



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118480125 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 13

(21) 申请号 202410423333.9

C07K 16/30 (2006.01)

(22) 申请日 2017.11.06

C12N 15/13 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 39/395 (2006.01)

62/419,157 2016.11.08 US

A61P 35/00 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

A61P 31/00 (2006.01)

201780069181.5 2017.11.06

A61P 37/00 (2006.01)

(71) 申请人 齐鲁皮吉特湾生物治疗有限公司

地址 美国华盛顿州

(72) 发明人 Z·刘 Z·胡 W·C·范斯洛

W·严

(74) 专利代理机构 北京市中伦律师事务所

11410

专利代理师 刘烽

(51) Int. Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

权利要求书2页 说明书65页

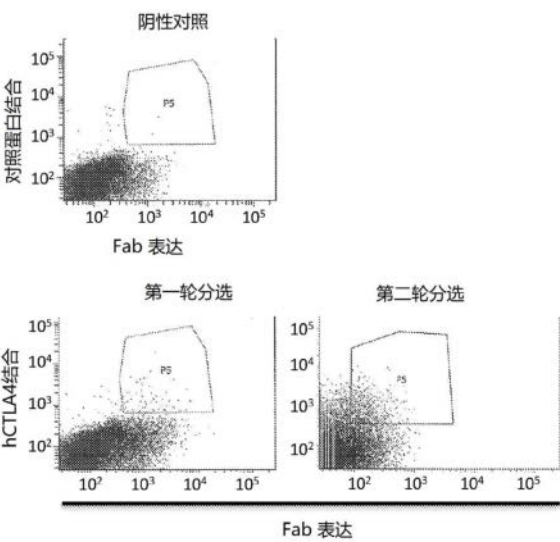
序列表 (电子公布) 附图22页

(54) 发明名称

抗PD1和抗CTLA4抗体

(57) 摘要

本文描述了抗CTLA4抗体、抗PD1抗体、其混合物、编码此类抗体或混合物的多核苷酸 (任选地在载体上携带), 以及利用此类抗体、混合物、多核苷酸或载体的治疗方法。抗CTLA4和抗PD1抗体具有特定的序列和特性。治疗方法包括用于治疗癌症、感染和免疫缺陷病症。



1. 包含VH和VL的抗人程序性细胞死亡1 (抗hPD1) 抗体, 所述VH和VL各自包含CDR1、CDR2和CDR3,

其中所述抗hPD1抗体包含VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3, 分别包含以下序列: SEQ ID NO: 88、89、90、93、94和95; SEQ ID NO: 98、89、99、102、94和95; SEQ ID NO: 105、89、90、93、108和95; SEQ ID NO: 105、111、112、115、94和95; SEQ ID NO: 105、111、90、120、94和95; SEQ ID NO: 88、89、112、102、108和95; SEQ ID NO: 88、89、127、130、108和131; SEQ ID NO: 88、89、134、137、94和131; SEQ ID NO: 98、89、90、142、94和131; SEQ ID NO: 98、111、112、130、94和131; SEQ ID NO: 149、150、112、130、94和131; SEQ ID NO: 105、111、90、142、94和131; SEQ ID NO: 149、89、127、115、94和95; SEQ ID NO: 88、89、112、93、94和95; 或SEQ ID NO: 105、89、127、102、108和95, 并且

其中所述抗hPD1抗体抑制hPD1与人程序性细胞死亡1配体1 (hPDL1) 的相互作用。

2. 根据权利要求1所述的抗hPD1抗体,

其中所述抗hPD1 VH包含的氨基酸序列相对于选自由SEQ ID NO: 87、97、104、110、117、122、126、133、139、144、148、154、158、162和166组成的组的氨基酸序列包含不超过4个改变, 和/或所述抗hPD1 VL包含的氨基酸序列相对于选自由SEQ ID NO: 92、101、107、114、119、124、129、136、141、146、152、156、160、164和168组成的组的氨基酸序列包含不超过4个氨基酸改变。

3. 根据权利要求2所述的抗hPD1抗体,

其中所述抗hPD1抗体的所述VH和所述VL各自包含一个氨基酸序列, 一共包含两个序列,

其中所述两个序列中的一个相对于VH/VL序列对中的一个序列包含不超过4个氨基酸改变, 并且所述两个序列中的另一个相对于所述VH/VL序列对中的另一个序列包含不超过4个氨基酸改变, 并且

其中所述VH/VL序列对选自由SEQ ID NO: 87 (VH) 和92 (VL); SEQ ID NO: 97 (VH) 和101 (VL); SEQ ID NO: 104 (VH) 和107 (VL); SEQ ID NO: 110 (VH) 和114 (VL); SEQ ID NO: 117 (VH) 和119 (VL); SEQ ID NO: 122 (VH) 和124 (VL); SEQ ID NO: 126 (VH) 和129 (VL); SEQ ID NO: 133 (VH) 和136 (VL); SEQ ID NO: 139 (VH) 和141 (VL); SEQ ID NO: 144 (VH) 和146 (VL); SEQ ID NO: 148 (VH) 和152 (VL); SEQ ID NO: 154 (VH) 和156 (VL); SEQ ID NO: 158 (VH) 和160 (VL); SEQ ID NO: 162 (VH) 和164 (VL); 和SEQ ID NO: 166 (VH) 和168 (VL) 组成的组。

4. 根据权利要求1所述的抗hPD1抗体, 其中所述VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3分别包含SEQ ID NO: 88、89、90、93、94和95的氨基酸序列,

其中所述VH包含的氨基酸序列相对于SEQ ID NO: 87的氨基酸序列包含不超过4个改变, 并且所述VL包含的氨基酸序列相对于SEQ ID NO: 92的氨基酸序列包含不超过4个改变。

5. 根据权利要求1所述的抗hPD1抗体, 其中所述VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3分别包含SEQ ID NO: 88、89、90、93、94和95的氨基酸序列。

6. 编码包含VH和VL的抗hPD1抗体的一种或多种多核苷酸, 所述VH和VL各自包含CDR1、CDR2和CDR3,

其中所述抗hPD1抗体包含VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3, 分别包含以下序列: SEQ ID NO: 88、89、90、93、94和95; SEQ ID NO: 98、89、99、102、94和95; SEQ

ID NO:105、89、90、93、108和95;SEQ ID NO:105、111、112、115、94和95;SEQ ID NO:105、111、90、120、94和95;SEQ ID NO:88、89、112、102、108和95;SEQ ID NO:88、89、127、130、108和131;SEQ ID NO:88、89、134、137、94和131;SEQ ID NO:98、89、90、142、94和131;SEQ ID NO:98、111、112、130、94和131;SEQ ID NO:149、150、112、130、94和131;SEQ ID NO:105、111、90、142、94和131;SEQ ID NO:149、89、127、115、94和95;SEQ ID NO:88、89、112、93、94和95;或SEQ ID NO:105、89、127、102、108和95,并且

其中所述抗hPD1抗体抑制hPD1与hPDL1的相互作用。

7. 包含编码包含VH和VL的抗hPD1抗体的一种或多种多核苷酸的宿主细胞,所述VH和VL各自包含CDR1、CDR2和CDR3,

其中所述抗hPD1抗体包含VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3,分别包含以下序列:SEQ ID NO:88、89、90、93、94和95;SEQ ID NO:98、89、99、102、94和95;SEQ ID NO:105、89、90、93、108和95;SEQ ID NO:105、111、112、115、94和95;SEQ ID NO:105、111、90、120、94和95;SEQ ID NO:88、89、112、102、108和95;SEQ ID NO:88、89、127、130、108和131;SEQ ID NO:88、89、134、137、94和131;SEQ ID NO:98、89、90、142、94和131;SEQ ID NO:98、111、112、130、94和131;SEQ ID NO:149、150、112、130、94和131;SEQ ID NO:105、111、90、142、94和131;SEQ ID NO:149、89、127、115、94和95;SEQ ID NO:88、89、112、93、94和95;或SEQ ID NO:105、89、127、102、108和95,并且

其中所述抗hPD1抗体抑制hPD1与hPDL1的相互作用。

8. 一种治疗患有癌症或传染病的患者的方法,包括:

(a) 向所述患者施用包含VH和VL的抗hPD1抗体,所述VH和VL各自包含CDR1、CDR2和CDR3,其中(1)所述抗hPD1抗体包含VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3,分别包含以下序列:SEQ ID NO:88、89、90、93、94和95;SEQ ID NO:98、89、99、102、94和95;SEQ ID NO:105、89、90、93、108和95;SEQ ID NO:105、111、112、115、94和95;SEQ ID NO:105、111、90、120、94和95;SEQ ID NO:88、89、112、102、108和95;SEQ ID NO:88、89、127、130、108和131;SEQ ID NO:88、89、134、137、94和131;SEQ ID NO:98、89、90、142、94和131;SEQ ID NO:98、111、112、130、94和131;SEQ ID NO:149、150、112、130、94和131;SEQ ID NO:105、111、90、142、94和131;SEQ ID NO:149、89、127、115、94和95;SEQ ID NO:88、89、112、93、94和95;或SEQ ID NO:105、89、127、102、108和95,并且(2)所述抗hPD1抗体抑制hPD1与hPDL1的相互作用;或

(b) 向所述患者施用编码(a)中所述的抗hPD1抗体的一种或多种多核苷酸。

9. 根据权利要求8所述的方法,其中所述VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2、VL CDR3分别包含SEQ ID NO:88、89、90、93、94和95的氨基酸序列。

抗PD1和抗CTLA4抗体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请是申请日为2017年11月6日、申请号为201780069181.5、标题为“抗PD1和抗CTLA4抗体”的中国发明专利申请的分案申请。

技术领域

[0003] 本文描述的组合物和方法属于重组抗体领域。

背景技术

[0004] 免疫检查点抑制剂代表了一类新的癌症治疗方法。参见例如Pardoll (2012), Nat.Rev.Cancer 12:252-264。通过激活和抑制信号的平衡来调节T细胞应答。免疫检查点,即抑制途径,可以帮助维持自身耐受性和/或调节免疫应答的持续时间和/或强度,从而限制对健康组织的附带损害。癌细胞可以通过多种方式上调这些免疫检查点通路,从而抑制宿主免疫反应,否则该免疫反应可能会杀死癌细胞。免疫检查点抑制剂或阻断剂(例如抗程序性细胞死亡1 (PD1), 抗程序性细胞死亡1配体1 (PDL1) 和抗细胞毒性T淋巴细胞相关4 (CTLA4) 抗体) 治疗多种类型的癌症的成功,是免疫检查点在调节T细胞响应癌症中的重要性的证据。参见例如,Larkin et al. (2015), New Engl.J.Med 373(1):23-34。

[0005] 改进这种方法以改善患者响应并限制毒性仍然是一项持续的挑战。因此,本领域需要改进的免疫检查点抑制剂和使用这些抑制剂的改进的治疗方法。本文描述了这种改进的免疫检查点抑制剂和改进的治疗方法。

发明内容

[0006] 本文描述了抗人CTLA4 (hCTLA4) 抗体,抗人PD1 (hPD1) 抗体,其混合物,编码这些抗体和混合物的核酸,含有这些核酸的宿主细胞,包含这些抗体、混合物和核酸的药物组合物,以及包括给患者施用这些抗体、混合物、核酸或药物组合物的治疗方法。下面编号的项目描述了这些组合物和方法。

[0007] 1. 一种抗人细胞毒性T淋巴细胞相关4 (hCTLA4) 抗体,其包含重链可变结构域 (VH),

[0008] 其中所述VH包含的氨基酸序列相对于选自由SEQ ID NO:2、12、19、23、30、36、42、45、52、58、64和69组成的组的氨基酸序列包含不超过4个改变,并且

[0009] 其中所述抗hCTLA4抗体抑制hCTLA4与人B淋巴细胞活化抗原B7-1 (hB7-1) 和/或人B淋巴细胞活化抗原B7-2 (hB7-2) 的相互作用。

[0010] 2. 根据项目1所述的抗hCTLA4抗体,其中所述VH包含VH互补决定区1 (CDR1)、VH互补决定区2 (CDR2) 和VH互补决定区3 (CDR3),所述VH互补决定区1 (CDR1)、VH互补决定区2 (CDR2) 和VH互补决定区3 (CDR3) 分别包含SEQ ID NO:3、4和5,SEQ ID NO:3、13和5,SEQ ID NO:3、20和21,SEQ ID NO:3、24和25,SEQ ID NO:3、31和5,SEQ ID NO:3、37和5,SEQ ID NO:3、43和5,SEQ ID NO:3、46和47,SEQ ID NO:3、59和5,SEQ ID NO:3、65和21,或SEQ ID NO:

3、70和21的氨基酸序列。

[0011] 3. 根据项目1或项目2所述的抗hCTLA4抗体,其中包含于所述VH的所述氨基酸序列相对于选自SEQ ID NO:2、12、19、23、30、36、42、45、52、58、64和69组成的组的氨基酸序列包含不超过3个氨基酸改变。

[0012] 4. 根据项目3所述的抗hCTLA4抗体,其中包含于所述VH的所述氨基酸序列相对于选自SEQ ID NO:2、12、19、23、30、36、42、45、52、58、64和69组成的组的氨基酸序列包含不超过2个氨基酸改变。

[0013] 5. 根据项目4所述的抗hCTLA4抗体,其中包含于所述VH的所述氨基酸序列相对于选自SEQ ID NO:2、12、19、23、30、36、42、45、52、58、64和69组成的组的氨基酸序列包含不超过1个氨基酸改变。

[0014] 6. 根据项目1至5中任一项所述的抗hCTLA4抗体,其中所述氨基酸改变是取代,并且所述取代是配偶体引导改变。

[0015] 7. 根据项目5所述的抗hCTLA4抗体,其中包含于所述VH的所述氨基酸序列选自SEQ ID NO:2、12、19、23、30、36、42、45、52、58、64和69组成的组。

[0016] 8. 根据项目1至7中任一项所述的抗hCTLA4抗体,其进一步包含轻链可变结构域(VL),所述轻链可变结构域(VL)包含VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3,所述VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:3、75和77的氨基酸序列。

[0017] 9. 根据项目8所述的抗hCTLA4抗体,其中所述VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:8、9和10,SEQ ID NO:16、9和17,SEQ ID NO:28、9和17,SEQ ID NO:34、9和17,SEQ ID NO:40、9和10,SEQ ID NO:50、9和17,SEQ ID NO:55、9和56,SEQ ID NO:40、9和62,SEQ ID NO:16、9和62,或SEQ ID NO:73、9和62的氨基酸序列。

[0018] 10. 根据项目1至7中任一项所述的抗hCTLA4抗体,其进一步包含VL,所述VL包含的氨基酸序列相对于选自SEQ ID NO:7、15、27、33、39、49、54、61、67、72、84和85组成的组的氨基酸序列包含不超过4个氨基酸改变。

[0019] 11. 根据项目10所述的抗hCTLA4抗体,其中包含于所述VL的所述氨基酸序列相对于选自SEQ ID NO:7、15、27、33、39、49、54、61、67、72、84和85组成的组的氨基酸序列包含不超过3个氨基酸改变。

[0020] 12. 根据项目11所述的抗hCTLA4抗体,其中包含于所述VL的所述氨基酸序列相对于选自SEQ ID NO:7、15、27、33、39、49、54、61、67、72、84和85组成的组的氨基酸序列包含不超过2个氨基酸改变。

[0021] 13. 根据项目12所述的抗hCTLA4抗体,其中包含于所述VL的所述氨基酸序列相对于选自SEQ ID NO:7、15、27、33、39、49、54、61、67、72、84和85组成的组的氨基酸序列包含不超过1个氨基酸改变。

[0022] 14. 根据项目10至13中任一项所述的抗hCTLA4抗体,其中相对于SEQ ID NO:7、15、27、33、39、49、54、61、67、72、84或85的所述氨基酸改变是取代,且所述取代是配偶体引导改变。

[0023] 15. 根据项目10至14中任一项所述的抗hCTLA4抗体,其中所述VL包含VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3,所述VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:8、9和10,SEQ ID NO:16、9和17,SEQ ID NO:28、9和17,SEQ ID NO:34、9和17,SEQ ID NO:40、9和10,SEQ ID

NO:50、9和17,SEQ ID NO:55、9和56,SEQ ID NO:40、9和62,SEQ ID NO:16、9和62,或SEQ ID NO:73、9和62的氨基酸序列。

[0024] 16.根据项目15所述的抗hCTLA4抗体,其中包含于所述VL的所述氨基酸序列选自由SEQ ID NO:7、15、27、33、39、49、54、61、67、72、84和85组成的组。

[0025] 17.一种抗hCTLA4抗体,其包含VL,

[0026] 其中所述VL包含的氨基酸序列相对于选自由SEQ ID NO:7、15、27、33、39、49、54、61、67和72组成的组的氨基酸序列包含不超过4个氨基酸改变,

[0027] 其中所述VL包含CDR1、CDR2和CDR3,所述CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:8、9和10的氨基酸序列,SEQ ID NO:16、9和17,SEQ ID NO:28、9和17,SEQ ID NO:34、9和17,SEQ ID NO:40、9和10,SEQ ID NO:50、9和17,SEQ ID NO:55、9和56,SEQ ID NO:40、9和62,SEQ ID NO:16、9和62,或SEQ ID NO:73、9和62,并且

[0028] 其中所述抗hCTLA4抗体抑制hCTLA4与hB7-1和/或hB7-2的相互作用。

[0029] 18.根据项目17所述的抗hCTLA4抗体,其中所述VL包含的所述氨基酸序列相对于选自由SEQ ID NO:7、15、27、33、39、49、54、61、67和72组成的组的氨基酸序列包含不超过3个氨基酸改变。

[0030] 19.根据项目18所述的抗hCTLA4抗体,其中所述VL包含的所述氨基酸序列相对于选自由SEQ ID NO:7、15、27、33、39、49、54、61、67和72组成的组的氨基酸序列包含不超过2个氨基酸改变。

[0031] 20.根据项目19所述的抗hCTLA4抗体,其中所述VL包含的所述氨基酸序列相对于选自由SEQ ID NO:7、15、27、33、39、49、54、61、67和72组成的组的氨基酸序列包含不超过1个氨基酸改变。

[0032] 21.根据项目17至20中任一项所述的抗hCTLA4抗体,其中所述氨基酸改变是取代,并且所述取代是配偶体引导改变。

[0033] 22.根据项目20所述的抗hCTLA4抗体,其中所述VL包含的所述氨基酸序列选自由SEQ ID NO:7、15、27、33、39、49、54、61、67和72组成的组。

[0034] 23.根据项目17至22中任一项所述的抗hCTLA4抗体,其进一步包含VH,所述VH包含VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,所述VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3分别包含SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:79和SEQ ID NO:81的氨基酸序列。

[0035] 24.根据项目23所述的抗hCTLA4抗体,其中所述VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3分别包含SEQ ID NO:3、4和5,SEQ ID NO:3、13和5,SEQ ID NO:3、20和21,SEQ ID NO:3、24和25,SEQ ID NO:3、31和5,SEQ ID NO:3、37和5,SEQ ID NO:3、43和5,SEQ ID NO:3、46和47,SEQ ID NO:3、59和5,SEQ ID NO:3、65和21,或SEQ ID NO:3、70和21的氨基酸序列。

[0036] 25.根据项目17至22中任一项所述的抗hCTLA4抗体,还包含VH,其中所述VH包含的氨基酸序列相对于选自由SEQ ID NO:2、12、19、23、30、36、42、45、52、58、64、69、82和83组成的组的氨基酸序列包含不超过4个氨基酸改变。

[0037] 26.根据项目25所述的抗hCTLA4抗体,其中包含于所述VH的所述氨基酸序列相对于选自由SEQ ID NO:2、12、19、23、30、36、42、45、52、58、64、69、82和83组成的组的氨基酸序列包含不超过3个氨基酸改变。

[0038] 27.根据项目26所述的抗hCTLA4抗体,其中包含于所述VH的所述氨基酸序列相对

于选自SEQ ID NO:2、12、19、23、30、36、42、45、52、58、64、69、82和83组成的组的氨基酸序列包含不超过2个氨基酸改变。

[0039] 28. 根据项目27所述的抗hCTLA4抗体,其中包含于所述VH的所述氨基酸序列相对于选自SEQ ID NO:2、12、19、23、30、36、42、45、52、58、64、69、82和83组成的组的氨基酸序列包含不超过1个氨基酸改变。

[0040] 29. 根据项目25至28中任一项所述的抗hCTLA4抗体,其中所述氨基酸改变是取代,并且所述取代是配偶体引导改变。

[0041] 30. 根据项目25至29中任一项所述的抗hCTLA4抗体,其中所述VH包含VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,所述VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:3、4和5,SEQ ID NO:3、13和5,SEQ ID NO:3、20和21,SEQ ID NO:3、24和25,SEQ ID NO:3、31和5,SEQ ID NO:3、37和5,SEQ ID NO:3、43和5,SEQ ID NO:3、46和47,SEQ ID NO:3、59和5,SEQ ID NO:3、65和21,或SEQ ID NO:3、70和21的氨基酸序列。

[0042] 31. 根据项目28所述的抗hCTLA4抗体,其中包含于所述VH的所述氨基酸序列选自SEQ ID NO:2、12、19、23、30、36、42、45、52、58、64、69、82和83组成的组。

[0043] 32. 一种抗hCTLA4抗体,其包含VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3,所述VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含以下氨基酸序列:

[0044] (a) SEQ ID NO:3、4、5、8、9和10;

[0045] (b) SEQ ID NO:3、13、5、16、9和17;

[0046] (c) SEQ ID NO:3、20、21、16、9和17;

[0047] (d) SEQ ID NO:3、24、25、28、9和17;

[0048] (e) SEQ ID NO:3、31、5、34、9和17;

[0049] (f) SEQ ID NO:3、37、5、40、9和10;

[0050] (g) SEQ ID NO:3、43、5、28、9和17;

[0051] (h) SEQ ID NO:3、46、47、50、9和17;

[0052] (i) SEQ ID NO:3、31、5、55、9和56;

[0053] (j) SEQ ID NO:3、59、5、40、9和62;

[0054] (k) SEQ ID NO:3、65、21、16、9和62;或

[0055] (l) SEQ ID NO:3、70、21、73、9和62;

[0056] 其中所述抗hCTLA4抗体抑制hCTLA4与hB7-1和/或hB7-2的相互作用。

[0057] 33. 根据项目32所述的抗hCTLA4抗体,其中所述抗hCTLA4抗体的所述VH和所述VL各自包含一个氨基酸序列,一共包含两个序列,并且

[0058] 其中所述两个序列中的一个相对于序列对中的一个序列包含不超过4个氨基酸改变,并且所述两个序列中的另一个相对于所述序列对中的另一个序列包含不超过4个氨基酸改变,并且

[0059] 其中所述序列对选自SEQ ID NO:2 (VH) 和7 (VL); SEQ ID NO:12 (VH) 和15 (VL); SEQ ID NO:19 (VH) 和15 (VL); SEQ ID NO:23 (VH) 和27 (VL); SEQ ID NO:30 (VH) 和33 (VL); SEQ ID NO:36 (VH) 和39 (VL); SEQ ID NO:42 (VH) 和27 (VL); SEQ ID NO:45 (VH) 和49 (VL); SEQ ID NO:52 (VH) 和54 (VL); SEQ ID NO:58 (VH) 和61 (VL); SEQ ID NO:64 (VH) 和67 (VL); 和

SEQ ID NO:69(VH)和72(VL)组成的组。

[0060] 34. 根据项目33所述的抗hCTLA4抗体,其中所述两个序列中的一个相对于所述序列对中的一个序列包含不超过3个氨基酸改变,并且所述两个序列中的另一个相对于所述序列对中的另一个序列包含不超过3个氨基酸改变。

[0061] 35. 根据项目34所述的抗hCTLA4抗体,其中所述两个序列中的一个相对于所述序列对中的一个序列包含不超过2个氨基酸改变,并且所述两个序列中的另一个相对于所述序列对中的另一个序列包含不超过2个氨基酸改变。

[0062] 36. 根据项目35所述的抗hCTLA4抗体,其中所述两个序列中的一个相对于所述序列对中的一个序列包含不超过1个氨基酸改变,并且所述两个序列中的另一个相对于所述序列对中的另一个序列包含不超过1个氨基酸改变。

[0063] 37. 根据项目33至36中任一项所述的抗hCTLA4抗体,其中所述改变是取代,并且所述取代是配偶体引导改变。

[0064] 38. 根据项目36所述的抗hCTLA4抗体,其中所述两个序列中的一个包含所述序列对中的一个序列,并且所述两个序列中的另一个包含所述序列对中的另一个序列。

[0065] 39. 根据项目1至38中任一项所述的抗hCTLA4抗体,其是人、人源化或灵长类IgG抗体。

[0066] 40. 根据项目39所述的抗hCTLA4抗体,其是(1) IgG4抗体或(2) 包含K409R改变的IgG1抗体。

[0067] 41. 根据项目39所述的抗hCTLA4抗体,其是IgG1抗体。

[0068] 42. 根据项目39至41中任一项所述的抗hCTLA4抗体,

[0069] 其中所述重链(HC)或所述轻链(LC)在选自所述HC中的位置44、105、147、168和181以及所述LC中的位置43、100、131、174和178组成的组中的一个或多个位置处包含第一配偶体引导改变,

[0070] 其中所述第一配偶体引导改变是带电荷氨基酸代替其他氨基酸的取代,

[0071] 其中所述第一配偶体引导改变的取代的带电荷氨基酸在所述抗体内形成接触氨基酸的电荷对的一部分,并且

[0072] 其中所述电荷对的所述接触氨基酸选自以下组成的组:

[0073] (a) 44R/K(HC)和100D/E(LC)或44D/E(HC)和100R/K(LC);

[0074] (b) 105R/K(HC)和43D/E(LC)或105D/E(HC)和43R/K(LC);

[0075] (c) 147R/K(HC)和131D/E(LC)或147D/E(HC)和131R/K(LC);

[0076] (d) 168R/K(HC)和174D/E(LC)或168D/E(HC)和174R/K(LC);和

[0077] (e) 181R/K(HC)和178D/E(LC)或181D/E(HC)和178R/K(LC)。

[0078] 43. 根据项目42所述的抗hCTLA4抗体,其进一步包含第二配偶体引导改变,

[0079] 其中所述第二配偶体引导改变是带电荷的氨基酸取代其他氨基酸,并且

[0080] 其中所述第一和第二配偶体引导改变的取代的带电荷氨基酸形成接触氨基酸的所述电荷对。

[0081] 44. 根据项目42或项目43所述的抗hCTLA4抗体,

[0082] 其中所述抗hCTLA4抗体是IgG1抗体,

[0083] 其中所述抗hCTLA4抗体的所述HC或LC在所述HC或所述LC中的氨基酸处包含第三

配偶体引导改变,

[0084] 其中所述第三配偶体引导改变是半胱氨酸取代,并且

[0085] 其中(1)如果所述第三配偶体引导改变在所述LC中,则所述第三配偶体引导改变的取代的半胱氨酸与所述HC中的半胱氨酸接触,或者(2)如果所述第三配偶体引导改变在所述HC中,则所述第三配偶体引导改变的取代的半胱氨酸与所述LC中的半胱氨酸接触,以此形成半胱氨酸接触对。

[0086] 45.根据项目44所述的抗hCTLA4抗体,其中所述半胱氨酸接触对位于选自以下组成的组的位置:

[0087] (a)所述HC的位置126和所述LC中的位置121或124;

[0088] (b)所述HC中的位置128和所述LC中的位置118;

[0089] (c)所述HC中的位置133和所述LC中的位置117或209;

[0090] (d)所述HC中的位置134或141和所述LC中的位置116;

[0091] (e)所述HC中的位置168和所述LC中的位置174;

[0092] (f)所述HC中的位置170和所述LC中的位置162或176;

[0093] (g)所述HC中的位置173和所述LC中的位置160;和

[0094] (h)所述HC中的位置183和所述LC中的位置176。

[0095] 46.根据项目45所述的抗hCTLA4抗体,其中所述半胱氨酸接触对位于选自以下组成的组的位置:

[0096] (a)所述HC的位置126和所述LC中的位置124;

[0097] (b)所述HC的位置128和所述LC中的位置118;

[0098] (c)所述HC的位置133和所述LC中的位置117或209;

[0099] (d)所述HC的位置134和所述LC中的位置116;

[0100] (e)所述HC的位置168和所述LC中的位置174;

[0101] (f)所述HC的位置170和所述LC中的位置162或176;和

[0102] (g)所述HC的位置173和所述LC中的位置160。

[0103] 47.根据项目44至46中任一项所述的抗hCTLA4抗体,其中

[0104] 如果所述第三配偶体引导改变在所述HC中,则所述LC包含第四配偶体引导改变,所述第四配偶体引导改变是在与所述第三配偶体引导改变的氨基酸接触的氨基酸处的半胱氨酸取代,或者

[0105] 如果所述第三个配偶体引导改变在所述LC中,则所述HC包含第四配偶体引导改变,所述第四配偶体引导改变是在与所述第三配偶体引导改变的氨基酸接触的氨基酸处的半胱氨酸取代。

[0106] 48.根据项目42或项目43所述的抗hCTLA4抗体,

[0107] 其中所述抗hCTLA4抗体是IgG4抗体,

[0108] 其中所述抗hCTLA4抗体的所述HC或LC在所述HC或LC中的氨基酸处包含第三配偶体引导改变,并且

[0109] 其中(1)如果所述第三配偶体引导改变在所述LC中,则所述第三配偶体引导改变的取代的半胱氨酸与所述HC中的半胱氨酸接触,或者(2)如果所述第三配偶体引导改变在所述HC中,则所述第三配偶体引导改变的取代的半胱氨酸与所述LC中的半胱氨酸接触,以

此形成半胱氨酸接触对。

[0110] 49. 根据项目48所述的抗hCTLA4抗体,其中所述半胱氨酸接触对位于所述HC和LC中的位置选自由以下组成的组:

[0111] (a) 所述HC中的位置126和所述LC中的位置121或124;

[0112] (b) 所述HC中的位置127和所述LC中的位置121;

[0113] (c) 所述HC中的位置128和所述LC中的位置118;

[0114] (d) 所述HC中的位置141和所述LC中的位置116;

[0115] (e) 所述HC中的位置168和所述LC中的位置174;和

[0116] (f) 所述HC中的位置170或173和所述LC中的位置162。

[0117] 50. 根据项目48或项目49所述的抗hCTLA4抗体,其中

[0118] 如果所述第三配偶体引导改变在所述HC中,则所述LC包含第四配偶体引导改变,所述第四配偶体引导改变是在与所述第三配偶体引导改变的氨基酸接触的氨基酸处的半胱氨酸取代,或者

[0119] 如果所述第三配偶体引导改变在所述LC中,则所述HC包含第四配偶体引导改变,所述第四配偶体引导改变是在与所述第三配偶体引导改变的氨基酸接触的氨基酸处的半胱氨酸取代。

[0120] 51. 根据项目1至50中任一项所述的抗hCTLA4抗体,其包含改变D399K/R和K/R409E/D。

[0121] 52. 根据项目1至51中任一项所述的抗hCTLA4抗体,其中所述抗hCTLA4抗体是包含Fc部分的人、人源化或灵长类IgG抗体,其中所述抗体的所述Fc部分包含一个或多个增加所述抗体在体内的清除的改变。

[0122] 53. 根据项目52所述的抗hCTLA4抗体,其中所述抗体的所述Fc部分包含至少一种以下改变:M252A、M252L、M252S、M252R、R255K或H435R。

[0123] 54. 一种抗hCTLA4抗体,其包含SEQ ID NO:189和191或SEQ ID NO:193和195的氨基酸序列。

[0124] 55. 一种包含VH的抗人程序性细胞死亡1(hPD1)抗体,

[0125] 其中所述VH包含的氨基酸序列相对于选自由SEQ ID NO:87、97、104、110、117、122、126、133、139、144、148、154、158、162和166组成的组的氨基酸序列包含不超过4个氨基酸改变,并且

[0126] 其中所述抗hPD1抗体抑制hPD1与人程序性细胞死亡1配体1(hPDL1)的相互作用。

[0127] 56. 根据项目55所述的抗hPD1抗体,其中所述VH包含VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,所述VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3分别包含SEQ ID NO:88、89和90,SEQ ID NO:98、89和99,SEQ ID NO:105、89和90,SEQ ID NO:105、111和112,SEQ ID NO:105、111和90,SEQ ID NO:88、89和112,SEQ ID NO:88、89和127,SEQ ID NO:88、89和134,SEQ ID NO:98、89和90,SEQ ID NO:98、111和112,SEQ ID NO:149、150和112,SEQ ID NO:105、111和90,SEQ ID NO:149、89和127,SEQ ID NO:88、89和112,或SEQ ID NO:105、89和127的氨基酸序列。

[0128] 57. 根据项目55或56所述的抗hPD1抗体,其中包含于所述VH的所述氨基酸序列相对于选自由SEQ ID NO:87、97、104、110、117、122、126、133、139、144、148、154、158、162和166组成的组的氨基酸序列包含不超过3个氨基酸改变。

[0129] 58. 根据项目57所述的抗hPD1抗体,其中包含于所述VH的所述氨基酸序列相对于选自由SEQ ID NO:87、97、104、110、117、122、126、133、139、144、148、154、158、162和166组成的组的氨基酸序列包含不超过2个氨基酸改变。

[0130] 59. 根据项目58所述的抗hPD1抗体,其中包含于所述VH的所述氨基酸序列相对于选自由SEQ ID NO:87、97、104、110、117、122、126、133、139、144、148、154、158、162和166组成的组的氨基酸序列包含不超过1个氨基酸改变。

[0131] 60. 根据项目55至59中任一项所述的抗hPD1抗体,其中所述氨基酸改变是取代,并且所述取代是配偶体引导改变。

[0132] 61. 根据项目59所述的抗hPD1抗体,其中所述VH所包含的所述氨基酸序列选自由SEQ ID NO:87、97、104、110、117、122、126、133、139、144、148、154、158、162和166组成的组。

[0133] 62. 根据项目55至61中任一项所述的抗hPD1抗体,进一步包含VL,所述VL包含VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3,所述VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:176、177和179的氨基酸序列。

[0134] 63. 根据项目62所述的抗hPD1抗体,其中所述VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:93、94和95,SEQ ID NO:102、94和95,SEQ ID NO:93、108和95,SEQ ID NO:115、94和95,SEQ ID NO:120、94和95,SEQ ID NO:102、108和95,SEQ ID NO:130、108和131,SEQ ID NO:137、94和131,SEQ ID NO:142、94和131,或SEQ ID NO:130、94和131的氨基酸序列。

[0135] 64. 根据项目55至61中任一项所述的抗hPD1抗体,其包含VL,所述VL包含的所述氨基酸序列相对于选自由SEQ ID NO:92、101、107、114、119、124、129、136、141、146、152、156、160、164、168、182和183组成的组的氨基酸序列包含不超过4个氨基酸改变。

[0136] 65. 根据项目64所述的抗hPD1抗体,其中包含于所述VH的所述氨基酸序列相对于选自由SEQ ID NO:92、101、107、114、119、124、129、136、141、146、152、156、160、164、168、182和183组成的组的氨基酸序列包含不超过3个氨基酸改变。

[0137] 66. 根据项目65所述的抗hPD1抗体,其中包含于所述VH的所述氨基酸序列相对于选自由SEQ ID NO:92、101、107、114、119、124、129、136、141、146、152、156、160、164、168、182和183组成的组的氨基酸序列包含不超过2个氨基酸改变。

[0138] 67. 根据项目66所述的抗hPD1抗体,其中包含于所述VH的所述氨基酸序列相对于选自由SEQ ID NO:92、101、107、114、119、124、129、136、141、146、152、156、160、164、168、182和183组成的组的氨基酸序列包含不超过1个氨基酸改变。

[0139] 68. 根据项目64至67中任一项所述的抗hPD1抗体,其中相对于SEQ ID NO:92、101、107、114、119、124、129、136、141、146、152、156、160、164、168、182或183的所述氨基酸改变是取代,并且所述取代是配偶体引导改变。

[0140] 69. 根据项目67所述的抗hPD1抗体,其中包含于所述VH的所述氨基酸序列选自由SEQ ID NO:92、101、107、114、119、124、129、136、141、146、152、156、160、164、168、182和183组成的组。

[0141] 70. 根据项目64至69中任一项所述的抗hPD1抗体,其中所述VL包含VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3,所述VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:93、94和95,SEQ ID NO:102、94和95,SEQ ID NO:93、108和95,SEQ ID NO:115、94和95,SEQ ID NO:120、94和95,

SEQ ID NO:102、108和95,SEQ ID NO:130、108和131,SEQ ID NO:137、94和131,SEQ ID NO:142、94和131,或SEQ ID NO:130、94和131的氨基酸序列。

[0142] 71.一种包含VL的抗hPD1抗体,

[0143] 其中所述VL包含的氨基酸序列相对于选自由SEQ ID NO:92、101、107、114、119、124、129、136、141、146、152、156、160、164和168组成的组的氨基酸序列包含不超过4个氨基酸改变,并且

[0144] 其中所述抗hPD1抗体抑制hPD1与hPDL1的相互作用。

[0145] 72.根据项目71所述的抗hPD1抗体,其包含VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3,所述VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:93、94和95,SEQ ID NO:102、94和95,SEQ ID NO:93、108和95,SEQ ID NO:115、94和95,SEQ ID NO:120、94和95,SEQ ID NO:102、108和95,SEQ ID NO:130、108和131,SEQ ID NO:137、94和131,SEQ ID NO:142、94和131,或SEQ ID NO:130、94和131的氨基酸序列。

[0146] 73.根据项目71或项目72所述的抗PD1抗体,其中包含于所述VL的所述氨基酸序列相对于选自由SEQ ID NO:92、101、107、114、119、124、129、136、141、146、152、156、160、164和168组成的组的氨基酸序列包含不超过3个氨基酸改变。

[0147] 74.根据项目73所述的抗PD1抗体,其中包含于所述VL的所述氨基酸序列相对于选自由SEQ ID NO:92、101、107、114、119、124、129、136、141、146、152、156、160、164和168组成的组的氨基酸序列包含不超过2个氨基酸改变。

[0148] 75.根据项目74所述的抗PD1抗体,其中包含于所述VL的所述氨基酸序列相对于选自由SEQ ID NO:92、101、107、114、119、124、129、136、141、146、152、156、160、164和168组成的组的氨基酸序列包含不超过1个氨基酸改变。

[0149] 76.根据项目71至75中任一项所述的抗PD1抗体,其中所述氨基酸改变是取代,并且所述取代是配偶体引导改变。

[0150] 77.根据项目75所述的抗PD1抗体,其中VL包含的氨基酸序列选自由SEQ ID NO:92、101、107、114、119、124、129、136、141、146、152、156、160、164和168组成的组。

[0151] 78.根据项目71至77中任一项所述的抗hPD1抗体,进一步包含VH,所述VH包含VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,所述VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3分别包含SEQ ID NO:170、172和174的氨基酸序列。

[0152] 79.根据项目78所述的抗hPD1抗体,其中所述VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3分别包含SEQ ID NO:88、89和90,SEQ ID NO:98、89和99,SEQ ID NO:105、89和90,SEQ ID NO:105、111和112,SEQ ID NO:105、111和90,SEQ ID NO:88、89和112,SEQ ID NO:88、89和127,SEQ ID NO:88、89和134,SEQ ID NO:98、89和90,SEQ ID NO:98、111和112,SEQ ID NO:149、150和112,SEQ ID NO:105、111和90,SEQ ID NO:149、89和127,SEQ ID NO:88、89和112,或SEQ ID NO:105、89和127的氨基酸序列。

