

1. 一种分离的抗原结合蛋白(ABP),其特异性结合人细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4),该ABP包含CDR1-L、CDR2-L、CDR3-L、CDR1-H、CDR2-H和CDR3-H,其中所述CDR1-L由SEQ ID NO:1014组成、所述CDR2-L由SEQ ID NO:2014组成、所述CDR3-L由SEQ ID NO:3014组成、所述CDR1-H由SEQ ID NO:4014组成、所述CDR2-H由SEQ ID NO:5014组成和所述CDR3-H由SEQ ID NO:6014组成。
2. 如权利要求1所述的ABP,其中所述CDR3-L和所述CDR3-H是同源对。
3. 如权利要求1所述的ABP,其包含可变轻链(V_L),其包含SEQ ID NO:14的序列,和可变重链(V_H),其包含SEQ ID NO:114的序列。
4. 如权利要求3所述的ABP,其中所述 V_L 和所述 V_H 是同源对。
5. 如权利要求1所述的ABP,其中所述ABP包含scFv或全长单克隆抗体。
6. 如权利要求1所述的ABP,其中所述ABP包含免疫球蛋白恒定区。
7. 如权利要求1所述的ABP,其中通过表面等离子体共振所测量的,所述ABP以小于500nM的 K_D 结合人CTLA-4。
8. 如权利要求7所述的ABP,其中通过表面等离子体共振所测量的,所述ABP以小于200nM的 K_D 结合人CTLA-4。
9. 如权利要求8所述的ABP,其中通过表面等离子体共振所测量的,所述ABP以小于25nM的 K_D 结合人CTLA-4。
10. 如权利要求1-9中任一项所述的ABP,其中所述ABP以小于25nM的 K_D 结合细胞表面上的人CTLA-4。
11. 一种药物组合物,其包含如权利要求1-10中任一项所述的ABP和赋形剂。
12. 如权利要求1-10中任一项所述的ABP或者如权利要求11所述的药物组合物在制备用于在有需要的受试者中治疗癌症的药物中的用途。
13. 如权利要求12所述的用途,其中一种或多种另外的治疗剂被施用于所述受试者。
14. 如权利要求13所述的方法,其中所述另外的治疗剂选自CTLA-4抑制剂、TIGIT抑制剂、化学治疗剂、免疫刺激剂、辐射、细胞因子、编码细胞因子的多核苷酸及其组合。
15. 一种分离的多核苷酸,其编码如权利要求1-6中任一项所述的ABP。
16. 一种载体,其包含如权利要求15所述的分离的多核苷酸。
17. 一种宿主细胞,其包含如权利要求15所述的分离的多核苷酸或如权利要求16所述的载体。
18. 一种产生特异性结合人CTLA-4的分离的抗原结合蛋白(ABP)的方法,其包括:在如权利要求17所述的宿主细胞中表达所述ABP,和分离所述ABP。

抗CTLA-4结合蛋白及其使用方法

[0001] 1. 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2018年12月27日提交的美国临时专利申请号62/785,659的优先权和权益,其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 2. 序列表

[0004] 本申请包含具有11998个序列的序列表,该序列表已通过EFS-Web提交,其全部内容通过引用并入本文。所述ASCII副本创建于2019年12月20日,名为GGN-010W0_SL.txt,大小为1,927,908字节。

[0005] 3. 技术领域

[0006] 本文提供了对CTLA-4具有结合特异性的抗原结合蛋白(ABP)和包含此类ABP的组合物,包括药物组合物、诊断组合物和试剂盒。还提供了制备CTLA-4 ABP的方法和使用CTLA-4 ABP的方法,例如,用于治疗目的、诊断目的和研究目的。

[0007] 4. 背景技术

[0008] CTLA-4,也称为细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4和CD152(分化簇152),是一种抑制T细胞炎性活性的细胞表面受体。CTLA-4由调节性T细胞(Treg)组成型表达,并在受刺激的T细胞中上调。CD80和CD86也在抗原呈递细胞(APC)如树突状细胞(DC)中表达,是CTLA-4的主要配体。CTLA-4与其配体之间的相互作用对于通过抑制T细胞炎性活性来下调免疫应答和促进自身耐受性至关重要。这种活性可以预防自身免疫性疾病,并阻止免疫系统杀死癌细胞。

[0009] CTLA-4是免疫球蛋白超家族的成员,由激活的T细胞表达并向T细胞传递抑制信号。CTLA-4以比CD28更高的亲和力和亲合力结合CD80和CD86,从而使其针对其配体能够胜过CD28。CTLA-4向T细胞传递抑制信号,而CD28则传递刺激信号。CTLA-4也存在于调节性T细胞(Treg)中,并有助于其抑制功能。通过T细胞受体和CD28激活T细胞导致CTLA-4表达增加。CTLA-4在T细胞中的作用机制仍有争议。生化证据表明,CTLA-4将磷酸酶募集到T细胞受体(TCR),从而减弱信号。从其首次发表以来,这项工作在文献中仍未得到证实。最近的工作表明,CTLA-4可能通过从抗原呈递细胞的膜上捕获和去除B7-1和B7-2来在体内发挥作用,从而使其不能用于触发CD28。

[0010] CTLA-4的变体与胰岛素依赖型糖尿病、格雷夫斯氏病、桥本氏甲状腺炎、乳糜泻、系统性红斑狼疮、甲状腺相关眼眶病、原发性胆汁性肝硬化和其他自身免疫性疾病有关。CTLA-4对CD80和CD86的较高结合亲和力使其成为治疗自身免疫性疾病的潜在疗法。CTLA-4的可溶性融合蛋白和抗体(CTLA-4-Ig)已在临床试验中用于类风湿性关节炎。

[0011] 肿瘤细胞通过各种机制抑制抗肿瘤免疫反应,包括Treg的上调。最近,CTLA-4抑制剂已被证明可以拮抗CTLA-4与其配体的结合,从而激活免疫系统来攻击肿瘤。CTLA-4抗体也被用于诱导对肿瘤微环境具有特异性的Treg的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC),从而降低对肿瘤的免疫耐受性。因此,CTLA-4抗体在治疗某些类型的癌症方面取得了不同程度的成功。

[0012] 因此,需要开发可用于治疗、诊断和研究各种疾病(包括癌症和自身免疫性疾病)

的CTLA-4 ABP。

[0013] 5. 发明内容

[0014] 本文提供了具有针对CTLA-4的结合特异性的新型ABP以及使用此类ABP的方法。所述CTLA-4是人CTLA-4(SEQ ID:7001)或人CTLA-4的片段。

[0015] ABP可以包含抗体。在一些实施方式中，抗体是单克隆抗体。在一些实施方式中，抗体是嵌合抗体。在一些实施方式中，抗体是人源化抗体。在一些实施方式中，抗体是人抗体。在一些实施方式中，ABP包含抗体片段。在一些实施方式中，ABP包含替代支架。在一些实施方式中，ABP包含单链可变片段(scFv)。

[0016] 本文提供的ABP可诱导与CTLA-4的抑制相关的各种生物学效应。在一些实施方式中，本文提供的ABP阻止CTLA-4和其配体之间的结合。在一些实施方式中，本文提供的ABP阻止Treg对效应T细胞的抑制。在一些实施方式中，ABP通过ADCC和/或ADCP直接杀伤或诱导肿瘤微环境中Treg或其他CTLA-4表达细胞的杀伤，例如通过NK细胞表达的CD16与ABP Fc结构域的结合介导。在一些实施方式中，ABP通过直接杀死Treg来抑制调节性T细胞对效应T细胞的抑制。在一些实施方式中，组织是肿瘤。在一些实施方式中，ABP激活CTLA-4，导致Treg表达和激活。

[0017] 还提供了试剂盒，其包含一种或多种包含ABP的药物组合物，以及药物组合物的使用说明书。

[0018] 还提供了编码本文提供的ABP的分离的多核苷酸，及其部分。

[0019] 还提供了包含此类多核苷酸的载体。

[0020] 还提供了包含此类多核苷酸的重组宿主细胞和包含此类载体的重组宿主细胞。

[0021] 还提供了使用本文提供的多核苷酸、载体或宿主细胞产生ABP的方法。

[0022] 还提供了包含ABP和药学上可接受的赋形剂的药物组合物。

[0023] 还提供了在有需要的受试者中治疗或预防疾病或病况的方法，包括向受试者施用有效量的本文提供的ABP，或包含此类ABP的药物组合物。在一些方面中，所述疾病或病况是癌症或自身免疫性疾病。在一些方面中，所述疾病或病况是病毒或细菌感染。在一些方面中，所述方法还包括施用一种或多种另外的治疗剂。在一些方面中，所属另外的治疗剂是免疫刺激剂。

[0024] 更具体地，本公开提供了一种分离的抗原结合蛋白(ABP)，其特异性结合人细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA-4)，该ABP包含：(a)具有选自SEQ ID NO:3001-3028的序列的CDR3-L，和具有选自SEQ ID NO:6001-6028的序列的CDR3-H；或者(b)具有选自SEQ ID NO:9984-10479的序列的CDR3-L，和具有选自SEQ ID NO:11472-11967的序列的CDR3-H；或者(c)具有以ATCC登录号PTA-125512保藏的文库中任一克隆的CD3-L的序列的CDR3-L，和具有以ATCC登录号PTA-125512保藏的文库中任一克隆的CD3-L的序列的CDR3-L。在一些实施方式中，所述CDR3-L和所述CDR3-H是同源对。

[0025] 在一些实施方式中，所述ABP包含(a)具有选自SEQ ID NO:1001-1028的序列的CDR1-L，和具有选自SEQ ID NO:2001-2028的序列的CDR2-L；和具有选自SEQ ID NO:4001-4028的序列的CDR1-H；和具有选自SEQ ID NO:5001-5028的序列的CDR2-H；或者(b)具有选自SEQ ID NO:8992-9487的序列的CDR1-L；和具有选自SEQ ID NO:9488-9983的序列的CDR2-L；和具有选自SEQ ID NO:10480-10975的序列的CDR1-H；和具有选自SEQ ID NO:

10976-11471的序列的CDR2-H;或者(c)具有以ATCC登录号PTA-125512保藏的文库中任一克隆的CDR1-L的序列的CDR1-L;和具有以ATCC登录号PTA-125512保藏的文库中任一克隆的CDR2-L的序列的CDR2-L;和具有以ATCC登录号PTA-125512保藏的文库中任一克隆的CDR1-H的序列的CDR1-H;和具有以ATCC登录号PTA-125512保藏的文库中任一克隆的CDR2-H的序列的CDR2-H。

[0026] 在一些实施方式中,所述ABP包含CDR1-L、CDR2-L、CDR3-L、CDR1-H、CDR2-H和CDR3-H,其中所述CDR1-L由SEQ ID NO:1001组成、所述CDR2-L由SEQ ID NO:2001组成、所述CDR3-L由SEQ ID NO:3001组成、所述CDR1-H由SEQ ID NO:4001组成、所述CDR2-H由SEQ ID NO:5001组成和所述CDR3-H由SEQ ID NO:6001组成;或者所述CDR1-L由SEQ ID NO:1002组成、CDR2-L由SEQ ID NO:2002组成、所述CDR3-L由SEQ ID NO:3002组成、所述CDR1-H由SEQ ID NO:4002组成、所述CDR2-H由SEQ ID NO:5002组成和所述CDR3-H由SEQ ID NO:6002组成;或者所述CDR1-L由SEQ ID NO:1003组成、所述CDR2-L由SEQ ID NO:2003组成、所述CDR3-L由SEQ ID NO:3003组成、所述CDR1-H由SEQ ID NO:4003组成、所述CDR2-H由SEQ ID NO:5003组成和所述CDR3-H由SEQ ID NO:6003组成;或者所述CDR1-L由SEQ ID NO:1004组成、所述CDR2-L由SEQ ID NO:2004组成、所述CDR3-L由SEQ ID NO:3004组成、所述CDR1-H由SEQ ID NO:4004组成、所述CDR2-H由SEQ ID NO:5004组成和所述CDR3-H由SEQ ID NO:6004组成;或者所述CDR1-L由SEQ ID NO:1005组成、所述CDR2-L由SEQ ID NO:2005组成、所述CDR3-L由SEQ ID NO:3005组成、所述CDR1-H由SEQ ID NO:4005组成、所述CDR2-H由SEQ ID NO:5005组成和所述CDR3-H由SEQ ID NO:6005组成;或者所述CDR1-L由SEQ ID NO:1006组成、所述CDR2-L由SEQ ID NO:2006组成、所述CDR3-L由SEQ ID NO:3006组成、所述CDR1-H由SEQ ID NO:4006组成、所述CDR2-H由SEQ ID NO:5006组成和所述CDR3-H由SEQ ID NO:6006组成;或者所述CDR1-L由SEQ ID NO:1007组成、所述CDR2-L由SEQ ID NO:2007组成、所述CDR3-L由SEQ ID NO:3007组成、所述CDR1-H由SEQ ID NO:4007组成、所述CDR2-H由SEQ ID NO:5007组成和所述CDR3-H由SEQ ID NO:6007组成;或者所述CDR1-L由SEQ ID NO:1008组成、所述CDR2-L由SEQ ID NO:2008组成、所述CDR3-L由SEQ ID NO:3008组成、所述CDR1-H由SEQ ID NO:4008组成、所述CDR2-H由SEQ ID NO:5008组成和所述CDR3-H由SEQ ID NO:6008组成;或者所述CDR1-L由SEQ ID NO:1009组成、所述CDR2-L由SEQ ID NO:2009组成、所述CDR3-L由SEQ ID NO:3009组成、所述CDR1-H由SEQ ID NO:4009组成、所述CDR2-H由SEQ ID NO:5009组成和所述CDR3-H由SEQ ID NO:6009组成;或者所述CDR1-L由SEQ ID NO:1010组成、所述CDR2-L由SEQ ID NO:2010组成、所述CDR3-L由SEQ ID NO:3010组成、所述CDR1-H由SEQ ID NO:4010组成、所述CDR2-H由SEQ ID NO:5010组成和所述CDR3-H由SEQ ID NO:6010组成;或者所述CDR1-L由SEQ ID NO:1011组成、所述CDR2-L由SEQ ID NO:2011组成、所述CDR3-L由SEQ ID NO:3011组成、所述CDR1-H由SEQ ID NO:4011组成、所述CDR2-H由SEQ ID NO:5011组成和所述CDR3-H由SEQ ID NO:6011组成;或者所述CDR1-L由SEQ ID NO:1012组成、所述CDR2-L由SEQ ID NO:2012组成、所述CDR3-L由SEQ ID NO:3012组成、所述CDR1-H由SEQ ID NO:4012组成、所述CDR2-H由SEQ ID NO:5012组成和所述CDR3-H由SEQ ID NO:6012组成;或者所述CDR1-L由SEQ ID NO:1013组成、所述CDR2-L由SEQ ID NO:2013组成、所述CDR3-L由SEQ ID NO:3013组成、所述CDR1-H由SEQ ID NO:4013组成、所述CDR2-H由SEQ ID NO:5013组成和所述CDR3-H由SEQ ID NO:6013组成;或者所述CDR1-L由SEQ ID NO:1014组成、所述

