



(12) 发明专利



(10) 授权公告号 CN 107540742 B

(45) 授权公告日 2021.06.29

(21) 申请号 201710735648.7

A61P 29/00 (2006.01)

(22) 申请日 2013.03.11

A61P 19/02 (2006.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

A61P 17/06 (2006.01)

申请公布号 CN 107540742 A

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 11/06 (2006.01)

(43) 申请公布日 2018.01.05

A61P 1/00 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61P 13/12 (2006.01)

61/645,686 2012.05.11 US

A61P 19/08 (2006.01)

A61P 17/14 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61P 37/06 (2006.01)

201380024763.3 2013.03.11

(73) 专利权人 米迪缪尼有限公司

(56) 对比文件

地址 英国剑桥郡

US 2011287032 A1,2011.11.24

CN 1867583 A,2006.11.22

(72) 发明人 R·敏特尔 J·杜思韦特

WO 2009058564 A2,2009.05.07

J·莫桑 M·鲍恩 S·拉斯特

Morton等.Differential effects of

C·普里韦曾特夫

CTLA-4 substitutions on the binding of
human CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2).《J

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

Immunol》.pubmed,1996,第156卷(第3期),第
1047-1054页.

代理人 陶家蓉

审查员 蒋超

(51) Int.Cl.

C07K 14/705 (2006.01)

权利要求书1页 说明书38页

A61K 38/17 (2006.01)

序列表55页 附图7页

(54) 发明名称

CTLA-4变体

(57) 摘要

在此披露具有高亲和力、效力以及稳定性的细胞毒性T淋巴细胞抗原4 (CTLA-4) 的变体。还披露用于例如以每月或更小频率的剂量间隔进行皮下或静脉内给药的高浓度的CTLA-4变体的配制物。还披露CTLA-4变体用于治疗类风湿性关节炎以及其他炎性病症的用途。还披露具有改进的稳定性和更长的体内半衰期的CTLA-4与IgG Fc的融合物。

1. 一种分离的CTLA-4多肽的用途,该分离的CTLA-4多肽与野生型CTLA-4SEQ ID NO:35相比具有更大的结合人CD80的亲合力、更大的效力和/或更大的稳定性,所述多肽选自SEQ ID NO:36-55之一,用于制备治疗病人的药物,所述病人患有自身免疫性疾病和/或炎性疾病。

2. 一种组合物的用途,所述组合物含有分离的CTLA-4多肽和一种或多种药物赋形剂,该分离的CTLA-4多肽与野生型CTLA-4SEQ ID NO:35相比具有更大的结合人CD80的亲合力、更大的效力和/或更大的稳定性,所述多肽选自SEQ ID NO:36-55之一,用于制备治疗病人的药物,所述病人患有自身免疫性疾病和/或炎性疾病。

3. 如权利要求1所述的CTLA-4多肽的用途或权利要求2所述的组合物的用途,其特征在于,所述疾病选自类风湿性关节炎(RA)、幼年型关节炎、银屑病性关节炎、银屑病、多发性硬化症、哮喘、克罗恩氏病、狼疮肾炎、强直性脊柱炎、I型糖尿病、干燥综合症、脱发、溃疡性结肠炎、系统性红斑狼疮或移植排斥。

4. 如权利要求1所述的CTLA-4多肽的用途或权利要求2所述的组合物的用途,其特征在于,所述多肽或组合物皮下或静脉内施用。

5. 如权利要求1所述的CTLA-4多肽的用途或权利要求2所述的组合物的用途,其特征在于,以28天的间隔向患者给与所述多肽或所述组合物。

6. 如权利要求1所述的CTLA-4多肽的用途或权利要求2所述的组合物的用途,其特征在于,所述多肽耦合至IgG Fc氨基酸序列。

7. 如权利要求6所述的CTLA-4多肽的用途或权利要求6所述的组合物的用途,其特征在于,所述IgG Fc是被修饰以降低Fc效应子功能的人IgG1Fc,并且包含天然人IgG1 Fc铰链区。

8. 如权利要求6所述的CTLA-4多肽的用途或组合物的用途,其特征在于,所述IgG Fc氨基酸序列包含SEQ ID NO:59。

9. 如权利要求1所述的CTLA-4多肽的用途或权利要求2所述的组合物的用途,所述多肽由氨基酸序列SEQ ID NO:43组成。

CTLA-4变体

[0001] 对电子版提交的序列表的引用

[0002] 与本申请一起提交的ASCII文本文件形式的电子版提交的序列表(名称:CTLA4101P1Sequencelisting.txt;大小:107,814字节;以及创建日期:2012年5月11日)的内容通过引用以其全部内容结合在此。

发明领域

[0003] 本发明涉及包含细胞毒性T淋巴细胞抗原4(CTLA-4)的变体(任选地与IgG Fc融合)的组合物,以及它们用于抑制T细胞活化,尤其是在如类风湿性关节炎(RA)的炎性病状背景下抑制T细胞活化的治疗用途。

背景

[0005] 天然T细胞的活化被认为是通过一种双信号机制而进行的。在遇到抗原呈递细胞(APC)时,T细胞受体(TCR)与主要组织相容性复合体(MHC)分子背景下的肽相互作用并且由此向T细胞递送第一活化信号。此初始信号不足以引起T细胞活化,并且来自共刺激受体的第二信号是绝对需要的。最重要且最佳描述的共刺激受体之一是CD28,它与巨噬细胞、树突细胞以及B淋巴细胞和活化的T淋巴细胞表面上的CD80(B7.1)和CD86(B7.2)相互作用。

[0006] CD86基因编码I型膜蛋白(Swiss-Prot登录号P33681)。选择性剪接产生编码不同同种型的CD86基因的两种转录物变体。已描述了另外的转录物变体,但它们的全长序列尚未确定。

[0007] CD80(Swiss-Prot登录号P42081)中的相关蛋白质具有与CD86相似的二级结构。CD80分别与CD86共享26%相同的氨基酸残基和46%相似的氨基酸残基。CD80在静止APC中仅以低水平表达,但在活化之后可以被上调。CD80识别T细胞上的相同受体CD28和CD152(CTLA-4),但结合后者的亲和力比CD86高大约2至4倍。

[0008] 尚未鉴别到负责结合CD28和/或CTLA-4的共享线性肽表位(埃利斯(Ellis)等人,免疫学杂志(J Immunol.),156,2700-2709),但已发现二级结构(CD80和CD86的IgV片层)中的保守残基与CTLA-4相互作用(斯沃茨(Swartz)等人,自然(Nature),410,604-608)。

[0009] 来自CD28的信号转导导致T细胞活化和CTLA-4共抑制受体的上调。CTLA-4是免疫球蛋白超家族的一个成员。它以与CD28相比增加的亲和力和亲合力结合CD80和CD86,并且有效地下调活化信号。

[0010] 已假定了关于CD80和CD86在结合CTLA-4方面的相对作用的不同理论。斯拉维克(Slavik)等人(免疫学研究(Immunol.Res.)19(1):1-24 1999)综述了CD28/CTLA-4和CD80/CD86家族的信号传导和功能。桑瑟姆(Sansom)(免疫学(Immunology 101:169-177 2000))概述了其中调查CD80与CD86之间的差异的一些研究。

[0011] 奥德拜西科(Odobasic)等人(免疫学124:503-513 2008)调查了CD80和CD86在效应T细胞应答中的作用。此研究调查了抗CD80和抗CD86单克隆抗体在抗原诱导的小鼠关节炎模型中的作用。据报道,CD80和CD86两者的阻断引起与对照抗体治疗的小鼠相比疾病严重

重程度降低的趋势。基于用 单独抗体治疗的结果,作者推断CD80通过下调全身性IL-4并且增加关节 中的T细胞累积而使关节炎恶化,而CD86通过上调IL-17并且增加关节中 效应T细胞的累积且不影响Th1或Th2发育而增大疾病严重程度。然而, 此研究报道,当CD80和CD86两者皆被阻断时没有观察到关节炎严重程度 的进一步附加降低,从而表明抑制任一 共刺激分子足以获得最大疾病改善。这一模型是基于对直接注射在关节间隙中的抗原(在此研究中是BSA)的回 忆应答。

[0012] 另一研究使用鼠胶原诱导的关节炎模型,涉及破坏对内源性抗原(胶 原)的耐受性。在此研究中,报道CD80和CD86两者的阻断都是获得最大 益处所需要的(韦勃(Webb)等人欧洲免疫学杂志(Eur. J. Immunol) 26(10):2320-2328 1996)。

[0013] 一种包含连接至修饰的IgG1 Fc结构域的CTLA-4的胞外结构域的重组 融合蛋白(“CTLA-4-Ig”)已显示体内结合CD80和CD86,并且有效抑制 CD28介导的T细胞活化(科林威斯基(Kliwinski)等人,自身免疫杂志(J. Autoimmun.) 2005;25(3):165-71)。

[0014] CTLA-4融合蛋白已被发展作为用于类风湿性关节炎(RA)的治疗剂。RA是一种导致软骨和骨质破坏的进行性退行性疾病。有证据证明免疫系统的许多分支牵涉于导致成纤维细胞样滑膜细胞和破骨细胞介导的关节损伤 以及软骨和骨质破坏的炎性过程中。多项研究已显示出滑膜中增加的T细 胞活化,并且高达50%的浸润发炎的血管翳的细胞是T淋巴细胞。另外,RA 患者滑膜中的T细胞表现出活化的效应子表型,该效应子表型展示出如CD44、CD69,CD45RO、VLA-1以及CD27的活化相关标志物的增加的表达。

[0015] 活化T细胞已显示在建立和维持于RA滑膜中发现的病理性炎症应答方 面起关键作用。活化T细胞是促炎性细胞因子如IFN γ 、IL-17以及TNF α 的 重要来源。这些因子是成纤维细胞样滑膜细胞(FLS)和巨噬细胞样滑膜细 胞(MLS)的强效活化剂,这些滑膜细胞引起为软骨破坏的介质的基质金属 蛋白酶(MMP)的分泌以及如IL-6、IL-1和TNF α 的炎症介质的分泌。活化 的CD4⁺细胞还可以向B淋巴细胞提供同源帮助,从而导致进一步促使疾病 进展的抗体如类风湿性因子(RF)的产生。

[0016] 阿巴西普(Abatcept)(Orencia®)是一种含有与IgG1的Fc融合 的CTLA-4的胞外结构域的CTLA-4 Ig融合蛋白。所得可溶性蛋白是具有大 约92kDa的分子量的二聚体。已显示它在临床治疗RA患者中具有有益作 用,从而证明抑制涉及CD80和CD86的共刺激路径是一种可行的RA治疗方 法。使用阿巴西普的RA疗法作为每月静脉内注射或每周皮下注射 来给与。

[0017] 阿巴西普在其CDR3样环中含有氨基酸六肽基序MYPPPY,这种基序是 CD28与CTLA-4之间共享的,并且据报道是结合B7配体所必需的。在此基 序中第一酪氨酸(Y)到丙氨酸(A)的突变消除了与CD80的结合,而且导 致与CD86的结合降低,而苯丙氨酸(F)取代允许对CD80的完整亲和力保 留而CD86结合全部损失(哈里斯(Harris)等人,实验医学杂志(J. Exp. Med.) (1997) 185:177-182)。CDR3样和CDR1样区域中的其他残基对于 阿巴西普与其配体的相互作用而言同样重要。因此,其中在位置104谷氨 酸(E)代替亮氨酸(L)和在位置29酪氨酸(Y)代替丙氨酸(A)的突变 分子表现出与阿巴西普相比对CD80(B7-1)的结合亲合力大大约2倍并且 对CD86(B7-2)的结合亲合力大大约4倍。据报道这种化合物LEA-29Y (贝 拉西普),Nulojix®)对于结合CD80具有与对于结合CD86相似的亲和力 (分别为3.66nM和3.21nM)。贝拉西普已被发展作为用于移植的免疫抑 制剂(拉森(Larsen)等人,美

国移植杂志 (Am.J.Transplantation) (2005) 5:443-453; 古普塔和乌摩尔 (Gupta&Womer), 药物设计、开 发与治疗 (Drug Des Develop Ther) 4:375-382 2010), 并且最近被批准 用于预防接受肾移植的成人患者中的器官排斥。阿巴西普本身显示出针对 移植排斥有限的功效, 这一发现被归因于其对CD86依赖性共刺激的较低的 抑制 (与对CD80依赖性共刺激的抑制相比) (古普塔和乌摩尔, 同上)。

[0018] 用于皮下给药的阿巴西普和贝拉西普的配制物描述于WO 2007/07654 中。

[0019] 先前已使用核糖体展示技术进行对改进的亲合力和稳定性的选择以便 分离改进的CTLA-4变体。易错PCR诱变 (使整个基因序列突变) 和定向诱 变 (靶向对关键区域的突变) 两者对蛋白质进化而言一直成功的。例如, WO 2008/047150报道了与野生型相比显示出增加的活性和增加的稳定性的 CTLA-4的蛋白质变体。

[0020] Maxygen公司报道了一种被指定为ASP2408的CTLA-4-Ig治疗性分子 其由普赛德治疗剂公司 (Perseid Therapeutics LLC) 与安斯泰来制药公 司 (Astellas Pharma Inc) 合作开发用于治疗RA。据报道, 与Orencia® (阿巴西普) 相比, CTLA-4-Ig显示出改进的效力 (WO 2009/058564)。

[0021] US 6,750,334 (Repligen公司) 描述了CTLA-4-C γ 4, 即一种包含与免 疫球蛋白的一部分融合的CTLA-4的可溶性融合蛋白。包含铰链区以及CH2 和CH3结构域的免疫球蛋白恒定区通过至少一个氨基酸残基的取代、添加 或缺失而修饰, 以便降低补体活化或Fc受体相互作用。

[0022] Xencor公司最近描述了一种CTLA4-Ig分子, 该分子包含变体CTLA-4 部分和免疫球蛋白Fc区 (WO 2011/103584)。描述了CTLA-4部分的氨基 酸序列中的多个氨基酸取代, 以用于产生具有更大T细胞抑制活性的 CTLA4-Ig变体。WO 2011/103584还描述了Fc修饰, 例如以用于改进与Fc γ R 的结合, 增强Fc介导的效应子功能和/或延长CTLA4-Ig的体内半衰期。

[0023] 发明概述

[0024] 在第一方面, 本发明提供为野生型CTLA-4的变体的CTLA-4多肽。本 发明的CTLA-4多肽可以具有一种或多种改进的特性, 如相比野生型更高的 效力、对CD80和/或CD86更高的亲合力、相对于CD86对CD80增强的选择 性、良好的交叉反应性、和/或更高的稳定性。

[0025] CTLA-4的改进可以通过人野生型人CTLA-4胞外结构域 (又称为可溶 性CTLA-4) 的氨基酸序列的突变来实现。一个或多个氨基酸突变 (其可以 是氨基酸取代、插入或缺失) 可以被引入CTLA-4氨基酸序列中, 以便产生 如在此所述的改进的CTLA-4多肽。该多肽可以例如表现出相对于野生型 CTLA-4而言增加的效力、亲合力和/或稳定性。

[0026] CTLA-4胞外结构域包含野生型氨基酸序列SEQ ID NO:35。SEQ ID NO: 35不是整个胞外结构域, 而是阿巴西普 (Orencia®) 中所采用的区。

[0027] 本发明的CTLA-4多肽可以或可以不包含对应于SEQ ID NO:35的区域 之外的另外的CTLA-4残基或序列。优选本发明的CTLA-4多肽是可溶性的。因此通常它将不包含CTLA-4跨膜区。

[0028] 在此鉴别的是CTLA-4氨基酸序列内的多个突变, 这些突变与改进的效 力、亲合力和/或稳定性是相关联, 或者这些突变可以出于如影响二聚作用 等的其他目的而被引入。

[0029] 野生型CTLA-4中的氨基酸取代的实例是: I16处的R、S、V或T; A24 处的T; S25处的N

或P;G27处的S;V32处的I;D41处的G;S42处的G; V44处的E;M54处的K或V;N56处的S或G;L58处的A、G、S或P;T59 处的S或A;F60处的T;L61处的Q或P;D62处的G;D63处的Y;S64处 的P;I65处的N、D、V或T;S70处的A、T、M或H;Q80处的R;M85处 的Q、S、V、R、K或L;T87处的S;K93处的Q、H、T、E或M;L104处的 R、Q或E;I106处的V;N108处的D或S;I115处的V或F以及C120处的S。氨基酸缺失的一个实例是T51的缺失。残基编号是参考图1A和图2中 所示的CTLA-4序列,以第一残基编号为位置1“序列编号”。图1还示出 用于比较的Swiss Prot编号。

[0030] CTLA-4变体可以具有人野生型可溶性CTLA-4中的例如多达十二个或 多达二十个氨基酸突变。这些突变可以包括以上所列举的任何或全部氨 基酸突变,以及任选地在这些 或在其他残基位置处的一个或多个不同的突变,例如不同的取代。变体氨基酸序列可以包 含具有所列举的氨基酸突变中的 一个或多个(例如至少五个、六个或七个)的人野生型 CTLA-4序列SEQ ID NO:35。

[0031] CTLA-4多肽可包含与SEQ ID NO:35具有至少70%、至少75%、至少 80%、至少 85%、至少90%或至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性的 氨基酸序列或由其组 成。

[0032] 根据本发明的CTLA-4变体氨基酸序列的实例包括图1A中所示的SEQ ID NO:36-55 的那些。CTLA-4变体可以包含由以NCIMB登录号41948保藏 的核酸编码的“1299”CTLA-4氨 基酸序列。NCIMB登录号41948编码与免 疫球蛋白Fc区融合的1299 CTLA-4多肽。编码的 1299 CTLA-4多肽、编码 的Fc区、以及包含与Fc区融合的1299 CTLA-4多肽的编码的多肽 (它们 全部都是由以NCIMB登录号41948保藏的核酸编码)全部都是本发明的单 独实施例。

[0033] 优选的突变是选自以下各项的氨基酸取代:I16处的R、S或V;A24 处的T;S25处的 N;G27处的S;M54处的K;N56处的S;L58处的A或G; F60处的T;L61处的Q;D63处的Y;S 64处的 P;I65处的N或D;S70 处的A;Q80处的R;M85处的Q或S;K93处的Q或H;以及C120处的S。因此, 变体氨基酸序列可以包含其中这些氨基酸残基位置中的一个或多个(例如至少五个或六个 或全部)如所指定的被不同残基取代的人野生型 CTLA-4序列SEQ ID NO:35。

[0034] CTLA-4多肽序列优选包含:位置16处的R、I、S或V;位置24处的 T或A;位置25处的 N;位置27处的S或G;位置54处的M或K;位置56 处的N或S;位置58处的A、L或G;位置59处的T 或S;位置60处的F 或T;位置61处的L或Q;位置63处的D或Y;位置64处的S或P;位置 65处的 I、N或D;位置70处的A或S;位置80处的Q或R;位置85处的 Q、M或S;位置93处的Q或H;和/或位 置120处的C或S。其他残基位置 可以是人野生型,或可以经受一个或多个另外的突变。

[0035] CTLA-4多肽可以包含位置25处的N,表示取代此位置处的野生型S。该多肽可以包 含位置93处的Q或H,表示取代此位置处的野生型K。如稍 后所述的实例所说明,在残基25和 93处的这些取代被认为与CTLA-4的亲 和力、效力和/或稳定性的改进紧密相关。

[0036] 一个优选氨基酸基序(在多种高效力变体中观察到)是STQDYPN(SEQ ID NO:69)。 位于残基59-65处的此基序是处于一个环区中,该环区似乎 在结合结构中 与CD80和CD86紧 密相邻。因此,在某些实施例中,CTLA-4 多肽包含在残基59-65处的SEQ ID NO:69。残基编 号如图1A(编号的上 行,从1开始)和图2中所示。当存在插入或缺失时,多肽的实际残基编 号可能与参考序列不同。图1A还示出用于比较的Swiss Prot编号。

[0037] 还可能合乎需要的是(例如)通过用S取代使位置120处的C突变,以便去除在此位 置处的CTLA-4分子之间形成的二硫键并且抑制CTLA-4二 聚化。在其他情况下,合乎需要的

是保持或促进CTLA-4二聚化或更高的多聚化(例如,四聚体形成)。这可以例如通过保留C120和/或通过添加二聚化结构域(如通过使CTLA-4轭合至IgG Fc区)而实现。这类结构域的添加以及包含CTLA-4的大分子的形成稍后将进一步讨论。

[0038] CTLA-4多肽可以包含氨基酸序列SEQ ID NO:68,或者可以包含具有一个或多个突变的SEQ ID NO:68。例如CTLA-4多肽可以包含具有多达十二个突变,多达十个氨基酸突变,或多达五个突变,例如一个、两个或三个氨基酸突变的SEQ ID NO:68。SEQ ID NO:68在图2中示出,并且是在六个具有格外良好的功能活性的CTLA-4多肽的一个组中发现的残基的共有序列,这些CTLA-4多肽如实例中所述而产生。这六个多肽具有图1A中所示的氨基酸序列,其中SEQ ID NO如下:SEQ ID NO:43(变体1299)、SEQ ID NO:37(变体1322)、SEQ ID NO:38(变体1321)、SEQ ID NO:36(变体1315)、SEQ ID NO:42(变体1115)以及SEQ ID NO:47(变体1227)。这六个序列,以及在这六个序列中的任一个中具有一个或多个氨基酸突变,例如多达十二个例如多达十个氨基酸突变,例如多达五个突变,例如一个、两个或三个氨基酸突变的变体代表本发明的各实例。CTLA-4多肽可以包含具有一个或多个氨基酸突变,例如多达十二个例如多达十个氨基酸突变,例如多达五个突变,例如一个、两个或三个氨基酸突变的以NCIMB 登录号41948保藏的“1299”CTLA-4多肽序列。

[0039] 根据本发明的CTLA-4多肽可以包含如下氨基酸序列或由其组成,该氨基酸序列与SEQ ID NO:68,与SEQ ID NO:36-55中的任一个,或与以NCIMB 登录号41948保藏的“1299”CTLA-4多肽序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%、96%、97%、98%或99%的序列一致性。

[0040] 该或这些突变可以包含氨基酸取代或由其组成,并且可以任选地选自以下各项:

[0041] 残基16处的T;残基25处的P;残基32处的I;残基41处的G;残基42处的G;残基44处的E;残基54处的V;残基56处的G;残基58处的S或P;残基59处的A;残基61处的P;残基62处的G;残基65处的V或T;残基70处的T、M或H;残基85处的V、R、K或L;残基87处的S;残基93处的T、E或M;残基104处的R、Q或E;残基106处的V;残基108处的D或S;残基115处的V或F;残基120处的S;残基51处的缺失。

[0042] 优选地,多肽包含位置25处的N,和/或包含位置93处的Q或H。多肽可以任选地包含位置120处的S。

[0043] 如上所指出,多肽优选地包含位置16处的R、I、S或V;位置24处的T或A;位置25处的N;位置27处的S或G;位置54处的M或K;位置56处的N或S;位置58处的A、L或G;位置59处的T或S;位置60处的F或T;位置61处的L或Q;位置63处的D或Y;位置64处的S或P;位置65处的I、N或D;位置70处的A或S;位置80处的Q或R;位置85处的Q、M或S;位置93处的Q或H;和/或位置120处的C或S。因此,相对于野生型CTLA-4 SEQ ID NO:35而言,该多肽包含以下氨基酸取代中的一个或多个,例如至少五个或六个或全部:I16处的R、S或V;A24处的T;S25处的N;G27处的S;M54处的K;N56处的S;L58处的A或G;T59处的S;F60处的T;L61处的Q;D63处的Y;S64处的P;I65处的N或D;S70处的A;Q80处的R;M85处的Q或S;K93处的Q或H。

[0044] 与野生型相比的SEQ ID NO:36-55中的突变在图1A中示出。根据本发明的多肽可以包含具有在这些变体中例示的一个或多个突变,例如具有存在于SEQ ID NO:36-55中的任一个中的突变的组合的野生型CTLA-4 SEQ ID NO:35。一个多肽可以任选地包含如上所讨论的另外的突变,例如,任选地一个或两个另外的突变。

[0045] 例如,一个多肽可以包含选自以下各项的突变的组合:

[0046] -1315突变,即I16处的S;S25处的N;L58处的G;S70处的A;Q80 处的R;M85处的S;和K93处的Q;

[0047] -1322突变,即S25处的N;G27处的S;M54处的K;N56处的S;T59 处的S;F60处的T;L61处的Q;D63处的Y;S64处的P;I65处的N;和 K93处的Q;

[0048] -1321突变,即I16处的S;S25处的N;M54处的K;L58处的G;S70 处的A;Q80处的R;M85处的S;和K93处的Q;

[0049] -1115突变,即I16处的V;S25处的N;L58处的G;S70处的A;M85 处的Q;和K93处的Q;

[0050] -1299突变,即I16处的R;A24处的T;S25处的N;G27处的S;L58 处的A;S70处的A;M85处的Q;和K93处的Q;以及

[0051] -1227突变,即I16处的S;S25处的N;G27处的S;L58处的A;S70 处的A;M85处的Q;和K93处的H。

[0052] 因此,CTLA-4多肽可以是相对于野生型包含SEQ ID NO:36-55中的 任一个中的取代的残基的组合的多肽,例如它可以包含:

[0053] -残基16处的S;残基25处的N;残基58处的G;残基70处的A; 残基80处的R;残基85处的S;和残基93处的Q;

[0054] -残基25处的N;残基27处的S;残基54处的K;残基56处的S; 残基59处的S;残基60处的T;残基61处的Q;残基63处的Y;残基64 处的P;残基65处的N;和残基处93的Q;

[0055] -残基16处的S;残基25处的N;残基54处的K;残基58处的G; 残基70处的A;残基80处的R;残基85处的S;和残基93处的Q;

[0056] -残基16处的V;残基25处的N;残基58处的G;残基70处的A; 残基85处的Q;和残基93处的Q;

[0057] -残基16处的R;残基24处的T;残基25处的N;残基27处的S; 残基58处的A;残基70处的A;残基85处的Q;和残基93处的Q;或

[0058] -残基16处的S;残基25处的N;残基27处的S;残基58处的A; 残基70处的A;残基85处的Q;和残基93处的H。

[0059] 突变优选是取代,并且可以是保守取代。所谓“保守取代”是指用一个第二不同的氨基酸残基取代一个第一氨基酸残基,其中该第一氨基酸残基和第二氨基酸残基具有生物物理学特征相似的侧链。相似的生物物理学特征包括疏水性、电荷、极性、或提供或接受氢键的能力。保守取代的实例包括将丝氨酸改变成苏氨酸或色氨酸,将谷氨酰胺改变成天冬酰胺,将 赖氨酸改变成精氨酸,将丙氨酸改变成缬氨酸,将天冬氨酸改变成谷氨酸,将缬氨酸改变成异亮氨酸,将天冬酰胺改变成丝氨酸。

[0060] 根据本发明的多肽可以包括一个或多个氨基酸序列突变(氨基酸残基 的取代、缺失和/或插入),并且小于约15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3或2个。

[0061] 突变通常不产生功能损失,因此包含如此改变的氨基酸序列的多肽可 保持结合人CD80和/或CD86的能力。它可保持与未产生改变的多肽相同的 结合亲和力或功能,例如如在此描述的测定中所测量。

[0062] 突变可包括以非天然存在的或非标准的氨基酸替换一个或多个氨基酸 残基、将一个或多个氨基酸残基修饰成非天然存在的或非标准的形式,或 将一个或多个非天然存

在的或非标准的氨基酸插入至序列中。本发明的序列中的改变的数量和位置的实例在此在别处描述。天然存在的氨基酸包括 20 个“标准”L-氨基酸,通过它们的标准单个字母代码被鉴别为G、A、V、L、I、M、P、F、W、S、T、N、Q、Y、C、K、R、H、D、E。非标准氨基酸包括可并入多肽骨架中或由现有氨基酸残基的修饰来产生的任何其他残基。非标准氨基酸可以是天然存在或非天然存在的。几个天然存在的非标准氨基酸在本领域中是已知的,如4-羟基脯氨酸、5-羟基赖氨酸、3-甲基组氨酸、N-乙酰丝氨酸等[富特&富特 (Voet&Voet), 生物化学 (Biochemistry), 第2版, (威利公司 (Wiley)) 1995]。这些在它们的N- α 位衍生的氨基酸残基将仅位于氨基酸序列的N末端。一般地,在本发明中,氨基酸为L-氨基酸,但它可以是D-氨基酸。因此,改变可包括将L-氨基酸修饰为D-氨基酸,或用D-氨基酸来替换L-氨基酸。甲基化、乙酰化和/或磷酸化形式的氨基酸也是已知的,并且本发明中的氨基酸可经受这种修饰。

[0063] 本发明的多肽中的氨基酸序列可包含上述的非天然的或非标准的氨基酸。非标准氨基酸(例如D-氨基酸)可以在合成过程中被并入氨基酸序列中,或在该氨基酸序列合成之后通过“原始”标准氨基酸的修饰或替换被并入。

