



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110248961 B

(45) 授权公告日 2024.11.01

(21) 申请号 201780085649.X

(72) 发明人 M·范迪杰克 C·A·蒙特

(22) 申请日 2017.12.07

G·利特 D·沙尔

(65) 同一申请的已公布的文献号

J·D·沃尔乔克 T·默霍布

申请公布号 CN 110248961 A

N·S·威尔森 D·A·萨维斯基

(43) 申请公布日 2019.09.17

M·A·芬戴斯 D·J·安德伍德

(30) 优先权数据

J-M·库尔勒罗特

62/431,272 2016.12.07 US

I·普罗斯库什姆 O·舍巴诺瓦

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所

2019.08.05

11256

(86) PCT国际申请的申请数据

专利代理人 陈文平 徐志明

PCT/US2017/065011 2017.12.07

(51) Int.CI.

(87) PCT国际申请的公布数据

C07K 16/28 (2006.01)

W02018/106862 EN 2018.06.14

A61K 39/00 (2006.01)

(73) 专利权人 艾吉纳斯公司

(56) 对比文件

地址 美国马萨诸塞州

US 2011081354 A1, 2011.04.07

专利权人 路德维格癌症研究有限公司
纪念斯隆凯特琳癌症中心

审查员 李雪莹

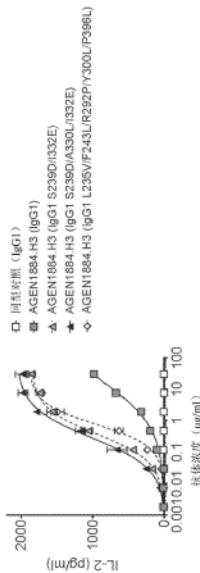
权利要求书3页 说明书79页
序列表67页 附图28页

(54) 发明名称

抗CTLA-4抗体和其使用方法

(57) 摘要

本公开提供了特异性结合到CTLA-4(例如，人类CTLA-4)并且拮抗CTLA-4功能的抗体。还提供了包含这些抗体的药物组合物、编码这些抗体的核酸、用于产生这些抗体的表达载体和宿主细胞，以及使用这些抗体治疗受试者的方法。



1. 一种特异性结合到人类CTLA-4的分离的抗体,所述抗体包括包含互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3的重链可变区以及包含互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3的轻链可变区,其中:

- (a) CDRH1由SEQ ID NO:10的氨基酸序列组成;
- (b) CDRH2由SEQ ID NO:12的氨基酸序列组成;
- (c) CDRH3由SEQ ID NO:14的氨基酸序列组成;
- (d) CDRL1由SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成;
- (e) CDRL2由SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成;并且
- (f) CDRL3由SEQ ID NO:17的氨基酸序列组成。

2. 根据权利要求1所述的分离的抗体,其中所述重链可变区由SEQ ID NO:8的氨基酸序列组成。

3. 根据权利要求1所述的分离的抗体,其中所述轻链可变区由SEQ ID NO:9的氨基酸序列组成。

4. 根据权利要求1所述的分离的抗体,其中所述抗体包括由SEQ ID NO:25的氨基酸序列组成的重链。

5. 根据权利要求1所述的分离的抗体,其中所述重链可变区和所述轻链可变区分别由SEQ ID NO:8和9中所示的氨基酸序列组成。

6. 根据权利要求1所述的分离的抗体,所述抗体包括由氨基酸序列SEQ ID NO:25组成的重链和由氨基酸序列SEQ ID NO:27组成的轻链。

7. 根据权利要求1所述的分离的抗体,其中所述抗体包含选自由人类IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂组成的群组的重链恒定区。

8. 根据权利要求7所述的分离的抗体,其中所述抗体包含IgG₁重链恒定区。

9. 根据权利要求8所述的分离的抗体,其中所述IgG₁重链恒定区的氨基酸序列包含S239D/A330L/I332E突变,根据EU编号系统编号。

10. 根据权利要求9所述的分离的抗体,其中所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:30的重链恒定区。

11. 根据权利要求1所述的分离的抗体,其中所述抗体包含选自由人κ轻链恒定区和人λ轻链恒定区组成的群组的轻链恒定区。

12. 根据权利要求11所述的分离的抗体,其中所述抗体包含人κ轻链恒定区。

13. 根据权利要求12所述的分离的抗体,其中所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:32的轻链恒定区。

14. 根据权利要求1-13中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体是人类抗体。

15. 根据权利要求1-13中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体对人类CTLA-4是拮抗的。

16. 根据权利要求1-13中任一项所述的分离的抗体,其中所述抗体降低或抑制人类CTLA-4的活性。

17. 根据权利要求16所述的分离的抗体,其中所述抗体抑制人类CTLA-4与人类CD80或人类CD86的结合。

18. 根据权利要求16所述的分离的抗体,其中所述抗体诱导经葡萄球菌肠毒素A(SEA)

刺激的外周血单核细胞(PBMC)的IL-2产生。

19. 根据权利要求1-13中任一项所述的分离的抗体,其缀合到细胞毒性剂、细胞抑制剂、毒素、放射性核素或可检测标签。

20. 一种药物组合物,其包含根据权利要求1-13中任一项所述的抗体和药学上可接受的载体或赋形剂。

21. 一种分离的多核苷酸,其编码:

- a) 根据权利要求1至13中任一项所述的抗体的重链和轻链;或
- b) 根据权利要求1至13中任一项所述的抗体的重链可变区和轻链可变区。

22. 多种分离的多核苷酸,其编码:

- a) 根据权利要求1至13中任一项所述的抗体的重链和轻链;或
- b) 根据权利要求1至13中任一项所述的抗体的重链可变区和轻链可变区。

23. 一种载体,其包含根据权利要求21所述的多核苷酸。

24. 多种载体,其编码:

- a) 根据权利要求1至13中任一项所述的抗体的重链和轻链;或
- b) 根据权利要求1至13中任一项所述的抗体的重链可变区和轻链可变区。

25. 一种重组宿主细胞,其包含:

- a) 根据权利要求21所述的多核苷酸;或
- b) 根据权利要求23所述的载体。

26. 一种重组宿主细胞,其包含:

a) 编码根据权利要求1至13中任一项所述的抗体的重链可变区的第一分离的多核苷酸,和编码根据权利要求1至13中任一项所述的抗体的轻链可变区的第二分离的多核苷酸;

b) 编码根据权利要求1至13中任一项所述的抗体的重链的第一分离的多核苷酸,和编码根据权利要求1至13中任一项所述的抗体的轻链的第二分离的多核苷酸;

c) 编码根据权利要求1至13中任一项所述的抗体的重链可变区的第一载体,和编码根据权利要求1至13中任一项所述的抗体的轻链可变区的第二载体;或

d) 编码根据权利要求1至13中任一项所述的抗体的重链的第一载体,和编码根据权利要求1至13中任一项所述的抗体的轻链的第二载体。

27. 一种产生特异性结合到人类CTLA-4的抗体的方法,所述方法包括培养根据权利要求25或26所述的宿主细胞以便表达所述多核苷酸并且产生所述抗体。

28. 根据权利要求1至13中任一项所述的抗体在制备用于治疗受试者的癌症的药物中的用途,其中所述癌症选自结肠直肠癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肉瘤、胰腺癌、宫颈癌、肺癌和黑色素瘤。

29. 根据权利要求28所述的用途,其中没有标准疗法可用于所述癌症。

30. 根据权利要求28所述的用途,其中所述癌症是标准疗法所难治愈的。

31. 根据权利要求28所述的用途,其中所述癌症在标准疗法之后复发。

32. 根据权利要求28所述的用途,其中所述肺癌是非小细胞肺癌(NSCLC)。

33. 根据权利要求32所述的用途,其中所述NSCLC是转移性NSCLC。

34. 根据权利要求32所述的用途,其中所述NSCLC没有EGFR或ALK基因组肿瘤畸变。

35. 根据权利要求32所述的用途,其中所述NSCLC没有EGFR敏化突变或ALK易位。

36. 根据权利要求28所述的用途,其中所述药物在所述癌症的诊断之后作为第一癌症疗法施用。

37. 根据权利要求28所述的用途,其中所述药物在以下之后作为第一癌症疗法施用:

- (a) 尽管先前用不同的癌症疗法治疗所述癌症但仍发生的肿瘤进展的诊断;或
- (b) 不同癌症疗法的毒性的诊断。

38. 根据权利要求37所述的用途,其中所述抗体是向所述受试者施用的第二癌症疗法。

39. 根据权利要求28所述的用途,其中所述药物皮下、瘤内或静脉内施用。

40. 根据权利要求39所述的用途,其中所述药物以0.01mg/kg、0.03mg/kg、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、6mg/kg或10mg/kg静脉内施用。

41. 根据权利要求39所述的用途,其中所述药物以每两周一次、每三周一次、每四周一次、每六周一次或每十二周一次的时间间隔施用。

42. 根据权利要求28所述的用途,其中所述药物被递送到肿瘤引流淋巴结。

43. 根据权利要求28所述的用途,其中所述药物作为单一疗法施用。

44. 根据权利要求28所述的用途,其中所述药物适合于与额外治疗剂组合向所述受试者施用。

45. 根据权利要求44所述的用途,其中所述额外治疗剂是抗PD-1抗体。

46. 根据权利要求45所述的用途,其中所述抗PD-1抗体是派姆单抗或纳武单抗。

47. 根据权利要求45所述的用途,其中所述额外治疗剂是每三周以200mg施用的派姆单抗。

48. 根据权利要求44所述的用途,其中所述额外治疗剂是化疗剂或检查点靶向剂。

49. 根据权利要求48所述的用途,其中所述检查点靶向剂选自由以下组成的群组:拮抗剂抗PD-1抗体、拮抗剂抗PD-L1抗体、拮抗剂抗PD-L2抗体、拮抗剂抗CTLA-4抗体、拮抗剂抗TIM-3抗体、拮抗剂抗LAG-3抗体、拮抗剂抗CEACAM1抗体、激动剂抗GITR抗体、激动剂抗OX40抗体和激动剂抗CD137抗体。

50. 根据权利要求44所述的用途,其中所述额外治疗剂是吲哚胺-2,3-双加氧酶(IDO)抑制剂。

51. 根据权利要求50所述的用途,其中所述抑制剂选自由以下组成的群组:艾卡唆司他、F001287、吲哚莫德和NLG919。

52. 根据权利要求44所述的用途,其中所述额外治疗剂是疫苗。

53. 根据权利要求52所述的用途,其中所述疫苗包括包含热休克蛋白与抗原肽复合的热休克蛋白肽复合物(HSPPC)。

54. 根据权利要求53所述的用途,其中所述热休克蛋白是hsc70并且与肿瘤相关的抗原肽复合。

55. 根据权利要求53所述的用途,其中所述热休克蛋白是gp96蛋白并且与肿瘤相关的抗原肽复合,其中所述HSPPC来源于从受试者获得的肿瘤。

抗CTLA-4抗体和其使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2016年12月7日提交的美国临时申请第62/431,272号的权益，所述临时申请以全文引用的方式并入本文中。

技术领域

[0003] 本公开涉及特异性结合到CTLA-4(例如，人类CTLA-4)的抗体和其使用方法。

背景技术

[0004] T淋巴细胞是对抗原的适应性免疫反应的关键。原初T细胞的完全活化需要至少两种信号(Bretscher 1999,《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA)》96:185-90)。第一抗原特异性信号通过T细胞受体(TCR)与抗原呈递细胞(APC)上的MHC/肽复合物的相互作用提供。第二共刺激信号通过T细胞上的受体与抗原呈递细胞(APC)上的其配体之间的相互作用提供。TCR/MHC和共刺激相互作用两者的接合经由多种细胞内途径引起T细胞活化，所述途径包括钙-钙调神经磷酸酶和RAS丝裂原活化蛋白激酶，和多种效应子化合物(包括细胞因子，如IL-2)的转录因子的后续活化。这些事件引起T细胞增殖，生成CD4+辅助T细胞(TH)池，并且扩增活化的CD8+细胞毒性T细胞。共刺激不仅对于完全T细胞活化是关键的，而且其在TCR/MHC接合期间的不存在会导致无能和/或细胞凋亡。

[0005] 多个正性和负性共刺激途径参与T细胞调节；然而，最关键的在T细胞上的CD28与APC上的B7-1(CD80)和B7-2(CD86)之间。CD28促进T细胞分化为TH1表型细胞并且增强B细胞的抗体产生和T细胞的活化。APC(如树突状细胞(DC)和B细胞)上表达的B7-1和B7-2具有重叠但独特的功能。B7-2组成性表达并且与TCR/MHC参与(信号1)一致地在APC上快速上调。B7-1表达在静止细胞上极低，但典型地在延长的T细胞刺激之后被诱导。这些差异表明，虽然B7-2可能在T细胞活化的起始时是重要的，但B7-1可能在延续免疫反应方面起更大作用。

[0006] 在T细胞活化之后，负调节受体细胞毒性T淋巴细胞抗原4(CTLA-4)在T细胞上上调(Alegre等人，2001，《自然·免疫学综述(Nat Rev Immunol)》1:220-8)。CTLA-4与CD28在结构上同源但更紧密地结合到B7-1和B7-2配体两者。CTLA-4以几种方式抑制免疫反应：其与CD28竞争B7配体并且因此阻断共刺激；其负性地信号传导以抑制T细胞活化；并且其可以通过反式内吞从相对细胞捕获CD80和CD86，从而导致受损的经由CD28的共刺激(Krummel和Allison,1995,《实验医学杂志(J Exp Med)》182:459-465;Walunas等人,1994,《免疫性(Immunity)》1:405-413;Qureshi等人,2011,《科学(Science)》332:600-603)。

[0007] 考虑到B7共刺激途径在促进和维持免疫反应方面的关键作用，经设计以拮抗这一途径的治疗剂对于治疗自身免疫疾病和病症是有希望的。

发明内容

[0008] 本公开提供了特异性结合到人类CTLA-4并且拮抗CTLA-4功能(例如，CTLA-4介导的免疫抑制)的抗体。还提供了包含这些抗体的药物组合物、编码这些抗体的核酸、用于产

生这些抗体的表达载体和宿主细胞,以及使用这些抗体治疗受试者的方法。本文所述的抗体尤其可用于增加响应于抗原(例如,肿瘤抗原或感染性疾病抗原)的T细胞活化和/或降低Treg介导的免疫抑制,并且因此可用于治疗受试者的癌症或可用于治疗或预防受试者的感染性疾病。

[0009] 因此,在一个方面,本公开提供了一种分离的抗体,所述抗体包括包含互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3的重链可变区以及包含互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3的轻链可变区,其中:

- [0010] (a) CDRH1包含氨基酸序列SYSMN (SEQ ID NO:10) ;
- [0011] (b) CDRH2包含氨基酸序列SISSSSSYIYYAXSVKG (SEQ ID NO:18) ,其中X是E或D;
- [0012] (c) CDRH3包含氨基酸序列VGLXGPFDI (SEQ ID NO:19) ,其中X是F或M;
- [0013] (d) CDRL1包含氨基酸序列RASQSVSRYLG (SEQ ID NO:15) ;
- [0014] (e) CDRL2包含氨基酸序列GASTRAT (SEQ ID NO:16) ;并且
- [0015] (f) CDRL3包含氨基酸序列QQYGSSPWT (SEQ ID NO:17) ,
[0016] 并且其中所述抗体的所述CDRH1、CDRH2和CDRH3序列分别不是SEQ ID NO:10、11和13。

[0017] 在某些实施例中,所述CDRH2包含氨基酸序列SEQ ID NO:11。在某些实施例中,所述CDRH2包含氨基酸序列SEQ ID NO:12。在某些实施例中,所述CDRH3包含氨基酸序列SEQ ID NO:13。在某些实施例中,所述CDRH3包含氨基酸序列SEQ ID NO:14。在某些实施例中,CDRH1、CDRH2和CDRH3分别包含SEQ ID NO:10、11和14;10、12和13;或10、12和14中所述的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列。在某些实施例中,CDRH1、CDRH2和CDRH3分别包含SEQ ID NO:10、12和14中所述的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列。在某些实施例中,CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3分别包含SEQ ID NO:10、11、14、15、16和17;10、12、13、15、16和17;或10、12、14、15、16和17中所述的氨基酸序列。在某些实施例中,CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3分别包含SEQ ID NO:10、12、14、15、16和17中所述的氨基酸序列。

[0018] 在另一方面,本公开提供了一种特异性结合到人类CTLA-4的分离的抗体,所述抗体包括包含互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3的重链可变区以及包含互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3的轻链可变区,其中:

- [0019] (a) CDRH1包含氨基酸序列SYSMN (SEQ ID NO:10) ;
- [0020] (b) CDRH2包含氨基酸序列SISSSSSYIYYAXSVKG (SEQ ID NO:18) ,其中X是E或D;
- [0021] (c) CDRH3包含氨基酸序列VGLXGPFDI (SEQ ID NO:19) ,其中X是F或M;
- [0022] (d) CDRL1包含氨基酸序列RASQSVSRYLG (SEQ ID NO:15) ;
- [0023] (e) CDRL2包含氨基酸序列GASTRAT (SEQ ID NO:16) ;并且
- [0024] (f) CDRL3包含氨基酸序列QQYGSSPWT (SEQ ID NO:17) ,
[0025] 并且其中所述抗体的所述CDRH1、CDRH2和CDRH3序列分别不是SEQ ID NO:10、11和13。

[0026] 在某些实施例中,所述CDRH2包含氨基酸序列SEQ ID NO:11。在某些实施例中,所述CDRH2包含氨基酸序列SEQ ID NO:12。在某些实施例中,所述CDRH3包含氨基酸序列SEQ ID NO:13。在某些实施例中,所述CDRH3包含氨基酸序列SEQ ID NO:14。在某些实施例中,CDRH1、CDRH2和CDRH3分别包含SEQ ID NO:10、11和14;10、12和13;或10、12和14中所述的

CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列。在某些实施例中，CDRH1、CDRH2和CDRH3分别包含SEQ ID NO:10、12和14中所述的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列。在某些实施例中，CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3分别包含SEQ ID NO:10、11、14、15、16和17；10、12、13、15、16和17；或10、12、14、15、16和17中所述的氨基酸序列。在某些实施例中，CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3分别包含SEQ ID NO:10、12、14、15、16和17中所述的氨基酸序列。

[0027] 在另一方面，本公开提供了一种特异性结合到人类CTLA-4的分离的抗体，所述抗体包括包含互补决定区CDRH1、CDRH2和CDRH3的重链可变区以及包含互补决定区CDRL1、CDRL2和CDRL3的轻链可变区，其中CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3分别包含SEQ ID NO:10、12、14、15、16和17中所述的氨基酸序列。

[0028] 在某些实施例中，所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:20的重链可变区。在某些实施例中，所述抗体包括包含与选自由SEQ ID NO:2和4-8组成的群组的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%一致的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施例中，所述抗体包括包含与选自由SEQ ID NO:3组成的群组的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%一致的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施例中，所述重链可变区包含选自由SEQ ID NO:2和4-8组成的群组的氨基酸序列。在某些实施例中，所述重链可变区包含氨基酸序列SEQ ID NO:8。在某些实施例中，所述重链可变区包含氨基酸序列SEQ ID NO:3。在某些实施例中，所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:23的重链。在某些实施例中，所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:24的重链。在某些实施例中，所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:25的重链。在某些实施例中，所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:26的重链。在某些实施例中，所述抗体包含具有来源于人类IGHV3-21胚系序列(例如，IGHV3-21*01，例如，具有氨基酸序列SEQ ID NO:21)的氨基酸序列的重链可变区。

[0029] 在某些实施例中，所述抗体包括包含与氨基酸序列SEQ ID NO:9至少75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%一致的氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施例中，所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:9的轻链可变区。在某些实施例中，所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:27的轻链。在某些实施例中，所述抗体包含具有来源于人类IGKV3-20胚系序列(例如，IGKV3-20*01，例如，具有氨基酸序列SEQ ID NO:22)的氨基酸序列的轻链可变区。

[0030] 在某些实施例中，本公开提供了一种特异性结合到人类CTLA-4的分离的抗体，所述抗体包含具有来源于人类IGHV3-21胚系序列(例如，IGHV3-21*01，例如，具有氨基酸序列SEQ ID NO:21)的氨基酸序列的重链可变区，其中所述重链可变区包含SEQ ID NO:14中所述的氨基酸序列。在某些实施例中，所述抗体包含具有来源于人类IGKV3-20胚系序列(例如，IGKV3-20*01，例如，具有氨基酸序列SEQ ID NO:22)的氨基酸序列的轻链可变区。

[0031] 在另一方面，本公开提供了一种特异性结合到人类CTLA-4的分离的抗体，所述抗体包括包含选自由SEQ ID NO:2-8组成的群组的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施例中，所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:8的重链可变区。在某些实施例中，所述抗体包括包含选自由SEQ ID NO:23-26组成的群组的氨基酸序列的重链。在某些实施例中，所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:23的重链。在某些实施例中，所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:24的重链。在某些实施例中，所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:

25的重链。在某些实施例中，所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:26的重链。

[0032] 在另一方面，本公开提供了一种特异性结合到人类CTLA-4的分离的抗体，所述抗体包含重链可变区和轻链可变区，其中所述重链可变区和所述轻链可变区分别包含SEQ ID NO:2和9;3和9;4和9;5和9;6和9;7和9;或8和9中所述的氨基酸序列。在某些实施例中，所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:8的重链可变区和包含氨基酸序列SEQ ID NO:9的轻链可变区。在某些实施例中，所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:23的重链；和包含氨基酸序列SEQ ID NO:27的轻链。在某些实施例中，所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:24的重链；和包含氨基酸序列SEQ ID NO:27的轻链。在某些实施例中，所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:25的重链；和包含氨基酸序列SEQ ID NO:27的轻链。在某些实施例中，所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:26的重链；和包含氨基酸序列SEQ ID NO:27的轻链。

[0033] 在另一方面，本公开提供了一种特异性结合到人类CTLA-4的分离的抗体，所述抗体包含具有来源于人类IGHV3-21*01胚系序列(例如，IGHV3-21*01，例如，具有氨基酸序列SEQ ID NO:21)的氨基酸序列的重链可变区；和具有来源于人类IGKV3-20*01胚系序列(例如，IGKV3-20*01，例如，具有氨基酸序列SEQ ID NO:22)的氨基酸序列的轻链可变区。

[0034] 在某些实施例中，所述抗体包含选自由人类IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂组成的群组的重链恒定区。在某些实施例中，所述重链恒定区是IgG₁。在某些实施例中，所述重链恒定区是IgG₂。在某些实施例中，所述抗体包含选自由人类Igκ和Igλ组成的群组的轻链恒定区。

[0035] 在某些实施例中，所述抗体包含IgG₁重链恒定区。在某些实施例中，所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:28的重链恒定区。在某些实施例中，所述IgG₁重链恒定区的氨基酸序列包含S239D/I332E突变，根据EU编号系统编号。在某些实施例中，所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:29的重链恒定区。在某些实施例中，所述IgG₁重链恒定区的氨基酸序列包含S239D/A330L/I332E突变，根据EU编号系统编号。在某些实施例中，所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:30的重链恒定区。在某些实施例中，所述IgG₁重链恒定区的氨基酸序列包含L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L突变，根据EU编号系统编号。在某些实施例中，所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:31的重链恒定区。在某些实施例中，所述IgG₁重链恒定区是无岩藻糖基化的IgG₁。

[0036] 在某些实施例中，所述抗体包含为野生型人类IgG重链恒定区的变异体的人类IgG重链恒定区，其中与所述野生型人类IgG重链恒定区结合到Fc γ RIIIA相比，所述变异的人类IgG重链恒定区以更高亲和力结合到Fc γ RIIIA。在某些实施例中，所述变异的人类IgG重链恒定区是变异的人类IgG₁重链恒定区。

[0037] 在某些实施例中，所述抗体包含选自由人类Igκ和Igλ组成的群组的轻链恒定区。在某些实施例中，所述抗体包含Igκ轻链恒定区。在某些实施例中，所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:32的轻链恒定区。

[0038] 在另一方面，本公开提供了一种与本文所述的抗体交叉竞争结合到人类CTLA-4的分离的抗体。在另一方面，本公开提供了一种与包含分别在SEQ ID NO:8和9中所述的重链和轻链可变区氨基酸序列的抗体交叉竞争结合到人类CTLA-4的分离的抗体。

[0039] 在另一方面，本公开提供了一种与本文所述的抗体结合到人类CTLA-4上的相同表

位的分离的抗体。在另一方面,本公开提供了一种与包含分别在SEQ ID NO:8和9中所述的重链和轻链可变区氨基酸序列的抗体结合到人类CTLA-4上的相同表位的分离的抗体。

[0040] 在另一方面,本公开提供了一种结合(例如,特异性结合)到人类CTLA-4的表位的分离的抗体。在某些实施例中,所述抗体结合到由选自由SEQ ID NO:34-39组成的群组的氨基酸序列组成的位于人类CTLA-4的区内的表位。在某些实施例中,所述抗体结合到由氨基酸序列SEQ ID NO:37组成的位于人类CTLA-4的区内的表位。在某些实施例中,所述抗体结合到由氨基酸序列SEQ ID NO:36组成的位于人类CTLA-4的区内的表位。在某些实施例中,所述抗体结合到由氨基酸序列SEQ ID NO:35组成的位于人类CTLA-4的区内的表位。在某些实施例中,所述抗体结合到由氨基酸序列SEQ ID NO:34组成的位于人类CTLA-4的区内的表位。在某些实施例中,所述抗体结合到由氨基酸序列SEQ ID NO:38组成的位于人类CTLA-4的区内的表位。在某些实施例中,所述抗体结合到由氨基酸序列SEQ ID NO:39组成的位于人类CTLA-4的区内的表位。

[0041] 在另一方面,本公开提供了一种与本发明的任何抗体特异性结合到人类CTLA-4的相同表位的抗体或分离的抗体。在某些实施例中,所述抗体结合到由选自由SEQ ID NO:34-39组成的群组的氨基酸序列组成的位于人类CTLA-4的区内的表位。在某些实施例中,所述抗体结合到由氨基酸序列SEQ ID NO:37组成的位于人类CTLA-4的区内的表位。在某些实施例中,所述抗体结合到由氨基酸序列SEQ ID NO:36组成的位于人类CTLA-4的区内的表位。在某些实施例中,所述抗体结合到由氨基酸序列SEQ ID NO:35组成的位于人类CTLA-4的区内的表位。在某些实施例中,所述抗体结合到由氨基酸序列SEQ ID NO:34组成的位于人类CTLA-4的区内的表位。在某些实施例中,所述抗体结合到由氨基酸序列SEQ ID NO:38组成的位于人类CTLA-4的区内的表位。在某些实施例中,所述抗体结合到由氨基酸序列SEQ ID NO:39组成的位于人类CTLA-4的区内的表位。

[0042] 在另一方面,本公开提供了一种抗体,其当结合到人类CTLA-4蛋白或其片段(例如,包含SEQ ID NO:33的残基37-162的氨基酸序列)时,相对于在不存在所述抗体的情况下由SEQ ID NO:34中所述的氨基酸序列组成的区中的氢/氘交换,减少由SEQ ID NO:34中所述的氨基酸序列组成的区中的氢/氘交换,如通过氢/氘分析法所测定。在另一方面,本公开提供了一种抗体,其当结合到人类CTLA-4蛋白或其片段(例如,包含SEQ ID NO:33的残基37-162的氨基酸序列)时,相对于在不存在所述抗体的情况下由SEQ ID NO:35中所述的氨基酸序列组成的区中的氢/氘交换,减少由SEQ ID NO:35中所述的氨基酸序列组成的区中的氢/氘交换,如通过氢/氘分析法所测定。在另一方面,本公开提供了一种抗体,其当结合到人类CTLA-4蛋白或其片段(例如,包含SEQ ID NO:33的残基37-162的氨基酸序列)时,相对于在不存在所述抗体的情况下由SEQ ID NO:36中所述的氨基酸序列组成的区中的氢/氘交换,减少由SEQ ID NO:36中所述的氨基酸序列组成的区中的氢/氘交换,如通过氢/氘分析法所测定。在另一方面,本公开提供了一种抗体,其当结合到人类CTLA-4蛋白或其片段(例如,包含SEQ ID NO:33的残基37-162的氨基酸序列)时,相对于在不存在所述抗体的情况下由SEQ ID NO:37中所述的氨基酸序列组成的区中的氢/氘交换,减少由SEQ ID NO:37中所述的氨基酸序列组成的区中的氢/氘交换,如通过氢/氘分析法所测定。在另一方面,本公开提供了一种抗体,其当结合到人类CTLA-4蛋白或其片段(例如,包含SEQ ID NO:33的残基37-162的氨基酸序列)时,相对于在不存在所述抗体的情况下由SEQ ID NO:38中所述的

氨基酸序列组成的区中的氢/氘交换,减少由SEQ ID N0:38中所述的氨基酸序列组成的区中的氢/氘交换,如通过氢/氘分析法所测定。在另一方面,本公开提供了一种抗体,其当结合到人类CTLA-4蛋白或其片段(例如,包含SEQ ID N0:33的残基37-162的氨基酸序列)时,相对于在不存在所述抗体的情况下由SEQ ID N0:39中所述的氨基酸序列组成的区中的氢/氘交换,减少由SEQ ID N0:39中所述的氨基酸序列组成的区中的氢/氘交换,如通过氢/氘分析法所测定。

[0043] 在另一方面,本公开提供了一种与本发明的任何抗体特异性结合到人类CTLA-4的相同表位的抗体或分离的抗体。在某些实施例中,所述抗体当结合到人类CTLA-4蛋白或其片段(例如,包含SEQ ID N0:33的残基37-162的氨基酸序列)时,相对于在不存在所述抗体的情况下由SEQ ID N0:34中所述的氨基酸序列组成的区中的氢/氘交换,减少由SEQ ID N0:34中所述的氨基酸序列组成的区中的氢/氘交换,如通过氢/氘分析法所测定。在某些实施例中,所述抗体当结合到人类CTLA-4蛋白或其片段(例如,包含SEQ ID N0:33的残基37-162的氨基酸序列)时,相对于在不存在所述抗体的情况下由SEQ ID N0:35中所述的氨基酸序列组成的区中的氢/氘交换,减少由SEQ ID N0:35中所述的氨基酸序列组成的区中的氢/氘交换,如通过氢/氘分析法所测定。在某些实施例中,所述抗体当结合到人类CTLA-4蛋白或其片段(例如,包含SEQ ID N0:33的残基37-162的氨基酸序列)时,相对于在不存在所述抗体的情况下由SEQ ID N0:36中所述的氨基酸序列组成的区中的氢/氘交换,减少由SEQ ID N0:36中所述的氨基酸序列组成的区中的氢/氘交换,如通过氢/氘分析法所测定。在某些实施例中,所述抗体当结合到人类CTLA-4蛋白或其片段(例如,包含SEQ ID N0:33的残基37-162的氨基酸序列)时,相对于在不存在所述抗体的情况下由SEQ ID N0:37中所述的氨基酸序列组成的区中的氢/氘交换,减少由SEQ ID N0:37中所述的氨基酸序列组成的区中的氢/氘交换,如通过氢/氘分析法所测定。在某些实施例中,所述抗体当结合到人类CTLA-4蛋白或其片段(例如,包含SEQ ID N0:33的残基37-162的氨基酸序列)时,相对于在不存在所述抗体的情况下由SEQ ID N0:38中所述的氨基酸序列组成的区中的氢/氘交换,减少由SEQ ID N0:38中所述的氨基酸序列组成的区中的氢/氘交换,如通过氢/氘分析法所测定。在某些实施例中,所述抗体当结合到人类CTLA-4蛋白或其片段(例如,包含SEQ ID N0:33的残基37-162的氨基酸序列)时,相对于在不存在所述抗体的情况下由SEQ ID N0:39中所述的氨基酸序列组成的区中的氢/氘交换,减少由SEQ ID N0:39中所述的氨基酸序列组成的区中的氢/氘交换,如通过氢/氘分析法所测定。

[0044] 在某些实施例中,所述抗体是人类抗体。在某些实施例中,所述抗体是双特异性抗体。

[0045] 在某些实施例中,所述抗体对人类CTLA-4是拮抗的。在某些实施例中,所述抗体灭活、降低或抑制人类CTLA-4的活性。在某些实施例中,所述抗体抑制人类CTLA-4与人类CD80或人类CD86的结合。在某些实施例中,所述抗体诱导经葡萄球菌肠毒素A(SEA)刺激的外周血单核细胞(PBMC)的IL-2产生。

[0046] 在某些实施例中,所述抗体缀合到细胞毒性剂、细胞抑制剂、毒素、放射性核素或可检测标签。

[0047] 在某些实施例中,所述抗体的所述重链可变区和/或所述轻链可变区的N末端氨基酸残基已经转化为焦谷氨酸。

[0048] 在一个实施例中,本发明涉及一种本发明的抗体,其用作药剂。

[0049] 在一个实施例中,本发明涉及一种本发明的抗体的用途,其用于制备用于免疫疗法的药物组合物或药剂。在某些实施例中,所述免疫疗法用于增加受试者的响应于抗原的T细胞活化,任选地用于治疗癌症,或治疗或预防感染性疾病。

[0050] 在一个实施例中,本发明涉及一种本发明的抗体,其用作诊断剂。

[0051] 在一个实施例中,本发明涉及一种本发明的抗体的用途,其用于体外检测生物样品中的人类CTLA-4。

[0052] 在另一方面,本公开提供了一种药物组合物,其包含本文所述的抗CTLA-4抗体和药学上可接受的载剂或赋形剂。

[0053] 在另一方面,本公开提供了一种分离的多核苷酸,其编码本文所述的抗体的重链和/或轻链。在另一方面,本公开提供了一种载体,其包含所述多核苷酸。在另一方面,本公开提供了一种重组宿主细胞,其包含所述多核苷酸或所述载体。在另一方面,本公开提供了一种产生结合到人类CTLA-4的抗体的方法,所述方法包含培养所述宿主细胞以便表达所述多核苷酸并且产生所述抗体。

[0054] 在另一方面,本公开提供了一种增加受试者的响应于抗原的T细胞活化的方法,所述方法包含向所述受试者施用有效量的本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物。在另一方面,本公开提供了一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包含向所述受试者施用有效量的本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物。

[0055] 在某些实施例中,受试者患有癌症。在某些实施例中,受试者患有转移性或局部晚期肿瘤(例如,实体肿瘤)。在某些实施例中,在转移性或局部晚期肿瘤的诊断之后(例如,在诊断之后1、2、3、4、5或6天;1、2、3、4、6、8或12周;或1、2、3、4、6、8或12个月内),根据本文所述的方法作为第一癌症疗法治疗癌症。在某些实施例中,在尽管先前用不同的癌症疗法治疗肿瘤但仍发生的肿瘤进展的诊断之后(例如,在肿瘤进展的诊断之后1、2、3、4、5或6天;1、2、3、4、6、8或12周;或1、2、3、4、6、8或12个月内),根据本文所述的方法作为第二癌症疗法治疗癌症,任选地其中本文所述的方法作为所施用的第二癌症疗法提供。在某些实施例中,在不同癌症疗法的毒性的诊断之后(例如,在不同癌症疗法的毒性的诊断之后1、2、3、4、5或6天;1、2、3、4、6、8或12周;或1、2、3、4、6、8或12个月内),根据本文所述的方法作为第一癌症疗法治疗癌症,任选地其中本文所述的方法作为所施用的第二癌症疗法提供。在某些实施例中,根据本文所述的方法治疗的癌症是没有标准疗法可用于的转移性或局部晚期癌症(例如,实体肿瘤)。在其它实施例中,根据本文所述的方法治疗的癌症是标准疗法失败了(即,在标准疗法之后,癌症有进展)的转移性或局部晚期癌症(例如,实体肿瘤)。在某些实施例中,如果癌症是疗法所难治愈的,那么所述疗法失败。在某些实施例中,如果癌症在完全或部分响应于疗法之后复发,那么所述疗法失败。在某些实施例中,转移性或局部晚期癌症(例如,实体肿瘤)已经从组织学上或细胞学上来确诊。

[0056] 在某些实施例中,癌症表达PD-L1。在某些实施例中,癌症样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少1%(例如,至少2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%或90%)。在某些实施例中,癌症样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少1%。在某些实施例中,癌症样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部

分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少5%。在某些实施例中,癌症样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少25%。在某些实施例中,癌症样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少50%。

[0057] 在某些实施例中,转移性或局部晚期肿瘤表达PD-L1。在某些实施例中,转移性或局部晚期肿瘤样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少1%(例如,至少2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%或90%)。在某些实施例中,转移性或局部晚期肿瘤样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少1%。在某些实施例中,转移性或局部晚期肿瘤样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少5%。在某些实施例中,转移性或局部晚期肿瘤样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少25%。在某些实施例中,转移性或局部晚期肿瘤样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少50%。

[0058] 在某些实施例中,癌症是宫颈癌。在某些实施例中,癌症是转移性或局部晚期癌症(例如,实体肿瘤)。在某些实施例中,转移性或局部晚期癌症(例如,实体肿瘤)是转移性或局部晚期的不可切除性鳞状细胞癌、腺鳞癌或宫颈腺癌。在某些实施例中,没有标准疗法可用于癌症(例如,宫颈癌)或转移性或局部晚期肿瘤(例如,实体肿瘤)。在某些实施例中,癌症(例如,宫颈癌)或转移性或局部晚期肿瘤(例如,实体肿瘤)是标准疗法所难治愈的。在某些实施例中,癌症(例如,宫颈癌)或转移性或局部晚期肿瘤(例如,实体肿瘤)在标准疗法之后复发。在某些实施例中,标准疗法包含含铂化疗。在某些实施例中,标准疗法是含铂双重疗法(platinum-containing doublet)。在某些实施例中,癌症(例如,宫颈癌)是在为了治疗晚期(复发性、不可切除性或转移性)疾病而施用的含铂双重疗法之后复发的转移性或局部晚期的不可切除性鳞状细胞癌、腺鳞癌或宫颈腺癌。在某些实施例中,癌症(例如,宫颈癌)或转移性或局部晚期肿瘤是HPV阳性。在某些实施例中,癌症或转移性或局部晚期实体肿瘤是头颈癌、黑色素瘤、肾细胞癌、尿道上皮癌或子宫内膜癌。在某些实施例中,癌症(例如,宫颈癌)或转移性或局部晚期实体肿瘤与微卫星不稳定性相关。

[0059] 在某些实施例中,受试者患有宫颈癌(例如,转移性或局部晚期的不可切除性鳞状细胞癌、腺鳞癌或宫颈腺癌),并且所述方法包含在宫颈癌的诊断之后(例如,在诊断之后1、2、3、4、5或6天;1、2、3、4、6、8或12周;或1、2、3、4、6、8或12个月内)向受试者施用有效量的本文所述的抗CTLA-4抗体(例如,AGEN1884.H3(IgG₁S239D/A330L/I332E))或包含此类抗CTLA-4抗体作为第一癌症疗法的药物组合物,任选地其中本文所述的抗CTLA-4抗体(例如,AGEN1884.H3(IgG₁S239D/A330L/I332E))或包含此类抗CTLA-4抗体的药物组合物以选自由以下组成的群组的剂量和频率施用:0.3mg/kg每四周、1mg/kg每四周、3mg/kg每四周、0.3mg/kg每六周、1mg/kg每六周、3mg/kg每六周、0.3mg/kg每十二周、1mg/kg每十二周和3mg/kg每十二周。在某些实施例中,受试者患有宫颈癌(例如,转移性或局部晚期的不可切除性鳞状细胞癌、腺鳞癌或宫颈腺癌),并且所述方法包含在宫颈癌的诊断之后(例如,在诊断之后1、2、3、4、5或6天;1、2、3、4、6、8或12周;或1、2、3、4、6、8或12个月内)向受试者施用有效量的包含本文所述的抗CTLA-4抗体(例如AGEN1884.H3(IgG₁S239D/A330L/I332E))的治

疗组合或包含此类抗CTLA-4抗体和派姆单抗(pembrolizumab)作为第一癌症疗法的药物组合物,任选地其中本文所述的抗CTLA-4抗体(例如,AGEN1884.H3(IgG₁S239D/A330L/I332E))或包含此类抗CTLA-4抗体的药物组合物以选自由以下组成的群组的剂量和频率施用:0.3mg/kg每四周、1mg/kg每四周、3mg/kg每四周、0.3mg/kg每六周、1mg/kg每六周、3mg/kg每六周、0.3mg/kg每十二周、1mg/kg每十二周和3mg/kg每十二周,并且派姆单抗每三周以200mg施用。

[0060] 在某些实施例中,癌症是非小细胞肺癌(NSCLC)。在某些实施例中,NSCLC是IV期NSCLC。在某些实施例中,NSCLC样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少1%(例如,至少2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%或90%)。在某些实施例中,NSCLC样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少1%。在某些实施例中,NSCLC样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少5%。在某些实施例中,NSCLC样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少25%。在某些实施例中,NSCLC样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少50%。在某些实施例中,NSCLC没有EGFR或ALK基因组肿瘤畸变。在某些实施例中,转移性或局部晚期NSCLC没有EGFR敏化突变(例如,适合用酪氨酸激酶抑制剂治疗的突变,酪氨酸激酶抑制剂包括埃罗替尼(erlotinib)、吉非替尼(gefitinib)或阿法替尼(afatinib))或ALK易位。在某些实施例中,受试者先前不曾接受过针对NSCLC的全身性化疗治疗。

[0061] 在某些实施例中,转移性或局部晚期实体肿瘤是转移性或局部晚期非小细胞肺癌(NSCLC)。在某些实施例中,转移性或局部晚期实体肿瘤是转移性非小细胞肺癌(NSCLC)。在某些实施例中,转移性或局部晚期实体肿瘤是IV期转移性或局部晚期NSCLC。在某些实施例中,转移性或局部晚期实体肿瘤是IV期转移性NSCLC。在某些实施例中,转移性或局部晚期NSCLC样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少1%(例如,至少2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%或90%)。在某些实施例中,转移性或局部晚期NSCLC样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少1%。在某些实施例中,转移性或局部晚期NSCLC样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少5%。在某些实施例中,转移性或局部晚期NSCLC样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少25%。在某些实施例中,转移性或局部晚期NSCLC样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少50%。在某些实施例中,转移性或局部晚期NSCLC没有EGFR或ALK基因组肿瘤畸变。在某些实施例中,受试者先前不曾接受过针对转移性或局部晚期NSCLC的全身性化疗治疗。

[0062] 在某些实施例中,受试者患有NSCLC(例如,IV期转移性或局部晚期NSCLC),任选地其中NSCLC样品中展现可检测的PD-L1表达(例如,膜表达,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%或90%,并且所述方法包含在宫颈癌的诊断之后(例如,在诊断之后1、2、3、4、5或6天;1、2、3、4、6、8或12周;或1、2、3、4、6、8或12个月内)向受试者施用有效量的

本文所述的抗CTLA-4抗体(例如,AGEN1884.H3(IgG₁S239D/A330L/I332E))或包含此类抗CTLA-4抗体作为第一癌症疗法的药物组合物,任选地其中本文所述的抗CTLA-4抗体(例如,AGEN1884.H3(IgG₁S239D/A330L/I332E))或包含此类抗CTLA-4抗体的药物组合物以选自由以下组成的群组的剂量和频率施用:0.3mg/kg每四周、1mg/kg每四周、3mg/kg每四周、0.3mg/kg每六周、1mg/kg每六周、3mg/kg每六周、0.3mg/kg每十二周、1mg/kg每十二周和3mg/kg每十二周。在某些实施例中,受试者患有NSCLC(例如,IV期转移性或局部晚期NSCLC),任选地其中NSCLC样品中展现可检测的PD-L1表达(例如,膜表达,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%或90%,并且所述方法包含在宫颈癌的诊断之后(例如,在诊断之后1、2、3、4、5或6天;1、2、3、4、6、8或12周;或1、2、3、4、6、8或12个月内)向受试者施用包含本文所述的抗CTLA-4抗体(例如,AGEN1884.H3(IgG₁S239D/A330L/I332E))的治疗组合或包含此类抗CTLA-4抗体和派姆单抗作为第一癌症疗法的药物组合物,任选地其中本文所述的抗CTLA-4抗体(例如,AGEN1884.H3(IgG₁S239D/A330L/I332E))或包含此类抗CTLA-4抗体的药物组合物以选自由以下组成的群组的剂量和频率施用:0.3mg/kg每四周、1mg/kg每四周、3mg/kg每四周、0.3mg/kg每六周、1mg/kg每六周、3mg/kg每六周、0.3mg/kg每十二周、1mg/kg每十二周和3mg/kg每十二周,并且派姆单抗每三周以200mg施用。

[0063] 在某些实施例中,癌症是皮肤鳞状细胞癌(cSCC)。在某些实施例中,转移性或局部晚期实体肿瘤是IV期皮肤鳞状细胞癌(cSCC)。在某些实施例中,所述cSCC是根据第八版美国癌症联合委员会分期手册从组织学上或细胞学上来诊断。在某些实施例中,cSCC不能用放疗治愈。在某些实施例中,受试者患有cSCC(例如,IV期cSCC),并且所述方法包含在cSCC的诊断之后(例如,在诊断之后1、2、3、4、5或6天;1、2、3、4、6、8或12周;或1、2、3、4、6、8或12个月内)向受试者施用有效量的本文所述的抗CTLA-4抗体(例如,AGEN1884.H3(IgG₁S239D/A330L/I332E))或包含此类抗CTLA-4抗体作为第一癌症疗法的药物组合物,任选地其中本文所述的抗CTLA-4抗体(例如,AGEN1884.H3(IgG₁S239D/A330L/I332E))或包含此类抗CTLA-4抗体的药物组合物以选自由以下组成的群组的剂量和频率施用:0.3mg/kg每四周、1mg/kg每四周、3mg/kg每四周、0.3mg/kg每六周、1mg/kg每六周、3mg/kg每六周、0.3mg/kg每十二周、1mg/kg每十二周和3mg/kg每十二周。在某些实施例中,受试者患有cSCC(例如,IV期cSCC),并且所述方法包含在cSCC的诊断之后(例如,在诊断之后1、2、3、4、5或6天;1、2、3、4、6、8或12周;或1、2、3、4、6、8或12个月内)向受试者施用有效量的包含本文所述的抗CTLA-4抗体(例如,AGEN1884.H3(IgG₁S239D/A330L/I332E))的治疗组合或包含此类抗CTLA-4抗体和派姆单抗作为第一癌症疗法的药物组合物,任选地其中本文所述的抗CTLA-4抗体(例如,AGEN1884.H3(IgG₁S239D/A330L/I332E))或包含此类抗CTLA-4抗体的药物组合物以选自由以下组成的群组的剂量和频率施用:0.3mg/kg每四周、1mg/kg每四周、3mg/kg每四周、0.3mg/kg每六周、1mg/kg每六周、3mg/kg每六周、0.3mg/kg每十二周、1mg/kg每十二周和3mg/kg每十二周,并且派姆单抗每三周以200mg施用。

[0064] 在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物静脉内施用。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物任选地以每两周一次的时间间隔,以0.01mg/kg、0.03mg/kg、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、6mg/kg或10mg/kg静脉内施用。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物任选地以每三周一次的时间