CDR2-L由SEQ ID NO:2014组成、所述CDR3-L由SEQ ID NO:3014组成、所述CDR1-H由SEQ ID NO:4014组成、所述CDR2-H由SEQ ID NO:5014组成和所述CDR3-H由SEQ ID NO:6014组成；或者所述CDR1-L由SEQ ID NO:1015组成、所述CDR2-L由SEQ ID NO:2015组成、所述CDR3-L由SEQ ID NO:3015组成、所述CDR1-H由SEQ ID NO:4015组成、所述CDR2-H由SEQ ID NO:5015组成和所述CDR3-H由SEQ ID NO:6015组成；或者所述CDR1-L由SEQ ID NO:1016组成、所述CDR2-L由SEQ ID NO:2016组成、所述CDR3-L由SEQ ID NO:3016组成、所述CDR1-H由SEQ ID NO:4016组成、所述CDR2-H由SEQ ID NO:5016组成和所述CDR3-H由SEQ ID NO:6016组成；或者所述CDR1-L由SEQ ID NO:1017组成、所述CDR2-L由SEQ ID NO:2017组成、所述CDR3-L由SEQ ID NO:3017组成、所述CDR1-H由SEQ ID NO:4017组成、所述CDR2-H由SEQ ID NO:5017组成和所述CDR3-H由SEQ ID NO:6017组成；或者所述CDR1-L由SEQ ID NO:1018组成、所述CDR2-L由SEQ ID NO:2018组成、所述CDR3-L由SEQ ID NO:3018组成、所述CDR1-H由SEQ ID NO:4018组成、所述CDR2-H由SEQ ID NO:5018组成和所述CDR3-H由SEQ ID NO:6018组成；或者所述CDR1-L由SEQ ID NO:1019组成、所述CDR2-L由SEQ ID NO:2019组成、所述CDR3-L由SEQ ID NO:3019组成、所述CDR1-H由SEQ ID NO:4019组成、所述CDR2-H由SEQ ID NO:5019组成和所述CDR3-H由SEQ ID NO:6019组成；或者所述CDR1-L由SEQ ID NO:1020组成、所述CDR2-L由SEQ ID NO:2020组成、所述CDR3-L由SEQ ID NO:3020组成、所述CDR1-H由SEQ ID NO:4020组成、所述CDR2-H由SEQ ID NO:5020组成和所述CDR3-H由SEQ ID NO:6020组成；或者所述CDR1-L由SEQ ID NO:1021组成、所述CDR2-L由SEQ ID NO:2021组成、所述CDR3-L由SEQ ID NO:3021组成、所述CDR1-H由SEQ ID NO:4021组成、所述CDR2-H由SEQ ID NO:5021组成和所述CDR3-H由SEQ ID NO:6021组成；或者所述CDR1-L由SEQ ID NO:1022组成、所述CDR2-L由SEQ ID NO:2022组成、所述CDR3-L由SEQ ID NO:3022组成、所述CDR1-H由SEQ ID NO:4022组成、所述CDR2-H由SEQ ID NO:5022组成和所述CDR3-H由SEQ ID NO:6022组成；或者所述CDR1-L由SEQ ID NO:1023组成、所述CDR2-L由SEQ ID NO:2023组成、所述CDR3-L由SEQ ID NO:3023组成、所述CDR1-H由SEQ ID NO:4023组成、所述CDR2-H由SEQ ID NO:5023组成和所述CDR3-H由SEQ ID NO:6023组成；或者所述CDR1-L由SEQ ID NO:1024组成、所述CDR2-L由SEQ ID NO:2024组成、所述CDR3-L由SEQ ID NO:3024组成、所述CDR1-H由SEQ ID NO:4024组成、所述CDR2-H由SEQ ID NO:5024组成和所述CDR3-H由SEQ ID NO:6024组成；或者所述CDR1-L由SEQ ID NO:1025组成、所述CDR2-L由SEQ ID NO:2025组成、所述CDR3-L由SEQ ID NO:3025组成、所述CDR1-H由SEQ ID NO:4025组成、所述CDR2-H由SEQ ID NO:5025组成和所述CDR3-H由SEQ ID NO:6025组成；或者所述CDR1-L由SEQ ID NO:1026组成、所述CDR2-L由SEQ ID NO:2026组成、所述CDR3-L由SEQ ID NO:3026组成、所述CDR1-H由SEQ ID NO:4026组成、所述CDR2-H由SEQ ID NO:5026组成和所述CDR3-H由SEQ ID NO:6026组成；或者所述CDR1-L由SEQ ID NO:1027组成、所述CDR2-L由SEQ ID NO:2027组成、所述CDR3-L由SEQ ID NO:3027组成、所述CDR1-H由SEQ ID NO:4027组成、所述CDR2-H由SEQ ID NO:5027组成和所述CDR3-H由SEQ ID NO:6027组成；或者所述CDR1-L由SEQ ID NO:1028组成、所述CDR2-L由SEQ ID NO:2028组成、所述CDR3-L由SEQ ID NO:3028组成、所述CDR1-H由SEQ ID NO:4028组成、所述CDR2-H由SEQ ID NO:5028组成和所述CDR3-H由SEQ ID NO:6028组成。

[0027] 在一些实施方式中，所述ABP包含可变轻链(V_L)，其包含与选自SEQ ID NO:1-28的序列具有至少97%同一性的序列，和可变重链(V_H)，其包含与选自SEQ ID NO:101-128的序

列具有至少97%同一性的序列；或者可变轻链(V_L)，其包含与选自SEQ ID NO:8000-8495的序列具有至少97%同一性的序列，和可变重链(V_H)，其包含与选自SEQ ID NO:8496-8991的序列具有至少97%同一性的序列；或者可变轻链(V_L)，其包含与以ATCC登录号PTA-125512保藏的文库中任一克隆的 V_L 序列具有至少97%同一性的序列，和可变重链(V_H)，其包含与以ATCC登录号PTA-125512保藏的文库中任一克隆的 V_H 序列具有至少97%同一性的序列。在一些实施方式中，所述 V_L 和所述 V_H 是同源对。

[0028] 在一些实施方式中，所述ABP包含可变轻链(V_L)，其包含选自SEQ ID NO:1-28的序列，和可变重链(V_H)，其包含选自SEQ ID NO:101-128的序列；或者可变轻链(V_L)，其包含选自SEQ ID NO:8000-8495的序列，和可变重链(V_H)，其包含选自SEQ ID NO:8496-8991的序列；或者可变轻链(V_L)，其包含以ATCC登录号PTA-125512保藏的文库中任一克隆的 V_L 序列，和可变重链(V_H)，其包含以ATCC登录号PTA-125512保藏的文库中任一克隆的 V_H 序列。在一些实施方式中，所述 V_L 和所述 V_H 是同源对。

[0029] 在一些实施方式中，所述ABP包含scFv或全长单克隆抗体。在一些实施方式中，所述ABP包含免疫球蛋白恒定区。

[0030] 在一些实施方式中，如通过表面等离子体共振所测量的，所述ABP以小于500nM的 K_d 结合人CTLA-4。在一些实施方式中，如通过表面等离子体共振所测量的，所述ABP以小于200nM的 K_d 结合人CTLA-4。在一些实施方式中，如通过表面等离子体共振所测量的，所述ABP以小于25nM的 K_d 结合人CTLA-4。在一些实施方式中，所述ABP以小于25nM的 K_d 结合细胞表面上的人CTLA-4。

[0031] 本公开的另一个方面提供了一种治疗疾病的步骤，其包括以下步骤：向有需要的受试者施用有效量的本文公开的ABP或本文公开的药物组合物。在一些实施方式中，所述疾病选自以下：癌症、AIDS、阿尔茨海默氏病和病毒或细菌感染。在一些实施方式中，所述方法还包括向所述受试者施用一种或多种另外的治疗剂的步骤。在一些实施方式中，所述另外的治疗剂选自CTLA-4抑制剂、TIGIT抑制剂、化学治疗剂、免疫刺激剂、辐射、细胞因子、编码细胞因子的多核苷酸及其组合。

[0032] 6.附图说明

[0033] 图1总结了从分离自全人小鼠的B细胞生成scFv文库并选择表达对抗原具有高亲和力的抗体的B细胞的方法。图1按照出现顺序分别公开了SEQ ID NO 11971-11998。

[0034] 图2说明了scFv扩增程序。首先，将针对IgK C区、IgG C区和所有V区的引物的混合物用于分别扩增IgK和IgH。其次，V-H和C-K引物包含互补区，其导致形成作为IgK和IgH之间的融合产物的重叠延伸扩增子。该互补区包含编码富含Gly-Ser的scFv接头序列的DNA序列。再次，进行半巢式PCR，以添加用于 Illumina 测序或酵母展示的衔接子。

[0035] 图3包括在其表位分箱中分选单克隆抗体的示意图。

[0036] 图4包括来自携带MC38肿瘤的hCTLA-4 KI小鼠的组织病理性染色的图。该图显示了来自右肾的H&E、免疫球蛋白(Ig)和C3染色的评分。ipi是伊匹单抗，和CTLA4.A14.2a是在小鼠IgG2a骨架上克隆的抗体A14。

[0037] 图5包括显示携带MC38肿瘤的经治疗的hCTLA4KI小鼠中碱性磷酸酶水平的图。IPI是伊匹单抗，和CTLA4.A14.2a是在小鼠IgG2a骨架上克隆的抗体A14。U/L是单位/升。

[0038] 图6包括指定治疗后肿瘤内调节性T细胞(Treg)细胞和肿瘤内自然杀伤(NK)细胞

的百分比图。

[0039] 图7包括显示接受指定治疗的hCTLA4小鼠体重变化的图。Ipi是伊匹单抗,和CTLA4.A14.2a是在小鼠IgG2a骨架上克隆的抗体A14。误差线表示平均值的+/-标准误差。

[0040] 图8包括显示对照、Ipi和抗CTLA4治疗对指定细胞群百分比的影响的图。Ipi是伊匹单抗,和CTLA4.A14.2a是在小鼠IgG2a骨架上克隆的抗体A14。

[0041] 图9包括显示对照、Ipi和抗CTLA4治疗对指定细胞群的百分比的影响的图。Ipi是伊匹单抗,和CTLA4.A14.2a是在小鼠IgG2a骨架上克隆的抗体A14。

[0042] 图10包括显示对照、Ipi和抗CTLA4治疗对树突状细胞 (DC) 和激活树突状细胞 (CD86+) 百分比的影响的图。Ipi是伊匹单抗,和CTLA4.A14.2a是在小鼠IgG2a骨架上克隆的抗体A14。

[0043] 图11包括显示用0.3mg/kg指定抗CTLA4治疗后平均肿瘤体积的图。

[0044] 7. 具体实施方式

[0045] 7.1. 定义

[0046] 除非本文另有定义,否则与本公开相关的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员通常理解的含义。此外,除非上下文另有要求,否则单数术语应包括复数,而复数术语应包括单数。通常,与本文所述的细胞和组织培养、分子生物学、免疫学、微生物学、遗传学以及蛋白质和核酸化学和杂交相关的命名法和技术是本领域熟知和常用的那些。除非另有说明,否则本公开的方法和技术通常根据本领域熟知的常规方法进行,并且如在本说明书通篇引用和讨论的各种一般性和更具体的参考文献中所描述的。参见,例如,Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,2d ed.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989)和Ausubel等,Current Protocols in Molecular Biology,Greene Publishing Associates(1992),以及Harlow和Lane Antibodies:A Laboratory Manual Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.(1990),其通过引用并入本文。酶促反应和纯化技术根据产生厂商的说明书进行,如本领域中通常完成的或如本文所述的。与本文所述的分析化学、合成有机化学以及药用和药物化学相关使用的术语,以及其实验室程序和技术是本领域熟知和常用的那些。可以用于化学合成、化学分析、药物制备、制剂、和递送以及患者治疗的标准技术。

[0047] 除非另有说明,否则以下术语应理解为具有以下含义:

[0048] 术语“CTLA-4”、“CTLA-4蛋白”和“CTLA-4抗原”在本文中可互换使用,指人CTLA-4或任何变体(例如,剪接变体和等位基因变体)、异形体以及人CTLA-4的物种同源物,其由细胞天然表达,或者由转染了ctla4基因的细胞表达。在一些方面中,CTLA-4蛋白是由灵长类(例如,猴或人)、啮齿类(例如,小鼠或大鼠)、犬、骆驼、猫、奶牛、山羊、马或绵羊天然表达的CTLA-4蛋白。在一些方面中,CTLA-4蛋白是人CTLA-4(hCTLA-4;SEQ ID NO:7001)。

[0049] 术语“免疫球蛋白”指一类结构相关的蛋白质,其通常包含两对多肽链:一对轻(L)链和一对重(H)链。在“完整免疫球蛋白”中,所有这四条链均通过二硫键相互连接。免疫球蛋白的结构已被很好地表征。参见,例如,Paul,Fundamental Immunology 7th ed.,Ch.5(2013)Lippincott Williams&Wilkins,Philadelphia,PA。简言之,每条重链通常包含重链可变区(V_H)和重链恒定区(C_H)。重链恒定区通常包含三个结构域,缩写为 C_{H1} 、 C_{H2} 和 C_{H3} 。每条轻链通常包含轻链可变区(V_L)和轻链恒定区。轻链恒定区通常包含一个结构域,缩写为 C_L 。

[0050] 术语“抗原结合蛋白”(ABP)指包含特异性结合抗原或表位的一个或多个抗原结合结构域的蛋白质。在一些实施方式中，抗原结合结构域以与天然存在的抗体相似的特异性和亲和力结合抗原或表位。在一些实施方式中，ABP包含抗体。在一些实施方式中，ABP由抗体组成。在一些实施方式中，ABP基本上由抗体组成。在一些实施方式中，ABP包含替代支架。在一些实施方式中，ABP由替代支架组成。在一些实施方式中，ABP基本上由替代支架组成。在一些实施方式中，ABP包含抗体片段。在一些实施方式中，ABP由抗体片段组成。在一些实施方式中，ABP基本上由抗体片段组成。“CTLA-4 ABP”、“抗CTLA-4 ABP”或“CTLA-4特异性ABP”是如本文所提供的与抗原CTLA-4特异性结合的ABP。在一些实施方式中，ABP结合CTLA-4的胞外域。在某些实施方式中，本文提供的CTLA-4 ABP结合在来自不同物种的CTLA-4蛋白之间或之中保守的CTLA-4表位。

[0051] 术语“抗体”在本文中以其最广泛的含义使用，包括某些类型的免疫球蛋白分子，其包含一个或多个特异性结合抗原或表位的抗原结合结构域。抗体特别地包括完整抗体(例如，完整免疫球蛋白)、抗体片段和多特异性抗体。抗原结合结构域的一个实例是由 V_H - V_L 二聚体形成的抗原结合结构域。抗体是ABP的一种类型。

[0052] 术语“替代支架”是指一种分子，其中一个或多个区域可以多样化以产生一个或多个与抗原或表位特异性结合的抗原结合结构域。在一些实施方式中，抗原结合结构域以与天然存在的抗体相似的特异性和亲和力结合抗原或表位。示例性替代支架包括来源于纤连蛋白(例如, AdnectinsTM)、 β -夹心(例如, iMab)、脂质运载蛋白(例如, Anticalins[®])、EETI-II/AGRP、BPTI/LACI-D1/ITI-D2(例如, Kunitz结构域)、硫氧环蛋白肽适体、蛋白A(例如, Affibody[®])、锚蛋白重复序列(例如, DARPin^s)、 γ -B-晶状体蛋白/泛素(例如, Affilins)、CTLD3(例如, 四联蛋白)、Fynomers和(LDLR-A模块)(例如, Avimers)的那些。在Binz等, Nat. Biotechnol., 2005, 23:1257-1268; Skerra, Current Opin. in Biotech., 2007, 18:295-304; 和Silacci等, J. Biol. Chem., 2014, 289:14392-14398中提供了替代支架的其他新型；其每一个的全部内容通过引用并入。替代支架是ABP的一种类型。

[0053] 术语“抗原结合结构域”指能够特异性结合抗原或表位的ABP的部分。

[0054] 术语“全长抗体”、“完整抗体”和“全抗体”在本文中可互换使用，指具有与天然存在的抗体结构基本相似的结构并且具有包含Fc区的重链的抗体。

[0055] 术语“Fc区”是指免疫球蛋白重链的C末端区域，在天然存在的抗体中，其与Fc受体和补体系统的某些蛋白相互作用。各种免疫球蛋白Fc区的结构以及其中包含的糖基化位点是本领域公知的。参见Schroeder和Cavacini, J. Allergy Clin. Immunol., 2010, 125:S41-52, 其全部内容通过引用并入。Fc区可以是天然存在的Fc区，或者如本公开其他地方所述的经修饰的Fc区。

[0056] V_H 和 V_L 区可以进一步细分为高变区(“高变区(HVR)；”也称为“互补性决定区(CDR)），其中散布着更保守的区域。更保守的区域称为框架区(FR)。每个 V_H 和 V_L 通常包含三个CDR和四个FR, 其按照以下顺序排列(从N末端到C末端)：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。CDR参与抗原结合，并影响抗体的抗原特异性和结合亲和力。参见Kabat等, Sequences of Proteins of Immunological Interest 5th ed. (1991) Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 其全部内容通过引用并入。

[0057] 基于其恒定结构域的序列,来自任何脊椎动物物种的轻链可以归为两种类型之一,称为 κ (κ)和 λ (λ)。

[0058] 来自任何脊椎动物物种的重链可以归为五种不同类型(或同种型)之一:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。这些类别也分别称为 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 和 μ 。IgG和IgA类别根据序列和功能的差异进一步分为亚类。人表达以下亚类:IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。

[0059] CDR的氨基酸序列边界可由本领域技术人员使用多种已知编号方案中的任一种确定,包括由Kabat等,同上(“Kabat”编号方案);Al-Lazikani等,1997,J.Mol.Biol.,273:927-948(“Chothia”编号方案);MacCallum等,1996,J.Mol.Biol.262:732-745(“Contact”编号方案);Lefranc等,Dev.Comp.Immunol.,2003,27:55-77(“IMGT”编号方案);和Honegger和Plückthun,J.Mol.Biol.,2001,309:657-70(“AHo”编号方案)描述的那些;其每一个的全部内容通过引用并入。

[0060] 表1提供了CDR1-L(V_L 的CDR1)、CDR2-L(V_L 的CDR2)、CDR3-L(V_L 的CDR3)、CDR1-H(V_H 的CDR1)、CDR2-H(V_H 的CDR2)和CDR3-H(V_H 的CDR3)的位置,如通过Kabat和Chothia方案鉴定的。对于CDR1-H,使用Kabat和Chothia编号方案两者提供残基编号。

[0061] 例如,可以使用抗体编号软件分配CDR,如从www.bioinf.org.uk/abs/abnum/获得的Abnum,以及在Abhinandan和Martin,Immunology,2008,45:3832-3839中对其进行描述,其全部内容通过引用并入。

表1: 根据Kabat和Chothia编号方案的CDR中的残基		
CDR	Kabat	Chothia
CDR1-L	24-34	24-34
CDR2-L	50-56	50-56
CDR3-L	89-97	89-97
CDR1-H (Kabat编号)	31-35B	26-32或34*
CDR1-H (Chothia编号)	31-35	26-32
CDR2-H	50-65	52-56
CDR3-H	95-102	95-102

[0062] [0063] *当使用Kabat编号惯例编号时,CDR1-H的C末端在32和34之间变化,其取决于CDR的长度。

[0064] 当涉及抗体重链恒定区中的残基时,通常使用“EU编号方案”(例如,如在Kabat等中报道的,同上)。

[0065] “抗体片段”包含完整抗体的一部分,如完整抗体的抗体结合或可变区。抗体片段包括例如Fv片段、Fab片段、 $F(ab')$ ₂片段、Fab'片段、scFv(sFv)片段和scFv-Fc片段。

[0066] “Fv”片段包含一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域非共价连接的二聚体。

[0067] 除了重链和轻链可变结构域以外,“Fab”片段包含轻链的恒定结构域和重链的第一恒定结构域(C_{H1})。Fab片段可以例如通过重组方法或通过完整抗体的木瓜蛋白酶消化产生。

[0068] “ $F(ab')$ ₂”片段包含两个Fab'片段,其在铰链区附近通过二硫键连接。 $F(ab')$ ₂片段可以例如通过重组方法或通过完整抗体的木瓜蛋白酶消化产生。 $F(ab')$ 片段可以被解离,例如,通过使用 β -巯基乙醇处理。

[0069] “单链Fv”、“sFv”或“scFv”抗体片段包含在单一多肽链中的 V_H 结构域和 V_L 结构域。 V_H 和 V_L 通常通过肽接头连接。参见Plückthun A. (1994)。在一些实施方式中,接头是(GGGGS)_n(SEQ ID N0:11968)。在一些实施方式中,n=1、2、3、4、5或6。参见Antibodies from

Escherichia coli. In Rosenberg M.&Moore G.P. (Eds.), *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies* vol.113 (pp.269-315). Springer-Verlag, New York, 其全部内容通过引用并入。

[0070] “scFv-Fc”片段包含附接至Fc结构域的scFv。例如,Fc结构域可以附接至scFv的C末端。Fc结构域可以在V_H或V_L之后,这取决于在scFv中可变结构域的方向(即,V_H-V_L或V_L-V_H)。可以使用本领域公知的或本文所述的任何合适的Fc结构域。在一些情况下,Fc结构域包含IgG4 Fc结构域。

[0071] 术语“单域抗体”指其中抗体的一个可变结构域特异性结合抗原而不存在其他可变结构域的分子。单域抗体及其片段如在Arabi Ghahroudi等,FEBS Letters,1998,414:521-526和Muyllemans等,Trends in Biochem.Sci.,2001,26:230-245中所描述的,其每一个的全部内容通过引用并入。

[0072] “单特异性ABP”是包含与单个表位特异性结合的结合位点的ABP。单特异性ABP的实例是天然存在的IgG分子,其虽然是二价的,但在每个抗原结合结构域识别相同表位。结合特异性可以以任何合适的化合价存在。

[0073] 术语“单克隆抗体”指来自一组基本同质的抗体的抗体。除了在单克隆抗体产生过程中通常可能出现的变体以外,一组基本上同质的抗体包含基本上相似并结合一个或多个相同表位的抗体。此类变体通常仅以少量存在。单克隆抗体通常通过包括从多种抗体中选择单一抗体的方法获得。例如,选择方法可以是从多个克隆中选择独特克隆,如杂交瘤克隆、噬菌体克隆、酵母克隆、细菌克隆或其他重组DNA克隆。可以进一步改变选择的抗体,例如,以提高对靶标的亲和力(“亲和力突变”)、使抗体人源化、提高其在细胞培养物中的产量和/或降低其在受试者中的免疫原性。

[0074] 术语“嵌合抗体”指重链和/或轻链的一部分来源于特定来源或物种,而重链和/或轻链的其余部分来源于不同来源或物种的抗体。

[0075] “人源化”形式的非人抗体是嵌合抗体,其包含来源于非人抗体的最小序列。人源化抗体通常是人抗体(受体抗体),其中来自一个或多个CDR的残基被来自非人抗体(供体抗体)的一个或多个CDR残基替代。供体抗体可以是任何合适的非人抗体,如具有所需特异性、亲和力或生物学效应的小鼠、大鼠、兔、鸡或非人灵长类抗体。在一些情况下,受体抗体的选定框架区残基被来自供体抗体的相应康佳区残基替代。人源化抗体还包含在受体抗体或供体抗体中均未发现的残基。可以进行此类修饰以进一步完善抗体功能。关于进一步的细节,参见Jones等,Nature,1986,321:522-525;Riechmann等,Nature,1988,332:323-329;和Presta,Curr.Op.Struct.Biol.,1992,2:593-596,其每一个的全部内容通过引用并入。

[0076] “人抗体”是这样一种抗体,其具有与由人或人细胞产生的或源自利用人抗体文库或人抗体编码序列的非人来源抗体的氨基酸序列相对应的氨基酸序列(例如,从人类来源获得或从头设计)。人抗体明确排除人源化抗体。在一些实施方式中,啮齿动物经基因改造,用人抗体替代其啮齿动物抗体序列。

[0077] “分离的ABP”或“分离的核酸”是已从天然环境的组分中分离和/或回收的ABP或核酸。天然环境的组分可以包括酶、激素和其他蛋白或非蛋白材料。在一些实施方式中,分离的ABP被纯化到足以获得至少15个N-末端或内部氨基酸序列残基的程度,例如通过使用旋转杯测序仪。在一些实施方式中,在还原或非还原条件下通过凝胶电泳(例如,SDS-PAGE)将

分离的ABP纯化至均质，并通过考马斯蓝或银染进行检测。分离的ABP包括重组细胞内的原位ABP，因为ABP天然环境的至少一种组分不存在。在一些方面中，分离的ABP或分离的核酸通过至少一个纯化步骤制备。在一些实施方式中，分离的ABP或分离的核酸被纯化至以重量计至少80%、85%、90%、95%或99%。在一些实施方式中，分离的ABP或分离的核酸被纯化至以体积计至少80%、85%、90%、95%或99%。在一些实施方式中，分离的ABP或分离的核酸以溶液形式提供，所述溶液包含以重量计至少85%、90%、95%、98%、99%至100%的ABP或核酸。在一些实施方式中，分离的ABP或分离的核酸以溶液形式提供，所述溶液包含以体积计至少85%、90%、95%、98%、99%至100%的ABP或核酸。