[0064] 使用非标准和/或非天然存在的氨基酸增加结构和功能多样性,并且因而可增加实现所希望的结合以及中和特性的潜力。另外,D-氨基酸和类似物已显示与标准L-氨基酸相比具有不同的药代动力学概况,这是由于具有L-氨基酸的多肽在给予至动物例如人之后在体内降解,从而意味着D-氨基酸有利于一些体内应用。

[0065] 可使用一个或多个选定VH和/或VL基因的随机诱变以便产生整个可变结构域内的突变来产生变体。这样一种技术由格拉姆 (Gram) 等人[格拉姆 等人,1992,美国科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci., USA), 89:3576-3580] 描述,他们使用易错PCR。可使用的另一种方法是将诱变引导至多肽中的特定区或位置。这类技术由巴巴斯 (Barbas) 等人[巴巴斯 等人,1994,美国科学院院刊,91:3809-3813]和希尔 (Schier) 等人[希尔 等人,1996,分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.) 263:551-567]披露。

[0066] 所有上述技术在本领域中为本身已知的并且本领域技术人员将能够使用这类技术以便使用本领域中的常规方法来提供本发明的多肽。

[0067] 可用于计算两个氨基酸序列的一致性%的算法包括例如BLAST[阿尔丘尔 (Altschul) 等人 (1990) 分子生物学杂志215:405-410];FASTA[皮尔森和李普曼 (Pearson and Lipman) (1988) 美国科学院院刊 (PNAS USA) 85:2444-2448];或例如采用缺省参数的史密斯-沃特曼算法[史密斯和沃特曼 (Smith and Waterman) (1981) 分子生物学杂志147:195-197]。

[0068] 根据本发明,可提供含有如下CTLA-4多肽的组合物,这些CTLA-4多肽与野生型CTLA-4相比具有改进的生物活性,如相对于CD86对CD80增强的选择性,更高的亲和力和/或更高的效力,和/或可以展示出良好的交叉反应性,改进的稳定性和/或延长的半衰期。如在此所详细讨论,这类多肽可以促成更大的治疗功效并且可以允许在减小或更小频率的剂量下实现治疗益处。改进的稳定性可以有助于制造和配制成药用组合物。

[0069] 根据本发明的CTLA-4多肽任选地融合至IgG Fc区,例如呈融合蛋白。Fc区可被工程化以增加分子的体内半衰期,并且促进组合物的整体稳定性,同时避免不想要的Fc效应子功能。改进的稳定性有助于例如针对皮下给药以高浓度配制产品。

[0070] 附图简要说明

[0071] 图1. (A) CTLA-4变体序列(SEQ ID NO:36-55)与野生型人CTLA-4 (SEQ ID NO:35)的比对。从野生型的突变以灰色框示出。除非另外指明,编号的上行(从1开始)是本申请中提及的编号。Swiss Prot编号在下方示出以用于比较。(B) IgG1 Fc序列SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59以及SEQ ID NO:60的比对。除非另外指明,编号的上行(从1开始)是本说明书中提及的编号。Swiss Prot编号在下方示出以用于比较。

[0072] 图2. CTLA-4多肽序列SEQ ID NO:68。其中序列编号从Met开始作为位置1, SEQ ID NO:68具有124个残基,在残基16、24、27、54、56、58、59、60、61、63、64、65、70、80、85以及93处具可变性。在每个这些可变位置处的氨基酸残基选自在每种情况下指示的残基组。

[0073] 图3. 在以下测定中CTLA-4变体和Fc融合物型式的野生型CTLA-4的 IC_{50} 曲线图:(A) Raji-Jurkat 双重细胞测定;(B) 原代人CD4+T细胞测定;(C) 食蟹猴混合淋巴细胞反应测定。

[0074] 图4. 与其他相关蛋白质配体相比,CTLA-4变体对CD80和CD86的特异性。(A) 变体1299。(B) 变体1322。

[0075] 图5. 具有TM和YTE修饰的CTLA-4变体的零效应子功能(ADCC和CDC)的展示。(A) ADCC。(B) CDC。

[0076] 图6. 与Fc融合物型式的野生型CTLA-4相比,CTLA-4变体对CD80和CD86的单价亲和力的改进。

[0077] 图7. (A) 用于四聚体CTLA-4蛋白的构建体设计。(B) Raji-Jurkat 测定中对Fc融合物型式的野生型CTLA-4与四聚体CTLA-4的效力比较。

[0078] 详细说明

[0079] 除非另外说明,否则在本说明书中通篇使用的CTLA-4残基的编号是如图1A(上行,序列编号)和图2中所示。CTLA-4具有被切割下来的前导序列,并且成熟蛋白质的至少两种不同的编号系统是可能的。CTLA-4序列可(除其他之外)以位置1的Ala开始(US 5,434,131),或以位置1的Met开始(拉森等人,美国移植杂志(2005)5:443-453)。除非上下文明确地规定,否则在此使用的编号系统是其中位置1为Met的编号系统。这还对应于通常用于指产品阿巴西普的残基的编号。

[0080] 除非另外说明,否则在本说明书中通篇使用的Fc残基的编号是如图1B(上行,从1开始)中所示。

[0081] 下列编号条款代表本发明的各方面:

[0082] 1. 一种分离的CTLA-4多肽,该分离的CTLA-4多肽与野生型CTLA-4 SEQ ID NO:35相比具有更大的结合人CD80的亲合力、更大的效力和/或更大的稳定性,该多肽包含为SEQ ID NO:35的变体的氨基酸序列,其中该变体在SEQ ID NO:35中包含以下氨基酸突变中的五个或更多个:

[0083] I16处的R、S、V或T;

[0084] A24处的T;

[0085] S25处的N或P;

[0086] G27处的S;

[0087] V32处的I;

- [0088] D41处的G;
- [0089] S42处的G;
- [0090] V44处的E;
- [0091] M54处的K;
- [0092] N56处的S或G;
- [0093] L58处的A、G、S或P;
- [0094] T59处的S或A;
- [0095] F60处的T;
- [0096] L61处的Q或P;
- [0097] D62处的G;
- [0098] D63处的Y;
- [0099] S64处的P;
- [0100] I65处的N、D、V或T;
- [0101] S70处的A、T、M或H;
- [0102] Q80处的R;
- [0103] M85处的Q、S、V、R、K或L;
- [0104] T87处的S;
- [0105] K93处的Q、H、T、E或M;
- [0106] L104处的R、Q或E;
- [0107] I106处的V;
- [0108] N108处的D或S;
- [0109] I115处的V或F;
- [0110] C120处的S;
- [0111] T51处的缺失。
- [0112] 2. 根据条款1所述的CTLA-4多肽,其中该多肽包含与SEQ ID NO:35 至少70%一致的氨基酸序列。
- [0113] 3. 根据条款1或条款2所述的CTLA-4多肽,包含以下氨基酸突变中的 五个或更多个:
 - [0114] I16处的R、S或V;
 - [0115] A24处的T;
 - [0116] S25处的N;
 - [0117] G27处的S;
 - [0118] M54处的K;
 - [0119] N56处的S;
 - [0120] L58处的A或G;
 - [0121] T59处的S;
 - [0122] F60处的T;
 - [0123] L61处的Q;
 - [0124] D63处的Y;

- [0125] S64处的P;
- [0126] I65处的N或D;
- [0127] S70处的A;
- [0128] Q80处的R;
- [0129] M85处的Q或S;
- [0130] K93处的Q或H;
- [0131] C120处的S。
- [0132] 4. 根据条款1或条款2所述的CTLA-4多肽, 包含取代S25N或S25P。
- [0133] 5. 根据条款1至3中任一项所述的CTLA-4多肽, 包含取代S25N、K93Q 或K93H。
- [0134] 6. 根据条款1至5中任一项所述的CTLA-4多肽, 包含与SEQ ID NO: 36-55中的任一个至少70%、80%、90%、95%或98%一致的氨基酸序列, 或与 由以NCIMB登录号41948保藏的核酸编码的CTLA-4氨基酸序列至少70%、80%、90%、95%、98%或99%一致的氨基酸序列。
- [0135] 7. 根据条款1至6中任一项所述的CTLA-4多肽, 包含残基59-65处的 氨基酸基序SEQ ID NO:69, 该残基编号是参照SEQ ID NO:35。
- [0136] 8. 根据条款1至6中任一项所述的CTLA-4多肽, 包含选自以下各项的 突变的组合:
- [0137] -1315突变, 即I16处的S; S25处的N; L58处的G; S70处的A; Q80 处的R; M85处的S; 和K93处的Q;
- [0138] -1322突变, 即S25处的N; G27处的S; M54处的K; N56处的S; T59 处的S; F60处的T; L61处的Q; D63处的Y; S64处的P; I65处的N; 和 K93处的Q;
- [0139] -1321突变, 即I16处的S; S25处的N; M54处的K; L58处的G; S70 处的A; Q80处的R; M85处的S; 和K93处的Q;
- [0140] -1115突变, 即I16处的V; S25处的N; L58处的G; S70处的A; M85 处的Q; 和K93处的Q;
- [0141] -1299突变, 即I16处的R; A24处的T; S25处的N; G27处的S; L58 处的A; S70处的A; M85处的Q; 和K93处的Q; 以及
- [0142] -1227突变, 即I16处的S; S25处的N; G27处的S; L58处的A; S70 处的A; M85处的Q; 和K93处的H。
- [0143] 9. 根据以上条款中任一项所述的CTLA-4多肽, 包含选自SEQ ID NO: 36-55的氨基酸序列, 或者包含由以NCIMB登录号41948保藏的核酸编码的 CTLA-4氨基酸序列, 或者包含具有多达十个氨基酸突变的那些序列中的任 一个的变体。
- [0144] 10. 根据以上条款中任一项所述的CTLA-4多肽, 包含选自SEQ ID NO: 36-55的氨基酸序列, 或者包含由以NCIMB登录号41948保藏的核酸编码的 CTLA-4氨基酸序列, 或者包含具有多达五个氨基酸突变的那些序列中的任 一个的变体。
- [0145] 11. 根据条款10所述的CTLA-4多肽, 包含选自SEQ ID NO:36-55 的氨基酸序列, 或者包含由以NCIMB登录号41948保藏的核酸编码的CTLA-4 氨基酸序列, 或者包含具有多达三个氨基酸突变的那些序列中的任一个的 变体。
- [0146] 12. 根据条款1或条款2所述的CTLA-4多肽, 包含选自SEQ ID NO: 36-55的氨基酸序列, 或者包含由以NCIMB登录号41948保藏的核酸编码的 CTLA-4氨基酸序列。
- [0147] 13. 根据条款12所述的CTLA-4多肽, 包含选自SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:37、SEQ

ID NO:38、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO: 47的氨基酸序列,或由以NCIMB登录号41948保藏的核酸编码的CTLA-4 氨基酸序列。

[0148] 14.一种分离的CTLA-4多肽,该分离的CTLA-4多肽与野生型CTLA-4 SEQ ID NO:35相比具有更大的结合人CD80的亲合力、更大的效力和/或更大的稳定性,其中该多肽包含:

[0149] (i)氨基酸序列SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:47;

[0150] (ii)为含有多达十个氨基酸突变的(i)的变体的氨基酸序列,其中 残基25未突变并且是N;

[0151] (iii)为包含一个或多个氨基酸突变的(i)的变体的氨基酸序列,其中残基25未突变并且是N;该变体与(i)具有至少70%的序列一致性;或

[0152] (iv)由以NCIMB登录号41948保藏的核酸编码的CTLA-4氨基酸序列。

[0153] 15.根据条款14所述的CTLA-4多肽,包含SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:42 或SEQ ID NO:47,或具有多达五个氨基酸突变的那些序列中的任一个的变体。

[0154] 16.根据条款15所述的CTLA-4多肽,包含SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:42 或SEQ ID NO:47,或具有多达三个氨基酸突变的那些序列中的任一个的变体。

[0155] 17.根据条款14所述的CTLA-4多肽,其中该多肽包含与SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:47具有至少80%序列一致性的氨基酸序列。

[0156] 18.根据条款17所述的CTLA-4多肽,其中该多肽包含与SEQ ID NO: 68、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:47具有至少90%、95%、98%或99%序列一致性的氨基酸序列。

[0157] 19.根据以上条款中任一项所述的CTLA-4多肽,该多肽具有用于结合人CD80的50nM或更小的亲合力,其中亲合力为 K_D ,如通过表面等离子体共振所确定。

[0158] 20.根据条款19所述的CTLA-4多肽,该多肽具有用于结合人CD80 的20nM或更小的亲合力,其中该亲合力为 K_D ,如通过表面等离子体共振 所确定。

[0159] 21.根据以上条款中任一项所述的CTLA-4多肽,其中该多肽具有比 野生型CTLA-4 (SEQ ID NO:35)更大的结合人CD86的亲合力。

[0160] 22.根据条款14至21中任一项所述的CTLA-4多肽,包含:

[0161] -残基16处的S;残基25处的N;残基58处的G;残基70处的A; 残基80处的R;残基85处的S;和残基93处的Q;

[0162] -残基25处的N;残基27处的S;残基54处的K;残基56处的S; 残基59处的S;残基60处的T;残基61处的Q;残基63处的Y;残基64 处的P;残基65处的N;和残基处93的Q;

[0163] -残基16处的S;残基25处的N;残基54处的K;残基58处的G; 残基70处的A;残基80处的R;残基85处的S;和残基93处的Q;

[0164] -残基16处的V;残基25处的N;残基58处的G;残基70处的A; 残基85处的Q;和残基93处的Q;

[0165] -残基16处的R;残基24处的T;残基25处的N;残基27处的S; 残基58处的A;残基70

处的A;残基85处的Q;和残基93处的Q;或

[0166] -残基16处的S;残基25处的N;残基27处的S;残基58处的A;残基70处的A;残基85处的Q;和残基93处的H。

[0167] 23.根据条款14至22中任一项所述的CTLA-4多肽,包含氨基酸序列SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:47,具有多达三个氨基酸突变。

[0168] 24.根据条款14至18中任一项所述的CTLA-4多肽,包含:位置16处的R、I、S或V;位置24处的T或A;位置27处的S或G;位置54处的M或K;位置56处的N或S;位置58处的A、L或G;位置59处的T或S;位置60处的F或T;位置61处的L或Q;位置63处的D或Y;位置64处的S或P;位置65处的I、N或D;位置70处的A或S;位置80处的Q或R;位置85处的Q、M或S;位置93处的Q或H;以及位置120处的C或S。

[0169] 25.根据条款14至18中任一项所述的CTLA-4多肽,其中这些氨基酸突变选自以下各项:残基16处的T取代;残基32处的I取代;残基41处的G取代;残基42处的G取代;残基44处的E取代;残基56处的G取代;残基58处的S或P取代;残基59处的A取代;残基61处的P取代;残基62处的G取代;残基65处的V或T取代;残基70处的T、M或H取代;残基85处的V、R、K或L取代;残基87处的S取代;残基93处的T、E或M取代;残基104处的R、Q或E取代;残基106处的V取代;残基108处的D或S取代;残基115处的V或F取代;残基120处的S取代;残基51处的缺失。

[0170] 26.根据条款14所述的CTLA-4多肽,包含氨基酸序列SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:47,或者包含由以NCIMB登录号41948保藏的核酸编码的CTLA-4氨基酸序列。

[0171] 27.一种分离的CTLA-4多肽,该分离的CTLA-4多肽所具有的结合CD80的亲合力比结合CD86的亲合力大至少10倍。

[0172] 28.根据条款27所述的CTLA-4多肽,该多肽所具有的结合CD80的亲合力比结合CD86的亲合力大至少50倍。

[0173] 29.根据条款27或条款28所述的CTLA-4多肽,其中该多肽是如条款1至26中任一项中所定义的。

[0174] 30.根据以上条款中任一项所述的CTLA-4多肽,该多肽融合至IgG Fc氨基酸序列。

[0175] 31.根据条款30所述的CTLA-4多肽,其中该IgG Fc是被修饰以降低Fc效应子功能的人IgG1 Fc,并且包含天然人IgG1 Fc铰链区。

[0176] 32.根据条款30或条款31所述的CTLA-4多肽,其中该IgG Fc氨基酸序列包含人IgG1 Fc区,其中以下残基组中的一者或两者被如下取代:

[0177] 残基20处的F;残基21处的E;残基117处的S;以及

[0178] 残基38处的Y;残基40处的T;残基42处的E,

[0179] 残基编号参照SEQ ID NO:56来定义。

[0180] 33.根据条款30至32中任一项所述的CTLA-4多肽,其中该IgG Fc氨基酸序列包含SEQ ID NO:59。

[0181] 34.一种分离的CTLA-4多肽,包含由以NCIMB登录号41948保藏的核酸编码的1299 CTLA-4-Ig氨基酸序列。

- [0182] 35. 根据以上条款中任一项所述的CTLA-4多肽, 其中该多肽是呈多聚体形式。
- [0183] 36. 根据条款35所述的CTLA-4多肽, 其中该CTLA-4多肽是呈二聚体形式。
- [0184] 37. 根据条款35所述的CTLA-4多肽, 其中该CTLA-4多肽是呈四聚体形式。
- [0185] 38. 根据条款37所述的CTLA-4多肽, 其中该四聚体包括两对CTLA-4多肽, 每对包括与抗体轻链恒定区融合的一个CTLA-4多肽和与抗体重链恒定区融合的一个CTLA-4多肽。
- [0186] 39. 一种含有核酸的宿主细胞, 其中该核酸包含以NCIMB登录号 41948保藏的1299 CTLA-4-Ig核酸序列。
- [0187] 40. 一种组合物, 包含:
- [0188] 根据以上条款中任一项所述的CTLA-4多肽; 以及
- [0189] 一种或多种药用赋形剂。
- [0190] 41. 一种组合物, 包含:
- [0191] CTLA-4多肽, 该多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:47、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:47、或由以NCIMB登录号41948保藏的核酸编码的CTLA-4氨基酸序列, 该多肽融合至IgG Fc氨基酸序列; 以及
- [0192] 一种或多种药用赋形剂。
- [0193] 42. 根据条款40或条款41所述的组合物, 其中该CTLA-4多肽融合至包含SEQ ID NO:59的IgG Fc氨基酸序列。
- [0194] 43. 根据条款42所述的组合物, 其中融合至IgG Fc的该CTLA-4多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:16。
- [0195] 44. 一种组合物, 包含由以NCIMB登录号41948保藏的核酸编码的 1299 CTLA-4-Ig多肽以及一种或多种药用赋形剂。
- [0196] 45. 根据条款40至44中任一项所述的组合物, 包含浓度为至少70 mg/ml的CTLA-4多肽。
- [0197] 46. 根据条款45所述的组合物, 包含浓度为至少100mg/ml的CTLA-4多肽。
- [0198] 47. 根据条款1至38中任一项所述的CTLA-4多肽, 或根据条款40至46中任一项所述的组合物, 用于在一种通过皮下或静脉内给药治疗患者的方法中使用。
- [0199] 48. 根据条款1至38中任一项所述的CTLA-4多肽, 或根据条款40至46中任一项所述的组合物, 用于在一种治疗类风湿性关节炎、多发性硬化症、哮喘、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、系统性红斑狼疮或移植排斥的方法中使用。
- [0200] 49. 根据条款1至38中任一项所述的CTLA-4多肽, 或根据条款40至46中任一项所述的组合物, 用于在一种治疗方法中使用, 该方法包括以 28天的间隔向患者给与所述CTLA-4多肽或所述组合物。
- [0201] 50. 一种通过使选自SEQ ID NO:36-55的CTLA-4多肽氨基酸序列、或由以NCIMB登录号41948保藏的核酸编码的CTLA-4氨基酸序列突变而产生另一种CTLA-4多肽的方法, 该方法包括:
- [0202] 提供一种CTLA-4多肽, 该多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:36-55或由以NCIMB登录号41948保藏的核酸编码的CTLA-4氨基酸序列或其组成;

[0203] 在该氨基酸序列中引入一个或多个突变以提供另一种CTLA-4多肽;

[0204] 测试该另一种CTLA-4多肽的稳定性、亲和力和/或效力;以及

[0205] 将该另一种CTLA-4多肽配制到一种包含一种或多种药用赋形剂的组合物中。

[0206] 51. 根据条款50所述的方法, 其中该另一种CTLA-4多肽被轭合至Fc区。

[0207] 生物效力

[0208] 可溶性CTLA-4与在T淋巴细胞表面上表达的CD28竞争, 从而抑制配体CD80 (B7.1) 和CD86 (B7.2) 与CD28的结合, 否则这将引起T淋巴细胞的共刺激和活化。因此, 可溶性CTLA-4抑制T淋巴细胞的活化。外源性可溶性CTLA-4实现的这种抑制的效力可以在体外测定中确定。CTLA-4可以任选地轭合至另一个分子, 例如, 作为融合蛋白。例如, 可以存在IgG Fc, 如在此别处所描述。该测定可以用于使用野生型CTLA-4 (任选地轭合至Fc, 视情况而定) 作为对照, 定性地确定CTLA-4多肽是比野生型效力更高还是更低, 并且还可以提供关于效力差异量级的定量信息。执行这类测定和分析数据的统计显著性以便可靠地产生定性或定量信息的方法是本领域中已知的。

[0209] CTLA-4多肽的结合可经由IL-2的产生来测量, 因为CTLA-4与CD80和CD86的结合使IL-2产生减弱。合适的测定可以包括例如通过ELISA检测所产生的IL-2的量。

[0210] IL-2产生的量的减少可以是部分的或总体的。在所测试的浓度下, CTLA-4多肽可以使IL-2产生减少至少50%、75%或80%, 更优选至少85%、90%或95%。

[0211] 双重细胞测定可以用于鉴别具有比野生型更高的效力的CTLA-4多肽。测定CTLA-4多肽以便测量信号传导的抑制。表达CD28的T细胞 (例如, Jurkat细胞) 和表达CD80和CD86的B细胞 (例如, Raji细胞) 的共同培养导致IL-2的产生, 这是由于在植物血凝素 (PHA) 的存在下CD28与配体CD80和CD86之间的相互作用。然后经由ELISA检测IL-2。关于此测定的详细工作实例, 参见实例3。

[0212] 原代人T细胞活化测定可以用于进一步评定所选择的多肽的效力。可以根据CTLA-4多肽抑制来自原代人CD4+T淋巴细胞的CD80/86介导的IL-2分泌的能力对它们进行排序。还可以根据CTLA-4多肽在表达CD80和CD86的Raji细胞存在下抑制人CD4+T淋巴细胞的抗CD3刺激的增殖的能力对它们进行排序。增殖可以使用均匀发光测定 (ATP Lite) 来测定。此测定的一个优点是, 它测量了CTLA-4多肽阻断原代人CD4+T淋巴细胞的活化的效力。关于此测定的详细工作实例, 参见实例4。

[0213] 根据本发明的某些CTLA-4多肽已显示在测量T细胞活化的测定中以高效力结合CD80和CD86。CTLA-4多肽阻断配体CD80和CD86, 从而阻止来自这些分子的另外的活化信号并且导致IL-2产生减少。

[0214] CTLA-4多肽的效力可以使用技术人员所已知的一种或多种测定和/或如在此所描述或提及的来确定或测量。效力是以产生一种作用所需的量表示的活性的量度。典型地在细胞测定中比较多肽的滴定并且报告 IC_{50} 值。在功能性测定中, IC_{50} 是产品的浓度, 此浓度使生物应答达减少其最大值的50%。可计算 IC_{50} , 方法是作为产品浓度的对数的函数将最大生物应答的%作图, 并且使用软件程序如Prism (GraphPad) 来将S形函数拟合至数据以便产生 IC_{50} 值。 IC_{50} 值越低, 产品的效力越大。

[0215] CTLA-4多肽可被描述为具有增大的效力, 因为与参考 (例如, 野生型) CTLA-4多肽相比, 产生对IL-2产生的抑制所需的量更少。这也反映在所报告的 IC_{50} 值中。与人野生型

CTLA-4 (SEQ ID NO:35) 相比,优选的CTLA-4 多肽具有增大的效力。

[0216] 根据本发明的CTLA-4多肽可以具有比包含SEQ ID NO:35的野生型 CTLA-4更大的效力,其中效力是使用由B细胞活化的T细胞的IL-2产生测定中 IC_{50} 的减小。效力可以比野生型大至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍或至少50倍。如在此的实例中所描述,一个多肽SEQ ID NO:36 (变体1315) 显示具有比野生型CTLA-4大大约120倍的效力。效力可以比野生型大例如,多达150倍、多达130倍、多达120倍、多达 100倍、多达80倍、多达70倍或多达60倍。效力改进可以例如在比野生型大10倍至100倍的范围内。

[0217] CTLA-4多肽的效力可以参考在此例示的CTLA-4多肽序列,而不是(或者并且)参考野生型来测定,例如效力可以与SEQ ID NO:37 (变体1322)、SEQ ID NO:38 (变体1321)、SEQ ID NO:43 (变体1299)、SEQ ID NO: 36 (变体1315)、SEQ ID NO:42 (变体1115)、SEQ ID NO:47 (变体1227) 或由以NCIMB登录号41948保藏的核酸编码的变体1299中的任一个相比较。因此,这些CTLA-4变体中的一个可以在测定中用作对照。CTLA-4多肽可以至少与这些变体中的一个或多个一样有效,例如,至少与SEQ ID NO:43 (变体1299)或SEQ ID NO:47 (变体1227) 一样有效。CTLA-4多肽可以具有与SEQ ID NO:36 (变体1315) 的效力大约相同或小于其的效力。

[0218] 亲和力

[0219] CTLA-4多肽结合CD80或CD86的亲和力可以使用表面等离子体共振确定 K_D 来确定单价亲和力。关于使用表面等离子体共振测量结合亲和力并且确定 K_D 的工作实例,参见实例8。所得 K_D 可以与野生型CTLA-4 SEQ ID NO: 35的 K_D 相比较,或者与CTLA-4多肽SEQ ID NO:37 (变体1322)、SEQ ID NO:38 (变体1321)、SEQ ID NO:43 (变体1299)、SEQ ID NO:36 (变体1315)、SEQ ID NO:42 (变体1115)、SEQ ID NO:47 (变体1227) 或由以NCIMB登录号41948保藏的核酸编码的变体1299之一的 K_D 相比较。与野生型CTLA-4的亲和力相比,CTLA-4多肽可以具有更大的结合人CD86和/ 或人CD80的亲和力。

[0220] CTLA-4多肽所具有的结合人CD80的亲和力可以比野生型CTLA-4的亲和力大,例如比野生型大至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少100倍或至少140倍。CTLA-4多肽可以具有至少SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:47中的一个或多个的结合人CD80的亲和力,或至少由以NCIMB登录号41948保藏的核酸编码的CTLA-4变体1299的亲和力。CTLA-4多肽所具有的结合人CD80的亲和力可以与SEQ ID NO:37 的亲和力大约相同或比其小。结合人CD80的 K_D 可以是50nM或更小,例如 25nM或更小、20nM或更小、或10nM或更小。例如, K_D 可以是在5至50 nM的范围内。

[0221] CTLA-4多肽所具有的结合人CD86的亲和力可以比野生型CTLA-4的亲和力大,例如比野生型大至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍或至少10倍。CTLA-4多肽可以具有至少SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:47中的一个或多个的结合人CD86的亲和力,或至少由以NCIMB登录号41948保藏的核酸编码的CTLA-4变体1299的亲和力。CTLA-4多肽所具有的结合人CD86的亲和力可以与SEQ ID NO:37的亲和力大约相同或比其小。结合人CD86的 K_D 可以是2 μ M或更小,例如1.5 μ M或更小或1 μ M或更小。例如, K_D 可以是在0.5至2 μ M的范围内。

[0222] 超过CD86的对CD80的选择性

[0223] 在此描述的CTLA-4多肽可以结合CD80和CD86两者,但可以优先于CD86选择性地结合CD80。已知野生型CTLA-4具有相比结合CD86的亲和力更高的结合CD80的亲和力,并且根据本发明的CTLA-4多肽也可以具有比结合CD86的亲和力更大的结合CD80的亲和力。然而,与野生型CTLA-4相比,CTLA-4多肽可以具有优先于CD86的更大的结合CD80的选择性。例如,在如在此所述的表面等离子体共振测定中,野生型CTLA-4表现出比结合CD86的亲和力大大约4倍的结合CD80的亲和力。相比之下,CTLA-4多肽可以表现出比结合CD86的亲和力大超过10倍、超过20倍、超过30倍、超过40倍或超过50倍的结合CD80的亲和力。例如,CTLA-4多肽可以表现出比结合CD86的亲和力大多达120倍或130倍的结合CD80的亲和力。因此,当与野生型CTLA-4的亲和力相比时,CTLA-4多肽可以表现出比CD86结合亲和力的增加更大的CD80结合亲和力的增加。对于人CD80和人CD86,可以观察到超过CD86的对CD80的选择优先。

