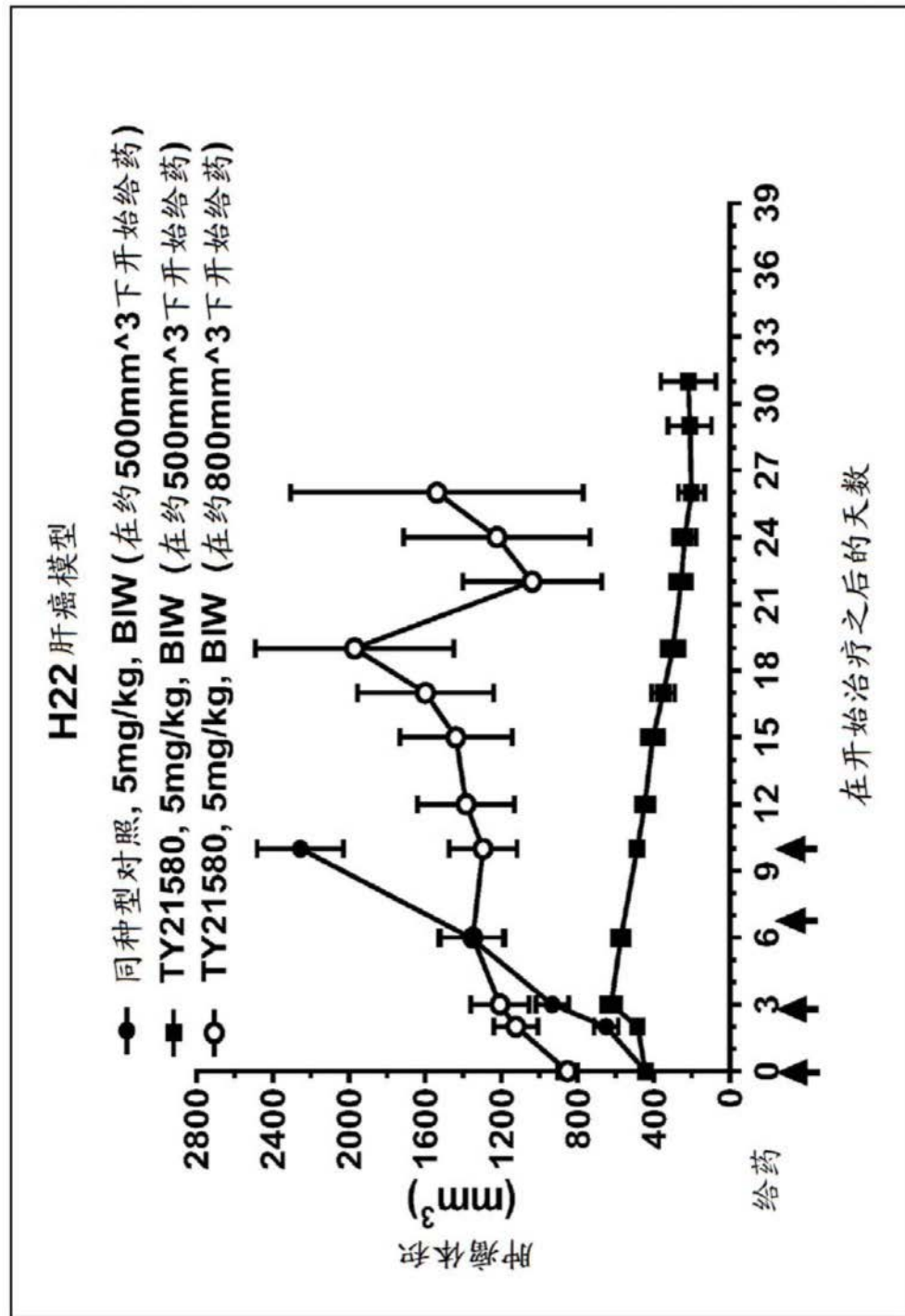


图64A

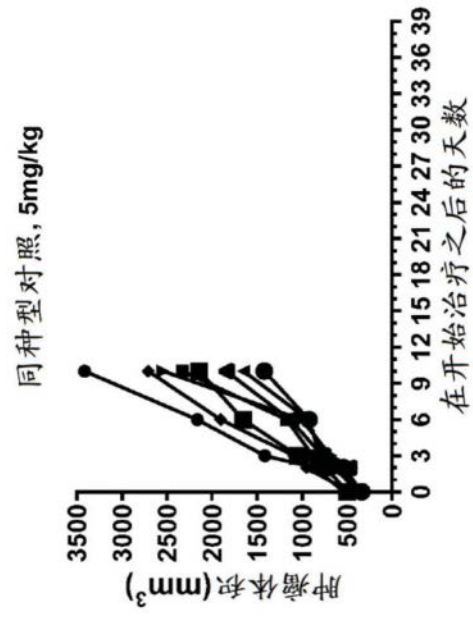


图64B