间隔,以0.01mg/kg、0.03mg/kg、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、6mg/kg或10mg/kg静脉内施用。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物任选地以每四周一次的时间间隔,以0.01mg/kg、0.03mg/kg、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、6mg/kg或10mg/kg静脉内施用。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物任选地以每六周一次的时间间隔,以0.01mg/kg、0.03mg/kg、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、6mg/kg或10mg/kg静脉内施用。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物任选地以每十二周一次的时间间隔,以0.01mg/kg、0.03mg/kg、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、6mg/kg或10mg/kg静脉内施用。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物瘤内施用。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物任选地以每三周一次的时间间隔,以0.01mg/kg、0.03mg/kg、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg或3mg/kg瘤内施用。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物任选地以每三周一次的时间间隔,以0.03mg/kg、0.1mg/kg或0.3mg/kg瘤内施用。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物以与通过全身施用所给予的剂量相比低多达5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或200倍的剂量瘤内施用。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物以与通过全身施用所给予的剂量相比低多达10倍的剂量瘤内施用。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物以与通过全身施用所给予的剂量相比低多达100倍的剂量瘤内施用。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物作为单一疗法(例如,瘤内或全身性地)施用。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物瘤内施用,并且所述方法进一步包含向受试者施用一额外治疗剂。在某些实施例中,额外治疗剂全身性地施用。在某些实施例中,受试者患有实体肿瘤,并且额外治疗剂是抗PD-1抗体。在某些实施例中,抗PD-1抗体是派姆单抗或纳武单抗(nivolumab)。在某些实施例中,派姆单抗每三周以200mg的剂量施用。在某些实施例中,受试者患有头颈部鳞状细胞癌,并且额外治疗剂是抗EGFR抗体。在某些实施例中,抗EGFR抗体是西妥昔单抗(cetuximab)。在某些实施例中,受试者患有HER2+乳癌,并且额外治疗剂是抗HER2抗体。在某些实施例中,抗HER2抗体是曲妥珠单抗(trastuzumab)。在某些实施例中,这些方法进一步包含向受试者施用化疗剂。在某些实施例中,化疗剂全身性地施用。在某些实施例中,化疗剂是吉西他滨(gemcitabine)。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物瘤内施用,并且受试者患有晚期或转移性实体肿瘤。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物瘤内施用,并且受试者患有头颈癌(例如,复发性/难治愈头颈部鳞状细胞癌)。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物瘤内施用,并且受试者患有乳癌(例如,复发性/难治愈HER2+乳癌)。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物被递送到肿瘤引流淋巴结。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物经由局部施用(例如,皮下施用)递送。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物以0.01mg/kg、0.03mg/kg、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg或3mg/kg经由局部施用(例如,皮下施用)递送。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物以与通过全身施用所给予的剂量相比低多达5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或200倍的剂量经由局部施用(例如,皮下施用)递送。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物以与通过全身施用所给予的剂量相比低多达10倍的剂量经由局部施用(例如,皮下施用)递送。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体

或药物组合物以与通过全身施用所给予的剂量相比低多达100倍的剂量经由局部施用(例如,皮下施用)递送。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物经由局部施用(例如,皮下施用)递送,并且所述方法进一步包含向受试者施用一额外治疗剂。在某些实施例中,所述额外治疗剂是疫苗。在某些实施例中,所述疫苗包括包含热休克蛋白与抗原肽复合的热休克蛋白肽复合物(HSPPC)。在一个实施例中,所述热休克蛋白是gp96蛋白并且与肿瘤相关的抗原肽复合,其中所述HSPPC来源于从受试者获得的肿瘤。在某些实施例中,热休克蛋白选自由以下组成的群组:hsc70、hsp70、hsp90、hsp110、grp170、gp96、钙网蛋白、其突变体和其两者或更多者的组合。在某些实施例中,热休克蛋白是hsc70。在某些实施例中,热休克蛋白是hsp70。在某些实施例中,抗原肽是合成的。在某些实施例中,受试者患有癌症。在某些实施例中,受试者患有感染性疾病。在某些实施例中,这些方法进一步包含向受试者施用一额外治疗剂。在某些实施例中,所述额外治疗剂是化疗剂或检查点靶向剂。在某些实施例中,检查点靶向剂选自由以下组成的群组:拮抗剂抗PD-1抗体、拮抗剂抗PD-L1抗体、拮抗剂抗PD-L2抗体、拮抗剂抗CTLA-4抗体、拮抗剂抗TIM-3抗体、拮抗剂抗LAG-3抗体、拮抗剂抗CEACAM1抗体、激动剂抗GITR抗体、激动剂抗OX40抗体和激动剂抗CD137抗体、激动剂抗DR3抗体、激动剂抗TNFSF14抗体和激动剂抗CD27抗体。在某些实施例中,额外治疗剂是放疗。在某些实施例中,所述额外治疗剂是吲哚胺-2,3-双加氧酶(IDO)抑制剂。合适的IDO抑制剂包括(但不限于)艾卡哚司他(epacadostat)、F001287、吲哚莫德(indoximod)和NLG919。在某些实施例中,所述额外治疗剂是疫苗。在某些实施例中,所述疫苗包括包含热休克蛋白与抗原肽复合的热休克蛋白肽复合物(HSPPC)。在一个实施例中,所述热休克蛋白是gp96蛋白并且与肿瘤相关的抗原肽复合,其中所述HSPPC来源于从受试者获得的肿瘤。

[0065] 在另一方面,本公开提供了一种治疗受试者的感染性疾病的方法,所述方法包含向受试者施用有效量的本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物。在另一方面,本公开提供了一种预防受试者的感染性疾病的方法,所述方法包含向受试者施用有效量的本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物。

[0066] 在一个实施例中,本发明涉及一种本发明的抗体、本发明的多核苷酸、本发明的载体和/或本发明的重组宿主细胞,其用作药剂。

[0067] 在一个实施例中,本发明涉及一种本发明的抗体、本发明的多核苷酸、本发明的载体和/或本发明的重组宿主细胞,其用作诊断剂。

[0068] 在一个实施例中,本发明涉及一种本发明的抗体、本发明的多核苷酸、本发明的载体和/或本发明的重组宿主细胞的用途,其用于体外检测生物样品中的人类CTLA-4。

[0069] 在一个方面,本文提供了一种药物组合物,其包含本文所述的抗CTLA-4抗体和药学上可接受的载剂或赋形剂,其用作药剂。

[0070] 在一个方面,本文提供了一种药物组合物,其包含本文所述的抗CTLA-4抗体和药学上可接受的载剂或赋形剂,其用作诊断剂。

[0071] 在一个方面,本文提供了一种药物组合物,其包含本文所述的抗CTLA-4抗体、本发明的多核苷酸、本发明的载体和/或本发明的重组宿主细胞,和药学上可接受的载剂或赋形剂。在一个方面,药物组合物用作药剂和/或诊断剂。

[0072] 在一个方面,本发明涉及一种本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,其用于增加响应于抗原的T细胞活化的方法中。

[0073] 在一个方面,本发明涉及一种本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,其用于增加受试者的响应于抗原的T细胞活化的方法中。

[0074] 在一个方面,本发明涉及一种本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,其用于增加受试者的响应于抗原的T细胞活化的方法中,所述方法包含向受试者施用有效量的本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物。

[0075] 在一个方面,本发明涉及一种本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,其用于治疗癌症的方法中。

[0076] 在一个方面,本发明涉及一种本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,其用于治疗受试者的癌症的方法中。

[0077] 在一个方面,本发明涉及一种本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,其用于治疗受试者的癌症的方法中,所述方法包含向受试者施用有效量的本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物。

[0078] 在一个方面,本发明涉及(a)本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,和(b)一额外治疗剂,优选抗PD-1抗体,其用作药剂。

[0079] 在一个方面,本发明涉及(a)本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,和(b)一额外治疗剂,优选抗PD-1抗体,其用于治疗癌症的方法中。在一优选实施例中,癌症是实体肿瘤。在另一优选实施例中,本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物向受试者瘤内施用,优选任选地以每三周一次的时间间隔,以0.01mg/kg、0.03mg/kg、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg或3mg/kg向受试者瘤内施用。

[0080] 在一个方面,本发明涉及一种药物组合物、试剂盒或部件试剂盒,其包含(a)本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,和(b)一额外治疗剂,优选抗PD-1抗体。

[0081] 在一个方面,本发明涉及(a)本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,和(b)抗EGFR抗体,和任选地(c)化疗剂,其用作药剂。

[0082] 在一个方面,本发明涉及(a)本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,和(b)抗EGFR抗体,和任选地(c)化疗剂,其用于治疗癌症的方法中。在一优选实施例中,癌症是头颈部鳞状细胞癌。在另一优选实施例中,本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物向受试者瘤内施用,优选任选地以每三周一次的时间间隔,以0.01mg/kg、0.03mg/kg、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg或3mg/kg向受试者瘤内施用。

[0083] 在一个方面,本发明涉及一种药物组合物、试剂盒或部件试剂盒,其包含(a)本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,和(b)抗EGFR抗体,和任选地(c)化疗剂。

[0084] 在一个方面,本发明涉及(a)本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,和(b)抗HER2抗体,和任选地(c)化疗剂,其用作药剂。

[0085] 在一个方面,本发明涉及(a)本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,和(b)抗HER2抗体,和任选地(c)化疗剂,其用于治疗HER2+乳癌的方法中。在一优选实施例中,本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物向受试者瘤内施用,优选任选地以每三周一次的时间间隔,以0.01mg/kg、0.03mg/kg、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg或3mg/kg向受试者瘤内施用。

[0086] 在一个方面,本发明涉及一种药物组合物、试剂盒或部件试剂盒,其包含(a)本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,和(b)抗HER2抗体,和任选地(c)化疗剂。

[0087] 在一个方面,本发明涉及一种本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,其用于治疗癌症的方法中,其中本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物向受试者瘤内施用,优选任选地以每三周一次的时间间隔,以0.01mg/kg、0.03mg/kg、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg或3mg/kg向受试者瘤内施用。

[0088] 在一个方面,本发明涉及一种本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,其用于治疗癌症的方法中,其中本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物向受试者皮下或静脉内施用,优选任选地以每三周一次的时间间隔,以0.01mg/kg、0.03mg/kg、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、6mg/kg或10mg/kg向受试者静脉内施用。

[0089] 在一个方面,本发明涉及(a)本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,和(b)一额外治疗剂,其用作药剂。在一优选实施例中,额外治疗剂是化疗剂或检查点靶向剂或吲哚胺-2,3-双加氧酶(IDO)抑制剂或疫苗。

[0090] 在一个方面,本发明涉及(a)本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,和(b)一额外治疗剂,其用于治疗癌症的方法中。在一优选实施例中,额外治疗剂是化疗剂或检查点靶向剂或吲哚胺-2,3-双加氧酶(IDO)抑制剂或疫苗。

[0091] 在一个方面,本发明涉及一种药物组合物、试剂盒或部件试剂盒,其包含(a)本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,和(b)一额外治疗剂。在一优选实施例中,额外治疗剂是化疗剂或检查点靶向剂或吲哚胺-2,3-双加氧酶(IDO)抑制剂或疫苗。

[0092] 在一个方面,本发明涉及一种本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,其用于治疗癌症的方法中,和/或用于增加响应于抗原的T细胞活化的方法中,其中本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物被递送到肿瘤引流淋巴结。

[0093] 在一个方面,本发明涉及一种本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物的用途,其用于治疗癌症的方法中,和/或用于增加受试者的响应于抗原的T细胞活化的方法中,其中本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物被递送到肿瘤引流淋巴结。

[0094] 在一个方面,本发明涉及一种本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物的用途,其用于制备用于免疫疗法(例如,用于增加受试者的响应于抗原的T细胞活化,治疗癌症,或治疗或预防感染性疾病)的药剂。

[0095] 在一个方面,本发明涉及一种本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物的用途,其用于制备用于免疫疗法(例如,用于增加受试者的响应于抗原的T细胞活化,治疗癌症,或治疗或预防感染性疾病)的药剂,其中本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物被递送到肿瘤引流淋巴结。

[0096] 在一个方面,本发明涉及一种(a)本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,和(b)抗HER2抗体,和任选地(c)化疗剂的用途,其用于制备用于免疫疗

法(例如,用于增加受试者的响应于抗原的T细胞活化,治疗癌症,或治疗或预防感染性疾病)的药剂。

[0097] 在一个方面,本发明涉及一种(a)本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物,和(b)抗HER2抗体,和任选地(c)化疗剂的用途,其用于制备用于免疫疗法(例如,用于增加受试者的响应于抗原的T细胞活化,治疗癌症,或治疗或预防感染性疾病)的药剂,其中本发明的抗体、多核苷酸、载体、重组宿主细胞和/或药物组合物被递送到肿瘤引流淋巴结。

附图说明

[0098] 图1A、1B、1C、1D、1E、1F和1G是展示抗CTLA-4抗体或IgG₁同型对照抗体与经工程改造以表达细胞表面上的人类CTLA-4的Jurkat细胞的结合的流式细胞术直方图。所测试的抗CTLA-4抗体是:AGEN1884.H1.1(IgG₁)、AGEN1884.H1.2(IgG₁)、AGEN1884.H1.3(IgG₁)、AGEN1884.H2.1(IgG₁)、AGEN1884.H2.2(IgG₁)、AGEN1884.H2.3(IgG₁)和AGEN1884.H3(IgG₁)。

[0099] 图2是展示在用葡萄球菌肠毒素A(SEA)超抗原次优刺激下在不存在或存在抗CTLA-4抗体AGEN1884.H3(IgG₁)或同型对照抗体(IgG₁)下孵育之后初级人类PBMC的IL-2产生的图。对每个组执行八个重复,并且八个重复的平均值用黑条指示。

[0100] 图3是展示证明阻断CTLA-4引起T细胞活化的IL-2-荧光素酶报告子分析法的结果的图。相对于AGEN1884.H3(IgG₁)或同型对照抗体(IgG₁)的一系列抗体浓度,绘制荧光素酶表达(IL-2基因活化的替代标志物)的倍数反应。

[0101] 图4是展示报告子分析法的结果的图,其中AGEN1884.H3(IgG₁)与靶细胞(经由CTLA-4结合)和效应细胞(经由Fc γ RIIIA结合)的同时接合触发荧光素酶由效应细胞系的表达。荧光素酶活性是Fc γ RIIIA信号传导的替代标志物。相对于AGEN1884.H3(IgG₁)和同型对照抗体(IgG₁)的一系列抗体浓度,绘制RLU值的倍数反应。

[0102] 图5A、5B、5C和5D是展示与抗CTLA-4抗体AGEN1884.H3(IgG₁)、AGEN1884.H3(IgG₁S239D/I332E)、AGEN1884.H3(IgG₁S239D/A330L/I332E)或AGEN1884.H3(IgG₁L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L)或同型对照抗体一起孵育的表达CTLA-4的Jurkat细胞的流式细胞术直方图。使用荧光染料缀合的二级抗体检测抗体结合。

[0103] 图6A和6B分别是展示人类CTLA-4与其配体CD80和CD86之间的结合通过AGEN1884.H3(IgG₁S239D/A330L/I332E)的阻断的图。经工程改造以组成性表达人类CTLA-4的Jurkat细胞与抗CTLA-4抗体AGEN1884.H3(IgG₁-S239D/A330E/I332E)、参考抗CTLA-4抗体或同型对照抗体(IgG₁)一起孵育,并且然后用指定荧光标记的配体染色。然后通过流式细胞术分析配体结合。

[0104] 图7A、7B和7C是展示在用SEA超抗原次优刺激下在不存在或存在同型对照抗体(IgG₁)或抗CTLA-4抗体下培养的初级人类PBMC的IL-2产生的图。图7A和7B是展示由单一剂量或剂量滴定的同型对照抗体(IgG₁)或抗CTLA-4抗体AGEN1884.H3(IgG₁)、AGEN1884.H3(IgG₁S239D/I332E)、AGEN1884.H3(IgG₁S239D/A330L/I332E)和AGEN1884.H3(IgG₁L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L)刺激的IL-2产生的图。在图7B中所示的研究中,除了同型对照抗体(IgG₁)或抗CTLA-4抗体之外,每个样品中的细胞还与IgG₄S228P同型对照抗体一起孵

育。图7C是展示由剂量滴定的同型对照抗体(IgG_1)或抗CTLA-4抗体AGEN1884(IgG_1)、AGEN1884($\text{IgG}_1\text{S239D/I332E}$)、AGEN1884($\text{IgG}_1\text{S239D/A330L/I332E}$)和无岩藻糖基化的AGEN1884(IgG_1)刺激的IL-2产生的图。

[0105] 图8A是在用50ng/ml SEA超抗原和10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 同型对照抗体(IgG_1)或抗CTLA-4抗体AGEN1884.H3(IgG_1)、AGEN1884.H3($\text{IgG}_1\text{S239D/A330L/I332E}$)或AGEN1884.H3($\text{IgG}_1\text{N297A}$)刺激之后人类PBMC中的磷酸化ZAP70(Y493)的免疫印迹分析。图8B是展示图8A中所示的数据的标准密度计分析的图表。

[0106] 图9A、9B、9C和9D是展示由鼠类抗CTLA-4抗体9D9的Fc变异数诱导的抗肿瘤功效和肿瘤内调节T细胞(Treg)耗尽的图。图9A展示了在用鼠类抗CTLA-4抗体9D9(mIgG2a)、抗CTLA-4抗体9D9的Fc-静止变异数(mIgG2a-N297A)、抗CTLA-4抗体9D9的Fc变异数($\text{mIgG2a-S239D/A330L/I332E}$)或同型对照抗体(mIgG2a)单剂量处理之后CT26小鼠中的肿瘤生长。上图展示了每个处理组的随时间推移的中值肿瘤体积。剩余的图展示了每个处理组中的个别动物的随时间推移的肿瘤体积。图9B展示了抗CTLA-4抗体处理对来自用单一剂量的抗CTLA-4抗体9D9(mIgG2a)、抗CTLA-4抗体9D9(mIgG2a-N297A)、抗CTLA-4抗体9D9($\text{mIgG2a-S239D/A330L/I332E}$)或同型对照抗体(mIgG2a)处理的小鼠收集的肿瘤浸润物的T细胞群体的作用。在注射抗体之后指定时间点收获并且通过流式细胞术分析肿瘤浸润物。所分析的细胞群体包括:FoxP3+Treg(左上图)、CD45+白细胞(右上图)和CD4+非Treg(左下图)。右下图展示了肿瘤浸润物中观测到的CD8+T细胞与Treg的比率。图9C展示了由如关于图9B所描述处理的小鼠收获的肿瘤引流淋巴结中的随时间推移的FoxP3+Treg群体。图9D展示了在如关于图9B所描述处理之后72小时时脾脏FoxP3+Treg的倍数变化。

[0107] 图10是展示鼠类抗CTLA-4抗体当与来源于HPV+肿瘤的肿瘤疫苗(病毒抗原E6/E7)组合时的抗肿瘤功效的一系列图。展示了不接受处理、接受同型对照抗体(mIgG2a)、抗CTLA-4抗体9D9(mIgG2a)或抗CTLA-4抗体9D9的Fc变异数($\text{mIgG2a-S239D/A330L/I332E}$)的个别小鼠的随时间推移的肿瘤体积。首行的图展示了仅施用指定抗体处理的动物的结果。底行的图展示了施用指定抗体处理与肿瘤疫苗的组合的动物的结果。

[0108] 图11A和11B是展示人类T细胞群体的基因表达和CpG甲基化的图。 $\text{CD4}^+\text{CD25}^{+/-}\text{FOXP3}^-$ 非调节T细胞(Teff)和 $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FOXP3}^+$ 调节T细胞(Treg)从健康供体的外周血液分离、扩增并且活化。图11A展示了如通过流式细胞术所测定,每个活化的T细胞群体中的FOXP3、细胞内CTLA-4和膜CTLA-4水平。图11B展示了各自来自同一供体的原初T细胞、活化的效应T细胞和活化的调节T细胞中的FOXP3(上图)和CTLA4(下图)基因座内的CpG区中的CpG甲基化的水平。

[0109] 图12A和12B是展示在与抗CTLA-4抗体AGEN1884.H3(IgG_1)或其Fc变异数一起孵育之后人类CTLA-4+靶细胞的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的时程的图。NK-92细胞(表达Fc γ RIIIA V158的)与CTLA-4+靶细胞一起共培养,所述靶细胞与抗CTLA-4抗体的不同Fc变异数或 IgG_1 同型对照(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)一起孵育。凋亡蛋白酶(caspase)3/7活化的高含量显微术然后用于定量ADCC活性。图12A展示了当与AGEN1884.H3(IgG_1)、AGEN1884.H3($\text{IgG}_1\text{N297A}$)、AGEN1884.H3($\text{IgG}_1\text{S239D/A330L/I332E}$)、AGEN1884.H3($\text{IgG}_1\text{S267E/L328F}$)、无岩藻糖基化的AGEN1884.H3(IgG_1)或同型对照抗体(IgG_1)一起孵育时,经工程改造以表达细胞表面上的CTLA-4的Jurkat细胞中的ADCC活性。图12B展示了当与这些抗体一起孵育时,初级人类活化

的效应T细胞(左图)或调节T细胞(右图)中的ADCC活性。

[0110] 图13A、13B、13C和13D是展示当单独或与抗PD-1抗体组合施用时抗CTLA-4抗体变异体对T细胞功能的作用的图。人类PBMC从两个供体分离，并且在刺激培养条件下与抗CTLA-4抗体AGEN1884.H3(IgG₁)、Fc变异抗CTLA-4抗体AGEN1884.H3(IgG₁S239D/A330L/I332E)或同型对照抗体(IgG₁)与参考抗PD-1抗体或同型对照抗体(IgG₄)的组合一起孵育，如所指示。对于所列的每个处理条件，剂量滴定用于第一所列抗体，并且固定浓度(5μg/ml)用于第二所列抗体。执行这个实验两次，每供体总共有两个重复。从第一供体收集的PBMC上由每个抗体组合诱导的IL-2产生的水平展示于图13A(重复1)和图13B(重复2)中。从第二供体收集的PBMC上由每个抗体组合诱导的IL-2产生的水平展示于图13C(重复1)和图13D(重复2)中。

[0111] 图14A、14B和14C是一系列序列比对。图14A是人类CTLA-4(SEQ ID NO:33)、食蟹猕猴CTLA-4(SEQ ID NO:40)、小鼠CTLA-4(SEQ ID NO:41)和大鼠CTLA-4(SEQ ID NO:42)的序列比对。点表示与相应的人类残基一致的残基。“*”(星号)指示具有单一完全保守残基的位置。“:”(冒号)指示具有强烈相似性质的组之间的保守性。“.”(句点)指示具有微弱相似性质的组之间的保守性。图14B和14C是人类CTLA-4(分别为SEQ ID NO:33的残基1-144和残基145-223)、食蟹猕猴CTLA-4(分别为SEQ ID NO:40的残基1-144和残基145-223)、人类CD28(分别为SEQ ID NO:43的残基1-127和残基128-220)、人类ICOS(分别为SEQ ID NO:44的残基1-124和残基125-199)、人类BTLA(分别为SEQ ID NO:45的残基1-125和残基126-289)和人类PD-1(分别为SEQ ID NO:46的残基1-143和残基144-288)的序列比对。当人类CTLA-4结合到AGEN1884-Fab时显示氘吸收强烈减少的两个区在图14A-14C中加下划线：残基80-82(QVT, SEQ ID NO:39)和残基135-149(YPPPYYLGIGNGTQI, SEQ ID NO:37)，根据SEQ ID NO:33编号。

具体实施方式

[0112] 本公开提供了特异性结合到CTLA-4(例如，人类CTLA-4)并且拮抗CTLA-4功能(例如，CTLA-4介导的免疫抑制)的抗体。还提供了包含这些抗体的药物组合物、编码这些抗体的核酸、用于产生这些抗体的表达载体和宿主细胞，以及使用这些抗体治疗受试者的方法。本文所述的抗体尤其可用于增加响应于抗原(例如，肿瘤抗原或感染性疾病抗原)的T细胞活化，并且因此可用于治疗受试者的癌症或治疗或预防受试者的感染性疾病。本文所述的“分离的抗体”的所有情况都另外涵盖为可以但不必为分离的抗体。本文所述的“分离的多核苷酸”的所有情况都另外涵盖为可以但不必为分离的多核苷酸。本文所述的“抗体”的所有情况都另外涵盖为可以但不必为分离的抗体。本文所述的“多核苷酸”的所有情况都另外涵盖为可以但不必为分离的多核苷酸。

[0113] 熟练的工作人员将了解，在某些条件下，本文所述的抗体中的任一个(例如，抗CTLA4抗体)的重链可变区和/或轻链可变区的N末端处的谷氨酸(E)或谷氨酰胺(Q)氨基酸残基可以通过游离氨基的翻译后环化形成内酰胺而自发地转化为焦谷氨酸。因此，在本文所述的方法、用途、药物组合物或试剂盒中的每一个的某些实施例中，抗体的一个或多个重链可变区和/或轻链可变区的N末端氨基酸残基已经转化为焦谷氨酸(例如，作为N末端E或Q残基的游离氨基的翻译后环化的结果)。

[0114] 1.1定义

[0115] 如本文所用,术语“约”和“大致”当用于修饰数字值或数字范围时,指示比所述值或范围高5%至10% (例如,高多达5%至10%) 和低5%至10% (例如,低多达5%至10%) 的偏差保持在所叙述值或范围的预期含义内。

[0116] 如本文所用,术语“CTLA-4”是指细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4。如本文所用,术语“人类CTLA-4”是指由野生型人类CTLA-4基因编码的人类CTLA-4蛋白,例如GenBankTM寄存编号NM_005214.4或NM_001037631.2。人类CTLA-4的示范性未成熟氨基酸序列提供为SEQ ID NO:33。

[0117] 如本文所用,术语“抗体(antibody)”和“抗体(antibodies)”包括全长抗体、全长抗体的抗原结合片段以及包含抗体CDR、VH区或VL区的分子。抗体的实例包括单克隆抗体、以重组方式产生的抗体、单特异性抗体、多特异性抗体(包括双特异性抗体)、人类抗体、人源化抗体、嵌合抗体、免疫球蛋白、合成抗体、包含两个重链和两个轻链分子的四聚体抗体、抗体轻链单体、抗体重链单体、抗体轻链二聚体、抗体重链二聚体、抗体轻链-抗体重链对、内抗体、异源缀合抗体、抗体-药物缀合物、单结构域抗体、单价抗体、单链抗体或单链Fv (scFv)、骆驼化抗体、亲和体、Fab片段、F(ab')₂片段、二硫键连接的Fv (sdFv)、抗独特型(抗Id)抗体(包括例如,抗抗Id抗体)以及以上任一个的抗原结合片段。在某些实施例中,本文所述的抗体是指多克隆抗体群体。抗体可以属于免疫球蛋白分子的任何类型(例如,IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY)、任何类别(例如,IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁或IgA₂)或任何亚类(例如,IgG_{2a}或IgG_{2b})。在某些实施例中,本文所述的抗体是IgG抗体,或其类别(例如,人类IgG₁或IgG₄)或亚类。在一特定实施例中,抗体是人源化单克隆抗体。在另一特定实施例中,抗体是人类单克隆抗体。

[0118] 如本文所用,术语“VH区”和“VL区”分别是指包含FR(框架区)1、2、3和4以及CDR(互补决定区)1、2和3的单一抗体重链和轻链可变区(参见Kabat等人,(1991)《免疫学感兴趣的蛋白质的序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)》(NIH公开第91-3242号,贝塞斯达(Bethesda)),其以全文引用的方式并入本文中)。

[0119] 如本文所用,术语“CDR”或“互补决定区”意指在重链和轻链多肽的可变区内发现的非连续抗原结合位点。这些特定区已经由以下描述:Kabat等人,《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》252:6609-6616(1977);和Kabat等人,《免疫学感兴趣的蛋白质的序列》。(1991);Chothia等人,《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》196:901-917(1987);以及MacCallum等人,《分子生物学杂志》262:732-745(1996),这些文献全部以其全文引用的方式并入本文中,其中在相对于彼此比较时,定义包括氨基酸残基的重叠或亚群。在某些实施例中,术语“CDR”是如由Kabat等人,《生物化学杂志》252,6609-6616(1977)和Kabat等人,《免疫学感兴趣的蛋白质的序列》。(1991)定义的CDR。在某些实施例中,术语“CDR”是如由Chothia等人,《分子生物学杂志》196:901-917(1987)定义的CDR。在某些实施例中,术语“CDR”是如由MacCallum等人,《分子生物学杂志》262:732-745(1996)和Martin A.“抗体可变结构域的蛋白质序列和结构分析(Protein Sequence and Structure Analysis of Antibody Variable Domains)”,《抗体工程(Antibody Engineering)》,Kontermann和Dübel编,第31章,第422-439页,施普林格(Springer-Verlag),柏林(Berlin)(2001)定义的CDR。

[0120] 如本文所用,术语“框架(FR)氨基酸残基”是指在免疫球蛋白链的框架区中的那些氨基酸。如本文所用,术语“框架区”或“FR区”包括为可变区的一部分但不为CDR的一部分(例如,使用CDR的Kabat或Chothia定义)的氨基酸残基。

[0121] 如本文所用,术语“可变区”和“可变结构域”可互换地使用并且是本领域中常见的。可变区典型地是指抗体的一部分,通常是轻链或重链的一部分,典型地是成熟重链中的氨基端约110至125个氨基酸和成熟轻链中的约90至115个氨基酸,其在抗体当中在序列上有很大差异并且被用于特定抗体对其特定抗原的结合和特异性中。序列变异性集中在被称作互补决定区(CDR)的那些区中,而可变结构域中的更高度保守区被称作框架区(FR)。不希望受任何特定机制或理论的束缚,可以认为,轻链和重链的CDR主要负责抗体与抗原的相互作用和特异性。在某些实施例中,可变区是人类可变区。在某些实施例中,可变区包含啮齿动物或鼠类CDR和人类框架区(FR)。在特定实施例中,可变区是灵长类动物(例如,非人类灵长类动物)可变区。在某些实施例中,可变区包含啮齿动物或鼠类CDR和灵长类动物(例如,非人类灵长类动物)框架区(FR)。

[0122] 术语“VL”和“VL结构域”可互换用于指抗体的轻链可变区。

[0123] 术语“VH”和“VH结构域”可互换用于指抗体的重链可变区。

[0124] 如本文所用,术语“恒定区”和“恒定结构域”是可互换的并且是本领域中常见的。恒定区是不直接参与抗体与抗原的结合但可以展现各种效应功能(如与Fc受体(例如,Fc γ 受体)的相互作用)的抗体部分,例如,轻链和/或重链的羧基端部分。免疫球蛋白分子的恒定区通常具有相对于免疫球蛋白可变结构域来说更为保守的氨基酸序列。

[0125] 如本文所用,术语“重链”当关于抗体使用时可以指基于恒定结构域的氨基酸序列的任何独特类型,例如,阿尔法(α)、德耳塔(δ)、厄普西隆(ϵ)、伽马(γ)和谬(μ),其分别产生抗体的IgA、IgD、IgE、IgG和IgM类别,包括IgG的亚类,例如,IgG₁、IgG₂、IgG₃和IgG₄。

[0126] 如本文所用,术语“轻链”当关于抗体使用时可以指基于恒定结构域的氨基酸序列的任何独特类型,例如,卡帕(κ)或拉姆达(λ)。轻链氨基酸序列是本领域熟知的。

[0127] 如本文所用,术语“EU编号系统”是指如以下所描述的抗体的恒定区的EU编号惯例:Edelman,G.M.等人,《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.USA)》,63,78-85(1969)和Kabat等人,《免疫学感兴趣的蛋白质的序列》,美国卫生与公众服务部(U.S.Dept.Health and Human Services),第5版,1991,所述文献中的每一个以全文引用的方式并入本文中。

[0128] “结合亲和力”通常是指分子(例如,抗体)的单一结合位点与其结合配偶体(例如,抗原)之间的非共价相互作用的总和的强度。除非另外指示,否则如本文所用的“结合亲和力”是指反映结合对的成员(例如,抗体与抗原)之间的1:1相互作用的内在结合亲和力。分子X对其配偶体Y的亲和力通常可以用解离常数(K_D)表示。亲和力可以按本领域中已知的多种方式测量和/或表示,包括(但不限于)平衡解离常数(K_D)和平衡缔合常数(K_A)。 K_D 从 k_{off}/k_{on} 的商计算,而 K_A 从 k_{on}/k_{off} 的商计算。 k_{on} 是指例如抗体与抗原的缔合速率常数,并且 k_{off} 是指例如抗体与抗原的解离速率常数。 k_{on} 和 k_{off} 可以通过本领域普通技术人员已知的技术,如BIAcore[®]或KinExA来确定。如本文所用,“较低亲和力”是指较大 K_D 。

[0129] 如本文所用,术语“特异性结合”、“特异性识别”、“免疫特异性结合”和“免疫特异性识别”在抗体的情形下是类似术语并且是指结合到抗原(例如,表位或免疫复合物)的分子,如此类结合由本领域技术人员所理解的。举例来说,特异性结合到抗原的分子可以结合

到其它肽或多肽,通常以较低亲和力结合,如通过例如免疫分析法、BIAcore®、KinExA 3000仪器(爱达荷州博伊西(Boise, ID)的Sapidyne Instruments)或本领域中已知的其它分析法所测定。在一特定实施例中,特异性结合到抗原的分子按为当分子非特异性结合到另一抗原时的 K_A 的至少2个log(即,10的因子)、2.5个log、3个log、4个log或更大的 K_A 结合到抗原。

[0130] 在另一特定实施例中,特异性结合到抗原的分子不与其它蛋白质在类似结合条件下交叉反应。在另一特定实施例中,特异性结合到CTLA-4的分子不与其它非CTLA-4蛋白交叉反应。在一特定实施例中,本文提供了一种以比结合到另一不相关抗原更高的亲和力结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的抗体。在某些实施例中,本文提供了一种以比结合到另一不相关抗原高20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更高的亲和力结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的抗体,如根据例如放射免疫分析法、表面等离子共振或动力排阻分析法所测量。在一特定实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体与不相关非CTLA-4蛋白的结合程度是抗体与CTLA-4蛋白的结合的小于10%、15%或20%,如根据例如放射免疫分析法所测量。

[0131] 如本文所用,术语“无岩藻糖基化”或“无岩藻糖基化的”在Fc的情形下是指基本上没有岩藻糖直接或间接共价连接到人类IgG₁Fc区的残基297(根据EU编号系统编号)或非IgG₁或非人类IgG₁免疫球蛋白中的相应残基。因此,在包含多个无岩藻糖基化抗体的组合物中,至少70%的抗体没有在抗体的Fc区的残基297处直接或间接(例如,经由插入糖)岩藻糖基化,并且在一些实施例中,至少80%、85%、90%、95%或99%没有在Fc区的残基297处直接或间接岩藻糖基化。

[0132] 如本文所用,“表位”是本领域中的术语并且是指可以与抗体特异性结合的局部抗原区。表位可以是例如多肽的连续氨基酸(线性或连续表位),或表位可以例如从一个或多个多肽的两个或更多个非连续区集合在一起(构象、非线性、不连续或非连续表位)。在某些实施例中,抗体所结合的表位可以通过例如NMR光谱法、X射线衍射晶体学研究、ELISA分析法、氢/氘交换偶联质谱法(例如,液相色谱法电喷雾质谱法)、基于阵列的寡肽扫描分析法(例如,使用CLIPS(肽化学键联至骨架上)定位不连续或构象表位的限制肽)和/或诱变定位(例如,定点诱变定位)确定。在X射线晶体学中,结晶可以使用本领域中的已知方法中的任一种实现(例如,GiegéR等人,(1994)《结晶学报D辑:生物结晶学》(Acta Crystallogr D Biol Crystallogr)》50(Pt 4):339-350;McPherson A(1990)《欧洲生物化学杂志(Eur J Biochem)》189:1-23;Chayen NE(1997)《结构(Structure)》5:1269-1274;McPherson A(1976)《生物化学杂志》251:6300-6303,所述文献全部以全文引用的方式并入本文中)。抗体:抗原晶体可以使用熟知的X射线衍射技术研究并且可以使用计算机软件精制,所述计算机软件如X-PLOR(耶鲁大学(Yale University),1992,由Molecular Simulations, Inc.分发;参见例如,《酶学方法(Meth Enzymol)》(1985)第114与115卷,Wyckoff HW等人编;U.S.2004/0014194)和BUSTER(Bricogne G(1993)《结晶学报D辑:生物结晶学》49(第1部分):37-60;Bricogne G(1997)《酶学方法》276A:361-423,Carter CW编;Roversi P等人,(2000)《结晶学报D辑:生物结晶学》56(第10部分):1316-1323),所述文献全部以全文引用的方式并入本文中。诱变定位研究可以使用本领域技术人员已知的任何方法实现。关于诱变技术(包括丙氨酸扫描诱变技术)的描述,参见例如,Champe M等人,(1995)《生物化学杂

志》270:1388-1394和Cunningham BC与Wells JA(1989)《科学》244:1081-1085,所述文献中的每一个以全文引用的方式并入本文中。CLIPS(肽化学键联至骨架上)是以结构受限构型呈现一种或多种肽以表现为复杂蛋白质结构域的功能模拟物的技术。参见例如,美国公开第US 2008/0139407A1号和第US 2007/099240A1号和美国专利第7,972,993号,所述文献中的每一个以全文引用的方式并入本文中。在一特定实施例中,抗体的表位使用丙氨酸扫描诱变研究来确定。在一特定实施例中,抗体的表位使用氢/氘交换偶联质谱法来确定。在一特定实施例中,抗体的表位使用来自Pepscan Therapeutics的CLIPS表位定位技术来确定。

[0133] 如本文所用,术语由一特定氨基酸序列或一组氨基酸残基组成的“位于人类CTLA-4的区内的表位”是指包含规定区的氨基酸残基中的一个或多个的表位,其中规定区包括人类CTLA-4的区的第一个规定氨基酸残基和最后一个规定氨基酸残基。在某些实施例中,表位包含位于规定区内的氨基酸残基中的每一个。在某些实施例中,规定区外的人类CTLA-4的一个或多个额外氨基酸残基与位于规定区内的表位一起结合到抗体。

[0134] 如本文所用,术语“T细胞受体”和“TCR”可互换使用并且是指全长杂二聚 $\alpha\beta$ 或 $\gamma\delta$ TCR、全长TCR的抗原结合片段、和包含TCR CDR或可变区的分子。TCR的实例包括(但不限于)全长TCR、全长TCR的抗原结合片段、不具有跨膜和细胞质区的可溶TCR、含有由柔性连接子连接的TCR的可变区的单链TCR、由工程改造的二硫键连接的TCR链、单特异性TCR、多特异性TCR(包括双特异性TCR)、TCR融合物、人类TCR、人源化TCR、嵌合TCR以重组方式产生的TCR和合成TCR。所述术语涵盖野生型TCR和遗传工程改造的TCR(例如,包含嵌合TCR链的嵌合TCR,其包括来自第一物种的TCR的第一部分和来自第二物种的TCR的第二部分)。

[0135] 如本文所用,术语“主要组织相容性复合物”和“MHC”可互换使用并且是指MHC I类分子和/或MHC II类分子。

[0136] 如本文所用,术语“肽-MHC复合物”是指有肽结合于MHC的本领域中公认的肽结合袋中的MHC分子(MHC I类或MHC II类)。

[0137] 如本文所用,术语“治疗(treat)”、“治疗(treating)”和“治疗(treatment)”是指本文所述的治疗性或预防性措施。“治疗”方法采用向患有疾病或病症或容易患此类疾病或病症的受试者施用抗体,以便对所述疾病或病症或复发性疾病或病症进行预防、治愈、延迟、降低其严重程度或改善其一种或多种症状,或是为了延长受试者的存活期,超过在没有此类治疗的情况下预期存活期。

[0138] 如本文所用,术语“有效量”在向受试者施用疗法的情形下是指实现所需预防性或治疗性作用的疗法的量。

[0139] 如本文关于癌症对疗法的反应所用,术语“难治愈”和“抗性”具有其在本领域中公认的含义并且可互换使用。

[0140] 如本文所用,术语“受试者”包括任何人类或非人类动物。在一个实施例中,受试者是人类或非人类哺乳动物。在一个实施例中,受试者是人类。

[0141] 两个序列(例如,氨基酸序列或核酸序列)之间的“一致性百分比”的确定可以使用数学算法实现。用于比较两个序列的数学算法的一特定非限制性实例是Karlin S与Altschul SF(1990)PNAS 87:2264-2268的算法,如Karlin S与Altschul SF(1993)PNAS 90:5873-5877中所修改,所述文献中的每一个以全文引用的方式并入本文中。此类算法并入Altschul SF等人,(1990)《分子生物学杂志》215:403的NBLAST和XBLAST程序中,所述文

献以全文引用的方式并入本文中。BLAST核苷酸搜索可以用NBLAST核苷酸程序参数集进行,例如,评分=100,字长=12,以获得与本文所述的核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST蛋白质搜索可以用XBLAST程序参数集进行,例如,评分50,字长=3,以获得与本文所述的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得带空位的比对用于比较目的,带空位的BLAST可以如Altschul SF等人,(1997)《核酸研究(Nuc Acids Res)》25:3389-3402中所描述而利用,所述文献以全文引用的方式并入本文中。或者,PSI BLAST可以用于进行迭代搜索,其检测分子之间的远距离关系(同上)。当利用BLAST、带空位的BLAST和PSI Blast程序时,可以使用相应程序(例如,XBLAST和NBLAST)的默认参数(参见例如,万维网ncbi.nlm.nih.gov上的美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information,NCBI))。用于比较序列的数学算法的另一特定非限制性实例是Myers和Miller,1988,CABIOS 4:11-17的算法,所述文献以全文引用的方式并入本文中。此类算法并入ALIGN程序(2.0版)中,所述程序是GCG序列比对软件包的一部分。当利用ALIGN程序比较氨基酸序列时,可以使用PAM120权重残基表、空位长度罚分12和空位罚分4。

[0142] 两个序列之间的一致性百分比可以在允许或不允许空位的情况下使用与上述类似的技术确定。在计算一致性百分比时,典型地只对精确匹配计数。

[0143] 1.2抗CTLA-4抗体

[0144] 在一个方面,本公开提供了特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)并且拮抗CTLA-4功能的抗体。示范性抗体的氨基酸序列阐述于本文表1-4中。

[0145] 表1.示范性抗CTLA-4抗体的氨基酸序列.*

SEQ ID NO:	描述	氨基酸序列
[0146]	1 AGEN1884 VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYS MNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYYADSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARV GLMGPFDIWGQQGTMVTVSS
	2 AGEN1884_M102F VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYS MNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYYADSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARV GLFGPFDIWGQQGTMVTVSS
	3 AGEN1884_M113L VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYS MNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYYADSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARV GLMGPFDIWGQQGTLVTVSS
	4 AGEN1884_D62E VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYS MNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYYAESVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARV GLMGPFDIWGQQGTMVTVSS
	5 AGEN1884_M102F_M113L VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYS MNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYYADSVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARV GLFGPFDIWGQQGTLVTVSS
	6 AGEN1884_D62E_M102F VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYS MNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYYAESVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARV GLFGPFDIWGQQGTMVTVSS
	7 AGEN1884_D62E_M113L VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYS MNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYYAESVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARV GLMGPFDIWGQQGTLVTVSS
	8 AGEN1884_D62E_M102F_M113L VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYS MNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYYAESVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARV GLFGPFDIWGQQGTLVTVSS
	9 AGEN1884 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRYLG WYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPDRFSGSGS GTDFTLTITRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQG TKVEIK
	10 CDRH1	SYSMN
	11 CDRH2	SISSSSSYIYYADSVKG
	12 CDRH2	SISSSSSYIYYAESVKG
	13 CDRH3	VGLMGPFDI
	14 CDRH3	VGLFGPFDI
	15 CDRL1	RASQSVSRYLG
	16 CDRL2	GASTRAT
	17 CDRL3	QQYGSSPWT
	18 CDRH2 共有序列	SISSSSSYIYYAXSVKG, 其中: X 是 E 或 D

19	CDRH3 共有序列	VGLXGPFDI, 其中: X 是 F 或 M
20	VH 共有序列	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYS MNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYAX, SVK RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR VGLX ₂ GPFDIWGQGTX ₃ VTVSS, 其中: X ₁ 是 E 或 D, X ₂ 是 F 或 M, 并且 X ₃ 是 L 或 M。
23 [0147]	AGEN1884.H3 (IgG ₁) 重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYS MNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYAESVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARV GLFGPFDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSQLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
24	AGEN1884.H3 (IgG ₁ S239D/I332E) 重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYS MNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYAESVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARV GLFGPFDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSQLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHCPPCPAPE LLGGPDVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA PEEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG

	25	AGEN1884.H3 (IgG ₁ S239D/A330L/I332E) 重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYS MNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYAESVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARV GLFGPFDIWGQQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHCPPCPAPE LLGGPDVFLFPKPDKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPL EEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
[0148]	26	AGEN1884.H3 (IgG ₁ L235V/F243L/R292P/Y300 L/P396L) 重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYS MNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYAESVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARV GLFGPFDIWGQQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHCPPCPAPE LVGGPSVFLPPKPDKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPPEEQYNST LRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPI EKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPLVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
	47	AGEN1884.H3 (IgG ₁ N297A) 重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYS MNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSSYIYYAESVKG RFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARV GLFGPFDIWGQQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHCPPCPAPE LLGGPSVFLPPKPDKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYAST YRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAP IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPLVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG

[0149]	48	AGEN1884.H3 (IgG ₁ S267E/L328F) 重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYS MNWVRQAPGKGLEWVSSISSSSYIYYAESVKG RFTISRDNAKNSLYLMQMSLRAEDTAVYYCARV GLFGPFDIWGQGTLTVSSASTKGPSVFPLAPSS KSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYLSLSSVTVPSQLGTQTYIC NVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDLMISRTPEVTCVVVDVE HEDPEVKFNWYVDGVEVHNNAKTKPREEQYNS TYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAFPA PIEKTISKAKGQPREPQVTLPSSREEMTKNQVS LTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCVMHE ALHNHYTQKSLSLSPG
	27	AGEN1884.H3 轻链	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRYLG WYQQKPGQAPRLLIYGASTRATGIPDRFSGSGS GTDFTLTITRLEPEDFAVYYCQQYGSSPWTFGQG TKVEIKRTVAAPSFIGFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYSLSSTLTSKADYEKHKVYACEVTHQGL SSPVTKSFNRGEC
	28	IgG ₁	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPEELLGGPSVFLFPPKPKDLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
	29	IgG ₁ S239D/I332E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTWSNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPEELLGGPDVFLFPPKPKDLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQQGNVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

	30	IgG ₁ S239D/A330L/I332E	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFP EPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPDVFLFPPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPLPEEKTIISKAKGQPQREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPLVLDSDGSFFYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
[0150]	31	IgG ₁ L235V/F243L/R292P/Y300 L/P396L	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGCLVKDYFP EPVTWSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK SCDKTHTCPPCPAPELVGGPSVFLPPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV HNAKTKPPEEQYNSTLRVSVLTVLHQDWLNG KEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPQREPQVY TLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTPLVLDSDGSFFYSKLTVDKSR WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
	32	轻链恒定区	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLNNFYP REAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTY SLSSTTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNRGEC

[0151] *CDR根据Kabat编号系统定义。

[0152] 表2.示范性抗CTLA-4抗体的重链CDR氨基酸序列.*

VH (SEQ ID NO:)	CDRH1 (SEQ ID NO:)	CDRH2 (SEQ ID NO:)	CDRH3 (SEQ ID NO:)
AGEN1884 VH (1)	SYSMN (10)	SISSSSSYIYYADSVKG (11)	VGLMGPFDI (13)
AGEN1884_M102F VH (2)	SYSMN (10)	SISSSSSYIYYADSVKG (11)	VGLFGPFDI (14)
AGEN1884_M113L VH (3)	SYSMN (10)	SISSSSSYIYYADSVKG (11)	VGLMGPFDI (13)
AGEN1884_D62E VH (4)	SYSMN (10)	SISSSSSYIYYAESVKG (12)	VGLMGPFDI (13)
AGEN1884_M102F_M113L VH (5)	SYSMN (10)	SISSSSSYIYYADSVKG (11)	VGLFGPFDI (14)
AGEN1884_D62E_M102F VH (6)	SYSMN (10)	SISSSSSYIYYAESVKG (12)	VGLFGPFDI (14)
AGEN1884_D62E_M113L VH (7)	SYSMN (10)	SISSSSSYIYYAESVKG (12)	VGLMGPFDI (13)
AGEN1884_D62E_M102F_M113L VH (8)	SYSMN (10)	SISSSSSYIYYAESVKG (12)	VGLFGPFDI (14)

[0154] *根据Kabat编号系统定义。

[0155] 表3.示范性抗CTLA-4抗体的轻链CDR氨基酸序列.*

VL (SEQ ID NO:)	CDRL1 (SEQ ID NO:)	CDRL2 (SEQ ID NO:)	CDRL3 (SEQ ID NO:)
AGEN1884 VL (9)	RASQSVSRYLG (15)	GASTRAT (16)	QQYGSSPWT (17)

[0157] *根据Kabat编号系统定义。

[0158] 表4.示范性抗CTLA-4抗体.