[0224] 此外,对于来自食蟹猴的CD80和CD86,可以保持同样的选择优先。超过CD86的结合CD80的亲和力的成倍差异对于人和食蟹猴CD80和CD86而言可以是大约相同的。

[0225] 结合CD80的亲和力的改进将赋予医学用途更好的生物学特征。通过结合CD80(其在活性免疫应答的背景下在抗原呈递细胞上被上调),CTLA-4抑制CD80与T细胞上的CD28结合,从而阻断至T细胞的活化信号。因此,CTLA-4多肽可以用于减弱体内T细胞应答,并且治疗其中这一点为有益的病状,如在此别处所描述。

[0226] 通过工程化优于CD86选择性地靶向CD80的CTLA-4多肽,可以获得结合CD80的相当大的亲和力增加。虽然关于CD80和CD86的相对作用本文尚无定论,但本发明的多肽优于CD86选择性地结合CD80并且表现出适于治疗用途的极佳生物学特征,如在各种测定中所示。不希望受理论束缚,本发明的CTLA-4多肽的属性可以至少部分归因于高的结合CD80的亲和力和/或相比CD86对CD80的优先结合。

[0227] 各种数据表明CD80向T淋巴细胞递送增加的活化信号的作用。例如:

[0228] 与CD86转导的CHO细胞相比,CD80转导的CHO细胞诱导从原代人T细胞增加的IL-2产生(斯拉维克(Slavik)等人,JBC 274(5):3116-3124 1999);

[0229] 在Jurkat T细胞(对细胞因子产生如IL-2重要的因子)中,与CD86相比,CD80诱导增加的NF κ B和AP-1转录因子活性(奥尔森(Olsson)等人,国际免疫学(Int.Immunol.) 10(4):499-506 1998);

[0230] 与CD86相比,CD80在与病毒感染的树突细胞(对T细胞存活和增殖重要)相互作用的CD8+T细胞中诱导增加的CD25表达(皮加瓦-加迪和亚历山大-米勒(Pejawar-Gaddy & Alexander-Miller),免疫学杂志 177:4495-4502 2006);以及

[0231] 在鼠过敏性哮喘模型中,使用突变的CTLA-4 Ig分子,发现CD80而非CD86是肺嗜酸性粒细胞增多的主要诱因(哈里斯等人,实验医学杂志185(1) 1997)。

[0232] 优先地增加CTLA-4对CD80的亲和力可以因此通过靶向更高效的CD80 T细胞活化途径而改进T细胞活化的抑制。

[0233] 另外,存在一些证据证明CD86信号传导可以在一些疾病模型中具有有益的抗炎作用。例如,在小鼠败血症模型中,观察到严重程度和死亡率与CD80的上调和伴随的CD86的下调相关联(诺兰(Nolan)等人,公共科学图书馆期刊(PLoS ONE) 4(8):6600 2009)。因此,优于CD86选择性结合CD80可以提供一个优点,因为这可以抑制CD80结合CD28,同时将

CD28的相互作用减少至更小的程度。

[0234] 在类风湿性关节炎患者的关节中可以发现CD80和CD86阳性细胞两者，并且这两种B7分子的结合可促进疗效，同时超过CD86的对CD80的选择性可以进一步促进在抑制T细胞活化方面的所希望的定量和定性作用。因此，本发明的CTLA-4多肽可以结合CD80和CD86两者，并且可以具有比野生型CTLA-4的亲合力更高的对CD80的亲合力，并且还可以具有比野生型CTLA-4的亲合力更高的对CD86的亲合力。

[0235] 交叉反应性

[0236] 优选地，根据本发明的CTLA-4多肽保持野生型CTLA-4的交叉反应性特征。

[0237] CTLA-4多肽可显示出用于结合食蟹猴和/或小鼠CD80和CD86，以及人CD80和CD86的交叉反应性。对食蟹猴CD80相比人CD80的亲合力的差异可以在10倍之内、在5倍之内、在2倍之内、在1.5倍之内或在1.2倍之内。对食蟹猴CD86相比人CD86的亲合力的差异可以在10倍之内、在5倍之内、在2倍之内、在1.5倍之内或在1.2倍之内。对小鼠CD80相比人CD80的亲合力的差异可以在10倍之内、在5倍之内、在2倍之内、在1.5倍之内或在1.2倍之内。对小鼠CD86相比人CD86的亲合力的差异可以在10倍之内、在5倍之内、在2倍之内、在1.5倍之内或在1.2倍之内。

[0238] CTLA-4多肽可以抑制食蟹猴T淋巴细胞的活化，该活化抑制例如被测量为使用来自食蟹猴的外周血单核细胞的混合淋巴细胞反应中IL-2产生的抑制。在针对食蟹猴T淋巴细胞的活化抑制的测定中，该多肽可以显示出比野生型CTLA-4更大的效力。

[0239] 关于本发明的示例性CTLA-4多肽的物种交叉反应性的数据在实例8中示出。

[0240] CTLA-4多肽可以显示出对CD80和CD86优先于B7家族中的其他相关蛋白质的特异性结合。因此，可能缺乏与PD-L2、B7-H1、B7-H2、B7-H3以及B7-H3B的交叉反应性。

[0241] 用于确定特异性的测定是本领域中已知的。例如，可以使用酶免疫测定。关于合适测定的工作实例，参见实例6。

[0242] 稳定性

[0243] CTLA-4多肽优选至少保持野生型CTLA-4的稳定性，并且优选比野生型更加稳定，例如如针对单独CTLA-4或如下所述的轭合（例如，融合）至Fc区的CTLA-4所测量。

[0244] 据信，更稳定的CTLA-4 Fc轭合物（“CTLA-4 Ig”）将能够更好地耐受皮下递送所要求的高（例如， $\geq 100\text{mg/ml}$ ）浓度配制物。

[0245] 可以在降解测定中测试稳定性。典型地，这包括将产品在固定温度（例如， 5°C 或 25°C ）下孵育一段时间，例如一个月，并且确定在那个月内的纯度损失程度（降解程度）。聚集和/或片段化可能造成纯度损失，并且各自可以被单独测量以确定一个百分比，两个值总计达到纯度损失%。降解测定的工作实例在实例9和实例10中陈述。

[0246] 具有改进的稳定性的CTLA-4多肽因为聚集减少可以更适于给药途径如皮下给药，聚集减少不仅增大功效而且降低中和或结合被激发的抗体的风险。

[0247] 与Fc轭合

[0248] 在一个实施例中，本发明提供一种亲合力优化的CTLA-4 Ig分子，该分子任选地具有延长的半衰期（例如，包含在此进一步描述的YTE突变），用于皮下或静脉内配制物，并且用于每月、28天的间隔或更小频率的给药以用于治疗中度至重度RA或如所述的其他病状。

[0249] 本发明提供一种多肽,该多肽由CTLA-4多肽序列组成,或者包含一种 肽或多肽序列或融合至该肽或多肽序列,例如融合至抗体分子或抗体分子 的一部分。例如,CTLA-4多肽可以融合至抗体Fc氨基酸序列,例如,IgG Fc。一个Fc区包括一个铰链区、一个CH2区和一个CH3区。优选地,IgG是人 IgG,例如IgG1、IgG2或IgG4。

[0250] IgG1的同种异型变体是已知的。优选地,IgG1 Fc区包含残基142处 的E和残基144处的M(编号对应于SEQ ID NO:56,从1开始,如图1中 所示)。这种同种异型在一般群体中得到充分体现。一种替代性IgG1 Fc 区(代表一种不同的同种异型)包含残基142处的D和残基144处的L。阿 巴西普中采用这种同种异型。

[0251] IgG Fc氨基酸序列可以包含具有某些突变的人IgG(例如IgG1或IgG4) Fc的氨基酸序列。例如,在人IgG是IgG1时,氨基酸序列可以被突变以便 减少或废除Fc效应子功能,例如补体依赖性细胞毒性(CDC)和抗体依赖 性细胞毒性(ADCC)。Fc效应子功能的去除可以在已知常规测定中进行确 认。关于确定ADCC和CDC的示例性测定,参见实例7。

[0252] 已知IgG1效应子功能可以通过IgG1 Fc铰链区的突变来降低。这一点 的一个实例在阿巴西普CTLA-4-IgG1 Fc构建体中,该构建体在IgG1 Fc区 中并入一个突变的铰链序列,其中野生型C被突变为S。阿巴西普的IgG1 区包含氨基酸序列SEQ ID NO:71,该氨基酸序列对应于野生型人IgG1 Fc 氨基酸序列SEQ ID NO:70,其中野生型C被S取代。这些取代是在Fc区 的残基6、12以及15处。

[0253] SEQ ID NO:70 VEPKSCDKTHTCPPCPAPE

[0254] SEQ ID NO:71 QEPKSSDKTHTSPSPAPE

[0255] 在本发明的背景中已出人意料地发现,这种突变降低了Fc结构域的稳 定性,这样使得阿巴西普CTLA4-IgG1 Fc融合物具有比使用野生型IgG1 Fc 序列的CTLA-4-IgG1 Fc融合物整体更低的稳定性。这种稳定性损失是不合 需要的,尽管如此但它仍然对降低或避免IgG1 Fc效应子功能至关重要。

[0256] 融合至本发明的CTLA-4多肽的Fc区优选不包含SEQ ID NO:71。优 选地,保留Fc的残基6、12和/或15处的半胱氨酸。优选地,根据本发明 的CTLA-4-Fc融合物包含野生型人IgG1 Fc铰链区。优选地,Fc区包含 SEQ ID NO:70。Fc区可以是如由以NCIMB登录号41948保藏的核酸编码的 1299 CTLA4-Ig多肽的Fc区。

[0257] 阿巴西普Fc回复突变为野生型去除由Fc突变所致的不稳定性,而这 同时也恢复了IgG1 Fc的效应子功能,这在许多治疗应用中是不合需要的。因此,这种突变改进了阿巴西普Fc结构域的稳定性,但却以重新引入不合 需要的效应子功能为代价。

[0258] 可以使用具有更低的或不具有效应子功能的其他IgG Fc区,例如IgG2。

[0259] 本发明提供一种使用缺乏效应子功能的IgG1 Fc,同时克服阿巴西普 突变中所固有的稳定性降低问题的方式。根据本发明的Fc区可以是包含三 重突变(TM)L20F、L21E、P117S的IgG1 Fc(奥加涅相(Oganessian)等 人,2008,晶体学报D(Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.)64:700-4)。这种突变降低Fc效应子功能,而不降低稳定性。因此,这样 一种Fc结构 域有助于高浓度的CTLA-4-Fc构建体的配制,这些构建体适合于产生用于 皮下给药的组合物。

[0260] 仍然另外的益处可以通过在Fc区中并入“YTE”突变来实现(道尔阿 奎(Dall'Acqua)等人,2006,生物化学杂志281:23514-24)。YTE突变 提供延长的体内半衰期,这可以

改进疗效和/或可以允许在降低或减小的频率剂量,如每月剂量下实现治疗益处。在本发明的产品中使用的Fc结构域可以包含残基38处的Y、残基40处的T以及残基42处的E。这代表来自人IgG1 Fc的突变M38Y、S40T、T42E。

[0261] 除了上述YTE和/或三重突变,优选的是Fc结构域的其他残基是野生型人IgG残基。人IgG1 Fc的一些改变是已知的,并且该Fc区可以包含具有YTE和/或三重突变的任何人IgG1。

[0262] 优选地,CTLA-4多肽铰合至IgG1 Fc氨基酸序列SEQ ID NO:59。这包括人IgG1 Fc铰链区,缺乏阿巴西普C至S突变,并入三重突变以便降低效应子功能,并且包括YTE半衰期延长。

[0263] 在此描述的改进的Fc区可以与野生型CTLA-4联合使用,但当铰合至根据本发明的CTLA-4多肽时提供还另外的益处。CTLA-4多肽可以任选地经由一个或多个连接氨基酸或接头肽在其C末端铰合至Fc区的N末端。优选地,铰合物是CTLA-4-Fc融合蛋白。

[0264] 例如,包含氨基酸序列SEQ ID NO:43、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:47的CTLA-4多肽可以铰合至IgG Fc氨基酸序列SEQ ID NO:59或铰合至IgG Fc氨基酸序列SEQ ID NO:60。

[0265] 根据本发明的CTLA-4-IgG Fc融合蛋白可以包含SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:16。

[0266] 由以NCIMB登录号41948保藏的核酸编码的1299 CTLA-4-IgG Fc多肽是本发明的一个实施例。如果需要,由以NCIMB登录号41948保藏的核酸编码的1299 CTLA-4多肽可以可替代地铰合至不同的Fc区。

[0267] CTLA-4多肽产品

[0268] CTLA-4多肽(包括CTLA-4-Fc的)可以是单体的或多聚体的,例如二聚体的、三聚体的、四聚体的或五聚体的。如在此别处所讨论,CTLA-4可以形成二聚体。这种天然二聚化可以通过将CTLA-4铰合至Fc结构域或其他二聚化结构域来促成。

[0269] 包含多个CTLA-4多肽的多肽多聚体是本发明的一方面。该多聚体内的该多个CTLA-4多肽可以是彼此相同或不同的。一种多聚体可以包含一些相同的多肽和/或一些不同的多肽。一种多聚体可以包含一个或多个根据本发明的CTLA-4多肽,以及一个或多个其他多肽。该一个或多个其他多肽可以包括例如,野生型CTLA-4和/或非CTLA-4多肽的多肽。

[0270] 该多聚体可以是包含两个根据本发明的CTLA-4多肽的二聚体,这些多肽可以是相同的(同二聚体)或不同的(异二聚体)。

[0271] 该多聚体可以是包含四个根据本发明的CTLA-4多肽的四聚体,这些多肽可以是全部相同的(同四聚体),或可以包括一个或多个根据本发明的不同的CTLA-4多肽(异四聚体)。该多聚体可以是包含两个根据本发明的CTLA-4多肽(彼此相同或不同)以及两个其他CTLA-4多肽(如野生型CTLA-4多肽)的四聚体。

[0272] 在CTLA-4是多聚体形式的情况下,CTLA-4多肽任选地与免疫球蛋白Fc区和/或抗体分子铰合。铰合物可以或不包含抗体抗原结合位点VH结构域或VL结构域。

[0273] 本发明的一方面是一种铰合物,该铰合物包含一个或多个,例如两个、三个、四个或五个CTLA-4多肽以及抗体分子或抗体结构域,优选人。二聚化CTLA-4结构域可以铰合至抗体重链-轻链对。抗体分子可以包括两个重链-轻链对,每个重链包括一个VH结构域和一

个或多个重链恒定结构域(例如CH1、CH2和CH3),并且每个轻链包括一个VL结构域和一个轻链恒定区,其中这两个重链-轻链对通过重链恒定结构域的二聚化而连接,并且其中4个CTLA-4多肽铰合至抗体分子,一个CTLA-4附接至四个可变结构域中的每个。轻链恒定区可以是 λ 或 κ 轻链。一对CTLA-4分子可以附接至每个VH-VL结构域对,其中附接至VH结构域的CTLA-4多肽与附接至VL结构域的CTLA-4多肽形成二聚体。优选地,CTLA-4的C末端与VH或VL结构域的N末端融合。优选地,VH和VL配对将不赋予与已知人抗原的任何结合。

[0274] 任选地,使抗体VH和/或VL结构域的一些或全部缺失,这样使得CTLA-4多肽被包括在内代替该VH和/或VL结构域或代替该VH和/或VL结构域的一部分。二聚体因此可以包括一对CTLA-4多肽,一个与抗体轻链恒定区融合,一个与抗体重链恒定区融合。四聚体因此可以包括两对CTLA-4多肽,每对包括与抗体轻链恒定区融合的一个CTLA-4多肽和与抗体重链恒定区融合的一个CTLA-4多肽。如上所述,重链恒定区包括一个或多个重链恒定结构域,例如CH1、CH2和CH3,并且轻链恒定区可以是 λ 或 κ 。

[0275] 本发明还包括CTLA4五聚体。可以任选地通过所附接的抗体Fc区的五聚化将五个CTLA4多肽组装以便形成五聚体。使用IgM(其是天然五聚体的)的Fc区,五聚体形成得到促进。因此,包含IgM(优选人IgM)的Fc区的五个CTLA4-Fc多肽可以被安排为五聚体。已对五聚体CTLA4进行了描述(山田(Yamada)等人,微生物学与免疫学(Microbiol.Immunol.) 40(7):513-518 1996)。

[0276] 多聚体内的多肽可以例如通过二硫键来共价连接。共价键可以存在于CTLA4多肽之间和/或连接至CTLA-4多肽的任何Fc区之间。在采用Fc区和其他抗体结构域的情况下,多肽可以按照与这类Fc结构域和其他抗体结构域天然发生的方式相同的方式连接。在CTLA-4多肽的半胱氨酸残基之间二硫键的形成在此别处进行描述。

[0277] 这类多聚体和铰合物可以用于如在此针对CTLA-4多肽所描述的任何方法或任何用途。多聚体结构可以促进CTLA-4的生物活性,例如对T细胞活化的抑制。野生型CTLA-4的抑制显示以四聚体形式增强(实例11,图7)。

[0278] CTLA-4多肽可以是标记的或未标记的。可以向CTLA-4序列或向铰合至其的Fc区添加标记。

[0279] 该CTLA-4和/或Fc区可以是糖基化的或未糖基化的。优选地,CTLA-4和/或Fc携带它们的正常人糖基化。

[0280] 如在此描述的CTLA-4多肽可以被进一步修饰并开发以便提供改进的或改变的额外变体。例如,在此描述的根据本发明的一种CTLA-4多肽的氨基酸序列可以通过引入一个或多个突变(例如取代)来修饰,以便提供另一种CTLA-4多肽,然后可以例如如在此别处所描述的测试该另一种CTLA-4多肽的效力、亲和力(对于CD80和/或CD86)和/或稳定性。

[0281] CTLA-4多肽优选地保持如在此描述的一种或多种所希望的功能特性。这类特性包括结合CD80和/或CD86的能力;以比野生型CTLA-4更大的亲和力结合CD80和/或CD86的能力;和/或如在此针对本发明的CTLA-4多肽描述的效力、亲和力和/或稳定性,例如如通过表面等离子体共振确定的50 nM或更小的结合人CD80的 K_D 。如在此所描述,与野生型CTLA-4 SEQ ID NO: 35相比,本发明的CTLA-4多肽典型地具有更大的结合人CD80的亲和力、更大的效力和/或更大的稳定性。

[0282] CTLA-4多肽可以包含与SEQ ID NO:36-55中的任一个,例如与SEQ ID NO:43、SEQ

ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:42 或SEQ ID NO:47具有至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98% 或至少99%序列一致性的氨基酸序列或由其组成。CTLA-4多肽可以包含与 SEQ ID NO:68具有至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%或 至少99%序列一致性的氨基酸序列或由其组成。CTLA-4多肽可以包含与由以NCIMB登录号41948保藏的核酸编码的CTLA-4氨基酸序列具有至少70%、至少80%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列一致性的氨基酸序列或由其组成。

[0283] CTLA-4多肽可以包含具有一个或多个氨基酸突变的SEQ ID NO:36-55、SEQ ID NO:68或由以NCIMB登录号41948保藏的核酸编码的CTLA-4氨基酸序列中的任一个或由其组成。例如,CTLA-4多肽可以包含多达十二个,例如多达十个氨基酸突变,例如多达五个突变,例如一个、两个或三个氨基酸突变。突变的实例在此别处进行描述。

[0284] 引入一个或多个突变之后,可以针对所希望的功能特性测试CTLA-4多肽,这些特性如结合CD80和/或CD86的能力;以比野生型CTLA-4更大的亲和力结合CD80和/或CD86的能力;和/或如在此针对本发明的CTLA-4多肽描述的效力、亲和力和/或稳定性,例如如通过表面等离子体共振确定的 50nM或更小的结合人CD80的 K_D 。

[0285] 本发明的一个方面是一种方法,该方法包括

[0286] 提供一种包含如在此所描述的CTLA-4多肽氨基酸序列或由其组成的 CTLA-4多肽;

[0287] 在该氨基酸序列中引入一个或多个突变以提供另一种CTLA-4多肽;并且

[0288] 测试该另一种CTLA-4多肽的稳定性、亲和力和/或效力。

[0289] CTLA-4多肽氨基酸序列可以包含例如SEQ ID NO 36-55或SEQ ID NO: 68或由以NCIMB登录号41948保藏的核酸编码的CTLA-4氨基酸序列中的任一个或由其组成。例如,氨基酸序列可以是SEQ ID NO:43、37、36、38、42或47。

[0290] 一个(含)与二十个(含)之间的突变可以被任选地引入,并且可以包括取代、缺失、插入或任何这些的混合。例如,可以引入一个或多个取代,例如一个(含)与二十个(含)之间的取代。

[0291] 用于测试该另一种CTLA-4多肽的稳定性、亲和力和/或效力的测定的实例在此进行描述。该另一种多肽可以具有不显著低于衍生其的CTLA-4多肽或大于衍生其的CTLA-4多肽的稳定性、亲和力和/或效力。

[0292] 该方法可以包括确定该另一种CTLA-4多肽具有如在此针对本发明的 CTLA-4多肽描述的效力、亲和力和/或稳定性,例如确定它具有如通过表面 等离子体共振确定的50nM或更小的结合人CD80的 K_D 。

[0293] 被鉴别为具有如在此针对本发明的CTLA-4多肽描述的效力、亲和力和 /或稳定性的另一种CTLA-4多肽然后可以被配制成一种药用组合物或用于包括如在此描述的治疗方法的方法中。

[0294] 该方法可以包括将该另一种CTLA-4多肽配制到包含一种或多种药学上可接受的赋形剂的组合物中。这类组合物、它们的用途以及配制在此别处进行更详细地描述。CTLA-4多肽可以按在此描述的任何型式提供,例如它可以如所述的轭合至Fc区。

[0295] 可以产生编码CTLA-4多肽,例如CTLA-4-Fc构建体的核酸分子。例如,核酸分子可以编码根据本发明的任何CTLA-4多肽氨基酸序列或CTLA-4-Fc 氨基酸序列。该核酸可以包

含以NCIMB登录号41948保藏的核酸序列,该 核酸序列编码1299 CTLA-4-Ig多肽,或至少编码其CTLA-4多肽区。核酸 分子可以被分离,并且可以包含于一种载体,例如一种用于在细胞中表达 该核酸的重组载体中。体外细胞可以包含该载体,并且可以用于表达CTLA-4 多肽或CTLA-4 Fc产品。多肽可以由具有NCIMB保藏登录号41948的大肠 杆菌细胞系表达。

[0296] 如在此描述的CTLA-4多肽可以通过包括从编码核酸表达多肽的一种 方法来产生。这可以方便地通过在引起或允许CTLA-4多肽表达的适当条件 下在含有这种载体的培养基中生长宿主细胞而实现。CTLA-4多肽还可以在 体外系统,如网织红细胞裂解物中表达。通过表达产生CTLA-4多肽之后, 可以常规地测试其活性,例如其结合CD86或CD80的能力。

[0297] 用于在各种不同的宿主细胞中克隆并表达多肽的系统是众所周知的, 并且可以用于表达在此描述的CTLA-4多肽,包括CTLA-4-Fc多肽。适合的 宿主细胞包括细菌、真核细胞(如哺乳动物细胞和酵母)以及杆状病毒系 统。本领域中可用于表达异源多肽的哺乳动物细胞系包括中国仓鼠卵巢细 胞、HeLa细胞、幼仓鼠肾细胞、COS细胞以及许多其他细胞。常见的优选 细菌宿主是大肠杆菌。可选择或构建合适载体,它们含有适当的调控序列, 包括启动子序列、终止子片段、多腺苷酸化序列、增强子序列、标志物基 因以及视情况的其他序列。视情况而定,载体可以是质粒、病毒,例如噬 菌体或噬菌粒。用于例如在核酸构建体制备、诱变、测序,将DNA引入细 胞和基因表达以及蛋白质分析中操作核酸的许多技术和方案是已知的。

[0298] 通常,编码根据本发明的CTLA-4多肽的核酸被提供为分离物、呈分离 的和/或纯化的形式,或者不含或基本上不含污染物。核酸可以是完全或部 分合成的,并且可以包括基因组DNA、cDNA或RNA。

[0299] 核酸可以作为可复制载体的一部分来提供,并且本发明还提供的是包 含编码本发明的CTLA-4多肽的核酸的载体,具体是所编码的多肽可在适当 条件下从其表达的任何表达载体;以及含有任何这种载体或核酸的宿主细 胞。在此背景下的表达载体是这样一种核酸分子,该核酸分子包含编码感 兴趣的多肽的核酸以及用于在体外表达系统(例如网织红细胞裂解物)中 或在体内例如在如COS或CHO细胞的真核细胞中或在如大肠杆菌的原核细 胞中表达多肽的适当调控序列。

[0300] 如在此所披露,宿主细胞可以含有核酸。本发明的核酸可以整合至宿 主细胞的基因组(例如染色体)中。整合可根据标准技术通过将促进与基 因组重组的序列包含在内来促成。核酸可以在细胞内的染色体外载体上。

[0301] 核酸可以被引入宿主细胞中。引入,通常可以(特别是对于体外引入 来说)被称为(但不限于)“转化”或“转染”,可以采用任何可用的技 术。对于真核细胞,合适技术可以包括磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖、电穿孔、使用逆转录病毒或其他病毒例如牛痘(或对于昆虫 细胞,使用杆状病毒)的脂质体介导的转染和转导。对于细菌细胞,合适技术可以包括氯化 钙转 化、电穿孔以及使用噬菌体来转染。

[0302] 标志物基因(如抗生素抗性 or 敏感性基因)可以用于鉴别含有感兴趣 的核酸的克隆,如本领域所众所周知的。

[0303] 引入之后可以引起或允许从核酸表达,方法是例如通过在用于表达基 因的条件下培养宿主细胞(其可以包括实际转化的细胞,但更可能的是细 胞将是转化的细胞的后

代),这样使得产生所编码的多肽。如果多肽被表达为与适当的信号前导肽偶联,它可从细胞分泌到培养基中。通过表达产生之后,可以根据具体情况将多肽从宿主细胞和/或培养基中分离和/或纯化,并且随后根据需要例如在一种可以包含一种或多种额外的组分的组合物,如包含一种或多种药学上可接受的赋形剂、媒介物或载体的药用组合物的配制中使用(例如,参见下文)。

[0304] 根据本发明的CTLA-4多肽可以例如在通过从编码核酸表达而产生之后(例如使用一种抗体)来分离和/或纯化。因此,CTLA-4多肽可以被提供为不含或基本上不含污染物。CTLA-4多肽可以被提供为不含或基本上不含其他多肽。分离的和/或纯化的CTLA-4多肽可以在一种可以包含至少一种额外组分的组合物,例如包含一种药学上可接受的赋形剂、媒介物或载体的药用组合物的配制中使用。包含根据本发明的CTLA-4多肽的组合物可以用于预防性和/或治疗性治疗,如在此别处所讨论。

[0305] 因此,本发明的一个方面是一种包含本发明的CTLA-4多肽(任选地铰合至IgG Fc的CTLA-4多肽)以及一种或多种药用赋形剂的组合物。根据本发明的CTLA-4多肽的许多实例在此别处描述,并且任一种可以铰合至Fc区。

[0306] 例如,该组合物可以包含以下各项或由其组成:

[0307] 一种铰合至IgG Fc氨基酸序列SEQ ID NO:59的CTLA-4多肽,该多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO:43(变体1299)、SEQ ID NO:37(变体1322)、SEQ ID NO:38(变体1321)、SEQ ID NO:36(变体1315)、SEQ ID NO:42(变体1115)或SEQ ID NO:47(变体1227);以及

[0308] 一种或多种药用赋形剂。

[0309] 该组合物可以包含由以NCIMB登录号41948保藏的核酸编码的1299 CTLA-4 Ig多肽以及一种或多种药用赋形剂或由其组成。

[0310] 例如,CTLA-4多肽可以包含氨基酸序列SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15或SEQ ID NO:16。

[0311] 根据本发明的组合物可以包含浓度为至少70mg/ml,例如至少80 mg/ml、至少90mg/ml或至少100mg/ml的CTLA-4多肽。浓度被计算为包括糖基化的多肽的质量,并且在存在Fc区时将Fc区包括在内。多肽浓度可以通过标准分光光度测量方法,基于所计算的包括糖基化(如果存在)的多肽的质量使用一个消光系数来确定。当存在糖基化时,可假定它是完整的。合适的方法在实例中进行说明。例如,可以使用1.09的消光系数来确定浓度,如针对1299 CTLA-4-Fc所例示的。

[0312] 配制物和医学用途

[0313] 本发明的CTLA-4多肽可以通过每月给药或更小频率给药来给与。低频率给药通常是所希望的以便减轻患者和临床医生的负担,但会涉及较低疗效的风险和/或产品剂量增加的需求。根据本发明的效力、亲和力和/或半衰期的改进降低了这类风险并且提供了与先前给药方案相比更低或更小频率给药的可能性。