[0153] 80.根据项目71至77中任一项所述的抗hPD1抗体,进一步包含VH,所述VH包含的氨基酸序列相对于选自由SEQ ID NO:87、97、104、110、117、122、126、133、139、144、148、154、158、162、166、180和181组成的组的氨基酸序列包含不超过4个氨基酸改变。

[0154] 81.根据项目80所述的抗hPD1抗体,其中包含于所述VH的所述氨基酸序列相对于选自由SEQ ID NO:87、97、104、110、117、122、126、133、139、144、148、154、158、162、166、180

和181组成的组的氨基酸序列包含不超过3个氨基酸改变。

[0155] 82. 根据项目81所述的抗hPD1抗体,其中包含于所述VH的所述氨基酸序列相对于选自SEQ ID NO:87、97、104、110、117、122、126、133、139、144、148、154、158、162、166、180和181组成的组的氨基酸序列包含不超过2个氨基酸改变。

[0156] 83. 根据项目82所述的抗hPD1抗体,其中包含于所述VH的所述氨基酸序列相对于选自SEQ ID NO:87、97、104、110、117、122、126、133、139、144、148、154、158、162、166、180和181组成的组的氨基酸序列包含不超过1个氨基酸改变。

[0157] 84. 根据项目80至83中任一项所述的抗hPD1抗体,其中所述氨基酸改变是取代,并且所述取代是配偶体引导改变。

[0158] 85. 根据项目83所述的抗hPD1抗体,其中所述VH包含的所述氨基酸序列选自SEQ ID NO:87、97、104、110、117、122、126、133、139、144、148、154、158、162、166、180和181组成的组的氨基酸序列。

[0159] 86. 根据项目80-85中任一项所述的抗PD1抗体,其中所述VH包含VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,所述VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3分别包含SEQ ID NO:88、89和90, SEQ ID NO:98、89和99, SEQ ID NO:105、89和90, SEQ ID NO:105、111和112, SEQ ID NO:105、111和90, SEQ ID NO:88、89和112, SEQ ID NO:88、89和127, SEQ ID NO:88、89和134, SEQ ID NO:98、89和90, SEQ ID NO:98、111和112, SEQ ID NO:149、150和112, SEQ ID NO:105、111和90, SEQ ID NO:149、89和127, SEQ ID NO:88、89和112, 或SEQ ID NO:105、89和127的氨基酸序列。

[0160] 87. 一种抗hPD1抗体,其包含VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3,所述VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含以下氨基酸序列:

[0161] (a) SEQ ID NO:88、89、90、93、94和95;

[0162] (b) SEQ ID NO:98、89、99、102、94和95;

[0163] (c) SEQ ID NO:105、89、90、93、108和95;

[0164] (d) SEQ ID NO:105、111、112、115、94和95;

[0165] (e) SEQ ID NO:105、111、90、120、94和95;

[0166] (f) SEQ ID NO:88、89、112、102、108和95;

[0167] (g) SEQ ID NO:88、89、127、130、108和131;

[0168] (h) SEQ ID NO:88、89、134、137、94和131;

[0169] (i) SEQ ID NO:98、89、90、142、94和131;

[0170] (j) SEQ ID NO:98、111、112、130、94和131;

[0171] (k) SEQ ID NO:149、150、112、130、94和131;

[0172] (l) SEQ ID NO:105、111、90、142、94和131;

[0173] (m) SEQ ID NO:149、89、127、115、94和95;

[0174] (n) SEQ ID NO:88、89、112、93、94和95;或

[0175] (o) SEQ ID NO:105、89、127、102、108和95,

[0176] 其中所述抗hPD1抗体抑制hPD1与hPDL1的相互作用。

[0177] 88. 根据项目87所述的抗hPD1抗体,其中所述抗hPD1抗体的所述VH和所述VL各自包含一个氨基酸序列,一共包含两个序列,并且

[0178] 其中所述两个序列中的一个相对于序列对中的一个序列包含不超过4个氨基酸改变,并且所述两个序列中的另一个相对于所述序列对中的另一个序列包含不超过4个氨基酸改变,并且

[0179] 其中所述序列对选自SEQ ID NO:87 (VH) 和92 (VL);SEQ ID NO:97 (VH) 和101 (VL);SEQ ID NO:104 (VH) 和107 (VL);SEQ ID NO:110 (VH) 和114 (VL);SEQ ID NO:117 (VH) 和119 (VL);SEQ ID NO:122 (VH) 和124 (VL);SEQ ID NO:126 (VH) 和129 (VL);SEQ ID NO:133 (VH) 和136 (VL);SEQ ID NO:139 (VH) 和141 (VL);SEQ ID NO:144 (VH) 和146 (VL);SEQ ID NO:148 (VH) 和152 (VL);SEQ ID NO:154 (VH) 和156 (VL);SEQ ID NO:158 (VH) 和160 (VL);SEQ ID NO:162 (VH) 和164 (VL);和SEQ ID NO:166 (VH) 和168 (VL) 组成的组。

[0180] 89. 根据项目88所述的抗hPD1抗体,其中所述两个序列中的一个相对于所述序列对中的一个序列包含不超过3个氨基酸改变,并且所述两个序列中的另一个相对于所述序列对中的另一个序列包含不超过3个氨基酸改变。

[0181] 90. 根据项目89所述的抗hPD1抗体,其中所述两个序列中的一个相对于所述序列对中的一个序列包含不超过2个氨基酸改变,并且所述两个序列中的另一个相对于所述序列对中的另一个序列包含不超过2个氨基酸改变。

[0182] 91. 根据项目90所述的抗hPD1抗体,其中所述两个序列中的一个相对于所述序列对中的一个序列包含不超过1个氨基酸改变,并且所述两个序列中的另一个相对于所述序列对中的另一个序列包含不超过1个氨基酸改变。

[0183] 92. 根据项目88至91中任一项所述的抗hPD1抗体,其中所述改变是取代,并且所述取代是配偶体引导改变。

[0184] 93. 根据项目91所述的抗hPD1抗体,其中所述两个序列中的一个包含所述序列对中的一个序列,并且所述两个序列中的另一个包含所述序列对中的另一个序列。

[0185] 94. 根据项目55至93中任一项所述的抗hPD1抗体,其是人、人源化或灵长类IgG抗体。

[0186] 95. 根据项目94所述的抗hPD1抗体,其是(1) IgG4抗体或(2) 包含改变K409R的IgG1抗体。

[0187] 96. 根据项目94所述的抗hPD1抗体,其是IgG1抗体。

[0188] 97. 根据项目94至96中任一项所述的抗hPD1抗体,

[0189] 其中所述重链(HC) 或所述轻链(LC) 在选自所述HC中的位置44、105、147、168和181以及所述LC中的位置43、100、131、174和178组成的组中的一个或多个位置处包含第一配偶体引导改变,

[0190] 其中所述配偶体引导改变是带电荷氨基酸代替其他氨基酸的取代,

[0191] 其中所述配偶体引导改变的取代的带电荷氨基酸在所述抗体内形成接触氨基酸的电荷对的一部分,并且

[0192] 其中所述电荷对的所述接触氨基酸选自以下组成的组:

[0193] (a) 44R/K (HC) 和100D/E (LC) 或44D/E (HC) 和100R/K (LC);

[0194] (b) 105R/K (HC) 和43D/E (LC) 或105D/E (HC) 和43R/K (LC);

[0195] (c) 147R/K (HC) 和131D/E (LC) 或147D/E (HC) 和131R/K (LC);

[0196] (d) 168R/K (HC) 和174D/E (LC) 或168D/E (HC) 和174R/K (LC); 和

- [0197] (e) 181R/K (HC) 和178D/E (LC) 或181D/E (HC) 和178R/K (LC) 。
- [0198] 98. 根据项目97所述的抗hPD1抗体,其进一步包含第二配偶体引导改变,
- [0199] 其中所述第二配偶体引导改变是带电荷的氨基酸取代其他氨基酸,并且
- [0200] 其中所述第一和第二配偶体引导改变的取代的带电荷氨基酸形成接触氨基酸的所述电荷对。
- [0201] 99. 根据项目97或项目98所述的抗hPD1抗体,
- [0202] 其中所述抗hPD1抗体是IgG1抗体,
- [0203] 其中所述抗hPD1抗体的所述HC或LC在所述HC或所述LC中的氨基酸处包含第三配偶体引导改变,
- [0204] 其中所述第三配偶体引导改变是半胱氨酸取代,并且
- [0205] 其中 (1) 如果所述第三配偶体引导改变在所述LC中,则所述第三配偶体引导改变的取代的半胱氨酸与所述HC中的半胱氨酸接触,或者 (2) 如果所述第三配偶体引导改变在所述HC中,则所述第三配偶体引导改变的取代的半胱氨酸与所述LC中的半胱氨酸接触,以此形成半胱氨酸接触对。
- [0206] 100. 根据项目99所述的抗hPD1抗体,其中所述半胱氨酸接触对位于选自以下组成的组的位置:
- [0207] (a) 所述HC的位置126和所述LC中的位置121或124;
- [0208] (b) 所述HC中的位置128和所述LC中的位置118;
- [0209] (c) 所述HC中的位置133和所述LC中的位置117或209;
- [0210] (d) 所述HC中的位置134或141和所述LC中的位置116;
- [0211] (e) 所述HC中的位置168和所述LC中的位置174;
- [0212] (f) 所述HC中的位置170和所述LC中的位置162或176;
- [0213] (g) 所述HC中的位置173和所述LC中的位置160;和
- [0214] (h) 所述HC中的位置183和所述LC中的位置176。
- [0215] 101. 根据项目100所述的抗hPD1抗体,其中所述半胱氨酸接触对位于选自以下组成的组的位置:
- [0216] (a) 所述HC的位置126和所述LC中的位置124;
- [0217] (b) 所述HC的位置128和所述LC中的位置118;
- [0218] (c) 所述HC的位置133和所述LC中的位置117或209;
- [0219] (d) 所述HC的位置134和所述LC中的位置116;
- [0220] (e) 所述HC的位置168和所述LC中的位置174;
- [0221] (f) 所述HC的位置170和所述LC中的位置162或176;和
- [0222] (g) 所述HC的位置173和所述LC中的位置160。
- [0223] 102. 根据项目99至101中任一项所述的抗hPD1抗体,其中
- [0224] 如果所述第三配偶体引导改变在所述HC中,则所述LC包含第四配偶体引导改变,所述第四配偶体引导改变是在与所述第三配偶体引导改变的氨基酸接触的氨基酸处的半胱氨酸取代,或者
- [0225] 如果所述第三个配偶体引导改变在所述LC中,则所述HC包含第四配偶体引导改变,所述第四配偶体引导改变是在与所述第三配偶体引导改变的氨基酸接触的氨基酸处的

半胱氨酸取代。

[0226] 103. 根据项目97或项目98所述的抗hPD1抗体,

[0227] 其中所述抗hPD1抗体是IgG4抗体,

[0228] 其中所述抗hPD1抗体的所述HC或LC在所述HC或LC中的氨基酸处含有第三配偶体引导改变,

[0229] 其中(1) 如果所述第三配偶体引导改变在所述LC中,则所述第三配偶体引导改变的取代的半胱氨酸与所述HC中的半胱氨酸接触,或者(2) 如果所述第三配偶体引导改变在所述HC中,则所述第三配偶体引导改变的取代的半胱氨酸与所述LC中的半胱氨酸接触,以此形成半胱氨酸接触对。

[0230] 104. 根据项目103所述的抗hPD1抗体,其中所述半胱氨酸接触对位于所述HC和LC中的位置选自由以下组成的组:

[0231] (a) 所述HC中的位置126和所述LC中的位置121或124;

[0232] (b) 所述HC中的位置127和所述LC中的位置121;

[0233] (c) 所述HC中的位置128和所述LC中的位置118;

[0234] (d) 所述HC中的位置141和所述LC中的位置116;

[0235] (e) 所述HC中的位置168和所述LC中的位置174;和

[0236] (f) 所述HC中的位置170或173和所述LC中的位置162。

[0237] 105. 根据项目103或项目104所述的抗hPD1抗体,其中

[0238] 如果所述第三配偶体引导改变在所述HC中,则所述LC包含第四配偶体引导改变,所述第四配偶体引导改变是在与第三配偶体引导改变的氨基酸接触的氨基酸处的半胱氨酸取代,或者

[0239] 如果所述第三配偶体引导改变在所述LC中,则所述HC包含第四配偶体引导改变,所述第四配偶体引导改变是在与第三配偶体引导改变的氨基酸接触的氨基酸处的半胱氨酸取代。

[0240] 106. 根据项目55至105中任一项所述的抗hPD1抗体,其包含改变D399K/R和K/R409E/D。

[0241] 107. 一种抗hPD1抗体,其包含SEQ ID NO:185和187的氨基酸序列。

[0242] 108. 一种抗体混合物,其包含根据项目1至54中任一项所述的抗hCTLA4抗体和根据项目55至107中任一项所述的抗hPD1抗体。

[0243] 109. 根据项目108所述的抗体混合物,其包含根据项目8所述的抗hCTLA4抗体和根据项目61所述的抗hPD1抗体。

[0244] 110. 根据项目108或项目109所述的抗体混合物,其中所述混合物在单一宿主细胞系中产生。

[0245] 111. 根据项目110所述的抗体混合物,其包含不超过3种主要种类的抗体。

[0246] 112. 根据项目111所述的抗体混合物,其包含不超过2种主要种类的抗体。

[0247] 113. 一种或多种多核苷酸,其编码根据项目1至54中任一项所述的抗hCTLA4抗体、根据项目55至107中任一项所述的抗hPD1抗体、或根据项目108至112中任一项所述的抗体混合物。

[0248] 114. 根据项目113所述的多核苷酸,其编码根据项目108至112中任一项所述的抗

体混合物。

[0249] 115. 一种或多种载体,其包含根据项目113或项目114所述的多核苷酸。

[0250] 116. 根据项目115所述的载体,其是病毒载体。

[0251] 117. 根据项目116所述的载体,其是溶瘤病毒载体。

[0252] 118. 根据项目116或117所述的载体,其是逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体、痘苗病毒载体、改良型痘苗病毒安卡拉(MVA)载体、疱疹病毒载体、慢病毒载体、麻疹病毒载体、柯萨奇病毒载体、新城疫病毒载体、呼肠孤病毒载体或痘病毒载体。

[0253] 119. 一种药物组合物,其包含根据项目1至54中任一项所述的抗hCTLA4抗体、根据项目55至107中任一项所述的抗hPD1抗体、根据项目108至112中任一项所述的抗体混合物、根据项目113或项目114所述的多核苷酸、或者根据项目115至118中任一项所述的载体。

[0254] 120. 一种宿主细胞,其中引入了根据项目113或项目114所述的多核苷酸或根据项目115或项目116所述的载体。

[0255] 121. 根据项目120所述的宿主细胞,其是哺乳动物细胞。

[0256] 122. 根据项目121所述的宿主细胞,其是CHO细胞或小鼠骨髓瘤细胞。

[0257] 123. 一种制备抗体或抗体混合物的方法,包括培养根据项目120至122中任一项所述的宿主细胞,并从所述培养基或所述细胞团中回收所述抗体或抗体混合物。

[0258] 124. 一种治疗患有实体瘤或恶性血液病的患者的方法,包括给所述患者施用根据项目1至54中任一项所述的抗hCTLA4抗体、根据项目55至107中任一项所述的抗hPD1抗体、根据项目108至112中任一项所述的混合物、根据项目113或项目114所述的多核苷酸、根据项目115至118中任一项所述的载体,或根据项目119所述的药物组合物。

[0259] 125. 根据项目124所述的方法,包括施用所述抗hCTLA4抗体、所述抗hPD1抗体或所述抗体混合物。

[0260] 126. 根据项目124或项目125所述的方法,其中所述患者患有黑素瘤、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、胃癌、膀胱癌、透明细胞肾癌、霍奇金淋巴瘤或头颈部鳞状细胞癌。

[0261] 127. 根据项目124至126中任一项所述的方法,进一步包括在所述抗hCTLA4抗体、所述抗hPD1抗体、或所述抗体混合物、所述多核苷酸、所述载体、或所述药物组合物之前、之后和/或同时施用其他治疗剂,其中所述其他治疗剂选自免疫调节分子、放射治疗剂、化学治疗剂、靶向生物制剂、靶向抑制剂和/或溶瘤病毒组成的组。

[0262] 128. 根据项目127所述的方法,其中所述其他治疗剂是放射治疗剂或化学治疗剂。

[0263] 129. 根据项目127所述的方法,其中所述其他治疗剂是靶向生物制剂、靶向抑制剂和/或免疫调节分子,所述免疫调节分子选自以下所组成的组:PDL1、TIGIT、CCR4、CCR8、CSFR1a、B7H3、B7H4、CD96或CD73的拮抗剂;GITR、41BB、OX40或CD40的激动剂;溶瘤病毒,如 talimogene laherparepvec (IMLYGICTM);双特异性T细胞衔接器(BiTE),如博纳吐单抗;吲哚胺2,3双加氧酶(IDO)抑制剂;抗血管生成剂,如贝伐单抗;抗体-药物偶联物;和酪氨酸激酶抑制剂。

[0264] 130. 一种诱导或增强患者免疫应答的方法,包括给所述患者施用根据项目1至54中任一项所述的抗hCTLA4抗体、根据项目55至107中任一项所述的抗hPD1抗体、根据项目108至112中任一项所述的混合物、根据项目113或项目114所述的多核苷酸、根据项目115至118中任一项所述的载体、或根据项目119所述的药物组合物。

[0265] 131. 根据项目130所述的方法, 包括施用所述抗体混合物、一种或多种编码所述抗体混合物的载体、或含有所述抗体混合物或编码所述抗体混合物的所述载体的药物组合物。

[0266] 132. 根据项目130或项目131所述的方法, 其中所述患者患有黑素瘤、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、胃癌、膀胱癌、透明细胞肾癌、霍奇金淋巴瘤或头颈部鳞状细胞癌。

[0267] 133. 根据项目130至132中任一项所述的方法, 进一步包括在所述抗hCTLA4抗体、所述抗hPD1抗体、或所述抗体混合物、所述多核苷酸、或所述载体之前、之后和/或同时施用其他治疗剂, 其中所述其他治疗剂选自免疫调节分子、放射治疗剂、化学治疗剂、靶向生物制剂、靶向抑制剂和/或溶瘤病毒组成的组。

[0268] 134. 根据项目133所述的方法, 其中所述其他治疗剂是放射治疗剂或化学治疗剂。

[0269] 135. 根据项目133所述的方法, 其中所述其他治疗剂是靶向生物制剂、靶向抑制剂和/或免疫调节分子, 所述免疫调节分子选自以下所组成的组: PDL1、TIGIT、CCR4、CCR8、CSFR1a、B7H3、B7H4、CD96或CD73的拮抗剂; GITR、41BB、OX40或CD40的激动剂; 溶瘤病毒, 如 talimogene laherparepvec (IMLYGIC™); 双特异性T细胞衔接器 (BiTE), 如博纳吐单抗; 吡啶胺2,3双加氧酶 (IDO) 抑制剂; 抗血管生成剂, 如贝伐单抗; 抗体-药物偶联物; 和酪氨酸激酶抑制剂。

[0270] 136. 一种治疗患有感染的患者的方法, 包括给所述患者施用根据权利要求1至54中任一项所述的抗hCTLA4抗体、根据权利要求55至107中任一项所述的抗hPD1抗体、根据权利要求108至112中任一项所述的混合物、根据权利要求113或权利要求114所述的多核苷酸、根据权利要求115至118中任一项所述的载体、或根据权利要求119所述的药物组合物。

[0271] 137. 一种包含重链可变结构域 (VH) 的抗人CTLA4 (hCTLA4) 抗体, 其中所述VH包含VH互补决定区1 (CDR1)、VH互补决定区2 (CDR2) 和VH互补决定区3 (CDR3), 所述VH互补决定区1 (CDR1)、VH互补决定区2 (CDR2) 和VH互补决定区3 (CDR3) 分别包含SEQ ID NO: 3、4和5, SEQ ID NO: 3、13和5, SEQ ID NO: 3、20和21, SEQ ID NO: 3、24和25, SEQ ID NO: 3、31和5, SEQ ID NO: 3、37和5, SEQ ID NO: 3、43和5, SEQ ID NO: 3、46和47, SEQ ID NO: 3、59和5, SEQ ID NO: 3、65和21, 或SEQ ID NO: 3、70和21的氨基酸序列。

[0272] 138. 根据项目137所述的抗hCTLA4抗体, 其中所述VH包含SEQ ID NO: 82的氨基酸序列。

[0273] 139. 根据项目138所述的抗hCTLA4抗体, 其中所述VH包含SEQ ID NO: 83的氨基酸序列。

[0274] 140. 根据项目139所述的抗hCTLA4抗体, 其中所述VH包含选自SEQ ID NO: 2、12、19、23、30、36、42、45、52、58、64和69的氨基酸序列组成的组。

[0275] 141. 一种包含轻链可变结构域 (VL) 的抗hCTLA4抗体, 其包含VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3, 所述VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO: 8、9和10, SEQ ID NO: 16、9和17, SEQ ID NO: 28、9和17, SEQ ID NO: 34、9和17, SEQ ID NO: 40、9和10, SEQ ID NO: 50、9和17, SEQ ID NO: 55、9和56, SEQ ID NO: 40、9和62, SEQ ID NO: 16、9和62, 或SEQ ID NO: 73、9和62的氨基酸序列。

[0276] 142. 根据项目141所述的抗hCTLA4抗体, 其中所述VL包含SEQ ID NO: 84的氨基酸序列。

[0277] 143. 根据项目142所述的抗hCTLA4抗体,其中所述VL包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列。

[0278] 144. 根据项目143所述的抗hCTLA4抗体,其中所述VL包含选自SEQ ID NO:7、15、27、33、39、49、54、61、67和72的氨基酸序列。

[0279] 145. 根据项目137至140中任一项所述的抗hCTLA4抗体,其进一步包含VL,所述VL包含VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3,所述VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:8、9和10,SEQ ID NO:16、9和17,SEQ ID NO:28、9和17,SEQ ID NO:34、9和17,SEQ ID NO:40、9和10,SEQ ID NO:50、9和17,SEQ ID NO:55、9和56,SEQ ID NO:40、9和62,SEQ ID NO:16、9和62,或SEQ ID NO:73、9和62的氨基酸序列。

[0280] 146. 根据项目145所述的抗hCTLA4抗体,其包含VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3,所述VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含以下氨基酸序列:

[0281] (a) SEQ ID NO:3、4、5、8、9和10;

[0282] (b) SEQ ID NO:3、13、5、16、9和17;

[0283] (c) SEQ ID NO:3、20、21、16、9和17;

[0284] (d) SEQ ID NO:3、24、25、28、9和17;

[0285] (e) SEQ ID NO:3、31、5、34、9和17;

[0286] (f) SEQ ID NO:3、37、5、40、9和10;

[0287] (g) SEQ ID NO:3、43、5、28、9和17;

[0288] (h) SEQ ID NO:3、46、47、50、9和17;

[0289] (i) SEQ ID NO:3、31、5、55、9和56;

[0290] (j) SEQ ID NO:3、59、5、40、9和62;

[0291] (k) SEQ ID NO:3、65、21、16、9和62;或

[0292] (l) SEQ ID NO:3、70、21、73、9和62。

[0293] 147. 根据项目145所述的抗hCTLA4抗体,其中所述VL包含SEQ ID NO:84的氨基酸序列,所述VH包含SEQ ID NO:82的氨基酸序列。

[0294] 148. 根据项目147所述的抗hCTLA4抗体,其中所述VL包含SEQ ID NO:85的氨基酸序列,所述VH包含SEQ ID NO:83的氨基酸序列。

[0295] 149. 根据项目148所述的抗hCTLA4抗体,其中所述VL包含选自SEQ ID NO:7、15、27、33、39、49、54、61、67和72的氨基酸序列。

[0296] 150. 根据项目149所述的抗hCTLA4抗体,其中所述VH和VL分别包含选自下组的氨基酸序列:SEQ ID NO:2和7;SEQ ID NO:12和15;SEQ ID NO:19和15;SEQ ID NO:23和27;SEQ ID NO:30和33;SEQ ID NO:36和39;SEQ ID NO:42和27;SEQ ID NO:45和49;SEQ ID NO:52和54;SEQ ID NO:58和61;SEQ ID NO:64和67;和SEQ ID NO:69和72。

[0297] 151. 根据项目137至150中任一项所述的抗hCTLA4抗体,其是人、人源化或灵长类动物IgG抗体。

[0298] 152. 根据项目151所述的抗hCTLA4抗体,其是IgG4抗体或包含K409R改变的IgG1抗体。

[0299] 153. 根据项目151所述的抗hCTLA4抗体,其是IgG1抗体。

- [0300] 154. 根据项目151至153中任一项所述的抗hCTLA4抗体,
- [0301] 其中所述重链(HC)或所述轻链(LC)在选自所述HC中的位置44、105、147、168和181以及所述LC中的位置43、100、131、174和178组成的组中的一个或多个位置处包含第一配偶体引导改变,
- [0302] 其中所述第一配偶体引导改变是带电荷氨基酸代替其他氨基酸的取代,
- [0303] 其中所述第一配偶体引导改变的取代的带电荷氨基酸在所述抗体内形成接触氨基酸的电荷对的一部分,并且
- [0304] 其中所述电荷对的所述接触氨基酸选自以下组成的组:
- [0305] (a) 44R/K(HC)和100D/E(LC)或44D/E(HC)和100R/K(LC);
- [0306] (b) 105R/K(HC)和43D/E(LC)或105D/E(HC)和43R/K(LC);
- [0307] (c) 147R/K(HC)和131D/E(LC)或147D/E(HC)和131R/K(LC);
- [0308] (d) 168R/K(HC)和174D/E(LC)或168D/E(HC)和174R/K(LC);和
- [0309] (e) 181R/K(HC)和178D/E(LC)或181D/E(HC)和178R/K(LC)。
- [0310] 155. 根据项目151、152或154所述的抗hCTLA4抗体,
- [0311] 其中所述抗hCTLA4抗体是IgG1抗体,
- [0312] 其中所述抗hCTLA4抗体的所述HC或LC在所述HC或LC的氨基酸上含有第二个配偶体引导改变,
- [0313] 其中所述第二配偶体引导改变是半胱氨酸取代其他氨基酸的取代,和
- [0314] 其中, (1) 如果所述第二配偶体引导改变在所述LC中,则所述第二配偶体引导改变的取代的半胱氨酸与所述HC中的半胱氨酸接触,或者(2) 如果所述第二配偶体引导改变在所述HC中,则所述第二配偶体引导改变的取代的半胱氨酸与所述LC中的半胱氨酸接触。
- [0315] 156. 根据项目155所述的抗hCTLA4抗体,其中半胱氨酸的接触对位于HC和LC内的位置对中,所述位置选自以下组成的组:
- [0316] (a) HC的位置126处和LC中的位置121处的氨基酸;
- [0317] (b) HC中的位置170处和LC中的位置162处的氨基酸;
- [0318] (c) HC中的位置170处和LC中的位置176处的氨基酸;
- [0319] (d) HC中的位置173处和LC中的位置160处的氨基酸;和
- [0320] (e) HC中的位置183处和LC中的位置176处的氨基酸。
- [0321] 157. 根据项目155或项目156所述的抗hCTLA4抗体,其中,
- [0322] 如果所述第二配偶体引导改变在所述HC中,则所述LC包括第三配偶体引导改变,所述第三配偶体引导改变是在与第二配偶体引导改变的氨基酸接触的氨基酸处的半胱氨酸取代,或者
- [0323] 如果所述第二配偶体引导改变在所述LC中,则所述HC包括第三配偶体引导改变,所述第三配偶体引导改变是在与第二配偶体引导改变的氨基酸接触的氨基酸处的半胱氨酸取代。
- [0324] 158. 根据项目151、152和154中任一项的抗hCTLA4抗体,
- [0325] 其中所述抗hCTLA4抗体是IgG4抗体,
- [0326] 其中所述抗hCTLA4抗体的所述HC或LC在HC或LC中氨基酸处包含第二配偶体引导改变,

[0327] 其中所述第二配偶体引导改变是半胱氨酸取代其他氨基酸的取代,和

[0328] 其中,(1)如果所述第二配偶体引导改变在所述LC中,则所述第二配偶体引导改变的取代的半胱氨酸与所述HC中的半胱氨酸接触,或者(2)如果所述第二配偶体引导改变在所述HC中,则所述第二配偶体引导改变的取代的半胱氨酸与所述LC中的半胱氨酸接触。

[0329] 159.根据项目158所述的抗hCTLA4抗体,其中半胱氨酸的所述接触对位于所述HC和LC内的位置对中,所述位置选自以下组成的组:

[0330] (a)HC中位置170和LC中位置162处的氨基酸;

[0331] (b)HC中位置173和LC中位置162处的氨基酸;和

[0332] (c)HC中位置183和LC中位置176处的氨基酸。

[0333] 160.根据项目159所述的抗hCTLA4抗体,其中,

[0334] 如果所述第二配偶体引导改变在所述HC中,则所述LC包括第三配偶体引导改变,所述第三配偶体引导改变是在与第二配偶体引导改变的氨基酸接触的氨基酸处的半胱氨酸取代,或者

[0335] 如果所述第二配偶体引导改变在所述LC中,则所述HC包括第三配偶体引导改变,所述第三配偶体引导改变是在与第二配偶体引导改变的氨基酸接触的氨基酸处的半胱氨酸取代。

[0336] 161.根据项目151至160中任一项所述的抗hCTLA4抗体,其包含改变D399K/R和K409D/E.

[0337] 162.根据项目151至161中任一项所述的抗hCTLA4抗体,其中所述抗体的Fc部分包含一种或多种增加体内抗体清除的改变。

[0338] 163.根据项目162所述的抗hCTLA4抗体,其中抗体的Fc部分包含以下改变中的至少一种:M252A、M252L、M252S、M252R、R255K或H435R。

[0339] 164.一种包含VH的抗hPD1抗体,所述VH包含VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,所述VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3分别包含SEQ ID NO:88、89和90,SEQ ID NO:98、89和99,SEQ ID NO:105、89和90,SEQ ID NO:105、111和112,SEQ ID NO:105、111和90,SEQ ID NO:88、89和112,SEQ ID NO:88、89和127,SEQ ID NO:88、89和134,SEQ ID NO:98、89和90,SEQ ID NO:98、111和112,SEQ ID NO:149、150和112,SEQ ID NO:105、111和90,SEQ ID NO:149、89和127,或SEQ ID NO:105、89和127。

[0340] 165.根据项目164所述的抗hPD1抗体,其中所述VH包含SEQ ID NO:180的氨基酸序列。

[0341] 166.根据项目165所述的抗hPD1抗体,其中所述VH包含SEQ ID NO:181的氨基酸序列。

[0342] 167.根据项目166所述的抗hPD1抗体,其中所述VH包含选自由SEQ ID NO:87、97、104、110、117、122、126、133、139、144、148、154、158、162和166的氨基酸序列组成的组。

[0343] 168.一种包含VL的抗hPD1抗体,所述VL包含VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3,所述VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:93、94和95,SEQ ID NO:102、94和95,SEQ ID NO:93、108和95,SEQ ID NO:115、94和95,SEQ ID NO:120、94和95,SEQ ID NO:102、108和95,SEQ ID NO:130、108和131,SEQ ID NO:137、94和131,SEQ ID NO:142、94和131,或SEQ ID NO:130、94和131的氨基酸序列。

[0344] 169. 根据项目168所述的抗hPD1抗体,其中所述VL包含SEQ ID NO:182的氨基酸序列。

[0345] 170. 根据项目169所述的抗hPD1抗体,其中所述VL包含SEQ ID NO:183的氨基酸序列。

[0346] 171. 根据项目170所述的抗hPD1抗体,其中所述VL包含选自由SEQ ID NO:92、101、107、114、119、124、129、136、141、146、152、156、160、164和168的氨基酸序列组成的组。

[0347] 172. 根据项目164-167中任一项所述的抗hPD1抗体,其进一步包含VL,所述VL包含VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3,所述VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含SEQ ID NO:93、94和95,SEQ ID NO:102、94和95,SEQ ID NO:93、108和95,SEQ ID NO:115、94和95,SEQ ID NO:120、94和95,SEQ ID NO:102、108和95,SEQ ID NO:130、108和131,SEQ ID NO:137、94和131,SEQ ID NO:142、94和131,或SEQ ID NO:130、94和131的氨基酸序列。

[0348] 173. 根据项目172所述的抗hPD1抗体,其包含VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3,所述VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3分别包含以下氨基酸序列:

[0349] (a) SEQ ID NO:88、89、90、93、94和95;

[0350] (b) SEQ ID NO:98、89、99、102、94和95;

[0351] (c) SEQ ID NO:105、89、90、93、108和95;

[0352] (d) SEQ ID NO:105、111、112、115、94和95;

[0353] (e) SEQ ID NO:105、111、90、120、94和95;

[0354] (f) SEQ ID NO:88、89、112、102、108和95;

[0355] (g) SEQ ID NO:88、89、127、130、108和131;

[0356] (h) SEQ ID NO:88、89、134、137、94和131;

[0357] (i) SEQ ID NO:98、89、90、142、94和131;

[0358] (j) SEQ ID NO:98 111、112、130、94和131;

[0359] (k) SEQ ID NO:149、150、112、130、94和131;

[0360] (l) SEQ ID NO:105、111、90、142、94和131;

[0361] (m) SEQ ID NO:149、89、127、115、94和95;

[0362] (n) SEQ ID NO:88、89、112、93、94和95;或者

[0363] (o) SEQ ID NO:105、89、127、102、108和95。

[0364] 174. 根据项目172或173所述的抗hPD1抗体,其中所述VL包含SEQ ID NO:182的氨基酸序列。

[0365] 175. 根据项目174所述的抗hPD1抗体,其中所述VL包含SEQ ID NO:183的氨基酸序列。

[0366] 176. 根据项目175所述的抗hPD1抗体,其中所述VL包含选自由SEQ ID NO:92、101、107、114、119、124、129、136、141、146、152、156、160、164和168的氨基酸序列组成的组。

[0367] 177. 根据项目174所述的抗hPD1抗体,其中VH和VL分别包含选自以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:87和92;SEQ ID NO:97和101;SEQ ID NO:104和107;SEQ ID NO:110和114;SEQ ID NO:117和119;SEQ ID NO:122和124;SEQ ID NO:126和129;SEQ ID NO:133和136;SEQ ID NO:139和141;SEQ ID NO:144和146;SEQ ID NO:148和152;SEQ ID NO:154和156;SEQ ID NO:158和160;SEQ ID NO:162和164;和SEQ ID NO:166和168。

- [0368] 178. 根据项目164-177中任一项所述的抗hPD1抗体,其是人、人源化或灵长类IgG抗体。
- [0369] 179. 根据项目178所述的抗hPD1抗体,其是IgG4抗体或包含K409R改变的IgG1抗体。
- [0370] 180. 根据项目178所述的抗hPD1抗体,其是IgG1抗体。
- [0371] 181. 根据项目178至180中任一项所述的抗hPD1抗体,
- [0372] 其中所述HC和/或LC在选自由HC中的位置44、105、147、168和181以及LC中的位置43、100、131、174和178组成的组的一个或多个位点含有至少一个配偶体引导改变,
- [0373] 其中所述配偶体引导改变是带电荷的氨基酸取代其他氨基酸的取代,
- [0374] 其中所述配偶体引导改变的取代的带电荷氨基酸形成抗体内电荷对的一部分,并且
- [0375] 其中形成所述电荷对的氨基酸的所述接触对选自以下组成的组:
- [0376] (a) 44R/K (HC) 和100D/E (LC) 或44D/E (HC) 和100R/K (LC) ;
- [0377] (b) 105R/K (HC) 和43D/E (LC) 或105D/E (HC) 和43R/K (LC) ;
- [0378] (c) 147R/K (HC) 和131D/E (LC) 或147D/E (HC) 和131R/K (LC) ;
- [0379] (d) 168R/K (HC) 和174D/E (LC) 或168D/E (HC) 和174R/K (LC) ;和
- [0380] (e) 181R/K (HC) 和178D/E (LC) 或181D/E (HC) 和178R/K (LC) 。
- [0381] 182. 根据项目178、179或181所述的抗hPD1抗体,
- [0382] 其中所述抗hPD1抗体是IgG1抗体,
- [0383] 其中所述抗hCTLA4抗体的所述HC或LC在所述HC或LC的氨基酸上含有第二配偶体引导改变,
- [0384] 其中所述第二配偶体引导改变是半胱氨酸取代其他氨基酸的取代,并且
- [0385] 其中, (1) 如果所述第二配偶体引导改变在所述LC中,则所述第二配偶体引导改变的取代的半胱氨酸与所述HC中的半胱氨酸接触,或者 (2) 如果所述第二配偶体引导改变在所述HC中,则所述第二配偶体引导改变的取代的半胱氨酸与所述LC中的半胱氨酸接触。
- [0386] 183. 根据项目182所述的抗hPD1抗体,其中所述半胱氨酸接触对位于所述HC和LC内的位置对中,所述位置选自以下组成的组:
- [0387] (a) HC的位置126的氨基酸和LC中的位置121的氨基酸;
- [0388] (b) HC中的位置170的氨基酸和LC中位置162的氨基酸;
- [0389] (c) HC中的位置170的氨基酸和LC中的位置176的氨基酸;
- [0390] (d) HC中的位置173的氨基酸和LC中的位置160的氨基酸;和
- [0391] (e) HC中的位置183和LC中的位置176的氨基酸。
- [0392] 184. 根据项目182或项目183所述的抗hPD1抗体,其中
- [0393] 如果第二配偶体引导改变在所述HC中,则所述LC包括第三配偶体引导改变,所述第三配偶体引导改变是在与所述第二配偶体引导改变的氨基酸接触的氨基酸处的半胱氨酸取代,或者
- [0394] 如果第二配偶体引导改变在所述LC中,则所述HC包括第三配偶体引导改变,所述第三配偶体引导改变是在与所述第二配偶体引导改变的氨基酸接触的氨基酸处的半胱氨酸取代。