抗体	重链可变区	SEQ ID NO:	轻链可变区	SEQ ID NO:
AGEN1884	AGEN1884 VH	1	AGEN1884 VL	9
AGEN1884.H1.1	AGEN1884_M102F VH	2	AGEN1884 VL	9
AGEN1884.H1.2	AGEN1884_M113L VH	3	AGEN1884 VL	9
AGEN1884.H1.3	AGEN1884_D62E VH	4	AGEN1884 VL	9
AGEN1884.H2.1	AGEN1884_M102F_M113L VH	5	AGEN1884 VL	9
AGEN1884.H2.2	AGEN1884_D62E_M102F VH	6	AGEN1884 VL	9
AGEN1884.H2.3	AGEN1884_D62E_M113L VH	7	AGEN1884 VL	9
AGEN1884.H3	AGEN1884_D62E_M102F_M113L VH	8	AGEN1884 VL	9

[0159] 表5.最接近的胚系基因.

SEQ ID NO:	最接近的胚系基因	氨基酸序列
21	IGHV3-21*01	EVQLVESGGGLVKP G SLRLSCAAS G FTFSSYSMNWVRQAP G KGLEWVSSISSSSSYIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQM N SLRAEDTAVYYCAR
	IGKV3-20*01	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQS V SSSYLAWYQQKPG Q APRLLIY G ASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAV Y YCQQY G SSP

[0160] 表6.CTLA-4和家族成员的示范性序列.

SEQ ID NO:	描述	氨基酸序列
33	人类 CTLA-4 未成熟蛋白质 (P16410)	MACLG F QRHKAQLNLATRTWPCTLLFFLLFIPVFCKAMHVA Q PAVVLASSRGIA F CEYASPGKATEVRVT V L R QAD S QVTE V CAATYMMGNELTF L D D SIC T G S SGNQVNLT I QGLRAMDT G LYICKVELMYPPPYYL G IGNGT Q IYVIDPEPCPD S DF L WIL A AVSSGLFFYS F LLTAV S LSKMLKKR S PLTTGVYVKMPPTEP E CEKQFQPYFIPIN P
		YLGI
		YPPPYYLG I
		YL G IGNGT Q I

37	CTLA-4 表位	YPPPYYLGIGNGTQI
38	CTLA-4 表位	MYPPYY
39	CTLA-4 表位	QVT
40	MACFA CTLA-4 (G7PL88)	MACLGFQRHKARLNLATRTRPYTLLFSLFIPVFSKAMHVA QPAVVLANSRGIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVT EVCAATYMMGNELTFLDDSICTGTSSGNQVNLTIQGLRAMD TGLYICKVELMYPYPMGIGNGTQIYVIDPEPCPDSDFLLWI LAAVSSGLFFYSFLTAWSLSKMLKRSPLTTGVYVKMPTE PECEKQFQPYFIPIN
41	小鼠 CTLA-4 (P09793)	MACLGLRKYKAQLQLPSRTWPFVALLTLLFIPVFSEAIQVTQ PSVVLASSHGVASFPCYEYSPSHNTDEVRVTVLRQTNDQMTE VCATTFTEKNTVGFLDYPFCSGTFNESRVNLTIQGLRAVDTG LYLCKVELMYPYFVGMGNGTQIYVIDPEPCPDSDFLLWIL VAVSLGLFFYSFLVSAVSLSKMLKRSPLTTGVYVKMPTE ECEKQFQPYFIPIN
42	大鼠 CTLA-4 (Q62859)	MACLGLQRYKTHLQLPSRTWPGVLLSLLFIPFSEAIQVTQP SVVLASSHGVASFPCYEYASSHTDEVRVTVLRQTNDQVTEV CATTFTVKNTLGFLDDPFCSGTFNESRVNLTIQGLRAADTGL YFCKVELMYPYFVGMGNGTQIYVIDPEPCPDSDFLLWILA AVSSGLFFYSFLVTAWSLNRTKRSPLTTGVYVKMPTE CEKQFQPYFIPIN
[0164]	43 人类 CD28 (P10747)	MLRLLLALNLFPSIQVTGNKILVKQSPMLVAYDNAVNLSCKY SYNLFSREFRASLHKGLDSAVEVCVYVGNSSQLQVYSKT GFNCGDGKLGNESTVTFYLQNLYVNQTDIYFCKIEVMYPPPYL DNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFLPGPSKPFWVLVVGGVLA CYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTRRPGPTRKH YQPYAPPRDFAAYRS
	44 人类 ICOS (Q9Y6W8)	MKSGLWYFFLFCLRIKVLTGEINGSANYEMFIFHNGGVQILC KYPDIVQQFKMQLLKGQILCDLTKTGSGNTVSIKSLKFC HSQLSNNSVSFFLYNLDHSANYYFCNLISIFDPFFKVTLTG GYLHIYESQLCCQLFWLPIGCAAFVVVCILGCILICWLTKK KYSSSVHDPNGEYMFMRNAVNTAKKSRLTDVTL
45	人类 BTLA (Q7Z6A9)	MKTLPAJGTGKLFWVFFLIPYLDIWINIHGKESCDVQLYIK RQEHSILAGDPFELECPVKYCANCPRHTWCKLNGTTCVKL EDRQTSWKEEKNISFFILHFEPVLPNDNGSYRCSANFQSNLIE SHSTTLYVTDVKSASERPSKDEMASRPWLLYRLLPLGGPLL ITTCFCLFCCLRRHQGKQNELSDTAGREINLVDAHLKSEQTE ASTRQNSQVLLSETGIYDNDPDLCFRMQEGSEVSNPCLEE NKPGIVYASLNHSVIGPNSRLARNVKEAPTEYASICVRS
46	人类 PD-1 (Q15116)	MQIPQAPWPVVWAVLQLGWRPGWFLDSPDRPNPPTFSPA LLVVTEGDNATFTCSFSNTSESFVNWYRMSPSNQTDKLA FPEDRSQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSVVRARRNDSGY LCGAISLAPKAQIKESLRAELRVTERRAEVPTAHPSPSPRAG QFQTLVVGVVGGLLGSVLVWVLAIVCSRAARGTIGARRT GQPLKEDPSAVPVFSVDYGELDFQWREKTPPEPPVPCVPEQT EYATIVFPGMGTSSPARRGSADGPRSAQPLRPEDGHCSWPL

[0165] 在某些实施例中,本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的分离的抗体,所述抗体包含VH结构域,所述VH结构域包含本文表1中所述的VH结构域的CDR中的一个、两个或所有三个。在某些实施例中,抗体包含表1中所述的其中一个VH结构域的CDRH1。在某些实施例中,抗体包含表1中所述的其中一个VH结构域的CDRH2。在某些实施例中,抗体包含表1中所述的其中一个VH结构域的CDRH3。

[0166] 在某些实施例中,本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的

分离的抗体,所述抗体包含VL结构域,所述VL结构域包含本文表1中所公开的VL结构域的CDR中的一个、两个或所有三个。在某些实施例中,抗体包含表1中所述的其中一个VL结构域的CDRL1。在某些实施例中,抗体包含表1中所述的其中一个VL结构域的CDRL2。在某些实施例中,抗体包含表1中所述的其中一个VL结构域的CDRL3。

[0167] 在某些实施例中,抗体的CDR可以根据Kabat等人,《生物化学杂志》252,6609-6616(1977)和Kabat等人,《免疫学感兴趣的蛋白质的序列》(1991)确定,所述文献中的每一个以全文引用的方式并入本文中。

[0168] 在某些实施例中,抗体的CDR可以根据Chothia编号方案确定,所述编号方案是指免疫球蛋白结构环的位置(参见例如,Chothia C与Lesk AM, (1987),《分子生物学杂志》196:901-917;Al-Lazikani B等人, (1997)《分子生物学杂志》273:927-948;Chothia C等人, (1992)《分子生物学杂志》227:799-817;Tramontano A等人, (1990)《分子生物学杂志》215(1):175-82;和美国专利第7,709,226号,其全部以全文引用的方式并入本文中)。典型地,当使用Kabat编号惯例时,Chothia CDRH1环存在于重链氨基酸26至32、33或34处,Chothia CDRH2环存在于重链氨基酸52至56处,并且Chothia CDRH3环存在于重链氨基酸95至102处,而Chothia CDRL1环存在于轻链氨基酸24至34处,Chothia CDRL2环存在于轻链氨基酸50至56处,并且Chothia CDRL3环存在于轻链氨基酸89至97处。当使用Kabat编号惯例编号时,Chothia CDRH1环的末端在H32与H34之间变化,这取决于环的长度(这是因为Kabat编号方案将插入放在H35A和H35B;如果35A和35B都不存在,那么环末端在32;如果仅存在35A,那么环末端在33;如果35A和35B都存在,那么环末端在34)。

[0169] 在某些实施例中,本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的分离的抗体,所述抗体包含本文表1中所公开的VH的Chothia VH CDR。在某些实施例中,本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的分离的抗体,所述抗体包含本文表1中所公开的VL的Chothia VL CDR。在某些实施例中,本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的分离的抗体,所述抗体包含本文表1中所公开的抗体的Chothia VH CDR和Chothia VL CDR。在某些实施例中,特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的抗体包含一个或多个CDR,其中Chothia和Kabat CDR具有相同氨基酸序列。在某些实施例中,本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)并且包含Kabat CDR和Chothia CDR的组合的分离的抗体。

[0170] 在某些实施例中,抗体的CDR可以根据IMGT编号系统确定,如Lefranc M-P, (1999)《免疫学家(The Immunologist)》7:132-136和Lefranc M-P等人, (1999)《核酸研究》27:209-212中所述,所述文献中的每一个以全文引用的方式并入本文中。

[0171] 在某些实施例中,本公开提供了特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)并且包含本文表1中所公开的抗体的CDR的抗体,如通过例如如Lefranc M-P (1999)同前文献和Lefranc M-P等人, (1999)同前文献中所述的IMGT编号系统所确定。

[0172] 在某些实施例中,抗体的CDR可以根据AbM编号方案确定,所述编号方案是指AbM高变区,其代表Kabat CDR与Chothia结构环之间的折衷,并且由Oxford Molecular的AbM抗体建模软件(Oxford Molecular Group, Inc.)使用,其以全文引用的方式并入本文中。在一特定实施例中,本公开提供了特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)并且包含本文表1中所公开的抗体的CDR的抗体,如通过AbM编号方案所确定。

[0173] 在某些实施例中,本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的分离的抗体,其中所述抗体包含:包含SEQ ID NO:2、4、5、6、7或8中所述的VH结构域的CDRH1、CDRH2和CDRH3区氨基酸序列的重链可变区,和包含SEQ ID NO:9中所述的VL结构域的CDRL1、CDRL2和CDRL3区氨基酸序列的轻链可变区,其中每个CDR根据CDR的MacCallum定义、Kabat定义、Chothia定义、Kabat定义和Chothia定义的组合、IMGT编号系统或AbM定义而定义。

[0174] 在某些实施例中,本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的分离的抗体,所述抗体包含:

[0175] (a) CDRH1包含氨基酸序列SYSMN(SEQ ID NO:10);和/或

[0176] (b) CDRH2包含氨基酸序列SISSSSYIYYAXSVKG(SEQ ID NO:18),其中X是E或D;和/或

[0177] (c) CDRH3包含氨基酸序列VGLXGPFDI(SEQ ID NO:19),其中X是F或M;和/或

[0178] (d) CDRL1包含氨基酸序列RASQSVSRYLG(SEQ ID NO:15);和/或

[0179] (e) CDRL2包含氨基酸序列GASTRAT(SEQ ID NO:16);和/或

[0180] (f) CDRL3包含氨基酸序列QQYGSSPWT(SEQ ID NO:17),

[0181] 并且其中所述抗体的所述CDRH1、CDRH2和CDRH3序列分别不是SEQ ID NO:10、11和13。

[0182] 在某些实施例中,CDRH2包含氨基酸序列SEQ ID NO:11。在某些实施例中,CDRH2包含氨基酸序列SEQ ID NO:12。在某些实施例中,CDRH3包含氨基酸序列SEQ ID NO:13。在某些实施例中,CDRH3包含氨基酸序列SEQ ID NO:14。

[0183] 在某些实施例中,本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的分离的抗体,其中所述抗体包括包含分别在SEQ ID NO:10、11和14;10、12和13;或10、12和14中所述的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列的VH结构域。在某些实施例中,本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的分离的抗体,其中所述抗体包括包含分别在SEQ ID NO:10、12和14中所述的CDRH1、CDRH2和CDRH3氨基酸序列的VH结构域。

[0184] 在某些实施例中,本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的分离的抗体,其中所述抗体包括包含CDRH1、CDRH2和CDRH3区的重链可变区以及包含CDRL1、CDRL2和CDRL3区的轻链可变区,其中CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3区分别包含SEQ ID NO:10、11、14、15、16和17;10、12、13、15、16和17;或10、12、14、15、16和17中所述的氨基酸序列。在某些实施例中,本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的分离的抗体,其中所述抗体包括包含CDRH1、CDRH2和CDRH3区的重链可变区以及包含CDRL1、CDRL2和CDRL3区的轻链可变区,其中CDRH1、CDRH2、CDRH3、CDRL1、CDRL2和CDRL3区分别包含SEQ ID NO:10、12、14、15、16和17中所述的氨基酸序列。

[0185] 在某些实施例中,本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的分离的抗体,其包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:20的重链可变区。在某些实施例中,本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的分离的抗体,其包括包含与SEQ ID NO:2、4、5、6、7或8中所述的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%、99%或100%(例如,至少86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%)一致的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施例中,本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的分离

的抗体,其包括包含与SEQ ID N0:3中所述的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%、99%或100% (例如,至少86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%)一致的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施例中,所述抗体包含具有SEQ ID N0:2、4、5、6、7或8中所述的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施例中,所述抗体包含具有SEQ ID N0:2中所述的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施例中,所述抗体包含具有SEQ ID N0:3中所述的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施例中,所述抗体包含具有SEQ ID N0:4中所述的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施例中,所述抗体包含具有SEQ ID N0:5中所述的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施例中,所述抗体包含具有SEQ ID N0:6中所述的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施例中,所述抗体包含具有SEQ ID N0:7中所述的氨基酸序列的重链可变区。在某些实施例中,所述抗体包含具有SEQ ID N0:8中所述的氨基酸序列的重链可变区。

[0186] 在某些实施例中,本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4 (例如,人类CTLA-4) 的分离的抗体,其包括包含与SEQ ID N0:9中所述的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%、99%或100% (例如,至少86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%)一致的氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施例中,所述抗体包含具有SEQ ID N0:9中所述的氨基酸序列的轻链可变区。

[0187] 在某些实施例中,本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4 (例如,人类CTLA-4) 的分离的抗体,其包括包含氨基酸序列SEQ ID N0:20的重链可变区和包含氨基酸序列SEQ ID N0:9的轻链可变区。在某些实施例中,本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4 (例如,人类CTLA-4) 的分离的抗体,其包含:包含与SEQ ID N0:2、4、5、6、7或8中所述的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%、99%或100% (例如,至少86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%)一致的氨基酸序列的重链可变区,和包含与SEQ ID N0:9中所述的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%、99%或100% (例如,至少86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%)一致的氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施例中,本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4 (例如,人类CTLA-4) 的分离的抗体,其包含:包含与SEQ ID N0:3中所述的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%、99%或100% (例如,至少86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%)一致的氨基酸序列的重链可变区,和包含与SEQ ID N0:9中所述的氨基酸序列至少75%、80%、85%、90%、95%、99%或100% (例如,至少86、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98或99%)一致的氨基酸序列的轻链可变区。在某些实施例中,所述抗体包含分别具有SEQ ID N0:2和9;4和9;5和9;6和9;7和9;或8和9中所述的氨基酸序列的重链可变区和轻链可变区。在某些实施例中,所述抗体包含分别具有SEQ ID N0:2和9中所述的氨基酸序列的重链可变区和轻链可变区。在某些实施例中,所述抗体包含分别具有SEQ ID N0:3和9中所述的氨基酸序列的重链可变区和轻链可变区。在某些实施例中,所述抗体包含分别具有SEQ ID N0:4和9中所述的氨基酸序列的重链可变区和轻链可变区。在某些实施例中,所述抗体包含分别具有SEQ ID N0:5和9中所述的氨基酸序列的重链可变区和轻链可变区。在某些实施例中,所述抗体包含分别具有SEQ ID N0:6和9中所述的氨基酸序列的重链可变区和轻链可变区。在某些实施例中,所述抗体包含分别具有SEQ ID N0:7和9中所述的氨基酸序列的重链可变区和轻链可变区。在某些实施例中,所述抗体包含分别具有SEQ ID N0:8和9中所述的氨基酸序列的重链可变区和轻链可变区。

[0188] 在某些实施例中,本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4 (例如,人类CTLA-4) 的

分离的抗体，其包含具有来源于人类IGHV3-21胚系序列(例如，IGHV3-21*01，例如，具有氨基酸序列SEQ ID NO:21)的氨基酸序列的重链可变区。选自框架1、框架2、框架3、CDRH1和CDRH2的一个或多个区(例如，这些区中的两个、三个、四个或五个)可以来源于人类IGHV3-21胚系序列(例如，IGHV3-21*01，例如，具有氨基酸序列SEQ ID NO:21)。在一个实施例中，框架1、框架2、框架3、CDRH1和CDRH2都来源于人类IGHV3-21胚系序列(例如，IGHV3-21*01，例如，具有氨基酸序列SEQ ID NO:21)。

[0189] 在某些实施例中，本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4(例如，人类CTLA-4)的分离的抗体，其包含具有来源于选自由IGKV3-20组成的群组的人类胚系序列(例如，IGKV3-20*01，例如，具有氨基酸序列SEQ ID NO:22)的氨基酸序列的轻链可变区。选自框架1、框架2、框架3、CDRL1和CDRL2的一个或多个区(例如，这些区中的两个、三个、四个或五个)可以来源于选自由IGKV3-20组成的群组的人类胚系序列(例如，IGKV3-20*01，例如，具有氨基酸序列SEQ ID NO:22)。在一个实施例中，框架1、框架2、框架3、CDRL1和CDRL2都来源于选自由IGKV3-20组成的群组的人类胚系序列(例如，IGKV3-20*01，例如，具有氨基酸序列SEQ ID NO:22)。

[0190] 在某些实施例中，本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4(例如，人类CTLA-4)的分离的抗体，其包含具有来源于人类IGHV3-21胚系序列(例如，IGHV3-21*01，例如，具有氨基酸序列SEQ ID NO:21)的氨基酸序列的重链可变区，和具有来源于选自由IGKV3-20组成的群组的人类胚系序列(例如，IGKV3-20*01，例如，具有氨基酸序列SEQ ID NO:22)的氨基酸序列的轻链可变区。

[0191] 在某些实施例中，本公开提供了一种与包含分别在SEQ ID NO:2和9;4和9;5和9;6和9;7和9;或8和9中所述的重链和轻链可变区氨基酸序列的抗体交叉竞争结合到CTLA-4(例如，人类CTLA-4)的分离的抗体。在某些实施例中，本公开提供了一种与包含分别在SEQ ID NO:3和9中所述的重链和轻链可变区氨基酸序列的抗体交叉竞争结合到CTLA-4(例如，人类CTLA-4)的分离的抗体。

[0192] 在某些实施例中，本公开提供了一种与本文所述的抗体，例如，包含分别在SEQ ID NO:2和9;4和9;5和9;6和9;7和9;或8和9中所述的重链和轻链可变区氨基酸序列的抗体结合到CTLA-4的相同或重叠表位(例如，人类CTLA-4的表位)的分离的抗体。在某些实施例中，本公开提供了一种与本文所述的抗体，例如，包含分别在SEQ ID NO:3和9中所述的重链和轻链可变区氨基酸序列的抗体结合到CTLA-4的相同或重叠表位(例如，人类CTLA-4的表位)的分离的抗体。在某些实施例中，抗体的表位可以通过例如NMR光谱法、表面等离子共振(BIAcore[®])、X射线衍射晶体学研究、ELISA分析法、氢/氘交换偶联质谱法(例如，液相色谱法电喷雾质谱法)、基于阵列的寡肽扫描分析法和/或诱变定位(例如，定点诱变定位)确定。在X射线晶体学中，结晶可以使用本领域中的已知方法中的任一种实现(例如，GiegéR等人，(1994)《结晶学报D辑：生物结晶学》50(Pt 4):339-350;McPherson A(1990)《欧洲生物化学杂志》189:1-23;Chayen NE(1997)《结构》5:1269-1274;McPherson A(1976)《生物化学杂志》251:6300-6303，所述文献全部以全文引用的方式并入本文中)。抗体：抗原晶体可以使用熟知的X射线衍射技术研究并且可以使用计算机软件精制，所述计算机软件如X-PLOR(耶鲁大学，1992，由Molecular Simulations, Inc.分发；参见例如，《酶学方法》(1985)

第114与115卷,Wyckoff HW等人编;美国专利申请第2004/0014194号)和BUSTER(Bricogne G(1993)《结晶学报D辑:生物结晶学》49(第1部分):37-60;Bricogne G(1997)《酶学方法》276A:361-423,Carter CW编;Roversi P等人,(2000)《结晶学报D辑:生物结晶学》56(第10部分):1316-1323),所述文献全部以全文引用的方式并入本文中。诱变定位研究可以使用本领域技术人员已知的任何方法实现。关于诱变技术(包括丙氨酸扫描诱变技术)的描述,参见例如,Champe M等人,(1995)同前文献和Cunningham BC与Wells JA(1989)同前文献。在一特定实施例中,抗体的表位使用丙氨酸扫描诱变研究来确定。另外,识别并且结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的相同或重叠表位的抗体可以使用常规技术鉴别,如免疫分析法,例如通过展示一种抗体阻断另一抗体结合到靶抗原的能力,即,竞争性结合分析法。竞争性结合分析法还可以用于确定两种抗体是否对表位具有类似结合特异性。竞争性结合可在一分析法中确定,其中受测试的免疫球蛋白抑制参考抗体与共同抗原,如CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的特异性结合。许多类型的竞争性结合分析法是已知的,例如:固相直接或间接放射免疫分析法(RIA)、固相直接或间接酶免疫分析法(EIA)、夹心竞争分析法(参见Stahli C等人,(1983)《酶学方法》9:242-253);固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(参见Kirkland TN等人,(1986)《免疫学杂志(J Immunol)》137:3614-9);固相直接标记分析法、固相直接标记夹心分析法(参见Harlow E与Lane D,(1988)《抗体:实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual)》,冷泉港出版社(Cold Spring Harbor Press));使用I-125标记的固相直接标记RIA(参见Morel GA等人,(1988)《分子免疫学(Mol Immunol)》25(1):7-15);固相直接生物素-抗生物素蛋白EIA(参见Cheung RC等人,(1990)《病毒学(Virology)》176:546-52);和直接标记RIA(参见Moldenhauer G等人,(1990)《斯堪的纳维亚免疫学杂志(Scand J Immunol)》32:77-82),所述文献全部以全文引用的方式并入本文中。典型地,此类分析法涉及使用结合到固体表面或携有其中的任一个的细胞的纯化的抗原(例如,CTLA-4,如人类CTLA-4)、未标记的测试免疫球蛋白和标记的参考免疫球蛋白。竞争性抑制可以通过测定在测试免疫球蛋白存在下与固体表面或细胞结合的标记的量来测量。测试免疫球蛋白通常过量存在。通常,当竞争性抗体过量存在时,其将参考抗体与共同抗原的特异性结合抑制至少50-55%、55-60%、60-65%、65-70%、70-75%或更多。竞争结合分析法可以按许多不同格式使用标记的抗原或标记的抗体配置。在这一分析法的常见版本中,抗原固定在96孔板上。未标记的抗体阻断标记的抗体结合到抗原的能力然后使用放射性或酶标记进行测量。关于其它细节,参见例如,Wagener C等人,(1983)《免疫学杂志》130:2308-2315;Wagener C等人,(1984)《免疫学方法杂志(J Immunol Methods)》68:269-274;Kuroki M等人,(1990)《癌症研究(Cancer Res)》50:4872-4879;Kuroki M等人,(1992)《免疫学研究(Immunol Invest)》21:523-538;Kuroki M等人,(1992)《杂交瘤(Hybridoma)》11:391-407;和《抗体:实验室手册》,Harlow E与Lane D编辑编同前文献,第386-389页,所述文献全部以全文引用的方式并入本文中。

[0193] 在某些实施例中,本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的分离的抗体,所述抗体包括包含SEQ ID NO:23、24、25或26中所述的氨基酸序列的重链。在某些实施例中,所述抗体包括包含SEQ ID NO:23中所述的氨基酸序列的重链。在某些实施例中,所述抗体包括包含SEQ ID NO:24中所述的氨基酸序列的重链。在某些实施例中,所述抗体包括包含SEQ ID NO:25中所述的氨基酸序列的重链。在某些实施例中,所述抗体包括

包含SEQ ID NO:26中所述的氨基酸序列的重链。

[0194] 在某些实施例中,本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的分离的抗体,所述抗体包括包含SEQ ID NO:27中所述的氨基酸序列的轻链。

[0195] 在某些实施例中,本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的分离的抗体,所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:23的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:27的轻链。在某些实施例中,本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的分离的抗体,所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:24的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:27的轻链。在某些实施例中,本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的分离的抗体,所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:25的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:27的轻链。在某些实施例中,本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的分离的抗体,所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:26的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:27的轻链。

[0196] 任何Ig恒定区都可以用于本文所述的抗体中。在某些实施例中,Ig区是人类IgG、IgE、IgM、IgD、IgA或IgY免疫球蛋白分子、免疫球蛋白分子的任何类别(例如,IgG₁、IgG₂、IgG₃、IgG₄、IgA₁和IgA₂)或任何亚类(例如,IgG_{2a}和IgG_{2b})。

[0197] 在某些实施例中,本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的分离的抗体,所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:28、29、30或31的重链恒定区。在某些实施例中,本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的分离的抗体,所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:32的轻链恒定区。

[0198] 在某些实施例中,本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的分离的抗体,所述抗体包括包含选自由以下组成的群组的突变的重链恒定区(例如,IgG₁恒定区)或其片段:S239D、I332E和其组合,根据EU编号系统编号。在某些实施例中,所述抗体包括包含S239D和I332E突变的IgG₁重链恒定区,根据EU编号系统编号。在某些实施例中,所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:29的重链恒定区。

[0199] 在某些实施例中,本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的分离的抗体,所述抗体包括包含选自由以下组成的群组的突变的重链恒定区(例如,IgG₁恒定区)或其片段:S239D、A330L、I332E和其组合,根据EU编号系统编号。在某些实施例中,所述抗体包括包含S239D、A330L和I332E突变的IgG₁重链恒定区,根据EU编号系统编号。在某些实施例中,所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:30的重链恒定区。

[0200] 在某些实施例中,本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的分离的抗体,所述抗体包括包含选自由以下组成的群组的突变的重链恒定区(例如,IgG₁恒定区)或其片段:L235V、F243L、R292P、Y300L、P396L和其组合,根据EU编号系统编号。在某些实施例中,所述抗体包括包含L235V、F243L、R292P、Y300L和P396L突变的IgG₁重链恒定区,根据EU编号系统编号。在某些实施例中,所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:31的重链恒定区。

[0201] 在某些实施例中,例如,与具有野生型Fc区(例如,IgG₁Fc)的抗体相比,本文所述的抗体的IgG区对于Fc γ RIIIA的亲和力增加。导致对Fc γ RIIIA的亲和力增加的序列改变是本领域中已知的,例如,Kellner等人,《方法(Methods)》65:105-113(2014),Lazar等人,《国家科学院院刊》103:4005-4010(2006),Shields等人,《生物化学杂志》276(9):6591-

6604(2001),所述文献中的每一个以全文引用的方式并入本文中。在某些实施例中,所述抗体包括包含选自由以下组成的群组的突变的重链恒定区(例如,IgG₁恒定区)或其片段:G236A、S239D、F243L、T256A、K290A、R292P、S298A、Y300L、V305I、A330L、I332E、E333A、K334A、A339T和P396L和其组合,根据EU编号系统编号。在某些实施例中,所述抗体包括包含S239D的重链恒定区(例如,IgG₁恒定区)或其片段,根据EU编号系统编号。在某些实施例中,所述抗体包括包含T256A的重链恒定区(例如,IgG1恒定区)或其片段,根据EU编号系统编号。在某些实施例中,所述抗体包括包含K290A的重链恒定区(例如,IgG1恒定区)或其片段,根据EU编号系统编号。在某些实施例中,所述抗体包括包含S298A的重链恒定区(例如,IgG1恒定区)或其片段,根据EU编号系统编号。在某些实施例中,所述抗体包括包含I332E的重链恒定区(例如,IgG1恒定区)或其片段,根据EU编号系统编号。在某些实施例中,所述抗体包括包含E333A的重链恒定区(例如,IgG1恒定区)或其片段,根据EU编号系统编号。在某些实施例中,所述抗体包括包含K334A的重链恒定区(例如,IgG1恒定区)或其片段,根据EU编号系统编号。在某些实施例中,所述抗体包括包含A339T的重链恒定区(例如,IgG1恒定区)或其片段,根据EU编号系统编号。在某些实施例中,所述抗体包括包含S239D和I332E的重链恒定区(例如,IgG1恒定区)或其片段,根据EU编号系统编号。在某些实施例中,所述抗体包括包含S239D、A330L和I332E的重链恒定区(例如,IgG1恒定区)或其片段,根据EU编号系统编号。在某些实施例中,所述抗体包括包含S298A、E333A和K334A的重链恒定区(例如,IgG1恒定区)或其片段,根据EU编号系统编号。在某些实施例中,所述抗体包括包含G236A、S239D和I332E的重链恒定区(例如,IgG1恒定区)或其片段,根据EU编号系统编号。在某些实施例中,所述抗体包括包含F243L、R292P、Y300L、V305I和P396L的重链恒定区(例如,IgG1恒定区)或其片段,根据EU编号系统编号。

[0202] 在某些实施例中,本文所述的抗体展现抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC)活性。在某些实施例中,本文所述的抗体引发自然杀伤细胞介导的细胞耗竭。在某些实施例中,本文所述的抗体用于治疗经自然杀伤细胞浸润的肿瘤。在某些实施例中,本文所述的抗体展现抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)活性。在某些实施例中,本文所述的抗体引发巨噬细胞介导的细胞耗竭。在某些实施例中,本文所述的抗体用于治疗经巨噬细胞浸润的肿瘤。在某些实施例中,本文所述的抗体选择性地耗竭肿瘤内调节T细胞。

[0203] 在某些实施例中,本文所述的抗体是以活化状态结合人类CTLA-4蛋白的可活化抗体。在某些实施例中,可活化抗体包含抑制未裂解状态的抗体与人类CTLA-4蛋白结合的掩蔽部分,和至少一个与抗体偶联的可裂解部分,例如其中可裂解部分是充当肿瘤微环境中所富含的蛋白酶的底物的多肽。示范性可活化抗体描述于例如美国专利第8,513,390号和第8,518,404号以及美国专利申请公开第US 2014/0255313号、第US 2014/0010810号、第US 2014/0023664号中,所述文献以引用的方式并入本文中。在某些实施例中,可活化抗体包含为野生型人类IgG重链恒定区的变异体的人类IgG重链恒定区,其中与野生型人类IgG重链恒定区结合到人类Fc γ RIIIA相比,变异的人类IgG重链恒定区以更高亲和力结合到人类Fc γ RIIIA。

[0204] 在某些实施例中,一个、两个或更多个突变(例如,氨基酸取代)引入本文所述的抗体的Fc区(例如,CH2结构域(人类IgG₁的残基231-340)和/或CH3结构域(人类IgG₁的残基341-447)和/或铰链区,根据EU编号系统编号)中,以改变抗体的一种或多种功能特性,如血

清半衰期、补体固定、Fc受体结合和/或抗原依赖性细胞的细胞毒性。

[0205] 在某些实施例中,一个、两个或更多个突变(例如,氨基酸取代)引入Fc区(CH1结构域)的铰链区中,使得铰链区中的半胱氨酸残基的数目改变(例如,增加或减少),如例如美国专利第5,677,425号中所描述,所述专利以全文引用的方式并入本文中。CH1结构域的铰链区中的半胱氨酸残基的数目可以改变以例如,促进轻链和重链的组装,或改变(例如,提高或降低)抗体的稳定性。

[0206] 在一特定实施例中,一个、两个或更多个氨基酸突变(例如,取代、插入或缺失)引入IgG恒定结构域或其FcRn结合片段(优选Fc或铰链-Fc结构域片段)中以改变(例如,缩短或延长)抗体在体内的半衰期。关于改变(例如,缩短或延长)抗体在体内的半衰期的突变的实例,参见例如,国际公开第WO 02/060919号、第WO 98/23289号和第WO 97/34631号以及美国专利第5,869,046号、第6,121,022号、第6,277,375号和第6,165,745号,所述文献全部以全文引用的方式并入本文中。在一些实施例中,一个、两个或更多个氨基酸突变(例如,取代、插入或缺失)引入IgG恒定结构域或其FcRn结合片段(优选Fc或铰链-Fc结构域片段)中以缩短抗体在体内的半衰期。在其它实施例中,一个、两个或更多个氨基酸突变(例如,取代、插入或缺失)引入IgG恒定结构域或其FcRn结合片段(优选Fc铰链-Fc结构域片段)中以延长抗体在体内的半衰期。在一特定实施例中,抗体可以在第二恒定(CH2)结构域(人类IgG₁的残基231-340)和/或第三恒定(CH3)结构域(人类IgG₁的残基341-447)中具有一个或多个氨基酸突变(例如,取代),根据EU编号系统编号。在一特定实施例中,本文所述的抗体的IgG₁的恒定区在位置252包含甲硫氨酸(M)向酪氨酸(Y)取代,在位置254包含丝氨酸(S)向苏氨酸(T)取代,并且在位置256包含苏氨酸(T)向谷氨酸(E)取代,根据EU编号系统编号。参见美国专利第7,658,921号,其以全文引用的方式并入本文中。据展示,与相同抗体的野生型形式相比,这一类型的突变IgG(被称作“YTE突变体”)展现出半衰期的四倍延长(参见Dall'Acqua WF等人,(2006)《生物化学杂志》281:23514-24,其以全文引用的方式并入本文中)。在某些实施例中,抗体包含IgG恒定结构域,所述IgG恒定结构域在位置251-257、285-290、308-314、385-389和428-436包含氨基酸残基的一个、两个、三个或更多个氨基酸取代,根据EU编号系统编号。

[0207] 在一些实施例中,一个、两个或更多个突变(例如,氨基酸取代)引入本文所述的抗体的Fc区(例如,CH2结构域(人类IgG₁的残基231-340)和/或CH3结构域(人类IgG₁的残基341-447)和/或铰链区,根据EU编号系统编号)中,以提高或降低抗体对效应细胞表面上的Fc受体(例如,活化的Fc受体)的亲和力。抗体的Fc区中的提高或降低抗体对Fc受体的亲和力的突变以及将此类突变引入Fc受体或其片段中的技术是本领域的技术人员已知的。抗体的Fc受体中的可以作出以改变抗体对Fc受体的亲和力的突变的实例描述于例如,Smith P等人,(2012)PNAS 109:6181-6186,美国专利第6,737,056号,以及国际公开第WO 02/060919号、第WO 98/23289号和第WO 97/34631号,所述文献全部以全文引用的方式并入本文中。

[0208] 在另一实施例中,一个、两个或更多个氨基酸取代引入IgG恒定结构域Fc区中以改变抗体的(一种或多种)效功能。举例来说,选自氨基酸残基234、235、236、237、297、318、320和322(根据EU编号系统编号)的一个或多个氨基酸可以置换成不同氨基酸残基,使得抗体对效应配体的亲和力改变但保留亲本抗体的抗原结合能力。亲和力改变了的效应配体可

以是例如补体的Fc受体或C1组分。这种方法更详细地描述于美国专利第5,624,821号和第5,648,260号中,所述文献中的每一个以全文引用的方式并入本文中。在一些实施例中,恒定区结构域的缺失或灭活(通过点突变或其它方式)可能降低循环抗体的Fc受体结合,从而增强肿瘤定位。关于使恒定结构域缺失或灭活并且从而增强肿瘤定位的突变的描述,参见例如,美国专利第5,585,097号和第8,591,886号,所述专利中的每一个以全文引用的方式并入本文中。在某些实施例中,一个或多个氨基酸取代可以引入本文所述的抗体的Fc区中以去除Fc区上的可能会降低Fc受体结合的潜在糖基化位点(参见例如,Shields RL等人,(2001)《生物化学杂志》276:6591-604,其以全文引用的方式并入本文中)。在各种实施例中,本文所述的抗体的恒定区中的以下突变中的一个或多个可以作出:N297A取代;N297Q取代;L235A取代和L237A取代;L234A取代和L235A取代;E233P取代;L234V取代;L235A取代;C236缺失;P238A取代;D265A取代;A327Q取代;或P329A取代,根据EU编号系统编号。在某些实施例中,选自由以下组成的群组的突变可以在本文所述的抗体的恒定区中作出:D265A、P329A和其组合,根据EU编号系统编号。

[0209] 在一特定实施例中,本文所述的抗体包含具有N297Q或N297A氨基酸取代的IgG₁的恒定结构域,根据EU编号系统编号。在一个实施例中,本文所述的抗体包含具有选自由组成的群组的突变的IgG₁的恒定结构域:D265A、P329A和其组合,根据EU编号系统编号。在另一实施例中,本文所述的抗体包含具有选自由组成的群组的突变的IgG₁的恒定结构域:L234A、L235A和其组合,根据EU编号系统编号。在某些实施例中,本文所述的抗体的恒定区中的在对应于人类IgG₁重链中的位置L234、L235和D265的位置的氨基酸残基分别不是L、L和D。这种方法详细地描述于国际公开第W014/108483号中,其以全文引用的方式并入本文中。在一特定实施例中,对应于人类IgG₁重链中的位置L234、L235和D265的氨基酸分别是F、E和A;或A、A和A,根据EU编号系统编号。

[0210] 在某些实施例中,本文所述的抗体的恒定区中的选自氨基酸残基329、331和322的一个或多个氨基酸(根据EU编号系统编号)可以置换成不同氨基酸残基,使得抗体的C1q结合改变和/或补体依赖性细胞毒性(CDC)降低或消除。这种方法更详细地描述于美国专利第6,194,551号(Idusogie等人)中,其以全文引用的方式并入本文中。在一些实施例中,本文所述的抗体的CH2结构域的N末端区中的氨基酸位置231到238内的一个或更多个氨基酸残基改变,从而改变抗体固定补体的能力,根据EU编号系统编号。这种方法进一步描述于国际公开第W0 94/29351号中,其以全文引用的方式并入本文中。在某些实施例中,本文所述的抗体的Fc区通过使以下位置的一个或多个氨基酸突变(例如,引入氨基酸取代)而经修饰以增强抗体介导抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的能力和/或增强抗体对Fc γ 受体的亲和力:238、239、248、249、252、254、255、256、258、265、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、301、303、305、307、309、312、315、320、322、324、326、327、328、329、330、331、333、334、335、337、338、340、360、373、376、378、382、388、389、398、414、416、419、430、434、435、437、438或439,根据EU编号系统编号。这种方法进一步描述于国际公开第W000/42072号中,其以全文引用的方式并入本文中。

[0211] 在某些实施例中,本文所述的抗体包含IgG₄抗体的恒定区,并且重链的氨基酸残基228处的丝氨酸(根据EU编号系统编号)取代了脯氨酸。

[0212] 在某些实施例中,本文所述的恒定区突变或修饰中的任一个可以引入具有两个重

链恒定区的本文所述的抗体的一个或两个重链恒定区中。

[0213] 在某些实施例中,本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)并且充当拮抗剂的分离的抗体。

[0214] 在某些实施例中,本公开提供了一种分离的抗体,其特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4),并且相对于在无任何抗体情况下或在不相关抗体(例如,不特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的抗体)情况下的CTLA-4(例如,人类CTLA-4)活性,降低CTLA-4(例如,人类CTLA-4)活性至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%,如通过本文所述和/或本领域的技术人员已知的方法所评估。在某些实施例中,本公开提供了一种分离的抗体,其特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4),并且相对于在无任何抗体情况下或在不相关抗体(例如,不特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的抗体)情况下的CTLA-4(例如,人类CTLA-4)活性,降低CTLA-4(例如,人类CTLA-4)活性至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍,如通过本文所述和/或本领域的技术人员已知的方法所评估。CTLA-4(例如,人类CTLA-4)活性的非限制性实例可以包括CTLA-4(例如,人类CTLA-4)信号传导、CTLA-4(例如,人类CTLA-4)与CTLA-4(例如,人类CTLA-4)配体(例如,CD80或CD86)的结合、和细胞因子产生(例如,IL-2、IFN- γ 或TNF- α)的抑制。在某些实施例中,本公开提供了一种特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)并且使CTLA-4(例如,人类CTLA-4)活性灭活、降低或抑制的分离的抗体。在特定实施例中,CTLA-4(例如,人类CTLA-4)活性的降低如下文实例中所述评估。

[0215] 在特定实施例中,本公开提供了一种分离的抗体,其特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4),并且相对于在无任何抗体情况下或在不相关抗体(例如,不特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的抗体)情况下的CTLA-4(例如,人类CTLA-4)与其配体(例如,CD80或CD86)的结合,降低CTLA-4(例如,人类CTLA-4)与其配体(例如,CD80或CD86)的结合至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%,如通过本领域的技术人员已知的方法所评估。在特定实施例中,本公开提供了一种分离的抗体,其特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4),并且相对于在无任何抗体情况下或在不相关抗体(例如,不特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的抗体)情况下的CTLA-4(例如,人类CTLA-4)与其配体(例如,CD80或CD86)的结合,降低CTLA-4(例如,人类CTLA-4)与其配体(例如,CD80或CD86)的结合至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍,如通过本领域的技术人员已知的方法所评估。

[0216] 在特定实施例中,本公开提供了一种分离的抗体,其特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4),并且相对于在无任何抗体情况下或在不相关抗体(例如,不特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的抗体)情况下的细胞因子产生,增加细胞因子产生(例如,IL-2、IFN- γ 或TNF- α)至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%,如通过本文所述(参见下文实例)或本领域的技术人员已知的方法所评估。在特定实施例中,本公开提供了一种分离的抗

体,其特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4),并且相对于在无任何抗体情况下或在不相关抗体(例如,不特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的抗体)情况下的细胞因子产生,增加细胞因子产生(例如,IL-2、IFN- γ 或TNF- α)至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍,如通过本文所述(参见下文实例)或本领域的技术人员已知的方法所评估。

[0217] 在某些实施例中,相对于在无任何抗体情况下或在不相关抗体(例如,不特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的抗体)情况下的仅经SEA刺激的PBMC,在特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的本文所述的抗体存在下经葡萄球菌肠毒素A(SEA)刺激的人类外周血单核细胞(PBMC)增加IL-2产生至少约1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍、10倍、15倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍,如通过本文所述(参见下文实例)或本领域的技术人员已知的方法所评估。

[0218] 1.3药物组合物

[0219] 本文提供了组合物,其在生理学上可接受的载剂、赋形剂或稳定剂中包含具有所需纯度的本文所述的抗CTLA-4抗体(《雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》(1990)马克出版公司(Mack Publishing Co.),宾夕法尼亚州伊斯顿(Easton, PA))。可接受的载剂、赋形剂或稳定剂在所用剂量和浓度下对接受者无毒性,并且包括缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苯甲基氯化铵;氯化六羟季铵;苯扎氯铵(benzalkonium chloride)、苯索氯铵(benzethonium chloride);苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷酯,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、双糖和其它碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖,如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐相对离子,如钠;金属复合物(例如,Zn-蛋白质复合物);和/或非离子表面活性剂,如TWEENTM、PLURONICSTM或聚乙二醇(PEG)。

[0220] 在一特定实施例中,药物组合物在药学上可接受的载剂中包含本文所述的抗CTLA-4抗体、和任选地一种或多种额外预防剂或治疗剂。在一特定实施例中,药物组合物在药学上可接受的载剂中包含有效量的本文所述的抗体或其抗原结合片段、和任选地一种或多种额外预防剂或治疗剂。在一些实施例中,抗体是药物组合物中所包括的唯一活性成分。本文所述的药物组合物可用于抑制CTLA-4活性和治疗病况,如癌症或感染性疾病。

[0221] 在一个方面,本文提供了一种药物组合物,其包含本发明的抗CTLA-4抗体和药学上可接受的载剂或赋形剂,其用作药剂。

[0222] 在一个方面,本文提供了一种药物组合物,其包含本发明的抗CTLA-4抗体和药学上可接受的载剂或赋形剂,其用于治疗癌症的方法中。

[0223] 用于肠胃外制剂中的药学上可接受的载剂包括水性媒剂、非水性媒剂、抗微生物剂、等渗剂、缓冲剂、抗氧化剂、局部麻醉剂、悬浮剂和分散剂、乳化剂、螯合或螯合剂(sequestering or chelating agent)和其它药学上可接受的物质。水性媒剂的实例包括

氯化钠注射剂、林格氏注射剂(Ringers Injection)、等渗右旋糖注射剂、无菌注射用水、右旋糖和乳酸化的林格氏注射剂。非水性肠胃外媒剂包括植物来源的不挥发性油、棉籽油、玉米油、芝麻油和花生油。可以向封装于多剂量容器中的肠胃外制剂中添加抑制细菌或抑制真菌浓度的抗微生物剂,所述多剂量容器包括苯酚或甲酚、汞剂、苯甲醇、氯丁醇、甲基和丙基对羟基苯甲酸酯、硫柳汞、苯扎氯铵和苄索氯铵。等渗剂包括氯化钠和右旋糖。缓冲剂包括磷酸盐和柠檬酸盐。抗氧化剂包括硫酸氢钠。局部麻醉剂包括盐酸普鲁卡因(procaine hydrochloride)。悬浮剂和分散剂包括羧甲基纤维素钠、羟丙基甲基纤维素和聚乙烯吡咯烷酮。乳化剂包括聚山梨醇酯80(TWEEN® 80)。金属离子的螯合剂包括EDTA。药物载剂还包括用于水可混溶的媒剂的乙醇、聚乙二醇和丙二醇;和用于pH调整的氢氧化钠、盐酸、柠檬酸或乳酸。