[0314] 对于许多患者来说,将要求在延长的时间段内进行治疗,例如持续许多年,并且可能持续患者的一生。因此设想将给与多个剂量。剂量之间的间隔可以是数天、一周或一月的数量级。优选地,以至少或大约14、21或28天的间隔进行给药。优选地,通过以28天或更大间隔的给药(例如每月给药)进行皮下递送而对患者给药。

[0315] 给药可以是静脉内的或通过任何其他合适的给药途径。例如,可以通过皮下注射

给与CTLA-4多肽,这有助于患者在家自我给药并且提供与静脉内给药方案相比减少患者到诊所的潜在优势。

[0316] 与用于静脉内给药的配制物相比,将CTLA-4配制到适合于皮下给药的减小体积中典型地要求更大浓度的CTLA-4产品。对于皮下给药,至少70 mg/ml的浓度典型地是优选的,更优选地至少100mg/ml。根据本发明的CTLA-4组合物的改进的稳定性有助于例如针对皮下给药以高浓度配制。

[0317] 根据本发明并且用于根据本发明使用的药用组合物除了活性成分以外,还可以包含一种药学上可接受的赋形剂、载体、缓冲剂、稳定剂或本领域技术人员熟知的其他材料。这些材料应无毒并且不应干扰活性成分的功效。载体或其他材料的确切性质将取决于给药途径,给药途径可以是任何合适的途径,但最可能的是注射(用或不用针),尤其是皮下注射。其他优选的给药途径包括通过吸入给药或鼻内给药。

[0318] 对于静脉内、皮下或肌内注射,活性成分将呈胃肠外可接受的水溶液形式,该溶液不含热原质并且具有适合的pH、等渗性以及稳定性。本领域技术人员完全能够使用例如等渗媒介物,如氯化钠注射液、林格氏注射液、或乳酸盐林格氏注射液来制备合适溶液。需要时,可以包括防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其他添加剂。

[0319] 根据本发明的CTLA-4多肽可以用于诊断或治疗人或动物身体,优选人的方法中。

[0320] 治疗方法可以包括给与根据本发明的CTLA-4多肽,例如给与包含该CTLA-4多肽的药用组合物。如在此描述的CTLA-4多肽或包含CTLA-4多肽的组合物可以用于在通过皮下或静脉内给药治疗患者的方法中使用。

[0321] CTLA-4多肽可以优选通过以“预防有效量”或“治疗有效量”(视情况而定,但预防可被视为疗法)给药而提供给个体,这足以对个体显示出益处。所给予的实际量以及给予的速率和时程将取决于正治疗的疾病的性质和严重程度。治疗处方,例如剂量等的确定,属于全科医生和其他医生的职责。

[0322] 取决于待治疗的病状,组合物可单独或与其他治疗组合,同时或顺序地给予。

[0323] CTLA-4多肽适用于减弱T细胞应答,并且因此可以用于治疗其中T细胞应答减弱是有益的病状。CTLA-4多肽可以用于提供治疗益处的临床适应症包括自身免疫性疾病和/或炎性疾病。治疗适应症的实例是类风湿性关节炎(RA)、幼年型关节炎、银屑病性关节炎、银屑病、多发性硬化症、哮喘、克罗恩氏病、狼疮肾炎、系统性红斑狼疮、强直性脊柱炎、移植排斥、I型糖尿病、干燥综合症和溃疡性结肠炎,以及其他自身免疫性病状如脱发。根据本发明的CTLA-4多肽被视为特别适合于患有中度至重度RA的患者。

[0324] 用根据本发明的CTLA-4多肽或药用组合物治疗的患者可以是患有中度至重度活动性RA的那些患者,不管先前或正在用合成的缓解疾病的抗风湿药(DMARD)或用不同于CTLA-4,例如不同于阿巴西普的生物制剂进行治疗。根据本发明的CTLA-4多肽可以用于通过单一疗法,结合常规DMARD(在对常规DMARD应答不足的患者中,或在生物制剂失效患者中)来治疗患者。

[0325] 可以监测治疗功效,并且可以获得关于关节损伤进展和/或患者功能的数据。

[0326] 实例

[0327] 以下CTLA4-Ig序列已保藏在NCIMB:

[0328] 大肠杆菌DH5a变体1299=NCIMB 41948

[0329] 保藏日期=2012年3月13日

[0330] 用于优化CTLA-4 Fc融合分子的生物效力的策略由两个主要活动组成。一个活动是利用核糖体展示执行CTLA-4结构域的定向进化以便选择该结构域的改进的对配体CD80和CD86的亲合力,以及改进的稳定性。对来自核糖体展示选择的输出(由不同群体的CTLA-4变体组成)进行测序,并且将编码独特序列的那些与Fc融合配偶体一起表达以用于直接在体外T细胞刺激测定中测试。此方法的优点是在生物相关测定中以药物样型式,即在促进二聚化的Fc结构域的背景下对许多不同的CTLA-4变体(>1,000被测试)进行排序。此策略的另一个特征是执行与改进的生物功能相关联的那些CTLA-4突变的重组,以便通过协同作用实现效力的进一步增加。

[0331] 这种方法能够同时选择更高亲和力的CTLA-4变体和蛋白质稳定性。亲和力选择采用降低浓度的靶配体(在此情况下是CD80/86),以便选择性地富集更高亲和力的CTLA-4变体。改进的稳定性选择使用去稳定剂如DTT,或疏水相互作用色谱(HIC)珠粒来从选择池中除去不太稳定或更易于解折叠的那些变体。因此,稳定性和亲和力压力可以应用于一个单一选择中,而不是追求并行方法。

[0332] 第二个活动是合理地工程化Fc结构域以便引入已知除去Fc介导的效应子功能并且增强分子的体内循环半衰期的突变。不同的变体Fc区被制备为与CTLA-4的融合物并且在加速的体外稳定性研究中进行测试以便选择具有最佳稳定性特征的Fc区。

[0333] 在进行这两个并行活动和后续筛选之后,将最具效力的CTLA-4结构域(如通过在多个体外T细胞刺激测定中的抑制所测量的)与最稳定的工程化Fc结构域(如通过加速的体外稳定性研究所测量的)组合。针对生物效力和蛋白质稳定性的另外体外测试允许以最终药物型式对分子进行相对排序。

[0334] 实例1.CTLA-4变体文库的构建和针对改进的效力和稳定性的核糖体展示选择

[0335] 对单体人CTLA-4结构域进行核糖体展示,该结构域对应于Swiss-Prot登记号P16410,胞外结构域的残基38-161,无Fc区附加。此序列(SEQ ID NO:35)也被称为野生型CTLA-4。通过将所要求的人CTLA-4cDNA的部分克隆到含有核糖体展示所要求的5'和3'调控元件的载体中来获得CTLA-4核糖体展示构建体(汉斯(Hanes)等人,酶学方法(Meth.Enzymol.) (2000) 328:404)。此构建体包含T7RNA聚合酶启动子序列,其后是CTLA-4编码序列上游的原核生物核糖体结合位点(夏因-达尔加诺序列(Shine-Dalgarno sequence))。将人CTLA-4的二聚化界面中的氨基酸120(或根据Swiss-Prot登记号P16410中的编号的位置157)处的半胱氨酸突变为丝氨酸以防止CTLA-4分子以核糖体展示型式二聚化,不然这可能会干扰改进的CTLA-4序列的选择。在CTLA-4序列下游,来自丝状噬菌体的基因III蛋白的一部分被包括在内作为一个间隔区,以便允许CTLA4变体从核糖体隧道中展示出。CTLA-4核糖体展示构建体还含有mRNA水平的5'和3'茎环序列,以便帮助使mRNA文库稳定而免于核酸酶降解。

[0336] 易错文库

[0337] 将上述人CTLA-4核糖体展示构建体用作如下一个模板,在该模板上使用易错PCR产生随机变体文库。根据制造商的说明书使用多样化PCR随机诱变试剂盒(Clontech公司)对CTLA-4基因应用易错PCR。定制反应以提供平均每个分子四个氨基酸突变,以及具有大约 2.5×10^{10} 个变体分子的文库。将这个随机诱变程序进一步并入选择过程中,在其中它被

应用于第三轮选择的输出,以便在进一步选择之前将更多的多样性引入到结合剂富集体上。

[0338] ‘环4’定向文库

[0339] 人CTLA-4核糖体展示构建体还用作如下一个模板,在该模板上产生一个变体文库,这些变体具有靶向CTLA-4分子的一个区的具有促进与CD80和CD86的相互作用的潜力的诱变。检查人CTLA-4:人CD80复合物(蛋白质数据库(PDB):1I8L)以及人CTLA-4:人CD86复合物(PDB:1I85)的共晶结构以便观察分子之间,特别是紧邻配体的CTLA-4的氨基酸侧链之间的结合相互作用。观察到包含氨基酸位置59至65(或根据CTLA-4 SwissProt登记号P16410编号的位置96至102)的人CTLA-4蛋白质(SEQ ID 35)的一个区域形成在CD80和CD86方向上延伸的一个环。使用饱和(NNS)诱变将此区域中的每个残基完全随机化以便产生具有大约 3.4×10^{10} 个变体分子的文库。通过标准技术使用重叠寡核苷酸(SEQ ID NO:33和SEQ ID NO:34)来构建此‘环4’文库。

[0340] 针对改进的亲合力和稳定性的选择

[0341] 使用如汉斯等人(酶学方法(2000)328:404)中描述的基于核糖体展示亲和力的选择进行对人CTLA-4变体与人CD80和CD86的改进的结合的选择。简言之,将CTLA-4变体DNA文库转录并且然后在不含细胞的原核翻译系统中翻译,并且使翻译反应停止以便产生三元核糖体展示选择复合物(mRNA-核糖体-蛋白质),然后将这些复合物与人CD80或人CD86 Fc融合蛋白(R&D系统公司)一起孵育。通过与蛋白G包被的磁珠(Dynal)一起孵育来捕获CD80或CD86结合复合物,并且通过磁性分离来回收结合的三元复合物,同时将未结合的复合物洗掉。通过逆转录和PCR回收编码结合的CTLA-4变体的mRNA。为驱动对具有改进的结合的CTLA-4变体的选择,使用降低浓度的CD80或CD86在若干轮次内重复选择过程。

[0342] 结合针对改进的对CD80和CD86的亲合力的选择,同时通过针对改进的稳定性的核糖体展示选择CTLA-4变体池。在早期选择轮次(第1轮和第3轮)中,使用DTT施加有利于回收更稳定的CTLA-4变体的选择压力(杰姆特斯(Jermutus)等人,美国科学院院刊,2001年1月2日;98(1):75-80)。在翻译反应中包括最终浓度0.5mM的DTT,之后将反应与疏水相互作用色谱(HIC)琼脂糖珠粒(通用医疗(GE Healthcare))的浆料一起孵育,同样是在0.5mM DTT存在下进行。HIC步骤用于捕获折叠不佳的变体并且通过离心将它们从反应中除去,之后与CD80一起孵育并且如上所述进行亲和力选择。

[0343] 热点诱变文库以及关键突变的合理重组

[0344] 在从易错PCR和环4定向文库中初始筛选CTLA-4变体之后,鉴别与改进的活性相关的突变并且使用它们来设计另外的CTLA-4变体。在一个策略中,构建热点诱变文库,其中将SEQ ID NO:35的位置16、25、58、70、85以及93(或根据CTLA-4 SwissProt登记号P16410编号的位置53、62、95、107、122以及130)在单个文库中使用饱和(NNS)诱变完全随机化。该文库是使用重叠和诱变寡核苷酸(SEQ ID NO:61(含)至SEQ ID NO:67(含))来创建。然后如上所述针对改进的亲和力对此文库进行选择。

[0345] 在一种替代方法中,将从易错、环4以及热点诱变文库中鉴别的较小数量的突变(这些突变与改进的活性相关)通过寡核苷酸定向的诱变进行组合,以便产生合理重组体,然后直接测试这些重组体的生物活性。为此策略选择的突变是:I16S、S25N、S25P、G27S、M54K、N56S、L58G、T59S、F60T、L61Q、L61P、D62G、D63Y、S64P、I65N、I65V、S70A、Q80R、M85S

以及K93Q(或根据CTLA-4 SwissProt登记号P16410编号为:I53S、S62N、S62P、G64S、M91K、N93S、L95G、T96S、F97T、L98Q、L98P、D99G、D100Y、S101P、I102N、I102V、S107A、Q117R、M122S以及K130Q)。

[0346] 实例2.CTLA-4野生型和作为Fc融合蛋白的变体的表达

[0347] 将来自核糖体展示选择的变体CTLA-4基因克隆到载体pEU7.1中。此载体允许CTLA-4基因作为与IgG1 Fc区(SEQ ID NO:56)的框内融合物而表达。将核糖体展示输出进行PCR扩增并且克隆到pEU7.1中,之后转化到大肠杆菌DH5- α 细胞中。用于PCR克隆的寡核苷酸还被设计成将位置120处的丝氨酸(根据Swiss-Prot登记号P16410中的编号的残基157)回复成野生型氨基酸半胱氨酸。在对单独转化体测序之后,选择总计超过1,000个具有独特CTLA-4氨基酸序列的变体以用于蛋白质表达。在88个变体的批次中,将编码质粒DNA根据供应商方案(凯杰(Qiagen))进行纯化并且通过分光光度法在260nm下进行量化,这样使得DNA浓度可以用于计算用于转染的DNA的正确量。

[0348] 来自24孔板的CTLA-4蛋白质的表达、纯化以及量化

[0349] 将3ml的中国仓鼠卵巢(CHO)细胞(ECACC)以每毫升1百万个细胞接种于含有25 μ M L-氨基亚砷蛋氨酸(西格玛(Sigma)M5379)的CD-CHO培养基(英杰(Invitrogen)10743-029)中的24孔板(沃特曼(Whatman)734-2558)的单独孔中。将含有细胞的24孔板用可透气的夹层盖(Applikon 生物技术公司(biotechnology),Z365001224)密封并且放置在用于深孔板的夹具(Applikon生物技术公司,Z365001700)上。在250rpm,80%湿度,5%CO₂和37℃下摇荡细胞。对于转染,将含有3 μ g质粒DNA的50 μ l NaCl(150mM)与含有21 μ g的线性25kDa PEI(Polysciences公司,23966)的50 μ l NaCl混合。将所形成的DNA-PEI复合物添加到细胞中,允许在复合物形成开始与添加到细胞中之间不超过15分钟。转染后16至24小时,通过添加300 μ l/孔的CD-CHO高效进料B(英杰A10240)喂养细胞。在250 rpm,80%湿度,5%CO₂和37℃下摇荡板,持续另外5至6天,以便允许蛋白质表达至生长培养基中。表达之后,通过在3000rpm下离心10分钟使含有蛋白质的用过的培养基澄清。使用FreedomEvo®液体处理机器人(帝肯瑞士(Tecan))将澄清的上清液(1.2ml)重新分布于96孔过滤板(3M Empore公司,12146036)中。使用真空泵和QIAvac 6S真空歧管(凯杰)通过过滤除去残留细胞碎片。处理1.8ml的澄清的过滤的上清液以用于纯化,该纯化是在Minitrack(RTM)液体处理机器人(珀金埃尔默(Perkin Elmer))上使用PhyTip(RTM)蛋白A亲和柱(普迈(Phynexus),PTP-92-20-01,20 μ l树脂床体积)而进行。通过500 μ l NaP(20mM,pH 7.0)调节PhyTip(RTM)柱。PhyTip(RTM)柱然后通过以6 $\times$ 300 μ l批次经过粗上清液来加载,用200 μ l D-PBS、200 μ l NaP(20mM,pH 7.0)洗涤,用120 μ l 100mM HEPES 140mM NaCl(pH3)洗脱并且用20 μ l HEPES(1M,pH 8.0)中和。

[0350] 将纯化的蛋白质转移到96孔黑聚丙烯板(格瑞那(Greiner),655209),随后添加145 μ l PBS、0.02%Tween 20、1mg/ml BSA、0.05%叠氮化钠缓冲液(Octet缓冲液)。在相同缓冲液中使用先前纯化的CTLA-4野生型Fc融合蛋白产生标准曲线。在黑聚丙烯板中,以150 μ l体积,以500 μ g/ml的起始浓度以及3倍稀释制备一组标准浓度。使用具有蛋白A包被的生物传感器(ForteBio公司,18-0004)的Octet RED,使用120秒的读取时间与200rpm的流速执行量化。具有8个生物传感器的一个柱用于样品的每个96孔板。通过在96孔板中添加200 μ l 10mM甘氨酸(pH 1.7)(西格玛,G-7403)生成生物传感器。在处理下批样品之前,

通过添加200 μ l Octet 缓冲液中和生物传感器。以30秒的时间和200rpm的流速执行3个再生/ 中和循环。通过使用Octet RED数据分析软件包比较未知物与标准曲线之间的结合率来确定未知样品的浓度。

[0351] 更大规模的CTLA-4蛋白质的表达、纯化以及量化

[0352] 为了更大规模地制备作为Fc融合物的单独CTLA-4蛋白质,应用如用于24孔板方法的相同的一般步骤。从大肠杆菌细胞制备含有作为与IgG1 Fc 的框内融合物的变体CTLA-4基因的质粒。为了以>100mg的规模制备蛋白质,通过基因合成制备含有与IgG1 Fc 基因直接同框的CTLA-4基因的整个构建体。在所有情况下,制备编码感兴趣的蛋白质的质粒DNA并且将这些质粒DNA转染到CHO细胞中用于表达。代替24孔板,在从培养上清液纯化之前,在组织培养瓶或波袋(wave-bags)中生长更大体积的细胞。汇集收获物并且过滤,之后通过蛋白A色谱法纯化。将培养上清液加载到适当大小的陶瓷蛋白A (BioSeptra) 柱上,并且用50mM Tris-Hcl (pH 8.0)、250mM NaCl洗涤。将结合的IgG使用0.1M柠檬酸钠 (pH 3.0) 从柱洗脱 并且通过添加Tris-Hcl (pH 9.0) 进行中和。使用Nap10柱 (GE, 17-0854-02) 将洗脱的物质缓冲液更换为PBS,并且基于蛋白质的氨基酸序列使用一个消光系数以分光光度法确定IgG的浓度。使用SEC-HPLC和SDS-PAGE分析纯化的蛋白质的聚集或降解。

[0353] 实例3. Raji (B细胞) 和Jurkat (T细胞) 双重细胞测定中CTLA-4变体的生物活性

[0354] 此处描述的筛选策略包括在体外T细胞刺激测定中测量超过1,000个 CTLA-4变体(与Fc融合配偶体一起表达)的生物活性。测试来自所有不同的诱变策略(包括易错PCR、靶向诱变、热点重组以及合理重组)的CTLA-4 变体的生物活性,并且根据它们相对于野生型CTLA-4 (SEQ ID NO:35) (也以Fc融合物型式表达)的生物活性对它们进行排序。

[0355] 为了确定CTLA-4变体的生物活性,向由Raji (B细胞) 和Jurkat (T 细胞) 细胞组成的双重细胞测定中添加样品。CD28 (由Jurkat细胞表达) 与CD80 (B7-1) 和CD86 (B7-2) 配体(在Raji细胞上表达)的相互作用 结合用于T细胞受体(如PHA (植物血凝素) 的共同活化信号导致白细胞介素-2 (IL-2) 从Jurkat细胞中释放。可溶性CTLA-4可以结合CD80和CD86 配体,从而阻断它们与CD28的相互作用并且减弱此应答。因此,CTLA-4 Ig 克隆的效力通过如在IL-2 HTRF测定 (CisBio 64IL2PEC) 中所测量的对IL-2 从T细胞中释放的抑制来确定。

[0356] 384孔低蛋白结合板(格瑞那#781280) 用于对测试样品进行十一次1/3连续稀释,这些测试样品是在完全生长培养基(RPMI 1640 Glutamax, 英杰#61870, 10%FBS, 1%盘尼西林/链霉素, 英杰#15140) 中制备的。所有样品稀释从5-30 μ g/ml最高样品浓度开始,以一式两份对细胞进行。

[0357] 将Raji和Jurkat悬浮细胞从瓶中转移到离心小瓶中并且在240g下 旋转5分钟。两种细胞系皆以750,000个细胞/ml的浓度重悬浮于生长培养基中,并且各自以0.02ml/孔(=15,000个细胞/细胞系/孔) 接种到384 孔Maxisorp板(Nunc 464718) 中。将0.02ml从样品稀释板转移到细胞板,并且向所有其他孔中添加0.02ml的40 μ g/ml PHA (西格玛#L-1668) (或0.02ml培养基,阴性对照孔) 以得到最终浓度10 μ g/ml,并且在37 $^{\circ}$ C 与5%CO₂一起孵育。

[0358] 20-24小时之后,收获细胞上清液并且使用商业IL-2 HTRF试剂盒 (CisBio 64IL2PEC) 测量IL-2分泌。简言之;抗hIL-2穴状化合物(供体荧光团) 和抗hIL-2 d2 (受体荧光团) 的‘主液混合物’ 是通过1/200 稀释于新鲜制成的轭合物缓冲液 (0.2%BSA/0.8M

KF/PBS) 中而制成的。使用1/2稀释于培养基中最高浓度为2ng/ml的IL-2 (NIBSC#96/504) 生成八点标准曲线。将相等体积的试剂主液混合物与样品混合于384孔低 体积测定板 (Costar 3676) 中并且在室温下孵育3-168小时。使用320nm 的激发波长以及620nm和665nm 的发射波长在Envision (珀金埃尔默) 上读取板。

[0359] 针对每个孔如下计算 $\Delta F\%$ 和特异性结合值:

$$\Delta F \% = \frac{(\text{样品 A665/A620 比} - \text{NSB A665/A620 比})}{(\text{NSB A665/A620 比})} \times 100$$

$$\text{特异性结合 \%} = \frac{(\text{样品 } \Delta F \% - \text{NSB } \Delta F \%)}{(\text{总 } \Delta F \% - \text{NSB } \Delta F \%)} \times 100$$

[0362] 仅含培养基的孔 (最小/非特异性结合 (NSB)) 用作背景, 并且仅含 PHA的孔 (最大/总计) 孔用于确定测定的最大信号。使用GraphPad Prism (v5.01) 软件分析结果并且利用最小二乘拟合方法使用非线性回归曲线拟合模型 (Log[抑制剂] 对应答, 具有可变斜率) 测定IC50浓度。

[0363] 下表概述了归类为相对于也以Fc融合物型式表达的野生型CTLA-4 (SEQ ID NO: 35) 生物效力得到显著改进的CTLA-4变体分子的数目:

[0364]	诱变策略	相比 Fc 融合物型式的野生型 CTLA-4 (SEQ ID NO: 35), 具有显著改进的生物活性的 CTLA-4 变体的数目
	易错 PCR 文库	50
	环 4 靶向文库	1
	热点文库	21
	合理重组	35
	总计	107

[0365] 重复测试这些107CTLA-4变体之后, 确定准确的IC₅₀测量值, 并且计算相比Fc融合物型式的野生型CTLA-4 (SEQ ID NO: 35) 的成倍改进。下表概述了来自每种诱变策略的最具效力的CTLA-4变体中的一些的此数据。

[0366]

CTLA-4 变体名称	SEQ ID NO	优化策略	Raji-Jurkat 双重细胞测定 IC ₅₀ (nM)	相比野生型 CTLA-4 (SEQ ID NO: 35) 的成倍改进
野生型	35	不适用	29.80	1
变体 1315	36	合理重组	0.24	123
变体 1322	37	合理重组	0.33	91
变体 1321	38	合理重组	0.44	68
变体 0943	39	合理重组	0.54	56
变体 0898	40	合理重组	0.60	50
变体 1319	41	合理重组	0.78	38
变体 1115	42	热点文库	0.44	67
变体 1299	43	热点文库	0.53	56
变体 1249	44	热点文库	0.69	43

[0367]

变体 1303	45	热点文库	0.93	32
变体 1114	46	热点文库	1.40	21
变体 1227	47	热点文库	1.60	19
变体 0722	48	易错文库	1.07	28
变体 0645	49	易错文库	1.24	24
变体 0636	50	易错文库	1.26	24
变体 0745	51	易错文库	1.36	22
变体 0673	52	易错文库	1.38	22
变体 0788	53	易错文库	1.60	19
变体 0701	54	易错文库	1.61	19
变体 0439	55	环 4 靶向文库	1.20	25

[0368] 这些CTLA-4变体的序列在图1A中示出。

[0369] 在Raji-Jurkat双重细胞测定中最具效力的CTLA-4变体中的6种以及 Fc融合物型式的野生型CTLA-4 (SEQ ID NO: 35) 的IC₅₀曲线在图3A中示出。

[0370] 实例4. Raji (B细胞) 和原代人CD4⁺T细胞双重细胞测定中CTLA-4变体的生物活性

[0371] 将人血收集于CPT Vacutainer收集管 (BD生物科学公司 (BD Biosciences)) 中并且添加400μl的CD4+RosetteSep纯化试剂 (干细胞技术公司 (Stem Cell Technologies))。

孵育20分钟后,将管在1700g 下旋转25分钟。收集细胞并转移至50ml锥形管中并且在350g下旋转沉降10分钟。通过重悬浮于20ml的Vitalize试剂(Vitalize reagent) 并且孵育从30分钟至1小时来使红细胞裂解。然后使细胞在350g下旋转 沉降10分钟并且用T细胞培养基(补充有1%Anti/Anti(英杰)的Xvivo-15 培养基(龙沙(Lonza)))洗涤一次。在完全T细胞培养基中制备Raji 和原代人CD4+T细胞的每毫升一百万个细胞的悬浮液,并且保持分离直到 准备好添加到96孔测定板中。在一个单独的96孔板(低蛋白结合)中, 在完全T细胞培养基中以100 μ g/ml的起始浓度并且进行十二次1:5连续稀释来制备CTLA-4变体分子稀释液。每种CTLA-4变体浓度取100 μ l分散到组织培养基处理的96孔测定板中。将Raji和人CD4+T细胞的细胞悬浮液以1:1的比例混合并且添加抗CD3抗体(克隆UCHT1 (BD生物科学 公司)达到最终浓度10 μ g/ml。将100 μ l的细胞悬浮液分散到含有CTLA-4 变体的每个孔中并且孵育18至24小时。接着通过在350g下离心5分钟 收获板,并且将上清液转移至一个新的96孔板。根据制造商的方案使用人 IL-2 Duoset试剂盒(R&D系统公司)测量IL-2分泌。

[0372] 在原代人CD4+T细胞测定中最具效力的CTLA-4变体中的6种与Fc融合物型式的野生型CTLA-4 (SEQ ID NO:35)的效力比较在图3B中示出。

[0373] 实例5. 使用来自食蟹猴的外周血单核细胞的混合淋巴细胞反应中CTLA-4变体的生物活性

[0374] 将来自两只单独动物的食蟹猴血收集于CPT Vacutainer收集管(BD 生物科学公司)中并且在1700g下旋转沉降25分钟。收集细胞并转移至 50ml锥形管中并且在350g下旋转沉降10分钟。通过重悬浮于20ml的 Vitalize试剂并且孵育从30分钟至1小时来使红细胞裂解。然后使细胞在 350g下旋转沉降10分钟并且用T细胞培养基(补充有1%Anti/Anti(英杰)的Xvivo-15培养基(龙沙))洗涤一次。在一个单独的96孔板(低 蛋白结合)中,在完全T细胞培养基中以100 μ g/ml的起始浓度并且进行 十二次1:5连续稀释来制备CTLA-4变体分子稀释液。将100 μ l的CTLA-4 Ig稀释液分散到组织培养基处理的96孔测定板中。将来自每只动物的PBMC 细胞悬浮液以1:1比例混合,并且将100 μ l的细胞悬浮液分散到含有 CTLA-4 Ig稀释液的所有孔中并且孵育24小时。接着通过在350g下旋转 5分钟收获板,并且将上清液转移至一个新的96孔板。根据制造商的方案 使用食蟹猴IL-2 ELISA试剂盒(MABTech公司)测量IL-2分泌。

[0375] 在食蟹猴混合淋巴细胞反应测定中最具效力的CTLA-4变体中的2种与 Fc融合物型式的野生型CTLA-4 (SEQ ID NO:35)的效力比较在图3C中示出。

[0376] 实例6. 变体结合CD80和CD86的特异性

[0377] 使用活化的HRP标记试剂盒(皮尔斯(Pierce) 公司)用辣根过氧化物酶标记CTLA-4变体。使B7家族成员的胞外结构域的Fc融合蛋白(R&D 系统公司)以在PBS中5 μ g/ml的浓度在Maxisorp板(Nunc)上包被过夜。将板用1%BSA阻断并以不同浓度添加HRP标记的CTLA-4变体,并且使用 比色底物(BD OptEIA底物,BD生物科学公司)确定结合蛋白的量。