- [0395] 185. 根据项目178、179和181中任一项所述的抗hPD1抗体，
- [0396] 其中所述抗hPD1抗体是IgG4抗体，
- [0397] 其中所述抗hPD1抗体的所述HC或LC在所述HC或LC的氨基酸上含有第二配偶体引导改变，
- [0398] 其中所述第二配偶体引导改变是所述半胱氨酸取代其他氨基酸的取代，
- [0399] 其中，如果所述第二配偶体引导改变在所述LC中，则所述第二配偶体引导改变的取代的半胱氨酸与所述HC中的半胱氨酸接触，或者(2) 如果所述第二配偶体引导改变在所述HC中，则所述第二配偶体引导改变的取代的半胱氨酸与所述LC中的半胱氨酸接触。
- [0400] 186. 根据项目185所述的抗hPD1抗体，其中所述半胱氨酸接触对位于所述HC和LC内的位置对中，所述位置选自：
- [0401] (a) HC中位置170和LC中位置162的氨基酸；
- [0402] (b) HC中位置173和LC中位置162的氨基酸；和
- [0403] (c) HC中位置183位和LC中位置176的氨基酸。
- [0404] 187. 根据项目186所述的抗hPD1抗体，其中
- [0405] 如果第二配偶体引导改变在所述HC中，则所述LC包括第三配偶体引导改变，所述第三配偶体引导改变是在与所述第二配偶体引导改变的氨基酸接触的氨基酸处的半胱氨酸取代，或者
- [0406] 如果第二配偶体引导改变在所述LC中，则所述HC包括第三配偶体引导改变，所述第三配偶体引导改变是在与所述第二配偶体引导改变的氨基酸接触的氨基酸处的半胱氨酸取代。
- [0407] 188. 根据项目178至187中任一项所述的抗hPD1抗体，其包含D399K/R和K409D/E的改变。
- [0408] 189. 一种包含根据项目137至163中任一项所述的抗hCTLA4抗体和根据项164至188中任一项的抗hPD1抗体的抗体混合物。
- [0409] 190. 根据项目189所述的抗体混合物，其包含根据项目151所述的抗hCTLA4抗体和根据项目178所述的抗hPD1抗体。
- [0410] 191. 根据项目190所述的抗体混合物，其中所述抗hCTLA4抗体的Fc部分包含一种或多种增加体内抗hCTLA4抗体清除的改变。
- [0411] 192. 根据项目191所述的抗体混合物，其中所述抗hCTLA4抗体的Fc部分包含以下改变中的至少一种：M252A、M252L、M252S、M252R、R255K或H435R。
- [0412] 193. 根据项目189至192中任一项所述的抗体混合物，其中所述混合物在单一宿主细胞系中产生。
- [0413] 194. 根据项目193所述的抗体混合物，其包含不超过三种主要种类的抗体。
- [0414] 195. 根据项目190至194中任一项所述的抗体混合物，
- [0415] 其中所述抗hCTLA4抗体和所述抗hPD1抗体之一或两者的所述HC和/或所述LC在选自所述HC中的位置44、105、147、168和181以及所述LC中的位置43、100、131、174和178组成的组中的一个或多个位点处包含至少一个配偶体引导改变，
- [0416] 其中所述配偶体引导改变是带电氨基酸取代任何其他氨基酸的取代，
- [0417] 其中所述配偶体引导改变的取代的带电荷氨基酸形成同源HC/LC对中的一个或两

个内的氨基酸电荷对的一部分,并且

[0418] 其中形成所述电荷对的所述接触氨基酸对选自以下组成的组:

[0419] (a) 44R/K (HC) 和100D/E (LC) 或44D/E (HC) 和100R/K (LC);

[0420] (b) 105R/K (HC) 和43D/E (LC) 或105D/E (HC) 和43R/K (LC);

[0421] (c) 147R/K (HC) 和131D/E (LC) 或147D/E (HC) 和131R/K (LC);

[0422] (d) 168R/K (HC) 和174D/E (LC) 或168D/E (HC) 和174R/K (LC);和

[0423] (e) 181R/K (HC) 和178D/E (LC) 或181D/E (HC) 和178R/K (LC)。

[0424] 196. 根据项目190至195中任一项所述的抗体混合物,

[0425] 其中所述抗hCTLA4抗体和所述抗hPD1抗体之一或两者的所述重链和/或轻链含有所述HC或LC中的第二配偶体引导改变,

[0426] 其中发生所述第二配偶体引导改变的抗体是IgG1抗体,

[0427] 其中所述第二配偶体引导改变是半胱氨酸取代其他氨基酸的取代,和

[0428] 其中, (1) 如果所述第二配偶体引导改变在所述LC中,则所述第二配偶体引导改变的取代的半胱氨酸与所述HC中的半胱氨酸接触,或者 (2) 如果所述第二配偶体引导改变在所述HC中,则所述第二配偶体引导改变的取代的半胱氨酸与所述LC中的半胱氨酸接触。

[0429] 197. 根据项目196所述的抗体混合物,其中半胱氨酸的所述接触对位于选自以下组成的组中的一种或两种抗体的同源HC/LC对内的位置对:

[0430] (a) HC的位置126的氨基酸和LC中的位置121的氨基酸;

[0431] (b) HC中的位置170的氨基酸和LC中位置162的氨基酸;

[0432] (c) HC中的位置170的氨基酸和LC中的位置176的氨基酸;

[0433] (d) HC中的位置173的氨基酸和LC中的位置160的氨基酸;和

[0434] (e) HC中的位置183和LC中的位置176的氨基酸。

[0435] 198. 根据项目196或项目197的抗体混合物,其中

[0436] 如果第二配偶体引导改变在所述HC中,则所述LC包括第三配偶体引导改变,所述第三配偶体引导改变是在与所述第二配偶体引导改变的氨基酸接触的氨基酸处的半胱氨酸取代,或者

[0437] 如果第二配偶体引导改变在所述LC中,则所述HC包括第三配偶体引导改变,所述第三配偶体引导改变是在与所述第二配偶体引导改变的氨基酸接触的氨基酸处的半胱氨酸取代。

[0438] 199. 根据项目190至195中任一项所述的抗体混合物,

[0439] 其中所述抗hCTLA4抗体和/或所述抗hPD1抗体的所述重链和/或轻链含有所述HC或LC中的第四配偶体引导改变,

[0440] 其中所述第四配偶体引导改变发生的抗体是IgG4抗体,

[0441] 其中所述第四配偶体引导改变是半胱氨酸取代其他氨基酸的取代,并且

[0442] 其中, (1) 如果所述第四配偶体引导改变在一种或两种抗体的LC中,则所述第四配偶体引导改变的取代的半胱氨酸与所述同源HC中的半胱氨酸接触,或者 (2) 如果所述第四配偶体引导改变在一种或两种抗体的HC中,则所述第四配偶体引导改变的取代的半胱氨酸与所述同源LC中的半胱氨酸接触。

[0443] 200. 根据项目199所述的抗体混合物,其中半胱氨酸的接触对位于选自下组的同

源HC/LC对内的位置对：

[0444] (a)HC中位置170和LC中位置162的氨基酸；

[0445] (b)HC中位置173和LC中位置162的氨基酸；和

[0446] (c)HC中位置183位和LC中位置176的氨基酸。

[0447] 201.根据项目200所述的抗体混合物，其中

[0448] 如果第四配偶体引导改变位于一个或两个抗体的HC中，则同源LC包含第五配偶体引导改变，所述第五配偶体引导改变为在与所述第四配偶体引导改变的氨基酸接触的氨基酸处的半胱氨酸取代；或

[0449] 如果第四配偶体引导改变位于一个或两个抗体的LC中，则同源HC包含第五配偶体引导改变，所述第五配偶体引导改变为在与所述第四配偶体引导改变的氨基酸接触的氨基酸处的半胱氨酸取代。

[0450] 202.根据项目189至201中任一项所述的抗体混合物，其中所述混合物包含不超过两种主要种类的抗体。

[0451] 203.根据项目202所述的抗体混合物，其中(1)所述抗hPD1抗体是IgG4抗体或包含K409R改变的IgG1抗体并且(2)所述抗hCTLA4抗体是包含D399K/R和K409D/E改变的IgG1抗体。

[0452] 204.一种编码根据项目137至163中任一项所述的抗hCTLA4抗体、根据项目164至188中任一项所述的抗hPD1抗体或根据项目189至203中任一项所述的抗体混合物的一种或多种多核苷酸。

[0453] 205.根据项目204所述的多核苷酸，其编码根据项目189至203中任一项所述的抗体混合物。

[0454] 206.一种或多种载体，其包含根据项目204或项目205所述的多核苷酸。

[0455] 207.根据项目206所述的载体，其是病毒载体。

[0456] 208.根据项目207所述的载体，其是溶瘤病毒载体。

[0457] 209.根据项目207或项目208所述的载体，其是逆转录病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体、痘苗病毒载体、改良型痘苗病毒安卡拉(MVA)载体、疱疹病毒载体、慢病毒载体、麻疹病毒载体、柯萨奇病毒载体、新城疫病毒载体、呼肠孤病毒或痘病毒载体。

[0458] 210.一种包含根据项目137-163中任一项所述的抗hCTLA4抗体、根据项目164-188中任一项所述的抗hPD1抗体、根据项目189-203中任一项所述的抗体混合物，根据项目204或项目205的多核苷酸、或根据项目206至209中任一项所述的载体的药物组合物。

[0459] 211.一种宿主细胞，其中引入了根据项目204或项目205所述的多核苷酸或根据项目206或项目207所述的载体。

[0460] 212.根据项目211所述的宿主细胞，其是哺乳动物细胞。

[0461] 213.根据项目212所述的宿主细胞，其是CHO细胞或小鼠骨髓瘤细胞。

[0462] 214.一种制备抗体或抗体混合物的方法，包括培养根据项目211至213中任一项所述的宿主细胞，并从所述培养基或所述细胞团中回收所述抗体或抗体混合物。

[0463] 215.一种治疗患有实体瘤或恶性血液病的患者的方法，包括施用根据项目137至163中任一项所述的抗hCTLA4抗体、根据项目164至188中任一项所述的抗hPD1抗体、根据项目189至203中任一项所述的混合物、根据项目204或项目205所述的多核苷酸、根据项目206

至209中任一项所述的载体或根据项目210所述的药物组合物。

[0464] 216. 根据项目215所述的方法, 包括施用根据项目146所述的抗hCTLA4抗体、根据项目173所述的抗hPD1抗体或根据项目189所述的抗体混合物。

[0465] 217. 根据项目215或项目216所述的方法, 其中所述患者患有黑素瘤、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、胃癌、膀胱癌、透明细胞肾癌、霍奇金淋巴瘤或头颈部鳞状细胞癌。

[0466] 218. 根据项目216至217中任一项所述的方法, 其进一步包括在施用所述抗hCTLA4抗体、抗hPD1抗体、抗体混合物、多核苷酸之前、之后和/或同时施用其他治疗剂, 其中所述其他治疗剂选自由免疫调节分子、放射治疗剂、化学治疗剂、靶向生物制剂、靶向抑制剂和/或溶瘤病毒组成的组。

[0467] 219. 根据项目218所述的方法, 其中所述其他治疗剂是放射疗法或化学治疗剂。

[0468] 220. 根据项目218的方法, 其中所述其他治疗剂是PDL1、TIGIT、CCR4、CCR8、CSFR1a、B7H3、B7H4、CD96或CD73的拮抗剂; GITR、41BB、OX40或CD40的激动剂; 溶瘤病毒, 如 talimogene laherparepvec (IMLYGIC™); 双特异性T细胞衔接器 (BiTE), 如博纳吐单抗; 吲哚胺2,3双加氧酶 (IDO) 抑制剂; 抗血管生成剂, 如贝伐单抗; 抗体-药物偶联物; 和酪氨酸激酶抑制剂。

[0469] 221. 一种诱导或增强患者免疫应答的方法, 包括给患者施用根据项目137-163中任一项所述的抗hCTLA4抗体、根据项目164-188中任一项所述的抗hPD1抗体, 根据项目189至203中任一项所述的混合物、根据项目204或项目205所述的多核苷酸、根据项目206至209中任一项所述的载体或根据项目210所述的药物组合物。

[0470] 222. 根据项目221所述的方法, 包括施用项目189至203中任一项所述的抗体混合物或包含根据项目206所述的多核苷酸的载体。

[0471] 223. 根据项目221或项目222所述的方法, 其中所述患者患有黑素瘤、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、胃癌、膀胱癌、透明细胞肾癌、霍奇金淋巴瘤或头颈部鳞状细胞癌。

[0472] 224. 根据项目221至223中任一项所述的方法, 其进一步包括在施用所述抗体、抗体混合物、多核苷酸、载体或药物组合物之前、之后和/或同时施用其他治疗剂, 其中所述其他治疗剂选自由免疫调节分子、放射治疗剂、化学治疗剂、靶向生物制剂、靶向抑制剂和/或溶瘤病毒组成的组。

[0473] 225. 根据项目224所述的方法, 其中所述其他治疗剂是放射治疗剂或化学治疗剂。

[0474] 226. 根据项目224所述的方法, 其中所述其他治疗剂是PDL1、TIGIT、CCR4、CCR8、CSFR1a、B7H3、B7H4、CD96或CD73的拮抗剂; GITR、41BB、OX40或CD40的激动剂; 溶瘤病毒, 如 talimogene laherparepvec (IMLYGIC™); 双特异性T细胞衔接器 (BiTE), 如博纳吐单抗; 吲哚胺2,3双加氧酶 (IDO) 抑制剂; 抗血管生成剂, 如贝伐单抗; 抗体-药物偶联物; 和酪氨酸激酶抑制剂。

[0475] 227. 一种治疗患有感染的患者的方法, 包括给患者施用根据项目137至163中任一项所述的抗hCTLA4抗体, 根据项目164至188中任一项所述的抗hPD1抗体, 或根据项目189至203中任一项所述的混合物。

[0476] 228. 根据项目227所述的方法, 包括施用根据项目146所述的抗hCTLA4抗体、根据项目173所述的抗hPD1抗体或根据项目193所述的混合物。

附图说明

[0477] 图1:抗hCTLA4抗体VH CDR的氨基酸序列。氨基酸用其一个字母标识来确认。最左边的列说明了本文提到的每种抗体的名称。如所示,每种抗体的VH的CDR显示在名称右侧的同一行中。与抗体1E1的CDR中的相同位点处的氨基酸不同的氨基酸以粗体斜体显示。在十二个抗体的CDR下,对于每个CDR的普通粗体类型的共有序列。在共有序列中可能不同的位点,可以在该位点发生的替代氨基酸如下所示,最常见的氨基酸(或两种同样常见的氨基酸中的一种,比其他所有氨基酸更常见)显示于替代氨基酸上的CDR全序列。

[0478] 图2:抗hCTLA4抗体VL CDR的氨基酸序列。抗体名称、CDR序列、变化的氨基酸和共有CDR序列同图1所说明。

[0479] 图3:抗hCTLA4 VH的氨基酸序列。每个抗体的名称显示在每行序列的左侧。显示了12种CTLA4抗体的VH的成熟氨基酸序列。CDR用下划线标出。根据Kabat等,SEQUENCE OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST,第五版,美国卫生和人类服务,公共卫生服务部,美国国立卫生研究院,NIH出版物编号91-3242,1991的编号,如上所示以20个氨基酸间隔的序列。该编号在所有情况下都不对应于实际的氨基酸数,因为插入的氨基酸(由#表示)在该编号系统中不计数,发生在整个序列的许多位点。十二种序列之间不同的氨基酸以粗体显示。应用于人VH的该编号系统的图示显示在国际申请PCT/US2017/030676的表5中,其通过引用并入本文,并且在下表2中。

[0480] 图4:抗hCTLA4 VL的氨基酸序列。CDR和不同的氨基酸如图3所说明,使用Kabat等的编号系统,如上所述。应用于VL的该编号系统的图示显示在国际申请号PCT/US2017/030676的表9中,其通过引用并入本文,并且在下表6中。这些序列中没有插入的氨基酸。

[0481] 图5:抗hPD1抗体VH CDR的氨基酸序列。抗体名称、CDR序列、变化的氨基酸和共有序列同图1所说明。

[0482] 图6:抗hPD1抗体VL CDR的氨基酸序列。抗体名称、CDR序列、变化的氨基酸和共有序列同图1所示。

[0483] 图7:抗hPD1 VH的氨基酸序列。每个抗体的名称(数字)显示在每行序列的左侧。所有其他指示同图3所说明。

[0484] 图8:抗hPD1 VL的氨基酸序列。所有指示均同图7所说明。

[0485] 图9:细胞分选以选择抗hCTLA4 Fab片段。步骤在实施例1中详细描述。x轴表示在展示的Fab片段的CH1结构域(CH1)和细胞壁蛋白凝集素之间用HA标签特异性的标记抗体检测到的酵母细胞上展示的Fab片段的表达水平。y轴表示标记的阴性对照蛋白(标记的PD1-Fc融合蛋白)与上图中的细胞的结合量或标记的hCTLA4:Fc融合蛋白与下两图中的细胞的结合量。标有“PS”的多边形表示分选窗口。下方两图显示选择过程中第一(左侧)和第二(右侧)分选的数据。

[0486] 图10:细胞分选以选择抗hPD1 Fab片段。步骤在实施例2中详细描述。说明如图9所示。如所示,右上图,左下图和右下图分别包含来自第一轮、第二轮和第三轮分选的数据,其中用标记的hPD1蛋白检测抗hPD1抗体。左上图包含使用阴性对照蛋白(生物素化的人PDL1蛋白)进行分选的数据用于检测。

[0487] 图11:hCTLA4和hB7-1/hB7-2之间相互作用的抗体抑制。使用工程化改造的Jurkat T细胞测定hCTLA4和hB7-1/hB7-2的抑制的步骤描述于实施例4中,并且来自测定的数值结

果报告于表12中。标识样本的符号的含义在每图的左上角的图例中指示。10D1抗体是阳性对照抗CTLA4抗体。x轴表示所用抗hCTLA4抗体的浓度(nM),y轴表示相对发光单位(RLU)的平均值加上或减去平均值的标准误差(\pm SEM)。

[0488] 图12:葡萄球菌肠毒素B(SEB)T细胞活化测定中抗hCTLA4抗体的效力。步骤在实施例5中描述。样本的标识在图表左上角的图例中说明。抗体10D1是阳性对照抗CTLA4抗体。x轴表示测定中使用的抗体的浓度(nM),y轴表示样品中检测到的白细胞介素-2(IL-2)(pg/ml)的水平。

[0489] 图13:抗hPD1抗体对hPD1/hPDL1相互作用的抑制。步骤在实施例7中描述。抗体样品的标识在每个小组的左上角的图例中指示。x轴表示每个样品中使用的抗体浓度(nM)。y轴表示平均RLU \pm SEM。Nivo G4是阳性对照抗hPD1抗体。

[0490] 图14:抗hPD1抗体对PD1/PDL1相互作用的抑制。步骤,即ALPHALISA测定,描述于实施例7中。抗体样品的标识在图的右上角的图例中指示。x轴表示测定中使用的抗体浓度(nM)。y轴表示相对荧光单位(RFU) \pm SEM。Nivo-G4和Pembro-G4是阳性对照IgG4抗hPD1抗体。

[0491] 图15:抗hPD1抗体在混合淋巴细胞反应(MLR)测定中的活性。步骤在实施例8中描述。所有组中抗体样品的标识在顶部示意图的左上角的图例中指示。在所有图中,x轴表示每个样品中测试抗体的浓度。在上图中,y轴表示样品中检测到的干扰素 γ (IFN γ)的浓度。中间和底部面板中的y轴表示用5-乙炔基-2'-去甲尿苷(EdU)染色的CD4⁺(中图)或CD8⁺(下图)T细胞,其反映培养物中增殖细胞的百分比。

[0492] 图16:巨细胞病毒(CMV)回忆应答测定中抗hPD1抗体的活性。步骤在实施例9中描述。抗体样品的标识在图的左上角的图例中指示。x轴表示每个样品中测试抗体的浓度(pM)。y轴表示样品中检测到的干扰素 γ (IFN γ)的浓度。

[0493] 图17:用于评估HC/LC配对的脱链瞬时转染。实验在实施例11中描述。每组五个样品来自使用编码第一重链(HC1)和第一轻链(LC1)的DNA的各种组合的转染,其共同编码第一抗体(抗hPD1#1)和第二重链(HC2)和第二轻链(LC2),它们一起编码第二抗体(抗hCTLA410D4或11F4)。转染中使用的DNA组合编码以下链:泳道1和6,HC1,LC1,HC2和LC2;泳道2和7,HC1和LC1;泳道3和8,HC1和LC2;泳道4和9,HC2和LC2;和泳道5和10,HC2和LC1。使用的第一种和第二种抗体是改变的抗hPD1#1和改变的抗hCTLA4 10D4(左图)或改变的抗hCTLA4 11F4(右图)。

[0494] 图18:抗体的质谱分析。步骤在实施例11中描述。x轴显示解卷积质量,y轴显示计数,其反映给定质量的蛋白质量。图A和B显示来自如实施例11中所述的在单一宿主细胞系中制备的改变的抗PD1#1和改变的抗CTLA4 10D4抗体的混合物的数据。

[0495] 图19:抗体的质谱分析。步骤在实施例11中描述。x轴显示解卷积质量,y轴显示计数,其反映给定质量的蛋白质量。图A和B显示来自如实施例11中所述的在单一宿主细胞系中制备的改变的抗PD1#1和改变的抗CTLA4 11F4抗体的混合物的数据。

[0496] 图20:单独和在抗体混合物中改变和未改变的抗hCTLA4抗体的效力。步骤在实施例12中描述。x轴显示每个测定中使用的抗体浓度,y轴显示RLU \pm SEM。符号和线表示的抗体样品如下:实线连接的实心方块,抗hCTLA4抗体10D1,阳性对照,在上图和下图中;实线连接的空心菱形,抗hCTLA4抗体10D4(上图)或11F4(下图);实线连接的空心向下三角形,均如实

实施例11中所述进行改变的抗hCTLA4抗体10D4(上图)或11F4(下图);虚线连接的空心向上三角形,改变的抗PD1抗体#1和改变的抗hCTLA4抗体10D4(上图)或改变的抗hCTLA4抗体11F4(下图)的混合物,其中混合物是如实施例11中所述在单细胞系中制备;以及在每图的右下角具有误差条(近似正方形)的实心圆,为阴性对照获得的值,其是不相关的人IgG1抗体。

[0497] 图21:单独和在抗体混合物中改变的和未改变的抗hPD1抗体的效力。程步骤在实施例12中描述。x轴显示每个测定中使用的抗体浓度,y轴显示RLU \pm SEM。符号和线表示的抗体样品如下:实线连接的实心方块,具有nivolumab的VH和VL的抗hPD1抗体,阳性对照(上图和下图);实线连接的实心菱形,抗hPD1抗体#1没有改变(上图和下图);实线连接的未填充的向下三角形,如实施例11中所述改变的抗hPD1抗体#1(上图和下图);虚线连接的空心向上三角形,改变的抗hPD1抗体#1和改变的抗hCTLA4抗体10D4(下图)或改变的抗hCTLA4抗体11F4(上图)的混合物,其中混合物是如实施例11中所述在单细胞系中制备;实线连接的实心圆,无关的人IgG4抗体,阴性对照(上图和下图)。

[0498] 图22:抗hPD1,抗hCTLA4抗体或其组合对IL-2表达的诱导。步骤在实施例13中描述。添加到各种样品中的抗体示于各图A和B的左上角的图例中。名称“抗PD1(#1)”表示抗hPD1抗体1,并且名称“抗CTLA4(#10D4)”和“抗CTLA4(#11F4)”分别表示抗hCTLA4抗体10D4和11F4。如图所示,x轴显示样品中葡萄球菌肠毒素(Staphylococcal Enterotoxin)B(SEB)的浓度,单位为毫微克/毫升(ng/mL),y轴表示在样品的细胞上清液中检测到的IL-2的浓度(皮克/毫升(pg/mL))。

[0499] 参考序列表

[0500] 该申请包括以电子方式提交的序列表,该文件名称为SB002W0_ST25.txt,于2017年9月20日创建并具有185千字节(KB)的大小,其通过引用并入本文。

具体实施方式

[0501] 本文描述了与人CTLA4(hCTLA4)结合的抗体,与人PD1(hPD1)结合的抗体,这些抗体的混合物,编码这些抗体和混合物的多核苷酸,含有这些多核苷酸的宿主细胞,以及用这些抗体、混合物和多核苷酸治疗的方法。本文进一步描述了利用单一宿主细胞系制备这些抗hCTLA4抗体和抗hPD1抗体的混合物以制备所述混合物的方法。本文所述的抗hCTLA4抗体可以结合人和食蟹猴CTLA4,可以抑制hCTLA4配体hB7-1和/或hB7-2与hCTLA4的结合,并且可以增强一种或多种细胞因子(例如IL-2)的由T细胞的分泌。本文所述的抗hPD1抗体可以抑制hPDL1和/或hPDL2与hPD1的结合,可以与人和食蟹猴PD1结合,并且可以在对同种异体抗原的初级应答中和/或在对巨细胞病毒(CMV)的回忆反应中增强T细胞的增殖和细胞因子分泌。与任一个单独的抗体相比,抗hCTLA4和抗hPD1抗体的混合物对T细胞活化的影响更大。

[0502] 定义

[0503] 本文所指的“激动剂”是模拟或增强特定生物活性分子的活性的分子。例如,在细胞表面表达的蛋白质由于与结合其上的细胞因子的相互作用,可能介导已知的下游效应。当激动剂与蛋白质相互作用时,蛋白质的激动剂可引起相似或甚至更大的下游效应,尽管它可能会或可能不会阻断或抑制细胞因子与蛋白质的结合。

[0504] 本文所指的“改变”是氨基酸序列的改变。改变可以是插入、删除或取代。“改变”是

单个氨基酸的插入、缺失或取代。例如,如果某缺失从氨基酸序列中移除了三个氨基酸,则发生三个改变(在这种情况下,为缺失)。作为取代的改变可以通过列出原始序列中存在的氨基酸,然后是原始序列中氨基酸的位置,再然后是取代原始氨基酸的氨基酸来说明。例如,G133M意指原始序列中第133位的甘氨酸被甲硫氨酸取代。此外,133M表示第133位的氨基酸是甲硫氨酸,但没有说明原始氨基酸的种类,原始氨基酸可以是任何氨基酸,包括甲硫氨酸。最后,G133表示原始序列中第133位的氨基酸是甘氨酸。

[0505] 如本文所指,“不利于异二聚体的改变”是重链第三恒定区(CH3)氨基酸序列(任选地人或灵长类动物CH3氨基酸序列)内的单个氨基酸的取代、插入或缺失,其中取代、插入或缺失不利于抗体混合物中异二聚体的形成。抗体可以包含一种以上不利于异二聚体的改变,并且不利异二聚体的多种改变可以发生在抗体混合物中的一种或多种抗体的多个位点。在一些情况下,不利于异二聚体的改变单独可能具有很少作用或没有作用,但当一种或多种其他不利于异二聚体形成的改变存在于相同抗体或抗体混合物中的不同抗体中时,可以抑制异二聚体形成。其中改变包括可以用带电荷的残基取代带电荷或不带电荷的野生型序列中存在的残基。或者,取代可以产生空间位阻,其干扰合适的重链/重链(HC/HC)配对,例如邻接另一个“突起”的“突起”或邻接另一个“孔”的“孔”。“突起或隆起以及孔在美国专利8,679,785的第12栏第12行至第13栏第2行中有所描述,其通过引用并入本文。

[0506] 一种或多种改变是否影响HC/HC异二聚体形成,可以通过向宿主细胞中引入编码两种不同的在二聚化时形成可区分大小的二聚体的Fc片段的DNA来确定。例如,其中之一是全长IgG HC,其包括Fc片段,另一个可以是仅包含Fc片段的片段。产生的同源和异源二聚体的量可以通过Western印迹检测到的这些蛋白质的大小来确定。可以在来自Fc区域包含或不包含改变的细胞的样品中比较这样的量。

[0507] 不利于异二聚体的改变发生在“结构域界面残基上”。结构域界面残基在表1中的美国专利8,592,562和所附文本中讨论,其通过引用并入本文。如果预测它们在物理上接近,即在两个氨基酸的 α 碳($C\alpha$,即氨基酸的氨基和羧基部分之间的碳)之间最多12埃(\AA)或者根据已知的结构模型在一个氨基酸的侧链重原子(除氢原子之外的任何其他原子)和其他氨基酸的任何重原子之间最多3.5埃(\AA),则这种结构域界面残基被称为“接触”残基,或者,被称为彼此“接触”。这种结构可在线获得,例如,通过蛋白质数据库(Protein Data Bank)(可从<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>获得)或通过国际免疫遗传学数据库[®](IMGT;可从<http://www.imgt.org>获得)。在下表1中,列出了人IgG抗体中CH3/CH3界面处接触残基的实例。

[0508] 表1:人IgG CH3/CH3界面处的接触残基

[0509]

在第一CH3*中的接触残基	在第二CH3*中的残基, 其具有的重原子与第一CH3中的接触氨基酸的侧链重原子在4.5Å之内
Q347	K360
Y349	S354, D356, E357, K360
T350	S354, R355
L351	L351, P352, P353, S354, T366
S354	Y349, T350, L351
R355	T350
D356	Y349, K439
E357	Y349, K370
K360	Q347, Y349
S364	L368, K370
T366	L351, Y407
L368	S364, K409
K370	E357, S364
N390	S400
K392	L398, D399, S400, F405
T394	T394, V397, F405, Y407
P395	V397
V397	T393, T394, P395
D399	K392, K409
S400	N390, K392
F405	K392, T394, K409
Y407	T366, T394, Y407, S408, K409
K409	L368, D399, F405, Y407
K439	D356

[0510] *编号是根据Edelman等,(1969),Proc.Natl.Acad.Sci.USA 63:78-85,其全部内容并入本文。

[0511] 不利于异二聚体的改变的实例包括,例如,在包含另一种含409R的IgG抗体的抗体混合物的情况下,灵长类IgG HC中的K/R409D加D399K/R.

[0512] 本文所指的“拮抗剂”是阻断或抑制特定生物活性分子活性的药剂。例如,当特定蛋白质与其结合配偶体相互作用时,它可以激活具有已知下游效应的生物途径。该蛋白质的拮抗剂或抑制剂可以任选地通过阻断或抑制与结合蛋白的相互作用来减轻或消除那些下游效应。

[0513] 如本文所述,“抗体”是至少含有VH或VL的蛋白质。抗体通常含有VH和VL。VH和VL在例如Kabat等,SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST,第五版,USDepartment of Health and Human Services,Public Health Service,National Institutes of Health,NIH Publication No.91-3242,1991,pp.xvi-xix和pp.103-533中有详细描述,其通过引用并入本文。“抗体”包括具有不同形式的分子,例如单链Fv抗体(scFv,其含有通过接头连接的VH和VL)、Fab、F(ab')₂、Fab'、scFv:Fc抗体(如Carayannopoulos和Capra,FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY,第9章,第3版增补版,Paul编著,Raven Press,New York,1993,pp.284-286,其通过引用并入本文),且IgG抗体如以下定义,以及许多其他可能的格式。

[0514] 如本文所述,“抗体-药物缀合物”是通过化学接头与药物或毒素缀合的如上定义的抗体。接头在某些条件下是不稳定的,并且可以起作用以在细胞内环境中从抗体释放药

物或毒素。药物或毒素可以是细胞毒性的并且可以是多种细胞毒素中的一种,包括例如美登木素生物碱、海兔毒素、auristatin药物类似物、cryptophycin、duocarmycin衍生物如CC-1065类似物和duocarmycin、烯二炔类抗生素包括esperamicin和calicheamicin,以及pyrolobenodiazepine。抗体-药物缀合物用作癌症治疗剂。此类治疗剂的实例包括brentuximab vedotin(**Adcetris**[®];Seattle Genetics/Millennium Pharmaceuticals)和ado-trastuzumab emtansine(**Kadcyla**[®];Genentech/Roche)。

[0515] 如本文所用,“带电荷”氨基酸是酸性或碱性氨基酸,其可以在接近生理pH下具有电荷。这些包括在生理pH下带负电荷的酸性氨基酸谷氨酸(E)和天冬氨酸(D),以及在生理pH下带正电荷的碱性氨基酸精氨酸(R)和赖氨酸(K)。可以在接近生理pH下部分带电的弱碱性氨基酸组氨酸不在本文“带电荷”氨基酸的定义范围内。为避免混淆,正电荷被认为与负电荷“相反”,如本文所述。因此,例如,氨基酸残基E和R的电荷相反。

[0516] 本文所指的“电荷对”是一对带相反电荷的“接触”氨基酸,两条不同的多肽链各有一个。因此,电荷对是多聚体蛋白质的不同多肽链上的一对带相反电荷的接触(如本文所定义)氨基酸。

[0517] 体内抗体的“清除”是指抗体的消除,其可以被检测为哺乳动物的血液或其他组织中的抗体消除或减少的量。通常,为了确定清除率,将抗体给予哺乳动物,随后定期采集哺乳动物的血液或组织样品并定量测试抗体的存在。根据这些测试,可以导出体内半衰期($T_{1/2}$)和/或曲线下面积(AUC)值。如本文所述, $T_{1/2}$ 或AUC的降低表明清除率增加。用于确定小鼠中改变的人IgG抗体的清除相对于未改变的抗体是否增加或减少的示例性方法包括以下步骤:可以将未改变和改变的抗体各自皮下注射,例如在肩膀上皮下注射到分开的小鼠中。通过眶后窦穿刺在每个时间点收集约0.1mL的全血样品。可以将血液凝结并加工以获得血清。可以使用对人Fc特异的抗体测定血清样品中人抗体的存在,对人Fc特异的抗体例如商业上销售的免疫测定系统,例如可从Gyros U.S., Inc., Warren, NJ, USA获得的那些。可以例如在注射后0、0.5、2、8、24、72、120、168、240、312、384和480小时收集血液样品。可以使用例如Phoenix.RTM.6.3软件(Pharsight, Sunnyvale, CA, USA)从血清浓度估计药物动力学参数。

[0518] “化学治疗剂”靶向分裂细胞并干扰与细胞分裂相关的过程,例如DNA复制、RNA合成、蛋白质合成、有丝分裂纺锤体的组装、分解或功能,和/或合成或稳定性。在这些过程中起作用的分子例如是核苷酸或氨基酸。因此,化学治疗剂可以杀死癌细胞和其他分裂细胞。化学治疗剂在本领域中是众所周知的。它们包括例如下列试剂:烷化剂(例如白消安、替莫唑胺、环磷酰胺、洛莫司汀(CCNU)、链脲佐菌素、甲基阿莫司汀、顺-二氨二氯铂,硫嘌呤和氮丙啶基苯并醌);无机离子(例如顺铂和卡铂);氮芥(例如,盐酸美法仑、苯丁酸氮芥、异环磷酰胺和二氯甲基二乙胺盐酸盐);亚硝基脲(例如,卡莫司汀(BCNU));抗肿瘤抗生素(例如阿霉素(多柔比星)、道诺霉素、光辉霉素、柔红霉素、伊达比星、丝裂霉素C和博来霉素);植物衍生物(例如长春新碱、长春地辛、长春碱、长春瑞滨、紫杉醇、多西紫杉醇、VP-16和VM-26);抗代谢物(例如有或没有甲酰四氢叶酸的甲氨蝶呤、有或没有甲酰四氢叶酸的5-氟尿嘧啶、5-氟脱氧尿苷、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、吉西他滨、阿糖胞苷、5-氮杂胞苷、羟基脲、脱氧同型霉素和氟达拉滨);鬼臼毒素(例如依托泊苷、伊立替康和拓扑替康);以及放线菌素D、达

卡巴嗪 (DTIC)、mAMSA、丙卡巴肼、六甲基三聚氰胺、五甲基三聚氰胺、L-天冬酰胺酶和米托蒽醌。参见例如Cancer:Principles and Practice of Oncology,第4版增补版,DeVita等编著,J.B.Lippincott Co.,Philadelphia,Pa.(1993),其相关部分通过引用并入本文。

[0519] 其他化学治疗剂包括通过与上面列出的那些相同的通用机制起作用的那些。例如,通过烷基化DNA起作用的试剂被认为是化学治疗剂,例如烷化剂和氮芥。干扰核苷酸合成的试剂被认为是化学治疗剂,例如甲氨蝶呤、阿糖胞苷、6-巯基嘌呤、5-氟尿嘧啶和吉西他滨。有丝分裂纺锤体毒素被认为是化学治疗剂,例如紫杉醇和长春碱。干扰DNA复制的拓扑异构酶抑制剂(例如鬼臼毒素)被认为是化学治疗剂。通过各种机制干扰DNA合成的抗生素被认为是化学治疗剂,例如多柔比星、博来霉素和丝裂霉素。氨基甲酰化氨基酸(例如,洛莫司汀、卡莫司汀)或消耗天冬酰胺库(例如天冬酰胺酶)的药剂也被认为是化学治疗剂。Merck Manual of Diagnosis and Therapy,第17版增补版,第11节,Hematology and Oncology,144.Principles of Cancer Therapy,表144-2(1999)。化学治疗剂中特别包括那些直接影响与上面列出的化学治疗剂影响的相同的细胞过程。

[0520] 如本文所述,抗体混合物中的“关联”HC是与已知特定LC成对以针对特定抗原形成结合位点的HC。例如,如果已知的全长IgG抗体X与抗原X结合,则抗体X的HC是抗体X的LC的关联HC,反之亦然。此外,如果混合物还包含与抗原Y结合的抗体Y,则抗体Y的HC相对于抗体X的LC是“非关联的”,反之亦然,并且抗体Y的LC相对于抗体X的HC是“非关联的”,反之亦然。

[0521] “互补决定区”(CDR)是VH或VL内的高变区。每个VH和VL含有称为CDR1、CDR2和CDR3的三个CDR。CDR在抗体表面上形成环,并且主要负责确定抗体的结合特异性。CDR如下分布在四个更保守的框架区(称为FR1、FR2、FR3和FR4)之间:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。CDR的位置在例如图3和7(对于VH)和图4和8(对于VL)中示出,Kabat等按如下方式定位VH CDR:CDR1位于31-35位(可能的插入编号为35A和35B);CDR2位于50-65位(可能的插入编号为52A-52C);CDR3位于第95-102位(可能的插入编号为100A-10K),参见Kabat等,同上,xvii.Kabat等按如下定位VL CDR:CDR1位于24-34位(可能的插入编号为27A-27F);CDR2位于50-56位;CDR3位于89-97位(可能的插入编号为95A-95F)参见Kabat等,同上,xvii,其通过引用并入本文。

[0522] 如果两种治疗/药物在相同的短时间范围内(例如在同一天)或在相同的更长时间范围内给药,则认为该治疗或药物与另一种治疗或药物“同时”施用。这种更长的时间范围可以包括一种情况,例如一种治疗/药物每周施用一次而另外一种治疗/药物每4天施用一次的情况。尽管两种治疗/药物可能不会或很少会在同一天施用,但是在数周、数月或更长的共同时期内持续施用两种治疗/药物。类似地,如果一种药物每年施用一次而另一种药物每周施用,则如果每周施用的药物在每年施用一次药物之前和/或之后的一年内施用被认为是“同时”施用的。因此,如本文所述,两种治疗/药物的“同时”施用包括在共同时间段内进行的两种不同治疗/药物的持续治疗。

[0523] 如本文所指,“保守”氨基酸取代是用具有相似性质(例如相似的极性、疏水性或体积)的不同氨基酸取代氨基酸。保守取代包括用同一组内的另一种氨基酸取代氨基酸,其中所述的氨基酸组包括以下:(1)疏水性氨基酸,包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、和蛋氨酸;(2)不带电荷的极性氨基酸,包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺;(3)碱性氨基酸,包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸;

(4) 酸性氨基酸, 包括天冬氨酸和谷氨酸。保守取代还包括 (1) 用V、L或I取代A, (2) 用K、Q或N取代R, (3) 用Q、H、K、R取代N, (4) 用E取代D, (5) 用S或A取代C, (6) 用N取代Q与N, (7) 用D取代E, (8) 用P或A取代G, (9) 用N、Q、K或R取代H, (10) 用L、V、M、A或F取代I, (11) 用I、V、A或F取代L, (12) 用R、Q或N取代K, (13) 用L、F或I取代M, (14) 用L、V、I、A或Y取代F, (15) 用A取代P, (16) 用T、A或G取代S, (17) 用S取代T, (18) 用Y或F取代W, (19) 用W、F、T或S取代Y, 和 (20) 用I、M、L、F或A取代V。