[0078] “亲和力”指分子(例如,ABP)的单个结合位点与其结合伴体(例如,抗原或表位)之间的非共价相互作用总和的强度。除非另有说明,否则如本文所用,“亲和力”指内在结合亲和力,其反映了结合对成员(例如,ABP和抗原或表位)之间的1:1相互作用。分子X对其伴体Y的亲和力可以用解离平衡常数(K_D)表示。在下面更详细地描述了有助于解离平衡常数的动力学组分。可以通过本领域公知的通常方法测量亲和力,包括本文所述的哪些。可以例如使用表面等离子体共振(SPR)技术(例如, BIACORE[®])或生物层干涉法(例如, FORTEBIO[®])确定亲和力。

[0079] 关于ABP与靶分子的结合,术语“结合”、“特异性的结合”、“特异性结合”、“特异性针对”、“选择性结合”和“选择性针对”特定抗原(例如,多肽靶标)或特定抗原上的表位意指与非特异性或非选择性相互作用(例如,与非靶分子)显著不同的结合。例如,可以通过测量与靶分子的结合并将其与同非靶分子的结合进行比较来测量特异性结合。特异性结合也可以通过与模拟靶分子上识别的表位的对照分子的竞争来确定。在这种情况下,如果ABP与靶分子的结合被对照分子竞争性抑制,则表明特异性结合。在一些方面中,CTLA-4 ABP对非靶分子的亲和力小于对CTLA-4亲和力的约50%。在一些方面中,CTLA-4 ABP对非靶分子的亲和力小于对CTLA-4亲和力的约40%。在一些方面中,CTLA-4 ABP对非靶分子CTLA-4 ABP的亲和力小于对CTLA-4亲和力的约30%。在一些方面中,CTLA-4 ABP对非靶分子CTLA-4 ABP的亲和力小于对CTLA-4亲和力的约20%。在一些方面中,CTLA-4 ABP对非靶分子CTLA-4 ABP的亲和力小于对CTLA-4亲和力的约10%。在一些方面中,CTLA-4 ABP对非靶分子CTLA-4 ABP的亲和力小于对CTLA-4亲和力的约1%。在一些方面中,CTLA-4 ABP对非靶分子CTLA-4 ABP的亲和力小于对CTLA-4亲和力的约0.1%。

[0080] 如本文所用,术语“ k_d ”(秒⁻¹)指特定ABP-抗原相互作用的解离速率常数。该值也称为 K_{off} 值。

[0081] 如本文所用,术语“ k_a ”(M⁻¹×秒⁻¹)指特定ABP-抗原相互作用的结合速率常数。该值也称为 K_{on} 值。

[0082] 如本文所用,术语“ K_D ”(M)指特定ABP-抗原相互作用的解离平衡常数。 $K_D = k_d/k_a$ 。

[0083] 如本文所用,术语“ K_A ”(M⁻¹)指特定ABP-抗原相互作用的结合平衡常数。 $K_A = k_a/k_d$ 。

[0084] “亲和力成熟”的ABP是一种具有一个或多个改变(例如,在一个或多个CDR或FR中的ABP,与不具有一个或多个改变的亲本ABP相比,其导致ABP对其抗原的亲和力提高。在一个实施方式中,亲和力成熟的ABP针对靶抗原具有纳摩尔或皮摩尔的亲和力。亲和力成熟的ABP可以使用本领域公知的各种方法产生。例如,Marks等,(Bio/Technology, 1992, 10:779-

783,其全部内容通过引用并入)描述了通过V_H和V_L结构域重排的亲和力成熟。通过以下描述了CDR和/或框架残基的随机诱变,例如,Barbas等,(Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.,1994,91:3809-3813);Schier等,Gene,1995,169:147-155;Yelton等,J.Immunol.,1995,155:1994-2004;Jackson等,J.Immunol.,1995,154:3310-33199;和Hawkins等,J.Mol.Biol.,1992,226:889-896;其每一个的全部内容通过引用并入。

[0085] “免疫缀合物”是与一种或多种异源分子缀合的ABP。

[0086] “效应功能”指由抗体Fc区介导的生物学活性,其活性可以因抗体同种型而异。抗体效应功能的实例包括激活补体依赖性细胞毒性(CDC)的C1q结合、激活抗体依赖性细胞毒性(ADCC)和抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)的Fc受体结合。

[0087] 当本文在两个或多个ABP的背景下使用时,术语“与……竞争”或“与……交叉竞争”表示该两个或更多个ABP竞争结合抗原(例如,CTLA-4)。在一个示例性测定中,将CTLA-4涂覆在表面上并与第一CTLA-4 ABP接触,然后加入第二CTLA-4 ABP。在另一个示例性测定中,将第一CTLA-4 ABP涂覆在表面上并与CTLA-4接触,然后加入第二CTLA-4 ABP。如果第一CTLA-4 ABP的存在降低了第二CTLA-4 ABP的结合,则在任一测定中ABP竞争。术语“与……竞争”还包括ABP的组合,其中一个ABP减少了另一个ABP的结合,但是当ABP以相反顺序添加时没有观察到竞争。然而,在一些实施方式中,第一和第二ABP抑制彼此的结合,无论它们的添加顺序如何。在一些实施方式中,一种ABP将另一种ABP与其抗原的结合降低至少25%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少85%、至少90%或至少95%。技术人员可以基于ABP对CTLA-4的亲和力和ABP的价数选择用于竞争测定的抗体浓度。在该定义中描述的测定是说明性的,且技术人员可以利用任何合适的测定来确定抗体是否相互竞争。例如在Cox等,“Immunoassay Methods,”Assay Guidance Manual[Internet],2014年12月24日更新(www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK92434/;2015年9月29日访问);Silman等,Cytometry,2001,44:30-37;和Finco等,J.Pharm.Biomed.Anal.,2011,54:351-358中描述了合适的测定;其每一个的全部内容通过引用并入。

[0088] 术语“表位”指特异性结合ABP的抗原的一部分。表位通常由表面可接近的氨基酸残基和/或糖侧链组成,并且可能具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。构象和非构象表位的区别在于,在变性溶剂的存在下可能会失去与前者而不是后者的结合。表位可以包含直接参与结合的氨基酸残基,以及不直接参与结合的其他氨基酸残基。ABP与其结合的表位可以使用已知的用于表位测定的技术来确定,例如,测试ABP与具有不同点突变的CTLA-4变体或嵌合CTLA-4变体的结合。

[0089] 多肽序列和参考序列之间的“同一性”百分比,定义为在比对序列并引入缺口(如果需要)之后,多肽序列中与参考序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比,以达到最大的序列同一性百分比。可以以本领域技术范围内的各种方式实现用于确定氨基酸序列同一性百分比目的的比对,例如,使用公开可用的计算机软件,如BLAST、BLAST-2、ALIGN、MEGALIGN(DNASTAR)、CLUSTALW、CLUSTAL OMEGA或MUSCLE软件。本领域技术人员可以确定用于比对序列的适当参数,包括在被比较序列的全长上实现最大比对所需的任何算法。

[0090] “保守性置换”或“保守性氨基酸置换”指使用化学或功能上相似的氨基酸置换氨基酸。提供相似氨基酸的保守性置换表是本领域熟知的。例如,表2-4中提供的氨基酸组在一些实施方式中被认为是彼此的保守性置换。

表2: 在某些实施方式中, 被认为是彼此的保守性置换的选定的氨基酸组	
酸性残基	D和E
碱性残基	K、R和H
亲水性不带电残基	S、T、N和Q
脂肪族不带电残基	G、A、V、L和I
非极性不带电残基	C、M和P
芳香族残基	F、Y和W

[0091]

表3: 在某些实施方式中, 被认为是彼此的保守性置换的另外选定的氨基酸组	
第1组	A、S和T
第2组	D和E
第3组	N和Q
第4组	R和K
第5组	I、L和M
第6组	F、Y和W

[0092]

表4: 在某些实施方式中, 被认为是彼此的保守性置换的进一步选定的氨基酸组	
第A组	A和G
第B组	D和E
第C组	N和Q
第D组	R、K和H
第E组	I、L、M、V
第F组	F、Y和W
第G组	S和T
第H组	C和M

[0093] [0094] [0095] 其他保守性置换可以参见例如Creighton, Proteins: Structures and Molecular Properties 2nd ed. (1993) W.H.Freeman&Co., New York, NY。通过在亲本ABP中制备一个或多个保守性氨基酸残基置换产生的ABP称为“保守性修饰的变体”。

[0096] [0097] [0098] [0099] [0100] 术语“治疗(treating)”(及其变体,如“治疗(treat)”或“治疗(treatment)”)指试图改变有需要的受试者的疾病或病症的自然过程的临床干预。治疗即可以用于预防,也可以在临床病理过程中进行。治疗的预期效果包括预防疾病的发生或复发、减轻症状、减轻疾病的任何直接或间接病理后果、预防转移、降低疾病进展速度、改善或缓解疾病状态以及缓解或改善预后。

[0101] [0102] 如本文所用,术语“治疗有效量”或“有效量”指本文提供的ABP或药物组合物的量,当施用于受试者时,可有效治疗疾病或病症。

[0103] [0104] [0105] [0106] [0107] 如本文所用,术语“受试者”指哺乳动物受试者。示例性受试者包括人、猴、犬、猫、小鼠、大鼠、奶牛、马、骆驼、山羊、兔和绵羊。在某些实施方式中,受试者是人。在一些实施方式中,受试者患有能够使用本文提供的ABP治疗的疾病或病况。在一些方面中,疾病或病况是癌症。在一些方面中,疾病或病况是病毒感染。

[0108] [0109] [0110] [0111] [0112] 术语“包装说明书”用于指通常包含在治疗或诊断产品(例如,试剂盒)的商业包装中的说明书,其中包含使用此类治疗或诊断产品所关注的有关适应症、用法、剂量、给药、联合治疗、禁忌症和/或使用警告信息。

[0113] [0114] [0115] [0116] [0117] 如本文所用,术语“细胞毒剂”指抑制或阻止细胞功能和/或导致细胞死亡或破坏的物质。

[0118] [0119] [0120] [0121] [0122] “化学治疗剂”指用于治疗癌症的化学化合物。化学治疗剂包括“抗激素剂”或“内分泌治疗剂”,其作用是调节、减少、阻断或抑制可促进癌症生长的激素的作用。

[0102] 术语“细胞抑制剂”指在体外或体内阻止细胞生长的化合物或组合物。在一些实施方式中,细胞抑制剂是降低S期细胞百分比的药剂。在一些实施方式中,细胞抑制剂降低S期细胞百分比至少约20%、至少约40%、至少约60%或至少约80%。

[0103] 术语“肿瘤”指所有肿瘤细胞生长和增殖,无论是恶性的还是良性的,以及所有癌前和癌变细胞和组织。术语“癌症”、“癌性”、“细胞增殖性病症”、“增殖性病症”和“肿瘤”在本文中并不互相排斥。术语“细胞增殖性病症”和“增殖性病症”指与某些程度的异常细胞增殖相关的病症。在一些实施方式中,细胞增殖性病症是癌症。

[0104] 术语“药物组合物”指这样一种制剂,其形式使得包含在其中的活性成分的生物学活性能够有效治疗受试者,并且不包含对受试者具有不可接受的毒性的附加成分。

[0105] 术语“调节(modulate)”和“调节(modulation)”指降低或抑制,或者,激活或增加所列举的变量。

[0106] 术语“增加”和“激活”指所列举的变量增加10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍或更多。

[0107] 术语“减少”和“抑制”指所列举的变量减少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、20倍、50倍、100倍或更多。

[0108] 术语“激动”指激活受体信号以诱导与受体激活相关的生物应答。“激动剂”是与受体结合并激动受体的实体。

[0109] 术语“拮抗”指抑制受体信号传导以抑制与受体激活相关的生物应答。“拮抗剂”是与受体结合并拮抗受体的实体。

[0110] 术语“效应T细胞”包括T辅助(即,CD4+)细胞和细胞毒性(即,CD8+)T细胞。CD4+效应T细胞有助于多种免疫过程的发展,包括B细胞成熟为浆细胞和记忆B细胞,以及细胞毒性T细胞和巨噬细胞的激活。CD8+效应T细胞破坏病毒感染的细胞和肿瘤细胞。参见Seder和Ahmed,Nature Immunol.,2003,4:835-842,其全部内容通过引用并入,用于提供效应T细胞的更多信息。

[0111] 术语“调节性T细胞”包括调节免疫耐受的细胞,例如,通过抑制效应T细胞。在一些方面中,调节性T细胞具有CD4+CD25+Foxp3+表型。在一些方面中,调节性T细胞具有CD8+CD25+表型。参见Nocentini等,Br.J.Pharmacol.,2012,165:2089-2099,其全部内容通过引用并入,用于提供调节性T细胞的更多信息。

[0112] 术语“树突状细胞”指能够激活幼稚T细胞和刺激B细胞生长和分化的专业抗原呈递细胞。

[0113] 多肽(例如,抗体)的“变体”包含氨基酸序列,其中一个或多个氨基酸残基相对于天然多肽序列插入、缺失和/或置换到氨基酸序列中,并且基本上保留与天然多肽相同的生物学活性。可以使用本领域的标准技术测量多肽的生物学活性(例如,如果变体是抗体,则其活性可以通过结合测定来检测,如本文所述的)。本公开的变体包括片段、类似物、重组多肽、合成多肽和/或融合蛋白。

[0114] 多肽的“衍生物”是已被化学修饰的多肽(例如,抗体),例如,通过缀合至另一化学部分,比如,例如,聚乙二醇、白蛋白(例如,人血清白蛋白)、磷酸化和糖基化。除非另有说明,否则术语“抗体”除包含两条全长重链和两条全长轻链的抗体外,还包括其衍生物、变