[0378] 与其他相关蛋白配体相比,最具效力的CTLA-4变体中的2种对CD80 和CD86的特异性在图4中示出。

[0379] 实例7. Fc介导的效应子功能的分析

[0380] 抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)测定

[0381] 将人血收集于CPT Vacutainer收集管(BD生物科学公司)中并且在 1700g下旋转

沉降25分钟。收集细胞并转移至50ml锥形管中并且在350 g下旋转沉降10分钟。通过重悬浮于20ml的Vitalize试剂并且孵育从30分钟至1小时来使红细胞裂解。然后使细胞在350g下旋转沉降10分钟并且用T细胞培养基(补充有1%Anti/Anti(英杰)的Xvivo-15培养基(龙沙))洗涤一次。将500,000个PBMC在各种抗体和Fc融合蛋白的存在下接种在200ul Xvivo-15培养基中。孵育24小时后,通过用抗CD19抗体(BD生物科学公司)和7-AAD(分子探针公司(Molecular Probes))染色使用流式细胞术来确定B淋巴细胞存活力。通过用500,000乘以存活门控内的细胞的百分比来计算每个样品的存活B细胞数目,存活门控内的这些细胞根据也是CD19⁺和7-AAD⁻的前向/侧向散射特性来确定。

[0382] 补体依赖性细胞毒性(CDC)测定

[0383] 将人血清收集在血清分离管中并且添加到Xvivo-15培养基中达到最终浓度10% w/v。将100,000个Raji B细胞在含有各种抗体和Fc融合蛋白的培养基中孵育18小时。通过用7-AAD(分子探针公司)染色使用流式细胞术来确定Raji细胞存活力。通过用100,000乘以存活门控内的细胞的百分比来计算每个样品的存活细胞数目,存活门控内的这些细胞根据也是7-AAD⁻的前向/侧向散射特性来确定。使用含有先前已在56℃下热灭活30分钟的人血清的培养基作为对照以便确认补体依赖性细胞毒性。具有TM修饰的最具效力的CTLA-4变体中的两种的零效应子功能(ADCC和CDC)的展示在图5中示出。

[0384] 实例8. 结合人、食蟹猴和小鼠CD80和CD86的CTLA-4变体的动力学分析

[0385] CD80和CD86试剂的克隆和表达

[0386] 通过引物延伸PCR克隆合成编码来自人和小鼠的CD80和CD86的细胞外结构域(ECD)的cDNA分子并将这些分子克隆到pDONR221(英杰目录号12536-017)中。使用用于人和小鼠CD80和CD86的数据库序列(参见表1)。无食蟹猴序列可用,所以基于预测的食蟹猴与恒河猴之间的高同源性,使用恒河猴CD80(ensemble登录号ENSMUG00000016367)和CD86(ensemble登录号ENSMUG00000000912)的序列来设计能够扩增食蟹猴中的基因的编码序列的引物。

[0387] 然后根据制造商的说明书使用LR Gateway Clonase II酶(英杰目录号12538-120),将编码胞外结构域的cDNA片段转移至哺乳动物表达载体pDEST12.2(英杰公司)。pDEST12.2载体已进行修饰以便含有与感兴趣的插入基因同框的FLAG 10xhis标签(DYKDDDDKAAHHHHHHHHHH),并且还通过插入来自pCEP4载体(英杰目录号V044-50)的oriP复制起点,从而允许在转染到表达EBNA-1基因产物的细胞系(如HEK293-EBNA细胞)后进行附加型质粒复制。使用Ni-NTA亲和色谱法(HisTrap HP柱(通用医疗目录号17-5248-02)),然后尺寸排阻色谱法(Superdex 200柱(通用医疗目录号17-1069-01))来纯化HEK293-EBNA上清液中的表达的蛋白。

[0388] CD80胞外结构域

	物种	ECD 中的氨基酸	登 录 号 (Swiss-Prot)	SEQ ID NO
[0389]	人	1-242	P33681	1
	小鼠	1-245	Q00609	2
	食蟹猴	1-242	不适用	3

[0390] CD86胞外结构域

	物种	ECD 中的氨基酸	登 录 号 (Swiss-Prot)	SEQ ID
[0391]	人	7-246	P42081	4
	小鼠	1-245	P42082	5
	食蟹猴	1-242	不适用	6

[0392] 结合亲和力的表面等离子体共振 (SPR) 分析

[0393] 在Biacore 2000SPR机器上执行CTLA-4:CD80和CD86相互作用的SPR 分析。使用胺偶联试剂盒(通用医疗目录号BR-1000-50),经由伯胺基团 使大约200RU的CTLA4变体共价偶联至CM5Biacore芯片(通用医疗目录 号BR-1000-14)。使CD80和CD86于HBS-EP缓冲液(通用医疗目录号 BR-1001-88)中的滴定液流过固定的CTLA4变体。对所有迹线进行双重参 考值扣除。使用Biacore评估软件,利用拟合缔合常数和解离常数的1:1 朗格缪尔(Langmuir)模型执行分析。在变体具有非常快速的动力学的情况 下执行平衡分析。

[0394] 所选择的CTLA-4变体和Fc融合物型式的野生型CTLA-4 (SEQ ID NO: 35) 对人、食蟹猴以及小鼠配体的单价亲和力 (K_d , nM) 在以下示出。

	人 CD80	人 CD86	食蟹猴 CD80	食蟹猴 CD86	小 鼠 CD80	小 鼠 CD86
野生型 CTLA-4	1540	6420	1550	6530	2950	5550
变体 1322	8	526	6	330	未检测到	未检测到
[0395] 变体 1321	23	1085	19	960	未检测到	未检测到
变体 1299	12	1388	10	1020	未检测到	未检测到
变体 1315	20	1129	17	750	未检测到	未检测到
变体 1227	11	1154	9	1020	未检测到	未检测到
变体 1115	20	1542	18	1070	未检测到	未检测到
[0396] 变体 1114	42	1340	39	1280	2170	4860

[0397] 所选择的CTLA-4变体对人、食蟹猴以及小鼠配体的亲和力的改进(相比Fc融合物型式的野生型CTLA-4的成倍改进)在以下示出。

[0398]		人CD80	人CD86	食蟹猴CD80	食蟹猴CD86	小鼠CD80	小鼠CD86
	野生型CTLA-4	1	1	1	1	1	1
	变体1322	193	12	258	20	未检测到	未检测到
	变体1321	67	6	82	7	未检测到	未检测到
	变体1299	128	5	155	6	未检测到	未检测到
	变体1315	77	6	91	9	未检测到	未检测到
	变体1227	140	6	172	6	未检测到	未检测到
	变体1115	77	4	86	6	未检测到	未检测到
	变体1114	37	5	40	5	1	1

[0399] 应注意,这些变体(它们是在生物活性测定中测试的最具效力的变体)展示了对人CD80配体比对人CD86配体更大的亲和力增加(如图6所概述)。使用食蟹猴配体观察到相似模式的对CD80比对CD86更大的亲和力增加。

[0400] 实例9.具有Fc突变的野生型CTLA-4的加速稳定性研究

[0401] CTLA-4蛋白质的表达、纯化以及量化

[0402] 将编码与Fc变体1至4融合的天然CTLA4胞外结构域的cDNA克隆到 pEE 12.4 (龙沙)中并且在CHO细胞中表达。简言之,通过核转染(龙沙)使用程序U-024和具有5mcg的线性化质粒DNA的溶液V对 1×10^6 个 CHO K1SV细胞(龙沙)进行转染。转染之后,将细胞在CD-CHO(英杰)($1 \times$ GS补充)以及50 μ M MSX中培养。细胞在转染后大约2周开始生长,在那时将它们扩大到摇瓶中以用于产生蛋白质。对于纯化,使用一系列步骤:开始是MabSelect捕获步骤,接着是SuperQ阴离子交换抛光步骤,随后是 SEC以便除去聚集体。将蛋白质储存在pH 7.2的磷酸盐缓冲盐水(PBS)中。

[0403] 稳定性研究

[0404] 对与不同Fc变体融合的CTLA-4分子执行稳定性研究,以便比较它们的稳定性并且确定最稳定的Fc构型。所测试的分子包括:CTLA-4 Fc变体-1 (SEQ ID NO:7);CTLA-4 Fc变体-2 (SEQ ID NO:8);CTLA-4 Fc变体-3 (SEQ ID NO:9);以及CTLA4 Fc变体-4 (SEQ ID NO:10)。对于Fc变体-1 (SEQ ID NO:57)、Fc变体-2 (SEQ ID NO:58)、Fc变体-3 (SEQ ID NO:59)以及Fc变体-4 (SEQ ID NO:60)在图1B中突出显示Fc区的氨基酸差异。

[0405] CTLA-4 Fc变体-1 (SEQ ID NO:7)是阿巴西普分子,它包含与具有修饰的铰链的IgG1 Fc区 (SEQ ID NO:57)融合的野生型CTLA-4 (SEQ ID NO:35)。

[0406] CTLA-4 Fc变体-2 (SEQ ID NO:8)是被修饰以便在Fc区中并入YTE突变的阿巴西普,并且包含与具有修饰的铰链和YTE突变的IgG1 Fc (SEQ ID NO:58)融合的野生型CTLA-4 (SEQ ID NO:35)。

[0407] CTLA-4 Fc变体-3 (SEQ ID NO:9)包含与其中在阿巴西普中所见的C>S突变回复,包含野生型铰链并且进一步包含三重突变(TM)和YTE突变的IgG1 Fc (SEQ ID NO:59)融合的野生型CTLA-4 (SEQ ID NO:35)。

[0408] CTLA4 Fc变体-4 (SEQ ID NO:10)包含与包含YTE突变和铰链区突变并且在位置111包含脯氨酸的IgG4 Fc (SEQ ID NO:60)融合的野生型CTLA-4 (SEQ ID NO:35)。

[0409] Swiss Prot编号中的位置111对应于如图1所示的相对应的IgG1序列SEQ ID NO: 56的残基14或IgG4的全长恒定区中的残基228。已知在此位置引入丝氨酸至脯氨酸突变可使链间二硫键相互作用稳定并且因此最小化半IgG₄分子的形成(阿尔博斯和舒尔曼,免疫学105(1):9-19 2002;范得纽特科夫司克登等人,科学307(5844):1554-7 2007;安吉尔等人,分子免疫学30(1):105-8 1993;舒尔曼等人,分子免疫学38(1):1-8 2001 (Aalberse and Schuurman, Immunology 105(1):9-19 2002; Van der Neut Kolfschoten et al, Science 307(5844):1554-7 2007; Angal et al, Mol Immunol 30(1):105-8 1993; Schuurman et al Mol Immunol 38(1):1-8 2001)),由此将与候选药物开发相关的难题减到最小。另外,因为此脯氨酸被发现于IgG₁的相对应位置中,所以预期它不会引起任何免疫性关注。

[0410] 将分子以液体形式以约10mg/mL接收在PBS缓冲液中。使用Amicon超离心过滤器,30,000MW截留浓缩这4种分子。将这些分子在4200g下离心直到达到目标体积(30-60分钟)。使用1.4的标准抗体消光系数以分光光度法测量浓度。最终浓度被计算为在71-85mg/ml之间。虽然在此实例中使用1.4的抗体消光系数,但多肽的实际消光系数随后被确定为接近1.1。这些计算的浓度因此实际上代表91-108mg/ml的浓度范围。如果需要,可以通过连续超滤,在体积限制的情况下实现更高的浓度。

[0411] 将每个Fc变体的样品在5°C和25°C下孵育1个月。尺寸排阻高效液相色谱法(SE-HPLC)是用于确定并且比较4种分子的降解率的稳定性指示测定。根据SOP DV-9525,以1ml/min的流速运行SE-HPLC。在HPLC色谱图中,在单体峰之前洗脱的任何峰(洗脱时间小于该单体的洗脱时间)被指定为聚集体峰。在单体峰之后洗脱的任何峰(洗脱时间大于该单体的洗脱时间)被指定为片段峰。聚集体和片段的总百分比通过一个或多个聚集体峰和一个或多个片段峰的区域占色谱图中所有蛋白质峰的总区域的分数的分数来确定。在孵育之前,对于时间0数据点,对所有样品运行SE-HPLC。此后,对于25°C稳定性研究每周收集SE-HPLC数据,对于5°C稳定性研究每2周收集SE-HPLC数据。两种研究的总持续时间为1个月。以下示出使用对1个月数据的线性拟合计算的聚集体率、片段化率以及降解率。

[0412] 5°C下的1个月后的比率

分子	聚集体%/月	片段%/月	纯度损失%/月
Fc变体-1 (SEQ ID 57)	2.6	0.4	3.0
Fc变体-2 (SEQ ID 58)	3.2	0	3.2
Fc变体-3 (SEQ ID 59)	1.0	0	1.0
Fc变体-4 (SEQ ID 60)	0.8	0.9	1.7

[0414] 25°C下的1个月后的比率

分子	聚集体%/月	片段%/月	纯度损失%/月
Fc变体-1 (SEQ ID 57)	12.8	0.7	13.4
Fc变体-2 (SEQ ID 58)	14.3	0.9	15.2
Fc变体-3 (SEQ ID 59)	7.8	0	7.8
Fc变体-4 (SEQ ID 60)	9.2	3.6	12.8

[0416] 基于此数据,基于在5°C和25°C下最低的纯度损失率,Fc变体-3 (SEQ ID NO:59) 被选择为最佳融合配偶体。

[0417] 实例10与Fc变体-3融合的CTLA-4变体的加速稳定性研究

[0418] 对与Fc变体-3 (SEQ ID NO:59) 融合的最具效力的CTLA-4变体分子 中的6种进行稳定性研究以便确定最稳定的CTLA-4变体。以此型式测试的 分子是：变体1115 (SEQ ID NO:15)、变体1227 (SEQ ID NO:16)、变体1299 (SEQ ID NO:13)、变体1315 (SEQ ID NO:14)、变体1321 (SEQ ID NO:12)、变体1322 (SEQ ID NO:11)。

[0419] 将分子以液体形式以约10mg/mL接收在PBS缓冲液中。使用Amicon 超离心过滤器，30,000MW截留浓缩这6种分子。将这些分子在4200g下 离心直到达到目标体积 (30-60分钟)。使用氨基酸序列计算消光系数。所 计算的消光系数是：1315和1321为1.10；1115、1227、1299以及1322 为1.09。使用适当的消光系数测量浓度。最终浓度在94.6-101.6mg/ml 之间。

[0420] 稳定性研究遵循在前面部分中描述的相同指导在5℃和25℃下进行，除了对于5℃稳定性研究仅收集0和1个月时间点。两种研究的总持续时 间为1个月。以下示出使用对1个月数据的线性拟合计算的聚集率、片段 化率以及降解率。

[0421] 25℃下的1个月后的比率

[0422]	分子	聚集体%/月	片段%/月	纯度损失%/月
	1115	6.0	0	6.0

[0423]	1227	4.0	0	4.0
	1315	24.0	0	24.0
	1299	1.5	0	1.5
	1321	8.8	0	8.8
	1322	1.4	0	1.4

[0424] 5℃下的1个月后的比率

[0425]	分子	聚集体%/月	片段%/月	纯度损失%/月
	1115	0.4	0	0.4
	1227	0.8	0	0.8
	1315	2.6	0	2.6
	1299	0.2	0	0.2
	1321	0.6	0	0.6
	1322	0.1	0	0.1

[0426] 发现变体1299和1322在5℃和25℃研究在1个月内具有最低水平 的纯度损失。因此，对于变体1299和1322，将5℃下的稳定性研究延长至 6个月。以下示出从每月时间点获得的结果。

[0427] 1299 5℃稳定性数据

[0428]	时间点 (月)	聚集体%	片段%	纯度%
	0	1.1	0.0	98.9

1	1.4	0.0	98.6
2	2.0	0.0	98.0
3	1.9	0.0	98.1
4	2.4	0.0	97.6
5			
6			

[0429] 从数据的线性拟合计算的纯度损失%/年=3.6%

[0430] 1322 5℃稳定性数据

[0431]

时间点(月)	%聚集体	片段%	纯度%
0	1.2	0.0	98.8
1	1.4	0.0	79.5
2	1.8	0.0	98.2
3	1.7	0.0	98.3
4	2.1	0.0	97.9
5			
6			

[0432] 从数据的线性拟合计算的纯度损失%/年=2.6%

[0433] 实例11四价CTLA-4分子的构建

[0434] 四价CTLA-4表达载体的设计和构建

[0435] 使用硝基酚结合IgG NIP 74(重链SEQ ID NO:17;轻链SEQ ID NO: 18)作为骨架,通过使CTLA-4与抗体V_H链和V_L链两者的氨基末端融合而产生四价CTLA-4(图7A)。通过使用2步PCR策略并且接着将PCR产物亚克隆到含有抗体恒定结构域的IgG表达载体中而使CTLA-4与V_H和V_L融合来产生表达构建体。初级PCR用基因特异性引物(SEQ ID NO 21-28)扩增CTLA-4以及IgG V_H和V_L,这些基因特异性引物将一个柔性接头添加在CTLA-4的3'端并且添加至V_H和V_L的5'端。二级‘拼接(pull-through)’PCR通过使互补接头序列退火而使CTLA-4附接至V_H和V_L的5'端。最终CTLA-4-V_H构建体是使用在5'端引入BssHII位点并且在3'端引入BstEII位点的引物(SEQ ID NO 29-30)进行扩增的。最终CTLA-4-V_L构建体是使用在5'端引入ApaLI位点并且在3'端引入PacI位点的引物(SEQ ID NO 31-32)进行扩增的。PCR产物然后用对应的限制酶消化,之后直接将它们连接至预消化的IgG表达载体(pEU1.4用于CTLA-4-V_H盒,并且pEU3.4用于CTLA-4-V_L盒)中,并且用于化学转化感受态大肠杆菌DH5-α细胞。通过序列分析鉴别了对应于SEQ ID NO 19和20的正确克隆以用于表达研究。

[0436] 四聚体CTLA-4的表达和纯化

[0437] 对于转染所要求的两种质粒,即编码CTLA-4重链融合物的一种质粒和编码CTLA-4轻链融合物的一种质粒,单个菌落用于接种含有100μg/mL氨苄西林的100ml 2×TY培养液。培养物在37℃和300rpm下孵育过夜(16小时)。按照制造商的说明书使用EndoFree Plasmid Maxi试剂盒(凯杰;12362)从细菌沉淀中分离质粒DNA。在转染的开始,将CHO细胞以每毫升一百万个细胞接种于含有25μM L-氨基亚砷蛋氨酸(西格玛;M5379)的CD-CHO培养基(英杰;10743-029)中。将细胞在500ml的体积中培养并且在37℃,140pm,80%湿度和5%CO₂下孵育。为了形成用于转染的DNA-PEI复合物,将250μg的各载体混合并且在150mM

NaCl中稀释,以便得到最终体积为1ml的500 μ g DNA。然后将DNA与1ml 5mg/ml PEI (Polysciences 公司;23966)混合,在150mM NaCl中稀释,并且在室温下孵育1分钟。然后将DNA-PEI混合物小心地添加到CEP6培养物中,然后将培养物孵育24 小时,之后添加150ml CD-CHO高效进料B(英杰;A10240)。然后将培养物孵育另外六天。

[0438] 将培养物在2000g下离心30分钟;然后将澄清的培养上清液通过500 ml Stericup (密理博;SCGVU05RE)过滤。使用ÄKTApurifier 10系统(通用医疗;28-4062-64)和亲和色谱法、随后凝胶过滤色谱法,进行来自澄清的培养上清液的四价CTLA-4的纯化。将5ml MabSelect Sure柱(通用医疗;11-0034-94)用10倍柱体积的D-PBS(英杰;14040-174)平衡。使澄清的培养上清液经过柱,随后将柱用另外10倍柱体积的D-PBS洗涤。将结合蛋白用0.1M甘氨酸(pH 2.7)洗脱,并且收集1ml级分。将各级分用100 μ l 1M Tris(pH 10)中和,并且汇集含有洗脱的蛋白质的级分并按照制造商的说明书使用Vivaspin,10,000MWC0过滤单元(赛多利斯(Sartorius Stedim);VS2002)将它们浓缩至2ml。将2ml浓缩的样品加载到HiLoad Superdex 200,16/60凝胶过滤柱(通用医疗;17-1069-01)上,该柱已在D-PBS中平衡。在整个过程中,收集1.2ml级分。汇集含有具有正确分子量(保留体积为56ml)的靶蛋白的那些级分,使用Vivaspin, 10,000MWC0过滤单元浓缩至1ml并且储存在-80°C下。

[0439] 在Raji-Jurkat双重细胞测定中对纯化的四聚体CTLA-4连同Fc融合物型式的野生型CTLA-4(SEQ ID NO:35)作图,并且数据在图7中示出。此测定中四聚体CTLA-4和Fc融合物型式的野生型CTLA-4(SEQ ID NO:35)的IC₅₀值分别是1.93nM和11.39nM。这指示在从二聚体Fc融合物型式转换成四聚体IgG样型式之后,效力增加5.9倍。

[0001]	序列表
[0002]	<110> 米迪缪尼有限公司 (MEDIMMUNE, LLC)
[0003]	米迪缪尼有限公司 (MEDIMMUNE LIMITED)
[0004]	<120> CTLA-4变体
[0005]	<130> CTLA4-101
[0006]	<141> 2013-03-11
[0007]	<150> 61/645,686
[0008]	<151> 2012-05-11
[0009]	<160> 72
[0010]	<170> SIPOSequenceListing 1.0
[0011]	<210> 1
[0012]	<211> 274
[0013]	<212> PRT
[0014]	<213> 人工序列()
[0015]	<220>
[0016]	<223> 合成序列:人CD80 flag his 10
[0017]	<400> 1
[0018]	Met Gly His Thr Arg Arg Gln Gly Thr Ser Pro Ser Lys Cys Pro Tyr
[0019]	1 5 10 15
[0020]	Leu Asn Phe Phe Gln Leu Leu Val Leu Ala Gly Leu Ser His Phe Cys
[0021]	20 25 30
[0022]	Ser Gly Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu
[0023]	35 40 45
[0024]	Ser Cys Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile
[0025]	50 55 60
[0026]	Tyr Trp Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp
[0027]	65 70 75 80
[0028]	Met Asn Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr
[0029]	85 90 95
[0030]	Asn Asn Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly
[0031]	100 105 110
[0032]	Thr Tyr Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg
[0033]	115 120 125
[0034]	Glu His Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr
[0035]	130 135 140
[0036]	Pro Ser Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile
[0037]	145 150 155 160
[0038]	Ile Cys Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu

[0039]	165																170				175							
[0040]	Glu	Asn	Gly	Glu	Glu	Leu	Asn	Ala	Ile	Asn	Thr	Thr	Val	Ser	Gln	Asp												
[0041]	180																185				190							
[0042]	Pro	Glu	Thr	Glu	Leu	Tyr	Ala	Val	Ser	Ser	Lys	Leu	Asp	Phe	Asn	Met												
[0043]	195																200				205							
[0044]	Thr	Thr	Asn	His	Ser	Phe	Met	Cys	Leu	Ile	Lys	Tyr	Gly	His	Leu	Arg												
[0045]	210																215				220							
[0046]	Val	Asn	Gln	Thr	Phe	Asn	Trp	Asn	Thr	Thr	Lys	Gln	Glu	His	Phe	Pro												
[0047]	225																230				235				240			
[0048]	Asp	Asn	Asp	Pro	Ala	Phe	Leu	Tyr	Lys	Val	Val	Gly	Ala	Ala	Asp	Tyr												
[0049]	245																250				255							
[0050]	Lys	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	Ala	Ala	His	His	His	His	His	His	His	His												
[0051]	260																265				270							
[0052]	His	His																										
[0053]	<210> 2																											
[0054]	<211> 277																											
[0055]	<212> PRT																											
[0056]	<213> 人工序列()																											
[0057]	<220>																											
[0058]	<223> 合成序列:小鼠CD80 flag his 10																											
[0059]	<400> 2																											
[0060]	Met	Ala	Cys	Asn	Cys	Gln	Leu	Met	Gln	Asp	Thr	Pro	Leu	Leu	Lys	Phe												
[0061]	1																5				10				15			
[0062]	Pro	Cys	Pro	Arg	Leu	Ile	Leu	Leu	Phe	Val	Leu	Leu	Ile	Arg	Leu	Ser												
[0063]	20																25				30							
[0064]	Gln	Val	Ser	Ser	Asp	Val	Asp	Glu	Gln	Leu	Ser	Lys	Ser	Val	Lys	Asp												
[0065]	35																40				45							
[0066]	Lys	Val	Leu	Leu	Pro	Cys	Arg	Tyr	Asn	Ser	Pro	His	Glu	Asp	Glu	Ser												
[0067]	50																55				60							
[0068]	Glu	Asp	Arg	Ile	Tyr	Trp	Gln	Lys	His	Asp	Lys	Val	Val	Leu	Ser	Val												
[0069]	65																70				75				80			
[0070]	Ile	Ala	Gly	Lys	Leu	Lys	Val	Trp	Pro	Glu	Tyr	Lys	Asn	Arg	Thr	Leu												
[0071]	85																90				95							
[0072]	Tyr	Asp	Asn	Thr	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ile	Ile	Leu	Gly	Leu	Val	Leu	Ser												
[0073]	100																105				110							
[0074]	Asp	Arg	Gly	Thr	Tyr	Ser	Cys	Val	Val	Gln	Lys	Lys	Glu	Arg	Gly	Thr												
[0075]	115																120				125							
[0076]	Tyr	Glu	Val	Lys	His	Leu	Ala	Leu	Val	Lys	Leu	Ser	Ile	Lys	Ala	Asp												
[0077]	130																135				140							

[0078]	Phe Ser Thr Pro Asn Ile Thr Glu Ser Gly Asn Pro Ser Ala Asp Thr
[0079]	145 150 155 160
[0080]	Lys Arg Ile Thr Cys Phe Ala Ser Gly Gly Phe Pro Lys Pro Arg Phe
[0081]	165 170 175
[0082]	Ser Trp Leu Glu Asn Gly Arg Glu Leu Pro Gly Ile Asn Thr Thr Ile
[0083]	180 185 190
[0084]	Ser Gln Asp Pro Glu Ser Glu Leu Tyr Thr Ile Ser Ser Gln Leu Asp
[0085]	195 200 205
[0086]	Phe Asn Thr Thr Arg Asn His Thr Ile Lys Cys Leu Ile Lys Tyr Gly
[0087]	210 215 220
[0088]	Asp Ala His Val Ser Glu Asp Phe Thr Trp Glu Lys Pro Pro Glu Asp
[0089]	225 230 235 240
[0090]	Pro Pro Asp Ser Lys Tyr Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Gly Ala
[0091]	245 250 255
[0092]	Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala Ala His His His His His
[0093]	260 265 270
[0094]	His His His His His
[0095]	275
[0096]	<210> 3
[0097]	<211> 274
[0098]	<212> PRT
[0099]	<213> 人工序列()
[0100]	<220>
[0101]	<223> 合成序列:食蟹猴CD80 flag his 10
[0102]	<400> 3
[0103]	Met Gly His Thr Trp Arg Gln Gly Ile Ser Pro Ser Lys Cys Pro Tyr
[0104]	1 5 10 15
[0105]	Leu Lys Phe Phe Gln Leu Leu Val Leu Ala Cys Leu Ser His Phe Cys
[0106]	20 25 30
[0107]	Ser Gly Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu
[0108]	35 40 45
[0109]	Ser Cys Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile
[0110]	50 55 60
[0111]	Tyr Trp Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp
[0112]	65 70 75 80
[0113]	Met Asn Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr
[0114]	85 90 95
[0115]	Asn Asn Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly
[0116]	100 105 110