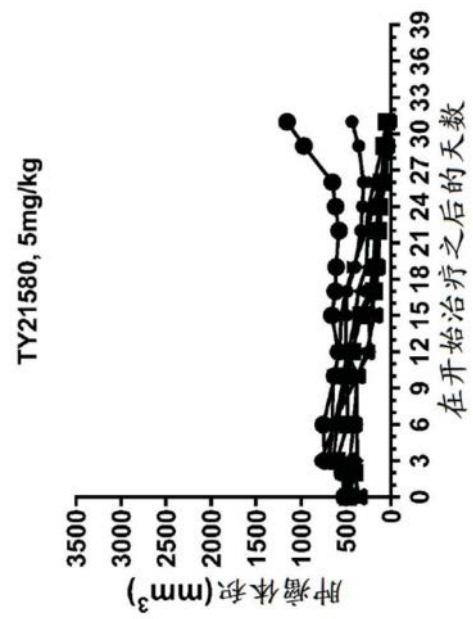


图64C

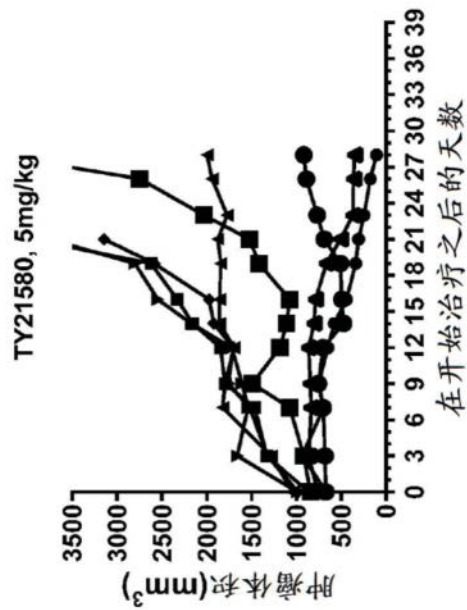


图64D

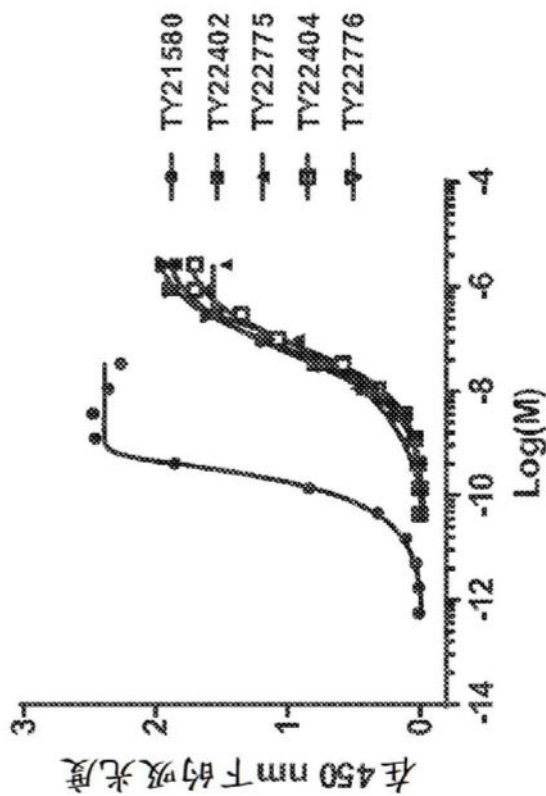