体、片段和突变蛋白，其实例如下所述。

[0115] 如果调控序列影响核苷酸序列的表达(例如,表达的水平、时间或位置),则核苷酸序列与调控序列“可操作地连接”。“调控序列”是影响与其可操作地连接的核酸的表达(例如,表达的水平、时间或位置)的核酸。例如,调控序列可以直接对受调控的核酸发挥作用,或通过一种或多种其他分子(例如,与调控序列和/或核酸结合的多肽)起作用。调控序列的实例包括启动子、增强子和其他表达控制元件(例如,多聚腺苷酸信号)。例如,在Goeddel, 1990, Gene Expression Technology: Methods in Enzymology 185, Academic Press, San Diego, CA和Baron等, 1995, Nucleic Acids Res. 23:3605-06[0078]中描述了调控序列的其他实例。

[0116] “宿主细胞”是可用于表达核酸(例如,本公开的核酸)的细胞。宿主细胞可以是原核细胞,例如,A host cell can be a prokaryote,例如,大肠杆菌,或者其可以是真核细胞,例如,单细胞真核生物(例如,酵母或其他真菌)、植物细胞(例如,烟草或番茄植物细胞)、动物细胞(例如,人细胞、猴细胞、仓鼠细胞、大鼠细胞、小鼠细胞或昆虫细胞)或者杂交瘤。宿主细胞的实例包括CS-9细胞、猴肾细胞COS-7细胞系(ATCC CRL 1651)(参见Gluzman等, 1981, Cell 23:175)、L细胞、C127细胞、3T3细胞(ATCC CCL 163)、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞或其衍生物,如Veggie CHO和在无血清培养基中生长的相关细胞系(参见Rasmussen等, 1998, Cytotechnology 28:31)、HeLa细胞、BHK(ATCC CRL 10)细胞系、来源于非洲绿猴肾细胞系CV1(ATCC CCL 70)的CV1/EBNA细胞系(参见McMahan等, 1991, EMBO J. 10:2821)、人胚肾细胞,如293、293EBNA或MSR 293、人表皮A431细胞、人Colo205细胞、其他转化的灵长类细胞系、正常二倍体细胞、来源于原代组织体外培养物的细胞系、原代外植体、HL-60、U937、HaK或Jurkat细胞。通常,宿主细胞是可以用编码多肽的核酸转化或转染的培养细胞,然后其可以在宿主细胞中表达。

[0117] 短语“重组宿主细胞”可用于表示已用待表达的核酸转化或转染的宿主细胞。宿主细胞也可以是包含核酸但不以所需水平表达其的细胞,除非将调控序列引入宿主细胞中,使其与核酸可操作地连接。应理解的是,术语宿主细胞不仅指特定的受试者细胞,而且指这种细胞的后代或潜在后代。因为某些修饰可能由于例如突变或环境影响而在后续世代中发生,所以此类后代实际上可能与亲代细胞不同,但仍包括在如本文所用术语的范围内。

[0118] 7.2. 其他理解性惯例

[0119] 将此处所述的范围理解为该范围内所有值的简写,包括所列举的端点。例如,将1至50的范围理解为包括来自以下的任何数字、数字组合或子范围:1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49和50。

[0120] 除非另有说明,否则提及具有一个或多个立体中心的化合物是指其每种立体异构体及其立体异构体的所有组合。

[0121] 7.3. 核酸

[0122] 在一个方面中,本公开提供了分离的核酸分子。核酸包括,例如,编码全部或部分抗原结合蛋白的多核苷酸,例如,本公开的抗体的一条或两条链,或其片段、衍生物、突变蛋白或变体,足以用作杂交探针、PCR引物或测序引物以鉴定、分析、突变或扩增编码多肽的多核苷酸的多核苷酸,用于抑制多核苷酸表达的反义核酸,以及上述的互补序列。核酸可以是

任何长度。例如,其长度可以是5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、125、150、175、200、250、300、350、400、450、500、750、1,000、1,500、3,000、5,000个或更多个核苷酸,和/或可以包含一个或多个另外的序列,例如,调控序列,和/或是更大核酸(例如,载体)的一部分。核酸可以是单链的或双链的,且可以包含RNA和/或DNA核苷酸,及其人工变体(例如,肽核酸)。

[0123] 编码抗体多肽(例如,重链或轻链、仅可变结构域或全长)的核酸可从已用CTLA-4免疫的小鼠的B细胞中分离。核酸可通过常规程序如聚合酶链式反应(PCR)分离。

[0124] 本文显示了编码重链可变区和轻链可变区的核酸序列。本领域技术人员将认识到的是,由于遗传密码的简并性,因而本文公开的每个多肽序列由大量其他核酸序列编码。本公开提供了编码本公开的每个抗原结合蛋白的每个简并核苷酸序列。

[0125] 本公开还提供了在特定杂交条件下与其他核酸(例如,包含任何CTLA-4基因的核苷酸序列的核酸)杂交的核酸。用于杂交核酸的方法是本领域熟知的。参见,例如,Curr.Prot.in Mol.Biol.,John Wiley&Sons,N.Y.(1989),6.3.1-6.3.6。如本文所定义的,中等严格杂交条件使用包含5X氯化钠/柠檬酸钠(SSC)的预洗涤溶液、0.5%SDS、1.0mM EDTA(pH 8.0)、约50%甲酰胺的杂交缓冲液、6X SSC和55°C的杂交温度(或其他类似杂交溶液,如包含约50%甲酰胺的溶液,及杂交温度42°C)以及60°C,在0.5X SSC、0.1%SDS中的洗涤条件。严格杂交条件在6X SSC中于45°C下杂交,然后在0.1X SSC、0.2%SDS中于68°C下洗涤一次或多次。此外,本领域技术人员可以操纵杂交和/或洗涤条件以增加或降低杂交的严格性,使得包含彼此至少65、70、75、80、85、90、95、96、97、98或99%相同的核苷酸序列的核酸通常保持彼此杂交。影响杂交条件选择的基本参数和设计合适的条件的指导原则通过,例如,Sambrook,Fritsch和Maniatis(1989,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,第9章和第11章;以及Curr.Prot.in Mol.Biol.1995,Ausubel等编著,John Wiley&Sons,Inc.,第2.10和6.3-6.4节)给出,并且可以由本领域普通技术人员基于例如DNA的长度和/或碱基组成容易地确定。

[0126] 可以通过突变将改变引入核酸中,从而导致其编码的多肽(例如,抗原结合蛋白)的氨基酸序列发生改变。可以使用本领域公知的任何技术引入突变。在一个实施方式中,使用例如位点定向诱变方案改变一个或多个特定氨基酸残基。在另一个实施方式中,使用例如随机诱变方案改变一个或多个随机选择的残基。无论其是如何制备的,都可以表达和筛选突变多肽的所需性质(例如,结合CTLA-4)。

[0127] 可以将突变引入核酸中而不显著改变其编码的多肽的生物学活性。例如,可以进行核苷酸置换,导致在非必需氨基酸残基处的氨基酸置换。在一个实施方式中,本文提供的针对CTLA-4或其所需片段、变体或衍生物的核苷酸序列被突变,以使得其编码包含一个或多个氨基酸残基的缺失或置换的氨基酸序列,其在本文中针对CTLA-4显示为其中两个或更多个序列不同的残基。或者,可以将一个或多个突变引入核酸中,其选择性地改变其编码的多肽的生物学活性(例如,CTLA-4的结合)。例如,突变可以定量或定性地改变生物学活性。定量改变的实例包括增加、减少或消除活性。定性改变的实例包括改变抗原结合蛋白的抗原特异性。

[0128] 在另一个方面中,本公开提供了适合用作用于检测本公开的核酸序列的引物或杂

交探针的核酸分子。本公开的核酸分子可以仅包含编码本公开的全长多肽的核酸序列的一部分,例如,可用作探针或引物的片段或者编码本公开多肽的活性部分(例如,CTLA-4结合部分)的片段。

[0129] 基于本公开的核酸序列的探针可用于检测核酸或类似核酸,例如,编码本公开的多肽的转录物。探针可以包含标记基团,例如,放射性同位素、荧光化合物、酶或酶辅因子。可以将此类探针用于鉴定表达该多肽的细胞。

[0130] 7.4. 表达载体

[0131] 本公开提供了包含编码本公开的多肽或其部分的核酸的载体。载体的实例包括但不限于质粒、病毒载体、非游离基因哺乳动物载体和表达载体,例如,重组表达载体。

[0132] 在本公开的另一个方面中,还提供了包含本公开的核酸分子和多核苷酸的表达载体和使用此类载体转化的宿主细胞,以及还提供了产生多肽的方法。术语“表达载体”指用于从多核苷酸序列表达多肽的质粒、噬菌体、病毒或载体。用于表达多肽的载体包含载体增殖和克隆插入片段表达所需的最少序列。表达载体包含转录单元,其包含以下组件:(1)在基因表达中具有调控作用的一个或多个遗传元件,例如,启动子或增强子,(2)编码多肽和蛋白的序列,可转录成mRNA并翻译成蛋白,和(3)适合的转录起始和终止序列。这些序列可以进一步包含选择性标记物。适合在宿主细胞中表达的载体很容易获得,并且使用标准重组DNA技术将核酸分子插入到载体中。此类载体可以包括在特定组织中起作用的启动子,以及用于在目标人或动物细胞中表达多肽的病毒载体。

[0133] 本公开的重组表达载体可以包含适于在宿主细胞中表达核酸的形式的本公开的核酸。重组表达载体包含一个或多个基于待用于表达的宿主细胞选择的调控序列,其与待表达的核酸序列可操作地连接。调控序列包括在很多类型的宿主细胞中指导核苷酸序列组成型表达的那些序列(例如,SV40早期基因增强子、劳斯肉瘤病毒启动子和巨细胞病毒启动子)、指导核苷酸序列仅在某些宿主细胞中表达的那些序列(例如,组织特异性调控序列,参见Voss等,1986,Trends Biochem. Sci. 11:287,Maniatis等,1987,Science 236:1237,其全部内容通过引用并入本文)以及指导核苷酸序列响应特定治疗或病况的可诱导表达的那些序列(例如,在哺乳动物细胞中的金属硫蛋白启动子以及原核和真核系统中的tet响应性和/或链霉素响应性启动子(参见同上))。本领域技术人员将认识到的是,表达载体的设计可以取决于诸如待转化宿主细胞的选择、所需蛋白的表达水平等因素。可以将本公开的表达载体引入宿主细胞中,从而产生由如本文所述的核酸编码的蛋白质或肽,包括融合蛋白或肽。

[0134] 在一些实施方式中,表达载体是从以ATCC登录号PTA-125512保藏的CTLA-4结合克隆文库的克隆之一纯化的表达载体。在一些实施方式中,表达载体是通过对从以ATCC登录号PTA-125512保藏的CTLA-4结合克隆文库中纯化的克隆之一中的表达载体之一进行遗传修饰而产生的。在一些实施方式中,表达载体是通过使用以ATCC登录号PTA-125512保藏的CTLA-4结合克隆文库的克隆之一的重链和轻链可变区序列产生的。

[0135] 本公开还提供了制备多肽的方法。可以利用多种其他表达/宿主系统。可以通过常规转化或转染技术将载体DNA引入原核或真核系统中。这些系统包括但不限于微生物,如使用重组噬菌体、质粒或粘粒DNA表达载体转化的细菌(例如,大肠杆菌);使用酵母表达载体转化的酵母;使用病毒表达载体(例如,杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;使用病毒表达载体

(例如,花椰菜花叶病毒,CaMV;烟草花叶病毒,TMV)转染的或使用细菌表达载体(例如,Ti或pBR322质粒)转化的植物细胞系统;或者动物细胞系统。在重组蛋白产生中使用的哺乳动物细胞包括但不限于VERO细胞、HeLa细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞系或其衍生物,如Veggie CHO和在无血清培养基中生长的相关细胞系(参见Rasmussen等,1998,Cytotechnology 28:31)或CHO细胞株DX-B11,其在DHFR中存在缺陷(参见Urlaub等,1980,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77:4216-20)、COS细胞,如猴肾细胞COS细胞系(ATCC CRL 1651)(参见Gluzman等,1981,Cell 23:175)、W138、BHK、HepG2、3T3(ATCC CCL 163)、RIN、MDCK、A549、PC12、K562、L细胞、C127细胞、BHK(ATCC CRL 10)细胞系、来源于非洲绿猴肾细胞系CV1(ATCC CCL 70)的CV1/EBNA细胞系(参见McMahan等,1991,EMBO J.10:2821)、人胚肾细胞,如293、293EBNA或MSR 293、人表皮A431细胞、人Colo205细胞、其他转化的灵长类细胞系、正常二倍体细胞、来源于原代组织体外培养物的细胞株、原代外植体、HL-60、U937、HaK或Jurkat细胞。哺乳动物表达允许产生可以从生长培养基中回收的分泌或可溶性多肽。

[0136] 对于哺乳动物细胞的稳定转染,众所周知,根据所使用的表达载体和转染技术,只有一小部分细胞可以将外源DNA整合到其基因组中。为了鉴定和选择这些整合体,通常将编码选择性标记物(例如,针对抗生素抗性)的基因与目标基因一起引入宿主细胞中。例如,一旦用包含选择性标记物以及所需表达盒的载体转化此类细胞,就可以让细胞在富集培养基中生长,然后再将其转换为选择性培养基。将选择性标记物设计为允许成功表达引入序列的细胞生长和回收。可以使用适合于所用细胞系的组织培养技术来增殖稳定转化细胞的抗性团块(clump)。重组蛋白表达的综述参见Methods of Enzymology,v.185,Goeddel,D.V.,ed.,Academic Press(1990)。优选的选择性标记物包括赋予药物抗性的那些,如G418、潮霉素和甲氨蝶呤。用引入的核酸稳定转染的细胞可以通过药物选择(例如,掺入选泽性标记物基因的细胞将存活,而其他细胞死亡)等方法进行鉴定。