[0524] 如本文所指, “半胱氨酸取代”是用半胱氨酸取代另一种氨基酸的氨基酸取代。

[0525] 如本文所指, 如果抗体中包括的所有多肽链的氨基酸序列与本文所述的不“相同”, 则两种或更多种抗体“不同”的。

[0526] 如本文所指, 如果氨基酸序列相对于彼此具有一个或多个氨基酸取代、缺失或插入, 则该氨基酸序列是“不同的”, 但是如果不同仅仅是由于翻译后的修饰引起的, 即如果氨基酸序列可以由相同的DNA序列编码, 则这种“不同”的氨基酸序列不认为是不同的。

[0527] 本文所指的“Fc片段”、“Fc区”或“Fc部分”基本上由铰链结构域(铰链)、来自HC的第二重链恒定结构域(CH2)和CH3组成, 尽管它在一些同种型如IgA或IgM中, 可进一步包含CH3下游的区域。

[0528] 如本文所述, “重链(HC)”至少包含VH、CH1、铰链、CH2和CH3。包括所有这些结构域的HC也可以称为“全长HC”或“IgG HC”。一些同种型如IgA或IgM可含有额外的序列, 例如IgM CH4结构域。Kabat等人(同上)的编号系统用于VH(见图3和7), 而EU系统(Edelman等, (1969), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 63:78-85, 其全部内容并入本文)用于CH1、铰链、CH2和CH3。使用这些众所周知的编号系统可导致本文公开的序列中的实际氨基酸位置与使用Kabat或Edelman编号系统分配给该位置的数字之间存在差异。然而, 本领域技术人员可以参考下文公开的表格将Kabat或Edelman编号指定给公开的抗体序列中的任何特定位置, 该表显示如何参照抗体序列的保守特征分配Kabat或Edelman编号, 所述保守特征可以位于公开的序列中。下面的表2-5说明了对广义HC序列的该编号。

[0529] 表2: 人VH的共有序列

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
			L				G						P	
16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
	S	V		L	S	C				G				
	T	L		V	T									
31	32	33	34	35	35A	35B	36	37	38	39	40	41	42	43
								W		R	Q		G	K
													Q	
<u>44</u>	45	46	47	48	49	50	51	52	52A	52B	52C	53	54	55
G	L		W											
[0530]														
56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70
										R				
71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	82A	82B	82C
			S						L					
83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97
			D				Y		C					
98	99	100	100A	100B	100C	100D	100E	100F	100G	100H	100I	100J		
100K	101	102	103	104	<u>105</u>	106	107	108	109	110	111	112	113	
			W		Q	G			V		V	S		(SEQ ID NO:196)

[0531] 表2:该表显示了基于Kabat等人(同上)中人VH氨基酸序列(I-III)的保守氨基酸。根据Kabat等人(同上)编号。CDR中的位点编号以粗体斜体书写。除了82A-82C之外,在它们之后带有字母的位置编号,例如100A,由于CDR的长度不同可能会或可能不会被氨基酸填充。如本文所述,位于框架区中的位置82A-82C总是被人VH中的氨基酸填充。如Kabat等人(同上)所述,在特定位置的单个粗体氨基酸表示所有三类人VH中的“不变”氨基酸。在感兴趣的位点,其中给定位置的氨基酸最常见的是一个氨基酸或两个氨基酸中的任一个,这些氨基酸以纯文本显示。带下划线的粗体字的位点编号表示在本文或PCT/US2017/030676的实施例中描述为改变的位置。没有指定氨基酸的位置不符合上述标准。

[0532] 表2显示存在许多具有保守间隔的保守氨基酸,该保守间隔允许任何VH序列与如上所述的保守氨基酸间隔目视比对。或者,可以使用比对软件将新序列与已知的VH序列比对,例如,可以在International ImunoGeneTics (IMGT) Information System[®]上可用的比对软件(例如,IMGT/DomainGapAlign,可在<http://www.imgt.org>获得,或者CLUSTAL Omega (Sievers等,(2011),Molecular Systems Biology 7(1):539)。

[0533] 表3显示了CH1的共有氨基酸序列,

[0534] 表3:CH1共有序列

	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	<u>131</u>	132
						P				P				L	
	<u>133</u>	134	134	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	<u>147</u>
	R/K											C	L		K
	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162
				P							W				
[0535]	163	164	165	166	167	<u>168</u>	169	<u>170</u>	171	172	<u>173</u>	174	175	<u>176</u>	177
						H		F			V			A	
	178	179	180	<u>181</u>	182	<u>183</u>	184	185	186	187	188	189	190	191	192
				T		S	S								
	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207
								C							
	208	209	210	211	212	213	214	215	(SEQ ID NO:197)						

[0536] 表3:该编号根据Edelman等(同上)。根据Kabat等(同上),数字下方以粗体显示的单个氨基酸是与来自各种物种的CH1相比“恒定”(invariant)的残基。选择用于本文或PCT/US2017/030676(131、133、147、168、170、173、176、181和183)中描述的改变的位点以下划线粗体显示。在这些位点,在Kabat等(同上)报道的63种灵长类动物CH1序列中最常见的一个或两个氨基酸以纯文本显示。没有指定氨基酸的位置不是“恒定”的并且未被选择用于改变。

[0537] 下表4显示了IgG1、IgG2、IgG3和IgG4同种型的比对人CH1。这种比对强调了这些密切相关的CH1中序列的强烈保守性。

[0538] 表4:人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4CH1的比对

	118	120	130	140	150	160	170	177
	*	*	*	*	*	*	*	*
IgG1	ASTKGPSVFPLAPSS	K STSGGTAALGCLV	K DYFPEPVT	TVSWNSGALTSGV	HTFPAVLQSS			
IgG2	ASTKGPSVFPLAP	C S R STSESTAALGCLV	K DYFPEPVT	TVSWNSGALTSGV	HTFPAVLQSS			
IgG3	ASTKGPSVFPLAP	C S R STSGGTAALGCLV	K DYFPEPVT	TVSWNSGALTSGV	HTFPAVLQSS			
IgG4	ASTKGPSVFPLAP	C S R STSESTAALGCLV	K DYFPEPVT	TVSWNSGALTSGV	HTFPAVLQSS			
[0539]	178	180	190	200	210	215		
	*	*	*	*	*	*		
IgG1	GLY	SLSS VVTV	PSSSLGTQTY	ICNVNHKPSNTK	VDDKKV	(SEQ ID NO:198)		
IgG2	GLY	SLSS VVTV	PSSNFGTQTY	TCNVDDHKPSNTK	VDDKTV	(SEQ ID NO:199)		
IgG3	GLY	SLSS VVTV	PSSSLGTQTY	TCNVNHKPSNTK	VDDKRV	(SEQ ID NO:200)		
IgG4	GLY	SLSS VVTV	PSSSLGTQTY	TCNVDDHKPSNTK	VDDKRV	(SEQ ID NO:201)		

[0540] 表4:人IgG1、IgG2、IgG3和IgG4抗体的代表性CH1的氨基酸序列分别从IMGT网页,登录号J00228、J00230、X03604和K01316获得,并用CLUSTALW软件比对。残基根据Edelman等(同上)的EU系统编号。根据Kabat等(同上)所述的“恒定”残基以粗体显示。这些残基是高度保守的,但不是完全恒定的。下划线和粗体斜体表示的残基是如以下实施例或PCT/US2017/030676中报道的方式进行取代和测试的位点。

[0541] 下表5显示了四种人IgG亚类IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的人IgG Fc区的比对。这种比

对显示了这些亚类之间的差异,以及高序列保守性。

[0542] 表5:人IgG Fc区的氨基酸序列

	IgG1	-----
	IgG2	-----
	IgG3	ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCP
	IgG4	-----
		216 226 236 246 256 266
		* * * * *
	IgG1	EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
	IgG2	ERKCCVE---CPPCPAPPVA-GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF
	IgG3	EPKSCDTPPPCPRCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQF
	IgG4	ESKYG---PPCPSCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSEQEDPEVQF
		276 286 296 306 316 326
		* * * * *
[0543]	IgG1	NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
	IgG2	NWYVDGMEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKT
	IgG3	KWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTFRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT
	IgG4	NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKT
		336 346 356 366 376 386
		* * * * *
	IgG1	ISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
	IgG2	ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
	IgG3	ISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGQPENNYNTTP
	IgG4	ISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP
		396 406 416 426 436 446
		* * * * *
	IgG1	PVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:202)
	IgG2	PMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:203)
	IgG3	PMLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMHEALHNRYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:204)
	IgG4	PVLDSGDSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLGGK (SEQ ID NO:205)

[0544] “人”核苷酸或氨基酸序列、蛋白质或抗体是天然存在于人体内的序列或蛋白,或除如下所述的少量改变外与这种序列或蛋白质相同的序列或蛋白质。许多人核苷酸和氨基酸序列报道于例如Kabat等(同上),其说明了本领域中“人”一词的用法。如本文所述,“人”氨基酸序列或抗体相对于天然存在的序列可包含一个或多个插入、缺失或取代,条件是“人”氨基酸序列在每100个氨基酸中包含不超过10个单个氨基酸的插入、缺失和/或取代。类似地,人核苷酸序列在每300个核苷酸中包含不超过30个单个核苷酸的插入、缺失和/或取代。在VH或VL序列的特定情况下,预期CDR变化极大,为了确定特定VH或VL氨基酸序列(或编码它的核苷酸序列)是否是“人”序列,CDR(或编码它们的核苷酸)不被认为是序列的一部分。

[0545] 如本文所述,“人源化”抗体是这样的抗体,其中抗体是非人来源的,但是已经尽可能地被工程化为人的,从而有希望降低人体的免疫原性,同时保持抗体稳定性和结合特性。通常,这意味着可变结构域的大部分或全部恒定结构域和框架区是人的或近似人的序列,而CDR来自不同的生物。然而,仅将来自例如小鼠抗体的CDR移植到人框架中可能不会产生具有所需特性的抗体,并且可能需要进一步修饰。近年来,已经开发了各种简化和改进人性化结果的方法。参见,例如,Choi等,(2015),mAbs 7(6):1045-1057和其中引用的参考文献。

[0546] 如本文所述,“IgG抗体”包含(1)两个HC,每个包含VH、CH1、铰链区、CH2和CH3,和(2)两个轻链(LC),每个包含VL、和LC恒定区(CL)。IgG抗体的重链具有IgG同种型,例如

IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。这些结构域描述于例如Kabat等(同上), pp.xv-xix和647-699中, 这些文献通过引用并入本文。上述Kabat等(同上)的编号系统用于VH和VL(参见图3、4、7和8), 以及EU系统(Edelman等, (1969), Proc.Natl.Acad.Sci.USA 63:78-85, 其通过引用并入本文)用于CL、CH1、铰链区、CH2和CH3。

[0547] 如本文所述, “免疫调节分子”是与可以介导免疫系统活性从而调节免疫系统活性的组分(例如蛋白质)相互作用的分子。如下文实施例8中所述, 可以在混合淋巴细胞反应(MLR)测定中评估免疫系统的活性, 并且免疫调节分子可以增加或降低免疫系统的活性。例如, 本文所述的抗hPD1抗体是该定义的免疫调节分子。

[0548] 如本文所述, 通过抗体“抑制”hCTLA4与人CD80(hCD80, 又称人B淋巴细胞活化抗原B7-1(hB7-1))和/或人CD86(hCD86, 又称人B淋巴细胞活化抗原B7-2(hB7-2))之间的相互作用可以使用CTLA4荧光素酶报告基因测定法测量, 使用如实施例4中所述的表达B7-1和B7-2的Raji细胞。如果在该测定中它的 IC_{50} 不高于抗CTLA4抗体7A4的 IC_{50} 的20、15、10或5倍, 则该抗体“抑制”hCTLA4与hB7-1/hB7-2的相互作用。

[0549] 类似地, 抗hPD1抗体对hPD1和hPDL1之间相互作用的“抑制”可以通过使用实施例7中所述的CHO-K1细胞和Jurkat T细胞的PD1双重报告基因测定来测量。如果在该测定中具有不高于抗hPD1抗体#9的20、15、10或5倍的 IC_{50} , 则抗体“抑制”hPD1和hPDL1之间的相互作用。

[0550] 如本文所述, “抑制剂”类似于如上定义的“拮抗剂”, 除了它是指小分子(与蛋白质或多核苷酸相对), 而拮抗剂是指任何种类分子的更通用的术语。例如, “酪氨酸激酶抑制剂”是指拮抗酪氨酸激酶的小分子。为了避免任何混淆, 术语“抑制剂”与小分子的这种关联不延伸到动词“抑制”或名词“抑制”。例如, 大分子(例如抗体)可以抑制例如PD1和PDL1的相互作用。此外, 如本文所述, 相互作用的“抑制”不需要被小分子介导而“抑制”。

[0551] 如本文所指, “轻链(LC)”包含VL和CL, 其可以是 κ (CL κ)或 λ (CL λ)结构域。这些结构域, 包括其示例性氨基酸序列, 描述于例如Kabat等(同上), 第xiii-lix, 103-309和647-660, 其通过引用并入本文。这里用于VL的编号系统是在上述Kabat等(同上)中描述的编号系统, 用于CL的EU编号系统是在Edelman等(同上)所述的编号系统。下表6和7说明了这些系统在各种轻链序列中的应用。本领域技术人员可以使用此类信息将Kabat或Edelman编号分配至本文公开的序列中的特定位置。

[0552] 表6: 人VL的共有序列

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

(SEQ ID NO:206)

[0554] 表6:编号根据Kabat等(同上)。粗体斜体的数字表示CDR的位置。由于CDR的长度不同,在它们之后具有字母的位置编号(例如,27A)可以由或可以不由氨基酸填充。Kabat等(同上)的所有人类轻链的不变残基显示为粗体字母,表示在该位置发现的氨基酸。在选定的位点,在该位点发现的一至三种最常见的氨基酸以纯文本形式显示。此外,许多其他氨基酸在κ或λVL的一些亚组内是恒定的或高度保守的,这可以帮助将特定氨基酸序列归类为VL。选择用于本文改变的位点如以下实施例或PCT/US2017/030676中所述,用粗体下划线表示。未指定氨基酸的位置和/或未以粗体下划线类型显示的数字不符合上述标准。

[0555] 表7:CL的共有序列和编号

	108	109	110	111	112	113	114	115	116	<u>117</u>	118	119	120	121	122	123
κ						P				I		P	P			
λ						P				L		P	P			
	124	125	126	127	128	129	130	<u>131</u>	132	133	134	135	136	137	138	139
κ								S		V	C					
λ								A		V	C					
	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155
κ		P					V		W							
λ		P					V		W							
	156	157	158	159	<u>160</u>	161	<u>162</u>	163	164	165	166	167	168	169	170	171
κ					Q		S		T							
λ					E		T		P							
	172	173	<u>174</u>	175	<u>176</u>	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187
κ			S		S	S	T	L	T	L						
λ			A/M		S	S	Y	L	S	L						
	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203
κ							C				H					
λ							C				H					
	204	205	206	207	208	<u>209</u>	210	211	212	213	<u>214</u>					
κ						F					C (SEQ ID NO:207)					
λ						V					C (SEQ ID NO:208)					

[0557] 表7: 编号根据Edelman等(同上), 其与Kabat等(同上)对于CL的编号相同。根据Kabat等(同上)的编号, 以粗体显示的氨基酸从各种物种的 κ 和 λ CL的比对的“恒定”残基。如在选定位点(131、160、162、174、176和178)所示, 在Kabat等(同上)报道的十个人 κ 链(上部)和28个人 λ 链(下部)中保守的氨基酸以纯文本显示。在这些位点之一处发现两种不同氨基酸中的任何一种的情况下, 更常见的氨基酸显示在较不常见的氨基酸之前, 例如A/M。粗体下划线数字表示如下面实施例或PCT/US2017/030676中报道的那样改变的位点。此外, 许多其他氨基酸在CL κ 或CL λ 结构域的一些亚组内是恒定的或高度保守的, 这可以帮助将特定氨基酸序列归类为CL。未指定氨基酸的位置和/或未以粗体下划线类型显示的数字不符合上述标准。

[0558] 如本文所指, “配偶体引导改变”是VH、CH1、VL或CL氨基酸序列内HC/LC界面处的单个氨基酸的取代、插入或缺失, 任选地用带电荷的氨基酸或半胱氨酸取代天然存在的氨基酸, 其导致HC和LC, 以及任选地人和/或灵长类HC和LC, 更强地关联。更具体地, “HC配偶体引导改变”是能够(有时仅在VH或CH1中的“接触”残基处存在“LC配偶体引导改变”)导致HC和LC关联性更强的VL或CL的改变。类似地, “LC配偶体引导改变”是能够(有时仅在CL或CL的接触残基处存在“HC配偶体引导改变”的情况下)导致HC和LC关联性更强的VH或CH1的改变。在一些实施方案中, HC和LC配偶体引导改变的接触对可以是具有相反电荷的带电荷氨基酸的取代。在其他实施方案中, 带电荷的氨基酸已经存在于HC或LC的接触位点之一处, 使得仅需要改变一条链即可在同源HC/LC对中的接触位点处产生一对带相反电荷的残基, 即电荷对。在其他实施方案中, 可以在接触位点引入半胱氨酸残基, 从而可以形成同源HC/LC对中的二硫键。在进一步的实施方案中, HC-和LC-配偶体引导改变可以是在接触残基处产生突起和

孔(或隆起和空腔)取代或预先存在的氨基酸,如美国专利8,679,785中所述,相关部分通过引用并入本文。HC可以是IgG、IgA、IgD、IgM或IgE同种型,任选地IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。HC-和LC-配偶体引导改变发生在接触形成HC/LC界面一部分的氨基酸位置。CL和CH1中的界面残基包括4.5Å内的界面残基,如美国专利8,592,562的表4和5以及第10和11栏中的附图所解释的,所有这些都通过引用并入本文。人CH1和CL中的这些位置列于下表8中。

[0559] 表8:CH1和CL之间的残基接触

[0560]

CH1残基	CLκ残基	CLλ残基
125	123	119
126	121,123,124	117,119,120
127	121	117,119
128	118,133	114,129
129	118	114
130	118	
139	116	
140	116	
141	116,118,135	112,114
142	118	114
143		114
145	124,131	127,129,173
147	124,131	125,127
148		125
168	137,138,174	133,163,169
169	164	
170	135,162,164,174,176	131,133,169,171
171	162,164	158,161,171
172		158
173	160,162	156,158,173
174	160	156
175	160	156
176		156
181		173
182		173
183	176	129,131,173
185	135	114,131
187	137	
213	123	119
218	122	

[0561] 在接触残基在VH和VL之间的界面上的特定情况下,适合于改变的残基对(一个在VH中且一个在VL中)可以使用以下标准选择:(1)残基被掩埋或部分掩埋,即在全长抗体的

三级结构中不可接近, (2) 残基在空间上接近, 即根据已知结构模型两个氨基酸在约 12 \AA 内, 或者在一个氨基酸的侧链重原子 (除氢之外的任何原子) 和另一个氨基酸的任何重原子之间至多 5.5 \AA , (3) 残基是高度保守的, 尽管不需要它们是完全恒定的, 以及 (4) 残基不在 CDR 内或不与 CDR 相互作用。这种接触残基的实例包括但不限于以下: 位点 44 (VH) 和位点 100 (VL); 位点 39 (VH) 和位点 38 (VL); 以及位点 105 (VH) 和位点 43 (VL)。

[0562] 对于第一近似, 可以通过如实施例 11 中所述的“脱链” (chain drop out) 实验来测量由于 HC-和/或 LC-配偶体引导改变引起的 HC/LC 关联强度的变化。

[0563] 为了证实或在某些情况下澄清脱链 (chain drop out) 实验的结果, 在含有编码第一抗体 (Mab1) 的 HC 和 LC 以及第二抗体 (Mab2) 的 HC 和 LC 的 DNA 的转染子中产生的 Fab 片段的大小可以通过质谱法测定, 参见本文实施例 11, Thompson 等, (2014), mAbs 6:1, 197-203 (其全部并入本文), 以及美国临时申请 62/342,167 图 5 和实施例 5 (其通过引用并入本文)。在大多数情况下, 可以使用这些技术通过质量来区分同源和非同源对。如果非同源对是转染了编码未改变的 Mab1 HC 和 LC 以及未改变的 Mab2 HC 和 LC 的 DNA 的细胞中的主要种类, 并且不是用编码 Mab1 HC 和 LC 以及 Mab2 HC 和 LC 的 DNA 转染的细胞中的主要种类 (其中这些抗体中的至少一种包含配偶体引导改变), 则在本文中认为这些改变中的至少一种改变是有利的配偶体引导改变。

[0564] 配偶体引导改变的例子包括部分或全部产生以下任何电荷对的改变: 44D/E (VH) 和 100R/K (VL); 44R/K (VH) 和 100D/E (VL); 105R/K (VH) 和 43D/E (VL); 105D/E (VH) 和 43R/K (VL); 147D/E (CH1) 和 131R/K (CL); 147R/K (CH1) 和 131D/E (CL); 168D/E (CH1) 和 174R/K (CL); 168R/K (CH1) 和 174D/E (CL); 181R/K (CH1) 和 178E/D (CL); 和 181E/D (CH1) 和 178R/K (CL)。另外, 配偶体引导改变包括用半胱氨酸取代另一个氨基酸, 使得抗体的 HC 和 LC 中存在接触半胱氨酸对, 例如以下任何一对: 126C (CH1) 和 121C (CL); 126C (CH1) 和 124C (CL); 127C (CH1) 和 121C (CL); 128C (CH1) 和 118C (CL); 133C (CH1) 和 117C (CL); 133C (CH1) 和 209C (CL); 123C (CH1) 和 116C (CL); 141C (CH1) 和 116C (CL); 168C (CH1) 和 174C (CL); 170C (CH1) 和 162C (CL); 183C (CH1) 和 176C (CL); 173C (CH1) 和 160C (CL); 170C (CH1) 和 176C (CL); 和 173C (CH1) 和 162C (CL)。

[0565] 如本文所述, 抗体混合物中抗体的“主要种类”是构成混合物中抗体总量的至少 10% 的特定抗体。为了确定抗体混合物中有多少主要种类, 可以进行如实施例 5 中所述的和美国临时申请 62/342,167 的图 14 中 (美国临时申请 62/342,167 的部分通过引用并入本文) 所示的低 pH CEX 色谱法可以执行。Chen 等, (2010), Protein Science, 19:1191-1204 描述了该方法, 其全部内容并入本文。简而言之, 它采用 Thermo PROPAC™WCX-10 弱 CEX 柱, 4x 250mm, 前面是 50mm 保护柱 (PROPAC™WCX-10G), 使用 Waters Alliance 2695 高效液相色谱 (HPLC) 系统。色谱法可以以线性梯度从 100% 缓冲液 A (20mM 乙酸钠 pH 5.2) 至 100% 缓冲液 B (20mM 乙酸钠和 250mM 氯化钠 pH 5.2) 在 30 分钟内进行。可以用高盐 (1M 氯化钠) 洗涤柱, 并重新平衡至缓冲液 A 的起始条件。可以通过 214nm 处的吸光度在柱流出物中检测抗体。可以使用 EMPOWER™软件 (Waters Corp, Milford, MA, USA) 确定检测到的峰的相对量。低 pH CEX 可以区分不同的全长抗体种类, 并且可以用于定量混合物中特定抗体种类的相对量。

[0566] 如本文所述, 抗体混合物中抗体的“次要种类”包含少于混合物中抗体总量的 10%。这可以通过低 pH CEX 色谱法测定, 如“主要种类”的定义中所述。

[0567] 术语“核酸”和“多核苷酸”在本文中可互换使用。

[0568] “灵长类动物”的核苷酸或氨基酸序列或蛋白质是天然存在于灵长类动物中的核酸或蛋白质或除下述少量改变之外与这种序列或蛋白质相同的序列蛋白质。灵长类动物包括来自许多科的动物,包括但不限于智人、原猴亚目(包括狐猴)、新世界猴、黑猩猩、人类、大猩猩、猩猩、长臂猿和旧世界猴。具体的灵长类动物包括但不限于智人、猕猴(恒河猴)、食蟹猕猴(长尾猕猴)和黑猩猩等。许多灵长类核苷酸和氨基酸序列是本领域已知的,例如在诸如Kabat等(同上)报道的那些。通常,如本文所述,“灵长类动物”氨基酸序列可以含有相对于天然存在的灵长类序列的一个或多个插入、缺失或取代,条件是“灵长类动物”氨基酸序列的每100个氨基酸包含不超过10个插入、缺失和/或取代单个氨基酸。类似地,灵长类动物核苷酸序列相对于天然存在的灵长类序列在每300个核苷酸内包含不超过30个单核苷酸的插入、缺失和/或取代。在VH或VL序列的特定情况下,预期CDR变化极大,并且为了确定特定VH或VL氨基酸序列(或编码它的核苷酸序列)是否是“灵长类动物”序列,CDR(或编码它们的核苷酸)不被认为是序列的一部分。

[0569] 如本文所述,如果两个氨基酸序可以由相同的DNA序列编码,则这两个氨基酸序列“相同”。也就是说,仅由于翻译后修饰(例如,羧基末端赖氨酸的消除或N-末端谷氨酸或谷氨酰胺残基的环化)而不同的氨基酸序列属于本文所述的“相同”。

[0570] 如本文所述,“靶向生物制剂”是指可以通过其与另一种特定分子(可以是蛋白质)的相互作用而影响细胞生物学的状态的一个方面的蛋白质。例如,“靶向生物制剂”可能影响细胞的生存、增殖、产生特定细胞因子或蛋白质等的的能力。例如,本文所述的抗hPD1抗体是“靶向生物制剂”,因为它们与PD1相互作用,在T细胞中引起许多生物学作用,包括增殖的增加和IFN γ 产生的增加。

[0571] 类似地,如本文所指的“靶向抑制剂”是可以通过与特定细胞分子(其可以是蛋白质)的相互作用影响细胞生物学状态的一个方面的小分子。例如,“酪氨酸激酶抑制剂”是通过其与酪氨酸激酶的相互作用影响酪氨酸激酶的活性(其影响多种细胞功能)的小分子。

[0572] 如本文所述,对特定疾病或病症的“治疗”是指如下的作用过程,其可包括施用一种或多种抗体或编码一种或多种抗体的多核苷酸,使得在人类患者、被认为可反映疾病或病症的动物模型系统、或被认为可反映疾病或病症的基于细胞的体外测定中可以减轻一种或多种症状或中断疾病或病症的预期进展。其可以通过客观测量人或动物的症状或通过测量基于细胞的测定中的各种参数来确定,例如,一种或多种细胞因子(例如IFN γ)的产生、细胞增殖、细胞死亡等。例如,对于癌症的“治疗”,该治疗可以导致肿瘤体积减少,人或动物模型系统中不出现预期的肿瘤转移,存活时间增加或无进展增加或患有癌症的人或动物的无病生存时间增加。癌症治疗还可以导致表明在基于细胞的测定中激活免疫系统的指数的增加,例如,T细胞的增殖和/或细胞因子(例如由T细胞产生的IFN γ 和/或IL-2)的产生增加。

[0573] 抗hCTLA4抗体的可变区

[0574] 在一个方面,本文提供了抗hCTLA4抗体的可变结构域,其具有独特但紧密相关的氨基酸序列。这些抗体可以与人和食蟹猴CTLA4结合,并且可以抑制hCTLA4与hB7-1和/或hB7-2的相互作用。在一个方面,这些抗体可以是人、人源化或灵长类IgG抗体,其可以是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。在一些实施方案中,它们可包含增加抗体体内清除的改变。这

些改变包括例如M252A、M252L、M252S、M252R、R255K或H435R。

[0575] 图1和2显示了抗hCTLA4抗体的VH和VL的CDR的比对,其选择在实施例1中描述。图3和4显示了所选抗hCTLA4抗体的VH和VL的比对。在VH的整个长度上只有八个位点变化,并且在VL的整个长度上只有五个位点变化。因此,这些选择的抗体的序列密切相关。这些抗hCTLA4 VH和VL的共有序列在SEQ ID NO:82和83(VH)和SEQ ID NO:84和85(VL)中提供。

[0576] 在一个方面,抗hCTLA4抗体的VH含有VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:3(CDR1),SEQ ID NO:74或75(CDR2)。和SEQ ID NO:76或77(CDR3)。SEQ ID NO:74,75,76和77是共有序列(参见图1),其中几个氨基酸可在有限的氨基酸范围内变化。此外,VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3可分别包含SEQ ID NO:3、4和5,SEQ ID NO:3、13和5,SEQ ID NO:3、20和21,SEQ ID NO:3、24和25,SEQ ID NO:3、31和5,SEQ ID NO:3、37和5,SEQ ID NO:3、43和5,SEQ ID NO:3、46和47,SEQ ID NO:3、59和5,SEQ ID NO:3、65和21,或SEQ ID NO:3、70和21的氨基酸序列。包含含有这些CDR序列组中的任何一个的VH的抗体可以抑制hCTLA4与hB7-1/hB7-2的相互作用。

[0577] 此外,VH可以包含SEQ ID NO:2、12、19、23、30、36、42、45、52、58、64、69、82或83中任一个的氨基酸序列或者可以包含这些序列的略微改变版本。例如,VH可以包含一个或多个配偶体引导改变,其可以是相对于SEQ ID NO:2、12、19、23、30、36、42、45、52、58、64、69、82和83中任一个的氨基酸取代。在一些实施方案中,相对于SEQ ID NO:2、12、19、23、30、36、42、45、52、58、64、69、82和83中任一个,VH可包含不超过6、5、4、3、2或1个氨基酸改变。这些氨基酸改变可以是取代和/或可以是配偶体引导改变。包含此类改变的序列的VH是可以抑制hCTLA4与hB7-1和/或hB7-2相互作用的抗体的一部分。

[0578] 类似地,抗hCTLA4抗体的VL可包含VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3,其包含SEQ ID NO:78或79(CDR1)、SEQ ID NO:9(CDR2)和SEQ ID NO:80或81(CDR3)的氨基酸序列。SEQ ID NO:78,79,80和81(参见图2)是各自在有限的氨基酸范围内的两个氨基酸位置处变化的共有序列。此外,VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3可分别包含SEQ ID NO:8、9和10,SEQ ID NO:16、9和17,SEQ ID NO:28、9 17,SEQ ID NO:34、9和17,SEQ ID NO:40、9和10,SEQ ID NO:50、9和17,SEQ ID NO:55、9和56,SEQ ID NO:40、9和62,SEQ ID NO:16、9和62,或SEQ ID NO:73、9和62的氨基酸序列。包含含有这些CDR序列组中的任何一个VL的抗体可以抑制hCTLA4与hB7-1/hB7-2的相互作用。

[0579] 此外,抗hCTLA4抗体的VL可包含SEQ ID NO:7、15、27、33、39、49、54、61、67、72、84和85中任一个的氨基酸序列或者可以包含这些序列的略微改变的版本。例如,VL可以包含一个或多个配偶体引导改变,其可以是相对于SEQ ID NO:7、15、27、33、39、49、54、61、67、72、84和85中任一个的氨基酸取代。在一些实施方案中,相对于SEQ ID NO:7、15、27、33、39、49、54、61、67、72、84和85中任一个,VL可包含不超过6、5、4、3、2或1个氨基酸改变。这些氨基酸改变可以是取代和/或可以是配偶体引导改变。包含此类改变的序列的VL是可以抑制hCTLA4与hB7-1和/或hB7-2相互作用的抗体的一部分。

[0580] 另一方面,抗hCTLA4抗体可包含VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3,其具有SEQ ID NO:3、4、5、8、9和10,SEQ ID NO:3、13、5、16、9和17,SEQ ID NO:3、20、21、16、9和17,SEQ ID NO:3、24、25、28、9和17,SEQ ID NO:3、31、5、34、9和17,SEQ ID NO:3、37、5、40、9和10,SEQ ID NO:3、43、5、28、9和17,SEQ ID NO:3、46、47、50、9、17,SEQ ID

NO:3、31、5、55、9和56,SEQ ID NO:3、59、5、40、9和62,SEQ ID NO:3、65、21、16、9和62,或SEQ ID NO:3、70、21、73、9和62的氨基酸序列。包含这样的CDR序列组的抗体可以抑制hCTLA4与hB7-1/hB7-2的相互作用。

[0581] 在另一方面,VH和VL可分别包含以下双氨基酸序列组的任一个的氨基酸序列:SEQ ID NO:2 (VH) 和7 (VL);SEQ ID NO:12 (VH) 和15 (VL);SEQ ID NO:19 (VH) 和15 (VL);SEQ ID NO:23 (VH) 和27 (VL);SEQ ID NO:30 (VH) 和33 (VL);SEQ ID NO:36 (VH) 和39 (VL);SEQ ID NO:42 (VH) 和27 (VL);SEQ ID NO:45 (VH) 和49 (VL);SEQ ID NO:52 (VH) 和54 (VL);SEQ ID NO:58 (VH) 和61 (VL);SEQ ID NO:64 (VH) 和67 (VL);SEQ ID NO:69 (VH) 和72 (VL);和SEQ ID NO:83 (VH) 和85 (VL)。在一些实施方案中,VH和VL可包含这些双序列组之一的略微改变的形式。例如,VH可以包含一个或多个配偶体引导改变,其可以是相对于双序列组之一中的一个序列的氨基酸取代,并且VL可以包含一个或多个配偶体引导改变,其可以是相对于同一双序列组中的另一个序列的氨基酸取代。形成抗体或其部分的VH和VL各自相对于双序列组中的第一 (VH) 和第二 (VL) 氨基酸序列可包含不超过6、5、4、3、2或1个氨基酸改变 (可选地取代) 的氨基酸序列。这些改变可以是配偶体引导改变。包含此类改变的序列的VH和VL可以是能够抑制hCTLA4与hB7-1和/或hB7-2相互作用的抗体的一部分。

[0582] 抗hPD1抗体的可变区

[0583] 在一个方面,本文提供了抗hPD1抗体的可变结构域,其具有独特但密切相关的氨基酸序列。这些抗体可以与人和食蟹猴PD1结合,并且可以抑制hPD1与hPDL1的相互作用。在一个方面,这些抗体可以是人、人源化或灵长类IgG抗体,其可以是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。

[0584] 图5和6显示了抗hPD1抗体的VH和VL的CDR的比对,其选择在实施例2中描述。图7和8分别显示了所选抗hPD1抗体的VH和VL的氨基酸序列的比对。VH和VL都在10个位点处不同。因此,这些选择的抗体的序列密切相关。这些VH和VL的共有序列在SEQ ID NO:180和181 (VH) 和SEQ ID NO:182和183 (VL) 中提供。

[0585] 在一个方面,抗hPD1抗体的VH含有VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3,其包含氨基酸序列SEQ ID NO:169或170 (CDR1)、171或172 (CDR2),和173或174 (CDR3)。这些是其中每个CDR中的至少一个氨基酸可以在有限的氨基酸范围内变化的共有序列 (图5)。此外,VH CDR1、VH CDR2和VH CDR3可分别包含SEQ ID NO:88、89和90,SEQ ID NO:98、89和99,SEQ ID NO:105、89和90,SEQ ID NO:105、111和112,SEQ ID NO:105、111和90,SEQ ID NO:88、89和112,SEQ ID NO:88、89、127,SEQ ID NO:88、89和134,SEQ ID NO:98、89和90,SEQ ID NO:98、111和112,SEQ ID NO:149、150和112,SEQ ID NO:105、111和90,SEQ ID NO:149、89和127,SEQ ID NO:88、89和112,或SEQ ID NO:105、89和127的氨基酸序列。包含含有这些CDR序列中的任何一个VH的抗体可以抑制hPD1与hPDL1的相互作用。

[0586] 此外,VH可包含SEQ ID NO:87、97、104、110、117、122、126、133、139、144、148、154、158、162、166、180和181中任一个的氨基酸序列,或可包含这些序列的略微改变的形式。例如,VH可以包含一个或多个配偶体引导改变,其可以是相对于SEQ ID NO:87、97、104、110、117、122、126、133、139、144、148、154、158、162、166、180和181中任一个的氨基酸取代。在一些实施方案中,相对于SEQ ID NO:87、97、104、110、117、122、126、133、139、144、148、154、158、162、166、180和181中的任一个,VH可包含不超过6、5、4、3、2或1个氨基酸改变,其可为

取代。这些改变可以是配偶体引导改变。包含此类改变的序列的VH可以是抑制hPD1与hPDL1相互作用的抗体的一部分。

[0587] 类似地,抗hPD1抗体的VL可具有包含VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3的VL,其包含SEQ ID NO:175或176(CDR1)、177(CDR2)和178或179(CDR3)的氨基酸序列。这些是其中每个CDR中的至少一个氨基酸可在有限的氨基酸范围内变化的共有序列(参见图6)。此外,VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3可分别包含SEQ ID NO:93、94和95,SEQ ID NO:102、94和95,SEQ ID NO:93、108和95,SEQ ID NO:115、94和95,SEQ ID NO:120、94和95,SEQ ID NO:102、108和95,SEQ ID NO:130、108和131,SEQ ID NO:137、94和131,SEQ ID NO:142、94和131,SEQ ID NO:130、94和131,SEQ ID NO:142、94和131,SEQ ID NO:115、94和95,或SEQ ID NO:102、108和95的氨基酸序列。包含含有这些CDR序列组中的任何一个的VL的抗体可以抑制hPD1与hPDL1的相互作用。

[0588] VL可以包含SEQ ID NO:92、101、107、114、119、124、129、136、141、146、152、156、160、164、168、182和183中任一个的氨基酸序列,或可以包含这些序列的略微改变的形式。例如,VL可以包含一个或多个配偶体引导改变,其可以是相对于SEQ ID NO:92、101、107、114、119、124、129、136、141、146、152、156、160、164、168、182和183中任一个的氨基酸取代。在一些实施方案中,相对于SEQ ID NO:92、101、107、114、119、124、129、136、141、146、152、156、160、164、168、182和183中任一个,VL可包含不超过6、5、4、3、2或1个氨基酸改变,其可为取代。这些改变可以是配偶体引导改变。包含此类改变的序列的VL可以是能够抑制hCTLA4与hB7-1和/或hB7-2相互作用的抗体的一部分。

[0589] 另一方面,抗hPD1抗体可包含VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3、VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3,其具有SEQ ID NO:88、89、90、93、94和95,SEQ ID NO:98、89、99、102、94和95,SEQ ID NO:105、89、90、93、108和95,SEQ ID NO:105、111、112、115、94和95,SEQ ID NO:105、111、90、120、94和95,SEQ ID NO:88、89、112、102、108和95,SEQ ID NO:88、89、127、130、108和131,SEQ ID NO:88、89、134、137、94和131,SEQ ID NO:98、89、90、142、94和131,SEQ ID NO:98、111、112、130、94和131,SEQ ID NO:149、150、112、130、94和131,SEQ ID NO:105、111、90、142、94、131,SEQ ID NO:149、89、127、115、94和95,SEQ ID NO:88、89、112、93、94和95,或SEQ ID NO:105、89、127、102、108和95的氨基酸序列。包含这样的CDR序列组的抗体可以抑制hPD1与hPDL1的相互作用。