[0224] 药物组合物可以被配制成用于向受试者的任何施用途径。施用途径的特定实例包括鼻内、口服、经肺、经皮、皮内和肠胃外。本文还涵盖肠胃外施用,其特征在于皮下、肌肉内或静脉内注射。可注射剂可以按常规形式制备,呈液体溶液或悬浮液形式、适合于在注射之前在液体中形成溶液或悬浮液的固体形式,或呈乳液形式。可注射剂、溶液和乳液还含有一种或多种赋形剂。合适的赋形剂是例如水、盐水、右旋糖、甘油或乙醇。另外,必要时,待施用的药物组合物还可以含有少量的无毒辅助物质,如润湿剂或乳化剂、pH缓冲剂、稳定剂、溶解度增强剂和其它此类试剂,如乙酸钠、脱水山梨糖醇单月桂酸酯、三乙醇胺油酸酯和环糊精。

[0225] 用于肠胃外施用抗体的制剂包括可以立即用于注射的无菌溶液;准备在临用前与溶剂组合的无菌干燥可溶性产品,如冻干粉末,包括皮下注射片剂;可以立即用于注射的无菌悬浮液;准备在临用前与媒剂组合的无菌干燥不溶性产品;以及无菌乳液。溶液可以是水性或非水性的。

[0226] 如果静脉内施用,那么合适的载剂包括生理盐水或磷酸盐缓冲盐水(phosphate buffered saline, PBS),以及含有增稠剂和增溶剂(如葡萄糖、聚乙二醇和聚丙二醇)的溶液,以及其混合物。

[0227] 如关于局部和全身施用所述制备包含抗体的局部混合物。所得混合物可以是溶液、悬浮液、乳液等并且可以被配制成乳膏、凝胶、软膏、乳液、溶液、酏剂、洗剂、悬浮液、酏剂、糊剂、泡沫剂、气雾剂、冲洗剂、喷雾剂、栓剂、绷带、皮肤贴片或任何其它适合局部施用的配制物。

[0228] 本文所述的抗CTLA-4抗体可以被配制用于局部施用的气雾剂,如通过吸入(参见例如,美国专利第4,044,126号、第4,414,209号和第4,364,923号,其描述了用于递送可用于治疗炎性疾病、尤其哮喘的类固醇的气雾剂并且以全文引用的方式并入本文中)。用于向呼吸道施用的这些配制物可以呈用于喷雾器的气雾剂或溶液的形式,或呈用于吹入的微细粉末形式,单独的或与如乳糖的惰性载剂组合。在这种情况下,配制物的颗粒在一个实施例中将具有小于50微米,在一个实施例中小于10微米的直径。

[0229] 本文所述的抗CTLA-4抗体可以被配制成用于局部(local)或局部(topical)施用,如局部施用于皮肤和粘膜,如在眼睛中,呈凝胶、乳膏和洗剂的形式,并且被配制成用于施用于眼睛或用于脑池内或脊柱内施用。预期局部施用用于经皮递送以及用于施用于眼睛或粘膜,或用于吸入疗法。还可以施用单独的或与其它药学上可接受的赋形剂组合的抗体的

鼻用溶液。

[0230] 经皮贴片,包括离子导入和电泳装置,是本领域技术人员熟知的,并且可以用于施用抗体。举例来说,此类贴片公开于美国专利第6,267,983号、第6,261,595号、第6,256,533号、第6,167,301号、第6,024,975号、第6,010715号、第5,985,317号、第5,983,134号、第5,948,433号和第5,860,957号中,所述专利全部以全文引用的方式并入本文中。

[0231] 在某些实施例中,包含本文所述的抗体或其抗原结合片段的药物组合物是冻干粉末,其可以经复原用于以溶液、乳液和其它混合物形式施用。它也可以经复原并被配制成固体或凝胶。冻干粉末通过将本文所述的抗体或其抗原结合片段或其药学上可接受的衍生物溶解于合适溶剂中而制备。在一些实施例中,冻干粉末是无菌的。溶剂可以含有能够改进粉末或由粉末制备的复原溶液的稳定性或其它药理学组分的赋形剂。可以使用的赋形剂包括(但不限于)右旋糖、山梨糖醇、果糖、玉米糖浆、木糖醇、甘油、葡萄糖、蔗糖或其它合适的试剂。溶剂还可以含有缓冲剂,如柠檬酸盐、磷酸钠或磷酸钾、或本领域技术人员已知的其它此类缓冲剂,在一个实施例中,缓冲剂约呈中性pH。随后无菌过滤溶液,随后在本领域的技术人员已知的标准条件下冻干,得到所需配制物。在一个实施例中,将所得溶液分配到小瓶中进行冻干。每个小瓶将含有单次剂量或多次剂量的化合物。可以将冻干粉末储存在适当的条件下,如在约4°C到室温下。用注射用水复原这种冻干粉末,得到用于肠胃外施用的配制物。在复原中,将冻干粉末添加到无菌水或其它合适的载剂中。精确的量取决于所选化合物。这个量可以凭经验确定。

[0232] 本文所述的抗CTLA-4抗体和本文所提供的其它组合物还可以被配制以靶向待治疗的受试者的身体的特定组织、受体或其它区域。许多此类靶向方法是本领域的技术人员熟知的。本文考虑所有此类靶向方法用于本发明组合物。关于靶向方法的非限制性实例,参见例如,美国专利第6,316,652号、第6,274,552号、第6,271,359号、第6,253,872号、第6,139,865号、第6,131,570号、第6,120,751号、第6,071,495号、第6,060,082号、第6,048,736号、第6,039,975号、第6,004,534号、第5,985,307号、第5,972,366号、第5,900,252号、第5,840,674号、第5,759,542号和第5,709,874号,所述专利全部以全文引用的方式并入本文中。在一特定实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段靶向肿瘤。

[0233] 待用于体内施用的组合物可以是无菌的。这易于通过例如通过无菌过滤膜过滤来实现。

[0234] 1.4 使用方法和用途

[0235] 在另一方面,本公开提供了一种使用本文所述的抗CTLA-4抗体治疗受试者的方法。受试者的将受益于CTLA-4功能抑制的任何疾病或病症都可以使用本文所述的抗CTLA-4抗体来治疗。本文所述的抗CTLA-4抗体尤其可用于抑制免疫系统对肿瘤的耐受性,并且因此可以用作用于患有癌症的受试者的免疫疗法。举例来说,在某些实施例中,本公开提供了一种增加受试者的响应于抗原的T细胞活化的方法,所述方法包含向受试者施用有效量的如本文所描述的抗CTLA-4抗体或其药物组合物。在某些实施例中,本公开提供了一种治疗受试者的癌症的方法,所述方法包含向受试者施用有效量的如本文所描述的抗体或药物组合物。

[0236] 可以用本文所述的抗体、治疗组合或药物组合物治疗的癌症包括(但不限于)实体癌(例如,复发性或难治愈实体癌和晚期或转移性实体癌)、癌瘤、肉瘤、黑色素瘤(例如,III

期或IV期黑色素瘤)、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、泌尿道上皮癌、卵巢癌、前列腺癌(例如,转移性激素难治愈前列腺癌和进展性转移性前列腺癌)、胰腺癌、乳癌例如,HER2⁺乳癌(例如,复发性/难治愈HER2⁺乳癌))、头颈癌(例如,复发性/难治愈头颈部鳞状细胞癌(HNSCC))、神经胶质瘤、恶性神经胶质瘤、多形性成胶质细胞瘤、脑转移、默克癌症(merkel cancer)、胃癌、胃食管癌、肾细胞癌、葡萄膜黑色素瘤、结肠癌、宫颈癌、淋巴瘤(例如,复发性或难治愈淋巴瘤)、非霍奇金氏淋巴瘤(non-Hodgkin's lymphoma)、霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's lymphoma)、白血病和多发性骨髓瘤。在某些实施例中,通过肿瘤内施用本文所述的抗体、治疗组合或药物组合物来治疗癌症。可以通过肿瘤内施用本文所述的抗体、治疗组合或药物组合物治疗的癌症包括(但不限于)实体肿瘤(例如,晚期或转移性实体肿瘤)、头颈癌(例如,复发性/难治愈头颈部鳞状细胞癌(HNSCC))和乳癌(例如,HER2⁺乳癌(例如,复发性/难治愈HER2⁺乳癌))。

[0237] 在某些实施例中,根据本文所述的方法治疗的癌症是实体肿瘤。在某些实施例中,根据本文所述的方法治疗的癌症是转移性或局部晚期癌症(例如,转移性或局部晚期实体肿瘤)。在某些实施例中,在转移性或局部晚期肿瘤的诊断之后(例如,在诊断之后1、2、3、4、5或6天;1、2、3、4、6、8或12周;或1、2、3、4、6、8或12个月内),根据本文所述的方法作为第一癌症疗法治疗癌症。在某些实施例中,在尽管先前用不同的癌症疗法治疗肿瘤但仍发生的肿瘤进展的诊断之后(例如,在肿瘤进展的诊断之后1、2、3、4、5或6天;1、2、3、4、6、8或12周;或1、2、3、4、6、8或12个月内),根据本文所述的方法作为第一癌症疗法治疗癌症,任选地其中本文所述的方法作为所施用的第二癌症疗法提供。在某些实施例中,在不同癌症疗法的毒性的诊断之后(例如,在不同癌症疗法的毒性的诊断之后1、2、3、4、5或6天;1、2、3、4、6、8或12周;或1、2、3、4、6、8或12个月内),根据本文所述的方法作为第一癌症疗法治疗癌症,任选地其中本文所述的方法作为所施用的第二癌症疗法提供。在某些实施例中,根据本文所述的方法治疗的癌症是没有标准疗法可用于的转移性或局部晚期癌症(例如,实体肿瘤)。在其它实施例中,根据本文所述的方法治疗的癌症是标准疗法失败了(即,在标准疗法之后,癌症有进展)的转移性或局部晚期癌症(例如,实体肿瘤)。在某些实施例中,如果癌症是疗法所难治愈的,那么所述疗法失败。在某些实施例中,如果癌症在完全或部分响应于疗法之后复发,那么所述疗法失败。在某些实施例中,转移性或局部晚期癌症(例如,实体肿瘤)已经从组织学上或细胞学上来确诊。

[0238] 在某些实施例中,癌症是实体肿瘤。在某些实施例中,癌症(例如,实体肿瘤)表达PD-L1。在某些实施例中,癌症(例如,实体肿瘤)样品中展现可检测的PD-L1表达(例如,部分或完全表达)的肿瘤细胞的百分比是至少1%(例如,至少2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%或90%)。在某些实施例中,癌症(例如,实体肿瘤)样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少1%(例如,至少2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%或90%)。在某些实施例中,癌症(例如,实体肿瘤)样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少1%。在某些实施例中,癌症(例如,实体肿瘤)样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少5%。在某些实施例中,癌症(例如,实体肿瘤)样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少25%。在某

些实施例中,癌症(例如,实体肿瘤)样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少50%。

[0239] 在某些实施例中,转移性或局部晚期癌症(例如,实体肿瘤)表达PD-L1。在某些实施例中,转移性或局部晚期癌症(例如,实体肿瘤)样品中展现可检测的PD-L1表达(例如,部分或完全表达)的肿瘤细胞的百分比是至少1%(例如,至少2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%或90%)。在某些实施例中,转移性或局部晚期癌症(例如,实体肿瘤)样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少1%(例如,至少2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%或90%)。在某些实施例中,转移性或局部晚期癌症(例如,实体肿瘤)样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少1%。在某些实施例中,转移性或局部晚期癌症(例如,实体肿瘤)样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少5%。在某些实施例中,转移性或局部晚期癌症(例如,实体肿瘤)样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少25%。在某些实施例中,转移性或局部晚期癌症(例如,实体肿瘤)样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少50%。

[0240] 在需要样品中某一百分比的细胞展现可检测的PD-L1表达(例如,膜表达,部分或完全膜表达)的本文所述方法中的每一种中,PD-L1的表达可以通过本领域中熟知的任何方法检测,所述方法包括(但不限于)免疫组织化学。用于测量肿瘤细胞中的PD-L1表达的示范性免疫组织化学分析法提供于Hirsch等人(2017,《胸部肿瘤学杂志(J.Thoracic Oncol.)》12(2):208-222)、Rimm等人(2017,《美国医学会杂志:肿瘤学(JAMA Oncol.)》3(8):1051-1058)以及Diggs和Hsueh(2017,《生物标志物研究(Biomarker Res.)》5:12)中,所述文献以全文引用的方式并入本文中。

[0241] 在某些实施例中,根据本文所述的方法治疗的癌症是转移性或局部晚期非小细胞肺癌(NSCLC)。在某些实施例中,根据本文所述的方法治疗的癌症是转移性非小细胞肺癌(NSCLC)。在某些实施例中,根据本文所述的方法治疗的癌症是IV期转移性或局部晚期NSCLC。在某些实施例中,根据本文所述的方法治疗的癌症是IV期转移性NSCLC。在某些实施例中,转移性或局部晚期NSCLC样品中展现可检测的PD-L1表达(例如,部分或完全表达)的肿瘤细胞的百分比是至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%或90%。在某些实施例中,转移性或局部晚期NSCLC样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%或90%。在某些实施例中,转移性或局部晚期NSCLC样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少1%。在某些实施例中,转移性或局部晚期NSCLC样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少5%。在某些实施例中,转移性或局部晚期NSCLC样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少25%。在某些实施例中,转移性或局部晚期NSCLC样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少50%。在某些实施例中,转移性或局部晚期NSCLC没有EGFR或ALK基因组肿瘤畸变。

在某些实施例中,转移性或局部晚期NSCLC没有EGFR敏化突变(例如,适合用酪氨酸激酶抑制剂治疗的突变,酪氨酸激酶抑制剂包括埃罗替尼、吉非替尼或阿法替尼)或ALK易位。在某些实施例中,患有转移性或局部晚期NSCLC的受试者先前不曾接受过针对转移性或局部晚期NSCLC的全身性化疗治疗。在某些实施例中,在转移性或局部晚期NSCLC的诊断之后(例如,在诊断之后1、2、3、4、5或6天;1、2、3、4、6、8或12周;或1、2、3、4、6、8或12个月内),根据本文所述的方法作为第一癌症疗法治疗转移性或局部晚期NSCLC。在某些实施例中,所述方法包含使用本文所述的抗CTLA-4抗体(例如,AGEN1884.H3(IgG₁S239D/A330L/I332E))或包含此类抗CTLA-4抗体的药物组合物治疗患有NSCLC(例如,IV期转移性或局部晚期NSCLC)的受试者,其中NSCLC样品中展现可检测的PD-L1膜表达(例如,部分或完全膜表达)的肿瘤细胞的百分比是至少1%、2%、3%、4%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、60%、70%、80%或90%,并且其中在宫颈癌的诊断之后(例如,在诊断之后1、2、3、4、5或6天;1、2、3、4、6、8或12周;或1、2、3、4、6、8或12个月内),提供所述方法作为第一癌症疗法。

[0242] 在某些实施例中,根据本文所述的方法治疗的癌症是宫颈癌。在某些实施例中,根据本文所述的方法治疗的癌症是转移性或局部晚期的不可切除性鳞状细胞癌、腺鳞癌或宫颈腺癌。在某些实施例中,根据本文所述的方法治疗的癌症是不可切除性或转移性宫颈癌。在某些实施例中,宫颈癌在标准疗法之后有进展(例如,已在标准疗法之后复发,或是标准疗法难治愈的)。在某些实施例中,标准疗法包含含铂化疗。在某些实施例中,含铂化疗选自由以下组成的群组:顺铂(cisplatin)、卡铂(carboplatin)、奥沙利铂(oxaliplatin)、奈达铂(nedaplatin)、沙铂(satraplatin)、吡铂(picoplatin)、三铂(triplatin)、菲铂(phenanthriplatin)、异丙铂(iproplatin)、洛铂(lobaplatin)、庚铂(heptaplatin)、利泊铂(lipoplatin)以及其组合。在某些实施例中,标准疗法进一步包含第二化疗。在某些实施例中,第二化疗选自由以下组成的群组:核苷酸类似物(例如,吉西他滨)、叶酸抗代谢物(例如,培美曲塞(pemetrexed))和紫杉烷(taxane)(例如,太平洋紫杉醇(paclitaxel))。在某些实施例中,标准疗法是本领域中已知的任何基于铂的双重化疗(PT-DC)(也被称为含铂双重疗法)。在某些实施例中,PT-DC包含顺铂和吉西他滨、顺铂和培美曲塞、顺铂和太平洋紫杉醇、卡铂和太平洋紫杉醇、或顺铂和拓扑替康(topotecan)。标准疗法(例如,包含PT-DC的标准疗法)可以任选地进一步包含一种或多种额外疗法,如贝伐单抗(bevacizumab)。在某些实施例中,标准疗法包含太平洋紫杉醇和拓扑替康。在某些实施例中,宫颈癌是HPV阳性。在某些实施例中,宫颈癌与微卫星不稳定性相关。在某些实施例中,根据本文所述的方法治疗的癌症是在为了治疗晚期(复发性、不可切除性或转移性)疾病而施用的含铂双重疗法之后复发的转移性或局部晚期的不可切除性鳞状细胞癌、腺鳞癌或宫颈腺癌。在某些实施例中,在宫颈癌的诊断之后(例如,在诊断之后1、2、3、4、5或6天;1、2、3、4、6、8或12周;或1、2、3、4、6、8或12个月内),根据本文所述的方法作为第一癌症疗法治疗宫颈癌。在某些实施例中,在尽管先前用不同的癌症疗法治疗宫颈癌但仍发生的肿瘤进展的诊断之后(例如,在肿瘤进展的诊断之后1、2、3、4、5或6天;1、2、3、4、6、8或12周;或1、2、3、4、6、8或12个月内),根据本文所述的方法作为第一癌症疗法治疗宫颈癌,任选地其中本文所述的方法作为所施用的第二癌症疗法提供。在某些实施例中,在不同癌症疗法的毒性的诊断之后(例如,在不同癌症疗法的毒性的诊断之后1、2、3、4、5或6天;1、2、3、4、6、8或12周;或1、2、3、4、6、8或12个

月内),根据本文所述的方法作为第一癌症疗法治疗宫颈癌,任选地其中本文所述的方法作为所施用的第二癌症疗法提供。在某些实施例中,所述方法包含使用本文所述的抗CTLA-4抗体(例如,AGEN1884.H3(IgG₁S239D/A330L/I332E))或包含此类抗CTLA-4抗体的药物组合物治疗患有宫颈癌(例如,转移性或局部晚期的不可切除性鳞状细胞癌、腺鳞癌或宫颈腺癌)的受试者,其中在宫颈癌的诊断之后(例如,在诊断之后1、2、3、4、5或6天;1、2、3、4、6、8或12周;或1、2、3、4、6、8或12个月内),提供所述方法作为第一癌症疗法。在某些实施例中,所述方法包含使用本文所述的抗CTLA-4抗体(例如,AGEN1884.H3(IgG₁S239D/A330L/I332E))或包含此类抗CTLA-4抗体的药物组合物治疗患有宫颈癌(例如,转移性或局部晚期的不可切除性鳞状细胞癌、腺鳞癌或宫颈腺癌)的受试者,其中在尽管先前用不同的癌症疗法治疗宫颈癌但仍发生的肿瘤进展的诊断之后(例如,在肿瘤进展的诊断之后1、2、3、4、5或6天;1、2、3、4、6、8或12周;或1、2、3、4、6、8或12个月内)提供所述方法,或在不同癌症疗法的毒性的诊断之后(例如,在不同癌症疗法的毒性的诊断之后1、2、3、4、5或6天;1、2、3、4、6、8或12周;或1、2、3、4、6、8或12个月内)提供所述方法,并且其中本文所述的方法作为所施用的第二癌症疗法提供。

[0243] 在某些实施例中,根据本文所述的方法治疗的癌症是皮肤鳞状细胞癌(cSCC)。在某些实施例中,根据本文所述的方法治疗的癌症是IV期皮肤鳞状细胞癌(cSCC)。在某些实施例中,cSCC(例如,IV期cSCC)不能用放疗治愈。在某些实施例中,IV期cSCC根据第八版美国癌症联合委员会分期手册(AJCC-8)从组织学上或细胞学上来诊断。在某些实施例中,在cSCC(例如,IV期cSCC)的诊断之后(例如,在诊断之后1、2、3、4、5或6天;1、2、3、4、6、8或12周;或1、2、3、4、6、8或12个月之内),根据本文所述的方法作为第一癌症疗法治疗cSCC(例如,IV期cSCC)。在某些实施例中,在尽管先前用不同的癌症疗法治疗cSCC(例如,IV期cSCC)但仍发生的肿瘤进展的诊断之后(例如,在肿瘤进展的诊断之后1、2、3、4、5或6天;1、2、3、4、6、8或12周;或1、2、3、4、6、8或12个月之内),根据本文所述的方法作为第一癌症疗法治疗cSCC(例如,IV期cSCC),任选地其中本文所述的方法作为所施用的第二癌症疗法提供。在某些实施例中,在不同的癌症疗法的毒性的诊断之后(例如,在不同的癌症疗法的毒性的诊断之后1、2、3、4、5或6天;1、2、3、4、6、8或12周;或1、2、3、4、6、8或12个月之内),根据本文所述的方法作为第一癌症疗法治疗cSCC(例如,IV期cSCC),任选地其中本文所述的方法作为所施用的第二癌症疗法提供。

[0244] 在某些实施例中,根据本文所述的方法治疗的癌症是B细胞淋巴瘤(例如,B细胞慢性淋巴细胞性白血病、B细胞非霍奇金淋巴瘤、皮肤B细胞淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤)、基底细胞癌、膀胱癌、胚细胞瘤、脑转移、乳癌、伯基特淋巴瘤(Burkitt lymphoma)、癌瘤(例如,(例如,胃食管结合部)腺癌)、宫颈癌、结肠癌、结肠直肠癌(结肠癌和直肠癌)、子宫内膜癌、食道癌、尤文氏肉瘤(Ewing sarcoma)、滤泡性淋巴瘤、胃癌、胃食管结合部癌瘤、胃肠癌、成胶质细胞瘤(例如,多形性成胶质细胞瘤,例如新诊断或复发性)、神经胶质瘤、头颈癌(例如,头颈部鳞状细胞癌)、肝转移、霍奇金氏和非霍奇金氏淋巴瘤、肾癌(例如,肾细胞癌和威尔姆斯氏肿瘤(Wilms' tumor))、喉癌、白血病(例如,慢性粒细胞性白血病、毛细胞白血病)、肝癌(例如,肝癌瘤和肝肿瘤)、肺癌(例如,非小细胞肺癌和小细胞肺癌)、成淋巴细胞淋巴瘤、淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、转移性脑肿瘤、转移性癌症、骨髓瘤(例如,多发性骨髓瘤)、成神经细胞瘤、眼部黑色素瘤、口咽癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰脏癌(例如,胰脏炎导管腺癌)、前

列腺癌(例如,激素难治愈(例如,去势抗性)、转移性、转移性激素难治愈(例如,去势抗性、雄激素非依赖性))、肾细胞癌(例如,转移性)、唾液腺癌、肉瘤(例如,横纹肌肉瘤)、皮肤癌(例如,黑色素瘤(例如,转移性黑色素瘤))、软组织肉瘤、实体肿瘤、鳞状细胞癌、滑液肉瘤、睾丸癌、甲状腺癌、移行细胞癌(尿道上皮细胞癌)、葡萄膜黑色素瘤(例如,转移性)、疣状癌、外阴癌和瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(Waldenstrom macroglobulinemia)。

[0245] 在某些实施例中,根据本文所述的方法治疗的癌症是人类肉瘤或癌瘤,例如,纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肉瘤、软骨肉瘤、成骨性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏肿瘤、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰脏癌、乳癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓质癌、支气管癌、肾细胞癌(例如,转移性)、肝肿瘤、胆管癌、绒膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、维尔姆斯瘤(Wilms' tumor)、宫颈癌、睾丸肿瘤、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、多形性成胶质细胞瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突神经胶质瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、成神经细胞瘤或成视网膜细胞瘤。

[0246] 在某些实施例中,根据本文所述的方法治疗的癌症是血管肉瘤。

[0247] 在某些实施例中,根据本文所述的方法治疗的癌症是急性淋巴细胞性白血病或急性骨髓细胞性白血病(例如,成骨髓细胞性、前髓细胞性、骨髓单核细胞性、单核细胞性和红白血病);慢性白血病(慢性骨髓细胞性(粒细胞)白血病或慢性淋巴细胞性白血病);霍奇金氏病;非霍奇金氏病;急性骨髓性白血病;B细胞淋巴瘤;T细胞淋巴瘤;退行性大细胞淋巴瘤;眼内淋巴瘤;滤泡性淋巴瘤;小肠淋巴瘤;或脾边缘区淋巴瘤。

[0248] 在某些实施例中,根据本文所述的方法治疗的癌症是多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦氏巨球蛋白血症、重链病、胃肠道间质瘤、头和/或颈癌(例如,舌的鳞状细胞癌、喉的鳞状细胞癌、口咽的细胞癌或喉的疣状癌)、子宫内膜基质肉瘤、肥大细胞肉瘤、成人软组织肉瘤、子宫肉瘤、梅克尔细胞癌(merkel cell carcinoma)、尿道上皮癌、黑色素瘤与脑转移、葡萄膜黑色素瘤、葡萄膜黑色素瘤与肝转移、非小细胞肺癌、直肠癌或骨髓发育不良综合征。在一些实施例中,根据所述方法治疗的癌症是转移性的。

[0249] 在某些实施例中,根据本文所述的方法治疗的癌症是前列腺癌、乳癌、肺癌、结肠直肠癌、黑色素瘤、支气管癌、膀胱癌、脑或中枢神经系统癌、外周神经系统癌、子宫或子宫内膜癌、口腔癌或咽癌、非霍奇金氏淋巴瘤、甲状腺癌、肾癌、胆道癌、小肠或阑尾癌、唾液腺癌、甲状腺癌、肾上腺癌、鳞状细胞癌、间皮瘤、骨癌、胸腺癌(thyoma/thymic carcinoma)、成胶质细胞瘤、骨髓发育不良综合征、软组织肉瘤、DIPG、腺癌、骨肉瘤、软骨肉瘤、白血病或胰脏癌。在一些实施例中,根据本文所述的方法治疗的癌症包括癌瘤(例如,腺癌)、淋巴瘤、胚细胞瘤、黑色素瘤、肉瘤或白血病。

[0250] 在某些实施例中,根据本文所述的方法治疗的癌症是鳞状细胞癌、小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胃癌、霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、胰脏癌、成胶质细胞瘤、神经胶质瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌(例如,肝癌和肝肿瘤)、膀胱癌、乳癌、炎性乳癌、梅克尔细胞癌、结肠癌、结肠直肠癌、胃癌、膀胱癌、子宫内膜癌、骨髓瘤(例如,多发性骨髓瘤)、唾液腺癌、肾癌(例如,肾细胞癌和威尔姆斯氏肿瘤)、基底细胞癌、黑色素瘤、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、睾丸癌、食道癌、浆液性腺癌或各种类型的头颈癌。在某些实施例中,根据本文所述

的方法治疗的癌症包括促结缔组织增生性黑色素瘤、炎性乳癌、胸腺瘤、直肠癌、肛门癌或手术可治疗或非手术可治疗的脑干神经胶质瘤。在一特定实施例中，癌症是实体肿瘤。在另一特定实施例中，癌症是多形性成胶质细胞瘤。在一些实施例中，多形性成胶质细胞瘤是复发性的。在一些实施例中，多形性成胶质细胞瘤是新诊断的。在一些实施例中，多形性成胶质细胞瘤是在具有非甲基化MGMT启动子的受试者中。在一些实施例中，多形性成胶质细胞瘤是贝伐单抗疗法难治愈的。在一些实施例中，多形性成胶质细胞瘤在尚未接受贝伐单抗疗法的受试者中。

[0251] 在某些实施例中，根据本文所述的方法治疗的癌症是转移性黑素瘤（例如，抗性转移性黑素瘤）、转移性卵巢癌或转移性肾细胞癌。在某些实施例中，根据本文所述的方法治疗的癌症是对伊匹单抗（Ipilimumab）具有抗性的黑色素瘤。在一些实施例中，根据本文所述的方法治疗的癌症是对纳武单抗或派姆单抗具有抗性的黑色素瘤。在一些实施例中，根据本文所述的方法治疗的癌症是对伊匹单抗和纳武单抗或派姆单抗具有抗性的黑色素瘤。

[0252] 在某些实施例中，根据本文所述的方法治疗的癌症是乳癌（例如，赫赛汀（herceptin）抗性乳癌和曲妥珠单抗-DM1（T-DM1）抗性乳癌）、前列腺癌、多形性成胶质细胞瘤、结肠直肠癌、肉瘤、膀胱癌、宫颈癌、HPV相关癌症、阴道癌、外阴癌、阴茎癌、肛门癌、直肠癌、口咽癌、多发性骨髓瘤、肾细胞癌、卵巢癌、肝细胞癌、子宫内膜癌、胰脏癌、淋巴瘤和白血病（例如，老年白血病、急性骨髓性白血病（AML）和老年AML）。

[0253] 在某些实施例中，根据本文所述的方法治疗的癌症是转移性恶性黑色素瘤（例如，皮肤或眼内恶性黑色素瘤）、肾癌（例如，透明细胞癌）、前列腺癌（例如，激素难治愈前列腺癌）、乳癌、结肠癌、肺癌（例如，非小细胞肺癌）、骨癌、胰脏癌、皮肤癌、头或颈癌、子宫癌、卵巢癌、直肠癌、肛区癌、胃癌、睾丸癌、子宫癌、输卵管癌、子宫内膜癌、宫颈癌、阴道癌、外阴癌、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、慢性或急性白血病（包括急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、急性成淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病）、儿童实体肿瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾癌或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统（CNS）赘瘤、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊髓轴肿瘤、脑干神经胶质瘤、神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤（Kaposi's sarcoma）、表皮样癌、鳞状细胞癌、T细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症（包括石棉诱发的癌症）、食道癌、肝癌、难治愈或复发性恶性病、转移性癌症、表达PD-L1的癌症和所述癌症的组合。

[0254] 在某些实施例中，受试者先前已接受免疫疗法。在某些实施例中，受试者先前不曾接受过任何免疫疗法。在某些实施例中，癌症是晚期或转移性癌症。

[0255] 在某些实施例中，本公开提供了一种预防或治疗受试者的感染性疾病的方法，所述方法包含向受试者施用有效量的如本文所描述的抗CTLA-4抗体或其药物组合物。在一个实施例中，本文提供了预防和/或治疗感染（例如，病毒感染、细菌感染、真菌感染、原虫感染或寄生虫感染）的方法。根据所述方法预防和/或治疗的感染可以由本文中所鉴别的感染媒介引起。在一特定实施例中，本文所述的抗CTLA-4抗体或其组合物是向受试者施用的唯一活性剂。在一些实施例中，本文所述的抗CTLA-4抗体或其组合物与抗感染干预（例如，抗病毒剂、抗生素、抗真菌剂或抗蠕虫剂）组合使用用于治疗感染性疾病。

[0256] 可以通过本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物治疗和/或预防的感染性疾病由包括（但不限于）以下的感染媒介引起：细菌、寄生虫、真菌、原生动物和病毒。在一特定实施

例中,通过本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物治疗和/或预防的感染性疾病由病毒引起。可以根据本文所述的方法预防和/或治疗的病毒性疾病或病毒感染包括(但不限于)由以下引起的病毒性疾病或病毒感染:甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、流感(例如,甲型流感或乙型流感)、水痘、腺病毒、单纯疱疹I型(HSV-I)、单纯疱疹II型(HSV-II)、牛痘、鼻病毒、埃可病毒(echovirus)、轮状病毒、呼吸道合胞病毒、乳头状瘤病毒、乳多空病毒、巨细胞病毒、棘状病毒、虫媒病毒、汉坦病毒(hantavirus)、柯萨奇病毒(coxsackie virus)、腮腺炎病毒、麻疹病毒、风疹病毒、脊髓灰质炎病毒、天花、埃-巴二氏病毒(Epstein Barr virus)、人类免疫缺陷病毒I型(HIV-I)、人类免疫缺陷病毒II型(HIV-II)以及如病毒性脑膜炎、脑炎、登革热(dengue)或天花的病毒性疾病的媒介。

[0257] 可以预防和/或治疗的细菌感染包括由以下引起的感染:大肠杆菌(*Escherichia coli*)、肺炎克雷伯菌(*Klebsiella pneumoniae*)、金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、粪肠球菌(*Enterococcus faecalis*)、普通变形杆菌(*Proteus vulgaris*)、草绿色葡萄球菌(*Staphylococcus viridans*)以及铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)。可以根据本文所述的方法预防和/或治疗的由细菌(例如,大肠杆菌、肺炎克雷伯菌、金黄色葡萄球菌、粪肠球菌、普通变形杆菌、草绿色葡萄球菌以及铜绿假单胞菌)引起的细菌性疾病包括(但不限于)分枝杆菌立克次氏体(*Mycobacteria rickettsia*)、支原体(*Mycoplasma*)、奈瑟菌(*Neisseria*)、肺炎链球菌(*S. pneumonia*)、伯氏疏螺旋体(*Borrelia burgdorferi*) (莱姆病(Lyme disease))、炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*) (炭疽)、破伤风、链球菌、葡萄球菌、分枝杆菌、百日咳、霍乱、瘟疫、白喉、衣原体、金黄色葡萄球菌以及军团杆菌(*legionella*)。

[0258] 可以根据本文所述的方法预防和/或治疗的由原生动物引起的原生动物疾病或原生动物感染包括(但不限于)利什曼原虫(*Leishmania*)、球虫病、锥虫血吸虫或疟疾。可以根据本文所述的方法预防和/或治疗的由寄生虫引起的寄生虫病或寄生虫感染包括(但不限于)衣原体和立克次氏体。

[0259] 可以根据本文所述的方法预防和/或治疗的真菌疾病或真菌感染包括(但不限于)由以下引起的真菌疾病或真菌感染:念珠菌(*Candida*)感染、接合菌病(*zygomycosis*)、念珠菌乳腺炎、具有潜伏性毛孢子虫血症的进行性播散性毛孢子菌病、播散性念珠菌病、肺副球孢子菌病、肺曲霉病、卡氏肺囊虫(*Pneumocystis carinii*)肺炎、隐球菌性脑膜炎、球孢子菌性(*coccidioidal*)脑膜脑炎和脑脊髓血管炎、黑曲霉(*Aspergillus niger*)感染、镰刀菌角膜炎(*Fusarium keratitis*)、副鼻窦霉菌病、烟曲霉(*Aspergillus fumigatus*)心内膜炎、胫骨软骨发育不良、光滑念珠菌(*Candida glabrata*)阴道炎、口咽念珠菌病、X连锁慢性肉芽肿病、足癣、皮肤念珠菌病、霉菌性胎盘炎、播散性毛孢子菌病、过敏性支气管肺曲霉病、霉菌性角膜炎、新型隐球菌(*Cryptococcus neoformans*)感染、真菌性腹膜炎、曲弯孢霉(*Curvularia geniculata*)感染、葡萄球菌性眼内炎、孢子丝菌病以及皮肤癣菌病。

[0260] 在某些实施例中,感染性疾病是急性的。在某些实施例中,感染性疾病是慢性的。在某些实施例中,感染性疾病由黄病毒引起,例如西尼罗病毒(West Nile virus)、圣路易斯脑炎病毒(Saint Louis encephalitis virus)、波瓦桑病毒(Powassan virus)、蜱传脑炎病毒、登革热病毒、寨卡病毒(zika virus)、科萨努尔森林病病毒(Kyasenur Forest disease virus)、黄热病毒以及基孔肯雅病毒(chikungunya virus)。在某些实施例中,感

染性疾病由埃博拉病毒 (Ebola virus) 引起。在某些实施例中，感染性疾病由流感病毒引起。在某些实施例中，感染性疾病由人类免疫缺陷病毒 (HIV)、乙型肝炎病毒 (HBV) 或丙型肝炎病毒 (HCV) 引起。在某些实施例中，如本文所述的抗CTLA-4抗体或其药物组合物促进病毒控制。在某些实施例中，如本文所述的抗CTLA-4抗体或其药物组合物消除病毒贮主。

[0261] 在一个方面，本发明涉及一种本发明的抗CTLA-4抗体和/或一种包含本发明的抗CTLA-4抗体和药学上可接受的载剂或赋形剂的本发明药物组合物，其用作药剂。

[0262] 在一个方面，本发明涉及一种本发明的抗CTLA-4抗体和/或其与药学上可接受的载剂或赋形剂组合用于制备用于免疫疗法(例如，用于增加受试者的响应于抗原的T细胞活化、治疗癌症、或治疗或预防感染性疾病的免疫疗法)的药物组合物或药剂的用途。

[0263] 在一个方面，本发明涉及一种本发明的抗CTLA-4抗体和/或一种包含本发明的抗CTLA-4抗体和药学上可接受的载剂或赋形剂的本发明药物组合物，其用于治疗癌症的方法中。

[0264] 在一个方面，本发明涉及一种本发明的抗CTLA-4抗体和/或一种包含本发明的抗CTLA-4抗体和药学上可接受的载剂或赋形剂的本发明药物组合物，其用于抑制免疫系统对肿瘤的耐受性和/或用于患有癌症的受试者的免疫疗法的方法中。

[0265] 在一个方面，本发明涉及一种本发明的抗CTLA-4抗体和/或一种包含本发明的抗CTLA-4抗体和药学上可接受的载剂或赋形剂的本发明药物组合物，其用于治疗感染性疾病的方法中。

[0266] 在某些实施例中，本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物作为单一疗法施用。

[0267] 在某些实施例中，这些方法进一步包含向受试者施用一额外治疗剂。在某些实施例中，所述额外治疗剂是化疗剂或检查点靶向剂。在某些实施例中，检查点靶向剂选自由以下组成的群组：拮抗剂抗PD-1抗体、拮抗剂抗PD-L1抗体、拮抗剂抗PD-L2抗体、拮抗剂抗CTLA-4抗体、拮抗剂抗TIM-3抗体、拮抗剂抗LAG-3抗体、拮抗剂抗CEACAM1抗体、激动剂抗GITR抗体、激动剂抗OX40抗体、激动剂抗CD137抗体、激动剂抗DR3抗体、激动剂抗TNFSF14抗体和激动剂抗CD27抗体。在某些实施例中，检查点靶向剂是拮抗剂抗PD-1抗体。在某些实施例中，检查点靶向剂是拮抗剂抗PD-L1抗体。在某些实施例中，检查点靶向剂是拮抗剂抗LAG-3抗体。在某些实施例中，额外治疗剂是肿瘤坏死因子受体超家族成员或肿瘤坏死因子超家族成员的激动剂。

[0268] 在某些实施例中，本发明涉及 (a) 一种本发明的抗CTLA-4抗体和/或一种包含本发明的抗CTLA-4抗体和药学上可接受的载剂或赋形剂和 (b) 一额外治疗剂的本发明药物组合物，其用作药剂。在一优选实施例中，所述额外治疗剂是化疗剂或检查点靶向剂。

[0269] 在某些实施例中，本发明涉及 (a) 一种本发明的抗CTLA-4抗体和/或一种包含本发明的抗CTLA-4抗体和药学上可接受的载剂或赋形剂和 (b) 一额外治疗剂的本发明药物组合物，其用于治疗癌症的方法中。

[0270] 在某些实施例中，本发明涉及 (a) 一种本发明的抗CTLA-4抗体和/或一种包含本发明的抗CTLA-4抗体和药学上可接受的载剂或赋形剂和 (b) 一额外治疗剂的本发明药物组合物，其用于治疗感染性疾病的方法中。

[0271] 在某些实施例中，本文所述的抗CTLA-4抗体与靶向免疫调节酶，如IDO(吲哚胺-(2,3)-双加氧酶) 和/或TDO(色氨酸2,3-双加氧酶) 的化合物组合向受试者施用。在某些实

施例中,此类化合物选自由以下组成的群组:艾卡哚司他(因塞特公司(Icyte Corp);参见例如,WO 2010/005958,其以全文引用的方式并入本文中)、F001287(Flexus Biosciences)、吲哚莫德(NewLink Genetics)和NLG919(NewLink Genetics)。在一个实施例中,所述化合物是艾卡哚司他。在另一个实施例中,所述化合物是F001287。在另一实施例中,所述化合物是吲哚莫德。在另一实施例中,所述化合物是NLG919。

[0272] 在某些实施例中,本发明涉及(a)一种本发明的抗CTLA-4抗体和/或一种包含本发明的抗CTLA-4抗体和药学上可接受的载剂或赋形剂和(b)靶向免疫调节酶的化合物,其用作药剂。在一优选实施例中,所述化合物靶向IDO和/或TDO。

[0273] 在某些实施例中,本发明涉及(a)一种本发明的抗CTLA-4抗体和/或一种包含本发明的抗CTLA-4抗体和药学上可接受的载剂或赋形剂和(b)靶向免疫调节酶的化合物,其用于治疗癌症的方法中。在一优选实施例中,所述化合物靶向IDO和/或TDO。

[0274] 在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体与疫苗组合向受试者施用。在某些实施例中,疫苗是基于热休克蛋白的肿瘤疫苗或基于热休克蛋白的病原体疫苗。在一特定实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体与基于热休克蛋白的肿瘤疫苗组合向受试者施用。热休克蛋白(HSP)是在所有物种中普遍存在的高度保守蛋白质家族。由于热休克或其它形式的应激,包括暴露于毒素、氧化应激或葡萄糖剥夺,其表达可以被强有力地诱导至高得多的水平。已经根据分子量分类成了五个家族:HSP-110、-90、-70、-60和-28。HSP通过如巨噬细胞和树突状细胞(DC)的抗原呈递细胞(APC)中的交叉呈递途径递送免疫原性肽,引起T细胞活化。HSP充当肿瘤相关的抗原肽的分子伴侣(chaperone)载剂,形成能够诱导肿瘤特异性免疫的复合物。从垂死的肿瘤细胞释放后,HSP-抗原复合物被抗原呈递细胞(APC)吸收,其中抗原被加工成结合MHC I类和II类分子的肽,引起抗肿瘤CD8+和CD4+T细胞的活化。由来源于肿瘤制剂的HSP复合物引发的免疫特异性针对由每个受试者的癌症表达的独特抗原肽谱。

[0275] 热休克蛋白肽复合物(HSPPC)是由与抗原肽非共价复合的热休克蛋白组成的蛋白质肽复合物。HSPPC引发先天性和适应性免疫反应。在一特定实施例中,抗原肽呈现对所治疗癌症的抗原性。HSPPC通过APC经由膜受体(主要是CD91)或通过结合到Toll样受体而高效地捕获。HSPPC内化导致APC的功能成熟,伴随着趋化因子和细胞因子产生,导致自然杀伤细胞(NK)、单核细胞以及Th1和Th-2介导的免疫反应的活化。在某些实施例中,本文所述的方法中所用的HSPPC包含一种或多种来自与抗原肽复合的hsp60、hsp70或hsp90应激蛋白家族的热休克蛋白。在某些实施例中,HSPPC包含hsc70、hsp70、hsp90、hsp110、grp170、gp96、钙网蛋白(calreticulin)或其中两种或更多种的组合。

[0276] 在一特定实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体与热休克蛋白肽复合物(HSPPC),例如,热休克蛋白肽复合物-96(HSPPC-96)组合向受试者施用,以治疗癌症。HSPPC-96包含与抗原肽复合的96kDa热休克蛋白(Hsp),gp96。HSPPC-96是由受试者的肿瘤制造的癌症免疫疗法并且含有癌症的抗原“指纹”。在某些实施例中,这种指纹含有仅存在于所述特定受试者的特定癌细胞中的独特抗原,并且注射疫苗旨在刺激受试者的免疫系统识别并攻击任何具有特定癌症指纹的细胞。

[0277] 在某些实施例中,HSPPC(例如,HSPPC-96)由受试者的肿瘤组织产生。在一特定实施例中,HSPPC(例如,HSPPC-96)由所治疗的癌症类型的肿瘤或其转移产生。在另一特定实

施例中,HSPPC(例如,HSPPC-96)是所治疗的受试者自身的。在某些实施例中,肿瘤组织是非坏死肿瘤组织。在某些实施例中,至少1克(例如,至少1、至少2、至少3、至少4、至少5、至少6、至少7、至少8、至少9或至少10克)非坏死肿瘤组织用于产生疫苗方案。在某些实施例中,在手术切除之后,在用于疫苗制备之前,冷冻非坏死肿瘤组织。在一些实施例中,HSPPC(例如,HSPPC-96)通过纯化技术从肿瘤组织分离、过滤并制备成用于可注射疫苗。在某些实施例中,向受试者施用6-12个剂量的HSPPC,例如,HSPPC-96。在此类实施例中,HSPPC(例如,HSPPC-96)剂量中的前4个剂量可以每周施用,并且然后2-8个额外剂量每两周施用。

[0278] 可以根据本文所述的方法使用的HSPPC的其它实例公开于以全文引用的方式并入本文中的以下专利和专利申请中:美国专利第6,391,306号、第6,383,492号、第6,403,095号、第6,410,026号、第6,436,404号、第6,447,780号、第6,447,781号和第6,610,659号,所述文献全部以全文引用的方式并入本文中。

[0279] 在某些实施例中,本发明涉及(a)一种本发明的抗CTLA-4抗体和/或一种包含本发明的抗CTLA-4抗体和药学上可接受的载剂或赋形剂和(b)疫苗,其用作药剂。在一优选实施例中,疫苗是基于热休克蛋白的肿瘤疫苗或基于热休克蛋白的病原体疫苗。在一优选实施例中,疫苗是基于热休克蛋白的病毒疫苗。

[0280] 在某些实施例中,本发明涉及(a)一种本发明的抗CTLA-4抗体和/或一种包含本发明的抗CTLA-4抗体和药学上可接受的载剂或赋形剂和(b)疫苗,其用于治疗癌症的方法中。在一优选实施例中,疫苗是基于热休克蛋白的肿瘤疫苗。

[0281] 抗CTLA-4抗体和额外治疗剂(例如,化疗剂、检查点靶向剂、IDO抑制剂和/或疫苗)可以以单独剂型分开、依序或同时施用。在一个实施例中,抗CTLA-4抗体肠胃外施用,并且IDO抑制剂口服施用。

[0282] 在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体向受试者瘤内施用。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体与一额外治疗剂组合向受试者瘤内施用。在某些实施例中,额外治疗剂全身性地施用。在某些实施例中,受试者患有实体肿瘤。在某些实施例中,受试者患有头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)。在某些实施例中,受试者患有HER2⁺乳癌。在某些实施例中,全身性地施用的额外治疗剂是抗PD-1抗体(例如,派姆单抗或纳武单抗)。在某些实施例中,全身性地施用的额外治疗剂是抗EGFR抗体(例如,西妥昔单抗)。在某些实施例中,全身性地施用的额外治疗剂是抗HER2抗体(例如,曲妥珠单抗)。在某些实施例中,全身性地施用的额外治疗剂是化疗剂(例如,吉西他滨)。在某些实施例中,受试者患有实体肿瘤,并且全身性地施用的额外治疗剂是抗PD-1抗体(例如,派姆单抗或纳武单抗)。在某些实施例中,抗PD-1抗体是每三周以200mg施用的派姆单抗。在某些实施例中,受试者患有头颈部鳞状细胞癌(HNSCC),并且全身性地施用的额外治疗剂是抗EGFR抗体(例如,西妥昔单抗)。在某些实施例中,受试者患有HER2⁺乳癌,并且全身性地施用的额外治疗剂是抗HER2抗体(例如,曲妥珠单抗)。在某些实施例中,受试者进一步接受化疗剂(例如,吉西他滨)。在一个方面,本发明涉及一种本发明的抗CTLA-4抗体和/或药物组合物,和任选地一额外治疗剂,其用于治疗癌症的方法中,其中本发明的抗CTLA-4抗体和/或药物组合物向受试者瘤内施用。在一个优选实施例中,一额外治疗剂向受试者施用,更优选地,一额外治疗剂向受试者全身性地施用。