[0117]	Thr	Tyr	Glu	Cys	Val	Val	Leu	Lys	Tyr	Glu	Lys	Asp	Ala	Phe	Lys	Arg
[0118]			115				120					125				
[0119]	Glu	His	Leu	Ala	Glu	Val	Met	Leu	Ser	Val	Lys	Ala	Asp	Phe	Pro	Thr
[0120]			130				135					140				
[0121]	Pro	Ser	Ile	Thr	Asp	Phe	Glu	Ile	Pro	Pro	Ser	Asn	Ile	Arg	Arg	Ile
[0122]	145					150					155					160
[0123]	Ile	Cys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Phe	Pro	Glu	Pro	His	Leu	Ser	Trp	Leu
[0124]					165					170					175	
[0125]	Glu	Asn	Gly	Glu	Glu	Leu	Asn	Ala	Ile	Ser	Thr	Thr	Val	Ser	Gln	Asp
[0126]					180					185				190		
[0127]	Pro	Glu	Thr	Glu	Leu	Tyr	Thr	Val	Ser	Ser	Lys	Leu	Asp	Phe	Asn	Met
[0128]					195					200				205		
[0129]	Thr	Thr	Asn	His	Ser	Phe	Met	Cys	Leu	Ile	Lys	Tyr	Gly	His	Leu	Arg
[0130]			210							215				220		
[0131]	Val	Asn	Gln	Thr	Phe	Asn	Trp	Asn	Thr	Pro	Lys	Gln	Glu	His	Phe	Pro
[0132]	225					230					235					240
[0133]	Asp	Asn	Asp	Pro	Ala	Phe	Leu	Tyr	Lys	Val	Val	Gly	Ala	Ala	Asp	Tyr
[0134]					245						250				255	
[0135]	Lys	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	Ala	Ala	His	His	His	His	His	His	His	His
[0136]					260					265					270	
[0137]	His	His														
[0138]	<210>	4														
[0139]	<211>	271														
[0140]	<212>	PRT														
[0141]	<213>	人工序列()														
[0142]	<220>															
[0143]	<223>	合成序列:人CD86 flag his 10														
[0144]	<400>	4														
[0145]	Met	Gly	Leu	Ser	Asn	Ile	Leu	Phe	Val	Met	Ala	Phe	Leu	Leu	Ser	Gly
[0146]	1				5					10					15	
[0147]	Ala	Ala	Pro	Leu	Lys	Ile	Gln	Ala	Tyr	Phe	Asn	Glu	Thr	Ala	Asp	Leu
[0148]					20					25				30		
[0149]	Pro	Cys	Gln	Phe	Ala	Asn	Ser	Gln	Asn	Gln	Ser	Leu	Ser	Glu	Leu	Val
[0150]					35					40				45		
[0151]	Val	Phe	Trp	Gln	Asp	Gln	Glu	Asn	Leu	Val	Leu	Asn	Glu	Val	Tyr	Leu
[0152]					50					55				60		
[0153]	Gly	Lys	Glu	Lys	Phe	Asp	Ser	Val	His	Ser	Lys	Tyr	Met	Gly	Arg	Thr
[0154]	65					70					75					80
[0155]	Ser	Phe	Asp	Ser	Asp	Ser	Trp	Thr	Leu	Arg	Leu	His	Asn	Leu	Gln	Ile

[0156]					85					90					95				
[0157]	Lys	Asp	Lys	Gly	Leu	Tyr	Gln	Cys	Ile	Ile	His	His	Lys	Lys	Pro	Thr			
[0158]					100					105					110				
[0159]	Gly	Met	Ile	Arg	Ile	His	Gln	Met	Asn	Ser	Glu	Leu	Ser	Val	Leu	Ala			
[0160]					115					120					125				
[0161]	Asn	Phe	Ser	Gln	Pro	Glu	Ile	Val	Pro	Ile	Ser	Asn	Ile	Thr	Glu	Asn			
[0162]					130					135					140				
[0163]	Val	Tyr	Ile	Asn	Leu	Thr	Cys	Ser	Ser	Ile	His	Gly	Tyr	Pro	Glu	Pro			
[0164]	145						150					155				160			
[0165]	Lys	Lys	Met	Ser	Val	Leu	Leu	Arg	Thr	Lys	Asn	Ser	Thr	Ile	Glu	Tyr			
[0166]					165					170					175				
[0167]	Asp	Gly	Ile	Met	Gln	Lys	Ser	Gln	Asp	Asn	Val	Thr	Glu	Leu	Tyr	Asp			
[0168]					180					185					190				
[0169]	Val	Ser	Ile	Ser	Leu	Ser	Val	Ser	Phe	Pro	Asp	Val	Thr	Ser	Asn	Met			
[0170]					195					200					205				
[0171]	Thr	Ile	Phe	Cys	Ile	Leu	Glu	Thr	Asp	Lys	Thr	Arg	Leu	Leu	Ser	Ser			
[0172]					210					215					220				
[0173]	Pro	Phe	Ser	Ile	Glu	Leu	Glu	Asp	Pro	Gln	Pro	Pro	Pro	Asp	His	Asp			
[0174]	225						230					235				240			
[0175]	Pro	Ala	Phe	Leu	Tyr	Lys	Val	Val	Gly	Ala	Ala	Asp	Tyr	Lys	Asp	Asp			
[0176]					245					250					255				
[0177]	Asp	Asp	Lys	Ala	Ala	His	His	His	His	His	His	His	His	His	His				
[0178]					260					265					270				
[0179]	<210> 5																		
[0180]	<211> 277																		
[0181]	<212> PRT																		
[0182]	<213> 人工序列()																		
[0183]	<220>																		
[0184]	<223> 合成序列:小鼠CD86 flag his 10																		
[0185]	<400> 5																		
[0186]	Met	Asp	Pro	Arg	Cys	Thr	Met	Gly	Leu	Ala	Ile	Leu	Ile	Phe	Val	Thr			
[0187]	1				5					10					15				
[0188]	Val	Leu	Leu	Ile	Ser	Asp	Ala	Val	Ser	Val	Glu	Thr	Gln	Ala	Tyr	Phe			
[0189]					20					25					30				
[0190]	Asn	Gly	Thr	Ala	Tyr	Leu	Pro	Cys	Pro	Phe	Thr	Lys	Ala	Gln	Asn	Ile			
[0191]					35					40					45				
[0192]	Ser	Leu	Ser	Glu	Leu	Val	Val	Phe	Trp	Gln	Asp	Gln	Gln	Lys	Leu	Val			
[0193]					50					55					60				
[0194]	Leu	Tyr	Glu	His	Tyr	Leu	Gly	Thr	Glu	Lys	Leu	Asp	Ser	Val	Asn	Ala			

[0195]	65	70	75	80
[0196]	Lys Tyr Leu Gly Arg Thr Ser Phe Asp Arg Asn Asn Trp Thr Leu Arg			
[0197]		85	90	95
[0198]	Leu His Asn Val Gln Ile Lys Asp Met Gly Ser Tyr Asp Cys Phe Ile			
[0199]		100	105	110
[0200]	Gln Lys Lys Pro Pro Thr Gly Ser Ile Ile Leu Gln Gln Thr Leu Thr			
[0201]		115	120	125
[0202]	Glu Leu Ser Val Ile Ala Asn Phe Ser Glu Pro Glu Ile Lys Leu Ala			
[0203]		130	135	140
[0204]	Gln Asn Val Thr Gly Asn Ser Gly Ile Asn Leu Thr Cys Thr Ser Lys			
[0205]	145	150	155	160
[0206]	Gln Gly His Pro Lys Pro Lys Lys Met Tyr Phe Leu Ile Thr Asn Ser			
[0207]		165	170	175
[0208]	Thr Asn Glu Tyr Gly Asp Asn Met Gln Ile Ser Gln Asp Asn Val Thr			
[0209]		180	185	190
[0210]	Glu Leu Phe Ser Ile Ser Asn Ser Leu Ser Leu Ser Phe Pro Asp Gly			
[0211]		195	200	205
[0212]	Val Trp His Met Thr Val Val Cys Val Leu Glu Thr Glu Ser Met Lys			
[0213]		210	215	220
[0214]	Ile Ser Ser Lys Pro Leu Asn Phe Thr Gln Glu Phe Pro Ser Pro Gln			
[0215]	225	230	235	240
[0216]	Thr Tyr Trp Lys Glu Tyr Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Gly Ala			
[0217]		245	250	255
[0218]	Ala Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala Ala His His His His His			
[0219]		260	265	270
[0220]	His His His His His			
[0221]		275		
[0222]	<210> 6			
[0223]	<211> 271			
[0224]	<212> PRT			
[0225]	<213> 人工序列()			
[0226]	<220>			
[0227]	<223> 合成序列:食蟹猴CD86 flag his 10			
[0228]	<400> 6			
[0229]	Met Gly Leu Ser Asn Thr Leu Phe Val Met Ala Phe Leu Leu Ser Gly			
[0230]	1	5	10	15
[0231]	Ala Ala Pro Leu Lys Ile Gln Ala Tyr Phe Asn Glu Thr Ala Asp Leu			
[0232]		20	25	30
[0233]	Pro Cys Gln Phe Ala Asn Ser Gln Asn Arg Ser Leu Ser Glu Leu Val			

[0234]	35	40	45
[0235]	Val Phe Trp Gln Asn Gln Glu Asn Leu Val Leu Asn Glu Val Tyr Leu		
[0236]	50	55	60
[0237]	Gly Lys Glu Lys Phe Asp Ser Val His Ser Lys Tyr Met Gly Arg Thr		
[0238]	65	70	75
[0239]	Ser Phe Asp Pro Glu Ser Trp Thr Leu Arg Leu His Asn Leu Gln Ile		
[0240]	85	90	95
[0241]	Lys Asp Lys Gly Leu Tyr Gln Cys Ile Ile His His Lys Arg Pro Thr		
[0242]	100	105	110
[0243]	Gly Met Ile Arg Ile His Gln Met Asn Ser Glu Leu Ser Val Leu Ala		
[0244]	115	120	125
[0245]	Asn Phe Ser Gln Pro Glu Ile Val Pro Ile Ser Asn Ile Thr Glu Asn		
[0246]	130	135	140
[0247]	Met Tyr Ile Asn Leu Thr Cys Ser Ser Ile His Gly Tyr Pro Glu Pro		
[0248]	145	150	155
[0249]	Glu Lys Met Ser Val Leu Leu Arg Thr Lys Asn Ser Thr Ile Glu Tyr		
[0250]	165	170	175
[0251]	Asp Gly Val Met Gln Lys Ser Gln Asp Asn Val Thr Glu Leu Tyr Asp		
[0252]	180	185	190
[0253]	Val Ser Ile Ser Leu Ser Val Ser Phe Pro Asp Val Thr Ser Asn Met		
[0254]	195	200	205
[0255]	Thr Ile Phe Cys Val Leu Glu Thr Asp Lys Thr Gln Leu Leu Ser Ser		
[0256]	210	215	220
[0257]	Pro Phe Ser Ile Glu Leu Glu Asp Pro Gln Pro Pro Pro Asp His Asp		
[0258]	225	230	235
[0259]	Pro Ala Phe Leu Tyr Lys Val Val Gly Ala Ala Asp Tyr Lys Asp Asp		
[0260]	245	250	255
[0261]	Asp Asp Lys Ala Ala His His His His His His His His His His		
[0262]	260	265	270
[0263]	<210> 7		
[0264]	<211> 357		
[0265]	<212> PRT		
[0266]	<213> 人工序列()		
[0267]	<220>		
[0268]	<223> 合成序列:CTLA4 Fc变体-1 [野生型CTLA-4 IgG1 Fc(修饰的铰链)]		
[0269]	<400> 7		
[0270]	Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile		
[0271]	1	5	10
[0272]	Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val		

[0273]	20					25					30						
[0274]	Arg	Val	Thr	Val	Leu	Arg	Gln	Ala	Asp	Ser	Gln	Val	Thr	Glu	Val	Cys	
[0275]	35					40					45						
[0276]	Ala	Ala	Thr	Tyr	Met	Met	Gly	Asn	Glu	Leu	Thr	Phe	Leu	Asp	Asp	Ser	
[0277]	50					55					60						
[0278]	Ile	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Gly	Asn	Gln	Val	Asn	Leu	Thr	Ile	Gln	
[0279]	65					70					75					80	
[0280]	Gly	Leu	Arg	Ala	Met	Asp	Thr	Gly	Leu	Tyr	Ile	Cys	Lys	Val	Glu	Leu	
[0281]	85					90					95						
[0282]	Met	Tyr	Pro	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Ile	Gly	Asn	Gly	Thr	Gln	Ile	
[0283]	100					105					110						
[0284]	Tyr	Val	Ile	Asp	Pro	Glu	Pro	Cys	Pro	Asp	Ser	Asp	Gln	Glu	Pro	Lys	
[0285]	115					120					125						
[0286]	Ser	Ser	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	
[0287]	130					135					140						
[0288]	Leu	Gly	Gly	Ser	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	
[0289]	145					150					155					160	
[0290]	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	
[0291]	165					170					175						
[0292]	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	
[0293]	180					185					190						
[0294]	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	
[0295]	195					200					205						
[0296]	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	
[0297]	210					215					220						
[0298]	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	
[0299]	225					230					235					240	
[0300]	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	
[0301]	245					250					255						
[0302]	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	
[0303]	260					265					270						
[0304]	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	
[0305]	275					280					285						
[0306]	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	
[0307]	290					295					300						
[0308]	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	
[0309]	305					310					315					320	
[0310]	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	
[0311]	325					330					335						

[0312]	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
[0313]	340 345 350
[0314]	Leu Ser Pro Gly Lys
[0315]	355
[0316]	<210> 8
[0317]	<211> 357
[0318]	<212> PRT
[0319]	<213> 人工序列()
[0320]	<220>
[0321]	<223> 合成序列:CTLA4 Fc变体-2 [具有YTE的野生型CTLA-4 IgG1 Fc(修饰的较链)]
[0322]	<400> 8
[0323]	Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
[0324]	1 5 10 15
[0325]	Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val
[0326]	20 25 30
[0327]	Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
[0328]	35 40 45
[0329]	Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser
[0330]	50 55 60
[0331]	Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
[0332]	65 70 75 80
[0333]	Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
[0334]	85 90 95
[0335]	Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
[0336]	100 105 110
[0337]	Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gln Glu Pro Lys
[0338]	115 120 125
[0339]	Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro Ala Pro Glu Leu
[0340]	130 135 140
[0341]	Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
[0342]	145 150 155 160
[0343]	Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
[0344]	165 170 175
[0345]	Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
[0346]	180 185 190
[0347]	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
[0348]	195 200 205
[0349]	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu

[0350]	210	215	220
[0351]	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
[0352]	225	230	235 240
[0353]	Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
[0354]	245	250	255
[0355]	Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln		
[0356]	260	265	270
[0357]	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
[0358]	275	280	285
[0359]	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
[0360]	290	295	300
[0361]	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
[0362]	305	310	315 320
[0363]	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
[0364]	325	330	335
[0365]	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
[0366]	340	345	350
[0367]	Leu Ser Pro Gly Lys		
[0368]	355		
[0369]	<210> 9		
[0370]	<211> 357		
[0371]	<212> PRT		
[0372]	<213> 人工序列()		
[0373]	<220>		
[0374]	<223> 合成序列:CTLA4 Fc变体-3 [具有TM和YTE的野生型CTLA-4 IgG1 Fc]		
[0375]	<400> 9		
[0376]	Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile		
[0377]	1 5 10 15		
[0378]	Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val		
[0379]	20 25 30		
[0380]	Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys		
[0381]	35 40 45		
[0382]	Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser		
[0383]	50 55 60		
[0384]	Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln		
[0385]	65 70 75 80		
[0386]	Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu		
[0387]	85 90 95		
[0388]	Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile		

[0389]	100	105	110
[0390]	Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Val Glu Pro Lys		
[0391]	115	120	125
[0392]	Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe		
[0393]	130	135	140
[0394]	Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
[0395]	145	150	155
[0396]	Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
[0397]	165	170	175
[0398]	Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
[0399]	180	185	190
[0400]	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		
[0401]	195	200	205
[0402]	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
[0403]	210	215	220
[0404]	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
[0405]	225	230	235
[0406]	Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
[0407]	245	250	255
[0408]	Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln		
[0409]	260	265	270
[0410]	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
[0411]	275	280	285
[0412]	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
[0413]	290	295	300
[0414]	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
[0415]	305	310	315
[0416]	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
[0417]	325	330	335
[0418]	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
[0419]	340	345	350
[0420]	Leu Ser Pro Gly Lys		
[0421]	355		
[0422]	<210> 10		
[0423]	<211> 354		
[0424]	<212> PRT		
[0425]	<213> 人工序列()		
[0426]	<220>		
[0427]	<223> 合成序列:CTLA4 Fc变体-4 [具有YTE和铰链脯氨酸的野生型CTLA-4 IgG4		

Fc]

[0428] <400> 10
 [0429] Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 [0430] 1 5 10 15
 [0431] Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val
 [0432] 20 25 30
 [0433] Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
 [0434] 35 40 45
 [0435] Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser
 [0436] 50 55 60
 [0437] Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
 [0438] 65 70 75 80
 [0439] Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
 [0440] 85 90 95
 [0441] Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
 [0442] 100 105 110
 [0443] Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Val Glu Ser Lys
 [0444] 115 120 125
 [0445] Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Leu Gly Gly
 [0446] 130 135 140
 [0447] Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile
 [0448] 145 150 155 160
 [0449] Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Gln Glu
 [0450] 165 170 175
 [0451] Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
 [0452] 180 185 190
 [0453] Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Tyr Arg
 [0454] 195 200 205
 [0455] Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
 [0456] 210 215 220
 [0457] Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu
 [0458] 225 230 235 240
 [0459] Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
 [0460] 245 250 255
 [0461] Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
 [0462] 260 265 270
 [0463] Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
 [0464] 275 280 285
 [0465] Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val

[0466]	290	295	300
[0467]	Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr Val Asp		
[0468]	305	310	315 320
[0469]	Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His		
[0470]	325	330	335
[0471]	Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Leu		
[0472]	340	345	350
[0473]	Gly Lys		
[0474]	<210> 11		
[0475]	<211> 357		
[0476]	<212> PRT		
[0477]	<213> 人工序列()		
[0478]	<220>		
[0479]	<223> 合成序列:具有TM和YTE的CTLA-4变体1322 IgG1 Fc (357aa)		
[0480]	<400> 11		
[0481]	Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile		
[0482]	1 5 10 15		
[0483]	Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Asn Pro Ser Lys Ala Thr Glu Val		
[0484]	20 25 30		
[0485]	Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys		
[0486]	35 40 45		
[0487]	Ala Ala Thr Tyr Met Lys Gly Ser Glu Leu Ser Thr Gln Asp Tyr Pro		
[0488]	50 55 60		
[0489]	Asn Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln		
[0490]	65 70 75 80		
[0491]	Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu		
[0492]	85 90 95		
[0493]	Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile		
[0494]	100 105 110		
[0495]	Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Val Glu Pro Lys		
[0496]	115 120 125		
[0497]	Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe		
[0498]	130 135 140		
[0499]	Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
[0500]	145 150 155 160		
[0501]	Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
[0502]	165 170 175		
[0503]	Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
[0504]	180 185 190		

[0505]	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		
[0506]	195	200	205
[0507]	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
[0508]	210	215	220
[0509]	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
[0510]	225	230	235
[0511]	Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
[0512]	245	250	255
[0513]	Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln		
[0514]	260	265	270
[0515]	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
[0516]	275	280	285
[0517]	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
[0518]	290	295	300
[0519]	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
[0520]	305	310	315
[0521]	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
[0522]	325	330	335
[0523]	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
[0524]	340	345	350
[0525]	Leu Ser Pro Gly Lys		
[0526]	355		
[0527]	<210> 12		
[0528]	<211> 357		
[0529]	<212> PRT		
[0530]	<213> 人工序列()		
[0531]	<220>		
[0532]	<223> 合成序列:具有TM和YTE的CTLA-4变体1321 IgG1 Fc (357aa)		
[0533]	<400> 12		
[0534]	Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ser		
[0535]	1	5	10
[0536]	Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Asn Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val		
[0537]	20	25	30
[0538]	Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys		
[0539]	35	40	45
[0540]	Ala Ala Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Gly Thr Phe Leu Asp Asp Ser		
[0541]	50	55	60
[0542]	Ile Cys Thr Gly Thr Ala Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Arg		
[0543]	65	70	75
			80

[0544]	Gly	Leu	Arg	Ala	Ser	Asp	Thr	Gly	Leu	Tyr	Ile	Cys	Gln	Val	Glu	Leu
[0545]					85					90					95	
[0546]	Met	Tyr	Pro	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Ile	Gly	Asn	Gly	Thr	Gln	Ile
[0547]					100					105					110	
[0548]	Tyr	Val	Ile	Asp	Pro	Glu	Pro	Cys	Pro	Asp	Ser	Asp	Val	Glu	Pro	Lys
[0549]					115					120					125	
[0550]	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe
[0551]					130					135					140	
[0552]	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr
[0553]	145											150			155	
[0554]	Leu	Tyr	Ile	Thr	Arg	Glu	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val
[0555]															165	
[0556]	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val
[0557]															170	
[0558]	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser
[0559]															180	
[0560]	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu
[0561]															190	
[0562]	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala
[0563]	205														210	
[0564]	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro
[0565]															225	
[0566]	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln
[0567]															230	
[0568]	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala
[0569]															245	
[0570]	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr
[0571]															250	
[0572]	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu
[0573]	305														260	
[0574]	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser
[0575]															275	
[0576]	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser
[0577]															280	
[0578]	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys										285	
[0579]															290	
[0580]	<210>	13													295	
[0581]	<211>	357													300	
[0582]	<212>	PRT													305	

[0583] <213> 人工序列()
 [0584] <220>
 [0585] <223> 合成序列:具有TM和YTE的CTLA-4变体1299 IgG1 Fc (357aa)
 [0586] <400> 13
 [0587] Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Arg
 [0588] 1 5 10 15
 [0589] Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Thr Asn Pro Ser Lys Ala Thr Glu Val
 [0590] 20 25 30
 [0591] Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
 [0592] 35 40 45
 [0593] Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Ala Thr Phe Leu Asp Asp Ser
 [0594] 50 55 60
 [0595] Ile Cys Thr Gly Thr Ala Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
 [0596] 65 70 75 80
 [0597] Gly Leu Arg Ala Gln Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu
 [0598] 85 90 95
 [0599] Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
 [0600] 100 105 110
 [0601] Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Val Glu Pro Lys
 [0602] 115 120 125
 [0603] Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
 [0604] 130 135 140
 [0605] Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 [0606] 145 150 155 160
 [0607] Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 [0608] 165 170 175
 [0609] Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 [0610] 180 185 190
 [0611] Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 [0612] 195 200 205
 [0613] Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 [0614] 210 215 220
 [0615] Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 [0616] 225 230 235 240
 [0617] Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 [0618] 245 250 255
 [0619] Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
 [0620] 260 265 270
 [0621] Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala

[0622]	275	280	285
[0623]	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
[0624]	290	295	300
[0625]	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
[0626]	305	310	315
[0627]	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
[0628]	325	330	335
[0629]	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
[0630]	340	345	350
[0631]	Leu Ser Pro Gly Lys		
[0632]	355		
[0633]	<210> 14		
[0634]	<211> 357		
[0635]	<212> PRT		
[0636]	<213> 人工序列()		
[0637]	<220>		
[0638]	<223> 合成序列:具有TM和YTE的CTLA-4变体1315 IgG1 Fc(357aa)		
[0639]	<400> 14		
[0640]	Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ser		
[0641]	1	5	10
[0642]	Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Asn Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val		
[0643]	20	25	30
[0644]	Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys		
[0645]	35	40	45
[0646]	Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Gly Thr Phe Leu Asp Asp Ser		
[0647]	50	55	60
[0648]	Ile Cys Thr Gly Thr Ala Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Arg		
[0649]	65	70	75
[0650]	Gly Leu Arg Ala Ser Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu		
[0651]	85	90	95
[0652]	Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile		
[0653]	100	105	110
[0654]	Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Val Glu Pro Lys		
[0655]	115	120	125
[0656]	Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe		
[0657]	130	135	140
[0658]	Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
[0659]	145	150	155
[0660]	Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		

[0661]	165	170	175
[0662]	Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
[0663]	180	185	190
[0664]	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		
[0665]	195	200	205
[0666]	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
[0667]	210	215	220
[0668]	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
[0669]	225	230	235
[0670]	Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
[0671]	245	250	255
[0672]	Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln		
[0673]	260	265	270
[0674]	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
[0675]	275	280	285
[0676]	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
[0677]	290	295	300
[0678]	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
[0679]	305	310	315
[0680]	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
[0681]	325	330	335
[0682]	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
[0683]	340	345	350
[0684]	Leu Ser Pro Gly Lys		
[0685]	355		
[0686]	<210> 15		
[0687]	<211> 357		
[0688]	<212> PRT		
[0689]	<213> 人工序列()		
[0690]	<220>		
[0691]	<223> 合成序列:具有TM和YTE的CTLA-4变体1115 IgG1 Fc(357aa)		
[0692]	<400> 15		
[0693]	Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Val		
[0694]	1	5	10
[0695]	Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Asn Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val		
[0696]	20	25	30
[0697]	Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys		
[0698]	35	40	45
[0699]	Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Gly Thr Phe Leu Asp Asp Ser		

[0700]	50	55	60
[0701]	Ile Cys Thr Gly Thr Ala Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln		
[0702]	65	70	75
[0703]	Gly Leu Arg Ala Gln Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu		
[0704]	85	90	95
[0705]	Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile		
[0706]	100	105	110
[0707]	Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Val Glu Pro Lys		
[0708]	115	120	125
[0709]	Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe		
[0710]	130	135	140
[0711]	Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr		
[0712]	145	150	155
[0713]	Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val		
[0714]	165	170	175
[0715]	Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val		
[0716]	180	185	190
[0717]	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser		
[0718]	195	200	205
[0719]	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu		
[0720]	210	215	220
[0721]	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala		
[0722]	225	230	235
[0723]	Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro		
[0724]	245	250	255
[0725]	Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln		
[0726]	260	265	270
[0727]	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala		
[0728]	275	280	285
[0729]	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr		
[0730]	290	295	300
[0731]	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu		
[0732]	305	310	315
[0733]	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser		
[0734]	325	330	335
[0735]	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser		
[0736]	340	345	350
[0737]	Leu Ser Pro Gly Lys		
[0738]	355		

[0739] <210> 16
 [0740] <211> 357
 [0741] <212> PRT
 [0742] <213> 人工序列()
 [0743] <220>
 [0744] <223> 合成序列:具有TM和YTE的CTLA-4变体1227 IgG1 Fc (357aa)
 [0745] <400> 16
 [0746] Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ser
 [0747] 1 5 10 15
 [0748] Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Asn Pro Ser Lys Ala Thr Glu Val
 [0749] 20 25 30
 [0750] Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
 [0751] 35 40 45
 [0752] Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Ala Thr Phe Leu Asp Asp Ser
 [0753] 50 55 60
 [0754] Ile Cys Thr Gly Thr Ala Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
 [0755] 65 70 75 80
 [0756] Gly Leu Arg Ala Gln Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys His Val Glu Leu
 [0757] 85 90 95
 [0758] Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
 [0759] 100 105 110
 [0760] Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Val Glu Pro Lys
 [0761] 115 120 125
 [0762] Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe
 [0763] 130 135 140
 [0764] Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
 [0765] 145 150 155 160
 [0766] Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
 [0767] 165 170 175
 [0768] Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
 [0769] 180 185 190
 [0770] Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
 [0771] 195 200 205
 [0772] Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
 [0773] 210 215 220
 [0774] Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
 [0775] 225 230 235 240
 [0776] Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
 [0777] 245 250 255

[0778]	Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln
[0779]	260 265 270
[0780]	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
[0781]	275 280 285
[0782]	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
[0783]	290 295 300
[0784]	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
[0785]	305 310 315 320
[0786]	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
[0787]	325 330 335
[0788]	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
[0789]	340 345 350
[0790]	Leu Ser Pro Gly Lys
[0791]	355
[0792]	<210> 17
[0793]	<211> 456
[0794]	<212> PRT
[0795]	<213> 人工序列()
[0796]	<220>
[0797]	<223> 合成序列:NIP 74重链(用于四聚体)
[0798]	<400> 17
[0799]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[0800]	1 5 10 15
[0801]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
[0802]	20 25 30
[0803]	Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
[0804]	35 40 45
[0805]	Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
[0806]	50 55 60
[0807]	Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Ile Ser Thr Ala Tyr
[0808]	65 70 75 80
[0809]	Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0810]	85 90 95
[0811]	Ala Arg Arg Gly Tyr Asp Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr Tyr Tyr Tyr
[0812]	100 105 110
[0813]	Gly Met Asp Val Trp Gly Lys Gly Thr Met Val Thr Val Thr Ala Ser
[0814]	115 120 125
[0815]	Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
[0816]	130 135 140

[0817]	Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro		
[0818]	145	150	155 160
[0819]	Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val		
[0820]		165 170	175
[0821]	His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser		
[0822]		180 185	190
[0823]	Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile		
[0824]		195 200	205
[0825]	Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val		
[0826]		210 215	220
[0827]	Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala		
[0828]		225 230	235 240
[0829]	Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro		
[0830]		245 250	255
[0831]	Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val		
[0832]		260 265	270
[0833]	Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val		
[0834]		275 280	285
[0835]	Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln		
[0836]		290 295	300
[0837]	Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln		
[0838]		305 310	315 320
[0839]	Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala		
[0840]		325 330	335
[0841]	Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro		
[0842]		340 345	350
[0843]	Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr		
[0844]		355 360	365
[0845]	Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser		
[0846]		370 375	380
[0847]	Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr		
[0848]		385 390	395 400
[0849]	Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr		
[0850]		405 410	415
[0851]	Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe		
[0852]		420 425	430
[0853]	Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys		
[0854]		435 440	445
[0855]	Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		