[0590] 在另一方面,抗hPD1抗体的VH和VL分别可包含下列双氨基酸序列组的任一组的氨基酸序列:SEQ ID NO:87(VH)和92(VL);SEQ ID NO:97(VH)和101(VL);SEQ ID NO:104(VH)和107(VL);SEQ ID NO:110(VH)和114(VL);SEQ ID NO:117(VH)和119(VL);SEQ ID NO:122(VH)和124(VL);SEQ ID NO:126(VH)和129(VL);SEQ ID NO:133(VH)和136(VL);SEQ ID NO:139(VH)和141(VL);SEQ ID NO:144(VH)和146(VL);SEQ ID NO:148(VH)和152(VL);SEQ ID NO:154(VH)和156(VL);SEQ ID NO:158(VH)和160(VL);SEQ ID NO:162(VH)和164(VL);SEQ ID NO:166(VH)和168(VL);SEQ ID NO:180(VH)和182(VL);和SEQ ID NO:181(VH)和183(VL)。在一些实施方案中,VH和VL可以包含这两个序列的组之一的略微改变的形式。例如,VH可以包含一个或多个配偶体引导改变,其可以是相对于双序列组之一中的一个序列的氨基酸取代,并且VL可以包含一个或多个配偶体引导改变,其可以是相对于同一双序列组中的另一个序列的氨基酸取代。形成抗体或其部分的VH和VL各自相对于双序列组中的

第一 (VH) 和第二 (VL) 氨基酸序列可包含不超过6、5、4、3、2或1个氨基酸改变 (可选地取代) 的氨基酸序列。这些改变可以是配偶体引导改变。包含此类改变的序列的VH和VL可以是能够抑制hPD1与hPDL1相互作用的抗体的一部分。

[0591] 抗hPD1和/或抗hCTLA4抗体的其他方面

[0592] 本文所述的抗hCTLA4和抗hPD1抗体可以是人、人源化或灵长类动物抗体和/或IgG抗体,例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体。此类IgG抗体可包含配偶体引导改变,例如HC和/或LC配偶体引导改变。此外,此类IgG抗体可包含一种或多种不利于异二聚体的改变。这样的改变可以使已被导入编码至少两种不同IgG抗体的DNA的单一宿主细胞系产生不超过两种或三种不同的主要抗体种类的机会提高。

[0593] 如本文所述,配偶体引导改变可以形成的IgG抗hCTLA4和/或抗hPD1抗体 (任选地人或灵长类IgG抗体) 内的电荷对或接触半胱氨酸对的一部分。例如,配偶体引导改变包括部分或全部产生以下任何一种电荷对的改变 (包括氨基酸取代): 44D/E (VH) 和100R/K (VL); 44R/K (VH) 和100D/E (VL); 105R/K (VH) 和43D/E (VL); 105D/E (VH) 和43R/K (VL); 147D/E (CH1) 和131R/K (CL); 147R/K (CH1) 和131D/E (CL); 168D/E (CH1) 和174R/K (CL); 168R/K (CH1) 和174D/E (CL); 181R/K (CH1) 和178E/D (CL); 和181E/D (CH1) 和178R/K (CL)。如果在这些位点之一处已存在带电荷的氨基酸,则仅需要一个配偶体引导改变来产生电荷对。在其他情况下,将需要两个配偶体引导改变,一个在HC中,一个在LC中,以产生电荷对。另外,配偶体引导改变包括取代,其中半胱氨酸取代另一个氨基酸,从而产生接触半胱氨酸对,其可形成二硫键。在人IgG1抗体中,可以包括以下对: 126 (CH1) 和121 (CL), 170C (CH1) 和162C (CL), 170 (CH1) 和176 (CL), 173 (CH1) 和160 (CL), 和183 (CH1) 和176 (CL)。在人IgG4抗体中,这些可包括以下对: 170C (CH1) 和162C (CL), 173C (CH1) 和162C (CL), 和183 (CH1) 和176 (CL)。抗体混合物中的一种抗体中的同源CH1/CL对中的接触半胱氨酸对可以位于与混合物中另一种抗体不同的位置,这可以增加同源HC/LC对形成的选择性。美国临时申请62/342,267中 (第33-36页和实施例1-3和5,包括其中提到的附图) 描述了配偶体引导改变的部分。

[0594] 众所周知的方法可用于产生编码含有配偶体引导改变的HC和/或LC的DNA。这些方法在下面的实施例1和2中描述,并且包括诸如人工合成DNA序列的方法 (例如商业供应商,例如Integrated DNA Technologies, Coralville, Iowa, USA, 或者Genewiz, South Plainfield, NJ, USA等) 和通过Gibson反应 (即重叠PCR) 连接DNA区段, 例如Gibson **Assembly**® Master Mix Instruction Manual, New England Biolabs Inc. (NEB), 版本3.3, NEB目录号#E2611S/L, NEB Inc., Ipswich, MA, USA。在美国临时申请62/342,267中详细描述了配偶体引导改变的设计、制备和测试。美国临时申请62/342,267的实施例1-3和5以及图4-7和12-15通过引用并入本文。一旦制备了编码抗体的DNA,就可以在转染的宿主细胞中制备抗体,如下文实施例1中所述。

[0595] 在进一步的实施方案中,如本文所述的抗hCTLA4和/或抗hPD1抗体可包含一种或多种不利于HC/HC异二聚体形成的改变。在美国临时申请62/342,267中,显示在用两种不同IgG抗体转染的细胞中不容易检测到异二聚体,其中一种抗体是IgG4抗体或在其HC中包含K409R取代的IgG,另一种抗体是包含D399K/R和K409D/E取代的IgG1抗体。美国临时申请62/342,267的实施例4和图8-11通过引用并入本文。

[0596] 抗hCTLA4和抗hPD1抗体的混合物

[0597] 在另一方面,本文描述了抗hCTLA4和抗hPD1抗体的混合物。在某些病症的治疗中,阻断或抑制CTLA4和PD1都是有益的。参见例如Larkin等(2015),New Engl.J.Med.373(1):23-34。抗体混合物可包含本文所述的特定抗hPD1和抗hCTLA4抗体。

[0598] 在一些实施方案中,抗hPD1和抗hCTLA4抗体的混合物可以在已引入了编码两种抗体的DNA的单一宿主细胞系中制备。这些方法已在美国临时申请62/342,167和国际申请PCT/US2017/030676中详细描述,并且描述这些方法的美国临时申请62/342,167和PCT/US2017/030676的部分在此通过引用并入本文。与在两个单独的细胞系中生产相比,在单个宿主细胞系中生产抗体混合物更加有效且降低成本,因为它仅需要开发和运行一个商业过程而不是两个。在单一宿主细胞系中产生的混合物中的抗体可包含一种或多种HC和/或LC配偶体引导改变和/或一种或多种不利于异二聚体的改变。由于两种不同的HC和LC的混杂配对和/或HC/HC异二聚体形成,这种改变可以限制宿主细胞系中形成的抗体种类的数量。参见例如美国临时申请62/342,167的图3,其通过引用并入本文。这可以减少从含有编码两种不同HC和两种不同LC的DNA的单一宿主细胞系产生包含至多三种或至多两种不同抗体的混合物所需的纯化步骤的数量。

[0599] 示例性HC和LC配偶体引导改变,其中一种或多种可包括在抗体混合物中的抗hCTLA4和/或抗hPD1抗体中,列于下表9中。

[0600] 表9:示例性的配偶体引导改变

	抗体1*				抗体2*			
	HC1		LC1		HC2		LC2	
	VH	CH1@	VL	CL	VH	CH1@	VL	CL
1#	44E/D		100R/K		44R/K		100E/D	
2	105R/K		43E/D		105E/D		43R/K	
3		147R/K		131E/D		147E/D		131R/K
4		168E/D		174R/K		168R/K		174E/D
5		181R/K		178E/D		181E/D		178R/K
6		126C		121C		133C		209C
7		168C		174C		133C		117C
8		170C		162C		183C		176C
9		173C		160C		170C		162C
10		173C		160C		183C		176C
11		170C		176C		173C		160C
12		170C		176C		183C		176C
13		170C		162C		170C		176C
14		173C		162C		170C		176C
15		173C		162C		173C		160C
16		173C		162C		170C		162C

[0602] *抗体1和2是不同的抗体。就本表的目的而言,它们是可以互换的。

[0603] #单行中列出的单一第一抗体(例如,HC1和LC1)的重链和轻链的改变可以如所列出的那样同时发生。然而,混合物中的第二抗体可以包含或不包含抗体2的同一行中列出的改变。在一些实施方案中,抗体可包含以两行或更多行列出的改变,例如重链中的105R/K和147R/K以及轻链中的43E/D和131E/D。

[0604] ⑥并非所有改变都适用于所有IgG亚型。

[0605] 当抗hCTLA4和/或抗hPD1抗体是抗体混合物的一部分时,不利于异二聚体的改变也可以包括在抗hCTLA4和/或抗hPD1抗体中(假设两种抗体都是IgG抗体)。在一个实施方案中,一种抗体可以是IgG4抗体(其在位点409具有天然存在的精氨酸)或已被改变以在位点409具有精氨酸的IgG1抗体,即该抗体具有K409R改变,另一种抗体具有399K/R和409D/E的改变。

[0606] 在一些实施方案中,抗体混合物中的抗hCTLA4抗体可包含一种或多种增加体内抗体清除的改变。这些改变可包括例如以下中的一种或多种:M252A、M252L、M252S、M252R、R255K和H435R。也可以使用具有这种效果的其他改变。如果抗体IgG恒定结构域内的特定改变具有增加例如特定人、人源化或灵长类IgG抗体的体内清除率(如上文所定义)的作用,则其在本文中定义为增加包含这种改变的恒定结构域的任何人、人源化或灵长类IgG抗体的体内清除的改变。

[0607] 制备抗体和抗体混合物的方法

[0608] 通常,可以通过将编码抗体的DNA导入宿主细胞,在适于细胞产生抗体的条件下培养宿主细胞,并从细胞团或细胞上清液中回收抗体来制备单个抗体。DNA可以通过转染、转化、电穿孔、微粒轰击、显微注射、脂质转染等引入。此后,可以纯化抗体以去除所需抗体之外的组分,例如,宿主细胞蛋白、培养基组分和/或不需要的抗体种(例如,不含两种重链和两种轻链的IgG抗体种类)。这些纯化步骤可包括例如选择性沉淀、柱层析、透析等。

[0609] 通过上述方法单独产生的抗体可以混合以产生混合物。或者,抗体混合物可以以类似的方式产生,除了可以同时或依次将编码两种抗体的DNA引入宿主细胞中外。由于混杂的HC/HC和HC/LC配对,含有编码两种不同IgG抗体(即两种不同的重链和轻链)的DNA的宿主细胞,可能潜在地产生多达十种不同的IgG抗体种类。为了限制该物种的数量,抗体可以包含HC和LC配偶体引导的改变和/或不利于异二聚体改变。这种改变可以限制宿主细胞产生的主要抗体种类的数量。可以如上所述纯化这种混合物。

[0610] 本领域技术人员将理解,相对于开发和运行两种商业生产方法,在单一宿主细胞系而非两种宿主细胞系中产生抗体混合物代表了生产的简易性和效率的显著增加。开发任何一种抗体的商业生产方法需要优化多种因素,包括例如表达系统、宿主细胞系(如果细胞系用于表达)、细胞培养过程(包括例如使用搅拌罐与灌注与许多其他培养方法的物理变量,以及用于培养宿主细胞系的培养基和饲养策略),以及抗体纯化和配制。此外,一旦开发出一个过程,就必须对其进行表征和验证,并将其转移到制造工厂,以实现当前的良好生产规范(cGMP)生产。参见例如Li等(2010),mAbs 2(5):466-477。因此,显然在单一过程中产生比在两个过程中的产生抗体混合物代表了生产的容易性和效率的显著增加,以及成本的显著降低。

[0611] 多核苷酸和载体

[0612] 提供了编码本文所述抗体和抗体混合物的多核苷酸,例如DNA或其他核酸。使用本文提供的指导,本领域技术人员可以组合编码抗体的已知的或新型的核酸序列并通过已知方法对其进行修饰以产生编码本文所述的包含VH和VL氨基酸序列的抗体和抗体混合物的多核苷酸。例如,在图3、4、7和8以及整个说明书中公开了这种VH和VL序列。在一些实施方案中,多核苷酸可编码HC和/或LC,其包含关于图3、4、7和8中公开的氨基酸序列的改变,例如

配偶体引导改变。这种改变可以是氨基酸取代。另外,此类多核苷酸可编码HC和/或LC,其包含可变结构域外的一个或多个配偶体引导改变和/或不利于异二聚体的一个或多个改变。

[0613] 编码本文所述的VH或VL的示例性核酸序列包括SEQ ID NO:1、6、11、14、18、22、26、29、32、35、38、41、44、48、51、53、57、60、63、66、68、71、86、91、96、100、103、106、109、113、116、118、121、123、125、128、132、135、138、140、143、145、147、151、153、155、157、159、161、163、165、167、184、186、188、190、192和194。编码人、哺乳动物和灵长类动物免疫球蛋白恒定结构域的许多核酸序列,例如CL、CH1、铰链、CH2和CH3是本领域已知的。参见例如,Kabat等(同上)。任选地,编码本文所述可变结构域的多核苷酸序列可与编码此类恒定结构域的多核苷酸序列组合以产生多种形式的抗体,例如IgG、IgM、IgD、IgE、IgA、双特异性形式、scFv、scFv-Fc、Fab、BiTE(scFc-接头-scFv)、Fab-scFv、IgG-scFv。在一些实施方案中,这些抗体可包含配偶体引导改变和/或不利于异二聚体的改变。

[0614] 在一些实施方案中,这些抗体可以是哺乳动物抗体,任选地人、人源化或灵长类动物抗体。修饰多核苷酸的方法是本领域熟知的。用于产生修饰的多核苷酸的最直接的方法可能是合成具有所需序列的多核苷酸。许多公司,例如DNA 2.0(Menlo Park, Calif., USA)、BlueHeron(Bothell, Washington)、Genewiz(South Plainfield, New Jersey)、Gen9(Cambridge, Massachusetts)和Integrated DNA Technologies(Coralville, Iowa),提供这项服务。也可以使用其他已知的引入突变的方法,例如使用聚合酶链式反应(PCR)的定点诱变。参见例如Zoller(1991), Curr. Opin. Biotechnol. 2(4):526-531; Reikofski和Tao(1992), Biotechnol. Adv. 10(4):535-547。

[0615] 含有编码本文所述抗体及其混合物的多核苷酸,任选DNA的载体可以是适合于在所选宿主细胞中表达抗体的任何载体。载体可包括选择标记,用于选择含有载体的宿主细胞和/或用于宿主细胞中载体的维持和/或扩增。这些标记包括,例如,(1)赋予抗生素或其他毒素抗性(例如氨苄青霉素、四环素或卡那霉素)的基因,用于原核宿主细胞,(2)补充细胞营养缺陷的基因,或(3)其操作提供了复杂或特定培养基无法获得的关键营养素的基因。特异性选择标记可以是卡那霉素抗性基因、氨苄青霉素抗性基因和四环素抗性基因。zeocin抗性或新霉素抗性基因也可用于在原核和真核宿主细胞中进行选择。如本领域已知的,二氢叶酸还原酶(DHFR)基因和/或无启动子胸苷激酶基因可用于哺乳动物细胞。参见例如,Kingston等,2002, AMPLIFICATION USING CHO CELL EXPRESSION VECTORS, Current Protocols in Molecular Biology,第16章,第16.23单元,Wiley 2002。

[0616] 另外,载体可含有维持载体所必需的一种或多种其他序列元件和/或编码本文所述抗体或抗体混合物的插入序列的表达。这些元件包括,例如,复制起点、启动子、一种或多种增强子、转录终止子、核糖体结合位点、聚腺苷酸化位点、外源序列的多接头插入位点(例如编码本文所述抗体或抗体混合物的DNA),以及两个插入序列之间的间插序列,例如编码HC和LC的DNA。可以选择这些序列元件在所需的宿主细胞中起作用,以促进载体的复制和/或扩增以及插入载体中的表达和异源序列的复制和/或扩增。这些序列元件在本领域中是公知的,并且可从大量商业上可获得的载体中获得。

[0617] 可以使用任何合适的方法将编码一种或多种抗体的DNA引入宿主细胞,包括例如转染、转导、脂质转染、转化、用微粒轰击、显微注射或电穿孔。在一些实施方案中,可以将编码两种全长抗体的DNA引入宿主细胞中。这些方法在本领域中是已知的,并且描述于例如

Kaestner等,(2015),Bioorg.Med.Chem.Lett.25:1171-1176,其通过引用并入本文。

[0618] 在一些实施方案中,编码抗体或抗体混合物的多核苷酸可以携带在一种或多种病毒载体,任选地溶瘤病毒载体上。此类病毒载体的实例包括腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体、逆转录病毒载体、痘苗病毒载体、改良型痘苗病毒安卡拉(MVA)载体、疱疹病毒载体、慢病毒载体、新城疫病毒载体、麻疹病毒载体、柯萨奇病毒载体、呼肠孤病毒载体和痘病毒载体。在此类实施方案中,可将包含编码本文所述抗体或抗体混合物的多核苷酸的这些病毒载体给予患者以治疗疾病。例如,在癌症患者中,含有编码抗体或抗体混合物的多核苷酸的此类病毒载体可以直接施用于患者的肿瘤或癌细胞的主要部位,例如通过注射、吸入(用于肺癌)。在许多可能性中,局部给药(用于皮肤癌)和/或给予粘膜(通过使用核酸可被吸收)。或者,此类病毒载体可以全身施用,例如口服、局部、通过粘膜、或通过如本文所述的皮下、静脉内、动脉内、肌肉内或腹膜内注射。类似地,可以将编码可以包封在脂质体中的如本文所述的抗体混合物的多核苷酸给予患有疾病的患者。

[0619] 药物组合物和给药方法

[0620] 本文所述的抗体、抗体混合物、多核苷酸和载体可以以药学上可接受的制剂给药。许多药物制剂是本领域已知的。许多这样的制剂描述于REMINGTON:THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY,第21版,Lippincott Williams&Wilkins,Philadelphia,PA,2005,其相关部分通过引用并入本文。这种药学上可接受的制剂可以是例如,如溶液或悬浮液的液体,如丸剂、胶囊、糊剂或凝胶的固体。液体制剂可含有例如一种或多种下列组分:缓冲剂、赋形剂、盐、糖、去污剂和螯合剂。它可以设计成保留抗体、抗体混合物、多核苷酸或载体的功能并且被患者良好耐受。

[0621] 与口服相反,多核苷酸和蛋白质如抗体通常肠胃外给药。取决于制剂,口服给药可使蛋白质或多核苷酸经受胃的酸性环境,这可使蛋白质或多核苷酸失活。在一些实施方案中,特定制剂可以允许口服施用特定蛋白质或多核苷酸,其中蛋白质或多核苷酸对胃酸不敏感或者充分保护免受酸性环境的影响,例如通过药丸或胶囊上的特定包衣。制剂也可以通过粘膜给药,包括例如鼻内、阴道、直肠或口服给药,或作为吸入剂给药。在一些实施方案中,制剂也可以局部给药。通常,通过注射液体制剂来施用抗体和多核苷酸。注射可以是例如皮下、静脉内、动脉内、病灶内(例如肿瘤内)、肌肉内或腹膜。

[0622] 含有编码抗体或抗体混合物的多核苷酸的宿主细胞

[0623] 含有一种或多种编码一种或多种抗体的多核苷酸的宿主细胞可以是适合于表达重组蛋白的多种细胞中的任何一种。这些包括,例如,革兰氏阴性或革兰氏阳性原核生物,例如,诸如大肠杆菌、枯草芽孢杆菌或鼠伤寒沙门氏菌的细菌。在其他实施方案中,宿主细胞可以是真核细胞,包括诸如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)或克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)、假丝酵母属(*Candida*)、*Spodotera*属的真核生物或任何能够表达异源多肽的细胞。在进一步的实施方案中,宿主细胞可以是哺乳动物细胞。许多适于表达异源多肽的哺乳动物细胞系是本领域已知的,并且可以从多种供应商获得,包括例如美国典型培养物保藏中心(ATCC)。合适的哺乳动物宿主细胞系包括,例如,COS-7系(ATCC CRL 1651)(Gluzman等,1981,Cell 23:175)、L细胞、C127细胞、3T3细胞(ATCC CCL 163)、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或其变体如Veggie CHO和相关细胞系(其在无血清培养基(Rasmussen等,1998,Cytotechnology 28:31)中培养)、CHO-K1和

CHO pro-3的变体如DUKX-X1 1和DG44细胞系(其缺乏二氢叶酸还原酶(DHFR)活性)、HeLa细胞、幼仓鼠肾(BHK)细胞(如ATCC CRL 10)、CVI/EBNA细胞系变体(来自非洲绿猴肾细胞系CVI(ATCC CCL 70),如McMahan等,1991,EMBO J.10:2821所述)、人胚肾(HEK)细胞如293、293EBNA或MSR 293、人表皮A431细胞、人Co1o205细胞、HL-60细胞、U937细胞、HaK细胞、Jurkat细胞、HepG2/3B细胞、KB细胞、NIH 3T3细胞、S49细胞和小鼠骨髓瘤细胞(包括NS0和Sp2/0个细胞)。也可以使用能够表达异源多肽的其他原核、真核或哺乳动物细胞类型。

[0624] 治疗方法

[0625] 抗hCTLA4抗体、抗hPD1抗体、其混合物和/或编码本文所述抗体或混合物的多核苷酸,任选地包含在一种或多种载体(例如溶瘤病毒载体)内,可用于增强免疫应答和/或治疗各种病症,包括感染、免疫缺陷病和各种癌症,如黑色素瘤、非小细胞肺癌、头颈部鳞状细胞癌、小细胞肺癌、胃癌、膀胱癌、透明细胞肾癌和霍奇金淋巴瘤。如本文所述,是否已增强免疫应答可通过混合淋巴细胞反应(MLR)测定来评估,如下文实施例8中所述。

[0626] 抗hCTLA4抗体、抗hPD1抗体、其混合物和/或编码此类抗体或混合物的多核苷酸可以与另外的治疗剂一起施用,所述另外的治疗剂在抗体、抗体混合物、或多核苷酸之前、之后和/或同时施用。另外的治疗剂可以选自由以下组成的组:免疫调节分子、放射治疗剂、化学治疗剂、靶向生物制剂、靶向抑制剂和/或溶瘤病毒。

[0627] 在一些实施方案中,另外的治疗剂可以是PDL1、TIGIT、CCR4、CCR8、CSFR1a、B7H3、B7H4、CD96或CD73的拮抗剂,GITR、41BB、OX40或CD40的激动剂,溶瘤病毒(如talimogene laherparepvec(IMLYGICTM)),双特异性T细胞衔接器(BiTE)(如blinatumomab),吲哚胺2,3双加氧酶(IDO)抑制剂,抗血管生成剂(如贝伐单抗),抗体-药物偶联物或酪氨酸激酶抑制剂。

[0628] 如果另外的治疗剂是化学治疗剂,它可以是,例如白消安、替莫唑胺、环磷酰胺、洛莫司汀(CCNU)、链脲佐菌素、甲基阿莫司汀、顺-二氨二氯铂、硫嘧啶、氮丙啶基苯并醌、顺铂、卡铂、盐酸美法仑、苯丁酸氮芥、异环磷酰胺、盐酸氯噻嗪、卡莫司汀(BCNU)、阿霉素(多柔比星)、道诺霉素、光霉素、柔红霉素、伊达比星、丝裂霉素C、博来霉素、长春新碱、长春地辛、长春碱、长春瑞滨、紫杉醇、多西紫杉醇、VP-16、VM-26、有或没有甲酰四氢叶酸的甲氨蝶呤、有或没有甲酰四氢叶酸的5-氟尿嘧啶、5-氟脱氧尿苷、5-氟尿嘧啶、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、吉西他滨、阿糖胞苷、5-氮杂胞苷、羟基脲、脱氧同型霉素、氟达拉滨、依托泊苷、伊立替康、托泊替康、放线菌素D、达卡巴嗪(DTIC)、mAMSA、丙卡巴肼、六甲基三聚氰胺、五甲基三聚氰胺、L-天冬酰胺酶、米托蒽醌。参见例如Cancer:Principles and Practice of Oncology,第4版增补版,DeVita等编著,J.B.Lippincott Co.,Philadelphia,Pa.(1993),其相关部分通过引用并入本文。

[0629] 关于抗体或其混合物,它们可以以适当的间隔以治疗有效剂量给予患者。例如,单剂量的单一抗体或抗体混合物可以是约0.01毫克/千克体重(mg/kg)至约50mg/kg、约0.05mg/kg至约10mg/kg、约0.1mg/kg至约10mg/kg、或约0.5mg/kg至约7mg/kg。单剂量可以是约0.05mg/kg、0.1mg/kg、0.5mg/kg、1mg/kg、2mg/kg、3mg/kg、4mg/kg、5mg/kg、6mg/kg、7mg/kg、8mg/kg、9mg/kg或10mg/kg的剂量。类似地,单剂量的抗体或抗体混合物可以是约0.37毫克/平方米的皮肤表面积(mg/m²)至约1850mg/m²、约0.5mg/m²至约370mg/m²、约3.7mg/m²至约370mg/m²、或约18.5mg/m²至约259mg/m²。单剂量可为约10mg/m²、20mg/m²、

37mg/m²、74mg/m²、111mg/m²、148mg/m²、185mg/m²、229mg/m²、259mg/m²、296mg/m²、333mg/m²、或370mg/m²。类似地,单剂量的抗体或抗体混合物可以约0.62mg至约3100mg、约1mg至约620mg、约6.2mg至约620mg、或约10mg至约434mg的剂量施用。单剂量可以是约0.5、1、3、6、10、15、20、25、30、35、40、45、50、60、70、80、90或100mg。

[0630] 抗体的剂量、抗体的混合物或编码它们的多核苷酸可以在一段时间内施用一次或两次或以一定的时间间隔施用。例如,剂量可以每天、每隔一天、每周两次、每周一次、每十天一次、每两周一次、每三周一次、每月一次、或每二、三、四、五、六、七八、九、十、十一或十二个月一次。给药可以持续例如约一至四周、约一至六个月、约六个月至一年、约一至两年、或长达五年。在某些情况下,可以停止并重新开始给药。在一些实施方案中,可以施用包含抗hCTLA4和抗hPD1抗体的混合物,使得两种抗体可以同时施用。在一次或多次剂量的混合物后,可以单独施用抗hPD1抗体。在一些实施方案中,用抗hPD1抗体给药可以持续一段时间。在一些实施方案中,可中断给予抗体或抗体混合物并重复一次或多次。

[0631] 在编码本文所述抗体或抗体混合物的一种或多种多核苷酸的情况下,剂量可以是,例如,每千克体重约 5×10^9 个拷贝的多核苷酸(拷贝/kg)至约 10^{15} 拷贝/kg,约 10^{10} 拷贝/kg至约 10^{14} 拷贝/kg,或约 5×10^{10} 拷贝/kg至约 5×10^{13} 拷贝/kg。或者,剂量可为约 10^{10} 、 10^{11} 、 10^{12} 、 10^{13} 、 5×10^{13} 、 10^{14} 、 2×10^{14} 、 3×10^{14} 、 4×10^{14} 、 5×10^{14} 、 6×10^{14} 、 7×10^{14} 、 8×10^{14} 、 9×10^{14} 或 10^{15} d的多核苷酸拷贝。可以根据需要调整给药频率,并且可以如上所述,或者例如每天、每隔一天、每周两次、每周一次、每十天一次、每两周一次、每三周一次,每月一次,或每两、三、四、五、六、七、八、九、十、十一或十二个月一次。

[0632] 已经在上面概括地描述了本发明,提供以下具体实施例来举例说明本发明,而不是限制其范围。应当理解,可以对本发明进行各种改变和修改,这些改变和修改符合本文所述的本发明的精神,并且对于本领域技术人员来说是显而易见的。这些改变和修改在本文所述的本发明的范围内,包括在所附权利要求中。

[0633] 实施例

[0634] 实施例1:制备抗hCTLA4抗体

[0635] 编码在选定位点随机化的各种抗hCTLA4 Fab片段的DNA文库如下产生。该文库基于人种系VH(IGHV3-33*01-IGHJ4*01)和VL(IGKV3-20*01-IGKJ3*01)框架区。重叠的69至99个碱基的单链寡核苷酸用于组装编码重链和轻链可变区的cDNA。使用简并合成寡核苷酸,将八个和五个保守随机化密码子分别引入编码VH和VL的DNA中。将保守随机化的密码子随机化,使得预期仅随机化产生保守氨基酸取代。例如,编码甘氨酸的G-G-C密码子可以使用A/G-C/G-C保守随机化,以编码甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸或苏氨酸。将寡核苷酸混合并通过多核苷酸链式反应(PCR)分别组装成VH和VL文库。编码CL κ (Ck)片段的DNA,接着是自切割2A肽(Pep2A;参见例如, Kim等, (2011), PLOS ONE, <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0018556>)使用gBlock[®](Integrated DNA Technologies (IDT), Coralville, Iowa, USA)作为PCR的模板扩增下游VH的信号肽。通过IDT合成所有寡核苷酸。用Pfu DNA聚合酶进行所有扩增。

[0636] 为了在酵母中展示随机化Fab片段的文库,用线性化载体电穿孔酿酒酵母细胞,所述载体具有在一端编码信号肽SP1的序列(其前面是半乳糖诱导型启动子)和在另一端编码CH1的序列(然后是编码凝集素的序列加上上述三种PCR片段编码(1)SPI-VL-Ck(部分), (2)

Ck-R6-Pep2A-SP2和(3)SP2-VH-CH1(部分),其中VL和VH在选定的位点保守随机化。PCR片段(1)与载体的SP1末端和PCR片段2的Ck末端重叠。PCR片段(2)的SP2末端在其SP2末端与PCR片段3重叠,PCR片段3的CH1末端在其CH1末端与载体重叠。由于所有这些重叠都在30至60个碱基对的范围内,酵母中的同源重组使得片段能够组装成含有具有以下序列元件顺序的插入物的单个载体:SP1-VL-Ck-R6-Pep2A-SP2-VH-CH1-HA-凝集素,其中R6编码六个连续的精氨酸残基,HA是HA标签,即衍生自人流感血凝素的小肽,其已广泛用作蛋白质标签。这些序列的表达由SP1上游的半乳糖诱导型启动子驱动。转化体在选择性琼脂平板上生长,所述琼脂平板由含有右旋糖和缺乏尿嘧啶的酵母培养基制成。该载体含有补充宿主酵母菌株不能制备尿嘧啶的基因。文库大小,即转化体的总数,在约 2×10^8 至 3×10^8 个转化体的范围内。估计的文库复杂性小于约 10^7 ,这意味着在每个文库中存在少于约 10^7 个编码Fab片段的核苷酸序列的不同组合。这些估计是基于在变化的位点进行保守随机化时可能发生的组合的数量。

[0637] 为了评估文库的实际多样性和质量,检查了编码来自50个随机挑选的酵母克隆的Fab片段的DNA片段。通过酵母菌落PCR扩增这些克隆的VH和VL DNA片段,并由Genewiz Inc.,Seattle,WA测序。参见例如,Dudaite等,(2015),Direct PCR from Yeast Cells,Application Note,Thermo Scientific。DNA序列分析显示,70%的序列编码框内VH和CH1以及框内VL和CL,编码VH和VL的DNA包含靶向位点的设计和预期变异。

[0638] 为了筛选文库,酿酒酵母细胞在缺乏尿嘧啶并含有右旋糖的培养基中生长,将细胞离心并重悬于缺乏尿嘧啶并含有半乳糖的培养基中以诱导Fab表达。用对HA标签特异的ALEXA FLUOR 488标记的抗体和链霉抗生物素蛋白-别藻蓝蛋白(链霉抗生物素蛋白-APC)和生物素化的hCTLA4:Fc融合蛋白的复合物标记酵母细胞,即与Fc区融合的hCTLA4的细胞外区域。为了同时检测细胞显示的Fab水平和由展示的Fab片段结合的hCTLA4水平,检测IgG1的水平。用抗HA标签抗体和链霉抗生物素蛋白-APC与无关的生物素化蛋白质(生物素化的PD1)的复合物标记阴性对照。样品在FACSARIA™流式细胞仪(BD Biosciences, San Jose, California)上分选,具有如图9所示的分选窗口,并以4,000个细胞/秒的事件速率收集。在第一轮荧光激活细胞分选(FACS)期间筛选总共 1×10^8 个细胞,并收集群落的0.5%。收集的细胞在30°C下在含有葡萄糖和缺乏尿嘧啶的酵母培养基制成的琼脂平板上生长。将来自这些平板的酵母细胞刮入含有右旋糖和缺乏尿嘧啶的液体培养基中,并在30°C下培养,然后在含有半乳糖和缺乏尿嘧啶的液体培养基中诱导用于下一轮分选。进行两轮分选。第一轮是在富集模式下进行的,即使用快速分选速度进行分选,使用500nM的链霉抗生物素蛋白-APC复合物和生物素化的hCTLA4:Fc进行标记,第二轮以纯化方式完成,即使用慢速分选速度完成,并使用0.6nM链霉抗生物素蛋白-APC和生物素化的hCTLA4复合物进行标记。图9显示阴性对照和第一轮和第二轮细胞分选的FACS分析。图9中标有“PS”的多边形表示门控排序窗口。

[0639] 为了增加获得真阳性的机会,将收集的细胞第三次重新分选并铺在用含有葡萄糖但缺乏尿嘧啶的培养基制成的琼脂平板上以获得单个菌落。为了证实在从第三轮获得的酵母细胞上表达的Fab片段可以与hCTLA4结合,随机挑选96个这些酵母菌落,诱导,并使用链霉抗生物素蛋白-APC和生物素化的hCTLA4:Fc的复合物进行FACS分析。ALEXAFLUOR®标记的HA标签特异性抗体。在这些酵母克隆中,95%结合hCTLA4:Fc和HA标签特异性抗体。

DNA测序显示,这些酵母克隆中有40%表达具有独特序列的Fab片段。为了鉴定最强的hCTLA4结合物,使用不同浓度的生物素化的hCTLA4:Fc对32个显示与hCTLA4:Fc强烈结合并且还表达具有独特VH/VL序列的Fab片段的酵母克隆进行额外的FACS分析,以鉴定可以在最低浓度结合hCTLA4:Fc的那些。

[0640] 通过将编码来自单个克隆的VH的DNA插入编码信号肽V κ 102/012和其余部分的哺乳动物表达载体,将来自显示与hCTLA4:Fc最强结合的12个酵母克隆的Fab片段转化为人IgG1 HC形式,并将编码来自相同克隆的VL的DNA插入编码信号肽V κ 102/012和C κ 结构域的另一哺乳动物表达载体中。大肠杆菌细胞用连接的混合物转化,通过DNA测序鉴定含有正确重链和轻链序列的细菌克隆。将编码正确重链和轻链序列的哺乳动物表达构建体共转染到EXPI293TM细胞中(ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA),并在有利于表达的条件下培养所得的转染子。使用蛋白A柱纯化得到的细胞上清液中的抗体。转化为IgG1形式的12个Fab片段的VH和VL的氨基酸序列示于图3和4中。如这些图中所示,这些抗体在本文中称为1E1、2F1、3G1、4H1、5B2、6E3、7A4、8B4、9C4、10D4、11F4和12G4抗体。VH和VL CDR的氨基酸序列分别显示在图1和2中。

[0641] 实施例2:制备抗hPD1抗体

[0642] 为了选择抗hPD1抗体,以与上述抗hCTLA4抗体基本相同的方式构建,分类和测试文库,除了分别将9和7个保守随机化密码子引入编码VH和VL的DNA中。

[0643] 如上所述,FACS用于选择表达与hPD1结合的Fab片段的酵母细胞,用于抗hCTLA4抗体,除了少数例外。通过将编码hPD1的细胞外区域的DNA与六组氨酸标签和AVITAGTM(Avidity L.L.C., Colorado, USA)融合来制备生物素化的单价hPD1。通过共转染编码BirA生物素-蛋白质连接酶和hPD1-His6-AVITAGTM融合蛋白的质粒DNA并在生长培养基中加入生物素,使hPD1-His6-AVITAGTM融合蛋白在体内生物素化。通过镍-次氨基三乙酸(Ni-NTA)琼脂糖柱纯化生物素化的hPD1-His6-AVITAGTM融合蛋白。使用该生物素化的hPD1蛋白代替生物素化的hCTLA4:Fc。使用500nM、5nM和0.05nM生物素化的hPD1连续进行总共3轮分选,用于在第一轮、第二轮和第三轮中进行标记。如在抗hCTLA4选择中,使用不相关的生物素化蛋白质进行阴性对照。这些FACS分析的结果显示在图10中。前两种分类是在富集模式下完成的,即分选速度快,最后一种分类是在净化模式下完成的,即分选速度慢。

[0644] 在第三轮之后,将收集的细胞重新分选并铺板在用含有右旋糖和缺乏尿嘧啶的酵母培养基制成的琼脂平板上。随机挑取300个菌落,在含有右旋糖和缺乏尿嘧啶的培养基中培养,在含有半乳糖和缺乏尿嘧啶的培养基中诱导,并如上所述通过FACS分析。通过PCR反应扩增编码每个单个克隆的VL和VH的DNA并测序。在300个菌落中,95%产生通过FACS测定结合hPD1的Fab片段,50%含有编码独特Fab片段的DNA。

[0645] 为了进一步表征Fab片段,表达独特抗hPD1 Fab片段的酵母细胞在含有半乳糖且缺乏尿嘧啶的培养基中生长。将细胞在75°C加热5分钟,然后用生物素化的hPD1染色,接着用链霉抗生物素蛋白-APC染色。此后,对细胞进行FACS分析。通过在FACS分析之前滴定加入细胞的hPD1的量来鉴定产生具有最强hPD1结合的Fab片段的100个酵母克隆。在低hPD1浓度下产生hPD1结合强信号的那些克隆被认为是强结合物。

[0646] 选择表现出良好温度稳定性和与hPD1强结合的15个Fab片段用于转化为人IgG4形式。这些Fab片段的VH和VL的氨基酸序列示于图7和8中。如这些图中所示,这些抗体在本文

中用1至15的数字表示。VH和VL CDR的氨基酸序列分别显示在图5和6中。

[0647] 基本上如上文针对抗hCTLA4抗体所述产生抗hPD1抗体,不同之处在于将编码VH的DNA插入编码人IgG4抗体的CH1、铰链、CH2和CH3的载体中,而不是人IgG1抗体。

[0648] 实施例3:抗hCTLA4抗体与细胞表面表达的hCTLA4的结合

[0649] 进行以下实验以确定当在细胞表面上表达时,如实施例1中所述选择的抗hCTLA4抗体是否可以结合hCTLA4。将表达hCTLA4 (Promega CS186907) 的约 1×10^5 个Jurkat T细胞在含有不同浓度的所选抗hCTLA4抗体的微量滴定板的孔中在4°C下在FACS缓冲液(0.1% NaN_3 和2% BSA,在磷酸盐缓冲盐(PBS,其含有137mM NaCl、2.7mM KCl、10mM Na_2HPO_4 和1.8mM K_2HPO_4)中)中温育30分钟。洗涤后,用异硫氰酸荧光素(FITC) (抗hIgG-FITC) 标记的多克隆抗hIgG (Fc特异性) 抗体检测表面结合的抗hCTLA4抗体。通过流式细胞术分析检测抗hCTLA4抗体的结合。使用FlowJo软件(FlowJo, L.L.C., Ashland, OR, USA) 报告结果的几何平均荧光强度(MFI)。使用GraphPad Prism软件(GraphPad, Inc., La Jolla, CA, USA) 从这些数据计算 EC_{50} 值,并显示在下表10中。

[0650] 表10. 抗hCTLA4抗体与细胞表面表达的hCTLA4结合的 EC_{50}

抗体	EC_{50} (pM)
1E1	696.8
2F1	276.3
3G1	3101.0
4H1	189.1
5B2	2927.0
6E3	437.0
7A4	217.2
8B4	384.0
9C4	472.7
10D4	85.0
11F4	157.9
12G4	150.2