[0283] 在某些实施例中,抗PD-1抗体用于本文所述的方法中。在某些实施例中,抗PD-1抗体是由百时美施贵宝公司(Bristol-Myers Squibb)开发的纳武单抗,也被称为BMS-936558

或MDX1106。在某些实施例中，抗PD-1抗体是由默克公司(Merck&Co)开发的派姆单抗，也被称为兰利珠单抗(Lambrolizumab)或MK-3475。在某些实施例中，抗PD-1抗体是由CureTech开发的匹立珠单抗(Pidilizumab)，也被称为CT-011。在某些实施例中，抗PD-1抗体是由医学免疫(Medimmune)开发的MEDI0680，也被称为AMP-514。在某些实施例中，抗PD-1抗体是由诺华制药(Novartis Pharmaceuticals)开发的PDR001。在某些实施例中，抗PD-1抗体是由雷杰纳荣制药(Regeneron Pharmaceuticals)开发的REGN2810。在某些实施例中，抗PD-1抗体是由辉瑞(Pfizer)开发的PF-06801591。在某些实施例中，抗PD-1抗体是由百济神州(BeiGene)开发的BGB-A317。在某些实施例中，抗PD-1抗体是由AnaptysBio和Tesaro开发的TSR-042。在某些实施例中，抗PD-1抗体是由恒瑞(Hengrui)开发的SHR-1210。

[0284] 可以用于本文所述的治疗方法中的抗PD-1抗体的其它非限制性实例公开于以全文引用的方式并入本文中用于所有目的的以下专利和专利申请中：美国专利第6,808,710号、美国专利第7,332,582号、美国专利第7,488,802号、美国专利第8,008,449号、美国专利第8,114,845号、美国专利第8,168,757号、美国专利第8,354,509号、美国专利第8,686,119号、美国专利第8,735,553号、美国专利第8,747,847号、美国专利第8,779,105号、美国专利第8,927,697号、美国专利第8,993,731号、美国专利第9,102,727号、美国专利第9,205,148号；美国公开第US 2013/0202623 A1号、美国公开第US 2013/0291136 A1号、美国公开第US 2014/0044738 A1号、美国公开第US 2014/0356363 A1号、美国公开第US 2016/0075783 A1号；以及PCT公开第WO 2013/033091 A1号、PCT公开第WO 2015/036394 A1号、PCT公开第WO 2014/179664 A2号、PCT公开第WO 2014/209804 A1号、PCT公开第WO 2014/206107 A1号、PCT公开第WO 2015/058573 A1号、PCT公开第WO 2015/085847 A1号、PCT公开第WO 2015/200119 A1号、PCT公开第WO 2016/015685 A1号和PCT公开第WO 2016/020856 A1号。

[0285] 在某些实施例中，抗PD-L1抗体用于本文所述的方法中。在某些实施例中，抗PD-L1抗体是由基因技术(Genentech)开发的阿特珠单抗(atezolizumab)。在某些实施例中，抗PD-L1抗体是由阿斯利康(AstraZeneca)、塞尔基因(Celgene)和医学免疫开发的度伐单抗(durvalumab)。在某些实施例中，抗PD-L1抗体是由默克雪兰诺(Merck Serono)和辉瑞开发的阿维鲁单抗(avelumab)，也被称为MSB0010718C。在某些实施例中，抗PD-L1抗体是由百时美施贵宝公司开发的MDX-1105。在某些实施例中，抗PD-L1抗体是由Amplimmune和GSK开发的AMP-224。

[0286] 可以用于本文所述的治疗方法中的抗PD-L1抗体的非限制性实例公开于以全文引用的方式并入本文中用于所有目的的以下专利和专利申请中：美国专利第7,943,743号、美国专利第8,168,179号、美国专利第8,217,149号、美国专利第8,552,154号、美国专利第8,779,108号、美国专利第8,981,063号、美国专利第9,175,082号；美国公开第US 2010/0203056 A1号、美国公开第US 2003/0232323 A1号、美国公开第US 2013/0323249 A1号、美国公开第US 2014/0341917 A1号、美国公开第US 2014/0044738 A1号、美国公开第US 2015/0203580 A1号、美国公开第US 2015/0225483 A1号、美国公开第US 2015/0346208 A1号、美国公开第US 2015/0355184 A1号；以及PCT公开第WO 2014/100079 A1号、PCT公开第WO 2014/022758 A1号、PCT公开第WO 2014/055897 A2号、PCT公开第WO 2015/061668 A1号、PCT公开第WO 2015/109124 A1号、PCT公开第WO 2015/195163 A1号、PCT公开第WO 2016/000619 A1号和PCT公开第WO 2016/030350 A1号。

[0287] 在某些实施例中，抗LAG-3抗体用于本文所述的方法中。在某些实施例中，抗LAG-3抗体是由百时美施贵宝公司开发的BMS-986016。在某些实施例中，抗LAG-3抗体是由诺华开发的LAG525。在某些实施例中，抗LAG-3抗体是由GSK开发的GSK2831781。

[0288] 可以用于本文所述的治疗方法中的抗LAG-3抗体的非限制性实例公开于以全文引用的方式并入本文中用于所有目的以下专利和专利申请中：美国专利第9,244,059号；美国公开第US 2011/0150892 A1号、美国公开第US 2014/0093511 A1号、美国公开第US 2014/0286935 A1号、美国公开第US 2015/0259420 A1号；以及PCT公开第W0 2015/042246 A1号、PCT公开第W0 2015/116539 A1号、PCT公开第W0 2015/200119 A1号和PCT公开第W0 2016/028672 A1号。

[0289] 在某些实施例中，抗EGFR抗体用于本文所述的方法中。在某些实施例中，抗EGFR抗体是由百时美施贵宝公司和英克隆(ImClone)开发的西妥昔单抗、由安根尼克斯(Abgenix)和安进(Amgen)开发的帕尼单抗(panitumumab)、由CMI Cuba和YM BioSciences开发的尼妥珠单抗(nimotuzumab)、由英克隆开发的耐昔妥珠单抗(necitumumab)、由Genmab开发的扎鲁木单抗(zalutumumab)、由武田(Takeda)开发的马妥珠单抗(matuzumab)、由默克雪兰诺和Symphogen开发的Sym004、由Glycart和罗氏(Roche)开发的伊姆加土珠单抗(imgatuzumab)、由基因技术和罗氏开发的度利戈妥单抗(duligotumab)、由雅培(Abbott)开发的达妥昔单抗(depatuxizumab)、由艾伯维(Abbvie)开发的达妥昔单抗马佛多汀(depatuxizumab mafodotin)、由Adimab和梅里马克(Merrimack)开发的MM-151、由绿十字开发的GC1118、由安进和英基(ImmunoGen)开发的AMG 595、由Glycotope开发的CetuGEX、由英基开发的拉普特西单抗恩他新(laprituximab emtansine)、由Genmab和杨森生物技术(Janssen Biotech)开发的JNJ-61186372、由神州细胞工程(SinoCelltech)开发的SCT200、由礼来(Lilly)开发的LY3164530、由上海复宏汉霖(Shanghai Henlius)开发的HLX07或由兴盟(Synermore)开发的SYN004。

[0290] 在某些实施例中，抗HER2抗体用于本文所述的方法中。在某些实施例中，抗HER2抗体是由基因技术和罗氏开发的曲妥珠单抗、由基因技术和罗氏开发的曲妥珠单抗恩他新、由基因技术开发的帕妥珠单抗、由费森尤斯(Fresenius)开发的厄马索单抗(ertumaxomab)、由MacroGenics开发的马尔吉土西单抗(margetuximab)、由梅里马克开发的MM-111、由赛尔群(Celltrion)开发的CT-P06、由辉瑞开发的PF-05280014、由梅里马克开发的MM-302、由默克公司开发的SB3、由上海中信国健(Shanghai CP Guojian)开发的CMAB302、由Glycotope开发的TrasGEX、由Ambrx和浙江医药(Zhejiang Medicine)开发的ARX788、由Synthon开发的SYD985、由百时美施贵宝公司和f-star开发的FS102、由Biocad开发的BCD-022、由安进开发的ABP 980、由第一三共(Daiichi Sankyo)开发的DS-8201a、由上海复宏汉霖(Shanghai Henlius)开发的HLX02或由百康(Biocon)和迈兰(Mylan)开发的CANMAb。

[0291] 本文所述的抗体或药物组合物可以通过多种途径递送到受试者。这些途径包括(但不限于)肠胃外、鼻内、气管内、口服、皮内、局部、肌肉内、腹膜内、经皮、静脉内、肿瘤内、结膜和皮下途径。还可以采用经肺施用，例如通过使用吸入器或雾化器，和含有适作喷雾剂的雾化剂的配制物。在某些实施例中，本文所述的抗体或药物组合物皮下或静脉内递送。在某些实施例中，本文所述的抗体或药物组合物瘤内递送。在某些实施例中，本文所述的抗

CTLA-4抗体或药物组合物被递送到肿瘤引流淋巴结。在某些实施例中，本文所述的抗体或药物组合物经由局部施用(例如，皮下施用)递送。在某些实施例中，本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物全身性地递送。在某些实施例中，本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物局部递送。

[0292] 在一个方面，本发明涉及一种本发明的抗CTLA-4抗体和/或药物组合物，和任选地一额外治疗剂，其用于治疗癌症的方法中，其中本发明的抗CTLA-4抗体和/或药物组合物瘤内递送到受试者，被递送到受试者的肿瘤引流淋巴结，或经由局部施用(例如，皮下施用)递送到受试者。

[0293] 抗体或组合物的有效治疗和/或预防病况的量将取决于疾病的性质，并且可以通过标准临床技术确定。

[0294] 组合物中所用的精确剂量还将取决于施用途径和感染或由其引起的疾病的严重性，并且应根据执业医生的判断和每个受试者的情况来决定。举例来说，有效剂量还可以取决于施用方式、目标部位、患者的生理状态(包括年龄、体重和健康状况)、患者是人还是动物、所施用的其它药剂、或治疗是预防性的还是治疗性的而变化。通常，患者是人类，但也可以治疗非人类哺乳动物，包括转基因哺乳动物。最优地滴定治疗剂量以优化安全性和功效。

[0295] 在某些实施例中，本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物以0.01mg/kg、0.03mg/kg、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、6mg/kg、10mg/kg、约0.1mg/kg、约0.3mg/kg、约1mg/kg、约3mg/kg、约6mg/kg或约10mg/kg(例如，经由静脉内注射)向受试者施用。在某些实施例中，本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物每周、每两周、每三周、每四周、每六周、每八周、每十二周、每月、每两个月、每三个月、每四个月、每五个月、每六个月、每八个月和每年，例如，以上文所描述的剂量(例如，经由静脉内注射)向受试者施用。在某些实施例中，本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物每三周以上文所描述的剂量(例如，经由静脉内注射)向受试者施用。

[0296] 在一个方面，本发明涉及一种本发明的抗CTLA-4抗体和/或药物组合物，和任选地一额外治疗剂，其用于治疗癌症的方法中，其中本发明的抗CTLA-4抗体和/或药物组合物以0.01mg/kg、0.03mg/kg、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、6mg/kg、10mg/kg、约0.1mg/kg、约0.3mg/kg、约1mg/kg、约3mg/kg、约6mg/kg或约10mg/kg，更优选每两周、每三周、每四周、每六周或每十二周向受试者施用。

[0297] 在某些实施例中，本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物每两周、每三周、每四周、每六周或每十二周以0.1mg/kg(例如，经由静脉内注射)向受试者施用。在某些实施例中，本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物每两周、每三周、每四周、每六周或每十二周以0.3mg/kg(例如，经由静脉内注射)向受试者施用。在某些实施例中，本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物每两周、每三周、每四周、每六周或每十二周以1mg/kg(例如，经由静脉内注射)向受试者施用。在某些实施例中，本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物每两周、每三周、每四周、每六周或每十二周以3mg/kg(例如，经由静脉内注射)向受试者施用。在某些实施例中，本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物每两周、每三周、每四周、每六周或每十二周以6mg/kg(例如，经由静脉内注射)向受试者施用。在某些实施例中，本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物每两周、每三周、每四周、每六周或每十二周以10mg/kg(例如，经由静脉内注射)向受试者施用。

[0298] 在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物每三周以0.1mg/kg或约0.1mg/kg(例如,经由静脉内注射)向受试者施用。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物每三周以0.3mg/kg或约0.3mg/kg(例如,经由静脉内注射)向受试者施用。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物每三周以1mg/kg或约1mg/kg(例如,经由静脉内注射)向受试者施用。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物每三周以3mg/kg或约3mg/kg(例如,经由静脉内注射)向受试者施用。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物每三周以6mg/kg或约6mg/kg(例如,经由静脉内注射)向受试者施用。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物每三周以10mg/kg或约10mg/kg(例如,经由静脉内注射)向受试者施用。

[0299] 在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物以0.01mg/kg、0.03mg/kg、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、约0.01mg/kg、约0.03mg/kg、约0.1mg/kg、约0.3mg/kg、约1mg/kg或约3mg/kg经由肿瘤内注射向受试者施用。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物每周、每两周、每三周、每四周、每六周、每八周、每十二周、每月、每两个月、每三个月、每四个月、每五个月、每六个月、每八个月和每年,例如,以上文所描述的剂量经由肿瘤内注射向受试者施用。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物每三周以上文所描述的剂量经由肿瘤内注射向受试者施用。

[0300] 在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物每三周以0.01mg/kg或约0.01mg/kg经由肿瘤内注射向受试者施用。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物每三周以0.03mg/kg或约0.03mg/kg经由肿瘤内注射向受试者施用。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物每三周以0.1mg/kg或约0.1mg/kg经由肿瘤内注射向受试者施用。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物每三周以0.3mg/kg或约0.3mg/kg经由肿瘤内注射向受试者施用。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物每三周以1mg/kg或约1mg/kg经由肿瘤内注射向受试者施用。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物每三周以3mg/kg或约3mg/kg经由肿瘤内注射向受试者施用。

[0301] 在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物以0.01mg/kg、0.03mg/kg、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、约0.01mg/kg、约0.03mg/kg、约0.1mg/kg、约0.3mg/kg、约1mg/kg或约3mg/kg经由局部施用(例如,皮下施用)向受试者施用。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物每周、每两周、每三周、每四周、每六周、每八周、每十二周、每月、每两个月、每三个月、每四个月、每五个月、每六个月、每八个月和每年,例如,以上文所描述的剂量经由局部施用(例如,皮下施用)向受试者施用。

[0302] 在某些实施例中,向受试者施用治疗组合,持续至少3、6、9、12、18或24个月。在某些实施例中,向受试者施用治疗组合,持续至多3、6、9、12、18或24个月。

[0303] 在某些实施例中,本公开提供了一种治疗患有血管肉瘤的受试者的方法,所述方法包含(例如,静脉内、瘤内或皮下)向受试者施用有效量的本文所述的抗CTLA-4抗体或药物组合物。在某些实施例中,本公开提供了一种治疗患有血管肉瘤的受试者的方法,所述方法包含任选地每周、每两周或每三周,以0.01mg/kg、0.03mg/kg、0.1mg/kg、0.3mg/kg、1mg/kg、3mg/kg、约0.01mg/kg、约0.03mg/kg、约0.1mg/kg、约0.3mg/kg、约1mg/kg或约3mg/kg静脉内向受试者施用特异性结合到人类CTLA-4的抗体。在某些实施例中,本公开提供了一种

治疗患有血管肉瘤的受试者的方法,所述方法包含每三周一次以0.1mg/kg静脉内向受试者施用特异性结合到人类CTLA-4的抗体。在某些实施例中,所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:8的重链可变区和包含氨基酸序列SEQ ID NO:9的轻链可变区。在某些实施例中,所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:23的重链;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:27的轻链。在某些实施例中,所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:24的重链;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:27的轻链。在某些实施例中,所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:25的重链;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:27的轻链。在某些实施例中,所述抗体包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:26的重链;和包含氨基酸序列SEQ ID NO:27的轻链。

[0304] 本文所述的抗CTLA-4抗体还可以用于使用本领域技术人员已知的经典免疫组织学方法,包括免疫分析法,如酶联免疫吸附分析法(ELISA)、免疫沉淀或蛋白质印迹法(Western blotting)来分析生物样品中的CTLA-4蛋白水平。合适的抗体分析法标记是本领域中已知的,并且包括酶标记,如葡萄糖氧化酶;放射性同位素,如碘(¹²⁵I、¹²¹I)、碳(¹⁴C)、硫(³⁵S)、氚(³H)、铟(¹¹¹In)和锝(⁹⁹Tc);发光标记,如鲁米诺(luminol);和荧光标记,如荧光素和若丹明,和生物素。此类标记可以用于标记本文所述的抗体或其抗原结合片段。或者,识别本文所述的抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段的第二抗体可以经标记并且与抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段组合用于检测CTLA-4蛋白水平。在一个实施例中,本发明涉及一种本发明的抗CTLA-4抗体的用途,其用于在体外分析和/或检测生物样品中的CTLA-4蛋白水平。

[0305] CTLA-4蛋白的表达水平的分析旨在包括定性地或定量地直接(例如,通过测定或估算绝对蛋白质水平)或相对(例如,通过与第二生物样品中的疾病相关蛋白质水平比较)测量或估算第一生物样品中的CTLA-4蛋白的水平。第一生物样品中的CTLA-4多肽表达水平可以经测量或估算并且与标准CTLA-4蛋白水平比较,标准是获自从不患有病症的个体获得的第二生物样品或通过对不患有病症的个体群体的水平求平均值而确定。如本领域中应了解,在“标准”CTLA-4多肽水平已知时,它可以反复地用作比较的标准。

[0306] 如本文所用,术语“生物样品”是指从受试者、细胞系、组织或可能表达CTLA-4的细胞的其它来源获得的任何生物样品。从动物(例如,人类)获得组织活检体和体液的方法是本领域中熟知的。生物样品包括外周单核血球。

[0307] 本文所述的抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段可以用于对于熟练技术人员熟知并且标准并且基于本发明描述的预后、诊断、监测和筛查应用,包括体外和体内应用。用于体外评估和评定免疫系统状态和/或免疫反应的预后、诊断、监测和筛查分析法和试剂盒可以用于预测、判断和监测以评估患者样品,包括已知具有或疑似具有免疫系统功能障碍的那些或关于预期或所需免疫系统反应、抗原反应或疫苗反应。评估和评定免疫系统状态和/或免疫反应还可用于确定患者对于药物临床试验或对于施用特定化疗剂或抗体或其抗原结合片段(包括其组合)对比不同药剂或抗体或其抗原结合片段的适合性。这种类型的预后和诊断监测和评估已经在实践中利用针对乳癌中的HER2蛋白的抗体(HercepTest™,Dako),其中分析法也用于使用Herceptin®针对抗体疗法评估患者。体内应用包括导向细胞疗法和免疫系统调节和免疫反应的放射成像。

[0308] 在一个方面,本发明涉及一种本发明的抗CTLA-4抗体和/或药物组合物,其用作诊断剂。

[0309] 在一个方面,本发明涉及一种本发明的抗CTLA-4抗体和/或药物组合物,其用于预

测、诊断和/或监测免疫系统功能障碍和/或癌症的方法中。

[0310] 在一个实施例中,本发明涉及一种本发明的抗CTLA-4抗体的用途,其用于通过分析和/或检测受试者体外的生物样品中的CTLA-4蛋白水平来预测、诊断和/或监测受试者的免疫系统功能障碍和/或癌症。

[0311] 在一个实施例中,抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段可以用于活检样品的免疫组织化学中。在另一实施例中,抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段可以用于检测CTLA-4的水平或在其膜表面上含有CTLA-4的细胞的水平,所述水平则可以与某些疾病症状相关。本文所述的抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段可以携有可检测或功能标记。当使用荧光标记时,本领域中已知的目前可用的显微术和荧光激活细胞分选仪分析(FACS)或两种方法程序的组合可以用于鉴别和定量特异性结合成员。本文所述的抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段可以携有荧光标记。示范性荧光标记包括例如反应性和缀合探针,例如氨基香豆素(Aminocoumarin)、荧光素(Fluorescein)和德克萨斯红(Texas red),Alexa Fluor染料、Cy染料和DyLight染料。抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段可以携有放射性标记,如同位素³H、¹⁴C、³²P、³⁵S、³⁶Cl、⁵¹Cr、⁵⁷Co、⁵⁹Fe、⁶⁷Cu、⁹⁰Y、⁹⁹Tc、¹¹¹In、¹¹⁷Lu、¹²¹I、¹²⁴I、¹²⁵I、¹³¹I、¹⁹⁸Au、²¹¹At、²¹³Bi、²²⁵Ac和¹⁸⁶Re。当使用放射性标记时,本领域中已知的目前可用的计数程序可以用于鉴别和定量抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段与CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的特异性结合。在标记是酶的情况下,检测可以通过如本领域中已知的当前所用比色、分光光度、荧光分光光度、安培或气体定量技术中的任一种实现。这可以通过使样品或对照样品与抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段在允许在抗体或其抗原结合片段与CTLA-4之间形成复合物的条件下接触来实现。在样品和对照中检测并且比较在抗体或其抗原结合片段与CTLA-4之间形成的任何复合物。鉴于本文所述的抗体对于CTLA-4的特异性结合,抗体或其抗原结合片段可以用于特异性检测细胞表面上的CTLA-4表达。本文所述的抗体或其抗原结合片段还可以用于经由免疫亲和力纯化而纯化CTLA-4。本文还包括分析法系统,所述系统可以按用于定量分析例如CTLA-4或CTLA-4/CTLA-4配体复合物的存在程度的测试试剂盒的形式制备。系统或测试试剂盒可以包含标记的组分,例如,标记的抗体,和一种或多种额外免疫化学试剂。

[0312] 在一个实施例中,本发明涉及一种分析和/或检测生物样品中的CTLA-4蛋白水平的体外方法,其包含(1)使样品和任选地对照样品与本发明的抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段在允许在抗体或其抗原结合片段与CTLA-4之间形成复合物的条件下接触,和(2)检测和比较在样品和任选地对照中形成的复合物。

[0313] 1.5产生抗CTLA-4抗体的多核苷酸、载体和方法

[0314] 在另一方面,本文提供了多核苷酸,其包含编码特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)抗原的本文所述的抗体或其片段(例如,轻链可变区和/或重链可变区)的核苷酸序列;和载体,例如,包含此类多核苷酸用于在宿主细胞(例如,大肠杆菌和哺乳动物细胞)中重组表达的载体。本文提供了包含编码本文所提供的抗体中的任一种的核苷酸序列的多核苷酸;以及包含此类多核苷酸序列的载体,例如,用于其高效表达于宿主细胞(例如,哺乳动物细胞)中的表达载体。

[0315] 如本文所用,“分离的”多核苷酸或核酸分子是与存在于核酸分子的天然来源中(例如,小鼠或人类中的)的其它核酸分子分离的多核苷酸或核酸分子。此外,“分离的”核酸分子,如cDNA分子,当通过重组技术产生时基本上不含其它细胞物质或培养基,或者当化学合

成时基本上不含化学前体或其它化学物质。举例来说,措辞“基本上不含”包括具有少于约15%、10%、5%、2%、1%、0.5%或0.1% (具体地说,少于约10%) 的其它物质(例如,细胞物质、培养基、其它核酸分子、化学前体和/或其它化学物质)的多核苷酸或核酸分子制剂。在一特定实施例中,编码本文所述的抗体的核酸分子是分离或纯化的。

[0316] 在特定方面,本文提供了多核苷酸,其包含编码特异性结合到CTLA-4多肽(例如,人类CTLA-4)并且包含如本文所述的氨基酸序列的抗体或其抗原结合片段的核苷酸序列,以及与此类抗体竞争结合到CTLA-4多肽(例如,以剂量依赖性方式)或与此类抗体结合到相同表位的抗体。

[0317] 在某些方面,本文提供了多核苷酸,其包含编码本文所述的抗体的轻链或重链的核苷酸序列。多核苷酸可以包含编码包含本文所述的抗体的VL FR和CDR的轻链的核苷酸序列(参见例如,表1)。

[0318] 本文还提供了例如通过密码子/RNA优化、经异源信号序列置换和消除mRNA不稳定元件而优化的编码抗CTLA-4抗体的多核苷酸。通过引入密码子变化和/或消除mRNA中的抑制区而产生用于重组表达的编码抗CTLA-4抗体或其片段(例如,轻链、重链、VH结构域或VL结构域)的优化核酸的方法可以通过改编例如美国专利第5,965,726号、第6,174,666号、第6,291,664号、第6,414,132号和第6,794,498号中所述的优化方法而进行,相应地,所述专利全部以全文引用的方式并入本文中。举例来说, RNA内的潜在剪接位点和不稳定元件(例如,富含A/T或A/U的元件)可以在不改变由核酸序列编码的氨基酸的情况下突变以提高RNA对于重组表达的稳定性。所述改变利用遗传密码的简并,例如,将替代密码子用于一致氨基酸。在一些实施例中,可能需要改变一个或多个密码子以编码保守突变,例如,与原始氨基酸具有类似化学结构和特性和/或功能的类似氨基酸。此类方法可以使抗CTLA-4抗体或其片段的表达相对于由未经优化的多核苷酸编码的抗CTLA-4抗体的表达增加至少1倍、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、30倍、40倍、50倍、60倍、70倍、80倍、90倍或100倍或更多倍。

[0319] 在某些实施例中,编码本文所述的抗CTLA-4抗体或其片段(例如,VL结构域和/或VH结构域)的优化的多核苷酸序列可以与编码本文所述的抗CTLA-4抗体或其片段(例如,VL结构域和/或VH结构域)的未优化的多核苷酸序列的反义(例如,互补)多核苷酸杂交。在特定实施例中,编码本文所述的抗CTLA-4抗体或片段的优化的核苷酸序列在高严格性条件下与编码本文所述的抗CTLA-4抗体或片段的未优化的多核苷酸序列的反义多核苷酸杂交。在一特定实施例中,编码本文所述的抗CTLA-4抗体或其片段的优化的核苷酸序列在高严格性、中等或低严格性杂交条件下与编码本文所述的抗CTLA-4抗体或其片段的未优化的核苷酸序列的反义多核苷酸杂交。关于杂交条件的信息已经有所描述,参见例如,以引用的方式并入本文中的美国专利申请公开第US 2005/0048549号(例如,第72-73段)。

[0320] 通过本领域中已知的任何方法,可以获得多核苷酸,并且测定多核苷酸的核苷酸序列。编码本文所述的抗体(例如,表1中所述的抗体)和这些抗体的修饰形式的核苷酸序列可以使用本领域中熟知的方法测定,即,已知编码特定氨基酸的核苷酸密码子以产生编码抗体的核酸的方式组装。编码抗体的此类多核苷酸可以由化学合成的寡核苷酸组装(例如,如以全文引用的方式并入本文中的Kutmeier G等人,(1994),《生物技术(BioTechniques)》17:242-6中所描述),其简单来说涉及合成含有编码抗体的序列的部分的重叠寡核苷酸,退火和连接那些寡核苷酸,并且然后通过PCR来扩增连接的寡核苷酸。

[0321] 或者,编码本文所述的抗体的多核苷酸可以使用本领域中熟知的方法(例如,PCR和其它分子克隆方法)从来自合适来源(例如,杂交瘤)的核酸产生。举例来说,使用可与已知序列的3'和5'末端杂交的合成引物的PCR扩增可以使用从产生目标抗体的杂交瘤细胞获得的基因组DNA进行。此类PCR扩增方法可以用于获得包含编码抗体的轻链和/或重链的序列的核酸。此类PCR扩增方法可以用于获得包含编码抗体的可变轻链区和/或可变重链区的序列的核酸。扩增的核酸可以克隆到用于在宿主细胞中表达和用于进一步克隆的载体中,例如,以产生嵌合和人源化抗体。

[0322] 如果含有编码特定抗体的核酸的克隆不可用,但抗体分子的序列已知,那么编码免疫球蛋白的核酸可以化学合成或通过使用可与序列的3'和5'末端杂交的合成引物的PCR扩增或通过使用对于特定基因序列特异性的寡核苷酸探针的克隆以鉴别例如来自编码抗体的cDNA文库的cDNA克隆而从合适来源(例如,抗体cDNA文库或由表达抗体的任何组织或细胞(如经选择以表达本文所述的抗体的杂交瘤细胞)产生的cDNA文库,或由其分离的核酸(优选聚A+RNA))获得。通过PCR产生的扩增的核酸然后可以使用本领域中熟知的任何方法克隆到可复制克隆载体中。

[0323] 编码本文所述的抗CTLA-4抗体的DNA可以使用常规程序(例如,通过使用能够特异性地结合到编码抗CTLA-4抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)容易地分离和测序。杂交瘤细胞可以充当此类DNA的来源。在分离后,DNA可以放到表达载体中,其然后转染到宿主细胞如大肠杆菌细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞(例如,来自CHO GS SystemTM(龙沙(Lonza))的CHO细胞)或不以其它方式产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞中,以获得重组宿主细胞中抗CTLA-4抗体的合成。

[0324] 为了产生全抗体,包括VH或VL核苷酸序列、限制位点和保护限制位点的侧翼序列的PCR引物可以用于扩增scFv克隆中的VH或VL序列。利用本领域技术人员已知的克隆技术,PCR扩增的VH结构域可以克隆到表达重链恒定区(例如,人类 γ 4恒定区)的载体中,并且PCR扩增的VL结构域可以克隆到表达轻链恒定区(例如,人类 κ 或 λ 恒定区)的载体中。在某些实施例中,用于表达VH或VL结构域的载体包含EF-1 α 启动子、分泌信号、用于可变区的克隆位点、恒定结构域和选择标志物(如新霉素(neomycin))。VH和VL结构域也可以克隆到表达必需恒定区的一个载体中。重链转换载体和轻链转换载体然后使用本领域技术人员已知的技术共转染到细胞系中以产生表达全长抗体(例如,IgG)的稳定或瞬时细胞系。

[0325] DNA也可以例如通过用人类重链和轻链恒定结构域的编码序列替代鼠类序列或者通过共价接合非免疫球蛋白多肽的全部或部分编码序列到免疫球蛋白编码序列进行修饰。

[0326] 还提供了在高严格性、中等或低严格性杂交条件下与编码本文所述的抗体的多核苷酸杂交的多核苷酸。在特定实施例中,本文所述的多核苷酸在高严格性、中等或低严格性杂交条件下与编码本文所提供的VH结构域和/或VL结构域的多核苷酸杂交。

[0327] 杂交条件已经在本领域中描述并且是本领域技术人员已知的。举例来说,在严格条件下的杂交可以包括在约45°C下6×氯化钠/柠檬酸钠(SSC)中与过滤器结合的DNA杂交,随后在约50-65°C下0.2×SSC/0.1%SDS中的一个或多个洗涤;在高度严格条件下的杂交可以包括在约45°C下6×SSC中与过滤器结合的核酸杂交,随后在约68°C下0.1×SSC/0.2%SDS中的一个或多个洗涤。在其它严格杂交条件下的杂交是本领域技术人员已知的并且已经被描述,参见例如,以全文引用的方式并入本文中的Ausubel FM等人编,(1989)《现代分

子生物学实验技术(*Current Protocols in Molecular Biology*)》,第I卷,格林出版联合公司(Green Publishing Associates, Inc.)和约翰·威利父子公司(John Wiley&Sons, Inc.),纽约(New York)第6.3.1-6.3.6页和第2.10.3页。

[0328] 在某些方面,本文提供了表达(例如,以重组方式)特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的本文所述的抗体(或其抗原结合片段)的细胞(例如,宿主细胞),和相关多核苷酸和表达载体。本文提供了用于在宿主细胞中,优选在哺乳动物细胞中重组表达的包括包含编码抗CTLA-4抗体或片段的核苷酸序列的多核苷酸的载体(例如,表达载体)。本文还提供了包含用于重组表达本文所述的抗CTLA-4抗体(例如,人类或人源化抗体)的此类载体的宿主细胞。在一特定方面,本文提供了用于产生本文所述的抗体的方法,其包含从宿主细胞表达此类抗体。

[0329] 特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的本文所述的抗体(例如,本文所述的全长抗体、抗体的重链和/或轻链、或单链抗体)的重组表达包括构建含有编码抗体的多核苷酸的表达载体。在获得编码本文所述的抗体分子、抗体的重链和/或轻链或其片段(例如,重链和/或轻链可变区)的多核苷酸后,用于产生抗体分子的载体可以使用本领域中熟知的技术通过重组DNA技术产生。因此,通过表达含有抗体或抗体片段(例如,轻链或重链)编码核苷酸序列的多核苷酸制备蛋白质的方法在本文中描述。本领域技术人员熟知的方法可以用于构建含有抗体或抗体片段(例如,轻链或重链)编码序列和适宜的转录和翻译控制信号的表达载体。这些方法包括例如体外重组DNA技术、合成技术和体内遗传重组。还提供了包含可操作地连接于启动子的编码本文所述的抗体分子、抗体的重链或轻链、抗体或其片段的重链或轻链可变区、或者重链或轻链CDR的核苷酸序列的可复制载体。此类载体可以例如包括编码抗体分子的恒定区的核苷酸序列(参见例如,国际公开第W0 86/05807号和第W089/01036号;以及美国专利第5,122,464号,其以全文引用的方式并入本文中),并且抗体的可变区可以克隆到此类载体中用于表达整个重链、整个轻链或整个重链和轻链两者。

[0330] 表达载体可以通过常规技术转移到细胞(例如,宿主细胞)并且所得细胞然后可以通过常规技术培养以产生本文所述的抗体或其片段。因此,本文提供了含有编码本文所述的抗体或其片段、或其重链或轻链或其片段、或本文所述的单链抗体的多核苷酸的宿主细胞,所述多核苷酸可操作地连接于用于在宿主细胞中表达此类序列的启动子。在某些实施例中,为了表达双链抗体,单独地编码重链和轻链两者的载体可以在宿主细胞中共表达以表达整个免疫球蛋白分子,如以下所详述。在某些实施例中,宿主细胞含有包含编码本文所述的抗体或其片段的重链和轻链两者的多核苷酸的载体。在特定实施例中,宿主细胞含有两个不同载体,第一载体包含编码本文所述的抗体或其片段的重链或重链可变区的多核苷酸,并且第二载体包含编码本文所述的抗体或其片段的轻链或轻链可变区的多核苷酸。在其它实施例中,第一宿主细胞包括包含编码本文所述的抗体或其片段的重链或重链可变区的多核苷酸的第一载体,并且第二宿主细胞包括包含编码本文所述的抗体的轻链或轻链可变区的多核苷酸的第二载体。在特定实施例中,由第一细胞表达的重链/重链可变区与第二细胞的轻链/轻链可变区结合以形成本文所述的抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段。在某些实施例中,本文提供了包含此类第一宿主细胞和此类第二宿主细胞的宿主细胞群体。

[0331] 在一特定实施例中,本文提供了载体群体,其包括包含编码本文所述的抗CTLA-4抗体的轻链/轻链可变区的多核苷酸的第一载体,和包含编码本文所述的抗CTLA-4抗体的

重链/重链可变区的多核苷酸的第二载体。

[0332] 多种宿主-表达载体系统可以用于表达本文所述的抗体分子(参见例如,美国专利第5,807,715号)。此类宿主-表达系统代表目标编码序列可以通过其产生并且随后纯化的媒介,而且代表在用适宜的核苷酸编码序列转化或转染时可以原位表达本文所述的抗体分子的细胞。其包括(但不限于)用含有抗体编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的微生物,如细菌(例如,大肠杆菌和枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)) ;用含有抗体编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(例如,毕赤酵母(*Saccharomyces Pichia*)) ;用含有抗体编码序列的重组病毒表达载体(例如,杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;用重组病毒表达载体(例如,花椰菜花叶病毒,CaMV;烟草花叶病毒, TMV)感染的或用含有抗体编码序列的重组质粒表达载体(例如,Ti质粒)转化的植物细胞系统(例如,绿藻,如莱茵衣藻(*Chlamydomonas reinhardtii*)) ;或携带含有来源于哺乳动物细胞基因组的启动子(例如,金属硫蛋白启动子)或来源于哺乳动物病毒的启动子(例如,腺病毒晚期启动子;牛痘病毒7.5K启动子)的重组表达构建体的哺乳动物细胞系统(例如,COS(例如,COS1或COS)、CHO、BHK、MDCK、HEK 293、NS0、PER.C6、VERO、CRL7030、HsS78Bst、HeLa和NIH 3T3、HEK-293T、HepG2、SP210、R1.1、B-W、L-M、BSC1、BSC40、YB/20和BMT10细胞)。在一特定实施例中,用于表达本文所述的抗体或其抗原结合片段的细胞是CHO细胞,例如来自CHO GS SystemTM(龙沙)的CHO细胞。在一特定实施例中,用于表达本文所述的抗体的细胞是人类细胞,例如,人类细胞系。在一特定实施例中,哺乳动物表达载体是pOptiVecTM或pcDNA3.3。在一特定实施例中,尤其用于表达完整重组抗体分子的细菌细胞如大肠杆菌或真核细胞(例如,哺乳动物细胞)用于重组抗体分子的表达。举例来说,与载体(如来自人类巨细胞病毒的主要中早期基因启动子元件)结合的哺乳动物细胞(如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞)是抗体的有效表达系统(Foecking MK与Hofstetter H(1986)《基因(Gene)》45:101-5;和Cockett MI等人,(1990)《生物技术》8(7):662-7,其以全文引用的方式并入本文中)。在某些实施例中,本文所述的抗体通过CHO细胞或NS0细胞产生。在一特定实施例中,编码特异性结合CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的本文所述的抗体的核苷酸序列的表达通过组成型启动子、诱导型启动子或组织特异性启动子调节。

[0333] 在细菌系统中,多种表达载体可以有利地取决于所表达抗体分子预期的用途来选择。举例来说,当待产生大量的此类抗体用于生成抗体分子的药物组合物时,指导高水平的容易纯化的融合蛋白产物的表达的载体可能是希望的。此类载体包括(但不限于)大肠杆菌表达载体pUR278(Ruether U与Mueller-Hill B(1983)EMBO J 2:1791-1794,其以全文引用的方式并入本文中),其中抗体编码序列可以单独地与lac Z编码区同框连接到载体中,使得产生融合蛋白;pIN载体(Inouye S与Inouye M(1985)《核酸研究》13:3101-3109;Van Heeke G与Schuster SM(1989)《生物化学杂志》24:5503-5509,其以全文引用的方式并入本文中);等等。举例来说,pGEX载体也可以用于表达作为与谷胱甘肽5-转移酶(GST)的融合蛋白的外源多肽。一般来说,此类融合蛋白是可溶性的并且可以通过吸附和结合基质谷胱甘肽琼脂糖珠从裂解的细胞纯化,随后在游离谷胱甘肽的存在下洗脱。pGEX载体设计为包括凝血酶或因子Xa蛋白酶裂解位点以使得克隆的靶基因产物可以从GST部分释放。

[0334] 在昆虫系统中,例如,苜蓿银纹夜蛾(*Autographa californica*)核多角体病毒(AcNPV)可以用作表达外源基因的载体。病毒在草地贪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞

中生长。抗体编码序列可以单独地克隆到病毒的非必需区(例如多角体蛋白基因)中并且放在AcNPV启动子(例如多角体蛋白启动子)的控制下。

[0335] 在哺乳动物宿主细胞中,可以使用多种基于病毒的表达系统。在腺病毒用作表达载体的情况下,目标抗体编码序列可以连接到腺病毒转录/翻译控制复合物,例如,晚期启动子和三联体前导序列。这一嵌合基因然后可以通过体外或体内重组插入腺病毒基因组中。病毒基因组的非必需区(例如,E1或E3区)中的插入将产生有活力的并且能够在感染的宿主中表达抗体分子的重组病毒(例如,参见Logan J与Shenk T(1984)PNAS 81(12):3655-9,其以全文引用的方式并入本文中)。特定的起始信号也可能是插入的抗体编码序列的高效翻译所需的。这些信号包括ATG起始密码子和相邻序列。此外,起始密码子必须与所需编码序列的阅读框同相以确保整个插入片段的翻译。这些外源翻译控制信号和起始密码子可以是多种来源的,天然的和合成的。表达的效率可以通过包括适宜的转录增强子元件、转录终止子等增强(参见例如,Bitter G等人,(1987)《酶学方法》153:516-544,其以全文引用的方式并入本文中)。

[0336] 另外,可以选择调节所插入序列的表达或以所需特定方式修饰并且加工基因产物的宿主细胞系。蛋白质产物的此类修饰(例如,糖基化)和加工(例如,裂解)对于蛋白质的功能可能是重要的。不同的宿主细胞具有用于蛋白质和基因产物的翻译后加工和修饰的特征性并且特定的机制。适宜的细胞系或宿主系统可以经选择以确保所表达的外源蛋白的正确修饰和加工。为此目的,可以使用具有用于初级转录物的适当加工、基因产物的糖基化和磷酸化的细胞机制的真核宿主细胞。此类哺乳动物宿主细胞包括(但不限于)CHO、VERO、BHK、HeLa、MDCK、HEK 293、NIH 3T3、W138、BT483、Hs578T、HTB2、BT20和T47D、NS0(不内源地产生任何免疫球蛋白链的鼠类骨髓瘤细胞系)、CRL7030、COS(例如,COS1或COS)、PER.C6、VERO、HsS78Bst、HEK-293T、HepG2、SP210、R1.1、B-W、L-M、BSC1、BSC40、YB/20、BMT10和HsS78Bst细胞。在某些实施例中,本文所述的抗CTLA-4抗体在哺乳动物细胞,如CHO细胞中产生。

[0337] 在一特定实施例中,本文所述的抗体或其抗原结合片段具有降低的岩藻糖含量或没有岩藻糖含量。此类抗体可以使用本领域技术人员已知的技术产生。举例来说,抗体可以在岩藻糖基化能力缺陷或缺乏的细胞中表达。在一特定实例中,敲除 α 1,6-岩藻糖基转移酶的两个等位基因的细胞系可以用于产生具有降低的岩藻糖含量的抗体或其抗原结合片段。

Potelligent[®] 系统(龙沙)是可以用于产生具有降低的岩藻糖含量的抗体或其抗原结合片段的此类系统的一实例。

[0338] 对于重组蛋白的长期、高产率的产生,可以生成稳定表达细胞。举例来说,稳定表达本文所述的抗CTLA-4抗体或其抗原结合片段的细胞系可以经工程改造。在特定实施例中,,本文所提供的细胞稳定表达轻链/轻链可变区和重链/重链可变区,其结合以形成本文所述的抗体或其抗原结合片段。

[0339] 在某些方面,替代使用含有病毒复制起点的表达载体,宿主细胞可以用通过适宜的表达控制元件(例如,启动子、增强子、序列、转录终止子、多腺苷酸化位点等)控制的DNA和可选标志物转化。在引入外源DNA/多核苷酸之后,可以允许经工程改造的细胞在富集培养基中生长1-2天,并且然后转换到选择培养基。重组质粒中的可选标志物赋予对选择的抗性并且允许细胞稳定地整合质粒到其染色体中和生长以形成基因座,其随后可以克隆和扩

增到细胞系中。这种方法可以有利地用于工程改造表达本文所述的抗CTLA-4抗体或其片段的细胞系。此类经工程改造的细胞系可以特别地用于筛选和评估直接或间接地与抗体分子相互作用的组合物。

[0340] 可以使用多种选择系统,包括(但不限于)分别在tk-、hgprt-或aprt-细胞中的单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler M等人,(1977)《细胞(Cell)》11(1):223-32)、次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(Szybalska EH与Szybalski W(1962)PNAS 48(12):2026-2034,其以全文引用的方式并入本文中)和腺嘌呤磷酸核糖基转移酶(Lowy I等人,(1980)《细胞》22(3):817-23,其以全文引用的方式并入本文中)基因。此外,抗代谢物抗性可以用作对于以下基因的选择基础:dhfr,其赋予对甲氨蝶呤的抗性(Wigler M等人,(1980)PNAS 77(6):3567-70;O'Hare K等人,(1981)PNAS 78:1527-31);gpt,其赋予对霉酚酸的抗性(Mulligan RC与Berg P(1981)PNAS 78(4):2072-6);neo,其赋予对氨基糖苷G-418的抗性(Wu GY与Wu CH(1991)《生物疗法(Biotherapy)》3:87-95;Tolstoshev P(1993)《药理学与毒理学年度评论(Ann Rev Pharmacol Toxicol)》32:573-596;Mulligan RC(1993)《科学》260:926-932;和Morgan RA与Anderson WF(1993)《生物化学年度评论(Ann Rev Biochem)》62:191-217;Nabel GJ与Felgner PL(1993)《生物技术趋势(Trends Biotechnol)》11(5):211-5);和hygro,其赋予对潮霉素的抗性(Santerre RF等人,(1984)《基因》30(1-3):147-56),所述文献全部以全文引用的方式并入本文中。重组DNA技术领域中通常已知的方法可以常规地应用于选择所需的重组克隆并且此类方法描述于例如Ausubel FM等人,(编),《现代分子生物学实验技术》,约翰·威利父子公司,纽约州(NY)(1993);Kriegler M,《基因转移和表达,实验室手册(Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual)》,斯托克顿出版社(Stockton Press),纽约州(1990);和第12和13章,Dracopoli NC等人,(编),《人类遗传学实验室指南(Current Protocols in Human Genetics)》,约翰·威利父子公司,纽约州(1994);Colbèvre-Garapin F等人,(1981)《分子生物学杂志》150:1-14中,所述文献以全文引用的方式併入本文中。

[0341] 抗体分子的表达水平可以通过载体扩增提高(关于综述,参见Bebbington CR与Hentschel CCG,使用基于基因扩增的载体在DNA克隆中的哺乳动物细胞中表达克隆基因(The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning),第3卷(学术出版社(Academic Press),纽约,1987),其以全文引用的方式并入本文中)。当表达抗体的载体系统中的标志物是可扩增的时,宿主细胞培养物中存在的抑制剂水平的提高将增加标志物基因的拷贝数。因为扩增的区与抗体基因相关,所以抗体的产生也增加(Crouse GF等人,(1983)《分子细胞生物学(Mol Cell Biol)》3:257-66,其以全文引用的方式并入本文中)。

[0342] 宿主细胞可以用本文所述的两种或更多种表达载体共转染,第一载体编码重链衍生的多肽并且第二载体编码轻链衍生的多肽。两种载体可以含有一致的可选标志物,这使得能够等同地表达重链和轻链多肽。宿主细胞可以用不同量的两种或更多种表达载体共转染。宿主细胞可以用以下比率中任一种的第一表达载体和第二表达载体转染:1:1、1:2、1:3、1:4、1:5、1:6、1:7、1:8、1:9、1:10、1:12、1:15、1:20、1:25、1:30、1:35、1:40、1:45或1:50。