[0137] 可以在促进多肽表达的条件下培养转化的细胞,并通过常规蛋白质纯化程序回收多肽(如上文所定义)。一种此类纯化程序包括使用亲和层析,例如,在具有与其结合的CTLA-4的全部或部分(例如,胞外结构域)的基质上。预期用于本文的多肽包括基本上不含污染性内源性材料的基本上均质的重组哺乳动物抗CTLA-4抗体多肽。

[0138] 在一些情况下,如在使用原核系统的表达中,本公开的表达多肽可能需要“重折叠”并氧化成适当的三级结构和生成的二硫键以具有生物学活性。可以使用本领域众所周知的多种程序实现重折叠。此类方法包括例如在离液剂存在下将溶解的多肽暴露于通常高于7的pH。离液剂的选择类似于用于包含体溶解的选择;然而,离液体通常以较低的浓度使用。示例性离液剂是胍和尿素。在大多数情况下,重折叠/氧化溶液还将包含特定比率的还原剂及其氧化形式,以产生特定的氧化还原电位,允许发生二硫化物重排以形成半胱氨酸桥。一些常用的氧化还原对包括半胱氨酸/胱胺、谷胱甘肽/二硫代双GSH、氯化铜、二硫苏糖醇DTT/二噻烷DTT和2-巯基乙醇(bME)/二硫代-bME。在很多情况下,可以使用共溶剂来提高重折叠的效率。常用的助溶剂包括甘油、各种分子量的聚乙二醇和精氨酸。

[0139] 此外,多肽可以根据常规技术在溶液中或在固体支持物上合成。各种自动合成器是可商购的并且可以根据已知方案使用。参见,例如,Stewart和Young,Solid Phase Peptide Synthesis,2d.Ed.,Pierce Chemical Co.(1984);Tam等,J Am Chem Soc,105:6442,(1983);Merrifield,Science 232:341-347(1986);Barany和Merrifield,The

Peptides, Gross and Meienhofer, eds, Academic Press, New York, 1-284; Barany等, Int J Pep Protein Res, 30: 705-739 (1987)。

[0140] 本公开的多肽和蛋白可以根据本领域技术人员公知的蛋白质纯化技术进行纯化。这些技术在一个层面上涉及蛋白和非蛋白级分的粗分馏。将肽多肽与其他蛋白分离后, 可以使用色谱和电泳技术进一步纯化目标肽或多肽以实现部分或完全纯化(或纯化至均质)。如本文所用, 术语“纯化的多肽”旨在指一种组合物, 其与其他组分分离, 其中多肽相对于其天然可获得的状态被纯化至任何程度。因此, 纯化的多肽也指脱离其可能天然存在的环境的多肽。通常, “纯化的”将指经过分级分离以去除各种其他组分的多肽组合物, 并且所述组合物基本上保留了其表达的生物学活性。当使用术语“基本上纯化的”时, 该名称将指肽或多肽组合物, 其中多肽或肽构成组合物的主要组分, 如构成约50%、约60%、约70%、约80%、约85%或约90%或更多在组合物中的蛋白质。

[0141] 适用于纯化的各种技术是本领域技术人员熟知的。这些包括, 例如, 用硫酸铵、PEG、抗体(免疫沉淀)等沉淀, 或通过热变性, 随后通过离心; 层析, 如亲和层析(蛋白A柱)、离子交换、凝胶过滤、反相、羟基磷灰石、疏水性相互作用色谱、等电聚焦、凝胶电泳以及这些技术的组合。如本领域通常知晓的, 相信可以改变进行各种纯化步骤的顺序, 或者可以省略某些步骤, 并且仍然产生用于制备基本上纯化的多肽的合适的方法。在下述实施例中提供了示例性纯化步骤。

[0142] 根据本公开, 本领域技术人员将知晓用于量化多肽纯化程度的各种方法。这些包括, 例如, 确定活性级分的特异性结合活性, 或通过SDS/PAGE分析评估级分内肽或多肽的量。评估多肽级分纯度的优选方法是计算级分的结合活性, 将其与初始提取物的结合活性进行比较, 从而计算纯化程度, 此处通过“-纯化倍数”评估。当然, 用于表示结合活性量的实际单位将取决于为进行纯化而选择的特定测定技术以及多肽或肽是否表现出可检测的结合活性。

[0143] 7.5. 抗体

[0144] CTLA-4抗体可以通过使用肝素HP柱, 使用盐梯度洗脱宿主细胞培养液的过滤上清液从已被编码抗体的基因转染的宿主细胞纯化。

[0145] Fab片段是具有 V_L 、 V_H 、 C_L 和 C_{H1} 结构域的单价片段; $F(ab')_2$ 片段是具有在铰链区通过二硫键桥连接的两个Fab片段的二价片段; Fd片段具有 V_H 和 C_{H1} 结构域; Fv片段具有抗体单一臂的 V_L 和 V_H 结构域; 和dAb片段具有 V_H 结构域、 V_L 结构域或者 V_H 或 V_L 结构域的抗原结合片段(美国专利号6,846,634、6,696,245, 美国申请公开号05/0202512、04/0202995、04/0038291、04/0009507、03/0039958, Ward等, Nature 341:544-546, 1989)。

[0146] 下文中描述了特定轻链和重链可变结构域的多核苷酸和多肽序列。包含轻链和重链的抗体通过组合轻链名称和重链可变结构域名称来命名。例如, “L4H7”表示包含轻链可变结构域L4(包含SEQ ID No:4的序列)和重链可变结构域H7(包含SEQ ID No:107的序列)的抗体。在SEQ ID No:1-28中提供了轻链可变序列和在SEQ ID No:101-128中提供了重链可变序列。

[0147] 在其他实施方式中, 抗体可以包含特定重链或轻链, 而互补的轻链或重链可变结构域保持未指定。特别地, 本文的某些实施方式包括通过特定轻链或重链结合特定抗原(如CTLA-4)的抗体, 使得互补的重链或轻链可能是混杂的, 或者甚至是不相关的, 但是其可以

通过例如筛选组合文库确定。Portolano等,J. Immunol.V.150 (3), pp. 880-887 (1993); Clackson等,Nature v.352pp. 624-628 (1991); Adler等,A natively paired antibody library yields drug leads with higher sensitivity and specificity than a randomly paired antibody library, MAbs(2018)); Adler等,Rare,high-affinity mouse anti-CTLA-4 antibodies that function in checkpoint blockade,discovered using microfluidics and molecular genomics,MAbs(2017)。

[0148] 天然存在的免疫球蛋白链表现出由三个高变区(也称为互补性决定区或CDR)连接的相对保守的框架区(FR)的相同一般结构。从N末端到C末端,轻链和重链两者均包含结构域FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。每个结构域的氨基酸分配符合Kabat等,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.,US Dept.of Health and Human Services,PHS,NIH,NIH出版物编号91-3242,1991的定义。

[0149] 术语“人抗体”,也称为“全人抗体”包括具有一个或多个来源于人免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的所有抗体。在一个实施方式中,全部的可变和恒定结构域来源于人免疫球蛋白序列(全人抗体)。这些抗体可以以多种方式制备,其实例如下所述,包括通过用小鼠的目的抗原免疫接种,所述小鼠经遗传修饰以表达来源于人重链和/或轻链编码基因的抗体。

[0150] 人源化抗体的序列与来源于非人物种的抗体的序列不同,其通过一个或多个氨基酸置换、缺失和/或添加,以使得当将其施用于人受试者时,与非人物种抗体相比,人源化抗体不太可能诱导免疫应答,和/或诱导不严重的免疫应答。在一个实施方式中,在非人物种抗体的重链和/或轻链的框架和恒定结构域中的某些氨基酸被突变以产生人源化抗体。在另一个实施方式中,人抗体的一个或多个恒定结构域与非人物种的一个或多个可变结构域融合。在另一个实施方式中,当非人抗体施用于人受试者时,改变非人抗体的一个或多个CDR序列中的一个或多个氨基酸残基以降低非人抗体可能的免疫原性,其中改变的氨基酸残基对于抗体与其抗原的免疫特异性结合不是关键的,或者对氨基酸序列所做的改变是保守的改变,以使得人源化抗体与抗原的结合不明显比非人抗体与抗原的结合差。如何制备人源化抗体的实例可以参见美国专利号6,054,297、5,886,152和5,877,293。

[0151] 术语“嵌合抗体”指包含来自一种抗体的一个或多个区域和来自一种或多种其他抗体的一个或多个区域的抗体。在一个实施方式中,一个或多个CDR来源于人抗CTLA-4抗体。在另一个实施方式中,所有CDR来源于人抗CTLA-4抗体。在另一个实施方式中,来自一种以上人抗CTLA-4抗体的CDR在嵌合抗体中混合和匹配。例如,嵌合抗体可以包含来自第一人抗CTLA-4抗体轻链的CDR1、来自第二人CTLA-4抗体轻链的CDR2和CDR3及来自第三抗CTLA-4抗体重链的CDR。此外,框架区可以来源于相同抗CTLA-4抗体之一,来源于一种或多种不同抗体(如人抗体)或来源于人源化抗体。在嵌合抗体的一个实例中,重链和/或轻链的一部分与来自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体相同、与其同源或来源于该抗体,而该链的其余部分与来自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体相同、与其同源或来源于该抗体。还包括显示出所需生物学活性(即,特异性结合CTLA-4的能力)的此类抗体的片段。

[0152] 依照本说明书的教导并使用本领域众所周知的技术,本领域普通技术人员可以容易地制备抗体的片段或类似物。优选的片段或类似物的氨基和羧基末端出现在功能性结构域的边界附近。可以通过将核苷酸和/或氨基酸序列数据与公共或专有序列数据库进行比

较来鉴定结构和功能结构域。计算机化的比较方法可用于鉴定存在于其他已知结构和/或功能的蛋白质中的序列基序或预测的蛋白质构象结构域。鉴定折叠成已知三维结构的蛋白质序列的方法是已知的。参见,例如,Bowie等,1991,Science 253:164。

[0153] 来源于抗体的抗原结合片段可以,例如,通过抗体的蛋白质水解,例如,根据常规方法的完整抗体的胃蛋白酶或木瓜蛋白酶消化获得。例如,抗体片段可以通过用胃蛋白酶对抗体进行酶切来产生,以提供称为F(ab')₂的5S片段。还可以使用巯基还原剂进一步切割该片段以产生3.5S Fab' 单价片段。任选地,可以使用由二硫键断裂产生的巯基的保护基团来进行切割反应。作为替代方案,使用木瓜蛋白酶的酶切可直接产生两个单价Fab片段和一个Fc片段。这些方法在例如Goldenberg,美国专利号4,331,647,Nisonoff等,Arch.Biochem.Biophys.89:230,1960;Porter,Biochem.J.73:119,1959;Edelman等,Methods in Enzymology 1:422(Academic Press 1967);和Andrews,S.M.和Titus,J.A.Current Protocols in Immunology(Coligan J.E.,等编著),John Wiley&Sons,New York(2003),第2.8.1 2.8.10和2.10A.1 2.10A.5页中进行了描述。也可以使用其他切割抗体的方法,如分离重链以形成单价轻重链片段(Fd)、进一步切割片段或其他酶促、化学或遗传技术,只要片段与被完整抗体识别的抗原结合即可。

[0154] 抗体片段还可以是任何合成或遗传工程化蛋白。例如,抗体片段包括由轻链可变区组成的分离的片段、由重链和轻链的可变区组成的“Fv”片段、其中轻链和重链可变区通过肽接头连接的重组单链多肽分子(scFv蛋白)。

[0155] 抗体片段的另一种形式是包含抗体的一个或多个互补性决定区(CDR)的肽。CDR(也称为“最小识别单元”或“高变区”)可以共价或非共价掺入分子中,使其成为抗原结合蛋白。CDR可以通过构建编码目标CDR的多核苷酸获得。此类多核苷酸例如通过使用聚合酶链式反应以抗体产生细胞的mRNA作为模板合成可变区制备(参见,例如,Larrick等,Methods:A Companion to Methods in Enzymology 2:106,1991;Courtenay Luck,“Genetic Manipulation of Monoclonal Antibodies,”Monoclonal Antibodies:Production,Engineering and Clinical Application,Ritter等编著,第166页(Cambridge University Press 1995);和Ward等,“Genetic Manipulation and Expression of Antibodies,”Monoclonal Antibodies:Principles and Applications,Birch等编著,第137页(Wiley Liss,Inc.1995))。

[0156] 因此,在一个实施方式中,结合剂包含如本文所述的至少一个CDR。结合剂可以包含如本文所述的至少2、3、4、5或6个CDR。结合剂还可以包含本文所述的抗体的至少一个可变区结构域。可变区结构域可以是任何尺寸或氨基酸组成,并且将通常包含至少一个负责结合人CTLA-4的CDR序列(例如,CDR1-H,CDR2-H,CDR3-H,CDR1-L,CDR2-L和CDR3-L,具体如本文所述的)的CDR序列,并且其与一个或多个框架序列相邻或同框。一般而言,可变(V)区结构域可以是免疫球蛋白重(V_H)和/或轻(V_L)链可变结构域的任何合适的排列。因此,例如,V区结构域可以是单体,并且可以是V_H或V_L结构域,其能够以如下所述的至少等于1x10⁷M或更低的亲和力独立地结合人CTLA-4。或者,V区结构域可以是二聚的,并且包含V_H V_H、V_H V_L或V_L V_L二聚体。V区二聚体包含可以是非共价结合的至少一个V_H和至少一个V_L链(下文中称为FV)。如果需要,链可以直接共价偶联,例如,通过两个可变结构域之间的二硫键,或通过接头,例如肽接头,偶联以形成单链Fv(scFV)。