[0652] 这些数据表明所有12种抗体都能够与细胞表面表达的CTLA4结合,尽管在该测定中测量的结合强度存在差异。

[0653] 实施例4:抗hCTLA4抗体抑制hCTLA4与hB7-1/hB7-2的结合

[0654] 在两种不同的测定系统中评估阻断或抑制hCTLA4与其配体hB7-1和/或hB7-2通过抗hCTLA4抗体的相互作用。

[0655] 在第一个测定中,评估了hCTLA4与Raji细胞表面上表达的hB7-1和hB7-2结合的抑制。Raji细胞是人类细胞,表达高水平的hB7-1和hB7-2。将包含与Fc片段融合的hCTLA4的细胞外结构域(CTLA4-ECD_Fc)的可溶形式的hCTLA4在室温下(RT)在FACS缓冲液在不同浓度的选定的抗hCTLA4抗体的微量滴定板中预温育。30分钟后,向每个孔中加入 1×10^5 个Raji细胞并再温育30分钟。用非阻断性抗CTLA4抗体(用PerCP-eFluor[®]710标记的抗人CD152(CTLA4) (克隆14D3), Affymetrix eBioscience目录号46-1529) 检测与Raji细胞结合

的CTLA4-ECD_Fc。通过流式细胞术分析检测结合的CTLA4-ECD_Fc的水平,并且报道CTLA4-ECD_Fc的结合为MFI。使用GraphPad Prism软件(GraphPad, Inc., La Jolla, CA, USA) 计算 IC_{50} 。

[0656] 表11. 在Raji细胞上抑制hCTLA4与hB7-1/hB7-2结合的 IC_{50}

抗体	IC_{50} (nM)
1E1	6.3
2F1	9.1
3G1	3.5
4H1	8.2
5B2	11.5
6E3	14.1
7A4	19.8
8B4	3.8
9C4	15.7
10D4	3.3
11F4	7.5
12G4	3.5

[0658] 在第二次抑制测定中,CTLA4双细胞报道分析(Promega CS186907)用于评估抗CTLA4抗体对CTLA4活性的功能影响。在该测定中,Jurkat细胞的抗CD3活化,其是表达由IL-2启动子驱动的荧光素酶报告基因的人细胞,诱导荧光素酶产生,其可被在同一Jurkat细胞上表达的hCTLA4的参与的hB7-1或hB7-2(来自添加的Raji细胞)抑制。结合hCTLA4并抑制或阻断hB7-1或hB7-2结合的抗CTLA4抗体除去阻断IL-2途径的抑制信号,从而在双细胞报告系统中恢复荧光素酶信号。

[0659] 该测定基本上根据制造商的说明如下文所述。将在测定培养基(含有10%胎牛血清(FBS)的RPMI 1640培养基(参见例如ATCC 30-2001™))中表达CTLA4的工程化Jurkat T细胞分配到半区96孔板中(Costar,目录数字3688)使用15 μ L/孔的 5×10^4 个细胞。在单独的微量滴定板中,制备每种测试抗体的连续稀释液。然后,含有Jurkat T细胞的每个孔接受两次15 μ L添加,一个含有测试抗体稀释液,另一个含有 5×10^4 个Raji细胞(其表达hB7-1和hB7-2)和抗CD3抗体。将微孔板在37°C, 5%CO₂中温育16小时。孵育后,按照制造商的说明将40 μ L Bio-Glo™试剂(Promega,目录号G7941)加入每个孔中。使用EnVision 2103Multilabel Reader(PerkinElmer)检测荧光素酶活性。将数据绘制为相对发光单位(RLU)并使用GraphPad Prism软件分析以确定 IC_{50} 值。下面的图11和表12显示,与不结合CTLA4的阴性对照抗体(同种型匹配的对照)相比,所有12种抗hCTLA4抗体引起荧光素酶表达增加。这些数据强烈表明测试的抗hCTLA4抗体抑制hCTLA4与hB7-1和/或hB7-2的相互作用,从而降低IL-2途径的功能抑制。抗体10D1是用作阳性对照的抗hCTLA4抗体(ipilimumab)。

[0660] 表12:抑制hCTLA4与hB7-1/B7-2相互作用的 IC_{50}

抗hCTLA4抗体	IC_{50} (nM)
1E1	28.19
2F1	20.53

3G1	>340
4H1	73.75
5B2	>340
6E3	29.96
7A4	10.86
8B4	19.01
9C4	25.32
10D4	6.123
11F4	7.393
12G4	13.94
10D1	5.19

[0662] 实施例5:抗hCTLA4抗体对T细胞活化的影响

[0663] 在体外葡萄球菌肠毒素B (SEB) T细胞活化测定中测试所选抗hCTLA4抗体增强T细胞活化的能力。来自三个不同供体的人外周血单核细胞 (PBMC) 在完全RPMI-1640培养基 (Invitrogen RPMI-1640加5%FBS) 中用0.5 μ g/ml OKT3 (一种可激活T细胞的抗CD3抗体) 预活化3天。收获PBMC (主要由第3天的活化T细胞组成), 用温热的培养基洗涤三次, 并静置2天。然后使用 3×10^4 细胞/孔将静置的预活化的PBMC分配在96孔微量滴定板的孔中。此后, 对每个孔进行以下添加: SEB至终浓度为100ng/ml, 1×10^4 个PBMC, 其先前已经耗尽自体CD3+T细胞, 并且不同浓度的每种抗体被测试。两天后收获培养物上清液, 通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 测定IL-2的水平。

[0664] 下面的图12和表13显示来自单个供体的一式两份样品的结果 (这是与其他供体进行的实验的代表)。这些结果表明, 所有测试的抗hCTLA4抗体都能够增加IL-2的产生。在测试的抗体中, 10D4是最有效的。命名为10D1的抗体是用作阳性对照的抗hCTLA4人IgG1 κ 抗体 (ipilimumab)。

[0665] 表13:产生IL-2的EC₅₀

抗体	EC ₅₀ (nM)
1E1	293
2F1	170
7A4	363
8B4	319
10D4	63
11F4	214
10D1	280

[0667] 实施例6:抗hPD1抗体与细胞表面上表达的hPD1的结合

[0668] 以下实验测试了所选择的抗hPD1抗体是否可以结合活化T细胞表面上表达的天然PD1。用浓度为1 μ g/ml的OKT3 (抗CD3抗体) 预活化人PBC。三天后, 使用 0.1×10^6 个细胞/孔将PBMC (此时主要是活化的T细胞) 分配到96孔微量滴定板中。将不同浓度的所选抗hPD1抗体加入孔中, 并将板在4 $^{\circ}$ C下在FACS缓冲液中孵育30分钟 (如实施例3中所述)。抗体结合CD4⁺T细胞和CD4-T细胞 (其主要是CD8⁺T细胞) 使用抗hIgG-FITC和用别藻蓝蛋白 (抗CD4-APC) 标

记的抗CD4抗体检测。

[0669] 通过流式细胞术 (FACScalibur, BD) 分析样品, 并将结合报告为MFI。使用GraphPad Prism软件计算用于结合的 EC_{50} 。数据报告于下表14中。

[0670] 表14: 抗hPD1抗体与T细胞上表达的hPD1的结合蛋白的 EC_{50} 值

[0671]

抗体	EC_{50} (pM)	
	CD4 ⁺ 细胞	CD4 ⁻ 细胞
抗hPD1 #1	918.0	1368.0
抗hPD1 #2	398.0	416.0
抗hPD1 #3	536.2	689.5
抗hPD1 #4	672.1	884.9
抗hPD1 #5	974.4	1123.0
抗hPD1 #6	667.5	616.5
抗hPD1 #7	439.1	569.2
抗hPD1 #8	646.8	903.9
抗hPD1 #9	1010.0	1484.0
抗hPD1 #10	1067.0	1605.0
抗hPD1 #11	33737.0	24657.0
抗hPD1 #12	849.1	1158.0
抗hPD1 #13	997.7	1463.0
抗hPD1 #14	389.9	449.3
抗hPD1 #15	720.1	627.5

[0672] 这些数据显示, 所有测试的抗hPD1抗体都可以与T细胞上表达的hPD1结合, 尽管在该测定中观察到 EC_{50} 有变化。

[0673] 实施例7: 抗hPD1抗体对hPD1/hPDL1相互作用的抑制

[0674] 使用两种不同的测定来评估抗hPD1抗体抑制hPD1与其配体hPDL1相互作用的能力。双细胞报告基因测定法测试了所选抗hPD1抗体抑制由hPDL1与hPDL1相互作用介导的hPD1功能的能力 (Promega目录号J1250, 原目录号CS187106)。使用 **ALPHALISA[®]** (PerkinElmer) 测量所选抗hPD1抗体抑制hPDL1与hPD1结合的能力。

[0675] PD1双报告分子测定系统依赖于以下事实: PDL1与在T细胞上表达的PD1的相互作用抑制由抗CD3抗体活化诱导的T细胞中活化T细胞 (NFAT) 基因的核因子的启动子的转录。测定中使用的T细胞在其细胞表面上表达hPD1并含有荧光素酶基因, 其表达由NFAT启动子驱动。如果细胞表面的hPD1被hPDL1参与, 则荧光素酶的产生将被抑制。当抗hPD1抗体阻止hPDL1与hPD1的结合时, 这种抑制将被逆转。

[0676] 测定如下进行。表达hPDL1和抗CD3的CHO-K1细胞 (参见例如 **ATCC[®]** CCL-61TM) (每孔 4×10^4 个细胞, 在50 μ L具有10%FBS的F-12培养基中 (参见, 例如, **ATCC[®]** 30-2004TM)) 分

配到半区域96孔板 (Costar, 3688) 中并孵育过夜。在第二天的单独的平板中, 在68nM的浓度下, 在测定培养基 (含有2%FBS的RPMI 1640) 中一式两份地制备每种测试抗体的两倍系列稀释液。然后取出含有CHO-K1细胞的每个孔的培养基, 并用含有稀释的测试抗体和20 μ L表达hPD1并含有NFAT-荧光素酶报告基因的Jurkat T细胞 (4×10^4) 的平板的孔中的20 μ L替换。将板在37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂中温育6小时。孵育后, 根据制造商的说明向每个孔中加入38 μ L Bio-GloTM试剂 (Promega目录号G7941)。在EnVision Multilabel Reader (PerkinElmer) 上读取荧光素酶活性。将数据绘制为RLU并使用GraphPad Prism软件 (GraphPad, Inc., La Jolla, CA, USA) 分析以确定IC₅₀值。

[0677] 数据显示在下面的图13和表15中。与同种型对照10D1 IgG4 (其为抗CTLA4抗体) 相比, 所有10种测试的抗hPD1抗体均抑制PD1/PDL1相互作用。测试的抗体比具有nivolumab (即Nivo G4, 一种抑制PD1/PDL1相互作用的IgG4抗hPD1抗体) 的可变结构域的一种阳性对照抗体更有效。

[0678] 表15: 抑制PD1/PDL1相互作用的IC₅₀

抗体	IC ₅₀ (nM)
抗PD1##1	1.181
抗PD1#2	2.453
抗PD1##3	2.37
抗PD1#4	2.032
抗PD1##5	3.004
抗PD1##6	3.848
抗PD1#7	2.392
抗PD1#9	3.135
抗PD1#10	2.691
抗PD1#14	2.694
NivoG4	4.587

[0680] 还使用ALPHALISA测定法 (PerkinElmer, USA) 测试选择的抗hPD1抗体抑制hPD1与其配体hPDL1的相互作用。简言之, 10 μ L含有可溶性生物素化形式的PD1蛋白 (其在体内生物素化 (参见, 例如, Ashraf等, (2004), Protein Expr. Purif. 33(2):238-245) 并仅含有细胞外区域)。在 **ALPHALISA[®]** 免疫测定缓冲液 (目录号AL000, PerkinElmer) 中将含有不同浓度的抗hPD1抗体的10 μ L混合在96孔半区域板 (PerkinElmer, USA) 的孔中, 并在室温下孵育1小时。然后加入可溶性谷胱甘肽S-转移酶 (GST) 标记的人PDL1 (仅含有细胞外结构域; 10 μ L浓度为1nM), 并将混合物在室温下再温育1小时。接下来, 加入10 μ L的GST受体珠 (其可以结合GST标记的PDL1) 至终浓度为16 μ g/mL, 并将板在室温下振荡1小时。最后, 加入10 μ L链霉抗生物素蛋白供体珠 (其可结合生物素化的hPD1) 以使供体珠的最终浓度达到16 μ g/mL, 并将板在室温下在室温下温育1小时。如果hPD1和hPDL1结合或相互作用, 供体和受体珠将彼此靠近, 因此应检测到信号。抑制这种相互作用或结合的抗体将减少该信号, 因为抑制性抗体阻止供体和受体珠的物理接近。

[0681] 在EnVision 2103Multilabel Reader (PerkinElmer) 中使用波长为680nm的照射

并读取波长为约615nm的发射来读板。绘制结果并使用GraphPad Prism软件计算 IC_{50} 值。结果显示在下面的图14和表16中。

[0682] 表16:抑制PD1/PDL1相互作用的 IC_{50}

抗体	IC_{50} (nM)
抗PD1#1	0.1966
抗PD1#3	0.3055
抗PD1#4	0.3143
抗PD1#7	0.3070
抗PD1#10	0.2789
Nivo-G4	0.3255
Pembro-G4	0.3997

[0684] 这些数据表明,测试的抗体能够更有效地抑制hPDL1与hPD1的结合,两种抗hPD1抗体Nivo-G4和Pembro-G4用作阳性对照。

[0685] 实施例8:在混合淋巴细胞反应 (MLR) 测定中测试抗hPD1抗体

[0686] 在MLR测定中测试所选抗hPD1抗体在增强T细胞活化中的效力。简言之,单核细胞衍生的未成熟树突细胞 (iDC) 用作刺激物。为了制备iDC,使用人单核细胞分离试剂盒 (Miltenyi) 从PBMC中分离单核细胞,并在含有800U/mL粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 和500U/mL白细胞介素4 (IL-4) 的完全RPMI培养基中培养6天。此后,来自培养的单核细胞 (现在主要是iDC) 的 2×10^4 个细胞在选定的抗hPD1抗体存在下在1°C下与 1×10^5 同种异体CD3⁺T细胞一起在37°C下在96平底板中培养。预期iDC将激活T细胞,并且如果阴性PD1途径未通过在T细胞表面上表达的配体结合的hPD1激活,则激活将更大。因此,如果抗PD1抗体可以抑制hPD1与其配体的相互作用,则预期抗hPD1抗体可以增加T细胞活化。

[0687] 5天后收集培养物上清液。使用IFN γ DuoSet ELISA试剂盒 (R&D Systems) 测量IFN γ 水平。使用CLICKIT[®] Plus EdU AlexaFluor[®] 流式细胞仪检测试剂盒 (Life Technologies,现在是ThermoFisher Scientific的一部分) 按照制造商的说明测量T细胞增殖。简言之,在收获前24小时的第5天加入终浓度为15 μ M的EdU。T细胞亚群的增殖表示为CD4⁺或CD4⁻ (主要是CD8⁺) T细胞亚群中EdU⁺细胞的百分比。用标记的抗CD4抗体区分CD4⁺和CD4⁻细胞。

[0688] 如图15所示,选择的抗hPD1抗体促进IFN γ 产生和CD4⁺和CD8⁺T细胞的增殖。使用GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA) 计算这些抗体的 EC_{50} 值,并显示在下表17中。显示的结果代表来自3个HLA-错配供体对的MLR测定结果。相对于未加入时观察到的IFN γ 产生,对照IgG未增加IFN γ 的产生 (参见图15)。

[0689] 表17:MLR测定中所选抗hPD1抗体的 EC_{50} 值

[0690]

抗体	IFN γ 产生的EC ₅₀ (pM)	针对CD4+ T细胞增殖的EC ₅₀ (pM)	针对CD8+ T细胞增殖的EC ₅₀ (pM)
抗PD1 #1	889.5	134.8	322.9
抗PD1 #3	2218.0	365.3	3670.0
抗PD1 #4	1542.0	391.2	534.3
抗PD1 #7	1460.0	165.0	1518.0
抗PD1 #10	2212.0	234.1	839.4

[0691] 实施例9:针对巨细胞病毒(CMV)回忆应答的抗hPD1抗体的测定

[0692] 为了测试所选抗hPD1抗体对抗原特异性T细胞记忆反应的影响,在96孔圆底微量滴定板中存在不同的抗体浓度的完全RPMI-1640培养基中于37°C用1.5ng/ml CMV裂解物刺激来自CMV血清阳性供体(Bentech, Seattle, WA)的 1×10^5 个PBMC(Astarte Biologies)。5天后收集培养物上清液以测量IFN γ 水平。EC₅₀的计算如上所述。

[0693] 结果显示在下面的图16和表18中。抗hPD1抗体响应CMV裂解物增强PMBC产生的抗原特异性IFN γ 。结果代表使用不同CMV血清阳性供体的两个实验。对照IgG抗体在与抗hPD1抗体相同的浓度下不响应CMV裂解物而增加IFN γ 产生,即对照IgG的EC₅₀大于10,000pM。数据未显示。

[0694] 表18:CMV回忆应答测定中IFN γ 产生抗hPD1抗体的EC₅₀

[0695]

抗体	EC ₅₀ (pM)
抗PD1#1	209.0
抗PD1#10	376.1
抗PD1#7	516.1

[0696] 实施例10:抗hPD1抗体的结合特性

[0697] 五种不同的抗hPD1抗体(#1、#3、#4、#7和#10)结合重组人(rhu)PD1(仅细胞外结构域)的结合速率常数(k_a)、解离速率常数(k_d)和平衡解离常数($K_D = k_d/k_a$)如下所述测定。确定这些抗hPD1抗体中的两种(#1和#7)与重组食蟹猴(rcyno)PD1的细胞外结构域的结合的相同值。

[0698] 生物传感器分析在25°C下在HBS-EP缓冲液(10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.005% 聚山梨醇酯20, 0.1% 牛血清白蛋白, pH 7.4)中使用配备有CM5传感器芯片的Biacore 3000光学生物传感器,根据制造商的一般方案使用。自动进样器保持在环境温度下。使用标准胺偶联化学将山羊抗人IgG捕获抗体(Jackson Laboratories; 109-005-098)固定到传感器芯片的流动池3和4上。将约8000个共振单位(RU)的该抗体固定在这些芯片上。流动池4用于分析捕获的抗hPD1抗体(在流动池4上捕获约100至200RU),而流动池3用作参考流动池。对于每种测试的抗体,以五种浓度制备两种分析物,即重组人PD1和重组食蟹猴PD1。测试的分析物浓度范围为1.2至300nM。在HPS-EP缓冲液中制备所有分析物稀释液。五种分析物样品浓度中的每一种均以一式两份并以混合顺序运行,作为评估结合的再现性和减轻注射顺序的系统偏差的手段。还运行多个空白(运行缓冲液)注射并用于评估和减去系统伪影。分别以50L/min的流速监测所有分析物浓度的缔合阶段和解离阶段300秒和1500秒。在抗体样品之间,流动池的表面用10mM甘氨酸, pH1.5再生30秒,流速为50L/min。

[0699] 使用SCRUBBER 2TM软件(BioLogic Software, Pty, Australia)对数据进行比对,双重参考和拟合,该软件是表面等离子体共振(SPR)数据处理和非线性最小二乘回归拟合程

序。从解离相数据的前1500秒确定解离速率常数(k_d)。然后使用一级结合模型将解离速率常数作为固定参数应用于关联相位数据的整体拟合,以确定结合速率常数(k_a)和表面的分析物结合能力(R_{max})。

[0700] 结果显示在下表19中。在测试的抗体中,抗hPD1抗体#7具有与人和食蟹猴PD1结合的最低KD。

[0701] 表19:抗hPD1抗体的结合常数

抗hPD1抗体	分析物	R_{max} (RU)	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (nM)
#1	重组人PD1	57.9	6.09E+04	1.33E-04	2.18
#3	重组人PD1	57.4	6.74E+04	3.48E-04	5.16
#4	重组人PD1	60	6.04E+04	2.79E-04	4.62
#7	重组人PD1	51.5	1.19E+05	3.54E-05	0.297
#10	重组人PD1	60.4	7.80E+04	7.15E-05	0.917
#1	食蟹猴PD1	32.3	1.18E+05	5.97E-04	5.06
#7	食蟹猴PD1	40.3	1.45E+05	5.79E-05	0.4

[0703] 实施例11:工程化抗hPD1和抗hCTLA4抗体用于在单一宿主细胞系中产生一对抗体

[0704] 以下实验的目的是获得仅表达两种主要抗体种类即抗hPD1抗体和抗hCTLA4抗体的宿主细胞系。非同源HC/LC配对和/或HC/HC异二聚体的形成可能导致在用编码两种不同HC和两种不同LC的DNA转染的细胞中产生多达十种不同的抗体种类。我们观察到转染了编码来自抗hPD1抗体的HC的DNA和来自抗hCTLA4抗体的LC的细胞(反之亦然),即非同源HC/LC对,可以产生IgG抗体,表明混杂的HC/LC发生。数据未显示。

[0705] 在以下实验中,改变抗体以增强同源HC/LC对,弱化非同源HC/LC对,并削弱HC/HC异二聚体。在美国临时申请62/342,167的实施例3(其通过引用并入本文)中,描述了抗hPD1和抗hCTLA4抗体的改变形式。变体对18C包含改变的IgG4抗PD1抗体(包含HC1和LC1)和改变的IgG1抗hCTLA4抗体(包含HC2和LC2)。这些HC和LC包含以下改变:HC1、G44D、Q105R、K147R、H168R和V173C;LC1、V43D、G100R、S131D、S174D和S162C;HC2、G44R、Q105D、V173C、K147D、H168D、D399R和K409E;和LC2、A43R、P100D、Q160C、S131R和S174R,参见美国临时申请62/342,167的表18,其通过引用并入本文。这些改变在HC1/LC1中产生以下电荷对:G44D/G100R、Q105R/V43D、K147R/S131D,以及H168R/S174D。在HC2/LC2中创建以下类似的电荷对:G44R/P100D、Q105D/A43R、K147D/S131R和H168D/S174R。这些改变也可能削弱非同源HC/LC对,因为它们在同源HC/LC对中产生具有相同电荷的接触残基,例如G44D(HC1)/P100D(LC2)。还在HC1/LC1(V173C/S162C)和HC2/LC2(V173C/Q160C)中产生了对半胱氨酸残基的接触。此外,抗CTLA4 HC中的改变D399R和K409E不利于形成HC/HC异二聚体,即抗hPD1抗体的HC与抗hCTLA4抗体的HC配对,因为它产生与hCTLA4抗体的接触残基。异二聚体中的电荷,例如D399R(HC2)/409R(HC1)。将18C变体对抗体的改变掺入抗hPD1抗体#1的HC和LC(分别为SEQ ID NO:185和187;本文称为改变的抗hPD1抗体#1)和两种不同的抗hCTLA4抗体10D4(分别为SEQ ID NO:189和191;本文称为改变的抗hCTLA4 10D4)和11F4(分别为SEQ ID NO:193和195;本文称为改变的抗hCTLA4 11F4)的HC和LC中。此外,两种改变的抗hCTLA4抗体包括其HC中的额外改变R255K,其增加抗体的体内清除率。

[0706] 为了澄清关于位置编号的任何可能的混淆,申请人在下面在所附序列列表中公开的

一些序列中指出了上述选定改变的实际位置。例如,改变G44D、Q105R、K147R、H168R和V173C分别位于SEQ ID NO:185中的位置44、111、149、170和175。类似地,改变V43D、G100R、S131D、S162C和S174D分别在SEQ ID NO:187中的位置49、106、137、168和180处。

[0707] 编码这些改变的抗体的DNA在“脱链”(chain drop out)实验中进行测试,如美国临时申请62/342,167的实施例3中所述,其通过引用并入本文。简而言之,对于每对改变的抗hPD1和抗hCTLA4抗体,在一组五次转染中使用五种不同的DNA组合,即(1)改变的抗hPD1#1/改变的抗hCTLA4 10D4和(2)改变的抗hPD1#1/改变的抗hCTLA4 11F4。对于每对抗体,编码以下HC和LC的DNA在五个单独的转染中转染到EXPI293TM细胞中:1)HC1、LC1、HC2和LC2;2)HC1和LC1;3)HC1和LC2;4)HC2和LC2;5)HC2和LC1。培养转染子,收获培养物上清液,并通过SDS-PAGE和Western印迹分析。使用HRP缀合的多克隆山羊抗人IgG(Fc特异性)检测抗体。

[0708] 从图17中可以看出,当编码HC1、LC1、HC2和LC2的DNA共转染到EXPI293TM细胞中时,在上清液中检测到约150千道尔顿(Kda)的IgG抗体(图17,泳道1和6)。当共转染编码HC1和LC1或HC2和LC2的DNA时,还检测到约150Kda的全长抗体(图17,泳道2、4、7和9),表明同源HC/LC对可以形成。然而,当共转染编码非同源对HC1/LC2和HC2/LC1的DNA时,未检测到抗体(图17,泳道3、5、8和10),表明非同源HC/LC对不容易形成。因此,这些数据表明这些抗体的改变减少或消除了在没有改变的情况下观察到的非同源HC/LC配对。

[0709] 为了证实这些结果,进行了质谱分析。为了获得足够的分析材料,编码每对改变的抗体的HC和LC(HC1、LC1、HC2和LC2)的DNA,即改变的抗hPD1#1/改变的抗hCTLA410D4和改变的抗hPD1#1/改变的抗hCTLA411F4用于更大规模地转染细胞。通过蛋白A亲和层析纯化培养上清液中的抗体。在配备有电喷雾电离(ESI)源的Agilent 6224精确质量飞行时间(TOF)质谱仪上对这些抗体进行质谱分析。

[0710] 图18的图A和B显示改变的抗hPD1#1/改变的抗hCTLA4 10D4对的结果。图A显示了各种大小的结果,图B显示了全长IgG抗体的大小范围,即刚好低于150Kda。图A显示了全长IgG抗体大小范围内的两个主要峰和约75Kda处的峰的痕迹,可能是含有HC和LC的半抗体。图B显示145,473.16道尔顿的主峰,其与全长改变的抗hCTLA4 10D4(145477.80道尔顿)的预测质量相匹配,误差为百万分之32(ppm)。在147,065.89道尔顿处的较短峰与改变的抗hPD1#1(147068.86道尔顿)的预测质量匹配,误差为20ppm。通过计算峰下面积,改变的抗hCTLA4 10D4和改变的抗hPD1#1抗体分别构成混合物中抗体质量的72.8%和27.2%,如图18的图B所示。

[0711] 图19的图A和B显示改变的抗hPD1#1/改变的抗hCTLA4 11F4对的结果。图A显示了各种大小的结果,图B显示了全长IgG抗体的大小范围。图A显示了全长IgG抗体大小范围内的两个主要峰,以及在约75Kda处的峰的痕迹。图B显示145,430.59道尔顿的主峰,其与全长改变的抗hCTLA410D4(145,427.68道尔顿)的预测质量相匹配,误差为20ppm。147,076.88道尔顿的较短峰与改变的抗hPD1#1(147,068.86道尔顿)的预测质量相匹配,误差为54.5ppm。改变的抗hCTLA411F4和改变的抗hPD1#1抗体分别构成混合物中抗体质量的70.9%和29.1%,如图19的图B所示。

[0712] 下表20和21显示了可能由HC的同源或非同源HC/LC配对和/或同二聚体或异二聚体形成引起的所有可能IgG种类的预测质量。在表20和21中,HC1和LC1是改变的抗hPD1#1的HC和LC。HC2和LC2是改变的抗hCTLA4 10D4(表20)和11F4(表21)的HC和LC。

[0713] 表20:用编码改变的抗hPD1#1和改变的抗hCTLA4 10D4的DNA转染的细胞中潜在IgG的预测质量

[0714]	组合	预测质量 (道尔顿)
	HC1/LC1+HC1/LC1	147068.86
	HC1/LC1+HC1/LC2	146392.35
	HC1/LC1+HC2/LC1	146949.84
	HC1/LC1+HC2/LC2	146273.33
	HC1/LC2+HC2/LC1	146273.33
	HC2/LC1+HC2/LC1	146830.82
	HC1/LC2+HC1/LC2	145715.84
	HC2/LC2+HC2/LC1	146154.31
	HC1/LC2+HC2/LC2	145596.82
	HC2/LC2+HC2/LC2	145477.80

[0715] 表21:用编码改变的抗hPD1#1和改变的抗hCTLA4 11F4的DNA转染的细胞中潜在IgG的预测质量

[0716]	组合	预测质量 (道尔顿)
	HC1/LC1+HC1/LC1	147068.86
	HC1/LC1+HC1/LC2	146419.37
	HC1/LC1+HC2/LC1	146897.76
	HC1/LC1+HC2/LC2	146248.27
	HC1/LC2+HC2/LC1	146248.27
	HC2/LC1+HC2/LC1	146726.66
	HC1/LC2+HC1/LC2	145769.88
	HC2/LC2+HC2/LC1	146077.17
	HC1/LC2+HC2/LC2	145598.78
	HC2/LC2+HC2/LC2	145427.68

[0717] 质谱数据与上述脱链实验的结果相结合,强烈表明可以在单一宿主细胞系中产生仅含有两种主要抗体种类的混合物。

[0718] 实施例12:荧光素酶报告基因测定以评估改变的抗体的效力

[0719] 以下实验测试改变(如实施例11中所述)和未改变形式的抗hCTLA4抗体10D4或11F4以及改变和未改变形式的抗hPD1抗体#1单独或在由单一宿主细胞系产生的改变(如上文实施例11中所述)的含有改变的抗PD1#1和改变的CTLA4抗体(10D4或11F4)的混合物中的效力。

[0720] 这种抗hCTLA4效力的测定在美国临时申请62/342,167的实施例8中有详细描述,该临时申请通过引用并入本文。简而言之,将稳定表达CTLA4和荧光素酶的Jurkat细胞(来自Promega Corporation, Madison, WI, USA)接种到微量滴定板中。孵育一天后,向每个孔中加入表达hCD80(也称为hB7-1)和hCD86(也称为hB7-2)的Raji细胞,以及抗hCTLA4抗体(改变或未改变的10D4或11F4或对照抗体10D1)或含有改变的抗hPD1#1和改变的抗hCTLA4 10D4或改变的抗hCTLA4 11F4的混合物之一。当使用抗体混合物时,基于混合物中抗hCTLA4抗体

的百分比确定抗hCTLA4抗体的量。参见实施例11。在Raji细胞上表达的hCD80和hCD86可以与Jurkat细胞上的hCTLA4结合,激活抑制荧光素酶表达的细胞内信号传导途径。如果抗hCTLA4抗体阻止hCTLA4与hCD80和/或hCD86的结合,则荧光素酶表达将增加。进行稀释系列的抗体或混合物,使得不同的孔具有不同浓度的抗体或抗体混合物。将板在37°C下孵育,然后,BIO-GLTM荧光素酶试剂(Promega,目录号G7941)被添加。在 **ENVISION**[®] 读板器(PerkinElmer)中读板。使用与ipilimumab具有相同VH和VL的抗hCTLA4抗体10D1作为阳性对照。使用不相关的人IgG1抗体(HulgG1)作为阴性对照。结果显示在图20和下表22和23中。

[0721] 表22:抗hCTLA4抗体10D4的效力

[0722]	抗体	IC ₅₀ (nM)
	抗CTLA410D1 (阳性对照)	11.55
	抗CTLA410D4	2.12
	改变的抗CTLA4 10D4	3.75
	改变的抗CTLA4 10D4和改变的抗PD1#1	3.87

[0723] 表23:抗hCTLA4抗体11F4的效力

[0724]	抗体	IC ₅₀ (nM)
	抗CTLA4 10D1 (阳性对照)	11.55
	抗CTLA411F4	4.80
	改变的抗CTLA4 11F4	8.68
	改变的抗CTLA4 11F4和改变的抗PD1#1	6.03

[0725] 这些结果表明,抗hCTLA4 10D4、改变的抗hCTLA4 10D4、改变的抗hCTLA4 10D4与改变的抗hPD1#1的混合物的IC₅₀是相当的,与抗hCTLA411F4、改变的抗hCTLA4 11F4、以及改变的抗hCTLA4 11F4与改变的抗hPD1#1的混合物的IC₅₀也如此。因此,抗CTLA4抗体10D4和11F4的改变对其在该测定中的效力几乎没有影响。

[0726] 抗hPD1效力的测定详细描述于美国临时申请62/342,167的实施例7中,其通过引用并入本文。简言之,将稳定表达hPD1和荧光素酶的Jurkat细胞(来自Promega Corporation, Madison, WI, USA)接种到96孔板中(4×10⁴个细胞/孔, 20μl)。孵育一天后,加入稳定表达hPDL1的CHO细胞(5×10⁴细胞/孔, 20μl),以及各种稀释度的测试抗体或抗体混合物(20μl)。在CHO细胞上表达的hPDL1可以与Jurkat细胞上的hPD1结合,激活抑制荧光素酶表达的细胞内信号传导途径。如果抗体阻止hPD1/hPDL1交互,则荧光素酶表达将增加。将板在37°C, 5%CO₂中温育6小时。加入BIO-GLTM荧光素酶试剂(Promega,目录号G7941) 40μl/孔)以裂解细胞,并在 **ENVISION**[®] 读板器(PerkinElmer)中读板。包含与nivolumab(Nivo-G4)相同的VH和VL的IgG4抗hPD1抗体用作阳性对照,并且使用不相关的IgG4抗体作为阴性对照。

[0727] 结果显示在下面的图21和表24和25中。

[0728] 表24:抗hPD1抗体的效力#1

[0729]	抗体	IC ₅₀ (nM)
	Nivo-G4	3.95
	抗hPD1#1	2.49

改变的抗hPD1#1	2.65
改变的抗CTLA4 10D4和改变的抗hPD1#1	3.80

[0730] 表25:抗hPD1抗体的效力#1

抗体	IC ₅₀ (nM)
Nivo-G4	3.98
抗hPD1#1	2.50
改变的抗hPD1#1	2.67
改变的抗CTLA411F4和改变的抗hPD1#1	3.34

[0732] 这些数据表明改变的抗hPD1抗体#1的改变对其效力几乎没有影响。此外,如实施例11中所述在单细胞系中产生的含有改变的抗hPD1#1和改变的抗hCTLA 10D4或11F4的混合物的IC₅₀与单独的改变的抗PD1#1的IC₅₀相当。

[0733] 实施例13:抗hPD1或抗hCTLA4抗体或其混合物对T细胞活化的影响

[0734] 以下实验测试IgG4抗hPD1抗体(两种IgG1抗hCTLA4抗体中任一)或抗hPD1抗体与任一抗hCTLA4抗体的混合物对T细胞活化的影响。

[0735] 将来自健康供体的人PBMC以每孔 3×10^5 个细胞分布在96孔U形底微量滴定板中。向每个孔中加入抗体(或缺乏抗体的对照溶液)。使用以下六种不同抗体,其组合或缺乏抗体的对照溶液:1) 2.5 μ g/ml的IgG4抗hPD1#1抗体;2) 10ng/ml的IgG1抗hCTLA4#10D4抗体;3) 10 μ g/ml的IgG1抗hCTLA4#11F4抗体;4) 2.5 μ g/ml的抗hPD1#1抗体和10 μ g/ml的抗hCTLA4#10D4抗体的混合物;5) 2.5 μ g/ml的抗hPD1#1抗体和10 μ g/ml的抗hCTLA4#11F4抗体的混合物;或6) 缺乏抗体的对照溶液。将葡萄球菌肠毒素B(SEB)以不同浓度(0、0.6、6、60或600ng/ml)加入所有孔中。所有条件均一式两份进行测试。将细胞在37°C, 5%CO₂下孵育4天。在第四天,收集细胞上清液并使用ELISA测定以确定IL-2的水平。通过与使用已知量的IL-2产生的标准曲线比较来确定IL-2的绝对浓度。

[0736] 未添加抗体的对照样品显示IL-2产生没有增加,参见图22的图A和B中带“X”符号的实线。添加IgG4抗hPD1#1抗体略微增加IL-2产生,参见图22的图A和B中带实心圆圈的实线。添加IgG1抗hCTLA4#10D4或IgG1抗hCTLA4#11F4抗体显著增加IL-2产生,参见图22的图A或B中分别带实心方块或实心菱形的虚线。添加抗hPD1抗体和抗hCTLA4#10D4或11F4抗体的混合物比单独添加任何这些抗体都更增加了IL-2产生,参见图22的图A和B中分别带空心方块或空心菱形的实线。

抗体	抗hCTLA VH CDR		
	CDR1	CDR2	CDR3
1E1	SYGMH (SEQ ID NO:3)	VIWYNPSEKDYADSAKG (SEQ ID NO:4)	AGLLGYFDY (SEQ ID NO:5)
2F1	SYGMH (SEQ ID NO:3)	VIWY HR SEKDYADSAKG (SEQ ID NO:13)	AGLLGYFDY (SEQ ID NO:5)
3G1	SYGMH (SEQ ID NO:3)	VIWY KS SEK YY ADSAKG (SEQ ID NO:20)	G GLLGYFDY (SEQ ID NO:21)
4H1	SYGMH (SEQ ID NO:3)	VIWYNPS KK DYADSAKG (SEQ ID NO:24)	GGLF GYFDY (SEQ ID NO:25)
5B2	SYGMH (SEQ ID NO:3)	VIWY KS SEKDYADSAKG (SEQ ID NO:31)	AGLLGYFDY (SEQ ID NO:5)
6E3	SYGMH (SEQ ID NO:3)	VIWY KT SEKDYADSAKG (SEQ ID NO:37)	AGLLGYFDY (SEQ ID NO:5)
7A4	SYGMH (SEQ ID NO:3)	VIWY QT SEKDYADSAKG (SEQ ID NO:43)	AGLLGYFDY (SEQ ID NO:5)
8B4	SYGMH (SEQ ID NO:3)	VIWY QP SEKDYADSAKG (SEQ ID NO:46)	AG FL GYFDY (SEQ ID NO:47)
9C4	SYGMH (SEQ ID NO:3)	VIWY KS SEKDYADSAKG (SEQ ID NO:31)	AGLLGYFDY (SEQ ID NO:5)
10D4	SYGMH (SEQ ID NO:3)	VIWY HPS KK DYADSAKG (SEQ ID NO:59)	AGLLGYFDY (SEQ ID NO:5)
11F4	SYGMH (SEQ ID NO:3)	VIWY KP SEKDYADSAKG (SEQ ID NO:65)	G GLLGYFDY (SEQ ID NO:21)
12G4	SYGMH (SEQ ID NO:3)	VIWYN TS KK DYADSAKG (SEQ ID NO:70)	G GLLGYFDY (SEQ ID NO:21)
	SYGMH (SEQ ID NO:3)	VIWYKPSEKDYADSAKG NS K Y QT HR (SEQ ID NO:75)	AGLLGYFDY G FF (SEQ ID NO:77)