[0343] 或者,可以使用编码并且能够表达重链和轻链多肽两者的单一载体。在此类情况下,轻链应当放在重链之前以避免过量的毒性游离重链(Proudfoot NJ(1986)《自然

(Nature) »322:562-565; 和 Köhler G (1980) PNAS 77:2197-2199, 其以全文引用的方式并入本文中)。重链和轻链的编码序列可以包含cDNA或基因组DNA。表达载体可以是单顺反子的或多顺反子的。多顺反子的核酸构建体可以编码2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个或者2-5、5-10或10-20个范围的基因/核苷酸序列。举例来说, 双顺反子的核酸构建体可以按以下顺序包含启动子、第一基因(例如, 本文所述的抗体的重链)和第二基因(例如, 本文所述的抗体的轻链)。在此类表达载体中, 两个基因的转录可以通过启动子驱动, 而来自第一基因的mRNA的翻译可以是通过帽依赖性(cap-dependent)的扫描机制并且来自第二基因的mRNA的翻译可以是通过非帽依赖性的机制, 例如, 通过IRES。

[0344] 在本文所述的抗体分子已经通过重组表达产生时, 其可以通过本领域已知用于免疫球蛋白分子纯化的任何方法进行纯化, 例如, 通过色谱(例如, 离子交换色谱、亲和色谱, 特别是通过对于蛋白A后的特定抗原的亲和力、和胶柱(sizing column)色谱)、离心、差异溶解度或通过任何其它用于蛋白质纯化的标准技术。此外, 本文所述的抗体可以与本文所述的或本领域中另外已知的异源多肽序列融合以促进纯化。

[0345] 在特定实施例中, 本文所述的抗体或其抗原结合片段被分离或纯化。一般来说, 分离的抗体是基本上不含具有与分离的抗体不同的抗原特异性的其它抗体的抗体。举例来说, 在一特定实施例中, 本文所述的抗体的制剂基本上不含细胞物质和/或化学前体。措辞“基本上不含细胞物质”包括其中抗体与它从其中分离或重组产生的细胞的细胞组分分离的抗体制剂。因此, 基本上不含细胞物质的抗体包括具有少于约30%、20%、10%、5%、2%、1%、0.5%或0.1%(以干重计)的异源蛋白质(本文中也称为“污染蛋白质”)和/或抗体的变异体, 例如, 抗体的不同翻译后修饰形式或抗体的其它不同形式(例如, 抗体片段)的抗体制剂。当抗体重组产生时, 它通常也基本上不含培养基, 即, 培养基占蛋白质制剂体积的少于约20%、10%、2%、1%、0.5%或0.1%。当抗体通过化学合成产生时, 它通常基本上不含化学前体或其它化学物质, 即, 它与参与蛋白质合成的化学前体或其它化学物质分离。因此, 此类抗体制剂具有少于约30%、20%、10%或5%(以干重计)的除目标抗体以外的化学前体或化合物。在一特定实施例中, 本文所述的抗体被分离或纯化。

[0346] 特异性地结合到CTLA-4(例如, 人类CTLA-4)的抗体或其片段可以通过本领域中已知用于抗体合成的任何方法产生, 例如, 通过化学合成或通过重组表达技术。除非另外指示, 否则本文所述的方法利用分子生物学、微生物学、遗传分析、重组DNA、有机化学、生物化学、PCR、寡核苷酸合成和修饰、核酸杂交和现有技术的相关领域中的常规技术。这些技术描述于例如本文所引用的参考文献中并在文献中有充分说明。参见例如, Maniatis T等人, (1982)《分子克隆: 实验指南(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》, 冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press); Sambrook J等人, (1989), 《分子克隆: 实验指南》, 第二版, 冷泉港实验室出版社; Sambrook J等人, (2001)《分子克隆: 实验指南》, 冷泉港实验室出版社, 纽约州冷泉港(Cold Spring Harbor, NY); Ausubel FM等人, 《现代分子生物学实验技术》, 约翰·威利父子公司(1987和年度更新); 《免疫学实验室指南(Immunochemistry Protocols)》, 约翰·威利父子公司(1987和年度更新); Gait (编) (1984)《寡核苷酸合成: 实用方法(Oligonucleotide Synthesis:A Practical Approach)》, IRL出版社(IRL Press); Eckstein (编) (1991)《寡核苷酸和类似物: 实用方法(Oligonucleotides and Analogues:A Practical Approach)》, IRL出版社; Birren B等

人, (编) (1999)《基因组分析:实验室手册(Genome Analysis:A Laboratory Manual)》, 冷泉港实验室出版社, 所述文献全部以全文引用的方式并入本文中。

[0347] 在一特定实施例中, 本文所述的抗体是通过涉及DNA序列的产生(例如, 经由合成)、遗传工程改造的任何方式制备、表达、产生或分离的抗体(例如, 重组抗体)。在某些实施例中, 此类抗体包含不天然存在于动物或哺乳动物(例如, 人类)体内的抗体胚系库内的序列(例如, DNA序列或氨基酸序列)。

[0348] 在一个方面, 本文提供了一种产生特异性结合到CTLA-4(例如, 人类CTLA-4)的抗体或其抗原结合片段的方法, 其包含培养本文所述的细胞或宿主细胞。在某一方面, 本文提供了一种产生特异性结合到CTLA-4(例如, 人类CTLA-4)的抗体或其抗原结合片段的方法, 其包含使用本文所述的细胞或宿主细胞(例如, 包含编码本文所述的抗体的多核苷酸的细胞或宿主细胞)表达(例如, 重组表达)抗体或其抗原结合片段。在一特定实施例中, 细胞是分离的细胞。在一特定实施例中, 外源多核苷酸已经被引入细胞中。在一特定实施例中, 所述方法进一步包含纯化从细胞或宿主细胞获得的抗体或其抗原结合片段的步骤。优选地, 所述方法体外进行。

[0349] 用于产生多克隆抗体的方法是本领域中已知的(参见例如《精编分子生物学实验指南(Short Protocols in Molecular Biology)》, (2002)第5版, Ausubel FM等人编, 约翰·威利父子出版公司, 纽约中的第11章, 其以全文引用的方式并入本文中)。

[0350] 单克隆抗体可以使用本领域中已知的各种技术制备, 包括使用杂交瘤、重组和噬菌体展示技术或其组合。举例来说, 单克隆抗体可以使用杂交瘤技术产生, 包括本领域中已知的和例如在Harlow E与Lane D, 《抗体:实验室手册》, (冷泉港实验室出版社, 第2版1988); Hammerling GJ等人, 《单克隆抗体和T细胞杂交瘤(Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas)》563-681(爱思唯尔(Elsevier), 纽约州, 1981)中传授的那些, 所述文献以全文引用的方式并入本文中。如本文所用的术语“单克隆抗体”不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。举例来说, 单克隆抗体可以从外源表达本文所述的抗体或其片段(例如此类抗体的轻链和/或重链)的宿主细胞重组产生。

[0351] 在特定实施例中, 如本文所用的“单克隆抗体”是通过单一细胞(例如, 产生重组抗体的杂交瘤或宿主细胞)产生的抗体, 其中抗体特异性结合到CTLA-4(例如, 人类CTLA-4), 如例如, 通过ELISA或本领域中已知的或本文提供的实例中的其它抗原结合或竞争结合分析法所测定。在特定实施例中, 单克隆抗体可以是嵌合抗体或人源化抗体。在某些实施例中, 单克隆抗体是单价抗体或多价(例如, 二价)抗体。在特定实施例中, 单克隆抗体是单特异性或多特异性抗体(例如, 双特异性抗体)。举例来说, 本文所述的单克隆抗体可以例如通过如Kohler G与Milstein C(1975)《自然》256:495中所述的杂交瘤方法产生, 或可以例如使用如本文所述的技术从噬菌体文库分离。用于制备克隆细胞系和由此表达的单克隆抗体的其它方法是本领域中熟知的(参见例如《精编分子生物学实验指南》, (2002)第5版中的第11章, Ausubel FM等人, 同前文献)。

[0352] 使用杂交瘤技术产生和筛选特异性抗体的方法是常规的和本领域中熟知的。举例来说, 在杂交瘤方法中, 小鼠或其它适宜的宿主动物(如绵羊、山羊、兔、大鼠、仓鼠或猕猴)经过免疫以引发产生或能够产生特异性结合到用于免疫的蛋白质(例如, CTLA-4(例如, 人类CTLA-4))的抗体的淋巴细胞。或者, 淋巴细胞可以在体外进行免疫。淋巴细胞然后使用合

适的融合剂(如聚乙二醇)与骨髓瘤细胞融合以形成杂交瘤细胞(Goding JW(编),《单克隆抗体:原理和实践(Monoclonal Antibodies:Principles and Practice)》,第59-103页(学术出版社,1986),其以全文引用的方式并入本文中)。另外,RIMMS(多位点重复免疫)技术可以用于使动物免疫(Kilpatrick KE等人,(1997)《杂交瘤》16:381-9,其以全文引用的方式并入本文中)。

[0353] 在一些实施例中,小鼠(或其它动物,如大鼠、猴、驴、猪、绵羊、仓鼠或狗)可以用抗原(例如,CTLA-4(例如,人类CTLA-4))免疫并且在检测到免疫反应时,例如,对于抗原特异性的抗体在小鼠血清中检测到时,收获小鼠脾脏并且分离脾细胞。脾细胞然后通过熟知技术与任何合适的骨髓瘤细胞融合,例如与来自可从美国菌种保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC[®]) (弗吉尼亚州马纳萨斯(Manassas, VA))获得的细胞系SP20的细胞融合,形成杂交瘤。选择杂交瘤并且通过有限稀释法克隆。在某些实施例中,收获免疫小鼠的淋巴结并且使其与NS0骨髓瘤细胞融合。

[0354] 如此制备的杂交瘤细胞在优选含有抑制未融合的亲本骨髓瘤细胞的生长或存活的一种或多种物质的合适培养基中接种和生长。举例来说,如果亲本骨髓瘤细胞缺乏酶次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT或HPRT),那么用于杂交瘤的培养基典型地将包括次黄嘌呤、氨基喋呤(aminopterin)和胸苷(HAT培养基),这些物质防止HGPRT-缺陷细胞的生长。

[0355] 特定实施例利用高效地融合、支持所选抗体产生细胞的稳定高水平抗体产生并且对如HAT培养基的培养基敏感的骨髓瘤细胞。在这些骨髓瘤细胞系中有鼠类骨髓瘤系,如NS0细胞系,或来源于可从美国加利福尼亚州圣地亚哥(San Diego, CA, USA)的索尔克研究所细胞分配中心(Salk Institute Cell Distribution Center)获得的MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤的骨髓瘤细胞系,以及可从美国马里兰州罗克维尔(Rockville, MD, USA)的美国菌种保藏中心获得的SP-2或X63-Ag8.653细胞。人类骨髓瘤和小鼠-人类杂交骨髓瘤细胞系也已经描述用于产生人类单克隆抗体(Kozbor D(1984)《免疫学杂志》133:3001-5; Brodeur等人,《单克隆抗体产生技术和应用(Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications)》,第51-63页(马塞尔德克公司(Marcel Dekker, Inc.),纽约,1987),其以全文引用的方式并入本文中)。

[0356] 分析其中生长有杂交瘤细胞的培养基的针对CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的单克隆抗体的产生。由杂交瘤细胞产生的单克隆抗体的结合特异性通过本领域中已知的方法(例如免疫沉淀)或通过体外结合分析法(如放射免疫分析法(RIA)或酶联免疫吸附分析法(ELISA))来测定。

[0357] 在鉴别了产生具有所需特异性、亲和力和/或活性的抗体的杂交瘤细胞之后,克隆可以通过有限稀释程序亚克隆并且通过标准方法生长(Goding JW(编),《单克隆抗体:原理和实践》,同前文献)。用于这一目的的合适的培养基包括例如D-MEM或RPMI 1640培养基。另外,杂交瘤细胞可以在动物中作为腹水瘤在体内生长。

[0358] 通过亚克隆分泌的单克隆抗体通过常规免疫球蛋白纯化程序,如蛋白A-琼脂糖、羟磷灰石色谱法、凝胶电泳、透析或亲和色谱法,从培养基、腹水或血清适当地分离。

[0359] 本文所述的抗体包括识别特定CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的抗体片段并且可以通过本领域技术人员已知的任何技术产生。举例来说,本文所述的Fab和F(ab')₂片段可以使

用酶,如木瓜蛋白酶(以产生Fab片段)或胃蛋白酶(以产生 $F(ab')_2$ 片段),通过免疫球蛋白分子的蛋白水解裂解产生。Fab片段对应于抗体分子的两个一致臂之一并且含有与重链的VH和CH1结构域配对的完整轻链。 $F(ab')_2$ 片段含有通过铰链区中的二硫键连接的抗体分子的两个抗原结合臂。

[0360] 此外,本文所述的抗体或其抗原结合片段还可以使用本领域中已知的各种噬菌体展示方法产生。在噬菌体展示方法中,功能性抗体结构域展示在携带编码其的多核苷酸序列的噬菌体颗粒的表面上。具体来说,编码VH和VL结构域的DNA序列从动物cDNA文库(例如,受影响的组织的人类或鼠类cDNA文库)扩增。编码VH和VL结构域的DNA通过PCR与scFv连接子重组在一起并且克隆到噬菌体载体中。载体电穿孔到大肠杆菌中并且大肠杆菌用辅助噬菌体感染。用于这些方法中的噬菌体典型地是丝状噬菌体,包括fd和M13,并且VH和VL结构域通常与噬菌体基因III或基因VIII重组融合。表达结合到特定抗原的抗原结合结构域的噬菌体可以用抗原,例如,使用标记的抗原或者结合或捕获到固体表面或珠粒的抗原,进行选择或鉴别。可以用于产生本文所述的抗体的噬菌体展示方法的实例包括Brinkman U等人,(1995)《免疫学方法杂志》182:41-50;Ames RS等人,(1995)《免疫学方法杂志》184:177-186;Kettleborough CA等人,(1994)《欧洲免疫学杂志(Eur J Immunol)》24:952-958;Persic L等人,(1997)《基因》187:9-18;Burton DR与Barbas CF(1994)《免疫学进展(Advan Immunol)》57:191-280;PCT申请第PCT/GB91/001134号;国际公开第WO 90/02809号、第WO 91/10737号、第WO 92/01047号、第WO 92/18619号、第WO 93/11236号、第WO 95/15982号、第WO 95/20401号和第WO 97/13844号;和美国专利第5,698,426号、第5,223,409号、第5,403,484号、第5,580,717号、第5,427,908号、第5,750,753号、第5,821,047号、第5,571,698号、第5,427,908号、第5,516,637号、第5,780,225号、第5,658,727号、第5,733,743号和第5,969,108号中公开的那些,所述文献全部以全文引用的方式并入本文中。

[0361] 如以上参考文献中所描述,在噬菌体选择之后,来自噬菌体的抗体编码区可以分离并用于产生全抗体(包括人类抗体),或任何其它所需抗原结合片段,并且在任何所需宿主(包括哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞、酵母和细菌)中表达,例如,如下文所描述。重组产生抗体片段如Fab、Fab'和 $F(ab')_2$ 片段的技术也可以使用本领域中已知的方法来利用,如PCT公开第WO 92/22324号;Mullinax RL等人,(1992)《生物技术》12(6):864-9;Sawai H等人,(1995)《美国生殖免疫学杂志(Am J Reprod Immunol)》34:26-34;和Better M等人,(1988)《科学》240:1041-1043中公开的那些方法,所述文献全部以全文引用的方式并入本文中。

[0362] 在某些实施例中,为了产生全抗体,包括VH或VL核苷酸序列、限制位点和保护限制位点的侧翼序列的PCR引物可以用于从模板(例如,scFv克隆)扩增VH或VL序列。利用本领域技术人员已知的克隆技术,PCR扩增的VH结构域可以克隆到表达VH恒定区的载体中,并且PCR扩增的VL结构域可以克隆到表达VL恒定区(例如,人类κ或λ恒定区)的载体中。VH和VL结构域也可以克隆到表达必需恒定区的一个载体中。重链转换载体和轻链转换载体然后使用本领域技术人员已知的技术共转染到细胞系中以产生表达全长抗体(例如,IgG)的稳定或瞬时细胞系。

[0363] 嵌合抗体是抗体的不同部分来源于不同免疫球蛋白分子的分子。举例来说,嵌合抗体可以含有与人类抗体的恒定区融合的小鼠或大鼠单克隆抗体的可变区。产生嵌合抗体

的方法是本领域中已知的。参见例如, Morrison SL (1985)《科学》229:1202-7;0i VT与Morrison SL (1986)《生物技术》4:214-221;Gillies SD等人, (1989)《免疫学方法杂志》125:191-202;和美国专利第5,807,715号、第4,816,567号、第4,816,397号和第6,331,415号,其全部以全文引用的方式并入本文中。

[0364] 人源化抗体能够结合到预定抗原并且包含基本上具有人类免疫球蛋白的氨基酸序列的框架区和基本上具有非人类免疫球蛋白(例如,鼠类免疫球蛋白)的氨基酸序列的CDR。在特定实施例中,人源化抗体还包含免疫球蛋白恒定区((Fc)的至少一部分,典型地人类免疫球蛋白的恒定区的一部分。抗体还可以包括重链的CH1、铰链、CH2、CH3和CH4区。人源化抗体可以选自免疫球蛋白的任何类别,包括IgM、IgG、IgD、IgA和IgE,和任何同型,包括IgG₁、IgG₂、IgG₃和IgG₄。人源化抗体可以使用本领域中已知的多种技术产生,包括(但不限于)CDR-移植(欧洲专利第EP 239400号;国际公开第WO 91/09967号;和美国专利第5,225,539号、第5,530,101号和第5,585,089号)、镶嵌(veneering)或表面重塑(resurfacing)(欧洲专利第EP 592106号和第EP 519596号;Padlan EA (1991)《分子免疫学》28 (4/5) :489-498;Studnicka GM等人, (1994)《蛋白质工程(Prot Engineering)》7 (6) :805-814;和Roguska MA等人, (1994)PNAS 91:969-973)、链改组(美国专利第5,565,332号)和例如,美国专利第6,407,213号、美国专利第5,766,886号、国际公开第WO 93/17105号;Tan P等人, (2002)《免疫学杂志》169:1119-25;Caldas C等人, (2000)《蛋白质工程》13 (5) :353-60;Morea V等人, (2000)《方法》20 (3) :267-79;Baca M等人, (1997)《生物化学杂志》272 (16) :10678-84;Roguska MA等人, (1996)《蛋白质工程》9 (10) :895-904;Couto JR等人, (1995)《癌症研究》55 (23增刊) :5973s-5977s;Couto JR等人, (1995)《癌症研究》55 (8) :1717-22;Sandhu JS (1994)《基因》150 (2) :409-10;和Pedersen JT等人, (1994)《分子生物学杂志》235 (3) :959-73中公开的技术,所述文献全部以全文引用的方式并入本文中。还参见美国申请公开第US2005/0042664A1号(2005年2月24日),其以全文引用的方式并入本文中。

[0365] 产生多特异性抗体(例如,双特异性抗体)的方法已经被描述,参见例如,美国专利第7,951,917号、第7,183,076号、第8,227,577号、第5,837,242号、第5,989,830号、第5,869,620号、第6,132,992号和第8,586,713号,所述文献全部以全文引用的方式并入本文中。

[0366] 单结构域抗体,例如缺乏轻链的抗体,可以通过本领域中熟知的方法产生。参见Riechmann L与Muylleermans S (1999)《免疫学杂志》231:25-38;Nuttall SD等人, (2000)《当今药物生物技术(Curr Pharm Biotechnol)》1 (3) :253-263;Muylleermans S, (2001)《生物技术杂志(J Biotechnol)》74 (4) :277-302;美国专利第6,005,079号;和国际公开第WO 94/04678号、第WO 94/25591号和第WO 01/44301号,其全部以全文引用的方式并入本文中。

[0367] 此外,特异性结合到CTLA-4抗原的抗体又可以用于使用本领域技术人员熟知的技术产生“模拟”抗原的抗独特型抗体。(参见例如,Green span NS与Bona CA (1989)FASEB J 7 (5) :437-444;和Nissinoff A (1991)《免疫学杂志》147 (8) :2429-2438,其以全文引用的方式并入本文中)。

[0368] 在特定实施例中,与本文所述的抗CTLA-4抗体结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的相同表位的本文所述的抗体是人类抗体或其抗原结合片段。在特定实施例中,竞争性阻断(例如,以剂量依赖性方式)任何一种本文所述的抗体结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)

的本文所述的抗体是人类抗体或其抗原结合片段。人类抗体可以使用本领域中已知的任何方法产生。举例来说,可以使用不能表达功能性内源免疫球蛋白但可以表达人类免疫球蛋白基因的转基因小鼠。具体来说,人类重链和轻链免疫球蛋白基因复合物可以随机地或通过同源重组引入小鼠胚胎干细胞中。或者,除人类重链和轻链基因之外,人类可变区、恒定区和多变区可以引入小鼠胚胎干细胞中。小鼠重链和轻链免疫球蛋白基因可以通过同源重组单独或与人类免疫球蛋白基因座的引入同时地显现为非功能性。具体来说,J_H区的纯合缺失阻止内源抗体产生。修饰的胚胎干细胞被扩增并微注射到囊胚中以产生嵌合小鼠。嵌合小鼠然后可以繁殖以产生表达人类抗体的纯合后代。转基因小鼠用所选抗原,例如,抗原(例如,CTLA-4)的全部或一部分,以正常方式进行免疫。针对抗原的单克隆抗体可以使用常规杂交瘤技术从免疫的转基因小鼠获得。转基因小鼠携带的人类免疫球蛋白转基因在B细胞分化期间重排,并且随后经历类别转换和体细胞突变。因此,使用此类技术,有可能产生治疗上有用的IgG、IgA、IgM和IgE抗体。关于用于产生人类抗体的这种技术的综述,参见Lonberg N与Huszar D(1995)《国际免疫学评论(Int Rev Immunol)》13:65-93,所述文献以全文引用的方式并入本文中。关于用于产生人类抗体和人类单克隆抗体的这种技术和用于产生此类抗体的方案的详细论述,参见例如,国际公开第W0 98/24893号、第W0 96/34096号和第W0 96/33735号;以及美国专利第5,413,923号、第5,625,126号、第5,633,425号、第5,569,825号、第5,661,016号、第5,545,806号、第5,814,318号和第5,939,598号。能够产生人类抗体的小鼠的实例包括XenomouseTM(安根尼克斯公司;美国专利第6,075,181号和的6,150,184号)、HuAb-MouseTM(Mederex, Inc./Gen Pharm;美国专利第5,545,806号和第5,569,825号)、Trans Chromo MouseTM(麒麟(Kirin))和KM MouseTM(Medarex/麒麟),其全部以全文引用的方式并入本文中。

[0369] 特异性结合到CTLA-4(例如,人类CTLA-4)的人类抗体可以通过本领域中已知的多种方法产生,包括使用来源于人类免疫球蛋白序列的抗体文库的上述噬菌体展示方法。还参见美国专利第4,444,887号、第4,716,111号和第5,885,793号;以及国际公开第W0 98/46645号、第W0 98/50433号、第W0 98/24893号、第W0 98/16654号、第W0 96/34096号、第W0 96/33735号和第W0 91/10741号,其全部以全文引用的方式并入本文中。

[0370] 在一些实施例中,人类抗体可以使用小鼠-人类杂交瘤产生。举例来说,用埃-巴二氏病毒(EBV)转化的人类外周血淋巴细胞可以与小鼠骨髓瘤细胞融合以产生分泌人类单克隆抗体的小鼠-人类杂交瘤,并且这些小鼠-人类杂交瘤可以进行筛选以确定分泌特异性结合到靶抗原(例如,CTLA-4(例如,人类CTLA-4))的人类单克隆抗体的小鼠-人类杂交瘤。此类方法是已知的并且描述于本领域中,参见例如,Shinmoto H等人,(2004)《细胞工程技术(Cytotechnology)》46:19-23;Naganawa Y等人,(2005)《人类抗体(Human Antibodies)》14:27-31,所述文献以全文引用的方式并入本文中。

[0371] 1.6试剂盒

[0372] 还提供了试剂盒,其包含一种或多种本文所述的抗体或其药物组合物或缀合物。在一特定实施例中,本文提供了一种药物包装或试剂盒,其包含填充有本文所述的药物组合物的一种或多种成分(如一种或多种本文所提供的抗体或其抗原结合片段)的一个或多个容器。在一些实施例中,试剂盒含有本文所述的药物组合物和任何预防剂或治疗剂,如本文所述的那些。在某些实施例中,试剂盒可以含有T细胞丝裂原,如植物血凝素

(phytohaemagglutinin, PHA) 和/或乙酸肉豆蔻酸佛波醇酯(phorbol myristate acetate, PMA), 或者TCR复合物刺激抗体, 如抗CD3抗体和抗CD28抗体。任选地与此类容器结合的可以是管理药物或生物产品的制造、使用或销售的政府机构规定的形式的通告, 所述通告反映了所述机构对于制造、使用和销售用于人类施用的批准。

[0373] 还提供了可以用于以上方法的试剂盒。在一个实施例中, 试剂盒在一个或多个容器中包含本文所述的抗体, 优选纯化的抗体。在一特定实施例中, 本文所述的试剂盒含有作为对照的基本上分离的CTLA-4抗原(例如, 人类CTLA-4)。在另一特定实施例中, 本文所述的试剂盒进一步包含不与CTLA-4抗原反应的对照抗体。在另一特定实施例中, 本文所述的试剂盒含有用于检测抗体与CTLA-4抗原的结合的一个或多个元件(例如, 抗体可以缀合到可检测的底物, 如荧光化合物、酶底物、放射性化合物或发光化合物, 或者识别第一抗体的第二抗体可以缀合到可检测的底物)。在特定实施例中, 本文所提供的试剂盒可以包括重组产生的或化学合成的CTLA-4抗原。试剂盒中提供的CTLA-4抗原也可以附接于固体载体。在一更特定实施例中, 上述试剂盒的检测手段包括上面附接有CTLA-4抗原的固体载体。此类试剂盒还可以包括非附接的报告子标记的抗人类抗体或抗小鼠/大鼠抗体。在这个实施例中, 抗体与CTLA-4抗原的结合可以通过所述报告子标记的抗体的结合来检测。

[0374] 在一个实施例中, 本发明涉及一种本发明的试剂盒的用途, 其用于体外分析和/或检测生物样品中的人类CTLA-4。

[0375] 2. 实例

[0376] 这一部分(即, 第2部分)中的实例是以说明的方式提供的, 而不是作为限制。

[0377] 2.1 实例1: 新颖抗CTLA-4抗体的表征

[0378] 这个实例描述了结合到人类CTLA-4的抗体的表征。具体来说, 这个实例描述了特异性结合到人类CTLA-4并且抑制CTLA-4功能的抗体的表征。这些抗体的可变区的序列信息提供于表4中。所有抗体都表示为IgG₁抗体并且在下文描述的分析法中分析。

[0379] 2.1.1 抗CTLA-4抗体与表达CTLA-4的细胞的结合

[0380] 经工程改造以组成性表达人类CTLA-4的Jurkat细胞(普洛麦格(Promega))用于分析抗CTLA-4抗体的结合。简单来说, 将细胞在4℃下在96孔板中使用2μg/ml抗体以5×10⁵个细胞/孔染色30分钟。将细胞洗涤两次并且在4℃下与抗人类IgG二级抗体(赛默科技(Thermo Scientific), 目录号31529)一起孵育20分钟。将细胞洗涤并且悬浮于50μl的在PBS中制备的2%多聚甲醛(阿法埃莎(Alfa Aesar), 目录号43368)中。用BD FACS Canto II收集数据。

[0381] 如图1A-1G中所示, 所有测试的抗CTLA-4抗体都结合到表达CTLA-4的细胞。

[0382] 2.1.2 在葡萄球菌肠毒素A(SEA)刺激之后人类PBMC上抗CTLA-4抗体的作用

[0383] 在葡萄球菌肠毒素A(SEA)刺激之后评估初级人类PBMC上抗CTLA-4抗体AGEN1884.H3(IgG₁)的功能活性。简单来说, 将冷冻保存的PBMC在37℃和5%CO₂下用100ng/ml SEA超抗原(Toxin Technologies, 目录号at101red)在不存在或存在10μg/ml抗CTLA-4抗体或同型对照抗体(IgG₁)下刺激5天。通过AlphaLISA(珀金埃尔默(Perkin Elmer), 目录号AL221F)分析培养物上清液中的IL-2浓度。

[0384] 抗CTLA-4抗体AGEN1884.H3(IgG₁)增加经SEA超抗原刺激的人类PBMC中的IL-2产生(图2)。

[0385] 2.1.3 IL-2-荧光素酶报告子细胞系上抗CTLA-4抗体的作用

[0386] 随后,使用IL-2-荧光素酶报告子分析法进一步分析抗CTLA-4抗体AGEN1884.H3(IgG₁)的功能活性。简单来说,将内源性表达CD3和CD28的人类T细胞系(Jurkat)工程改造以组成性表达细胞表面CTLA-4并且通过IL-2启动子驱动荧光素酶报告基因。将Jurkat报告子细胞系与内源性表达CD80和CD86并且经工程改造以表达专用T细胞活化剂(普洛麦格)的抗原呈递细胞系(Raji)共培养。T细胞受体(TCR)触发(信号1)由T细胞活化剂实现;并且共刺激信号传导(信号2)以反式由Raji细胞上表达的CD80和CD86提供。Jurkat T细胞系中的TCR信号传导触发IL-2表达,导致荧光素酶产生(T细胞活化的替代标志物)。共培养这两种细胞系导致抑制性共受体CTLA-4(表达于Jurkat细胞上)与其天然配体CD80和CD86(表达于Raji细胞上)的接合,抑制T细胞活化,由荧光素酶表达的缺乏展现。这一抑制在添加增加浓度的抗CTLA-4阻断抗体后减轻。使用Bio-GloTM试剂定量荧光素酶表达,并且所得数据用于确定倍数反应值(AGEN1884.H3(IgG₁)与同型对照抗体(IgG₁)相比的倍数增加)。

[0387] 如图3中所示,在这个IL-2-荧光素酶报告子分析法中,抗CTLA-4抗体AGEN1884.H3(IgG₁)剂量依赖性地减轻CTLA-4介导的T细胞抑制。

[0388] 2.1.4 Fc γ受体IIIA报告子细胞系上抗CTLA-4抗体的作用

[0389] 使用表达Fc γ受体IIIA(Fc γ RIIIA)的报告子细胞系(普洛麦格)评估抗CTLA-4抗体经由活化Fc γ受体共接合CTLA-4和信号的能力。简单来说,将Jurkat细胞工程改造以组成性表达细胞表面上的人类CTLA-4。将这些靶细胞与经工程改造以表达驱动萤火虫荧光素酶表达的NFAT反应元件(RE)上游的Fc γ RIIIA(V158变异体)的效应细胞系(Jurkat)共培养。添加滴定剂量的AGEN1884.H3(IgG₁)或同型对照抗体(IgG₁)到共培养物并且在37℃下孵育过夜。AGEN1884.H3由靶细胞系(通过Fab区结合到CTLA-4)和效应细胞系(通过Fc区结合到Fc γ RIIIA)的同时接合触发NFAT RE报告基因活化和荧光素酶表达。第二天,添加Bio-Glo试剂(普洛麦格)到共培养物,通过EnVision多模板读取器(Multimode Plate Reader)(珀金埃尔默)测量发光,并且记录相对光单位(RLU)以计算倍数反应值(AGEN1884.H3(IgG₁)与同型对照抗体(IgG₁)相比的倍数增加)。

[0390] 当结合到表达细胞表面上的人类CTLA-4的靶细胞时,IgG₁抗体AGEN1884.H3活化效应细胞中的Fc γ RIIIA信号传导(图4)。

[0391] 2.2实例2:具有不同Fc区的抗CTLA-4抗体的表征

[0392] 这个实例分析了Fc/Fc受体相互作用对抗CTLA-4抗体的功能活性的影响。AGEN1884.H3表示为IgG₁Fc区包含S239D/I332E、S239D/A330L/I332E或L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L突变的抗体,根据EU编号系统编号,并且在下文描述的功能分析法中进行测试。抗体AGEN1884.H3(IgG₁S239D/I332E)包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:24的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:27的轻链。抗体AGEN1884.H3(IgG₁S239D/A330L/I332E)包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:25的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:27的轻链。抗体AGEN1884.H3(IgG₁L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L)包括包含氨基酸序列SEQ ID NO:26的重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:27的轻链。为了比较,AGEN1884还表示为野生型IgG₁抗体、包含S239D/I332E或S239D/A330L/I332E突变(根据EU编号系统编号)的IgG₁抗体、或无岩藻糖基化的IgG₁抗体,并且在一些功能分析法中进行测试。

[0393] 2.2.1抗CTLA-4抗体与表达CTLA-4的细胞的结合

[0394] 与上文所描述类似地表征抗CTLA-4抗体AGEN1884.H3 (IgG₁S239D/I332E)、AGEN1884.H3 (IgG₁S239D/A330L/I332E) 和AGEN1884.H3 (IgG₁L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L) 与表达CTLA-4的细胞的结合。简单来说,将经工程改造以表达人类CTLA-4的Jurkat细胞(普洛麦格)首先用5μg/ml抗CTLA-4抗体或同型对照抗体染色,并且然后用抗人类IgG二级抗体(赛默科技,目录号31529)染色。使用BD FACS Canto II分析细胞。

[0395] 如图5A-5D中所示,具有不同Fc区的AGEN1884.H3抗体都结合到表达人类CTLA-4的细胞。

[0396] 2.2.2抗CTLA-4抗体对配体与人类CTLA-4的结合的作用

[0397] 在这个实例中,测试Fc变异抗CTLA-4抗体AGEN1884.H3 (IgG₁-S239D/A330E/I332E) 阻断人类CTLA-4与其配体CD80和CD86之间的结合的能力。

[0398] 简单来说,使重组CD80-Fc和CD86-Fc蛋白缀合到荧光染料Alexa Fluor 647(英杰(Invitrogen),A20186)。将Jurkat细胞用trCTLA4(截短的胞内结构域)在EF1α启动子的控制下转导,如Nakaseko等人(《实验医学杂志》,1999年9月20日;190(6):765-774)中所描述,因此产生组成性表达细胞表面上的人类CTLA-4的细胞系。将表达CTLA-4的细胞与剂量滴定的抗CTLA-4抗体AGEN1884.H3 (IgG₁-S239D/A330E/I332E)、参考抗CTLA-4抗体或同型对照抗体(IgG₁)一起孵育。然后将细胞用荧光标记的CD80-Fc或CD86-Fc蛋白染色。在染色之后,使用LSRFortessa流式细胞仪(BD Biosciences)分析荧光。使用FACS DIVA和WEHI Weasel软件的组合分析FACS图。使用Graphpad Prism软件绘制值。

[0399] 如图6A中所示,AGEN1884.H3 (IgG₁-S239D/A330E/I332E) 和参考抗CTLA-4抗体各自以剂量依赖性方式阻断人类CTLA-4与CD80之间的结合,而同型对照抗体(IgG₁)不具有作用。如图6B中所示,AGEN1884.H3 (IgG₁-S239D/A330E/I332E) 和参考抗CTLA-4抗体各自还以剂量依赖性方式阻断人类CTLA-4与CD86之间的结合,而同型对照抗体(IgG₁)不具有作用。这些数据显示,AGEN1884.H3 (IgG₁-S239D/A330E/I332E) 充当CTLA-4的配体阻断抗体。

[0400] 2.2.3在葡萄球菌肠毒素A(SEA)刺激之后人类PBMC上抗CTLA-4抗体的作用

[0401] 在这个实例中,使用上文所描述的SEA刺激分析法分析Fc区对抗CTLA-4抗体的功能活性的影响。简单来说,将人类PBMC在体外与100ng/ml SEA肽(Toxin Technologies,目录号at101red)一起在不存在或存在具有不同Fc区的抗CTLA-4抗体或同型对照抗体下培养。五天后,使用AlphaLISA(珀金埃尔默,目录号AL221F)测量培养物上清液中的IL-2(T细胞活化的标志物)浓度。

[0402] 如图7A中所示,在IgG₁Fc区中含有突变的三种AGEN1884.H3抗体(其全部增强与FcγRIIIA的结合)比具有野生型IgG₁Fc区的AGEN1884.H3刺激更多IL-2分泌。

[0403] 在类似研究中,在SEA刺激分析法中测试具有不同Fc区的AGEN1884.H3或AGEN1884抗体。在IgG₁Fc区中引入S239D/I332E、S239D/A330L/I332E或L235V/F243L/R292P/Y300L/P396L取代显著地增强AGEN1884.H3的功能活性(图7B)。类似地,与具有野生型IgG₁Fc区的AGEN1884相比,AGEN1884(IgG₁S239D/I332E)、AGEN1884(IgG₁S239D/A330L/I332E)和无岩藻糖基化的AGEN1884(IgG₁)以实质性更低浓度增强IL-2产生(图7C)。

[0404] 2.2.4抗CTLA-4抗体对ZAP70磷酸化的作用

[0405] 在这个实例中,使用一分析法分析在T细胞-抗原呈递细胞(APC)突触中Fc区对抗CTLA-4抗体的功能活性的影响,所述分析法测量蛋白质酪氨酸激酶ZAP70的磷酸化程度,所

述激酶在TCR接合之后募集到TCR,其中所述激酶变得磷酸化并且促进下游信号传导事件。

[0406] 简单来说,将人类PBMC与次优浓度的SEA肽和10 μ g/mL同型对照抗体(IgG₁)或抗CTLA-4抗体AGEN1884.H3(IgG₁)、AGEN1884.H3(IgG₁S239D/A330L/I332E)或AGEN1884.H3(IgG₁N297A)一起孵育。然后将细胞在37℃下孵育0(预)、1、5、10、30或60分钟。在孵育结束时,将细胞用补充有磷酸酶/蛋白酶抑制剂混合物(细胞信号传导技术(Cell Signaling Technologies))的冷1×RIPA缓冲液裂解。在上清液澄清之后,使用二辛可宁酸(BCA)分析(皮尔斯生物技术(Pierce Biotechnology))定量蛋白质浓度。将细胞裂解物(20 μ g/泳道)在经稀释的Bolt LDS样品缓冲液中制备,并且在70℃下加热10分钟,随后装载到4-12% Bolt Bis Tris凝胶(Novex)上。将蛋白质在1×Bolt MOPS-缓冲液(赛默飞世尔(ThermoFisher))中分离,并且然后印迹到PVDF膜上。在用5%牛血清白蛋白(BSA,1小时)阻断之后,将样品在4℃下在阻断缓冲液中与初级抗人类兔磷酸化-ZAP70(Tyr493)/Syk(Tyr526)抗体(细胞信号传导技术)一起孵育过夜。用山羊抗兔二级HRP-缀合物探测膜并且用SignalFire ECL试剂(细胞信号传导技术)使其显像。使用Chemidoc成像系统(伯乐(BioRad))采集图像。作为对照,在用RestoreTM PLUS蛋白质印迹膜再生液(Western Blot Stripping Buffer)进行膜再生(membrane stripping)之后评估总ZAP70蛋白。使用Image J(Wayne Rasband;国家心理健康研究所(National Institute of Mental Health),美国马里兰州贝塞斯达(Bethesda,MD,USA))对针对总ZAP70标准化的磷酸化-ZAP70执行密度计分析,并且将其表示为相对于孵育1分钟的同型对照处理样品的倍数变化。

[0407] 如图8A-8B中所示,在同型对照抗体样品中,ZAP70磷酸化在刺激之后十分钟内短暂增加并且在15分钟之后无可检测水平地快速减弱。相比之下,添加抗CTLA-4抗体AGEN1884.H3(IgG₁)或AGEN1884.H3(IgG₁S239D/A330L/I332E)将可检测ZAP70活化延长到30分钟,AGEN1884.H3(IgG₁S239D/A330L/I332E)情况下观察到最明显的活性和相对丰度。

[0408] 2.2.5鼠类抗CTLA-4抗体对小鼠模型中的肿瘤生长和肿瘤内调节T细胞耗竭的作用

[0409] 在这个实例中,使用结肠癌小鼠模型(携带CT26肿瘤的小鼠)分析Fc区对抗CTLA-4抗体的抗肿瘤和肿瘤内调节T细胞(Treg)耗竭活性的影响。

[0410] 简单来说,将5×10⁴个CT26肿瘤细胞悬浮于100ml PBS中并且皮下注射到6-8周大的雌性BALB/cJ小鼠(杰克逊实验室(Jackson Laboratories))中。在移植到50-80mm³的肿瘤体积之后,将小鼠用单一100 μ g剂量的鼠类抗CTLA-4抗体9D9(mIgG2a)、抗CTLA-4抗体9D9的Fc-静止变异数体(mIgG2a-N297A)、抗CTLA-4抗体9D9的Fc变异数体(mIgG2a-S239D/A330L/I332E)或同型对照抗体(mIgG2a)处理。所测试鼠类抗体的氨基酸序列展示于表7中。

[0411] 表7.鼠类抗CTLA-4抗体的氨基酸序列

描述	序列	SEQ ID NO
[0412] 鼠类抗 CTLA-4 抗体 (mIgG2a) 重链	EAKLQESGPVLVPGASVKMSCKASGYFTDYYMNW VKQSHGKSLEWIGVINPYNGDTSYNQKFKGATLVDK SSSTAYMELNSLTSEDAVYYCARYYGSWFAYWGQGTL VTVSSAKTTAPSVDPLAPVCVGDTTGSSVTLGCLVKGYFP EPVTLWNSSGLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTSST WPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPA PNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISSPIVTCVVVDVSEDDP DVQISWFVNNVEVHTAQTHREDYNSTLRVVSALPIQ HQDWMSGKEFKCKVNNKDLPLAPIERTISKPKGSVRAPQ	49
鼠类抗 CTLA-4 抗体 (mIgG2a-S239D/A330L/I332E) 重链	VYVLPPEEEMTKQVTLCTMVTDMPEDIYVEWTNN GKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERN SYSCSVVHEGLHNHHTKSFRTPG	50
[0413] 鼠类抗 CTLA-4 抗体 (mIgG2a-N297A) 重链	EAKLQESGPVLVPGASVKMSCKASGYFTDYYMNW VKQSHGKSLEWIGVINPYNGDTSYNQKFKGATLVDK SSSTAYMELNSLTSEDAVYYCARYYGSWFAYWGQGTL VTVSSAKTTAPSVDPLAPVCVGDTTGSSVTLGCLVKGYFP EPVTLWNSSGLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTSST WPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPA PNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMISSPIVTCVVVDVSEDDP DVQISWFVNNVEVHTAQTHREDYASTLRVVSALPIQ HQDWMSGKEFKCKVNNKDLPLPEERTISKPKGSVRAPQ VYVLPPEEEMTKQVTLCTMVTDMPEDIYVEWTNN GKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERN SYSCSVVHEGLHNHHTKSFRTPG	51
鼠类抗 CTLA-4 抗体 (mIgG2a) 轻链	DIVMTQTTLSPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLE WYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTL KISRVEAEDLGYYCFQGSHVPYTFGGGTKLEIKRADA APTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVWKID GSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLTKDEYERH NSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC	52

[0414] 在第一实验中,然后两周一次测量经抗体处理的小鼠的肿瘤生长。如图9A中所示,抗CTLA-4抗体9D9的Fc变异数体(展示为mIgG2a-S239D/A330L/I332E)在所有携带CT26肿瘤的小鼠(八个测试小鼠当中的八个)中诱导完全消退。相比之下,抗体9D9的其它变异数未能引发相同功效:抗体9D9(mIgG2a)本身在九个测试小鼠当中的三个中诱导完全消退,并且抗体9D9的Fc-静止变异数体(mIgG2a-N297A)在九个测试小鼠中的任一个中都未能诱导消退。

[0415] 在第二实验中,如上文所描述处理携带CT26肿瘤的小鼠,并且然后在处理后0、24、72或240小时将其处死以便收集肿瘤组织、肿瘤引流淋巴结和脾脏。通过流式细胞术评估所

收集组织的FoxP3⁺Treg扩增。通过机械解离随后过滤(70μM细胞过滤器)获得单细胞悬浮液。为了降低非特异性结合,将细胞在环境温度下在FACS缓冲液(PBS, 2mM EDTA, 0.5% BSA, pH 7.2)中与Fc γ R阻断抗体(Biolegend)一起孵育15分钟。然后将样品在FACS缓冲液中洗涤两次并且在4°C下针对一谱系组的CD3、CD4、CD8和CD25以及可固定活/死标志物染色30分钟。在Treg描绘中,然后将样品洗涤两次,固定,渗透,并且然后在4°C下与抗FoxP3抗体(FJK-16s)一起孵育30分钟。使用LSRFortessa流式细胞仪(BD Biosciences)分析样品。使用FACS DIVA和WEHI Weasel软件的组合分析FACS图。如图9B中所示,与同型对照抗体相比,抗CTLA-4抗体9D9(mIgG2a)和Fc变异抗CTLA-4抗体9D9(mIgG2a-S239D/A330L/I332E)各自减少肿瘤内FoxP3+Treg的量,Fc变异抗CTLA-4抗体9D9(mIgG2a-S239D/A330L/I332E)最显著地减少肿瘤内FoxP3+Treg的量。相对于同型对照抗体,抗CTLA-4抗体9D9的Fc-静止变异数体(mIgG2a-N297A)不实质性减少肿瘤内FoxP3+Treg的量。没有一个处理组展示肿瘤内CD45+白细胞或CD4+非Treg的量的实质性变化。Fc变异抗CTLA-4抗体9D9(mIgG2a-S239D/A330L/I332E)诱导肿瘤内CD8/Treg比率随时间推移的最大增加,随后是抗体9D9(mIgG2a),并且然后是Fc静止变异数体9D9(mIgG2a-N297A)和同型对照抗体(mIgG2a)。

[0416] 如图9C中所示,与同型对照抗体相比,抗CTLA-4抗体9D9(mIgG2a)、Fc变异抗CTLA-4抗体9D9(mIgG2a-S239D/A330L/I332E)和抗CTLA-4抗体9D9的Fc-静止变异数体(mIgG2a-N297A)对肿瘤引流淋巴结(TDLN) FoxP3+Treg的量不具有实质性作用。类似地,如图9D中所示,与同型对照抗体相比,抗CTLA-4抗体9D9(mIgG2a)、Fc变异抗CTLA-4抗体9D9(mIgG2a-S239D/A330L/I332E)和抗CTLA-4抗体9D9的Fc-静止变异数体(mIgG2a-N297A)对脾脏FoxP3+Treg的量不具有实质性作用。

[0417] 2.2.6鼠类抗CTLA-4抗体与肿瘤疫苗组合对肿瘤生长的作用

[0418] 在这个实例中,在HPV+TC-1同基因肿瘤小鼠模型中测试鼠类抗CTLA-4抗体和HPV肿瘤疫苗的组合对肿瘤生长的作用。

[0419] 通过共转化初级肺上皮细胞(C57BL/6)与c-Ha-ras和HPV-16(E6/E7)致癌基因发育TC-1细胞系,如Lin等人(1996,《癌症研究》.56(1):21-26)中所描述。在肿瘤植入中,将 2×10^5 个TC-1细胞皮下注射到6-8周大的雌性C57BL/6小鼠(杰克逊实验室)中。在肿瘤植入后5天、10天和15天中的每一天,向小鼠施用100μg抗CTLA-4抗体9D9(mIgG2a)、Fc变异抗CTLA-4抗体9D9(mIgG2a-S239D/A330L/I332E)或同型对照抗体(mIgG2a)与一剂量的HPV疫苗(HPV⁺肿瘤,病毒抗原E6/E7)的组合或无额外处理。每个剂量的HPV疫苗含有与HPV池肽(1.2nM)复合的30μg HSP蛋白(0.4nM)并且补充有10μg QS-21 Stimulon[®]佐剂。在处理之后,两周一次评估小鼠的肿瘤生长并且当肿瘤达到2000mm³时或在溃烂时将小鼠处死。