图65A

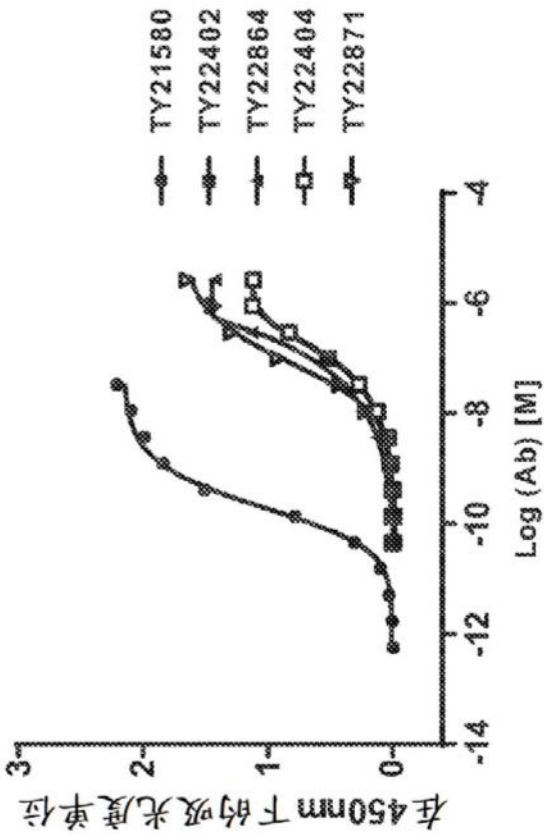


图65B

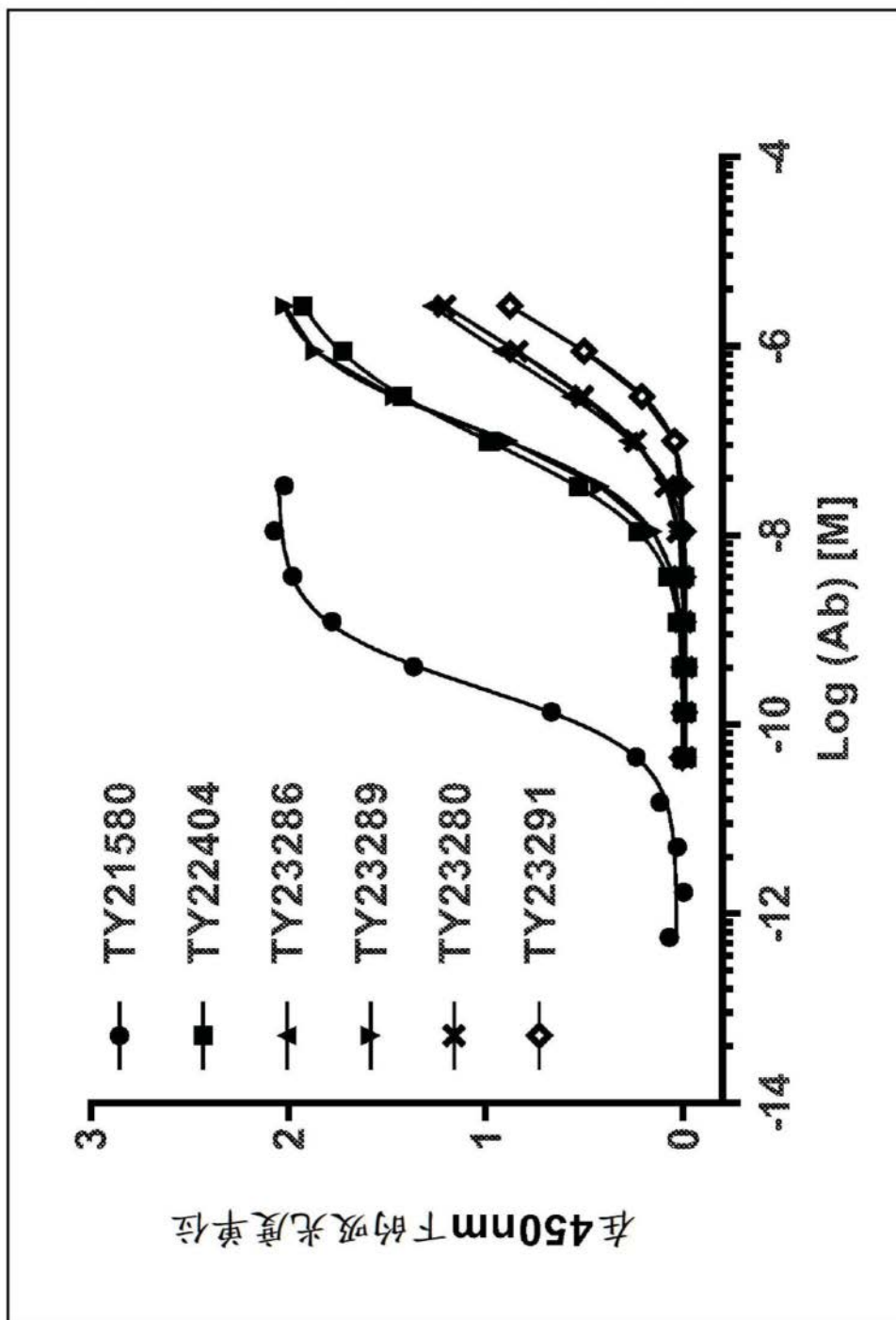


图66