[0856]	450	455
[0857]	<210> 18	
[0858]	<211> 217	
[0859]	<212> PRT	
[0860]	<213> 人工序列()	
[0861]	<220>	
[0862]	<223> 合成序列:NIP 74轻链(用于四聚体)	
[0863]	<400> 18	
[0864]	Gln Ser Val Val Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln	
[0865]	1 5 10 15	
[0866]	Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly	
[0867]	20 25 30	
[0868]	Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu	
[0869]	35 40 45	
[0870]	Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe	
[0871]	50 55 60	
[0872]	Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu	
[0873]	65 70 75 80	
[0874]	Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser	
[0875]	85 90 95	
[0876]	Leu Ser Asp Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly	
[0877]	100 105 110	
[0878]	Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu	
[0879]	115 120 125	
[0880]	Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe	
[0881]	130 135 140	
[0882]	Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val	
[0883]	145 150 155 160	
[0884]	Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys	
[0885]	165 170 175	
[0886]	Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser	
[0887]	180 185 190	
[0888]	His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu	
[0889]	195 200 205	
[0890]	Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser	
[0891]	210 215	
[0892]	<210> 19	
[0893]	<211> 608	
[0894]	<212> PRT	

[0895]	<213> 人工序列()															
[0896]	<220>															
[0897]	<223> 合成序列:CTLA-4四聚体重链															
[0898]	<400> 19															
[0899]	Met	His	Val	Ala	Gln	Pro	Ala	Val	Val	Leu	Ala	Ser	Ser	Arg	Gly	Ile
[0900]	1				5					10					15	
[0901]	Ala	Ser	Phe	Val	Cys	Glu	Tyr	Ala	Ser	Pro	Gly	Lys	Ala	Thr	Glu	Val
[0902]					20					25					30	
[0903]	Arg	Val	Thr	Val	Leu	Arg	Gln	Ala	Asp	Ser	Gln	Val	Thr	Glu	Val	Cys
[0904]					35					40					45	
[0905]	Ala	Ala	Thr	Tyr	Met	Met	Gly	Asn	Glu	Leu	Thr	Phe	Leu	Asp	Asp	Ser
[0906]					50					55					60	
[0907]	Ile	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Gly	Asn	Gln	Val	Asn	Leu	Thr	Ile	Gln
[0908]	65					70					75					80
[0909]	Gly	Leu	Arg	Ala	Met	Asp	Thr	Gly	Leu	Tyr	Ile	Cys	Lys	Val	Glu	Leu
[0910]					85					90					95	
[0911]	Met	Tyr	Pro	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Ile	Gly	Asn	Gly	Thr	Gln	Ile
[0912]					100					105					110	
[0913]	Tyr	Val	Ile	Asp	Pro	Glu	Pro	Cys	Pro	Asp	Ser	Asp	Gly	Gly	Ser	Gly
[0914]					115					120					125	
[0915]	Ser	Ala	Thr	Gly	Gly	Ser	Gly	Ser	Thr	Ala	Ser	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser
[0916]					130					135					140	
[0917]	Ala	Thr	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly
[0918]	145					150					155					160
[0919]	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala
[0920]					165					170					175	
[0921]	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Gly	Tyr	Tyr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala
[0922]					180					185					190	
[0923]	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met	Gly	Trp	Ile	Asn	Pro	Asn	Ser	Gly
[0924]					195					200					205	
[0925]	Gly	Thr	Asn	Tyr	Ala	Gln	Lys	Phe	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met	Thr	Arg
[0926]					210					215					220	
[0927]	Asp	Thr	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr	Met	Glu	Leu	Ser	Arg	Leu	Arg	Ser
[0928]	225					230					235					240
[0929]	Asp	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg	Arg	Gly	Tyr	Asp	Tyr	Gly
[0930]					245					250					255	
[0931]	Ser	Gly	Ser	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Met	Asp	Val	Trp	Gly	Lys	Gly
[0932]					260					265					270	
[0933]	Thr	Met	Val	Thr	Val	Thr	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro

[0934]	275	280	285
[0935]	Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly		
[0936]	290	295	300
[0937]	Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn		
[0938]	305	310	315
[0939]	Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln		
[0940]	325	330	335
[0941]	Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser		
[0942]	340	345	350
[0943]	Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser		
[0944]	355	360	365
[0945]	Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr		
[0946]	370	375	380
[0947]	His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser		
[0948]	385	390	395
[0949]	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg		
[0950]	405	410	415
[0951]	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
[0952]	420	425	430
[0953]	Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala		
[0954]	435	440	445
[0955]	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val		
[0956]	450	455	460
[0957]	Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr		
[0958]	465	470	475
[0959]	Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
[0960]	485	490	495
[0961]	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu		
[0962]	500	505	510
[0963]	Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys		
[0964]	515	520	525
[0965]	Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser		
[0966]	530	535	540
[0967]	Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
[0968]	545	550	555
[0969]	Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser		
[0970]	565	570	575
[0971]	Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala		
[0972]	580	585	590

[0973]	Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0974]	595 600 605
[0975]	<210> 20
[0976]	<211> 369
[0977]	<212> PRT
[0978]	<213> 人工序列()
[0979]	<220>
[0980]	<223> 合成序列:CTLA-4四聚体轻链
[0981]	<400> 20
[0982]	Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
[0983]	1 5 10 15
[0984]	Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val
[0985]	20 25 30
[0986]	Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
[0987]	35 40 45
[0988]	Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser
[0989]	50 55 60
[0990]	Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
[0991]	65 70 75 80
[0992]	Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
[0993]	85 90 95
[0994]	Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
[0995]	100 105 110
[0996]	Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp Gly Gly Ser Gly
[0997]	115 120 125
[0998]	Ser Thr Ala Gly Gly Ser Gly Ser Ala Thr Ser Ser Gly Ser Gly Ser
[0999]	130 135 140
[1000]	Ala Thr Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gln Ser Val Val Thr Gln Pro Pro
[1001]	145 150 155 160
[1002]	Ser Val Ser Gly Ala Pro Gly Gln Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly
[1003]	165 170 175
[1004]	Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln
[1005]	180 185 190
[1006]	Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg
[1007]	195 200 205
[1008]	Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser
[1009]	210 215 220
[1010]	Ala Ser Leu Ala Ile Thr Gly Leu Gln Ala Glu Asp Glu Ala Asp Tyr
[1011]	225 230 235 240

[1012]	Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Asp Val Val Phe Gly Gly
[1013]	245 250 255
[1014]	Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val
[1015]	260 265 270
[1016]	Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr
[1017]	275 280 285
[1018]	Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala
[1019]	290 295 300
[1020]	Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys
[1021]	305 310 315 320
[1022]	Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser
[1023]	325 330 335
[1024]	Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val
[1025]	340 345 350
[1026]	Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys
[1027]	355 360 365
[1028]	Ser
[1029]	<210> 21
[1030]	<211> 22
[1031]	<212> DNA
[1032]	<213> 人工序列()
[1033]	<220>
[1034]	<223> 合成序列:用于扩增CTLA4以融合于NIP74 VH的5' 寡核苷酸
[1035]	<400> 21
[1036]	gcttgcgcgcg actccgcaat gc 22
[1037]	<210> 22
[1038]	<211> 22
[1039]	<212> DNA
[1040]	<213> 人工序列()
[1041]	<220>
[1042]	<223> 合成序列:用于扩增CTLA4以融合于NIP74 VH的3' 寡核苷酸
[1043]	<400> 22
[1044]	ccagaaccag aagaagcgggt ag 22
[1045]	<210> 23
[1046]	<211> 23
[1047]	<212> DNA
[1048]	<213> 人工序列()
[1049]	<220>
[1050]	<223> 合成序列:用于扩增CTLA4以融合于NIP74 VL的5' 寡核苷酸

- [1051] <400> 23
[1052] gcttgtgcac tccgcaatgc acg 23
[1053] <210> 24
[1054] <211> 23
[1055] <212> DNA
[1056] <213> 人工序列()
[1057] <220>
[1058] <223> 合成序列:用于扩增CTLA4以融合于NIP74 VL的3' 寡核苷酸
[1059] <400> 24
[1060] gagccagaag aggtagcaga acc 23
[1061] <210> 25
[1062] <211> 70
[1063] <212> DNA
[1064] <213> 人工序列()
[1065] <220>
[1066] <223> 合成序列:用于扩增NIP74 VH以用于CTLA4融合的5' 寡核苷酸
[1067] <400> 25
[1068] ctaccgcttc ttctggttct ggttctgcta ccggtggtgg tgggtggtggc caggtgcagc 60
[1069] tgggtgcagtc 70
[1070] <210> 26
[1071] <211> 18
[1072] <212> DNA
[1073] <213> 人工序列()
[1074] <220>
[1075] <223> 合成序列:用于扩增NIP74 VH以用于CTLA4融合的3' 寡核苷酸
[1076] <400> 26
[1077] ccagggggaa gaccgatg 18
[1078] <210> 27
[1079] <211> 74
[1080] <212> DNA
[1081] <213> 人工序列()
[1082] <220>
[1083] <223> 合成序列:用于扩增NIP74 VL以用于CTLA4融合的5' 寡核苷酸
[1084] <400> 27
[1085] ggttctgcta cctcttctgg ctctggttct gcgaccggtg gtggcggtgg tggccagtct 60
[1086] gtcgtgacgc agcc 74
[1087] <210> 28
[1088] <211> 53
[1089] <212> DNA

- [1090] <213> 人工序列()
[1091] <220>
[1092] <223> 合成序列:用于扩增NIP74 VL以用于CTLA4融合的3'寡核苷酸
[1093] <400> 28
[1094] gcacttaatt aagtttagatc tattctgact cacctaggac ggtcagcttg gtc 53
[1095] <210> 29
[1096] <211> 22
[1097] <212> DNA
[1098] <213> 人工序列()
[1099] <220>
[1100] <223> 合成序列:用于组装CTLA4 -NIP74 VH融合物的5'寡核苷酸
[1101] <400> 29
[1102] gcttgcgcgcg actccgcaat gc 22
[1103] <210> 30
[1104] <211> 18
[1105] <212> DNA
[1106] <213> 人工序列()
[1107] <220>
[1108] <223> 合成序列:用于组装CTLA4 -NIP74 VH融合物的3'寡核苷酸
[1109] <400> 30
[1110] ccaggggggaa gaccgatg 18
[1111] <210> 31
[1112] <211> 23
[1113] <212> DNA
[1114] <213> 人工序列()
[1115] <220>
[1116] <223> 合成序列:用于组装CTLA4 -NIP74 VL融合物的5'寡核苷酸
[1117] <400> 31
[1118] gcttgtgcac tccgcaatgc acg 23
[1119] <210> 32
[1120] <211> 53
[1121] <212> DNA
[1122] <213> 人工序列()
[1123] <220>
[1124] <223> 合成序列:用于组装CTLA4 -NIP74 VL融合物的3'寡核苷酸
[1125] <400> 32
[1126] gcacttaatt aagtttagatc tattctgact cacctaggac ggtcagcttg gtc 53
[1127] <210> 33
[1128] <211> 64

[1129]	<212> DNA
[1130]	<213> 人工序列()
[1131]	<220>
[1132]	<223> 合成序列:用于构建靶向“环4”核糖体展示文库的随机化寡核苷酸
[1133]	<220>
[1134]	<221> misc_feature
[1135]	<222> (22) .. (23)
[1136]	<223> n是a、c、g或t
[1137]	<220>
[1138]	<221> misc_feature
[1139]	<222> (25) .. (26)
[1140]	<223> n是a、c、g或t
[1141]	<220>
[1142]	<221> misc_feature
[1143]	<222> (28) .. (29)
[1144]	<223> n是a、c、g或t
[1145]	<220>
[1146]	<221> misc_feature
[1147]	<222> (31) .. (32)
[1148]	<223> n是a、c、g或t
[1149]	<220>
[1150]	<221> misc_feature
[1151]	<222> (34) .. (35)
[1152]	<223> n是a、c、g或t
[1153]	<220>
[1154]	<221> misc_feature
[1155]	<222> (37) .. (38)
[1156]	<223> n是a、c、g或t
[1157]	<220>
[1158]	<221> misc_feature
[1159]	<222> (40) .. (41)
[1160]	<223> n是a、c、g或t
[1161]	<400> 33
[1162]	ccactggagg tgcccggtgca snnsnnsnns nnsnnsnnsn ncaactcatt ccccatcatg 60
[1163]	tagg 64
[1164]	<210> 34
[1165]	<211> 25
[1166]	<212> DNA
[1167]	<213> 人工序列()

[1168]	<220>
[1169]	<223> 合成序列:用于构建靶向“环4”核糖体展示文库的重叠寡核苷酸
[1170]	<400> 34
[1171]	tgcacgggca cctccagtgg aaatc 25
[1172]	<210> 35
[1173]	<211> 124
[1174]	<212> PRT
[1175]	<213> 智人()
[1176]	<400> 35
[1177]	Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
[1178]	1 5 10 15
[1179]	Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val
[1180]	20 25 30
[1181]	Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
[1182]	35 40 45
[1183]	Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Asp Asp Ser
[1184]	50 55 60
[1185]	Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
[1186]	65 70 75 80
[1187]	Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu
[1188]	85 90 95
[1189]	Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
[1190]	100 105 110
[1191]	Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
[1192]	115 120
[1193]	<210> 36
[1194]	<211> 124
[1195]	<212> PRT
[1196]	<213> 人工序列()
[1197]	<220>
[1198]	<223> 合成序列:CTLA-4变体1315
[1199]	<400> 36
[1200]	Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ser
[1201]	1 5 10 15
[1202]	Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Asn Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val
[1203]	20 25 30
[1204]	Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
[1205]	35 40 45
[1206]	Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Gly Thr Phe Leu Asp Asp Ser

[1207]	50	55	60
[1208]	Ile Cys Thr Gly Thr Ala Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Arg		
[1209]	65	70	75
[1210]	Gly Leu Arg Ala Ser Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu		
[1211]	85	90	95
[1212]	Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile		
[1213]	100	105	110
[1214]	Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp		
[1215]	115	120	
[1216]	<210> 37		
[1217]	<211> 124		
[1218]	<212> PRT		
[1219]	<213> 人工序列()		
[1220]	<220>		
[1221]	<223> 合成序列:CTLA-4变体1322		
[1222]	<400> 37		
[1223]	Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile		
[1224]	1	5	10
[1225]	Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Asn Pro Ser Lys Ala Thr Glu Val		
[1226]	20	25	30
[1227]	Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys		
[1228]	35	40	45
[1229]	Ala Ala Thr Tyr Met Lys Gly Ser Glu Leu Ser Thr Gln Asp Tyr Pro		
[1230]	50	55	60
[1231]	Asn Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln		
[1232]	65	70	75
[1233]	Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu		
[1234]	85	90	95
[1235]	Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile		
[1236]	100	105	110
[1237]	Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp		
[1238]	115	120	
[1239]	<210> 38		
[1240]	<211> 124		
[1241]	<212> PRT		
[1242]	<213> 人工序列()		
[1243]	<220>		
[1244]	<223> 合成序列:CTLA-4变体1321		
[1245]	<400> 38		

[1246]	Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ser
[1247]	1 5 10 15
[1248]	Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Asn Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val
[1249]	20 25 30
[1250]	Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
[1251]	35 40 45
[1252]	Ala Ala Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Gly Thr Phe Leu Asp Asp Ser
[1253]	50 55 60
[1254]	Ile Cys Thr Gly Thr Ala Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Arg
[1255]	65 70 75 80
[1256]	Gly Leu Arg Ala Ser Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu
[1257]	85 90 95
[1258]	Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
[1259]	100 105 110
[1260]	Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
[1261]	115 120
[1262]	<210> 39
[1263]	<211> 124
[1264]	<212> PRT
[1265]	<213> 人工序列()
[1266]	<220>
[1267]	<223> 合成序列:CTLA-4变体0943
[1268]	<400> 39
[1269]	Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
[1270]	1 5 10 15
[1271]	Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Pro Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val
[1272]	20 25 30
[1273]	Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
[1274]	35 40 45
[1275]	Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Ser Thr Phe Leu Asp Asp Ser
[1276]	50 55 60
[1277]	Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Arg
[1278]	65 70 75 80
[1279]	Gly Leu Arg Ala Leu Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu
[1280]	85 90 95
[1281]	Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
[1282]	100 105 110
[1283]	Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
[1284]	115 120

[1285] <210> 40
 [1286] <211> 124
 [1287] <212> PRT
 [1288] <213> 人工序列()
 [1289] <220>
 [1290] <223> 合成序列:CTLA-4变体0898
 [1291] <400> 40
 [1292] Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Val
 [1293] 1 5 10 15
 [1294] Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Pro Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val
 [1295] 20 25 30
 [1296] Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
 [1297] 35 40 45
 [1298] Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Pro Asp Asp Ser
 [1299] 50 55 60
 [1300] Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
 [1301] 65 70 75 80
 [1302] Gly Leu Arg Ala Leu Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu
 [1303] 85 90 95
 [1304] Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
 [1305] 100 105 110
 [1306] Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
 [1307] 115 120
 [1308] <210> 41
 [1309] <211> 124
 [1310] <212> PRT
 [1311] <213> 人工序列()
 [1312] <220>
 [1313] <223> 合成序列:CTLA-4变体1319
 [1314] <400> 41
 [1315] Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 [1316] 1 5 10 15
 [1317] Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Pro Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val
 [1318] 20 25 30
 [1319] Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
 [1320] 35 40 45
 [1321] Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Ser Glu Leu Ser Thr Gln Asp Tyr Pro
 [1322] 50 55 60
 [1323] Asn Cys Thr Gly Thr Ala Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln

[1324]	65	70	75	80
[1325]	Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu			
[1326]	85	90	95	
[1327]	Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile			
[1328]	100	105	110	
[1329]	Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp			
[1330]	115	120		
[1331]	<210> 42			
[1332]	<211> 124			
[1333]	<212> PRT			
[1334]	<213> 人工序列()			
[1335]	<220>			
[1336]	<223> 合成序列:CTLA-4变体1115			
[1337]	<400> 42			
[1338]	Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Val			
[1339]	1 5 10 15			
[1340]	Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Asn Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val			
[1341]	20 25 30			
[1342]	Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys			
[1343]	35 40 45			
[1344]	Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Gly Thr Phe Leu Asp Asp Ser			
[1345]	50 55 60			
[1346]	Ile Cys Thr Gly Thr Ala Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln			
[1347]	65 70 75 80			
[1348]	Gly Leu Arg Ala Gln Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu			
[1349]	85 90 95			
[1350]	Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile			
[1351]	100 105 110			
[1352]	Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp			
[1353]	115 120			
[1354]	<210> 43			
[1355]	<211> 124			
[1356]	<212> PRT			
[1357]	<213> 人工序列()			
[1358]	<220>			
[1359]	<223> 合成序列:CTLA-4变体1299			
[1360]	<400> 43			
[1361]	Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Arg			
[1362]	1 5 10 15			

[1363]	Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Thr Asn Pro Ser Lys Ala Thr Glu Val
[1364]	20 25 30
[1365]	Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
[1366]	35 40 45
[1367]	Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Ala Thr Phe Leu Asp Asp Ser
[1368]	50 55 60
[1369]	Ile Cys Thr Gly Thr Ala Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
[1370]	65 70 75 80
[1371]	Gly Leu Arg Ala Gln Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu
[1372]	85 90 95
[1373]	Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
[1374]	100 105 110
[1375]	Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
[1376]	115 120
[1377]	<210> 44
[1378]	<211> 124
[1379]	<212> PRT
[1380]	<213> 人工序列()
[1381]	<220>
[1382]	<223> 合成序列:CTLA-4变体1249
[1383]	<400> 44
[1384]	Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Arg
[1385]	1 5 10 15
[1386]	Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Asn Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val
[1387]	20 25 30
[1388]	Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
[1389]	35 40 45
[1390]	Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Pro Thr Phe Leu Asp Asp Ser
[1391]	50 55 60
[1392]	Ile Cys Thr Gly Thr Met Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
[1393]	65 70 75 80
[1394]	Gly Leu Arg Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Thr Val Glu Leu
[1395]	85 90 95
[1396]	Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asp Gly Thr Gln Ile
[1397]	100 105 110
[1398]	Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
[1399]	115 120
[1400]	<210> 45
[1401]	<211> 124

[1402]	<212>	PRT
[1403]	<213>	人工序列()
[1404]	<220>	
[1405]	<223>	合成序列:CTLA-4变体1303
[1406]	<400>	45
[1407]	Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Thr	
[1408]	1 5 10 15	
[1409]	Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Pro Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val	
[1410]	20 25 30	
[1411]	Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys	
[1412]	35 40 45	
[1413]	Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Ala Thr Phe Leu Asp Asp Ser	
[1414]	50 55 60	
[1415]	Ile Cys Thr Gly Thr His Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln	
[1416]	65 70 75 80	
[1417]	Gly Leu Arg Ala Arg Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu	
[1418]	85 90 95	
[1419]	Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile	
[1420]	100 105 110	
[1421]	Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp	
[1422]	115 120	
[1423]	<210>	46
[1424]	<211>	124
[1425]	<212>	PRT
[1426]	<213>	人工序列()
[1427]	<220>	
[1428]	<223>	合成序列:CTLA-4变体1114
[1429]	<400>	46
[1430]	Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Arg	
[1431]	1 5 10 15	
[1432]	Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Asn Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val	
[1433]	20 25 30	
[1434]	Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys	
[1435]	35 40 45	
[1436]	Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Gly Thr Phe Leu Asp Asp Ser	
[1437]	50 55 60	
[1438]	Ile Cys Thr Gly Thr Thr Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln	
[1439]	65 70 75 80	
[1440]	Gly Leu Arg Ala Lys Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu	

[1441]		85		90		95
[1442]	Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile					
[1443]		100		105		110
[1444]	Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp					
[1445]		115		120		
[1446]	<210> 47					
[1447]	<211> 124					
[1448]	<212> PRT					
[1449]	<213> 人工序列()					
[1450]	<220>					
[1451]	<223> 合成序列:CTLA-4变体1227					
[1452]	<400> 47					
[1453]	Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ser					
[1454]	1	5		10		15
[1455]	Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Asn Pro Ser Lys Ala Thr Glu Val					
[1456]		20		25		30
[1457]	Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys					
[1458]		35		40		45
[1459]	Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Ala Thr Phe Leu Asp Asp Ser					
[1460]	50		55		60	
[1461]	Ile Cys Thr Gly Thr Ala Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln					
[1462]	65		70		75	80
[1463]	Gly Leu Arg Ala Gln Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys His Val Glu Leu					
[1464]		85		90		95
[1465]	Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile					
[1466]		100		105		110
[1467]	Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp					
[1468]		115		120		
[1469]	<210> 48					
[1470]	<211> 124					
[1471]	<212> PRT					
[1472]	<213> 人工序列()					
[1473]	<220>					
[1474]	<223> 合成序列:CTLA-4变体0722					
[1475]	<400> 48					
[1476]	Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Val					
[1477]	1	5		10		15
[1478]	Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Pro Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val					
[1479]		20		25		30

[1480]	Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Gly Gln Val Thr Glu Val Cys
[1481]	35 40 45
[1482]	Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Ser Thr Phe Leu Asp Asp Ser
[1483]	50 55 60
[1484]	Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
[1485]	65 70 75 80
[1486]	Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Glu Val Glu Leu
[1487]	85 90 95
[1488]	Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Arg Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
[1489]	100 105 110
[1490]	Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
[1491]	115 120
[1492]	<210> 49
[1493]	<211> 124
[1494]	<212> PRT
[1495]	<213> 人工序列()
[1496]	<220>
[1497]	<223> 合成序列:CTLA-4变体0645
[1498]	<400> 49
[1499]	Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Thr
[1500]	1 5 10 15
[1501]	Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Pro Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val
[1502]	20 25 30
[1503]	Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
[1504]	35 40 45
[1505]	Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Ala Phe Pro Asp Asp Ser
[1506]	50 55 60
[1507]	Val Cys Thr Gly Thr Thr Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
[1508]	65 70 75 80
[1509]	Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Glu Val Glu Leu
[1510]	85 90 95
[1511]	Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
[1512]	100 105 110
[1513]	Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
[1514]	115 120
[1515]	<210> 50
[1516]	<211> 124
[1517]	<212> PRT
[1518]	<213> 人工序列()

[1519] <220>
 [1520] <223> 合成序列:CTLA-4变体0636
 [1521] <400> 50
 [1522] Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
 [1523] 1 5 10 15
 [1524] Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Pro Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val
 [1525] 20 25 30
 [1526] Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Gly Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
 [1527] 35 40 45
 [1528] Ala Ala Thr Tyr Met Lys Gly Asn Glu Ser Thr Phe Leu Asp Asp Ser
 [1529] 50 55 60
 [1530] Val Cys Thr Gly Thr Thr Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
 [1531] 65 70 75 80
 [1532] Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Gln Val Glu Leu
 [1533] 85 90 95
 [1534] Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile
 [1535] 100 105 110
 [1536] Tyr Val Val Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
 [1537] 115 120
 [1538] <210> 51
 [1539] <211> 124
 [1540] <212> PRT
 [1541] <213> 人工序列()
 [1542] <220>
 [1543] <223> 合成序列:CTLA-4变体0745
 [1544] <400> 51
 [1545] Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Thr
 [1546] 1 5 10 15
 [1547] Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val
 [1548] 20 25 30
 [1549] Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
 [1550] 35 40 45
 [1551] Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Gly Glu Ser Thr Phe Leu Asp Asp Ser
 [1552] 50 55 60
 [1553] Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln
 [1554] 65 70 75 80
 [1555] Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Glu Val Glu Leu
 [1556] 85 90 95
 [1557] Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Arg Gly Val Gly Asn Gly Thr Gln Ile

[1558]	100	105	110
[1559]	Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp		
[1560]	115	120	
[1561]	<210> 52		
[1562]	<211> 123		
[1563]	<212> PRT		
[1564]	<213> 人工序列()		
[1565]	<220>		
[1566]	<223> 合成序列:CTLA-4变体0673		
[1567]	<400> 52		
[1568]	Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile		
[1569]	1 5 10 15		
[1570]	Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val		
[1571]	20 25 30		
[1572]	Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys		
[1573]	35 40 45		
[1574]	Ala Ala Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Gly Asp Ser Thr		
[1575]	50 55 60		
[1576]	Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly		
[1577]	65 70 75 80		
[1578]	Leu Arg Ala Met Asp Ser Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met		
[1579]	85 90 95		
[1580]	Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr		
[1581]	100 105 110		
[1582]	Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp		
[1583]	115 120		
[1584]	<210> 53		
[1585]	<211> 124		
[1586]	<212> PRT		
[1587]	<213> 人工序列()		
[1588]	<220>		
[1589]	<223> 合成序列:CTLA-4变体0788		
[1590]	<400> 53		
[1591]	Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile		
[1592]	1 5 10 15		
[1593]	Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Ile		
[1594]	20 25 30		
[1595]	Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys		
[1596]	35 40 45		

[1597]	Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Ser Thr Phe Leu Asp Asp Ser
[1598]	50 55 60
[1599]	Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Arg
[1600]	65 70 75 80
[1601]	Gly Leu Arg Ala Val Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Met Val Glu Leu
[1602]	85 90 95
[1603]	Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Gln Gly Ile Gly Ser Gly Thr Gln Ile
[1604]	100 105 110
[1605]	Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
[1606]	115 120
[1607]	<210> 54
[1608]	<211> 123
[1609]	<212> PRT
[1610]	<213> 人工序列()
[1611]	<220>
[1612]	<223> 合成序列:CTLA-4变体0701
[1613]	<400> 54
[1614]	Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Ile
[1615]	1 5 10 15
[1616]	Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Ala Ser Pro Gly Lys Ala Thr Glu Val
[1617]	20 25 30
[1618]	Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Glu Thr Glu Val Cys
[1619]	35 40 45
[1620]	Ala Ala Tyr Met Val Gly Asn Glu Leu Thr Phe Leu Gly Asp Ser Ile
[1621]	50 55 60
[1622]	Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Gln Gly
[1623]	65 70 75 80
[1624]	Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Lys Val Glu Leu Met
[1625]	85 90 95
[1626]	Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Glu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile Tyr
[1627]	100 105 110
[1628]	Val Phe Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp
[1629]	115 120
[1630]	<210> 55
[1631]	<211> 124
[1632]	<212> PRT
[1633]	<213> 人工序列()
[1634]	<220>
[1635]	<223> 合成序列:CTLA-4变体0439

[1636]	<400>	55														
[1637]	Met	His	Val	Ala	Gln	Pro	Ala	Val	Val	Leu	Ala	Ser	Ser	Arg	Gly	Ile
[1638]	1				5					10					15	
[1639]	Ala	Ser	Phe	Val	Cys	Glu	Tyr	Ala	Pro	Pro	Gly	Lys	Ala	Thr	Glu	Val
[1640]					20					25					30	
[1641]	Arg	Val	Thr	Val	Leu	Arg	Gln	Ala	Asp	Ser	Gln	Val	Thr	Glu	Val	Cys
[1642]					35					40					45	
[1643]	Ala	Ala	Thr	Tyr	Met	Met	Gly	Ser	Glu	Leu	Ser	Thr	Gln	Asp	Tyr	Pro
[1644]					50					55					60	
[1645]	Asn	Cys	Thr	Gly	Thr	Ser	Ser	Gly	Asn	Gln	Val	Asn	Leu	Thr	Ile	Gln
[1646]	65									70					75	80
[1647]	Gly	Leu	Arg	Ala	Met	Asp	Thr	Gly	Leu	Tyr	Ile	Cys	Lys	Val	Glu	Leu
[1648]										85					90	95
[1649]	Met	Tyr	Pro	Pro	Pro	Tyr	Tyr	Leu	Gly	Ile	Gly	Asn	Gly	Thr	Gln	Ile
[1650]										100					105	110
[1651]	Tyr	Val	Ile	Asp	Pro	Glu	Pro	Cys	Pro	Asp	Ser	Asp				
[1652]										115					120	
[1653]	<210>	56														
[1654]	<211>	233														
[1655]	<212>	PRT														
[1656]	<213>	智人()														
[1657]	<400>	56														
[1658]	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro
[1659]	1					5					10				15	
[1660]	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys
[1661]						20					25				30	
[1662]	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val
[1663]						35					40				45	
[1664]	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr
[1665]						50					55				60	
[1666]	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu
[1667]	65									70					75	80
[1668]	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His
[1669]						85					90				95	
[1670]	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys
[1671]						100					105				110	
[1672]	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln
[1673]						115					120				125	
[1674]	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met