[0420] 如图10中所示,抗CTLA-4抗体9D9(mIgG2a)和Fc变异抗CTLA-4抗体9D9(mIgG2a-S239D/A330L/I332E)的抗肿瘤功效当与HPV肿瘤疫苗组合施用时各自显示出改进。Fc变异抗CTLA-4抗体(mIgG2a-S239D/A330L/I332E)的这种作用更大。具体来说,相对于当抗体作为单一药剂施用时,Fc变异抗CTLA-4抗体9D9(mIgG2a-S239D/A330L/I332E)当与HPV肿瘤疫苗组合时诱导TC-1肿瘤生长的明显额外减少。肿瘤生长的这种额外减少大于抗体9D9(mIgG2a)或同型对照抗体(mIgG2a)与HPV肿瘤疫苗的组合所观察到的减少。

[0421] 2.2.7扩增并且活化的T细胞群体的表征

[0422] 在这个实例中,表征扩增并且活化的T细胞群体的基因表达和CpG甲基化。简单来

说,将天然CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺调节T细胞或CD4⁺CD25^{+/-}FOXP3⁻非调节T细胞从健康人类供体的外周血液分离,扩增,并且活化。然后通过流式细胞术表征T细胞的FOXP3和CTLA-4表达,并且通过检查FOXP3和CTLA4基因座内的CpG区处的DNA CpG甲基化评估其谱系稳定性。如本领域中已知,这些CpG位点处的低甲基化可以用于准确地描绘效应对比调节T细胞谱系(Waight等人,2015,《免疫学杂志》194(3):878-882)。

[0423] 将PBMC经由Ficoll梯度从健康供体白细胞层(Research Blood Components,LLC)分离,并且然后使用磁珠分离(MACS,美天旎(Miltenyi))富集效应T细胞(Teff)或天然调节T细胞(Treg)。将富集的Teff或Treg在37℃和5%CO₂下在补充有10%热失活FBS的RPMI培养基中用CD3-CD28微珠(1:1珠粒:细胞比率;英杰)和重组人类IL-2活化七天。在刺激之后,经由流式细胞术评估细胞的FOXP3和CTLA-4表达。为了降低非特异性结合,将细胞在环境温度下在FACS缓冲液(PBS,2mM EDTA,0.5%BSA,pH 7.2)中与Fc γ R阻断抗体(Biolegend)一起预孵育15分钟。然后将样品在FACS缓冲液中洗涤两次并且在4℃下用一谱系组的CD3、CD4、CD8和CD25以及可固定细胞死亡标志物染色30分钟。为了评估膜CTLA-4表达,在37℃下执行CTLA-4染色。在细胞内FOXP3和CTLA-4染色中,将样品洗涤两次,固定,渗透,并且然后在4℃下分别与抗FOXP3抗体(PCH101)和抗CTLA-4抗体(BNI3)一起孵育30分钟。然后将样品洗涤两次并且使用LSRFortessa流式细胞仪(BD Biosciences)分析。使用FACS DIVA和WEHI Weasel软件的组合分析FACS图。在CpG甲基化分析中,将总DNA从约1×10⁵个原初CD4⁺T细胞、活化的Teff或活化的Treg分离,并且进行焦磷酸测序。

[0424] 如图11A中所示,在活化的Treg上检测到高水平的FOXP3表达,以及高水平的细胞内和膜CTLA-4表达。相比之下,相对于活化的Treg,活化的Teff展示降低水平的FOXP3、细胞内CTLA-4和膜CTLA-4。具体来说,与活化的Treg相比,观察到活化的Teff的实质性更低膜CTLA-4表达。图11B进一步显示,与来自同一供体的原初和活化的Teff相比,活化的Treg还展现低甲基化的FOXP3和CTLA4CpG区。

[0425] 2.2.8抗CTLA-4抗体对表达CTLA-4的人类T细胞的抗体依赖性细胞毒性的作用

[0426] 在这个实例中,使用凋亡蛋白酶3/7活化的高含量显微术定量ADCC活性来评估抗CTLA-4抗体AGEN1884.H3(IgG₁)或其Fc变异体对表达人类CTLA-4的T细胞的抗体依赖性细胞毒性(ADCC)的作用。

[0427] 简单来说,将表达CTLA-4的靶细胞在用10μg/ml抗CTLA-4抗体或其Fc变异体调理之后与表达Fc γ RIIIA的NK-92细胞共培养,如下文所描述。在第一实验中,经工程改造以组成性表达细胞表面人类CTLA-4的Jurkat细胞用作靶细胞。表达CTLA-4的Jurkat细胞通过将Jurkat细胞系用trCTLA4(胞内结构域去除的)在EF1α启动子的控制下转导而产生,如Nakaseko等人(1999,《实验医学杂志》190(6):765-774)中所描述。在第二实验中,初级人类活化的效应和调节T细胞用作靶细胞。将表达CTLA-4的靶细胞和表达Fc γ RIIIA-158V的NK-92细胞使用红色和蓝色活细胞示踪剂(赛默飞世尔)差异染色并且以1:1细胞比率(1.5×10³个细胞/孔,在384孔板中)共培养。将样品用10μg/ml的AGEN1884.H3(IgG₁)、AGEN1884.H3(IgG₁N297A)、AGEN1884.H3(IgG₁S239D/A330L/I332E)、AGEN1884.H3(IgG₁S267E/L328F)、无岩藻糖基化的AGEN1884.H3(IgG₁)或同型对照抗体(IgG₁)处理。然后通过凋亡蛋白酶3/7底物的活共焦成像评估样品的细胞凋亡随时间推移的诱导,所述底物在由活化的凋亡蛋白酶裂解之后发荧光。持续六小时每20分钟获取样品图像。在每种情况下以凋亡细胞的数目相

对于总细胞计数的形式测量ADCC活性百分比。

[0428] 如图12A中所示,相对于AGEN1884.H3(IgG₁N297A)变异体、AGEN1884.H3(IgG₁S267E/L328F)变异体和同型对照抗体(IgG₁),Fc变异AGEN1884.H3(IgG₁S239D/A330L/I332E)抗体、无岩藻糖基化的AGEN1884.H3抗体和AGEN1884.H3(IgG₁)抗体各自在经工程改造以表达细胞表面CTLA-4的Jurkat细胞中诱导实质性更大ADCC活性。与AGEN1884.H3(IgG₁)抗体相比,AGEN1884.H3(IgG₁S239D/A330L/I332E)Fc变异抗体和无岩藻糖基化的AGEN1884.H3抗体诱导ADCC活性的更大增加。如图12B中所示,AGEN1884.H3(IgG₁S239D/A330L/I332E)Fc变异抗体在初级人类活化的效应T细胞(左图)和初级人类活化的调节T细胞(右图)中都诱导最高水平的ADCC,随后是无岩藻糖基化的AGEN1884.H3抗体。与对照相比,AGEN1884.H3(IgG₁)抗体也诱导略高水平的ADCC。其余的测试抗体在效应或调节T细胞中诱导极少ADCC活性到不诱导ADCC活性。值得注意地,AGEN1884.H3(IgG₁S239D/A330L/I332E)Fc变异抗体和无岩藻糖基化的AGEN1884.H3抗体各自在调节T细胞中与效应T细胞相比诱导实质性更大ADCC。

[0429] 2.2.9抗CTLA-4抗体与抗PD-1抗体组合对T细胞功能的作用

[0430] 在这个实例中,检查抗CTLA-4抗体与抗PD-1抗体组合对初级人类T细胞功能的作用。

[0431] 简单来说,将PBMC经由Ficoll梯度从两个人类供体的健康供体白细胞层(Research Blood Components,LLC)分离。对从每个供体收集的PBMC执行这个实验两次,每供体总共有两个重复。对于每个重复,将分离的PBMC在刺激培养条件下与剂量滴定的抗CTLA-4抗体AGEN1884.H3(IgG₁)、Fc变异抗CTLA-4抗体AGEN1884.H3(IgG₁S239D/A330L/I332E)或同型对照抗体(IgG₁)与固定剂量(5μg/ml)的参考抗PD-1拮抗剂抗体或同型对照抗体(IgG₄)的组合一起孵育四天。刺激培养条件定义为在37°C和5%CO₂下细胞悬浮于补充有100ng/ml SEA超抗原(西格玛-奥德里奇(Sigma-Aldrich))、10%热失活FBS的RPMI培养基中。在孵育之后,使用AlphaLISA免疫分析法(珀金-埃尔默)分析无细胞上清液的IL-2产生。使用EnVision®多标记板读取器(珀金-埃尔默)收集数据,并且使用IL-2标准曲线确定IL-2的浓度。使用Graphpad Prism软件内插并且绘制值。

[0432] 如图13A-13D中所示,相对于同型对照或单独的参考抗PD-1抗体,抗CTLA-4抗体AGEN1884.H3(IgG₁)和Fc变异抗CTLA-4抗体AGEN1884.H3(IgG₁S239D/A330L/I332E)各自诱导增加的IL-2产生。当AGEN1884.H3或AGEN1884.H3(IgG₁S239D/A330L/I332E)与参考抗PD-1抗体组合时,IL-2产生进一步增加。无论施用同型对照抗体还是与抗PD-1参考抗体组合,与AGEN1884.H3(IgG₁)相比,Fc变异抗CTLA-4抗体AGEN1884.H3(IgG₁S239D/A330L/I332E)都诱导IL-2产生的更大增加。这个作用在第一供体(图13A和13B)和第二供体(图13C和13D)的重复中一致。

[0433] 2.3实例3:抗CTLA-4抗体的表位定位

[0434] AGEN1884的Fab片段(AGEN1884-Fab)与人类CTLA-4的胞外结构域的相互作用通过氢-氘交换(HDX)质谱法来研究。单独的或与AGEN1884-Fab组合的CTLA-4胞外结构域在pH 7.4的磷酸盐缓冲盐水溶液中用十倍体积的氧化氘标记缓冲液稀释并在室温下孵育不同时间段(0、60、300、1800和7200秒)。通过添加一个体积的4M盐酸胍、0.85M三(2-羧基乙基)膦(TCEP)缓冲液淬灭氢的氘交换,并且最终pH是2.5。接着对样品进行柱上胃蛋白酶/蛋白酶

XIII型消化和LC-MS分析。以仅MS模式记录质谱。为了计算氘掺入,将既定肽的质谱在提取的离子色谱峰上组合,并计算加权平均m/z。从天然肽的质量(0分钟)到加权平均质量的质量增加对应于氘掺入水平。绘制所有肽在交换时间内的氘累积曲线进行进一步分析,并用HDXaminer软件比较。

[0435] 大多数CTLA-4肽在存在和不存在抗人类CTLA-4Fab的情况下显示相同或相似的氘水平。然而,发现几个肽区段在Fab结合后具有显著减少的氘掺入。本段中的所有残基都根据SEQ ID NO:33编号。当人类CTLA-4结合到Fab时,两个区,残基80-82(QVT, SEQ ID NO:39)和残基135-149(YPPTYYLGIGNGTQI, SEQ ID NO:37),经历强氘保护。在残基140-141(YL)处观察到氘摄入的最强减少,因此这似乎是CTLA-4上AGEN1884的表位的主要特征。对AGEN1884强烈结合的人类和食蟹猕猴CTLA-4的序列(数据未显示)的检查揭露了上述两个区中除了在位置141的甲硫氨酸取代亮氨酸外几乎完全的序列一致性(图14A)。相比之下,AGEN1884不在任何显著程度上结合到小鼠或大鼠CTLA-4(数据未显示),所述小鼠或大鼠CTLA-4与人类CTLA-4在残基140-143(YLGI, SEQ ID NO:34)的四个位置当中的三个位置处不同(图14A)。其它的选择性数据显示,AGEN1884以高特异性结合到人类和食蟹猕猴CTLA-4,并且不结合到其它相关的CD28家族成员,所述成员包括CD28、ICOS、BTLA和PD-1(数据未显示)。这些相关蛋白质之间的序列比较显示,非CTLA-4蛋白在残基140-143(YLGI, SEQ ID NO:34)处都不同(图14B),进一步支持这一表位对AGEN1884结合的重要性。

[0436] ***

[0437] 本发明的范围不限于本文所述的特定实施例。实际上,除了所描述的那些之外,本发明的各种修改对于本领域技术人员来说将从前面的描述和附图中变得显而易见。希望此类修改属于所附权利要求书的范围内。

[0438] 本文引用的所有参考文献(例如,公开或专利或专利申请)以全文引用的方式并出于所有目的并入本文中,并入程度如同每个单独的参考文献(例如,公开或专利或专利申请)明确地并且单独地指示出于所有目的以全文引用的方式并入本文中那样。

[0439] 其它实施例在所附权利要求书内。

序列表

<110> 艾吉纳斯公司
路德维格癌症研究有限公司
纪念斯隆凯特琳癌症中心

<120> 抗 CTLA-4 抗体和其使用方法

<130> 596911:AGBW-093PC

<140>

<141>

<150> 62/431, 272

<151> 2016-12-07

<160> 46

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

[0001] <211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 1

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

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

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

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

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

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

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

Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 2

<211> 118

<212> PRT

[0002] <213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 2

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

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

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

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

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

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

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

Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 3
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

[0003] <220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 3
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 4
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成多肽"

[0004]

<400> 4
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 5
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成多肽"

[0005] <400> 5
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 6
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 6
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 [0006]

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

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

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

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

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

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

Met Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 7
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 7
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

[0007] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 8
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 8
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
[0008]

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 9
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 9
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

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

[0009] Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

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

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

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

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

<210> 10
<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 10

Ser Tyr Ser Met Asn

1 5

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"

[0010]

<400> 11

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

1 5 10 15

Gly

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 12

Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 13

Val Gly Leu Met Gly Pro Phe Asp Ile

1 5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

[0011] <213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 14

Val Gly Leu Phe Gly Pro Phe Asp Ile

1 5

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 15

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Tyr Leu Gly

1 5 10

<210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 16
Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr
1 5

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

[0012] <220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"

<400> 17
Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro Trp Thr
1 5

<210> 18
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"

<220>
<221> 变体
<222> (13)..(13)
<223> /替换="Asp"

<220>

<221> 杂项特征

<222> (1)..(17)

<223> /注释="序列中给出的变体残基相对于变体位置的注解中的那些没有偏好"

<400> 18

Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Glu Ser Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 19

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

[0013] <223> /注释="人工序列的描述: 合成肽"

<220>

<221> 变体

<222> (4)..(4)

<223> /替换="Met"

<220>

<221> 杂项特征

<222> (1)..(9)

<223> /注释="序列中给出的变体残基相对于变体位置的注解中的那些没有偏好"

<400> 19

Val Gly Leu Phe Gly Pro Phe Asp Ile

1

5

<210> 20

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成多肽"

<220>

<221> 变体

<222> (62)..(62)

<223> /替换="Asp"

<220>

<221> 变体

<222> (102)..(102)

<223> /替换="Met"

<220>

<221> 变体

<222> (113)..(113)

<223> /替换="Met"

<220>

[0014]

<221> 杂项特征

<222> (1)..(118)

<223> /注释="序列中给出的变体残基相对于变体位置的注解中的那些没有偏好"

<400> 20

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly

1

5

10

15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20

25

30

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

35

40

45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Glu Ser Val

50

55

60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr

65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85		90	95
Ala Arg Val Gly Leu Phe Gly Pro Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr			
100		105	110
Leu Val Thr Val Ser Ser			
115			
<210> 21			
<211> 98			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 21			
[0015] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr			
20		25	30
Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val			
35		40	45
Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val			
50		55	60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr			
65	70	75	80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys			
85		90	95

Ala Arg

<210> 22

<211> 96

<212> PRT

<213> 智人

<400> 22

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Ser

20 25 30

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu

35 40 45

[0016]

Ile Tyr Gly Ala Ser Ser Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu

65 70 75 80

Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Gly Ser Ser Pro

85 90 95

<210> 23

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 23

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

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

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

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

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

[0017] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85		90		95
----	--	----	--	----

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0018] Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
 260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0019] Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 435 440 445

<210> 24

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 24

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

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

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

35 40 45

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

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

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

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

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

[0020]

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

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

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

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

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

Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr

210	215	220
-----	-----	-----

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp	225	230
---	-----	-----

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

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro	260	265
---	-----	-----

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

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

[0021]

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

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

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

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

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

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp		
---	--	--

385	390	395	400
-----	-----	-----	-----

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

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

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

<210> 25

<211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

[0022] <221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 25

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0023] Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

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

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

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

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

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

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro			
260	265	270	
Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala			
275	280	285	
Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val			
290	295	300	
Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr			
305	310	315	320
Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Leu Pro Glu Glu Lys Thr			
325	330	335	
Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu			
[0024] 340	345	350	
Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys			
355	360	365	
Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser			
370	375	380	
Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp			
385	390	395	400
Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser			
405	410	415	
Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala			
420	425	430	

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

<210> 26
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 26
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15

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

[0025]

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

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

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

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

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

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro

115	120	125
-----	-----	-----

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

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

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

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

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

[0026]

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

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

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

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro		
260	265	270

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

Lys Thr Lys Pro Pro Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val

290

295

300

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

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

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

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

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

[0027]

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

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

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

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

<210> 27

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 27

Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Tyr

20 25 30

Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser Gly

50 55 60

[0028] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Arg Leu Glu Pro

65 70 75 80

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

85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala

100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly

115 120 125

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

130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln

145 150 155 160

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

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210

<210> 28
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> 智人

[0029] <400> 28
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85	90	95
----	----	----

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

[0030]

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260	265	270
-----	-----	-----

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe 275	280	285
--	-----	-----

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn 290	295	300
--	-----	-----

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr 305	310	315	320
--	-----	-----	-----

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly 325		
--	--	--

<210> 29

<211> 329

[0031] <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 29

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys 1	5	10	15
--	---	----	----

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr 20	25	30
---	----	----

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser 35	40	45
---	----	----

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser 50	55	60
---	----	----

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

[0032] Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 [0033] 325

<210> 30
 <211> 329
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 30
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35	40	45
----	----	----

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

[0034]

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Leu Pro Glu Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210	215	220
-----	-----	-----

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu		
225	230	235
		240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		
245	250	255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		
260	265	270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		
275	280	285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		
290	295	300

[0035]

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		
305	310	315
		320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly		
325		

<210> 31

<211> 329

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述：合成多肽"

<400> 31

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys		
1	5	10
		15

Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	
20								25					30			
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	
35							40					45				
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	
50						55					60					
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	
65					70				75				80			
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
85							90					95				
[0036]	Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
	100						105					110				
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Val	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Leu	Pro	Pro	
115							120					125				
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	
130						135						140				
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	
145						150				155			160			
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Pro	Glu	
165							170					175				
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
180							185					190				

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

[0037] Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Leu Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 325

<210> 32

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 32

Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu
1															
														10	15

Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe
													20	25	30

Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln
													35	40	45

Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser
													50	55	60

Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	
													65	70	75	80

[0038]

Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser
													85	90	95

Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys					
													100	105	

<210> 33

<211> 223

<212> PRT

<213> 智人

<400> 33

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

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

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

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

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

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

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

[0039] Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile
115 120 125

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

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

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

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

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

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

<210> 34

<211> 4

<212> PRT

<213> 智人

<400> 34

Tyr Leu Gly Ile

1

<210> 35

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 35

[0040] Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile
1 5

<210> 36

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 36

Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

1 5 10

<210> 37

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 37

Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Leu Gly Ile Gly Asn Gly Thr Gln Ile

1 5 10 15

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 38

Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr

1 5

<210> 39

<211> 3

<212> PRT

<213> 智人

<400> 39

Gln Val Thr

1

<210> 40

[0041] <211> 223

<212> PRT

<213> 食蟹猴

<400> 40

Met Ala Cys Leu Gly Phe Gln Arg His Lys Ala Arg Leu Asn Leu Ala

1 5 10 15

Thr Arg Thr Arg Pro Tyr Thr Leu Leu Phe Ser Leu Leu Phe Ile Pro

20 25 30

Val Phe Ser Lys Ala Met His Val Ala Gln Pro Ala Val Val Leu Ala

35 40 45

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

50 55 60

Lys Ala Thr Glu Val Arg Val Thr Val Leu Arg Gln Ala Asp Ser Gln

65	70	75	80
Val Thr Glu Val Cys Ala Ala Thr Tyr Met Met Gly Asn Glu Leu Thr			
85	90	95	
Phe Leu Asp Asp Ser Ile Cys Thr Gly Thr Ser Ser Gly Asn Gln Val			
100	105	110	
Asn Leu Thr Ile Gln Gly Leu Arg Ala Met Asp Thr Gly Leu Tyr Ile			
115	120	125	
Cys Lys Val Glu Leu Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Tyr Met Gly Ile Gly			
130	135	140	
Asn Gly Thr Gln Ile Tyr Val Ile Asp Pro Glu Pro Cys Pro Asp Ser			
145	150	155	160
Asp Phe Leu Leu Trp Ile Leu Ala Ala Val Ser Ser Gly Leu Phe Phe			
165	170	175	
Tyr Ser Phe Leu Leu Thr Ala Val Ser Leu Ser Lys Met Leu Lys Lys			
180	185	190	
Arg Ser Pro Leu Thr Thr Gly Val Tyr Val Lys Met Pro Pro Thr Glu			
195	200	205	
Pro Glu Cys Glu Lys Gln Phe Gln Pro Tyr Phe Ile Pro Ile Asn			
210	215	220	
<210> 41			
<211> 223			
<212> PRT			
<213> 小鼠			

<400> 41

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

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

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

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

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

[0043] Met Thr Glu Val Cys Ala Thr Thr Phe Thr Glu Lys Asn Thr Val Gly
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 42

<211> 223

<212> PRT

<213> 大鼠

<400> 42

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

[0044]

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

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

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

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

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

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

100	105	110
-----	-----	-----

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

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

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

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

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

[0045]

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

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

<210> 43

<211> 220

<212> PRT

<213> 智人

<400> 43

Met Leu Arg Leu Leu Ala Leu Asn Leu Phe Pro Ser Ile Gln Val	1	5	10	15
---	---	---	----	----

Thr Gly Asn Lys Ile Leu Val Lys Gln Ser Pro Met Leu Val Ala Tyr	20	25	30
---	----	----	----

Asp Asn Ala Val Asn Leu Ser Cys Lys Tyr Ser Tyr Asn Leu Phe Ser
35 40 45

Arg Glu Phe Arg Ala Ser Leu His Lys Gly Leu Asp Ser Ala Val Glu
50 55 60

Val Cys Val Val Tyr Gly Asn Tyr Ser Gln Gln Leu Gln Val Tyr Ser
65 70 75 80

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

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

[0046] Lys Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser
115 120 125

Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro
130 135 140

Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly
145 150 155 160

Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile
165 170 175

Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met
180 185 190

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

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

<210> 44
 <211> 199
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 44
 Met Lys Ser Gly Leu Trp Tyr Phe Phe Leu Phe Cys Leu Arg Ile Lys
 1 5 10 15

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

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

[0047]

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

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

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

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

Ile Phe Asp Pro Pro Phe Lys Val Thr Leu Thr Gly Gly Tyr Leu
 115 120 125

His Ile Tyr Glu Ser Gln Leu Cys Cys Gln Leu Lys Phe Trp Leu Pro

130	135	140
-----	-----	-----

Ile Gly Cys Ala Ala Phe Val Val Val Cys Ile Leu Gly Cys Ile Leu		
145	150	155
		160

Ile Cys Trp Leu Thr Lys Lys Tyr Ser Ser Ser Val His Asp Pro		
165	170	175

Asn Gly Glu Tyr Met Phe Met Arg Ala Val Asn Thr Ala Lys Lys Ser		
180	185	190

Arg Leu Thr Asp Val Thr Leu		
195		

<210> 45

<211> 289

[0048] <212> PRT

<213> 智人

<400> 45

Met Lys Thr Leu Pro Ala Met Leu Gly Thr Gly Lys Leu Phe Trp Val		
1	5	10
		15

Phe Phe Leu Ile Pro Tyr Leu Asp Ile Trp Asn Ile His Gly Lys Glu		
20	25	30

Ser Cys Asp Val Gln Leu Tyr Ile Lys Arg Gln Ser Glu His Ser Ile		
35	40	45

Leu Ala Gly Asp Pro Phe Glu Leu Glu Cys Pro Val Lys Tyr Cys Ala		
50	55	60

Asn Arg Pro His Val Thr Trp Cys Lys Leu Asn Gly Thr Thr Cys Val		
65	70	75
		80

Lys Leu Glu Asp Arg Gln Thr Ser Trp Lys Glu Glu Lys Asn Ile Ser
85 90 95

Phe Phe Ile Leu His Phe Glu Pro Val Leu Pro Asn Asp Asn Gly Ser
100 105 110

Tyr Arg Cys Ser Ala Asn Phe Gln Ser Asn Leu Ile Glu Ser His Ser
115 120 125

Thr Thr Leu Tyr Val Thr Asp Val Lys Ser Ala Ser Glu Arg Pro Ser
130 135 140

Lys Asp Glu Met Ala Ser Arg Pro Trp Leu Leu Tyr Arg Leu Leu Pro
145 150 155 160

[0049] Leu Gly Gly Leu Pro Leu Leu Ile Thr Thr Cys Phe Cys Leu Phe Cys
165 170 175

Cys Leu Arg Arg His Gln Gly Lys Gln Asn Glu Leu Ser Asp Thr Ala
180 185 190

Gly Arg Glu Ile Asn Leu Val Asp Ala His Leu Lys Ser Glu Gln Thr
195 200 205

Glu Ala Ser Thr Arg Gln Asn Ser Gln Val Leu Leu Ser Glu Thr Gly
210 215 220

Ile Tyr Asp Asn Asp Pro Asp Leu Cys Phe Arg Met Gln Glu Gly Ser
225 230 235 240

Glu Val Tyr Ser Asn Pro Cys Leu Glu Glu Asn Lys Pro Gly Ile Val
245 250 255

Tyr Ala Ser Leu Asn His Ser Val Ile Gly Pro Asn Ser Arg Leu Ala
 260 265 270

Arg Asn Val Lys Glu Ala Pro Thr Glu Tyr Ala Ser Ile Cys Val Arg
 275 280 285

Ser

<210> 46

<211> 288

<212> PRT

<213> 智人

<400> 46

Met Gln Ile Pro Gln Ala Pro Trp Pro Val Val Trp Ala Val Leu Gln
 1 5 10 15

[0050]

Leu Gly Trp Arg Pro Gly Trp Phe Leu Asp Ser Pro Asp Arg Pro Trp
 20 25 30

Asn Pro Pro Thr Phe Ser Pro Ala Leu Leu Val Val Thr Glu Gly Asp
 35 40 45

Asn Ala Thr Phe Thr Cys Ser Phe Ser Asn Thr Ser Glu Ser Phe Val
 50 55 60

Leu Asn Trp Tyr Arg Met Ser Pro Ser Asn Gln Thr Asp Lys Leu Ala
 65 70 75 80

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

Val Thr Gln Leu Pro Asn Gly Arg Asp Phe His Met Ser Val Val Arg

100	105	110
-----	-----	-----

Ala Arg Arg Asn Asp Ser Gly Thr Tyr Leu Cys Gly Ala Ile Ser Leu	115	120	125
---	-----	-----	-----

Ala Pro Lys Ala Gln Ile Lys Glu Ser Leu Arg Ala Glu Leu Arg Val	130	135	140
---	-----	-----	-----

Thr Glu Arg Arg Ala Glu Val Pro Thr Ala His Pro Ser Pro Ser Pro	145	150	155	160
---	-----	-----	-----	-----

Arg Pro Ala Gly Gln Phe Gln Thr Leu Val Val Gly Val Val Gly Gly	165	170	175
---	-----	-----	-----

Leu Leu Gly Ser Leu Val Leu Val Trp Val Leu Ala Val Ile Cys	180	185	190
---	-----	-----	-----

[0051]

Ser Arg Ala Ala Arg Gly Thr Ile Gly Ala Arg Arg Thr Gly Gln Pro	195	200	205
---	-----	-----	-----

Leu Lys Glu Asp Pro Ser Ala Val Pro Val Phe Ser Val Asp Tyr Gly	210	215	220
---	-----	-----	-----

Glu Leu Asp Phe Gln Trp Arg Glu Lys Thr Pro Glu Pro Pro Val Pro	225	230	235	240
---	-----	-----	-----	-----

Cys Val Pro Glu Gln Thr Glu Tyr Ala Thr Ile Val Phe Pro Ser Gly	245	250	255
---	-----	-----	-----

Met Gly Thr Ser Ser Pro Ala Arg Arg Gly Ser Ala Asp Gly Pro Arg	260	265	270
---	-----	-----	-----

Ser Ala Gln Pro Leu Arg Pro Glu Asp Gly His Cys Ser Trp Pro Leu

275	280	285
-----	-----	-----

<210> 47
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 47

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

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

[0052]

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

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

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

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

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

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

	Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly			
	130	135	140	
	Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn			
	145	150	155	160
	Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln			
	165	170	175	
	Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser			
	180	185	190	
	Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser			
	195	200	205	
[0053]	Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr			
	210	215	220	
	His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser			
	225	230	235	240
	Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg			
	245	250	255	
	Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro			
	260	265	270	
	Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala			
	275	280	285	
	Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Ala Ser Thr Tyr Arg Val Val			
	290	295	300	

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

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

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

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

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

[0054] Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400

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

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

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

<210> 48
 <211> 447
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 48

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

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

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

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

[0055] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0056] Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
 245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Glu His Glu Asp Pro
 260 265 270

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

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

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

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

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

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

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

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

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

[0057] Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430

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

<210> 49

<211> 446

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释=“人工序列的描述：合成多肽”

<400> 49

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr		
20	25	30
Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile		
35	40	45
Gly Val Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe		
50	55	60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys		
85	90	95
[0058] Ala Arg Tyr Tyr Gly Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu		
100	105	110
Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu		
115	120	125
Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys		
130	135	140
Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser		
145	150	155
Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser		
165	170	175
Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp		
180	185	190

Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr
 195 200 205

Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys
 210 215 220

Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
 225 230 235 240

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

Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp
 260 265 270

[0059] Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln
 275 280 285

Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser
 290 295 300

Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys
 305 310 315 320

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

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

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

Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn
370 375 380

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

Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn
405 410 415

Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu
 420 425 430

His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly
435 440 445

<210> 50
<211> 446
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 来源
<223> /注释="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 50

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Val Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe

50	55	60
----	----	----

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr 65	70	75	80
---	----	----	----

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

Ala Arg Tyr Tyr Gly Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu 100	105	110
--	-----	-----

Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu 115	120	125
--	-----	-----

Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys 130	135	140
--	-----	-----

[0061]

Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser 145	150	155	160
--	-----	-----	-----

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

Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp 180	185	190
--	-----	-----

Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr 195	200	205
--	-----	-----

Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys 210	215	220
--	-----	-----

Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Asp Val		
---	--	--

225	230	235	240
Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser			
245		250	255
Pro Ile Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp			
260	265	270	
Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln			
275	280	285	
Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser			
290	295	300	
Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys			
305	310	315	320
[0062]			
Cys Lys Val Asn Asn Lys Asp Leu Pro Leu Pro Glu Glu Arg Thr Ile			
325		330	335
Ser Lys Pro Lys Gly Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro			
340	345	350	
Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met			
355	360	365	
Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn			
370	375	380	
Gly Lys Thr Glu Leu Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser			
385	390	395	400
Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn			

405

410

415

Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu
 420 425 430

His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly
 435 440 445

<210> 51

<211> 446

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 来源

<223> /注释="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 51

[0063]

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Val Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

	Ala Arg Tyr Tyr Gly Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu			
	100	105	110	
	Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu			
	115	120	125	
	Ala Pro Val Cys Gly Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys			
	130	135	140	
	Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser			
	145	150	155	160
	Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser			
	165	170	175	
[0064]	Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp			
	180	185	190	
	Pro Ser Gln Ser Ile Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr			
	195	200	205	
	Lys Val Asp Lys Lys Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys			
	210	215	220	
	Pro Pro Cys Lys Cys Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val			
	225	230	235	240
	Phe Ile Phe Pro Pro Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser			
	245	250	255	
	Pro Ile Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp			
	260	265	270	

Val Gln Ile Ser Trp Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln
275 280 285

Thr Gln Thr His Arg Glu Asp Tyr Ala Ser Thr Leu Arg Val Val Ser
290 295 300

Ala Leu Pro Ile Gln His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys
305 310 315 320

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

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

[0065] Pro Pro Glu Glu Glu Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met
355 360 365

Val Thr Asp Phe Met Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn
370 375 380

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

Asp Gly Ser Tyr Phe Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn
405 410 415

Trp Val Glu Arg Asn Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu
420 425 430

His Asn His His Thr Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly
435 440 445

<210> 52
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <221> 来源
 <223> /注释="人工序列的描述: 合成多肽"

<400> 52

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

[0066] Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu
 115 120 125

Gln Leu Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg
145 150 155 160

Gln Asn Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

[0067]

Thr Tyr Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu
180 185 190

Arg His Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser
195 200 205

Pro Ile Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys
210 215

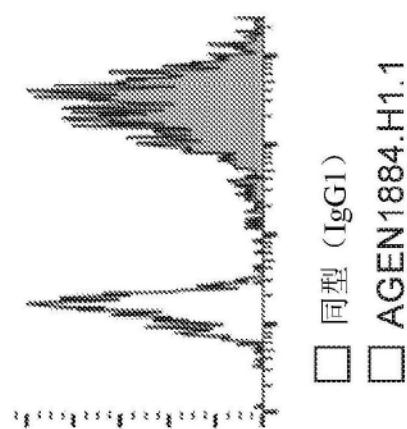


图1A

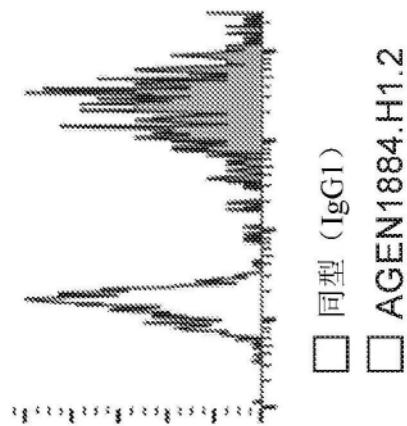


图1B

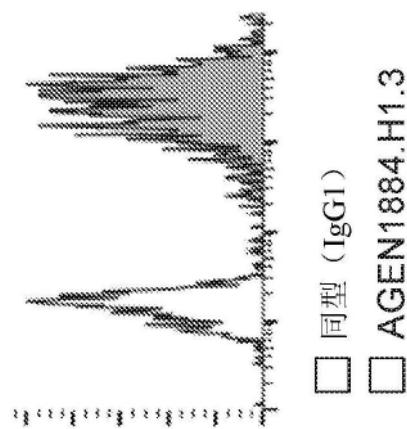
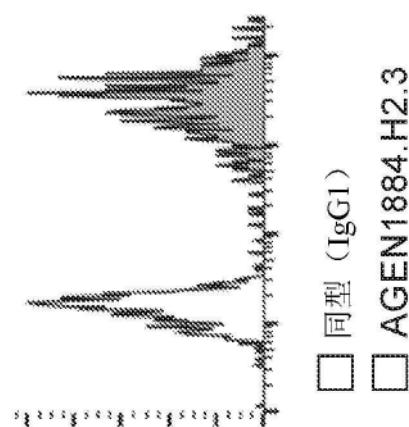
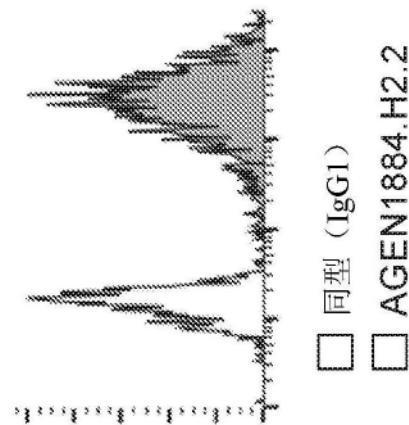
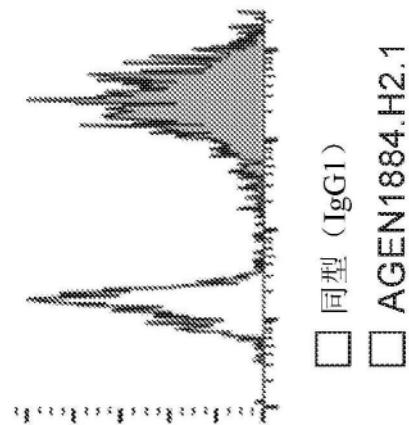