图1

抗hCTLA4 VL CDR			
抗体	CDR1	CDR2	CDR3
1E1	RASQSISSYLA (SEQ ID NO:8)	GVSSRAT (SEQ ID NO:9)	QQYGMSPFT (SEQ ID NO:10)
2F1	RASQSINSYLA (SEQ ID NO:16)	GVSSRAT (SEQ ID NO:9)	QQYGMYPFT (SEQ ID NO:17)
3G1	RASQSINSYLA (SEQ ID NO:16)	GVSSRAT (SEQ ID NO:9)	QQYGMYPFT (SEQ ID NO:17)
4H1	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO:28)	GVSSRAT (SEQ ID NO:9)	QQYGMYPFT (SEQ ID NO:17)
5B2	RASQSLSSYLA (SEQ ID NO:34)	GVSSRAT (SEQ ID NO:9)	QQYGMYPFT (SEQ ID NO:17)
6E3	RASQSVTSYLA (SEQ ID NO:40)	GVSSRAT (SEQ ID NO:9)	QQYGMSPFT (SEQ ID NO:10)
7A4	RASQSVSSYLA (SEQ ID NO:28)	GVSSRAT (SEQ ID NO:9)	QQYGMYPFT (SEQ ID NO:17)
8B4	RASQSVNSYLA (SEQ ID NO:50)	GVSSRAT (SEQ ID NO:9)	QQYGMYPFT (SEQ ID NO:17)
9C4	RASQSLNSYLA (SEQ ID NO:55)	GVSSRAT (SEQ ID NO:9)	QQYGIYPFT (SEQ ID NO:56)
10D4	RASQSVTSYLA (SEQ ID NO:40)	GVSSRAT (SEQ ID NO:9)	QQYGRYPFT (SEQ ID NO:62)
11F4	RASQSINSYLA (SEQ ID NO:16)	GVSSRAT (SEQ ID NO:9)	QQYGRYPFT (SEQ ID NO:62)
12G4	RASQSI T SYLA (SEQ ID NO:73)	GVSSRAT (SEQ ID NO:9)	QQYGRYPFT (SEQ ID NO:62)
	RASQSINSYLA VS LT (SEQ ID NO:79)	GVSSRAT (SEQ ID NO:9)	QQYGMYPFT RS I (SEQ ID NO:81)

图2

抗hCTLA4 VH 序列

		20		40	
		*		*	
1E1	QVQLVESGGG	VVEPGRSLRL	SCAASGFTFS	<u>SYGMHWVRQA</u>	PGKGL
2F1	QVQLVESGGG	VVEPGRSLRL	SCAASGFTFS	<u>SYGMHWVRQA</u>	PGKGL
3G1	QVQLVESGGG	VVEPGRSLRL	SCTASGFTFS	<u>SYGMHWVRQA</u>	PGKGL
4H1	QVQLVESGGG	VVEPGRSLRL	SCTASGFTFS	<u>SYGMHWVRQA</u>	PGKGL
5B2	QVQLVESGGG	VVEPGRSLRL	SCTASGFTFS	<u>SYGMHWVRQA</u>	PGKGL
6E3	QVQLVESGGG	VVEPGRSLRL	SCAASGFTFS	<u>SYGMHWVRQA</u>	PGKGL
7A4	QVQLVESGGG	VVEPGRSLRL	SCTASGFTFS	<u>SYGMHWVRQA</u>	PGKGL
8B4	QVQLVESGGG	VVEPGRSLRL	SCAASGFTFS	<u>SYGMHWVRQA</u>	PGKGL
9C4	QVQLVESGGG	VVEPGRSLRL	SCAASGFTFS	<u>SYGMHWVRQA</u>	PGKGL
10D4	QVQLVESGGG	VVEPGRSLRL	SCTASGFTFS	<u>SYGMHWVRQA</u>	PGKGL
11F4	QVQLVESGGG	VVEPGRSLRL	SCAASGFTFS	<u>SYGMHWVRQA</u>	PGKGL
12G4	QVQLVESGGG	VVEPGRSLRL	SCAASGFTFS	<u>SYGMHWVRQA</u>	PGKGL
		60		80	
	#	*		* ###	
1E1	EWVAV <u>IWYNPSEKDY</u>	ADSAKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	
2F1	EWVAV <u>IWYHRSEKDY</u>	ADSAKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	
3G1	EWVAV <u>IWYKSSEKYY</u>	ADSAKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	
4H1	EWVAV <u>IWYNPSKKDY</u>	ADSAKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	
5B2	EWVAV <u>IWYKSSEKDY</u>	ADSAKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	
6E3	EWVAV <u>IWYKTSEKDY</u>	ADSAKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	
7A4	EWVAV <u>IWYOTSEKDY</u>	ADSAKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	
8B4	EWVAV <u>IWYOPSEKDY</u>	ADSAKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	
9C4	EWVAV <u>IWYKSSEKDY</u>	ADSAKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	
10D4	EWVAV <u>IWYHPSKKDY</u>	ADSAKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	
11F4	EWVAV <u>IWYKPSEKDY</u>	ADSAKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	
12G4	EWVAV <u>IWYNTSKKDY</u>	ADSAKGRFTI	SRDNSKNTLY	LQMNSLRAED	
		100			
		*#			
1E1	TAVYYCAR <u>AG LLGYFDYWGQ</u>	GTLVTVSS	(SEQ ID NO:2)		
2F1	TAVYYCAR <u>AG LLGYFDYWGQ</u>	GTLVTVSS	(SEQ ID NO:12)		
3G1	TAVYYCAR <u>GG LLGYFDYWGQ</u>	GTLVTVSS	(SEQ ID NO:19)		
4H1	TAVYYCAR <u>GG LFGYFDYWGQ</u>	GTLVTVSS	(SEQ ID NO:23)		
5B2	TAVYYCAR <u>AG LLGYFDYWGQ</u>	GTLVTVSS	(SEQ ID NO:30)		
6E3	TAVYYCAR <u>AG LLGYFDYWGQ</u>	GTLVTVSS	(SEQ ID NO:36)		
7A4	TAVYYCAR <u>AG LLGYFDYWGQ</u>	GTLVTVSS	(SEQ ID NO:42)		
8B4	TAVYYCAR <u>AG FLGYFDYWGQ</u>	GTLVTVSS	(SEQ ID NO:45)		
9C4	TAVYYCAR <u>AG LLGYFDYWGQ</u>	GTLVTVSS	(SEQ ID NO:52)		
10D4	TAVYYCAR <u>AG LLGYFDYWGQ</u>	GTLVTVSS	(SEQ ID NO:58)		
11F4	TAVYYCAR <u>GG LLGYFDYWGQ</u>	GTLVTVSS	(SEQ ID NO:64)		
12G4	TAVYYCAR <u>GG LLGYFDYWGQ</u>	GTLVTVSS	(SEQ ID NO:69)		

图3

抗hCTLA4 VL 序列

	20	40
	*	*
1E1	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT	LSCRASQSI S SYLAWYQQKP
2F1	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT	LSCRASQSI N SYLAWYQQKP
3G1	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT	LSCRASQSI N SYLAWYQQKP
4H1	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT	LSCRASQSV S SYLAWYQQKP
5B2	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT	LSCRASQSL S SYLAWYQQKP
6E3	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT	LSCRASQSV T SYLAWYQQKP
7A4	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT	LSCRASQSV S SYLAWYQQKP
8B4	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT	LSCRASQSV N SYLAWYQQKP
9C4	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT	LSCRASQSL N SYLAWYQQKP
10D4	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT	LSCRASQSV T SYLAWYQQKP
11F4	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT	LSCRASQSI N SYLAWYQQKP
12G4	EIVLTQSPGT LSLSPGERAT	LSCRASQSI T SYLAWYQQKP
	60	80
	*	*
1E1	GQAPRPLIYG <u>VSSRAT</u> GIPD	RFSGSGSGTD FTLTISRLEP
2F1	GQAPRPLIYG <u>VSSRAT</u> GIPD	RFSGSGSGTD FTLTISRLEP
3G1	GQAPRPLIYG <u>VSSRAT</u> GIPD	RFSGSGSGTD FTLTISRLEP
4H1	GQAPRPLIYG <u>VSSRAT</u> GIPD	RFSGSGSGTD FTLTISRLEP
5B2	GQAPRLLIYG <u>VSSRAT</u> GIPD	RFSGSGSGTD FTLTISRLEP
6E3	GQAPRPLIYG <u>VSSRAT</u> GIPD	RFSGSGSGTD FTLTISRLEP
7A4	GQAPRPLIYG <u>VSSRAT</u> GIPD	RFSGSGSGTD FTLTISRLEP
8B4	GQAPRPLIYG <u>VSSRAT</u> GIPD	RFSGSGSGTD FTLTISRLEP
9C4	GQAPRPLIYG <u>VSSRAT</u> GIPD	RFSGSGSGTD FTLTISRLEP
10D4	GQAPRPLIYG <u>VSSRAT</u> GIPD	RFSGSGSGTD FTLTISRLEP
11F4	GQAPRPLIYG <u>VSSRAT</u> GIPD	RFSGSGSGTD FTLTISRLEP
12G4	GQAPRPLIYG <u>VSSRAT</u> GIPD	RFSGSGSGTD FTLTISRLEP
	100	
	*	
1E1	EDFAVYYCQO <u>YGMS</u> PFTFGP	GTKVDIK (SEQ ID NO:7)
2F1	EDFAVYYCQO <u>YGMYP</u> PFTFGP	GTKVDIK (SEQ ID NO:15)
3G1	EDFAVYYCQO <u>YGMYP</u> PFTFGP	GTKVDIK (SEQ ID NO:15)
4H1	EDFAVYYCQO <u>YGMYP</u> PFTFGP	GTKVDIK (SEQ ID NO:27)
5B2	EDFAVYYCQO <u>YGMYP</u> PFTFGP	GTKVDIK (SEQ ID NO:33)
6E3	EDFAVYYCQO <u>YGMS</u> PFTFGP	GTKVDIK (SEQ ID NO:39)
7A4	EDFAVYYCQO <u>YGMYP</u> PFTFGP	GTKVDIK (SEQ ID NO:27)
8B4	EDFAVYYCQO <u>YGMYP</u> PFTFGP	GTKVDIK (SEQ ID NO:49)
9C4	EDFAVYYCQO <u>YGIY</u> PFTFGP	GTKVDIK (SEQ ID NO:54)
10D4	EDFAVYYCQO <u>YGRYP</u> PFTFGP	GTKVDIK (SEQ ID NO:61)
11F4	EDFAVYYCQO <u>YGRYP</u> PFTFGP	GTKVDIK (SEQ ID NO:67)
12G4	EDFAVYYCQO <u>YGRYP</u> PFTFGP	GTKVDIK (SEQ ID NO:72)

图4

抗hPD1 VH CDR

抗体	CDR1	CDR2	CDR3
1	NYW I H (SEQ ID NO: 88)	EIDPYDSYTNYNQKFKG (SEQ ID NO: 89)	PGFTYGGMDF (SEQ ID NO: 90)
2	SYW MH (SEQ ID NO: 98)	EIDPYDSYTNYNQKFKG (SEQ ID NO: 89)	PG N TYGGMD Y (SEQ ID NO: 99)
3	NYW I H (SEQ ID NO: 105)	EIDPYDSYTNYNQKFKG (SEQ ID NO: 89)	PGFTYGGMDF (SEQ ID NO: 90)
4	NYW I H (SEQ ID NO: 105)	EIDP F DSYTNYNQKFKG (SEQ ID NO: 111)	PG Y TYGGMDF (SEQ ID NO: 112)
5	NYW I H (SEQ ID NO: 105)	EIDP F DSYTNYNQKFKG (SEQ ID NO: 111)	PGFTYGGMDF (SEQ ID NO: 90)
6	NYW I H (SEQ ID NO: 88)	EIDPYDSYTNYNQKFKG (SEQ ID NO: 89)	PG Y TYGGMDF (SEQ ID NO: 112)
7	NYW I H (SEQ ID NO: 88)	EIDPYDSYTNYNQKFKG (SEQ ID NO: 89)	PG L TYGGMDF (SEQ ID NO: 127)
8	NYW I H (SEQ ID NO: 88)	EIDPYDSYTNYNQKFKG (SEQ ID NO: 89)	PG N TYGGMDF (SEQ ID NO: 134)
9	SYW MH (SEQ ID NO: 98)	EIDPYDSYTNYNQKFKG (SEQ ID NO: 89)	PGFTYGGMDF (SEQ ID NO: 90)
10	SYW MH (SEQ ID NO: 98)	EIDP F DSYTNYNQKFKG (SEQ ID NO: 111)	PG Y TYGGMDF (SEQ ID NO: 112)
11	SYW IH (SEQ ID NO: 149)	EIDP S DSYTNYNQKFKG (SEQ ID NO: 150)	PG Y TYGGMDF (SEQ ID NO: 112)
12	NYW I H (SEQ ID NO: 105)	EIDP F DSYTNYNQKFKG (SEQ ID NO: 111)	PGFTYGGMDF (SEQ ID NO: 90)
13	SYW IH (SEQ ID NO: 149)	EIDPYDSYTNYNQKFKG (SEQ ID NO: 89)	PG L TYGGMDF (SEQ ID NO: 127)
14	NYW I H (SEQ ID NO: 88)	EIDPYDSYTNYNQKFKG (SEQ ID NO: 89)	PG Y TYGGMDF (SEQ ID NO: 112)
15	NYW I H (SEQ ID NO: 105)	EIDPYDSYTNYNQKFKG (SEQ ID NO: 89)	PG L TYGGMDF (SEQ ID NO: 127)
	NYW MH (SEQ ID NO: 170)	EIDP YDSYTNYNQKFKG (SEQ ID NO: 172)	PGFTYGGMDF (SEQ ID NO: 174)
	S I	F S	Y L N

图5

抗hPD1 VL CDR

抗体	CDR1	CDR2	CDR3
1	KSSQSLFNSGNQKNYLA(SEQ ID NO:93)	GASTRDS(SEQ ID NO:94)	QNDHYYPYT(SEQ ID NO:95)
2	R SSQSLFNSGNQKNYLA(SEQ ID NO:102)	GASTRDS(SEQ ID NO:94)	QNDHYYPYT(SEQ ID NO:95)
3	KSSQSLFNSGNQKNYLA(SEQ ID NO:93)	GASTRES(SEQ ID NO:108)	QNDHYYPYT(SEQ ID NO:95)
4	KSSQSL L NSGNQKNYLA(SEQ ID NO:115)	GASTRDS(SEQ ID NO:94)	QNDHYYPYT(SEQ ID NO:95)
5	R SSQSL L NSGNQKNYLA(SEQ ID NO:120)	GASTRDS(SEQ ID NO:94)	QNDHYYPYT(SEQ ID NO:95)
6	R SSQSLFNSGNQKNYLA(SEQ ID NO:102)	GASTRES(SEQ ID NO:108)	QNDHYYPYT(SEQ ID NO:95)
7	R SSQSLF I SGNQKNYLA(SEQ ID NO:130)	GASTRES(SEQ ID NO:108)	Q N MHYYPYT(SEQ ID NO:131)
8	KSSQSLF I SGNQKNYLA(SEQ ID NO:137)	GASTRDS(SEQ ID NO:94)	Q N MHYYPYT(SEQ ID NO:131)
9	R SSQSL L I SGNQKNYLA(SEQ ID NO:142)	GASTRDS(SEQ ID NO:94)	Q N MHYYPYT(SEQ ID NO:131)
10	R SSQSLF I SGNQKNYLA(SEQ ID NO:130)	GASTRDS(SEQ ID NO:94)	Q N MHYYPYT(SEQ ID NO:131)
11	R SSQSLF I SGNQKNYLA(SEQ ID NO:130)	GASTRDS(SEQ ID NO:94)	Q N MHYYPYT(SEQ ID NO:131)
12	R SSQSL L I SGNQKNYLA(SEQ ID NO:142)	GASTRDS(SEQ ID NO:94)	Q N MHYYPYT(SEQ ID NO:131)
13	KSSQSL L NSGNQKNYLA(SEQ ID NO:115)	GASTRDS(SEQ ID NO:94)	QNDHYYPYT(SEQ ID NO:95)
14	KSSQSLFNSGNQKNYLA(SEQ ID NO:93)	GASTRDS(SEQ ID NO:94)	QNDHYYPYT(SEQ ID NO:95)
15	R SSQSLFNSGNQKNYLA(SEQ ID NO:102)	GASTRES(SEQ ID NO:108)	QNDHYYPYT(SEQ ID NO:95)
	R SSQSLFNSGNQKNYLA(SEQ ID NO:176)	G ASTRDS(SEQ ID NO:177)	QNDHYYPYT(SEQ ID NO:179)
	K	E	N
	L1		

图6

抗hPD1 VH 序列					
	20			40	
	*			*	
1	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	<u>NYW</u> IHWVRQA	PGQGL
2	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	<u>SYWM</u> HWVRQA	PGQGL
3	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASSYTFT	<u>NYWM</u> HWVRQA	PGQGL
4	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	<u>NYWM</u> HWVRQA	PGQGL
5	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	<u>NYWM</u> HWVRQA	PGQGL
6	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	<u>NYW</u> IHWVRQA	PGQGL
7	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	<u>NYW</u> IHWVRQA	PGQGL
8	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	<u>NYW</u> IHWVRQA	PGQGL
9	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	<u>SYWM</u> HWVRQA	PGQGL
10	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	<u>SYWM</u> HWVRQA	PGQGL
11	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	<u>SYW</u> IHWVRQA	PGQGL
12	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	<u>NYWM</u> HWVRQA	PGQGL
13	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	<u>SYW</u> IHWVRQA	PGQGL
14	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	<u>NYW</u> IHWVRQA	PGQGL
15	QVQLVQSGAE	VKKPGASVKV	SCKASGYTFT	<u>NYWM</u> HWVRQA	PGQGL
	60			80	
	#	*		*	###
1	EWMGE	IDP <u>Y</u> DSYTN	NOKFKGRVTM	TVDKSTSTVY	MELSSLRSED
2	EWMGE	IDP <u>Y</u> DSYTN	NOKFKGRVTM	TVDKSTSTVY	MELSSLRSED
3	EWMGE	IDP <u>Y</u> DSYTN	NOKFKGRVTM	TIDTSTSTVY	MELSSLTSED
4	EWMGE	IDP <u>F</u> DSYTN	NOKFKGRVTM	TRDTSTSTVY	MELSSLTSED
5	EWMGE	IDP <u>F</u> DSYTN	NOKFKGRVTM	TRDKSTSTVY	MELSSLRSED
6	EWMGE	IDP <u>Y</u> DSYTN	NOKFKGRVTM	TGDTSTSTVY	MELSSLTSED
7	EWMGE	IDP <u>Y</u> DSYTN	NOKFKGRVTM	TIDKSTNTVY	MELSSLRSED
8	EWMGE	IDP <u>Y</u> DSYTN	NOKFKGRVTM	TIDTSTSTVY	MELSSLRSED
9	EWMGE	IDP <u>Y</u> DSYTN	NOKFKGRVTM	TIDKSTSTVY	MELSSLTSED
10	EWMGE	IDP <u>F</u> DSYTN	NOKFKGRVTM	TIDKSTNTVY	MELSSLGSED
11	EWMGE	IDP <u>S</u> DSYTN	NOKFKGRVTM	TGDTSTNTVY	MELSSLTSED
12	EWMGE	IDP <u>F</u> DSYTN	NOKFKGRVTM	TIDTSTNTVY	MELSSLRSED
13	EWMGE	IDP <u>Y</u> DSYTN	NOKFKGRVTM	TVDKSTNTVY	MELSSLTSED
14	EWMGE	IDP <u>Y</u> DSYTN	NOKFKGRVTM	TGDKSTSTVY	MELSSLTSED
15	EWMGE	IDP <u>Y</u> DSYTN	NOKFKGRVTM	TRDTSTNTVY	MELSSLRSED
	100				
	*	###			
1	TAVYYCARPG	<u>F</u> TYGGMD <u>F</u> WG	QGT L VTVSS	(SEQ ID NO:87)	
2	TAVYYCARPG	<u>N</u> TYGGMD <u>Y</u> WG	QGT L VTVSS	(SEQ ID NO:97)	
3	TAVYYCARPG	<u>F</u> TYGGMD <u>F</u> WG	QGT L VTVSS	(SEQ ID NO:104)	
4	TAVYYCARPG	<u>Y</u> TYGGMD <u>F</u> WG	QGT L VTVSS	(SEQ ID NO:110)	
5	TAVYYCARPG	<u>F</u> TYGGMD <u>F</u> WG	QGT L VTVSS	(SEQ ID NO:117)	
6	TAVYYCARPG	<u>Y</u> TYGGMD <u>F</u> WG	QGT L VTVSS	(SEQ ID NO:122)	
7	TAVYYCARPG	<u>L</u> TYGGMD <u>F</u> WG	QGT L VTVSS	(SEQ ID NO:126)	
8	TAVYYCARPG	<u>N</u> TYGGMD <u>F</u> WG	QGT L VTVSS	(SEQ ID NO:133)	
9	TAVYYCARPG	<u>F</u> TYGGMD <u>F</u> WG	QGT L VTVSS	(SEQ ID NO:139)	
10	TAVYYCARPG	<u>Y</u> TYGGMD <u>F</u> WG	QGT L VTVSS	(SEQ ID NO:144)	
11	TAVYYCARPG	<u>Y</u> TYGGMD <u>F</u> WG	QGT L VTVSS	(SEQ ID NO:148)	
12	TAVYYCARPG	<u>F</u> TYGGMD <u>F</u> WG	QGT L VTVSS	(SEQ ID NO:154)	
13	TAVYYCARPG	<u>L</u> TYGGMD <u>F</u> WG	QGT L VTVSS	(SEQ ID NO:158)	
14	TAVYYCARPG	<u>Y</u> TYGGMD <u>F</u> WG	QGT L VTVSS	(SEQ ID NO:162)	
15	TAVYYCARPG	<u>L</u> TYGGMD <u>F</u> WG	QGT L VTVSS	(SEQ ID NO:166)	

图7

抗hPD1 VL 序列

		20			
		*		### ###	
1	DIQMTQSPSS	LSASVGDRV	ITCKSSQSLF	NSGNQKNYLA	WYQ
2	DIQMTQSPSS	LSASVGDRV	ITCRSSQSLF	NSGNQKNYLA	WYQ
3	DIQMTQSPSS	LSASVGDRV	ITCKSSQSLF	NSGNQKNYLA	WYQ
4	DIQMTQSPSS	LSASVGDRV	ITCKSSQSL	NSGNQKNYLA	WYQ
5	DIQMTQSPSS	LSASVGDRV	ITCRSSQSL	NSGNQKNYLA	WYQ
6	DIQMTQSPSS	LSASVGDRV	ITCRSSQSLF	NSGNQKNYLA	WYQ
7	DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	INCRSSQSLF	ISGNQKNYLA	WYQ
8	DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	INCKSSQSLF	ISGNQKNYLA	WYQ
9	DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	INCRSSQSL	ISGNQKNYLA	WYQ
10	DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	INCRSSQSLF	ISGNQKNYLA	WYQ
11	DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	ISCRSSQSLF	ISGNQKNYLA	WYQ
12	DIVMTQSPDS	LAVSLGERAT	ISCRSSQSL	ISGNQKNYLA	WYQ
13	DIQMTQSPSS	LSASVGDRV	ITCKSSQSL	NSGNQKNYLA	WYQ
14	DIQMTQSPSS	LSASVGDRV	ITCKSSQSLF	NSGNQKNYLA	WYQ
15	DIQMTQSPSS	LSASVGDRV	ITCRSSQSLF	NSGNQKNYLA	WYQ
	40		60		
	*		*		
1	QKPGKVP	KLLIYGASTR	DSGVPIRFSG	SGSGTDFTLT	ISSLQ
2	QKPGKVP	KLLIYGASTR	DSGVPIRFSG	SGSGTDFTLT	ISSLQ
3	QKPGKVP	KLLIYGASTR	ESGVPIRFSG	SGSGTDFTLT	ISSLQ
4	QKPGKPP	KLLIYGASTR	DSGVPSRFSG	SGSGTDFTLT	ISSLQ
5	QKPGKLP	KLLIYGASTR	DSGVPSRFSG	SGSGTDFTLT	ISSLQ
6	QKPGKPP	KLLIYGASTR	ESGVPIRFSG	SGSGTDFTLT	ISSLQ
7	QKPGQPP	KLLIYGASTR	ESGVPIRFSG	SGSGTDFTLT	ISSLQ
8	QKPGQPP	KLLIYGASTR	DSGVPIRFSG	SGSGTDFTLT	ISSLQ
9	QKPGQPP	KLLIYGASTR	DSGVPIRFSG	SGSGTDFTLT	ISSLQ
10	QKPGQPP	KLLIYGASTR	DSGVPIRFSG	SGSGTDFTLT	ISSLQ
11	QKPGQPP	KLLIYGASTR	DSGVPIRFSG	SGSGTDFTLT	ISSLQ
12	QKPGQPP	KLLIYGASTR	DSGVPIRFSG	SGSGTDFTLT	ISSLQ
13	QKPGKPP	KLLIYGASTR	DSGVPAKFSG	SGSGTDFTLT	ISSLQ
14	QKPGKLP	KLLIYGASTR	DSGVPSRFSG	SGSGTDFTLT	ISSLQ
15	QKPGKPP	KLLIYGASTR	ESGVPIRFSG	SGSGTDFTLT	ISSLQ
	80		100		
	*		*		
1	PEDVA	TYYCQNDHYY	PYTFGGGTV	EIK	(SEQ ID NO:92)
2	PEDVA	TYYCQNDHYY	PYTFGGGTV	EIK	(SEQ ID NO:101)
3	AEDVA	TYYCQNDHYY	PYTFGGGTV	EIK	(SEQ ID NO:107)
4	PEDVA	TYYCQNDHYY	PYTFGGGTV	EIK	(SEQ ID NO:114)
5	AEDVA	TYYCQNDHYY	PYTFGGGTV	EIK	(SEQ ID NO:119)
6	PEDVA	TYYCQNDHYY	PYTFGGGTV	EIK	(SEQ ID NO:124)
7	AEDVA	VYYCQNNHYY	PYTFGGGTV	EIK	(SEQ ID NO:129)
8	AEDVA	VYYCQNNHYY	PYTFGGGTV	EIK	(SEQ ID NO:136)
9	AEDVA	VYYCQNNHYY	PYTFGGGTV	EIK	(SEQ ID NO:141)
10	AEDVA	VYYCQNNHYY	PYTFGGGTV	EIK	(SEQ ID NO:146)
11	AEDVA	VYYCQNNHYY	PYTFGGGTV	EIK	(SEQ ID NO:152)
12	AEDVA	VYYCQNNHYY	PYTFGGGTV	EIK	(SEQ ID NO:156)
13	PEDVA	TYYCQNDHYY	PYTFGGGTV	EIK	(SEQ ID NO:160)
14	PEDVA	TYYCQNDHYY	PYTFGGGTV	EIK	(SEQ ID NO:164)
15	PEDVA	TYYCQNDHYY	PYTFGGGTV	EIK	(SEQ ID NO:168)