[1675]	130	135	140
[1676]	Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro		
[1677]	145	150	155
[1678]	Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn		160
[1679]		165	170
[1680]	Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu		175
[1681]		180	185
[1682]	Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val		190
[1683]		195	200
[1684]	Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln		205
[1685]	210	215	220
[1686]	Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[1687]	225	230	
[1688]	<210> 57		
[1689]	<211> 233		
[1690]	<212> PRT		
[1691]	<213> 人工序列()		
[1692]	<220>		
[1693]	<223> 合成序列:Fc变体-1		
[1694]	<400> 57		
[1695]	Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro		
[1696]	1	5	10
[1697]	Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys		15
[1698]		20	25
[1699]	Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val		30
[1700]		35	40
[1701]	Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr		45
[1702]	50	55	60
[1703]	Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu		
[1704]	65	70	75
[1705]	Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His		80
[1706]		85	90
[1707]	Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys		95
[1708]		100	105
[1709]	Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln		110
[1710]		115	120
[1711]	Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu		125
[1712]	130	135	140
[1713]	Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro		

[1714]	145	150	155	160
[1715]	Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn			
[1716]	165	170	175	
[1717]	Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu			
[1718]	180	185	190	
[1719]	Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val			
[1720]	195	200	205	
[1721]	Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln			
[1722]	210	215	220	
[1723]	Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
[1724]	225	230		
[1725]	<210> 58			
[1726]	<211> 233			
[1727]	<212> PRT			
[1728]	<213> 人工序列()			
[1729]	<220>			
[1730]	<223> 合成序列:Fc变体-2			
[1731]	<400> 58			
[1732]	Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro			
[1733]	1	5	10	15
[1734]	Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Ser Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys			
[1735]	20	25	30	
[1736]	Pro Lys Asp Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val			
[1737]	35	40	45	
[1738]	Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr			
[1739]	50	55	60	
[1740]	Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu			
[1741]	65	70	75	80
[1742]	Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His			
[1743]	85	90	95	
[1744]	Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys			
[1745]	100	105	110	
[1746]	Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln			
[1747]	115	120	125	
[1748]	Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu			
[1749]	130	135	140	
[1750]	Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro			
[1751]	145	150	155	160
[1752]	Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn			

[1753]	165							170							175		
[1754]	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	
[1755]	180							185							190		
[1756]	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	
[1757]	195							200							205		
[1758]	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	
[1759]	210							215							220		
[1760]	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys								
[1761]	225							230									
[1762]	<210> 59																
[1763]	<211> 233																
[1764]	<212> PRT																
[1765]	<213> 人工序列()																
[1766]	<220>																
[1767]	<223> 合成序列:Fc变体-3																
[1768]	<400> 59																
[1769]	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	
[1770]	1 5 10 15																
[1771]	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	
[1772]	20 25 30																
[1773]	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Tyr	Ile	Thr	Arg	Glu	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	
[1774]	35 40 45																
[1775]	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	
[1776]	50 55 60																
[1777]	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	
[1778]	65 70 75 80																
[1779]	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	
[1780]	85 90 95																
[1781]	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	
[1782]	100 105 110																
[1783]	Ala	Leu	Pro	Ala	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	
[1784]	115 120 125																
[1785]	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	
[1786]	130 135 140																
[1787]	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	
[1788]	145 150 155 160																
[1789]	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	
[1790]	165 170 175																
[1791]	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	

[1792]	180	185	190
[1793]	Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val		
[1794]	195	200	205
[1795]	Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln		
[1796]	210	215	220
[1797]	Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[1798]	225	230	
[1799]	<210> 60		
[1800]	<211> 230		
[1801]	<212> PRT		
[1802]	<213> 人工序列()		
[1803]	<220>		
[1804]	<223> 合成序列:Fc变体-4		
[1805]	<400> 60		
[1806]	Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu		
[1807]	1	5	10
[1808]	Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp		
[1809]	20	25	30
[1810]	Thr Leu Tyr Ile Thr Arg Glu Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp		
[1811]	35	40	45
[1812]	Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly		
[1813]	50	55	60
[1814]	Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn		
[1815]	65	70	75
[1816]	Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp		
[1817]	85	90	95
[1818]	Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro		
[1819]	100	105	110
[1820]	Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
[1821]	115	120	125
[1822]	Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn		
[1823]	130	135	140
[1824]	Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile		
[1825]	145	150	155
[1826]	Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr		
[1827]	165	170	175
[1828]	Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg		
[1829]	180	185	190
[1830]	Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys		

[1831]	195	200	205
[1832]	Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
[1833]	210	215	220
[1834]	Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
[1835]	225	230	
[1836]	<210> 61		
[1837]	<211> 61		
[1838]	<212> DNA		
[1839]	<213> 人工序列()		
[1840]	<220>		
[1841]	<223> 合成序列:用于构建热点诱变核糖体展示文库的重叠寡核苷酸		
[1842]	<400> 61		
[1843]	gagatatatc catggccgca atgcacgtgg cccagcctgc tgttggtactg gccagcagcc 60		
[1844]	g 61		
[1845]	<210> 62		
[1846]	<211> 80		
[1847]	<212> DNA		
[1848]	<213> 人工序列()		
[1849]	<220>		
[1850]	<223> 合成序列:用于构建热点诱变核糖体展示文库的重叠寡核苷酸		
[1851]	<220>		
[1852]	<221> misc_feature		
[1853]	<222> (25) .. (26)		
[1854]	<223> n是a、c、g或t		
[1855]	<220>		
[1856]	<221> misc_feature		
[1857]	<222> (52) .. (53)		
[1858]	<223> n是a、c、g或t		
[1859]	<400> 62		
[1860]	cggacctcag tggctttgcc tggsnntgca tactcacaca caaagctggc snngcctcgg 60		
[1861]	ctgctggcca gtaccacagc 80		
[1862]	<210> 63		
[1863]	<211> 70		
[1864]	<212> DNA		
[1865]	<213> 人工序列()		
[1866]	<220>		
[1867]	<223> 合成序列:用于构建热点诱变核糖体展示文库的重叠寡核苷酸		
[1868]	<400> 63		
[1869]	ggcaaagcca ctgaggtccg ggtgacagtg cttcggcagg ctgacagcca ggtgactgaa 60		

[1870] gtctgtgcgg 70
[1871] <210> 64
[1872] <211> 70
[1873] <212> DNA
[1874] <213> 人工序列()
[1875] <220>
[1876] <223> 合成序列:用于构建热点诱变核糖体展示文库的重叠寡核苷酸
[1877] <220>
[1878] <221> misc_feature
[1879] <222> (26) .. (27)
[1880] <223> n是a、c、g或t
[1881] <400> 64
[1882] gcagatggaa tcattctagga aggttsnnctc attccccatc atgtagggttg ccgcacagac 60
[1883] ttcatgtacc 70
[1884] <210> 65
[1885] <211> 72
[1886] <212> DNA
[1887] <213> 人工序列()
[1888] <220>
[1889] <223> 合成序列:用于构建热点诱变核糖体展示文库的重叠寡核苷酸
[1890] <220>
[1891] <221> misc_feature
[1892] <222> (29) .. (30)
[1893] <223> n是a、c、g或t
[1894] <400> 65
[1895] cctagatgat tccatctgca cgggcaccnn sagtggaaat caagtgaacc tcactatcca 60
[1896] aggactgagg gc 72
[1897] <210> 66
[1898] <211> 59
[1899] <212> DNA
[1900] <213> 人工序列()
[1901] <220>
[1902] <223> 合成序列:用于构建热点诱变核糖体展示文库的重叠寡核苷酸
[1903] <220>
[1904] <221> misc_feature
[1905] <222> (18) .. (19)
[1906] <223> n是a、c、g或t
[1907] <220>
[1908] <221> misc_feature

- [1909] <222> (42) .. (43)
- [1910] <223> n是a、c、g或t
- [1911] <400> 66
- [1912] ggtacatgag ctccacsnnng cagatgtaga gtcccgtgtc snntgccctc agtccttgg 59
- [1913] <210> 67
- [1914] <211> 31
- [1915] <212> DNA
- [1916] <213> 人工序列()
- [1917] <220>
- [1918] <223> 合成序列:用于构建热点诱变核糖体展示文库的重叠寡核苷酸
- [1919] <400> 67
- [1920] gtggagctca tgtaccacc gccatactac c 31
- [1921] <210> 68
- [1922] <211> 124
- [1923] <212> PRT
- [1924] <213> 人工序列()
- [1925] <220>
- [1926] <223> 合成序列:CTLA-4多肽
- [1927] <220>
- [1928] <221> VARIANT
- [1929] <222> (16) .. (16)
- [1930] <223> Xaa是Arg、Ile、Ser或Val
- [1931] <220>
- [1932] <221> VARIANT
- [1933] <222> (24) .. (24)
- [1934] <223> Xaa是Thr或Ala
- [1935] <220>
- [1936] <221> VARIANT
- [1937] <222> (27) .. (27)
- [1938] <223> Xaa是Ser或Gly
- [1939] <220>
- [1940] <221> VARIANT
- [1941] <222> (54) .. (54)
- [1942] <223> Xaa是Met或Lys
- [1943] <220>
- [1944] <221> VARIANT
- [1945] <222> (56) .. (56)
- [1946] <223> Xaa是Asn或Ser
- [1947] <220>

[1948] <221> VARIANT
[1949] <222> (58) .. (58)
[1950] <223> Xaa是Ala、Leu或Gly
[1951] <220>
[1952] <221> VARIANT
[1953] <222> (59) .. (59)
[1954] <223> Xaa是Thr或Ser
[1955] <220>
[1956] <221> VARIANT
[1957] <222> (60) .. (60)
[1958] <223> Xaa是Phe或Thr
[1959] <220>
[1960] <221> VARIANT
[1961] <222> (61) .. (61)
[1962] <223> Xaa是Leu或Gln
[1963] <220>
[1964] <221> VARIANT
[1965] <222> (63) .. (63)
[1966] <223> Xaa是Asp或Tyr
[1967] <220>
[1968] <221> VARIANT
[1969] <222> (64) .. (64)
[1970] <223> Xaa是Ser或Pro
[1971] <220>
[1972] <221> VARIANT
[1973] <222> (65) .. (65)
[1974] <223> Xaa是Ile、Asn或Asp
[1975] <220>
[1976] <221> VARIANT
[1977] <222> (70) .. (70)
[1978] <223> Xaa是Ala或Ser
[1979] <220>
[1980] <221> VARIANT
[1981] <222> (80) .. (80)
[1982] <223> Xaa是Gln或Arg
[1983] <220>
[1984] <221> VARIANT
[1985] <222> (85) .. (85)
[1986] <223> Xaa是Gln、Met或Ser

[1987]	<220>
[1988]	<221> VARIANT
[1989]	<222> (93) .. (93)
[1990]	<223> Xaa是Gln或His
[1991]	<220>
[1992]	<221> UNSURE
[1993]	<222> (16) .. (16)
[1994]	<223> The 'Xaa' at location 16 stands for Gln, Arg, Pro, or Leu.
[1995]	<220>
[1996]	<221> UNSURE
[1997]	<222> (24) .. (24)
[1998]	<223> The 'Xaa' at location 24 stands for Gln, Arg, Pro, or Leu.
[1999]	<220>
[2000]	<221> UNSURE
[2001]	<222> (27) .. (27)
[2002]	<223> The 'Xaa' at location 27 stands for Gln, Arg, Pro, or Leu.
[2003]	<220>
[2004]	<221> UNSURE
[2005]	<222> (54) .. (54)
[2006]	<223> The 'Xaa' at location 54 stands for Gln, Arg, Pro, or Leu.
[2007]	<220>
[2008]	<221> UNSURE
[2009]	<222> (56) .. (56)
[2010]	<223> The 'Xaa' at location 56 stands for Gln, Arg, Pro, or Leu.
[2011]	<220>
[2012]	<221> UNSURE
[2013]	<222> (58) .. (58)
[2014]	<223> The 'Xaa' at location 58 stands for Gln, Arg, Pro, or Leu.
[2015]	<220>
[2016]	<221> UNSURE
[2017]	<222> (59) .. (59)
[2018]	<223> The 'Xaa' at location 59 stands for Gln, Arg, Pro, or Leu.
[2019]	<220>
[2020]	<221> UNSURE
[2021]	<222> (60) .. (60)
[2022]	<223> The 'Xaa' at location 60 stands for Gln, Arg, Pro, or Leu.
[2023]	<220>
[2024]	<221> UNSURE
[2025]	<222> (61) .. (61)

[2026] <223> The 'Xaa' at location 61 stands for Gln, Arg, Pro, or Leu.
 [2027] <220>
 [2028] <221> UNSURE
 [2029] <222> (63) .. (63)
 [2030] <223> The 'Xaa' at location 63 stands for Gln, Arg, Pro, or Leu.
 [2031] <220>
 [2032] <221> UNSURE
 [2033] <222> (64) .. (64)
 [2034] <223> The 'Xaa' at location 64 stands for Gln, Arg, Pro, or Leu.
 [2035] <220>
 [2036] <221> UNSURE
 [2037] <222> (65) .. (65)
 [2038] <223> The 'Xaa' at location 65 stands for Gln, Arg, Pro, or Leu.
 [2039] <220>
 [2040] <221> UNSURE
 [2041] <222> (70) .. (70)
 [2042] <223> The 'Xaa' at location 70 stands for Gln, Arg, Pro, or Leu.
 [2043] <220>
 [2044] <221> UNSURE
 [2045] <222> (80) .. (80)
 [2046] <223> The 'Xaa' at location 80 stands for Gln, Arg, Pro, or Leu.
 [2047] <220>
 [2048] <221> UNSURE
 [2049] <222> (85) .. (85)
 [2050] <223> The 'Xaa' at location 85 stands for Gln, Arg, Pro, or Leu.
 [2051] <220>
 [2052] <221> UNSURE
 [2053] <222> (93) .. (93)
 [2054] <223> The 'Xaa' at location 93 stands for Gln, Arg, Pro, or Leu.
 [2055] <400> 68
 [2056] Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala Ser Ser Arg Gly Xaa
 [2057] 1 5 10 15
 [2058] Ala Ser Phe Val Cys Glu Tyr Xaa Asn Pro Xaa Lys Ala Thr Glu Val
 [2059] 20 25 30
 [2060] Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln Val Thr Glu Val Cys
 [2061] 35 40 45
 [2062] Ala Ala Thr Tyr Met Xaa Gly Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Asp Xaa Xaa
 [2063] 50 55 60
 [2064] Xaa Cys Thr Gly Thr Xaa Ser Gly Asn Gln Val Asn Leu Thr Ile Xaa

[2065]	65	70	75	80
[2066]	Gly Leu Arg Ala Xaa Asp Thr Gly Leu Tyr Ile Cys Xaa Val Glu Leu			
[2067]	85	90	95	
[2068]	Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile			
[2069]	100	105	110	
[2070]	Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser Asp			
[2071]	115	120		
[2072]	<210> 69			
[2073]	<211> 7			
[2074]	<212> PRT			
[2075]	<213> 人工序列()			
[2076]	<220>			
[2077]	<223> 合成序列:CTLA-4环4基序			
[2078]	<400> 69			
[2079]	Ser Thr Gln Asp Tyr Pro Asn			
[2080]	1	5		
[2081]	<210> 70			
[2082]	<211> 19			
[2083]	<212> PRT			
[2084]	<213> 智人()			
[2085]	<400> 70			
[2086]	Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro			
[2087]	1	5	10	15
[2088]	Ala Pro Glu			
[2089]	<210> 71			
[2090]	<211> 19			
[2091]	<212> PRT			
[2092]	<213> 人工序列()			
[2093]	<220>			
[2094]	<223> 合成序列:包含铰链的修饰的人IgG1 Fc区			
[2095]	<400> 71			
[2096]	Gln Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys Thr His Thr Ser Pro Pro Ser Pro			
[2097]	1	5	10	15
[2098]	Ala Pro Glu			
[2099]	<210> 72			
[2100]	<211> 20			
[2101]	<212> PRT			
[2102]	<213> 人工序列()			
[2103]	<220>			

[2104] <223> 合成序列:FLAG 10xhis标签
[2105] <400> 72
[2106] Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys Ala Ala His His His His His His
[2107] 1 5 10 15
[2108] His His His His
[2109] 20

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
M	H	V	A	Q	P	A	V	V	L	A	S	S	R	G	R ₁₆	A	S	F	V
21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
C	E	Y	R ₂₄	N	P	R ₂₇	K	A	T	E	V	R	V	T	V	L	R	Q	A
41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
D	S	Q	V	T	E	V	C	A	A	T	Y	M	R ₅₄	G	R ₅₆	E	R ₅₈	R ₅₉	R ₆₀
61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
R ₆₁	D	R ₆₃	R ₆₄	R ₆₅	C	T	G	T	R ₇₀	S	G	N	Q	V	N	L	T	I	R ₈₀
81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
G	L	R	A	R ₈₅	D	T	G	L	Y	I	C	R ₉₃	V	E	L	M	Y	P	P
101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
P	Y	Y	L	G	T	G	N	G	T	Q	I	Y	V	I	D	P	E	P	C
121	122	123	124																
P	D	S	D																

R₁₆ = R、I、S 或 V
R₂₄ = T 或 A
R₂₇ = S 或 G
R₅₄ = M 或 K
R₅₆ = N 或 S
R₅₈ = A、L 或 G
R₅₉ = T 或 S
R₆₀ = F 或 T
R₆₁ = L 或 Q
R₆₃ = D 或 Y
R₆₄ = S 或 P
R₆₅ = I、N 或 D
R₇₀ = A 或 S
R₈₀ = Q 或 R
R₈₅ = Q、M 或 S
R₉₃ = Q 或 H

图2

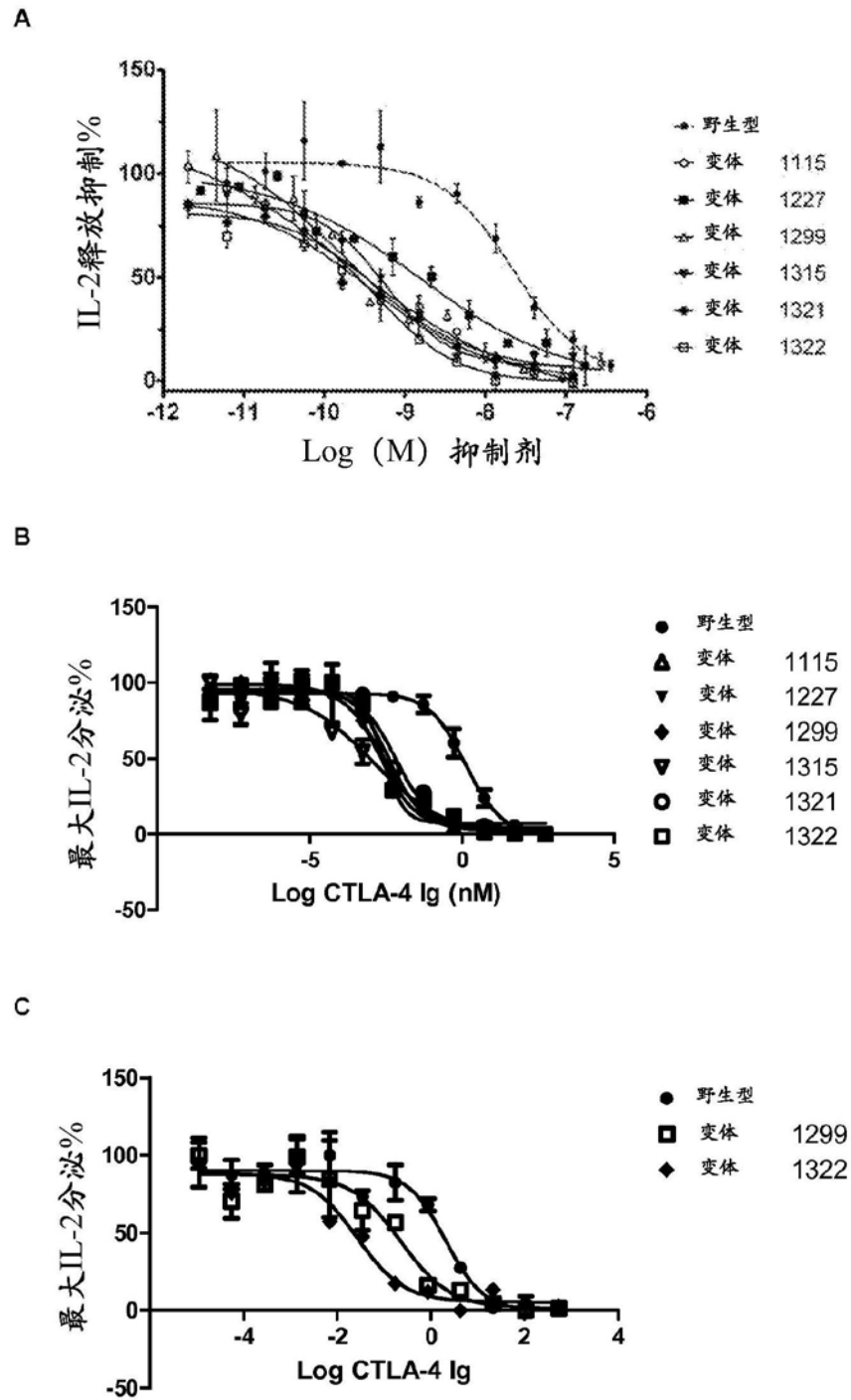
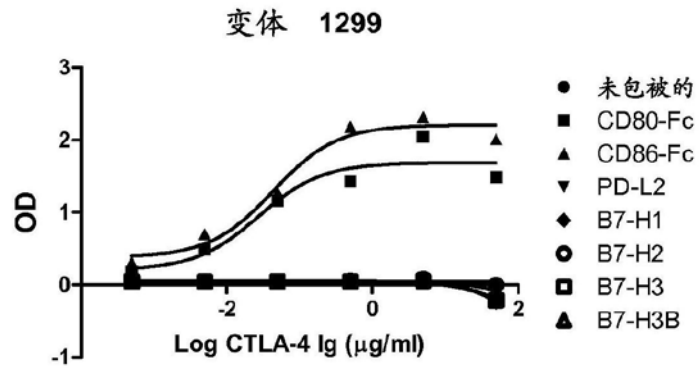


图3

A



B

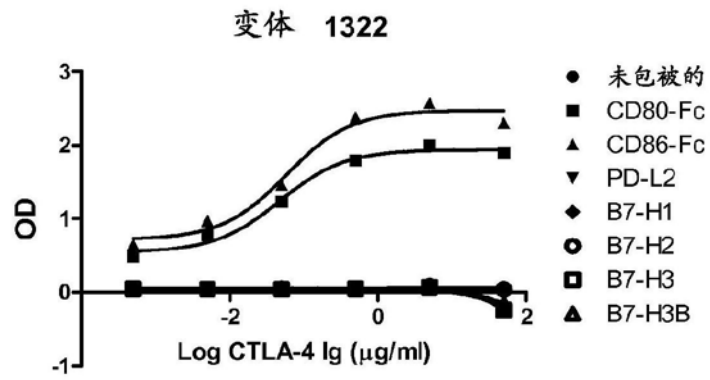


图4

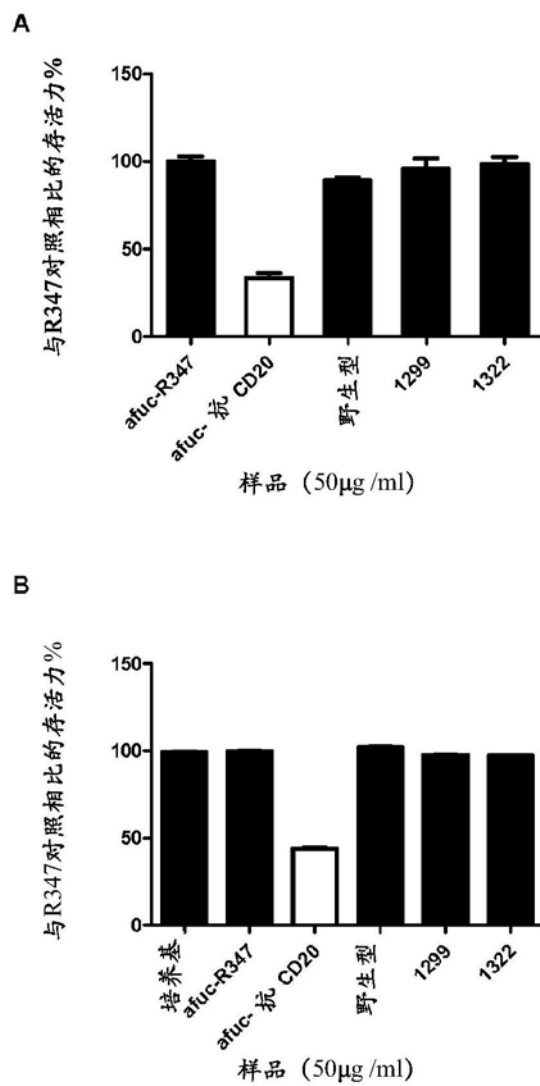


图5

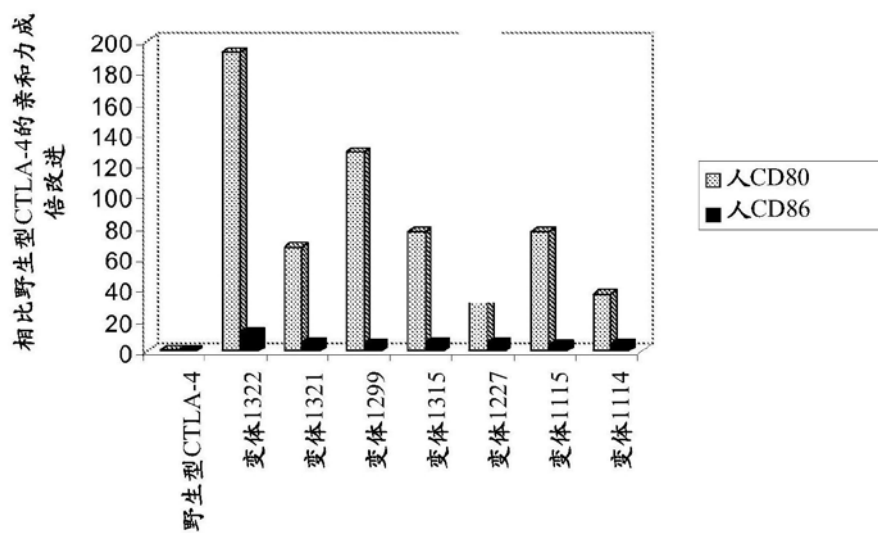
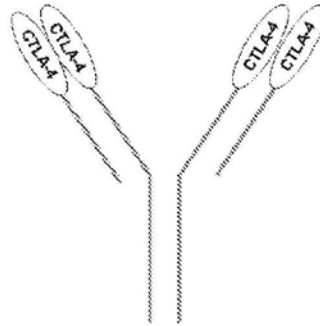


图6

A

CTLA-4	NIP74 V _H	C _H 1	C _H 2	C _H 3
--------	----------------------	------------------	------------------	------------------

CTLA-4	NIP74 V _L	C _L
--------	----------------------	----------------



B

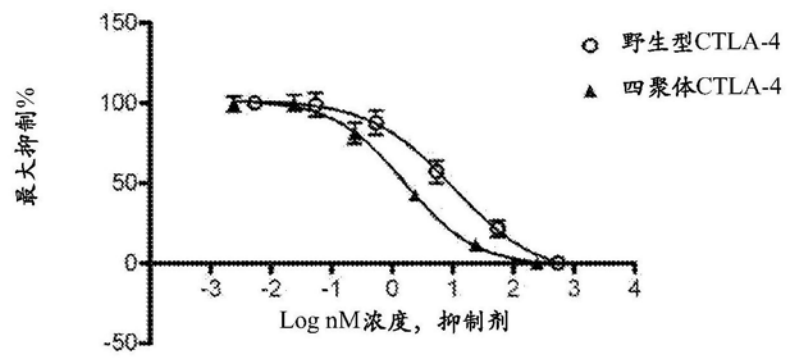


图7