[0157] 可变区结构域可以是任何天然存在的可变结构域或其工程化形式。工程化形式指使用重组DNA工程技术创建的可变区结构域。此类工程化形式包括例如通过在特定抗体的氨基酸序列中插入、缺失或改变而从特定抗体可变区产生的那些。具体实例包括工程化的可变区结构域，其包含来自第一抗体的至少一个CDR和任选地一个或多个框架氨基酸以及来自第二抗体的可变区结构域的其余部分。

[0158] 可变区结构域可以在C末端氨基酸处共价连接至至少一个其他抗体结构域或其片段。因此，例如，在可变区结构域中存在的V_H结构域可以连接至免疫球蛋白CH1结构域或其片段。类似地，V_L结构域可以连接至CK结构域或其片段。以这种方式，例如，抗体可以是Fab片段，其中抗原结合结构域包含相关的V_H和V_L结构域，在其C末端分别与CH1和CK结构域共价连接。CH1结构域可以用更多氨基酸延伸，例如以提供在Fab'片段中发现的铰链区或铰链区结构域的一部分，或者以提供更多结构域，如抗体CH2和CH3结构域。

[0159] 如本文所述，抗体包含至少一个这些CDR。例如，可以将一个或多个CDR引入已知抗体框架区(IgG1、IgG2等)中，或缀合至合适的载剂以增强其半衰期。合适的载剂包括但不限于Fc、聚乙二醇(PEG)、白蛋白、转铁蛋白等。这些和其他合适的载剂是本领域公知的。此类缀合的CDR肽可以是单体、二聚体、四聚体或其他形式。在一个实施方式中，一种或多种水溶性聚合物键合在粘合剂的一个或多个特定位置，例如氨基末端。

[0160] 在另一个实例中，来自抗体(即，CTLA-4抗体)的单个V_L或V_H链可用于搜寻可以形成具有相同特异性的抗原结合片段(或Fab)的其他V_H或V_L链。因此，V_H和V_L链Ig基因的随机组合可以在噬菌体文库(如fd或λ噬菌体)中表达为抗原结合片段。例如，组合文库可以通过分别利用与抗原结合特异性V_L或V_H链文库组合的亲本V_L或V_H链文库来产生。然后，可以通过常规技术筛选组合文库，例如通过使用放射性标记的探针(如放射性标记的CTLA-4)。参见，例如，Portolano等，J. Immunol. V. 150 (3) pp. 880-887 (1993)。

[0161] 双体是包含两条多肽链的二价抗体，其中每条多肽链包含由接头连接的VH和VL结构域，该接头太短而不能在同一条链上的两个结构域之间配对，从而允许每个结构域与另一条多肽链上的互补结构域配对(参见，例如，Holliger等，1993，Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-48，和Poljak等，1994，Structure 2:1121-23)。如果双体的两条多肽链相同，则由其配对产生的双体将具有两个相同的抗原结合位点。具有不同序列的多肽链可以用于制备具有两个不同抗原结合位点的双体。类似地，三体和四体是分别包含三条和四条多肽链，并分别形成三个和四个抗原结合位点的抗体，其可以是相同的或不同的。

[0162] 在美国专利号6,703,199中还公开了抗体多肽，包括纤连蛋白多肽单体。在美国专利公开号2005/0238646中公开了其他抗体多肽，其是单链多肽。

[0163] 在某些实施方式中，抗体包含一个或多个水溶性聚合物连接物，包括但不限于聚乙二醇、聚氧乙二醇或聚丙二醇。参见，例如，美国专利号4,640,835、4,496,689、4,301,144、4,670,417、4,791,192和4,179,337。在某些实施方式中，衍生的结合剂包括单甲氧基-聚乙二醇、葡聚糖、纤维素或其他碳水化合物基聚合物、聚-(N-乙烯基吡咯烷酮)-聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/环氧乙烷共聚物、聚氧乙烯化多元醇(例如，甘油)和聚乙烯醇的一种或多种，以及此类聚合物的混合物。在某些实施方式中，一种或多种水溶性聚合物随机附接至一条或多条侧链。在某些实施方式中，PEG能够起到提高结合剂(如抗体)的治疗能力的作用。例如，在美国专利号6,133,426中讨论了某些此类方法，出于任何目标将其通

过引用并入本文。

[0164] 7.6. 抗原结合蛋白

[0165] 在一个方面中,本公开提供了结合CTLA-4的抗原结合蛋白(例如,抗体、抗体片段、抗体衍生物、抗体突变蛋白和抗体变体)。

[0166] 抗原结合蛋白可以具有例如天然存在的免疫球蛋白结构。“免疫球蛋白”是四聚化分子。在天然存在的免疫球蛋白中,每个四聚体由两对相同的多肽链组成,每对具有一条“轻”链(约25kDa)和一条“重”链(约50-70kDa)。每条链的氨基末端部分包含主要负责抗原识别的约100至110个或更多个氨基酸的可变区。每条链的羧基末端部分定义了一个主要负责效应功能的恒定区。人轻链分为κ轻链和λ轻链。重链分为μ、δ、γ、α或ε,并将抗体的同种型分别定义为IgM、IgD、IgG、IgA和IgE。在轻链和重链内,可变区和恒定区由约12个或更多氨基酸的“J”区连接,重链还包含约10个或更多个氨基酸的“D”区。通常参见,Fundamental Immunology Ch. 7(Paul, W. 编著, 2nd ed. Raven Press, N.Y. (1989)) (出于所有目的其全部内容通过引用并入)。每个轻/重链对的可变区形成抗体结合位点,以使得完整的免疫球蛋白具有两个结合位点。

[0167] 根据本公开的抗原结合蛋白包括抑制CTLA-4的生物学活性的抗原结合蛋白。

[0168] 不同的抗原结合蛋白可能与CTLA-4的不同结构域结合或通过不同作用机制发挥作用。如本文中特别指出的,除非另有说明,否则结构域区域被指定以包括该组。例如,氨基酸4-12指9个氨基酸:在位置4和12的氨基酸,以及在该序列中的七个中间氨基酸。其他实例包括抑制CTLA-4与其配体结合的抗原结合蛋白。抗原结合蛋白无需完全抑制CTLA-4诱导的活性即可用于本公开;相反,也考虑使用降低CTLA-4特定活性的抗原结合蛋白。(本文对CTLA-4结合抗原结合蛋白在治疗特定疾病中的特定作用机制的讨论仅是说明性的,本文提出的方法不限于此。)

[0169] 在另一个方面中,本公开提供了包含选自以下的轻链可变区的抗原结合蛋白:A1LC-A28LC,或选自以下的重链可变区:A1HC-A28HC,及其片段、衍生物、突变蛋白和变体。此类抗原结合蛋白可以使用命名法“LxHy”表示,其中“x”对应于轻链可变区的数量和“y”对应于重链可变区的数量,如其在以下序列中被标记的。也就是说,例如,“A1HC”表示包含SEQ ID NO:101的氨基酸序列的重链可变区;“A1LC”表示包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的轻链可变区,等等。更一般来说,“L2H1”指具有包含L2的氨基酸序列的轻链可变区(SEQ ID NO:2)和包含H1的氨基酸序列的重链可变区(SEQ ID NO:101)的抗原结合蛋白。为清楚起见,由组的至少两个成员表示的所有范围包括组中的所有成员,包括末端范围成员。因此,组范围A1-A28,包括A1至A28之间的所有成员,以及成员A1和A28本身。组范围A4-A6包括成员A4、A5和A6等。

[0170] 在一些实施方式中,抗原结合蛋白包含与以ATCC登录号PTA-125512保藏的CTLA-4结合克隆文库中的一个克隆相同的重链和轻链序列的可变(V(D)J)区。在一些实施方式中,抗原结合蛋白包含与以ATCC登录号PTA-125512保藏的CTLA-4结合克隆文库中的一个克隆相同的重链或轻链序列的可变(V(D)J)区。在一些实施方式中,抗原结合蛋白从以ATCC登录号PTA-125512保藏的CTLA-4结合克隆文库的一个克隆中的表达载体表达。

[0171] 下面还显示了形成部分抗原结合位点的CDR(下划线)的位置,而框架区(FR)是这些可变域序列的中间区段。在轻链可变区和重链可变区中,有三个CDR(CDR1-3)和四个FR

(FR 1-4)。每条轻链和重链的CDR区也按抗体类型(A1、A2、A3等)分组。本公开的抗原结合蛋白包括,例如,具有选自由以下组成的组合的组的轻链和重链可变结构域的组合的抗原结合蛋白:L1H1(抗体A1)、L2H2(抗体A2)、L3H3(抗体A3)、L4H4(抗体A4)、L5H5(抗体A5)、L6H6(抗体A6)、L7H7(抗体A7)、L8H8(抗体A8)、L9H9(抗体A9)、L10H10(抗体A10)、L11H11(抗体A11)、L12H12(抗体A12)、L13H13(抗体A13)、L14H14(抗体A14)、L15H15(抗体A15)、L16H16(抗体A16)、L17H17(抗体A17)、L18H18(抗体A18)、L19H19(抗体A19)、L20H20(抗体A20)、L21H21(抗体A21)、L22H22(抗体A22)、L23H23(抗体A23)、L24H24(抗体A24)、L25H25(抗体A25)、L26H26(抗体A26)、L27H27(抗体A27)和L28H28(抗体A28)。

[0172] 在一些实施方式中,抗原结合蛋白包含与以ATCC登录号PTA-125512保藏的CTLA-4结合克隆文库中的克隆之一相同的所有六个CDR序列(轻链的三个CDR和重链的三个CDR)。在一些实施方式中,抗原结合蛋白包含与以ATCC登录号PTA-125512保藏的CTLA-4结合克隆文库中的克隆之一相同的六个CDR序列(轻链的三个CDR和重链的三个CDR)中的三个。在一些实施方式中,抗原结合蛋白包含与以ATCC登录号PTA-125512保藏的CTLA-4结合克隆文库中的克隆之一相同的六个CDR序列中的一个、两个、三个、四个或五个。

[0173] 在一个实施方式中,本公开提供了包含轻链可变结构域的抗原结合蛋白,所述轻链可变结构域包含的氨基酸序列与选自L1至L28的轻链可变结构域的序列仅在15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个残基处不同,其中每个此类序列的差异独立地是一个氨基酸残基的缺失、插入或置换。在另一个实施方式中,轻链可变结构域包含与选自由L1-L28组成的组的轻链可变结构域的序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在另一个实施方式中,轻链可变结构域包含由与编码选自由L1-L28(其包括L1、L2、L3、L4、L5、L6、L7、L8、L9、L10、L11、L12、L13、L14、L15、L16、L17、L18、L19、L20、L21、L22、L23、L24、L25、L26、L27和L28)组成的组的轻链可变结构域的核苷酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的核苷酸序列编码的氨基酸序列。在另一个实施方式中,轻链可变结构域包含由多核苷酸编码的氨基酸序列,该多核苷酸在中等严格条件下与编码选自由L1-L28组成的组的轻链可变结构域的多核苷酸的互补序列杂交。在另一个实施方式中,轻链可变结构域包含由多核苷酸编码的氨基酸序列,该多核苷酸在中等严格条件下与编码选自由L1-L28组成的组的轻链可变结构域的多核苷酸的互补序列杂交。在另一个实施方式中,轻链可变结构域包含由多核苷酸编码的氨基酸序列,该多核苷酸在中等严格条件下与由L1-L28组成的轻链多核苷酸的互补序列杂交。

[0174] 在一个实施方式中,本公开提供了包含轻链可变结构域的抗原结合蛋白,所述轻链可变结构域包含仅在15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个残基处不同于由以ATCC登录号PTA-125512保藏的CTLA-4结合克隆文库中的一个克隆编码的轻链可变域序列的氨基酸序列,其中每个此类序列差异独立地是一个氨基酸残基的缺失、插入或置换。在另一个实施方式中,轻链可变结构域包含与由以ATCC登录号PTA-125512保藏的CTLA-4结合克隆文库中的一个克隆编码的轻链可变结构域的序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在另一个实施方式中,轻链可变结构域包含由与保藏在ATCC登录号PTA-125512下的CTLA-4结合克隆文库中的一个克隆的核苷酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的核苷

酸序列编码的氨基酸序列。

[0175] 在另一个实施方式中，本公开提供了包含重链可变结构域的抗原结合蛋白，所述重链可变结构域包含的氨基酸序列与选自H1至H28的重链可变结构域的序列仅在15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个残基处不同，其中每个此类序列的差异独立地是一个氨基酸残基的缺失、插入或置换。在另一个实施方式中，重链可变结构域包含与选自由H1-H28组成的组的重链可变结构域的序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在另一个实施方式中，重链可变结构域包含由与编码选自由H1-H28组成的组的重链可变结构域的核苷酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的核苷酸序列编码的氨基酸序列。在另一个实施方式中，重链可变结构域包含由多核苷酸编码的氨基酸序列，该多核苷酸在中等严格条件下与编码选自由H1-H28组成的组的重链可变结构域的多核苷酸的互补序列杂交。在另一个实施方式中，重链可变结构域包含由多核苷酸编码的氨基酸序列，该多核苷酸在中等严格条件下与编码选自由H1-H28组成的组的重链可变结构域的多核苷酸的互补序列杂交。在另一个实施方式中，重链可变结构域包含由多核苷酸编码的氨基酸序列，该多核苷酸在中等严格条件下与本文公开的重链多核苷酸的互补序列杂交。