图8

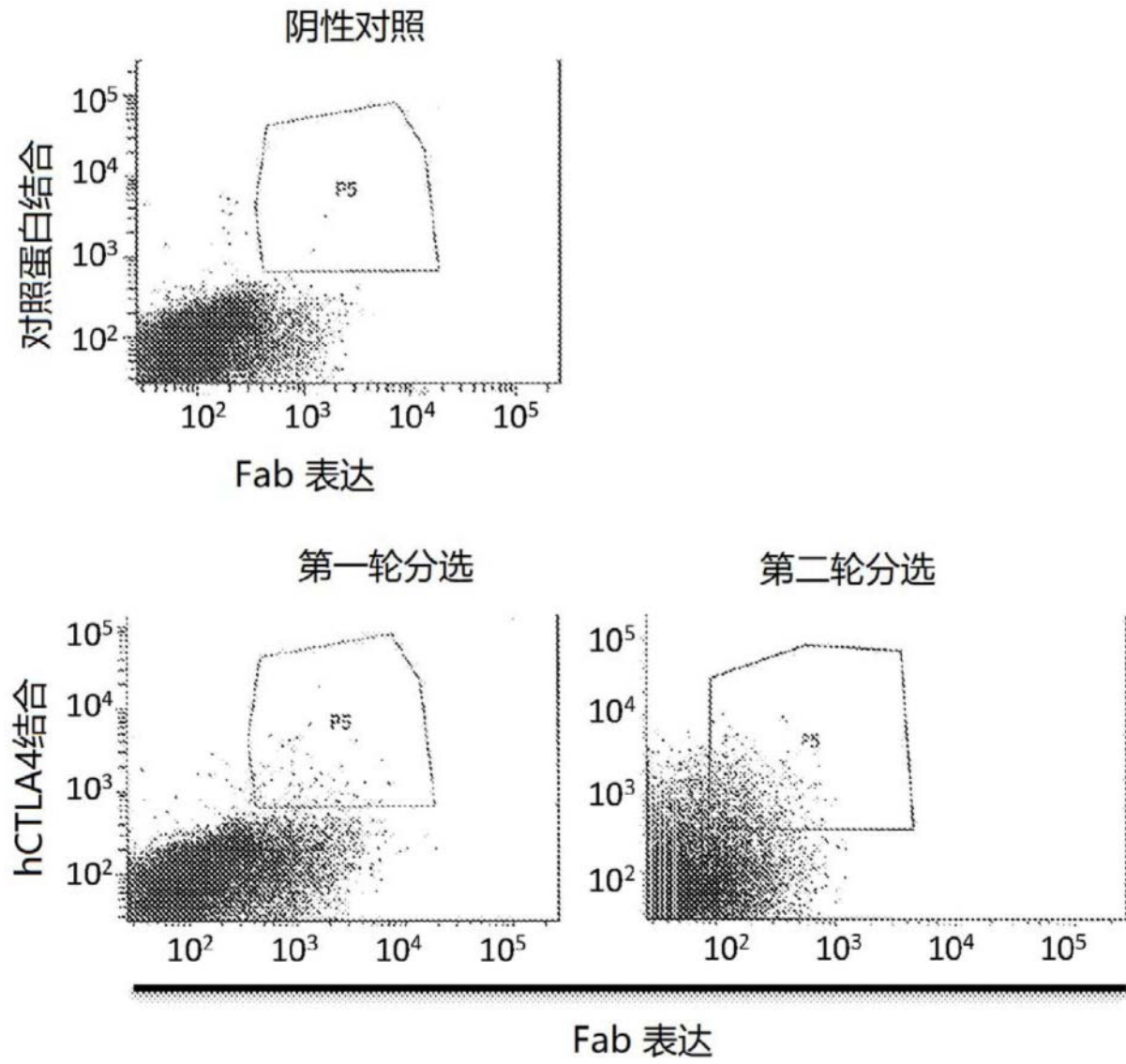


图9

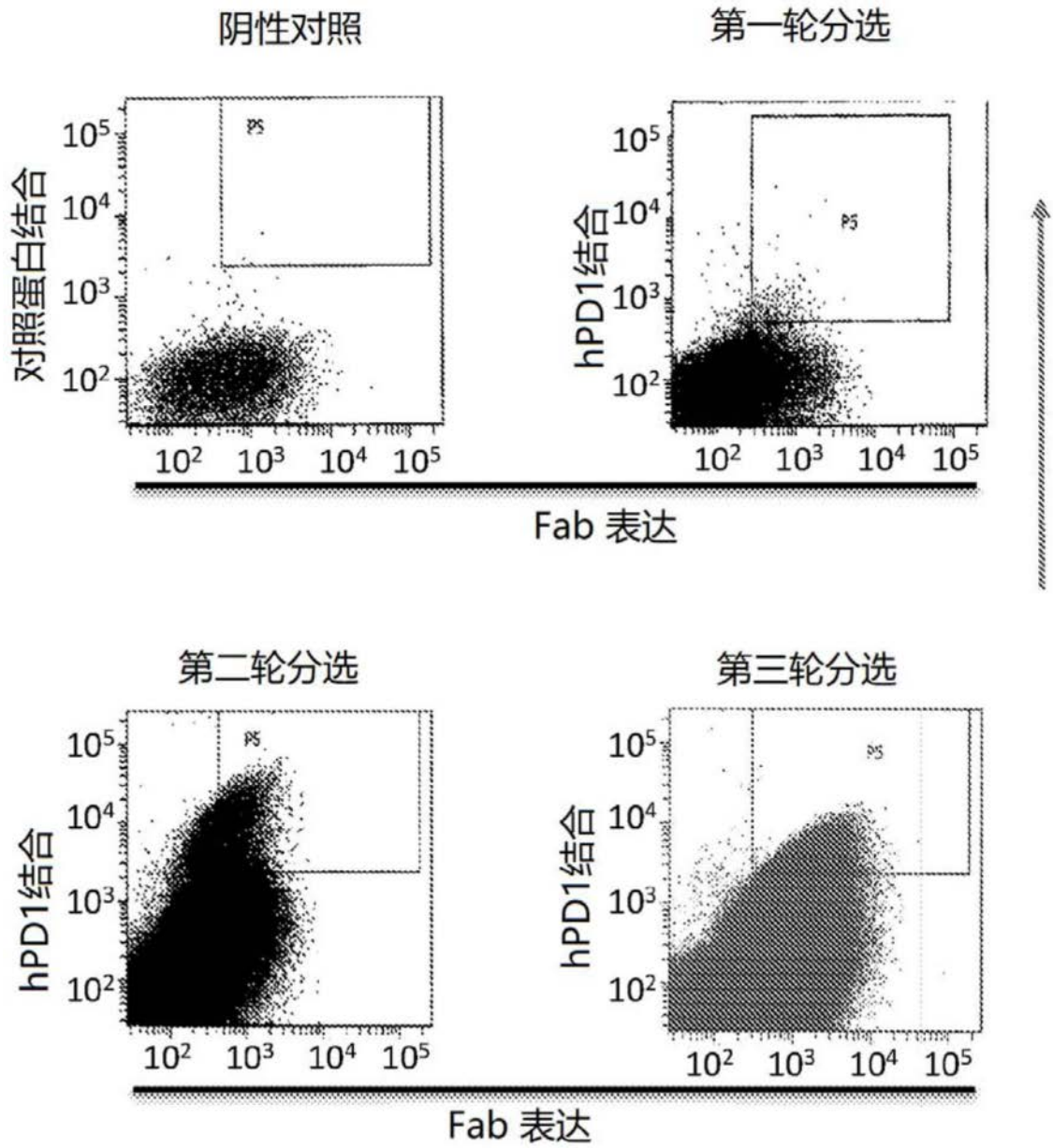


图10

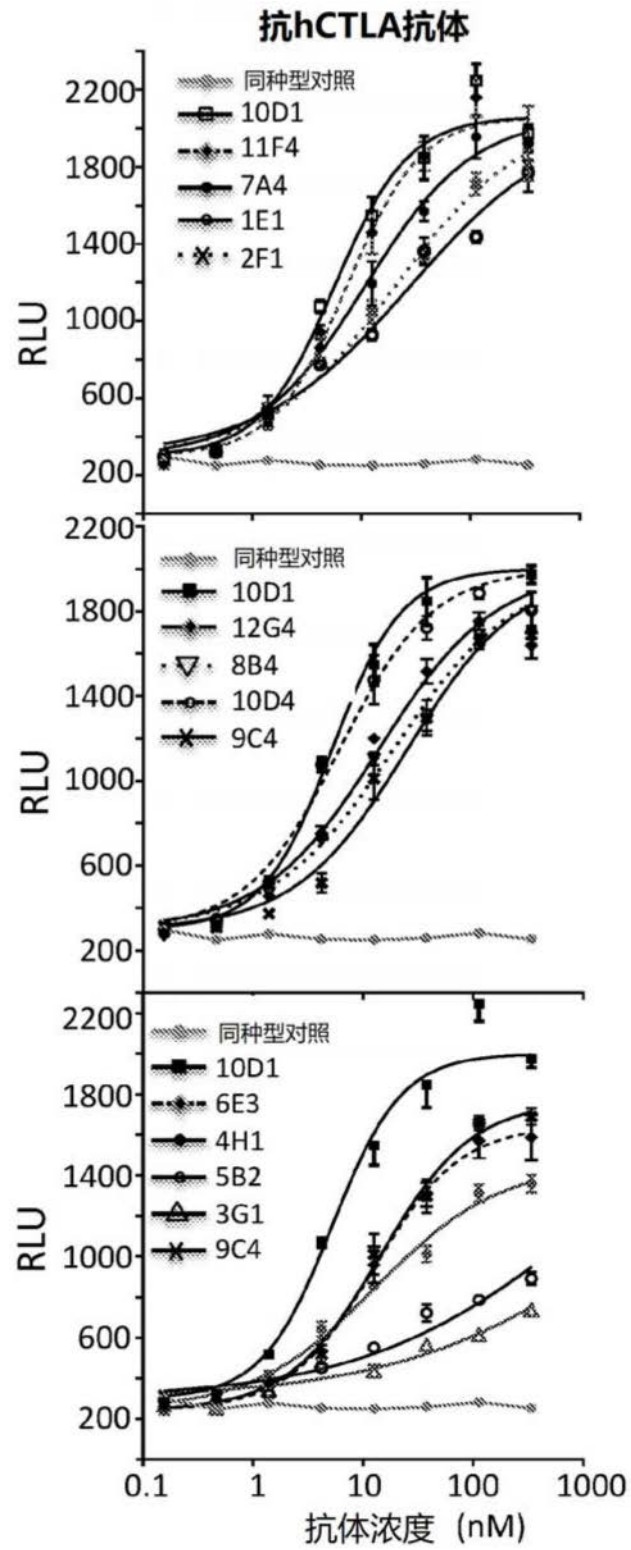


图11

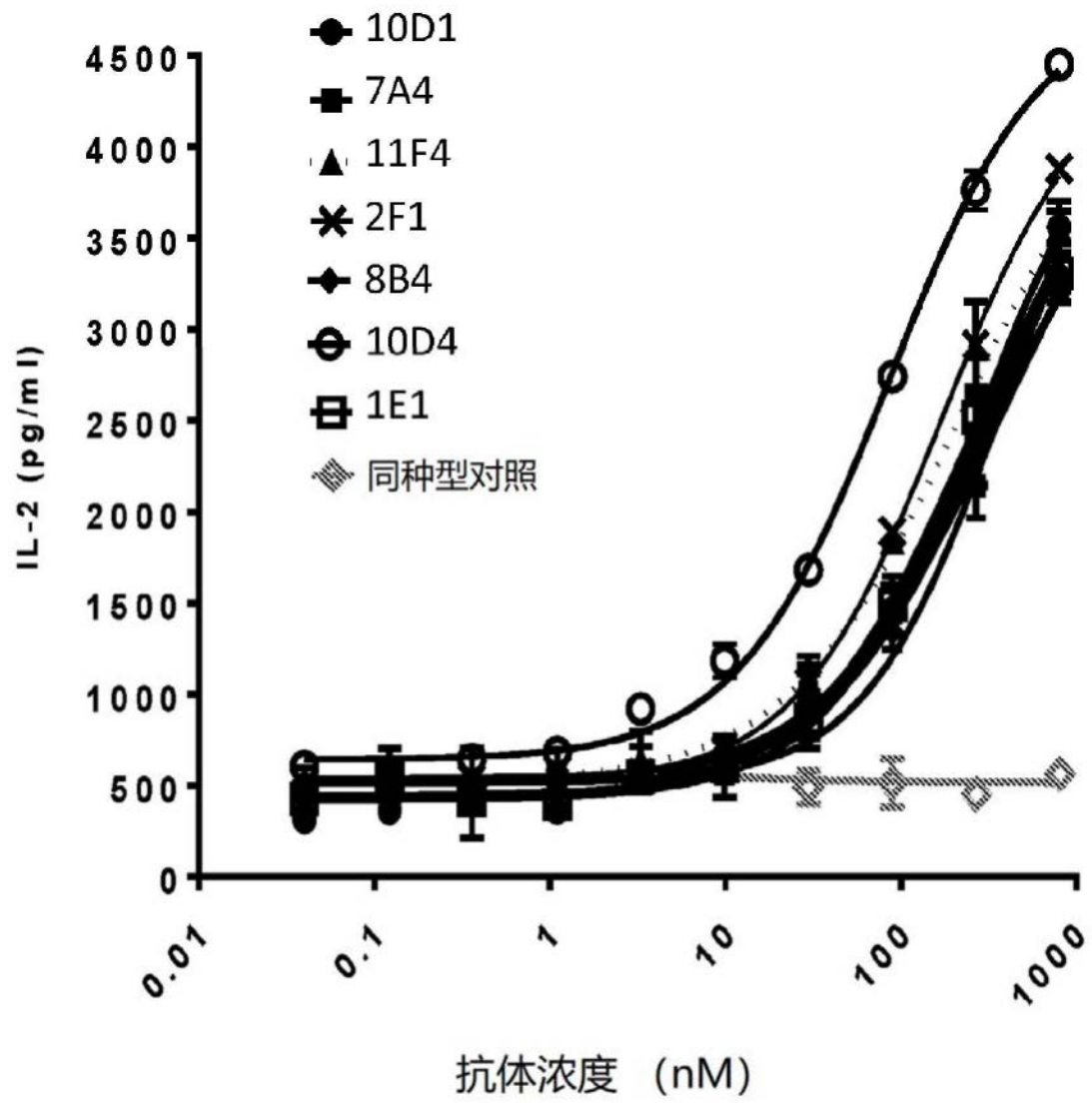


图12

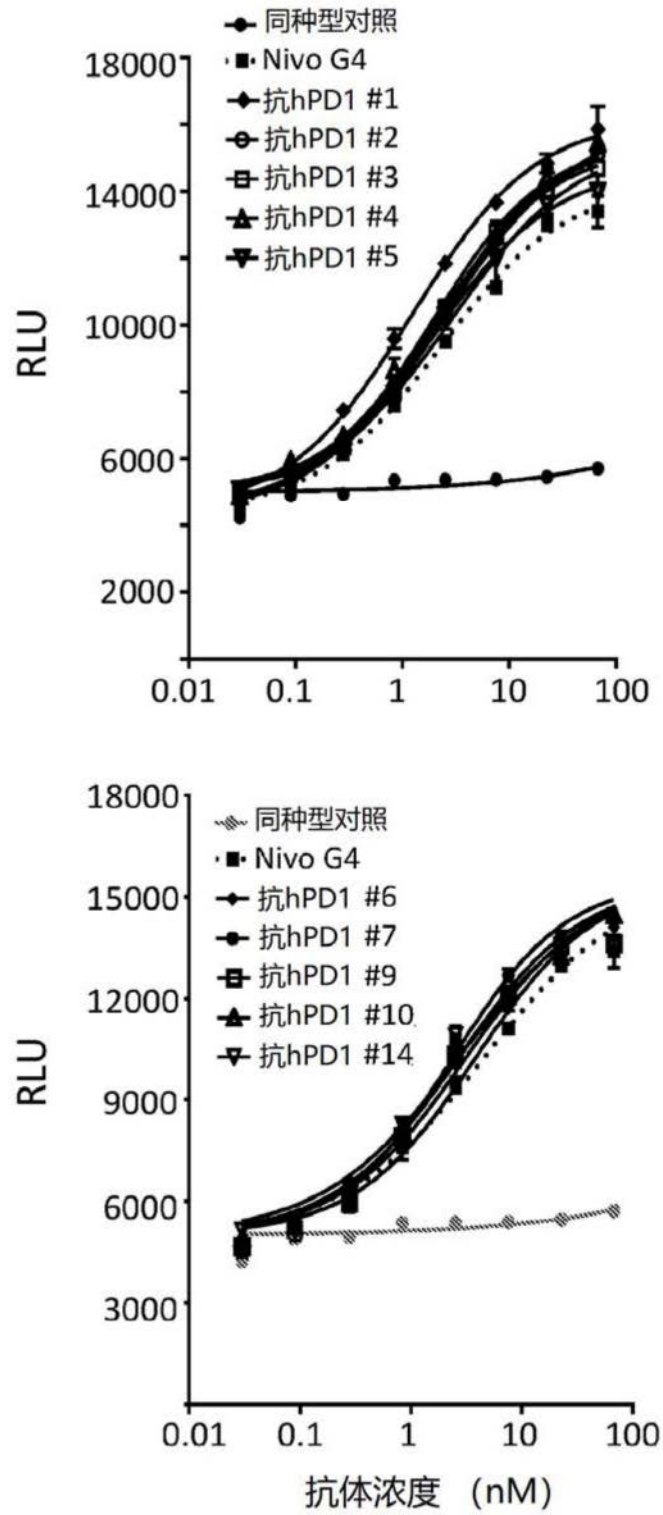


图13

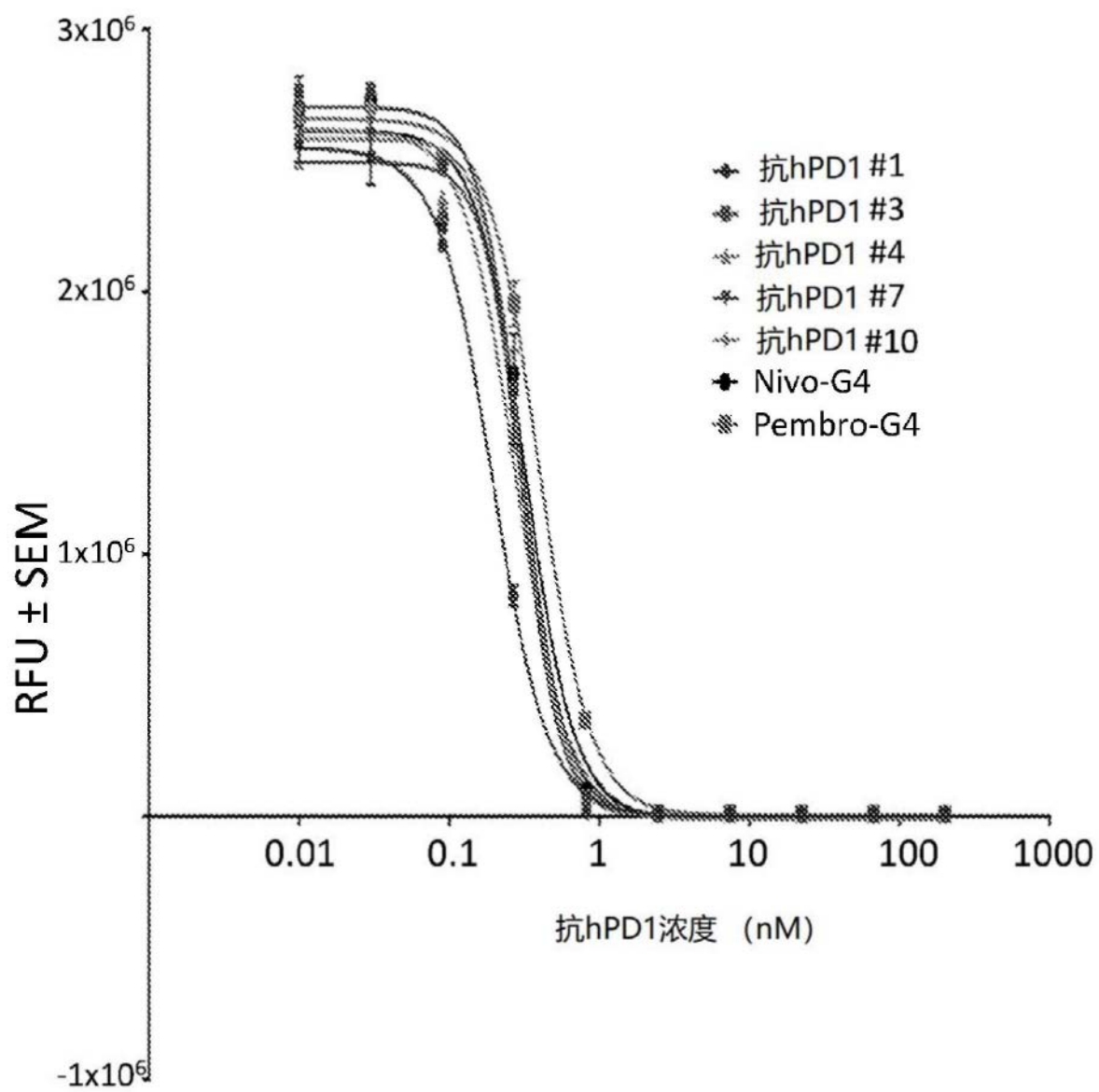


图14

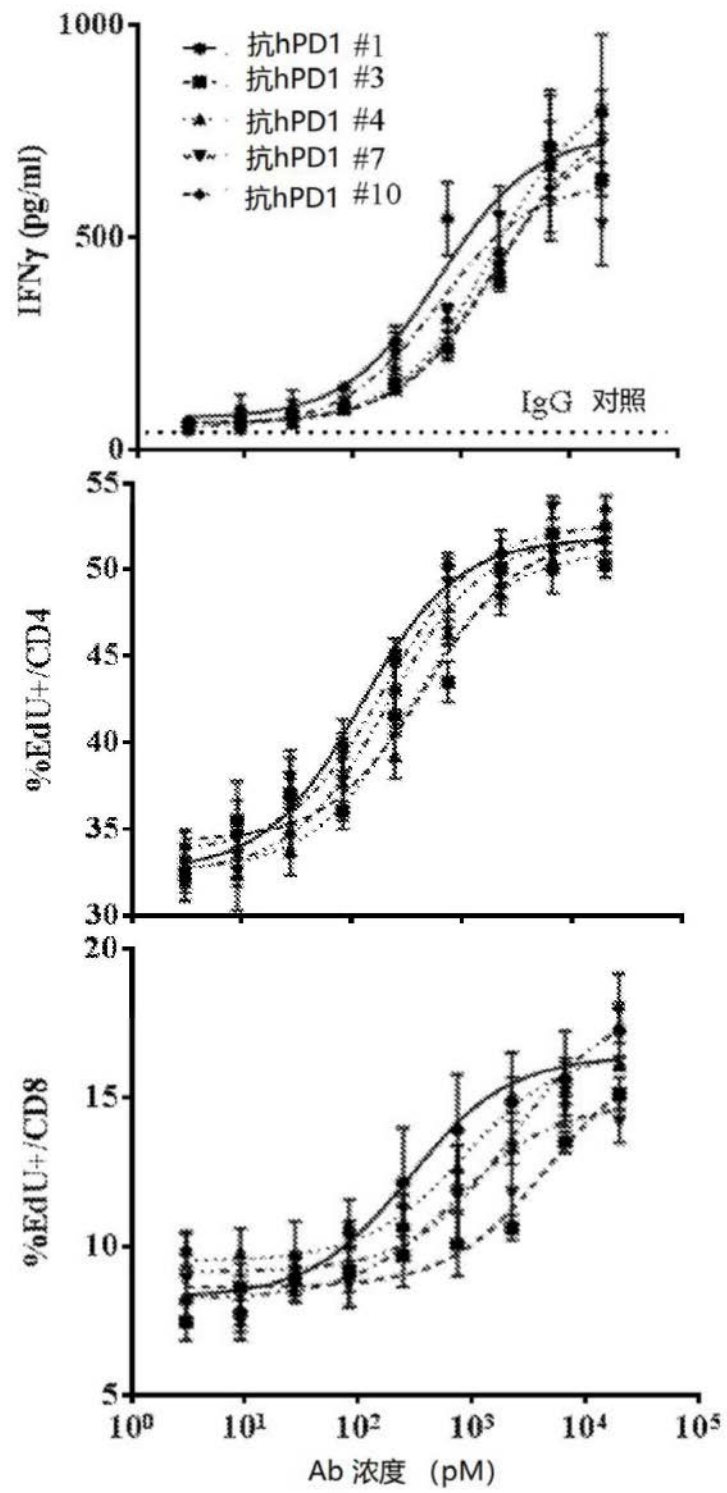


图15

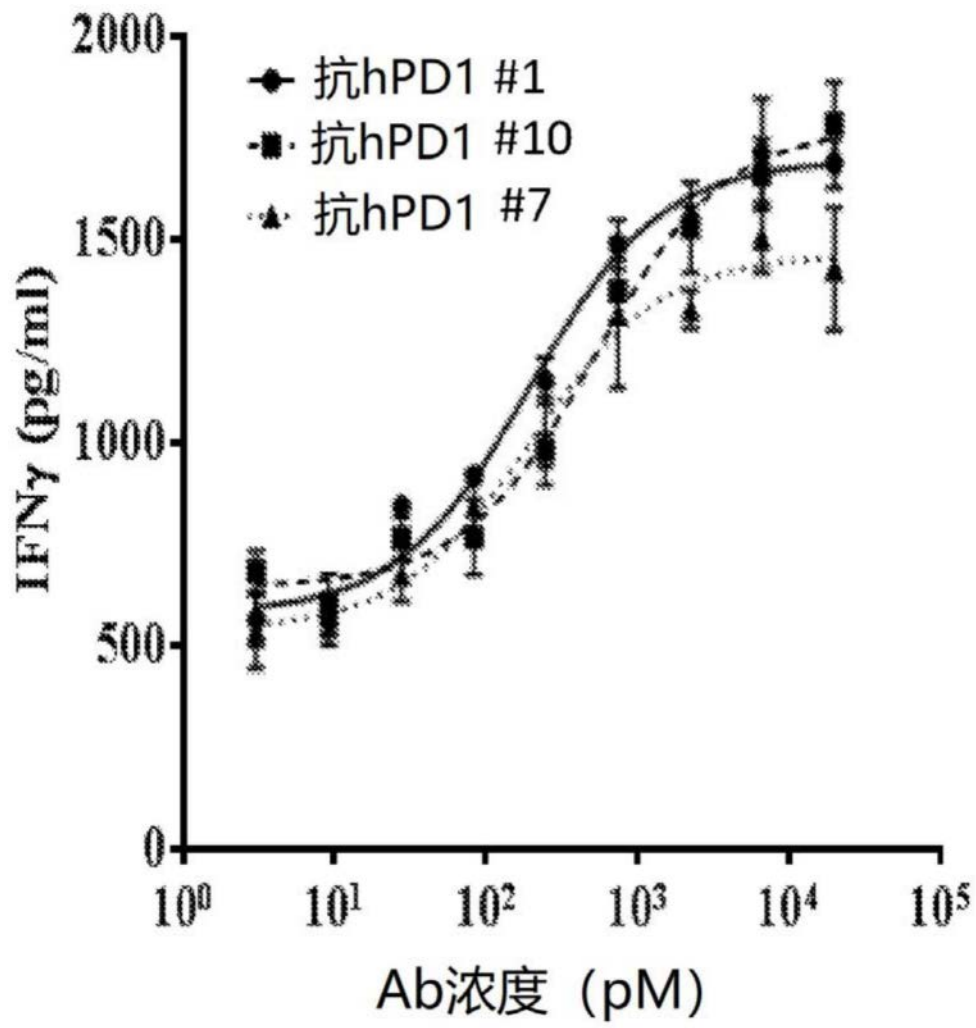


图16

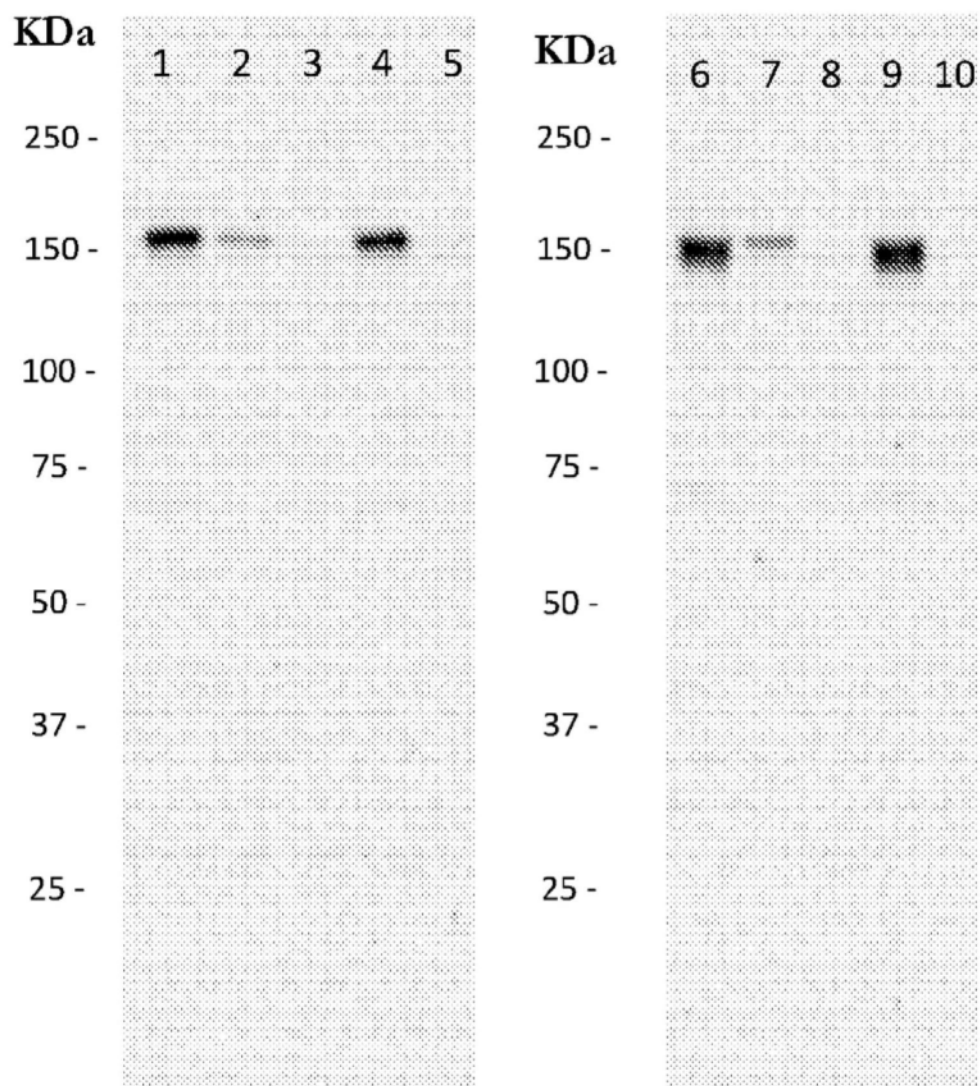


图17

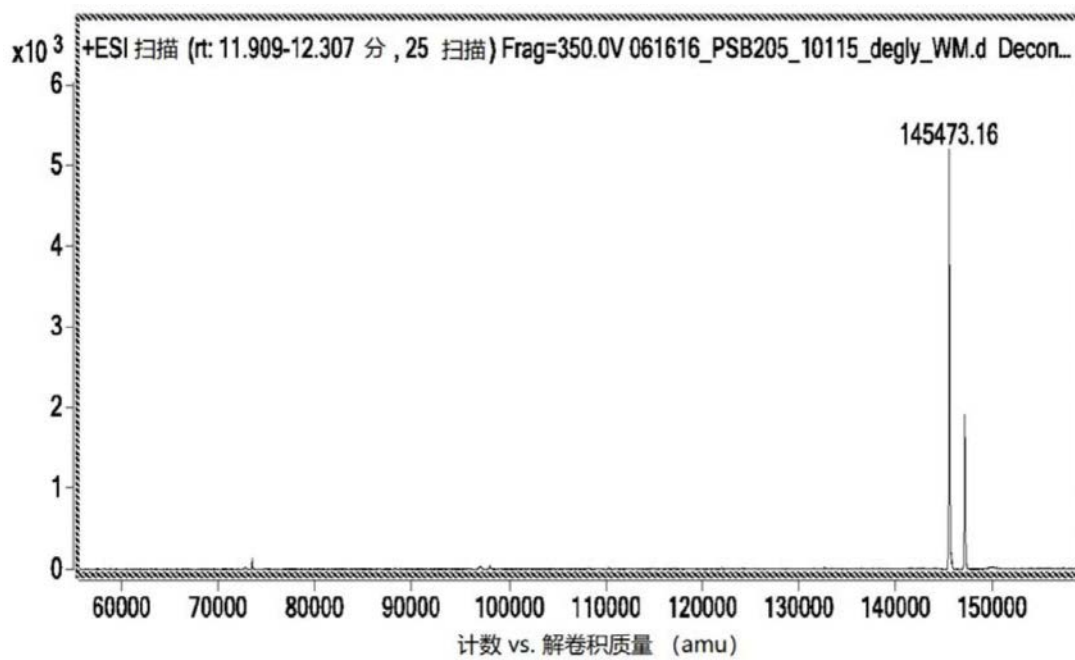


图18A

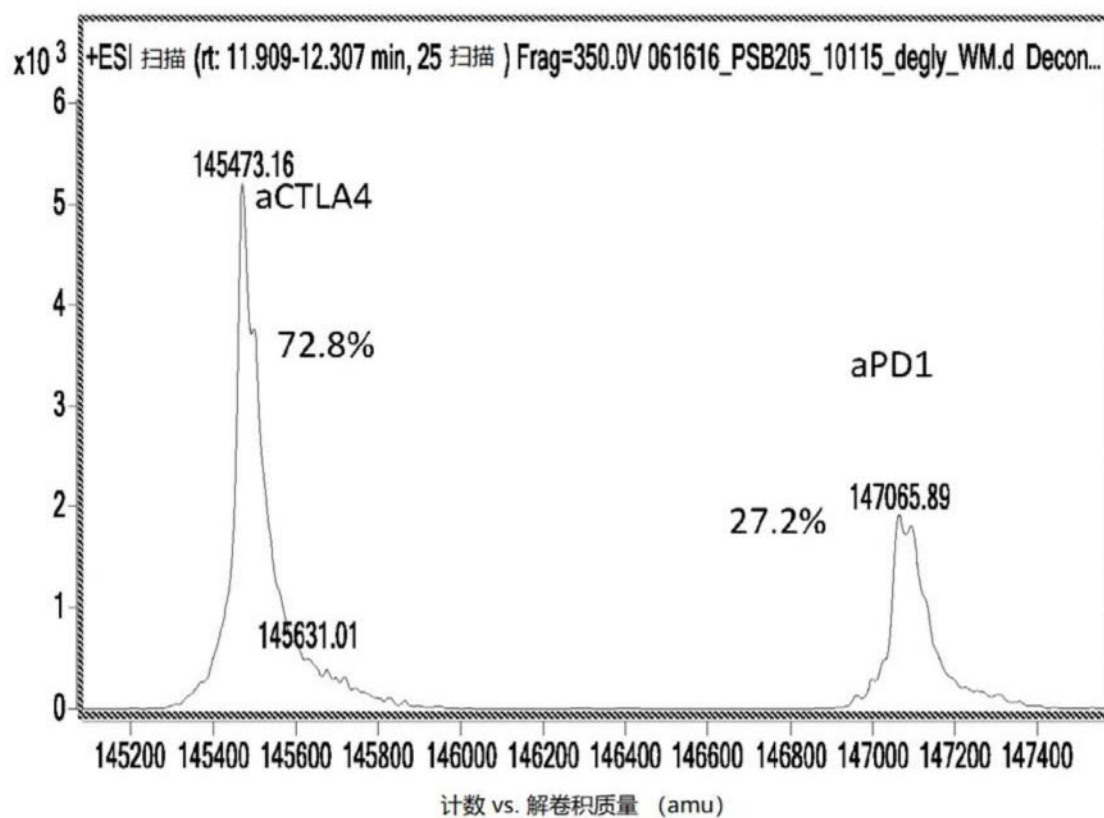


图18B

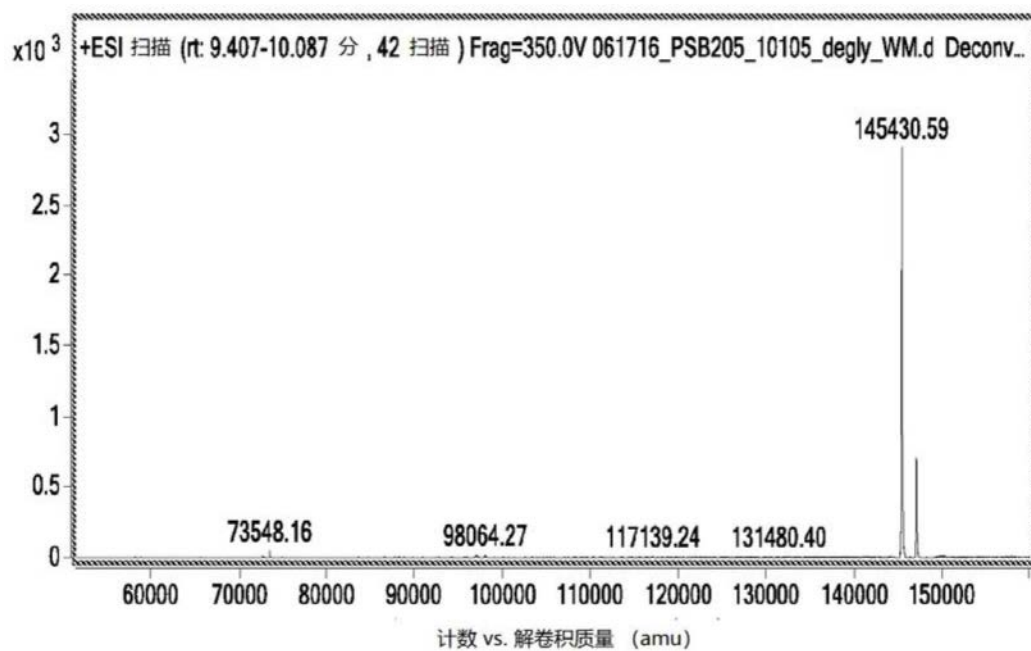


图19A

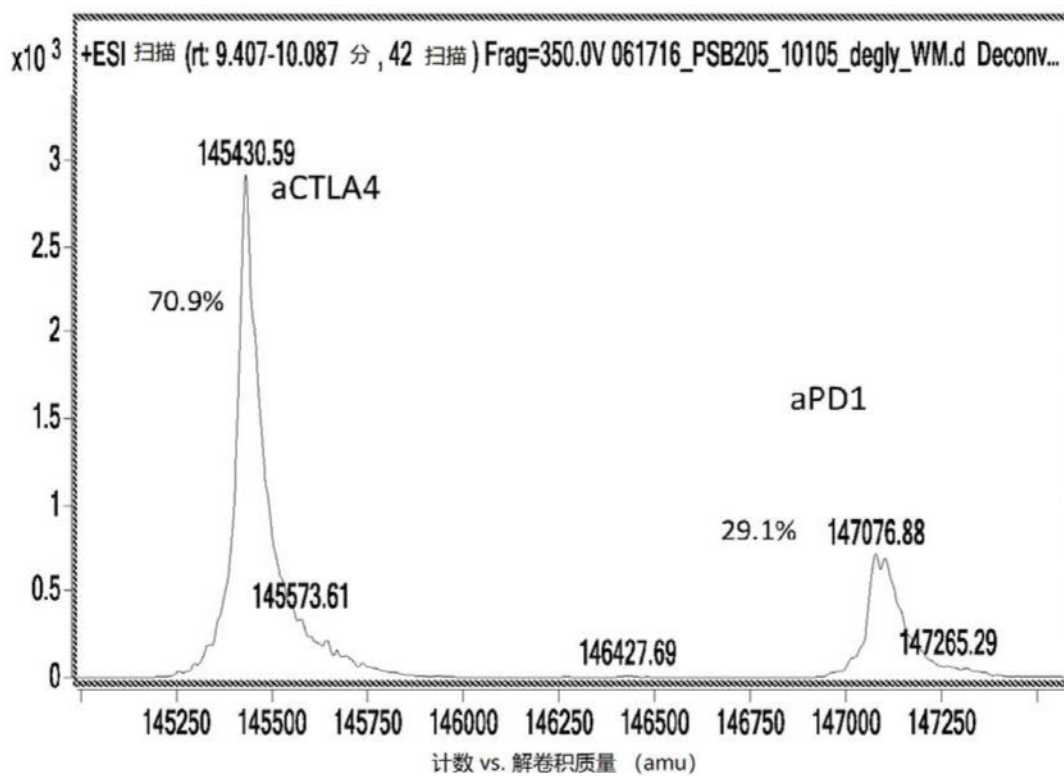


图19B

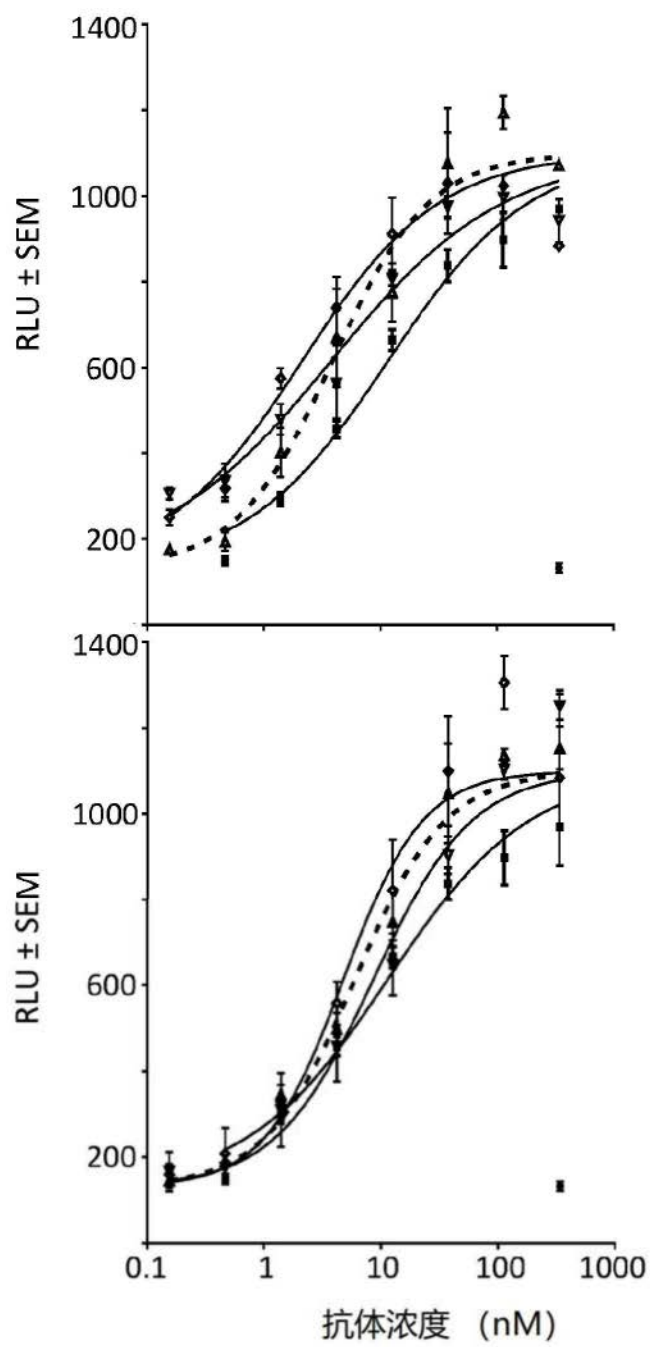


图20

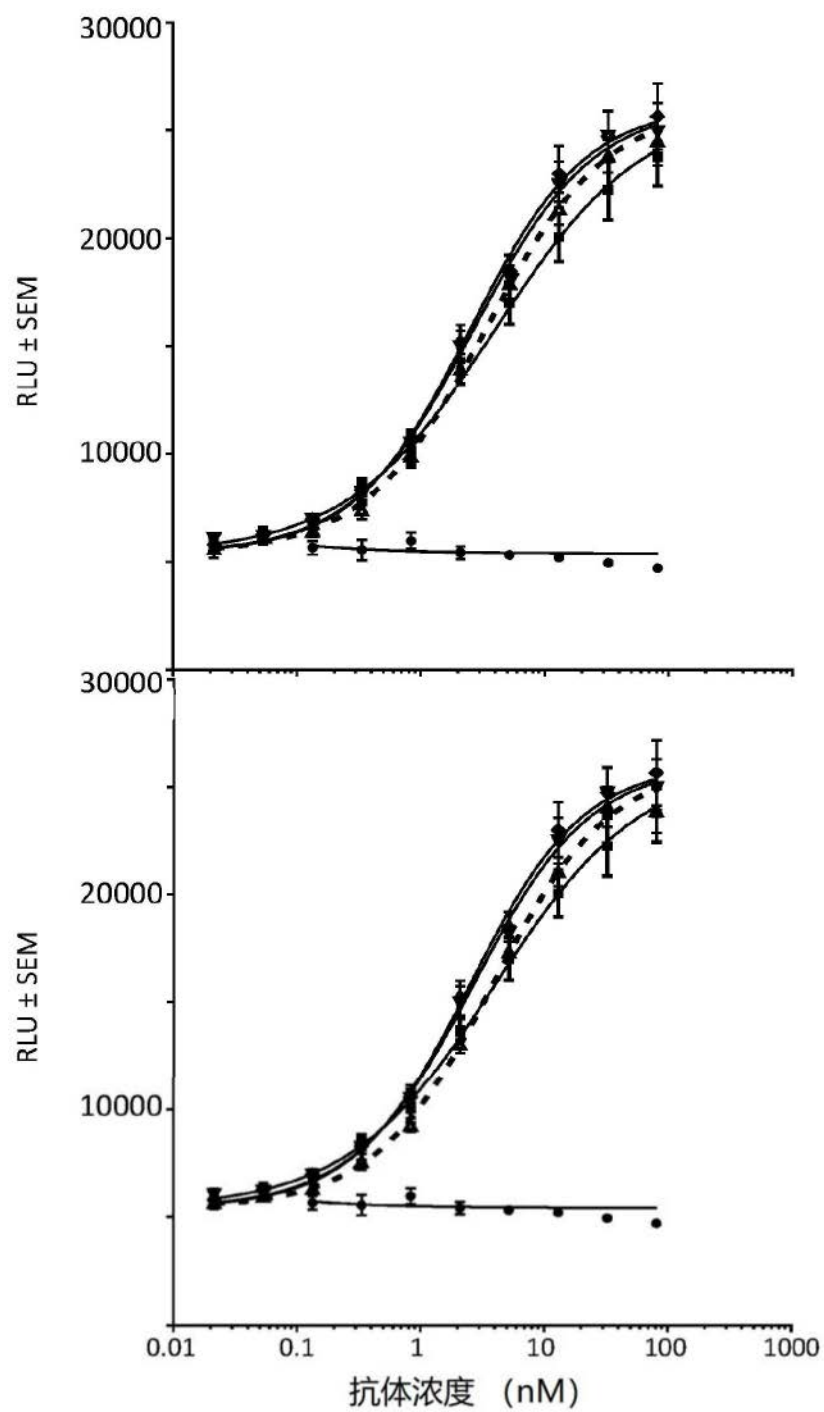


图21

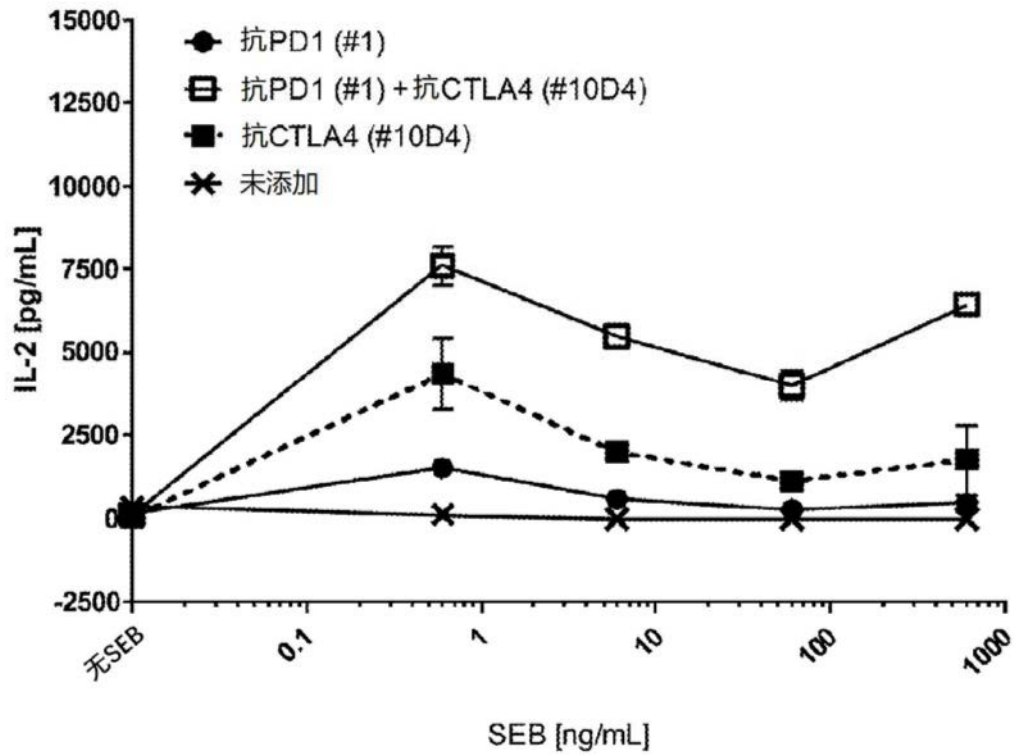


图22A

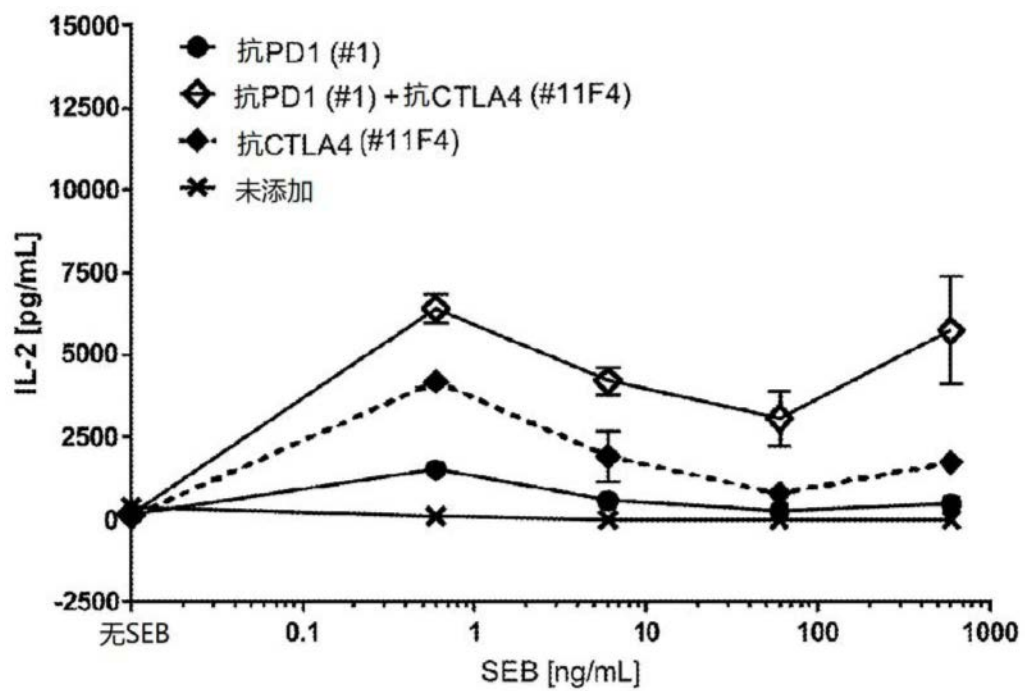


图22B