图1C



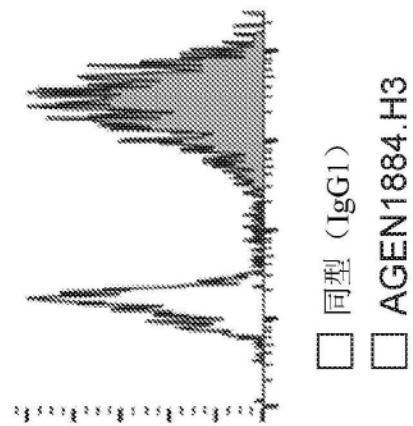


图1G

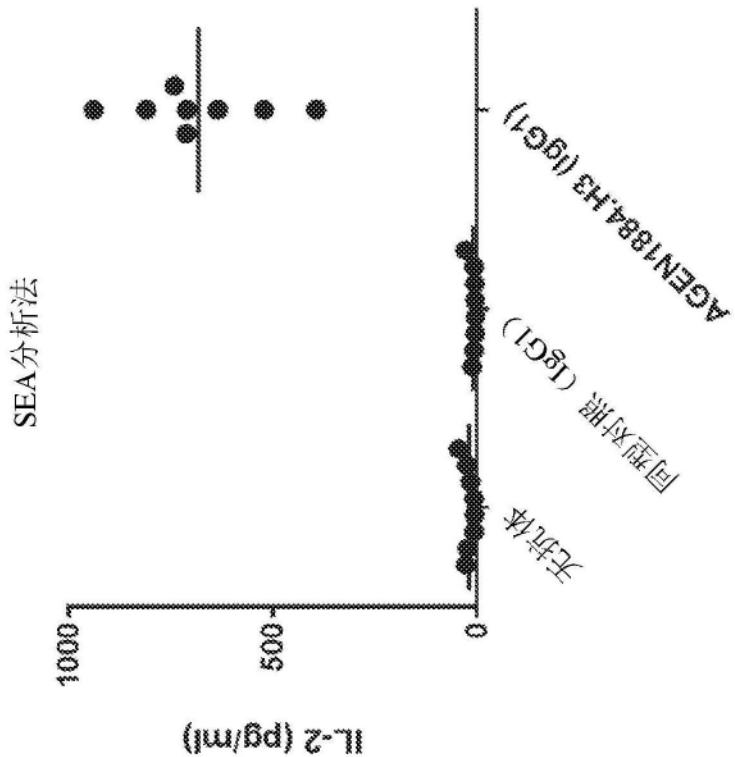


图2

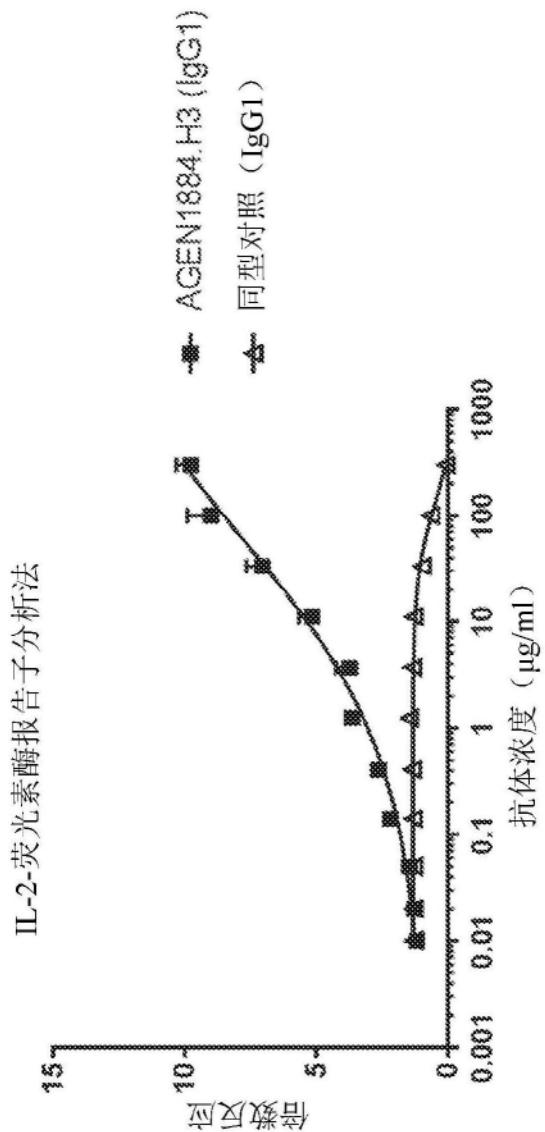


图3

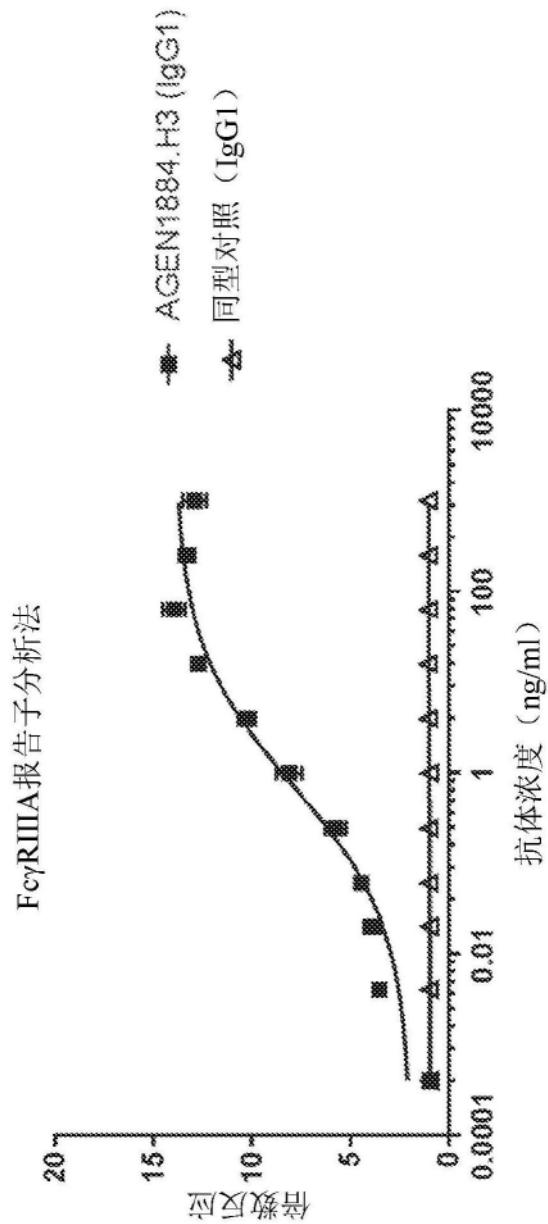


图4

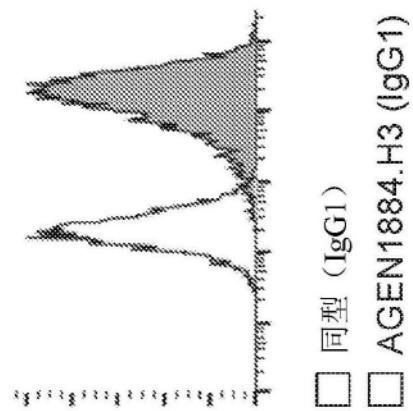


图5A

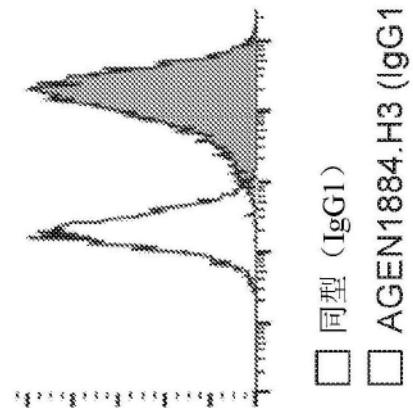


图5B

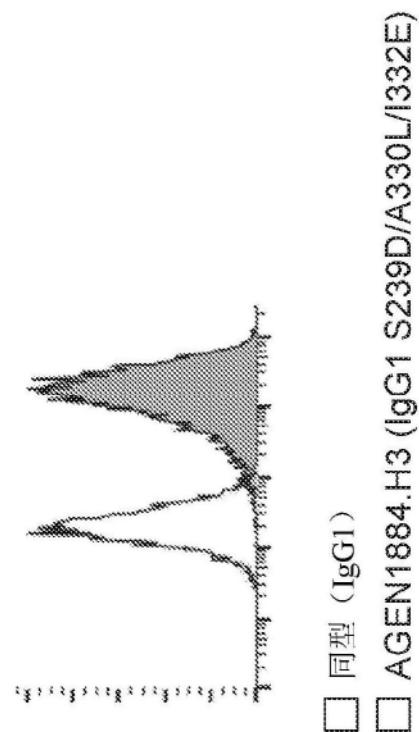


图5C

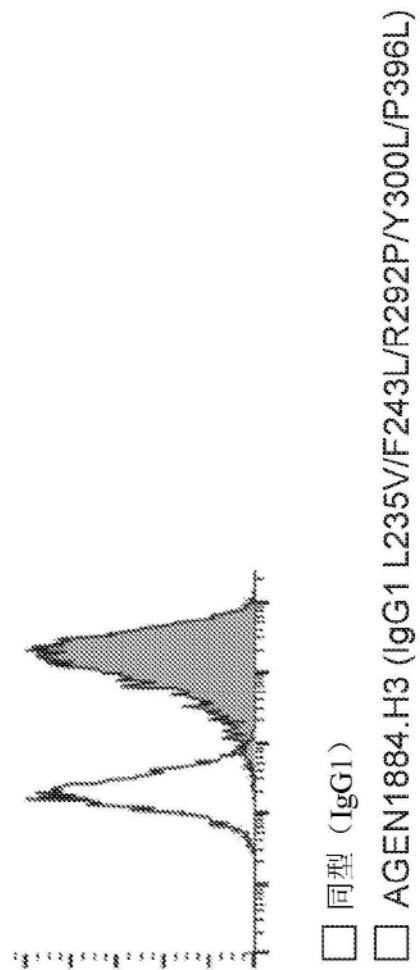


图5D

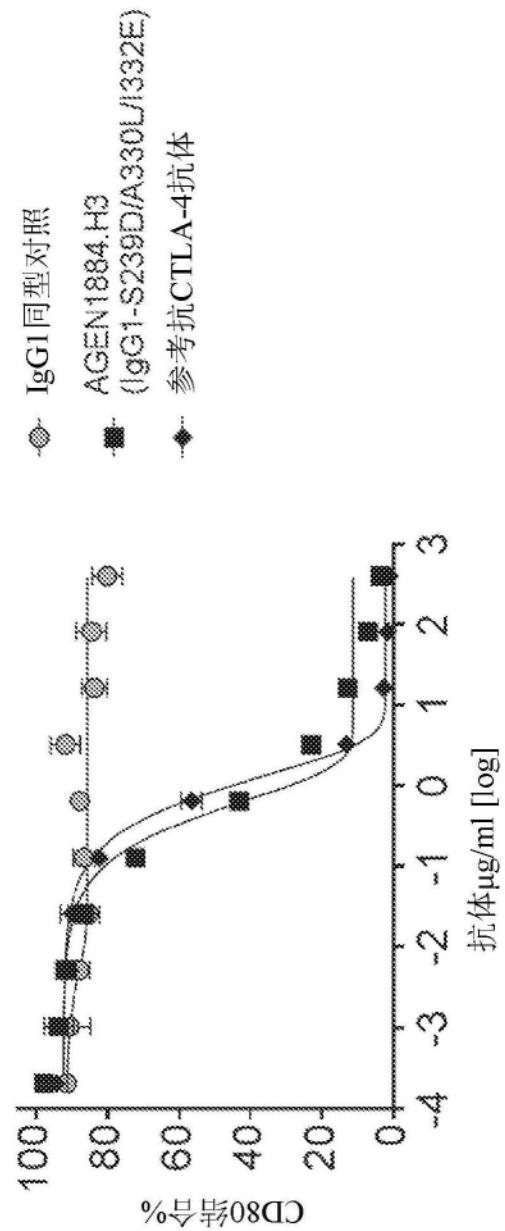


图6A

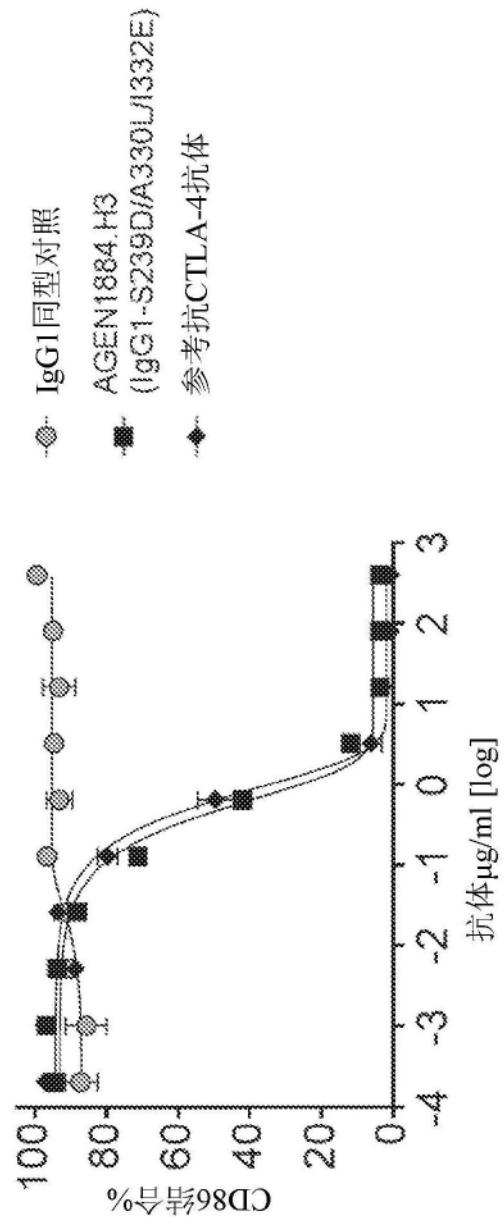


图6B

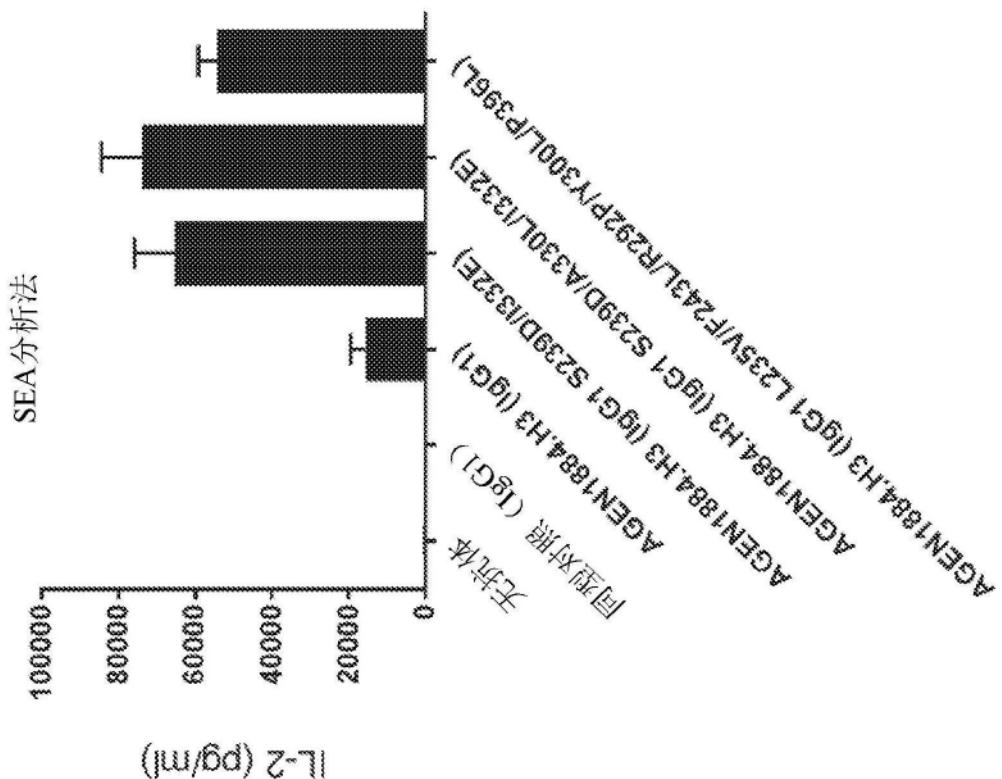


图7A

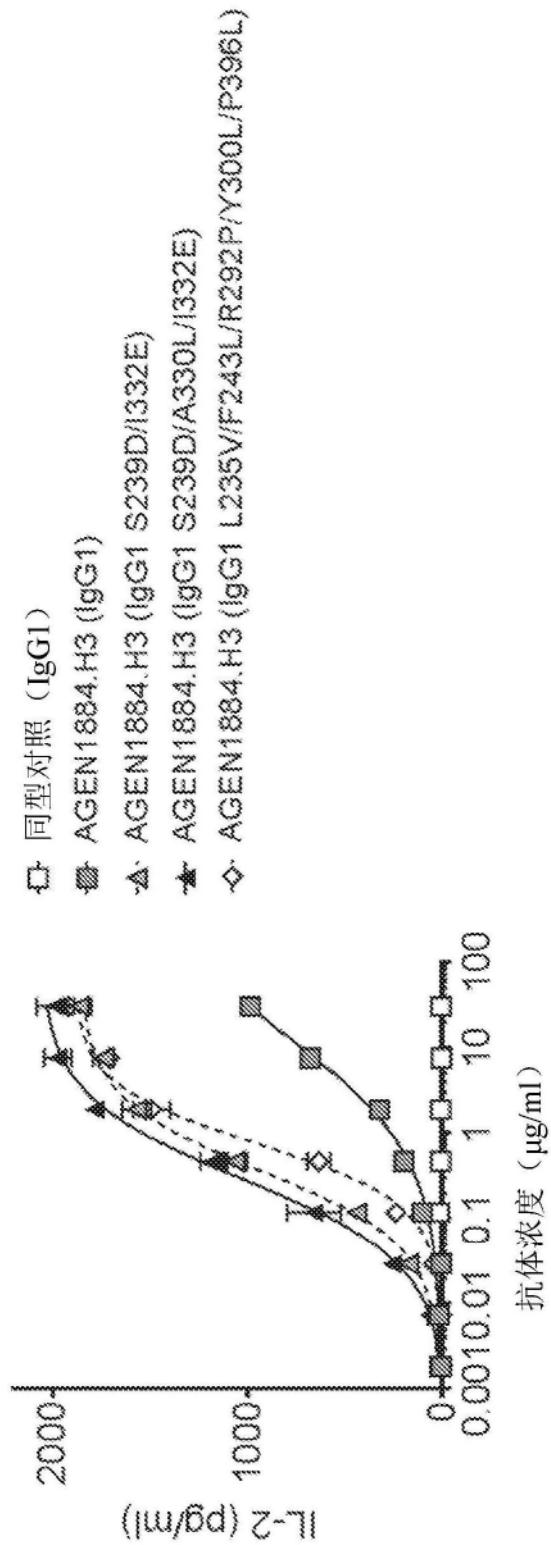


图7B

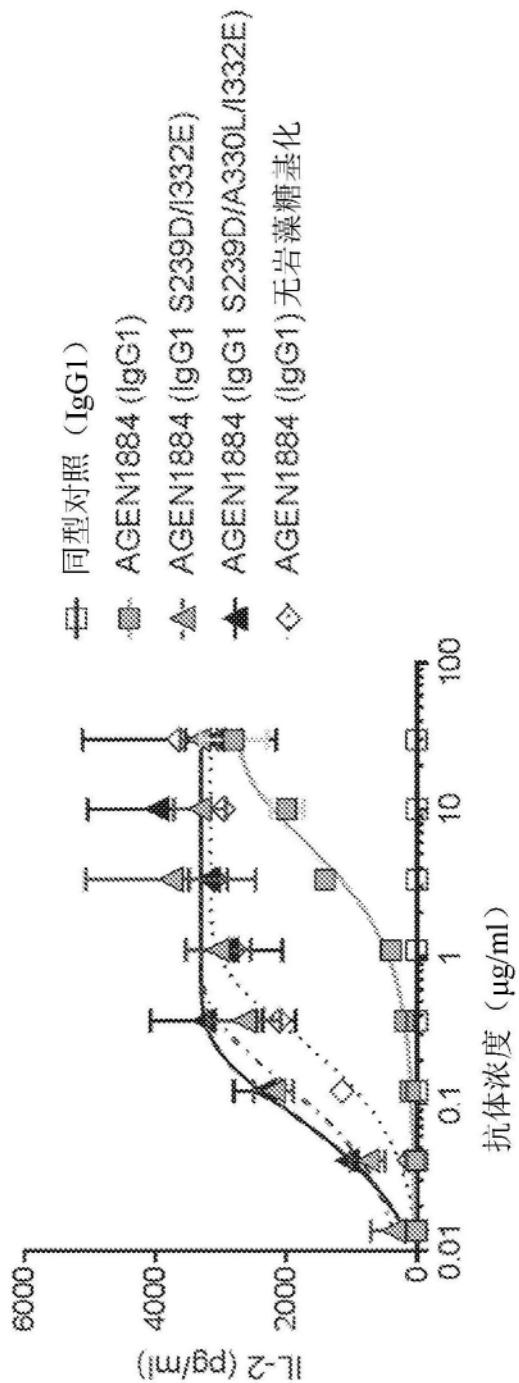


图7C

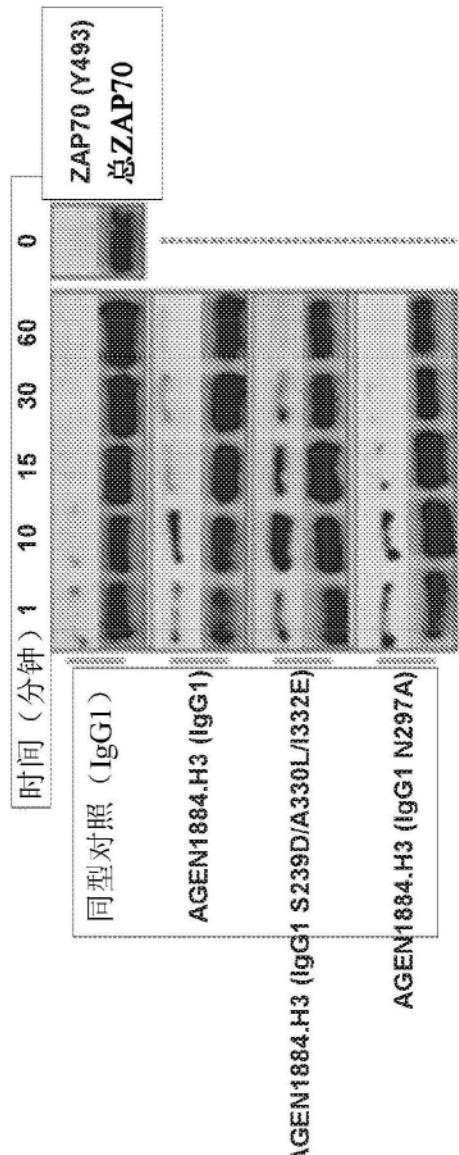


图8A

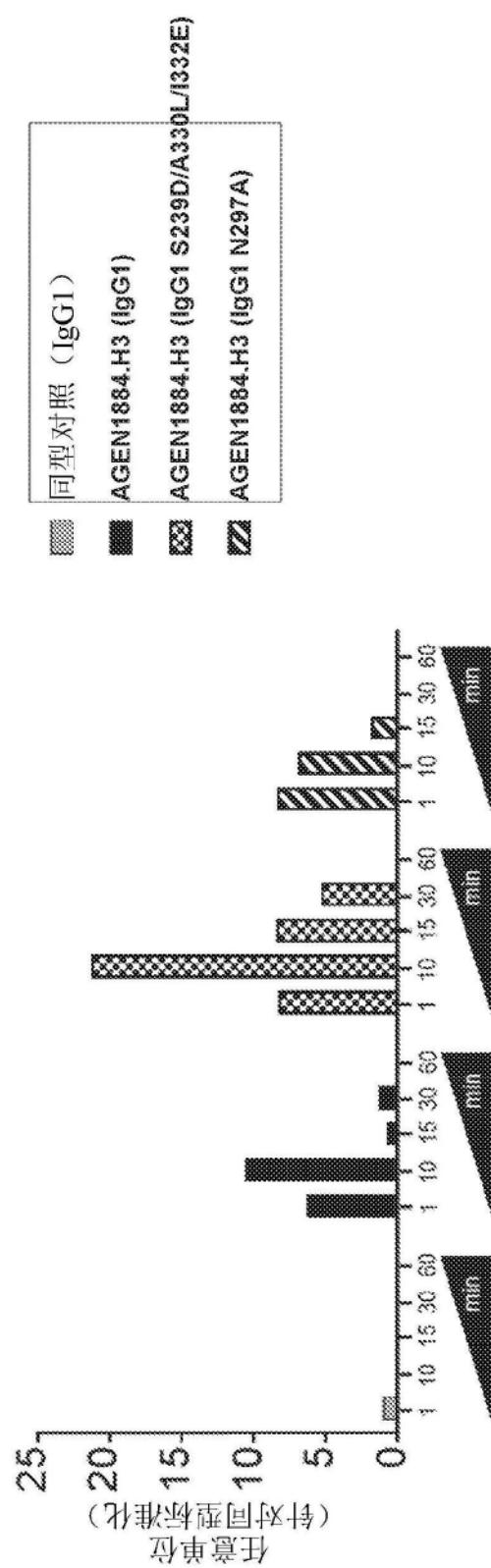


图8B

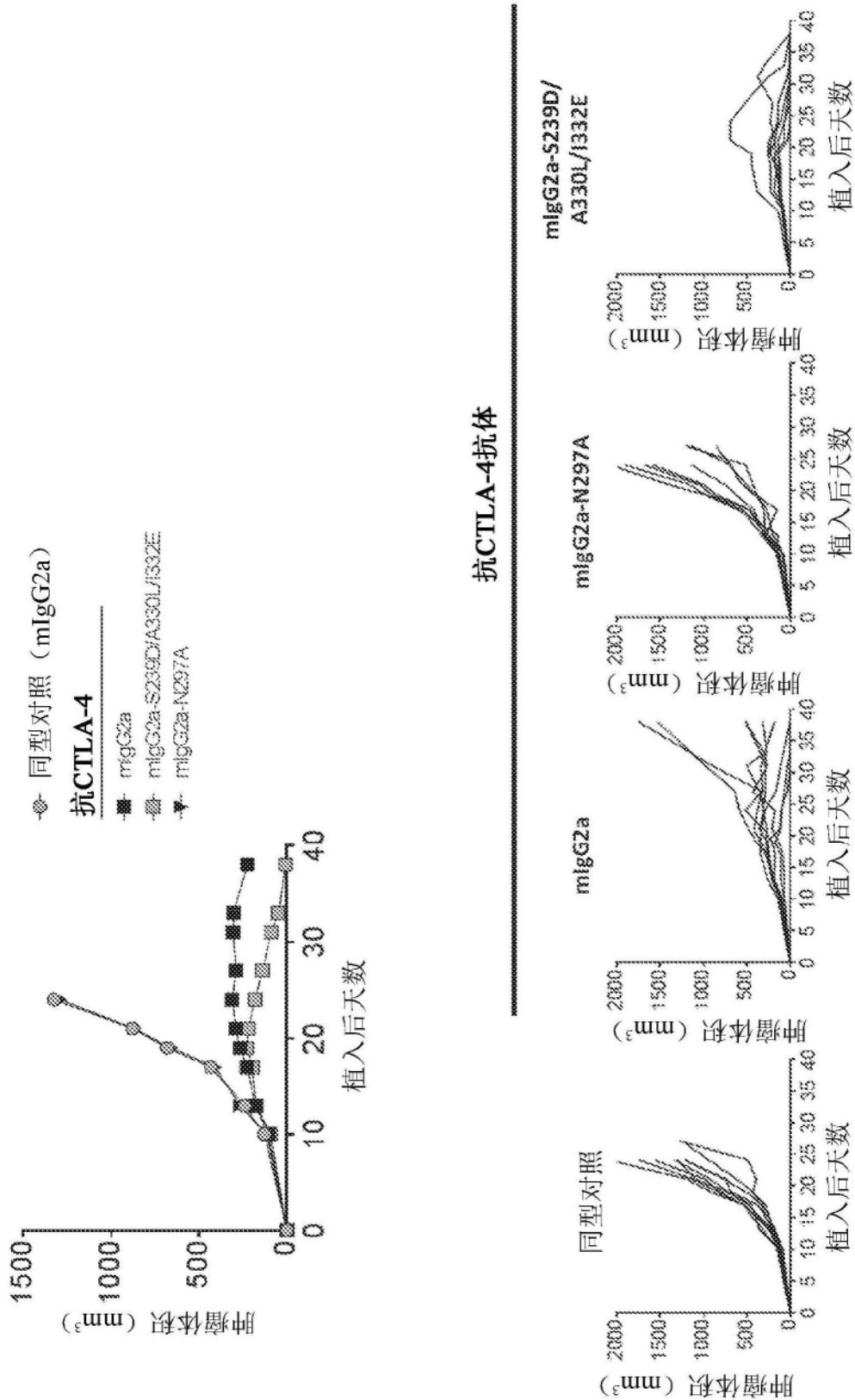


图9A

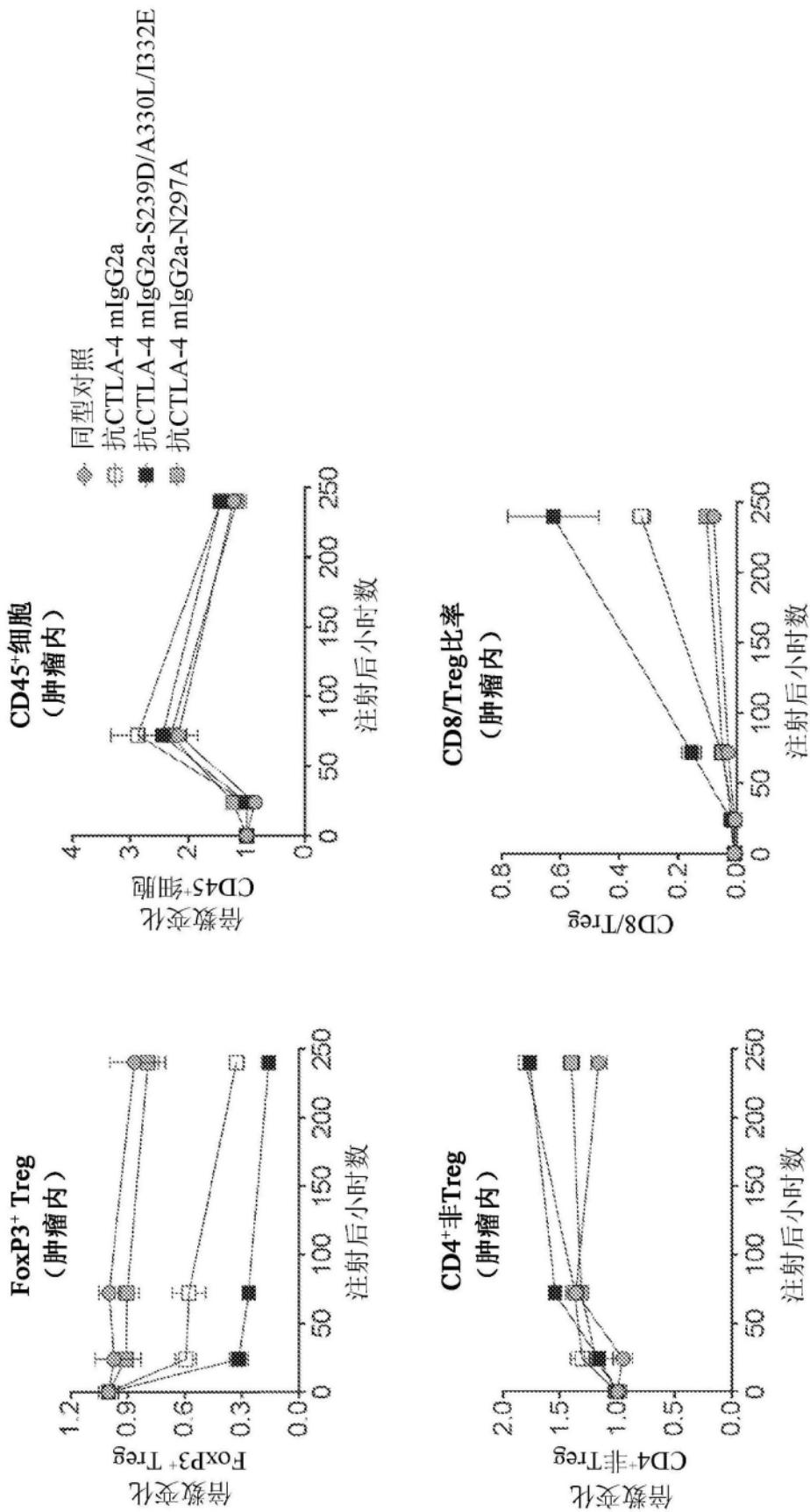


图9B

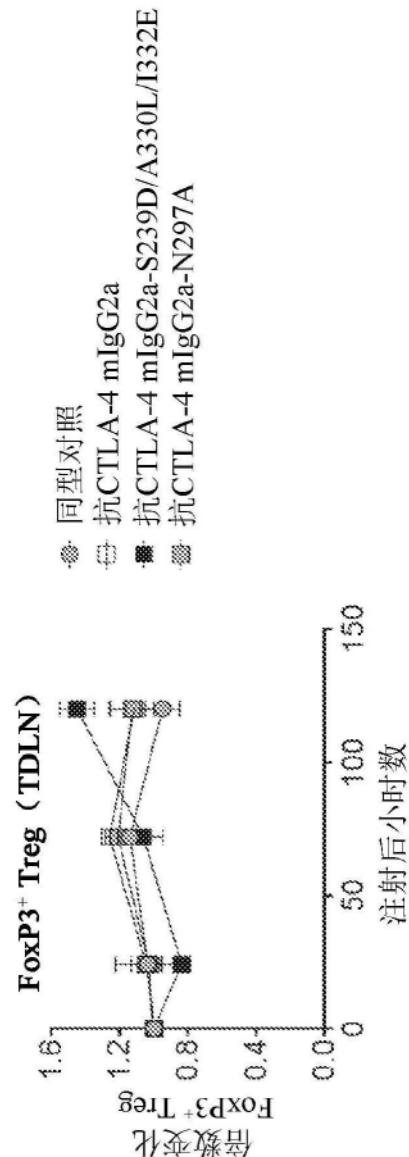


图9C

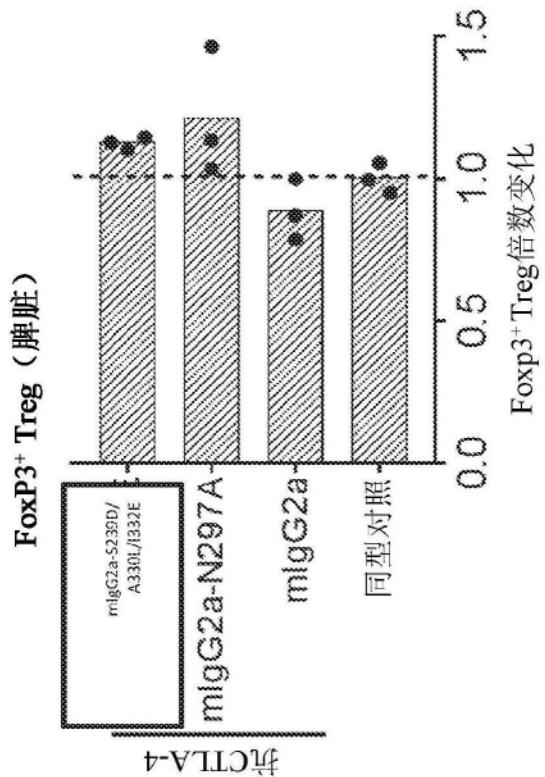


图9D

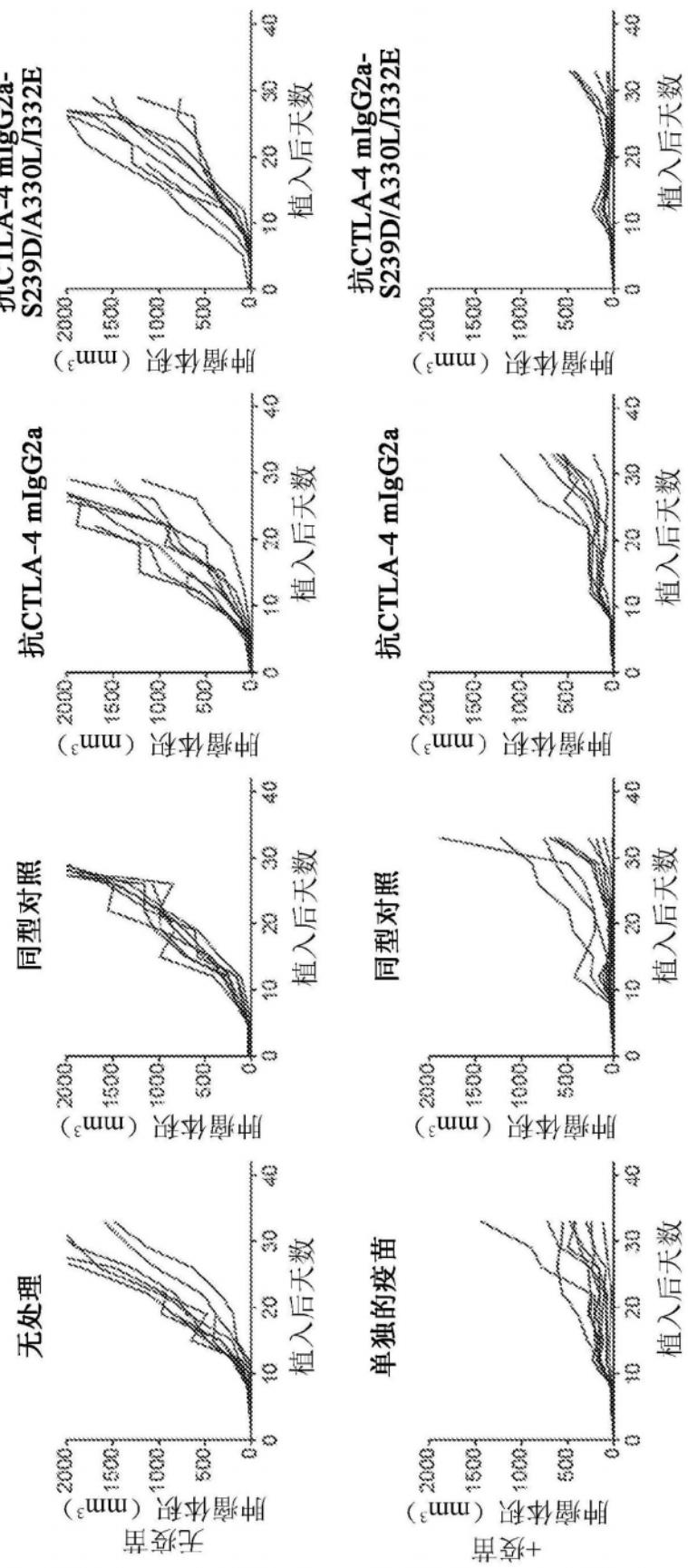


图10

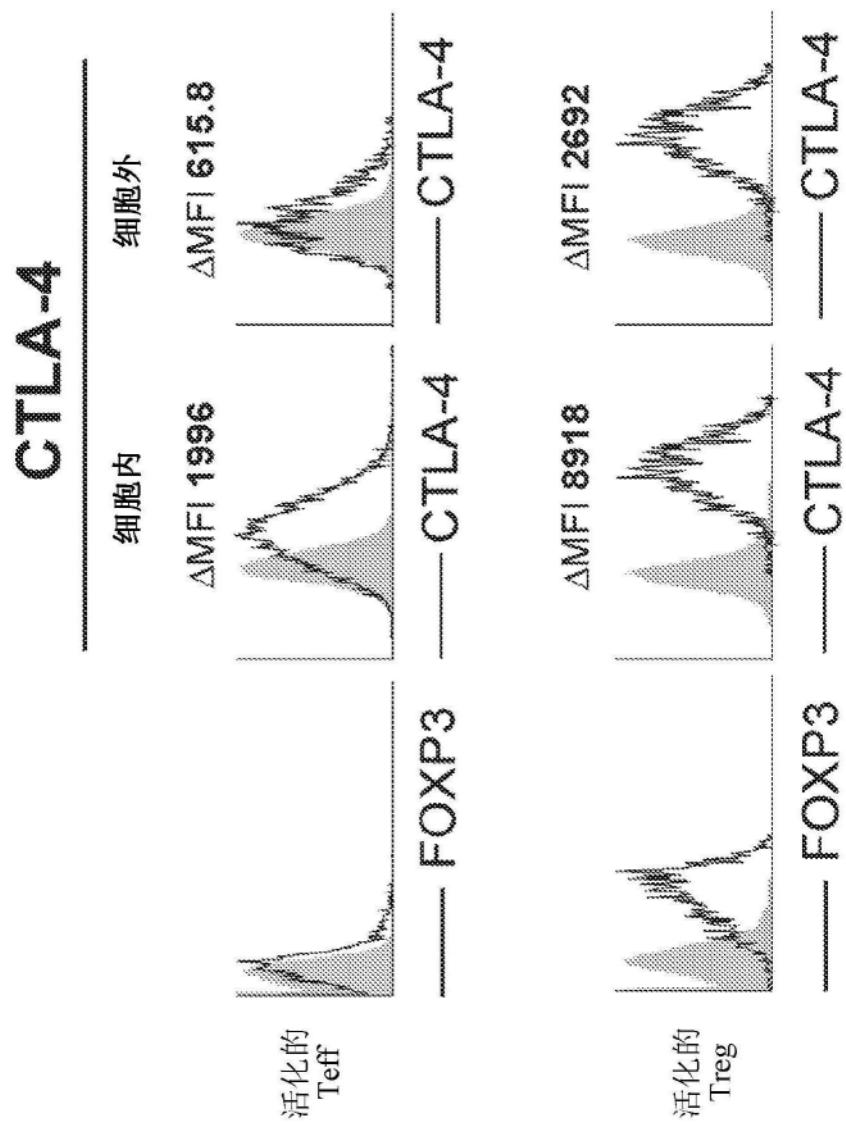


图11A

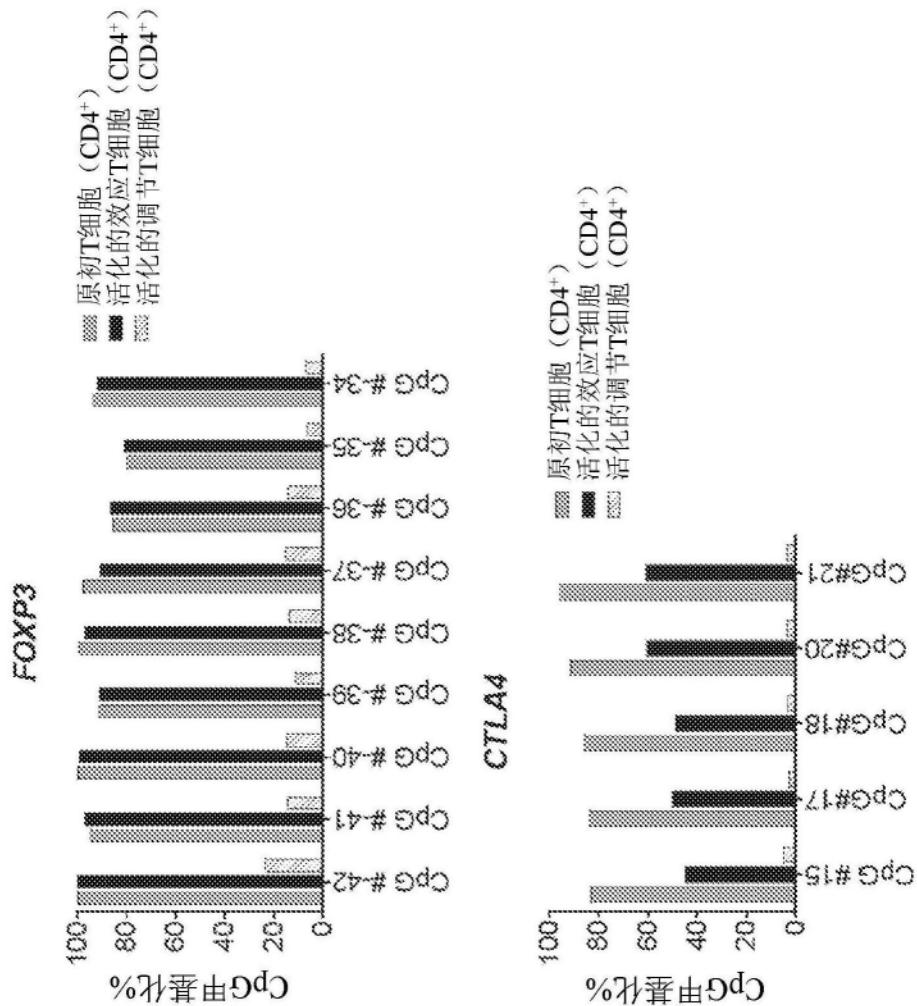


图11B

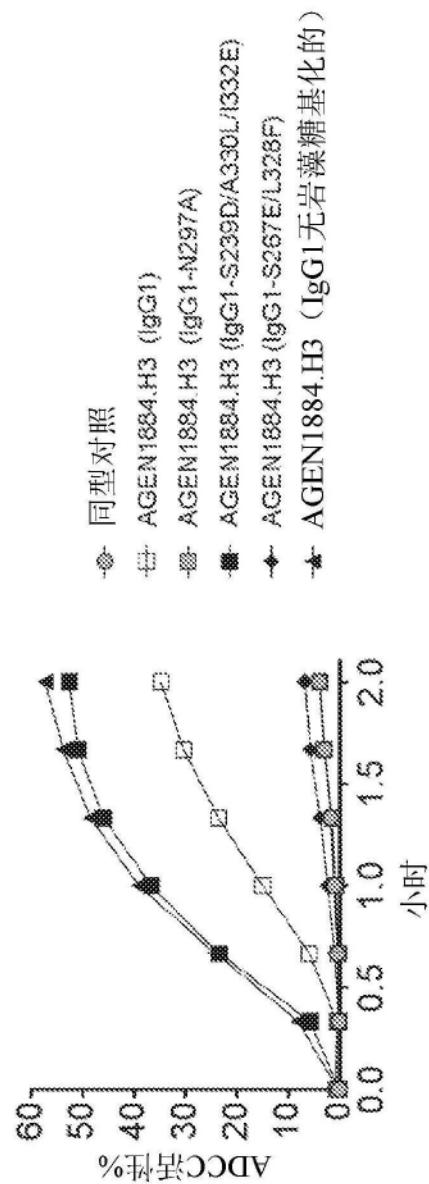


图12A

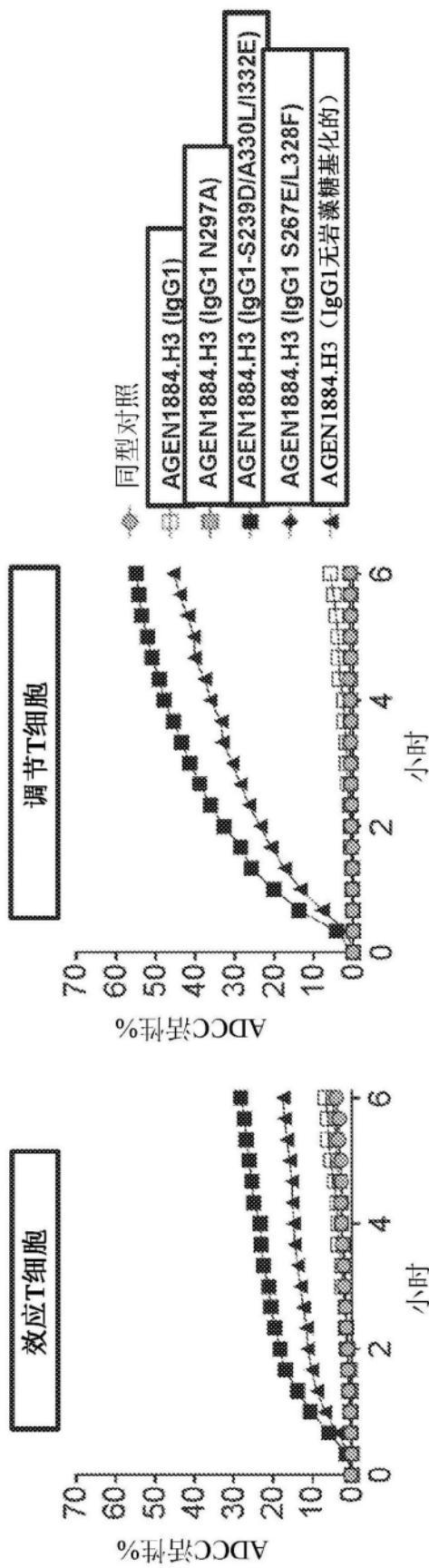


图12B

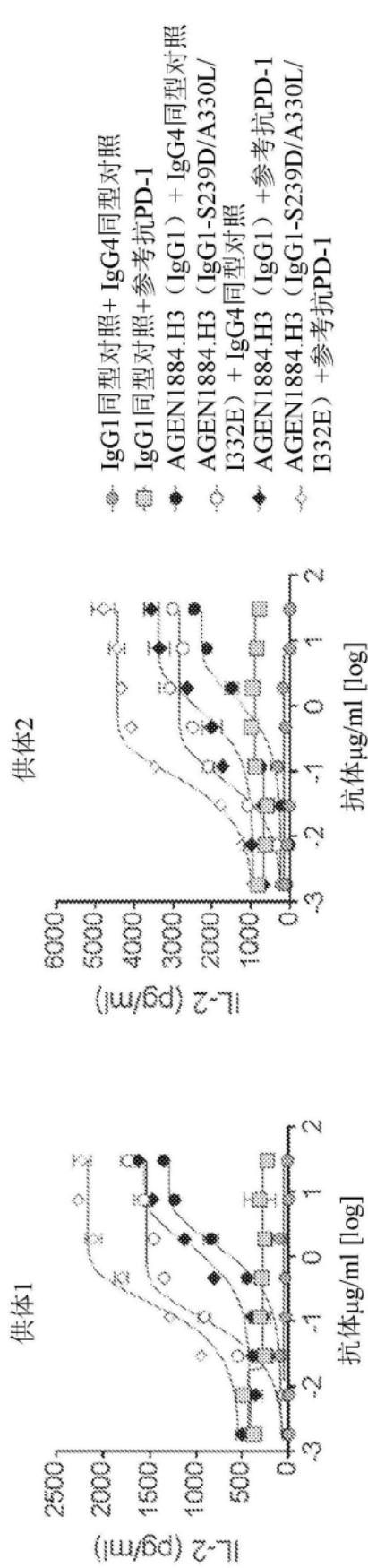


图 13C

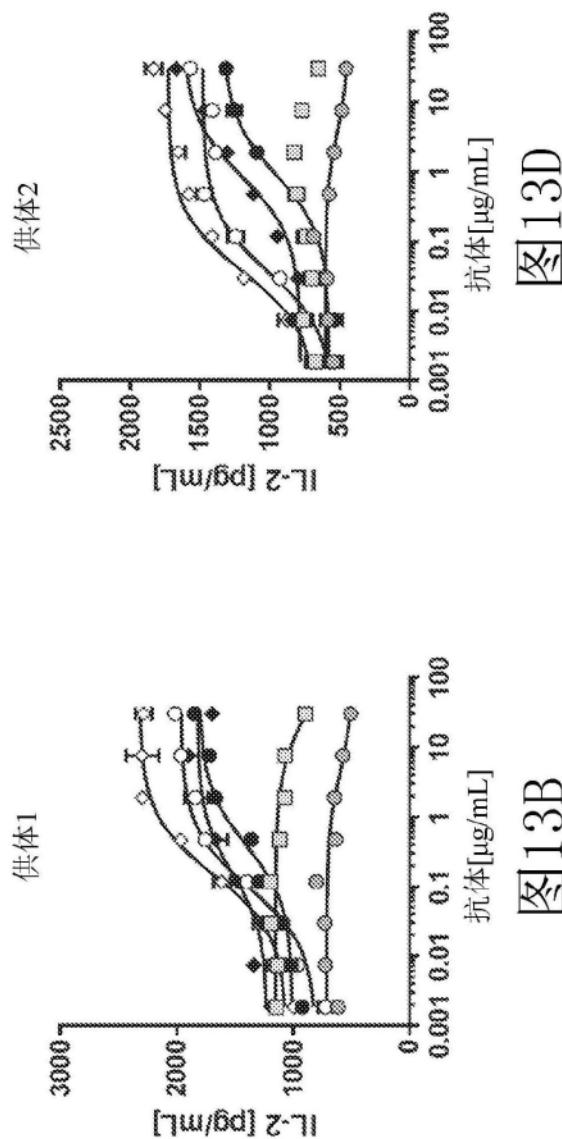


图 13B

图14A

SP P16410 CTLA4_人类	MACLGFQRHKAQLNILATRTPCCTLFFLFFIP--VFC-----KAMHVAQPAVVL-----48
TR G7PL88 G7PL88_MACFA	MACLGFQRHKAQLNILATRTPCCTLFFLFFIP--VFS-----KAMHVAQPAVVL-----48
SP P10747 CD28_人类	-----MLRLLLAIN--LEPS-IQVTGNKILLVKQSP-MLV-----30
SP P10747 CD28_人类	-----MKGSLIWIY-----EE--LECLRIKVLTGEINGSANAYEMEL-----32
SP Q9Y6W8 ICOS_人类	-----MKTLPAMLGTGKLFWV---FFLIFIYDIWNIHGKESCDVQLYIK 41
SP Q7Z6A9 BTLA_人类	-----MQ1PQAFWPVWAVIQLGWPRGFWEFLSDSPD-RPWNPPTFSPALLVV----44
SP Q15116 PDCD1_人类	*
	:
SP P16410 CTLA4_人类	-----SSRGIASEVCEYASPGKA---TEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNE---LT 96
TR G7PL88 G7PL88_MACFA	-----NSRGIASEVCEYASPGKA---TEVRVTVLRQADSQVTEVCAATYMMGNE---LT 96
SP P10747 CD28_人类	-----AYDNAVNLSCCKSYNLES---REFRASLHKGLDSA-VEVCVYGNYSQQQLQVY 79
SP Q9Y6W8 ICOS_人类	-----FHNGGVQILCKYPD---IV---QQEFKMQLLKGGQ---ILCDLTKTKGSNTIVS 76
SP Q7Z6A9 BTLA_人类	RQSEHSILAGDPFELECPVKYCANCNRPHVTWCKLN---GT-----TCVKLEDRQ-----86
SP Q15116 PDCD1_人类	-----TEGDNATFTCSFSNTSESFVLNWYRMSPSNQTDK---LAAFPEDR-----86
	:
SP P16410 CTLA4_人类	FLDDSICT----GTSSGNQVNLTI----QGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYYLIGIG-----144
TR G7PL88 G7PL88_MACFA	FLDDSICT----GTSSGNQVNLTI----QGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYYLIGIG-----144
SP P10747 CD28_人类	SKTGFNCD---GKLGNESVTFL---ONLYVNQTDIYECKIEVMYPPPYLDNEK-----127
SP Q9Y6W8 ICOS_人类	IKSIEKFCHE----SQLSNNSVSEFL---SQLSNNSVSEFL---DPPPFKVTLT-----124
SP Q7Z6A9 BTLA_人类	-----TSWKEEKNISFFILHFEPVLFNDNGSYRCSANFQSNL---IE-----125
SP Q15116 PDCD1_人类	SQPGQDCRFRVTQLPNGRDFHMSV---VRARRNDSGTYLICGAISLAPKAQIKESLRAELR 143
	... : :
	* * *

图14B

SP P16410 CTLA4_人类	-NGTQIYVIDP-----EPCPDS-----DFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSL--S-KML	190
TR G7PL88 G7PL88_MACFA	-NGTQIYVIDP-----EPCPDS-----DFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSL--S-KML	190
SP P10747 CD28_人类	SNGTIIHVRGK-----HLCPSPLFPGPSKPFWVLVVGGVLACYSLLVTVAIFI--IFWVR	180
SP Q9Y6W8 ICOS_人类	--GGYLHIYES----QLCCQL----KFWLPIGCAA---FVVVCILGCIL--ICWL	165
SP Q7Z6A9 BTLA_人类	SHSTTLYVTDVKSASERPSKDEMASR-PWLLYRLPLGG---LPLLITTCFCLFCCLLR	180
SP Q15116 PDCD1_人类	VTERRAEVPTA-----HPSPSPRSPAG-QFQTLVVGVLGVVGGLLGSVLVWVIAV--ICSR	195
:	:	:
SP P16410 CTLA4_人类	KKRSP-----LTTGVVVKMPPTE-----PEC-EKQFQPYFIPIN-----	223
TR G7PL88 G7PL88_MACFA	KKRSP-----LTTGVVVKMPPTE-----PEC-EKQFQPYFIPIN-----	223
SP P10747 CD28_人类	SKRSR----LIHSDDMMNMTPRR-----PGPTRKHQPYAPPDR--FAAYRS-----	220
SP Q9Y6W8 ICOS_人类	KKKYSSSVHDPNGEYMFMRVN----TAKKSRLTDVTI-----	199
SP Q7Z6A9 BTLA_人类	HQGKQNELSDTAGREINLVD AHLKSEQTEASTRQNSQVILLSETGYDNDPDLCFRMQEGS	240
SP Q15116 PDCD1_人类	ARG-----TIG----ARR-----TGQP-LKEDPSAVPVE--SVDYGELDFQWREKT	234
:	:	:
SP P16410 CTLA4_人类	-----	
TR G7PL88 G7PL88_MACFA	-----	
SP P10747 CD28_人类	-----	
SP Q9Y6W8 ICOS_人类	-----	
SP Q7Z6A9 BTLA_人类	-----	
SP Q15116 PDCD1_人类	-----	

图14C