[0176] 在一个实施方式中，本公开提供了包含重链可变结构域的抗原结合蛋白，所述重链可变结构域包含仅在15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个残基处不同于由以ATCC登录号PTA-125512保藏的CTLA-4结合克隆文库中的一个克隆编码的重链可变域序列的氨基酸序列，其中每个此类序列差异独立地是一个氨基酸残基的缺失、插入或置换。在另一个实施方式中，重链可变结构域包含与由以ATCC登录号PTA-125512保藏的CTLA-4结合克隆文库中的一个克隆编码的重链可变结构域的序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。在另一个实施方式中，重链可变结构域包含由与由以ATCC登录号PTA-125512保藏的CTLA-4结合克隆文库中的一个克隆的核苷酸序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的核苷酸序列编码的氨基酸序列。

[0177] 本公开的抗原结合蛋白的特定实施方式包含与本文提及的一个或多个CDR和/或FR的氨基酸序列相同的一个或多个氨基酸序列。在一个实施方式中，抗原结合蛋白包含如上所示的轻链CDR1序列。在另一个实施方式中，抗原结合蛋白包含如上所示的轻链CDR2序列。在另一个实施方式中，抗原结合蛋白包含如上所示的轻链CDR3序列。在另一个实施方式中，抗原结合蛋白包含如上所示的重链CDR1序列。在另一个实施方式中，抗原结合蛋白包含如上所示的重链CDR2序列。在另一个实施方式中，抗原结合蛋白包含如上所示的重链CDR3序列。

[0178] 在一个实施方式中，本公开提供了包含一个或多个CDR序列的抗原结合蛋白，所述CDR序列与上述CDR序列的差异不超过5、4、3、2或1个氨基酸残基。

[0179] 在一些实施方式中，至少一个抗原结合蛋白的CDR1序列是来自如表5中所示的A1-A28的CDR1序列，CDR1-L1至28或CDR1-H1至28。在一些实施方式中，至少一个抗原结合蛋白的CDR2序列是来自如表5中所示的A1-A28的CDR2序列，CDR2-L1至28或CDR2-H1至28。在一些实施方式中，至少一个抗原结合蛋白的CDR3序列是来自如表5中所示的A1-A28的CDR3序列，CDR3-L1至28或CDR3-H1至28。

[0180] 在另一个实施方式中,抗原结合蛋白的轻链CDR3序列是来自如表5中所示的A1-A28的CDR3序列或CDR3-L1至28,以及抗原结合蛋白的重链CDR3序列是来自如表5中所示的A1-A28的重链序列或CDR3-H1至28。

[0181] 在另一个实施方式中,抗原结合蛋白包含1、2、3、4或5个CDR序列,其各自独立地与A1-A23的CDR序列相差6、5、4、3、2、1或0个单氨基酸添加、置换和/或缺失,以及抗原结合蛋白还包含1、2、3、4或5个CDR序列,其各自独立地与CDR序列相差6、5、4、3、2、1或0个单氨基酸添加、置换和/或缺失。在一些实施方式中,抗原结合蛋白包含1、2、3、4或5个CDR序列,其每个与A1-A28的CDR序列具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列同一性。

[0182] A1-A28的核苷酸序列或A1-A28的氨基酸序列可以,例如,通过随机诱变或通过定点诱变(例如,寡核苷酸定向位点特异性诱变)改变以产生改变的多核苷酸,与未突变的多核苷酸相比,其包含一个或多个特定核苷酸置换、缺失或插入。用于进行此类改变的技术的实例描述于Walder等,1986, Gene 42:133; Bauer等,1985, Gene 37:73; Craik, BioTechniques, 1985年1月,12-19; Smith等,1981, Genetic Engineering: Principles and Methods, Plenum Press; 和美国专利号4,518,584和4,737,462中。这些和其他方法可以用于制备,例如,具有所需性质的抗CTLA-4抗体的衍生物,例如,与未衍生化的抗体相比增加的对CTLA-4的亲和力、亲合力或特异性,增加的体内或体外活性或稳定性,或降低的体内副作用。

[0183] 本公开范围内的抗CTLA-4抗体的其他衍生物包括抗CTLA-4抗体或其片段与其他蛋白质或多肽的共价或聚集缀合物,如通过表达包含与抗CTLA-4抗体多肽的N-末端或C-末端融合的异源多肽的重组融合蛋白。例如,缀合的肽可以是异源信号(或前导)多肽,例如,酵母 α 因子前导或诸如表位标记的肽。包含抗原结合蛋白的融合蛋白可以包含添加的肽以便于抗原结合蛋白的纯化或鉴定(例如,聚-His)。抗原结合蛋白还可以连接至FLAG肽Asp-Tyr-Asp-Asp-Asp-Lys(DYKDDDDK)(SEQ ID NO:12191),如在Hopp等,Bio/Technology 6:1204,1988和U.S.专利5,011,912中所描述的。FLAG肽具有高度抗原性,并提供与特定单克隆抗体(mAb)可逆结合的表位,从而能够快速检测和轻松纯化表达的重组蛋白。可用于制备其中FLAG肽与给定多肽融合的融合蛋白的试剂是可商购的(Sigma, St.Louis, MO)。

[0184] 在PCT申请WO 93/10151(通过引用在此并入)中描述的一种合适的Fc多肽是从人IgG1抗体Fc区的N-末端铰链区延伸至天然C-末端的单链多肽。另一种有用的Fc多肽是在美国专利5,457,035中和在Baum等,1994,EMBO J.13:3992-4001中描述的Fc突变蛋白。该突变蛋白的氨基酸序列与WO 93/10151中提供的天然Fc序列的氨基酸序列相同,除了氨基酸19已从Leu变为Ala,氨基酸20已从Leu变为Glu,以及氨基酸22已从Gly变为Ala以外。突变蛋白针对Fc受体显示出降低的亲和力。

[0185] 在其他实施方式中,抗CTLA-4抗体的重链和/或轻链的可变部分可以替代抗体重链和/或轻链的可变部分。

[0186] 可以将包含一个或多个抗原结合蛋白的寡聚体作为CTLA-4拮抗剂使用。寡聚体可以是共价连接的或非共价连接的二聚体、三聚体或更高级的寡聚体形式。考虑使用包含两个或更多个抗原结合蛋白的寡聚体,其一个实例是同二聚体。其他寡聚体包括异二聚体、同

三聚体、异三聚体、同四聚体、异四聚体等。

[0187] 一个实施方式涉及包含通过与抗原结合蛋白融合的肽部分之间的共价或非共价相互作用连接的多个抗原结合蛋白的寡聚体。此类肽可以是肽接头(间隔物),或具有促进寡聚化的性质的肽。亮氨酸拉链和某些来源于抗体的多肽属于可促进与其相连的抗原结合蛋白质寡聚化的肽,如下文更详细描述的。

[0188] 在特定实施方式中,寡聚体包含两至四个抗原结合蛋白。寡聚体的抗原结合蛋白可以是任何形式,如上述任何形式,例如,变体或片段。优选地,寡聚体包含具有CTLA-4结合活性的抗原结合蛋白。

[0189] 在一个实施方式中,寡聚体是使用来源于免疫球蛋白的多肽制备的。例如,Ashkenazi等,1991,PNAS USA 88:10535;Byrn等,1990,Nature 344:677;和Hollenbaugh等,1992Curr.Prots in Immunol.,Suppl.4,第10.19.1-10.19.11页已描述了包含融合到抗体衍生多肽的各个部分(包括Fc结构域)的某些异源多肽的融合蛋白的制备。

[0190] 本公开的一个实施方式涉及包含通过将抗CTLA-4抗体的CTLA-4结合片段与抗体的Fc区融合而产生的两个融合蛋白的二聚体。二聚体可以通过例如将编码融合蛋白的基因融合物插入到合适的表达载体中,在用重组表达载体转化的宿主细胞中表达基因融合物,并使表达的融合蛋白更像抗体分子一样组装而制备,从而在Fc部分之间形成链间二硫键以产生二聚体。

[0191] 或者,寡聚体是包含多个抗原结合蛋白的融合蛋白,其具有或不具有肽接头(间隔物肽)。合适的肽接头是美国专利4,751,180和4,935,233中描述的那些。

[0192] 用于制备寡聚化抗原结合蛋白的另一种方法涉及使用亮氨酸拉链。亮氨酸拉链结构域是促进其发现的蛋白质寡聚化的肽。亮氨酸拉链最初在几种DNA结合蛋白中被识别(Landschulz等,1988,Science 240:1759),并且此后在多种不同蛋白质中发现。在已知的亮氨酸拉链中有二聚化或三聚化的天然存在的肽及其衍生物。PCT申请WO 94/10308中描述了适于产生可溶性寡聚蛋白质的亮氨酸拉链结构域的实例,以及Hoppe等,1994,FEBS Letters 344:191中描述了来源于肺表面活性蛋白D(SPD)的亮氨酸拉链,在此通过引用并入。在Fanslow等,1994,Semin.Immunol.6:267-78中描述了允许将与其融合的异源蛋白质三聚化的修饰的亮氨酸拉链的使用。在一种途径中,包含与亮氨酸拉链肽融合的抗CTLA-4抗体片段或衍生物的重组融合蛋白在合适的宿主细胞中表达,并且形成的可溶性寡聚抗CTLA-4抗体片段或衍生物从培养物上清液中回收。

[0193] 在一个方面中,本公开提供了干扰CTLA-4与其配体结合的抗原结合蛋白。此类抗原结合蛋白可以针对CTLA-4或其片段、变体或衍生物产生,并在常规测定中筛选干扰CTLA-4与其配体结合的能力。合适的测定的实例是测试抗原结合蛋白抑制配体与表达CTLA-4的细胞结合的能力的测定,或测试抗原结合蛋白降低因CTLA-4配体与细胞表面CTLA-4结合而导致的生物或细胞反应的能力。例如,抗体可以根据其与固定的抗体表面(CTLA-4)结合的能力来筛选抗体。阻断CTLA-4与配体结合的抗原结合蛋白可用于治疗任何CTLA-4相关病症,包括但不限于癌症。在一个实施方式中,通过涉及免疫转基因小鼠的程序产生的人抗CTLA-4单克隆抗体用于治疗此类病症。

[0194] 可以通过常规技术产生本公开的抗原结合蛋白的抗原结合片段。此类片段的实例包括但不限于Fab和F(ab')₂片段。还涉及通过遗传工程技术产生的抗体片段和衍生物。

[0195] 其他实施方式包括嵌合抗体，例如，非人(例如，小鼠)多克隆抗体的人源化形式。此类人源化抗体可以通过公知技术制备，并且在将抗体施用于人时提供降低免疫原性的优势。在一个实施方式中，人源化单克隆抗体包含小鼠抗体的可变结构域(或其抗原结合位点的全部或部分)和来源于人抗体的恒定结构域。或者，人源化抗体片段可以包含小鼠单克隆抗体的抗原结合位点和来源于人抗体的可变结构域片段(缺乏抗原结合位点)。产生嵌合和进一步工程化的单克隆抗体的程序包括在Riechmann等, 1988, Nature 332:323, Liu等, 1987, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 84:3439, Larrick等, 1989, Bio/Technology 7:934, 和Winter等, 1993, TIPS 14:139中描述的那些。在一个实施方式中，嵌合抗体是CDR移植抗体。在例如美国专利号5,869,619、5,225,539、5,821,337、5,859,205、6,881,557, Padlan等, 1995, FASEB J. 9:133-39, 和Tamura等, 2000, J. Immunol. 164:1432-41. 中讨论了用于人源化抗体的技术。

[0196] 已开发了用于在非人动物中产生人或部分人抗体的程序。例如，制备了其中一种或多种内源性免疫球蛋白基因已通过各种方式灭活的小鼠。已将人免疫球蛋白基因引入小鼠中以替代灭活的小鼠基因。动物体内产生的抗体整合由引入动物中的人类遗传物质编码的人类免疫球蛋白多肽链。在一个实施方式中，使用CTLA-4多肽免疫非人动物(如转基因小鼠)，以使得在动物中产生针对CTLA-4多肽的抗体。

[0197] 合适的免疫原的一个实例是可溶性人CTLA-4, 如包含具有以下序列SEQ ID:7001的蛋白质的胞外域或蛋白的其他免疫原性片段的多肽。在以下描述了产生和使用用于产生人或部分人抗体的转基因动物的技术的实例: 美国专利5,814,318、5,569,825和5,545, 806, Davis等, 2003, Production of human antibodies from transgenic mice in Lo, ed. Antibody Engineering: Methods and Protocols, Humana Press, NJ:191-200, Kellermann等, 2002, Curr Opin Biotechnol. 13:593-97, Russel等, 2000, Infect Immun. 68:1820-26, Gallo等, 2000, Eur J Immun. 30:534-40, Davis等, 1999, Cancer Metastasis Rev. 18:421-25, Green, 1999, J Immunol Methods. 231:11-23, Jakobovits, 1998, Advanced Drug Delivery Reviews 31:33-42, Green等, 1998, J Exp Med. 188:483-95, Jakobovits A, 1998, Exp. Opin. Invest. Drugs. 7:607-14, Tsuda等, 1997, Genomics. 42: 413-21, Mendez等, 1997, Nat Genet. 15:146-56, Jakobovits, 1994, Curr Biol. 4:761-63, Arbones等, 1994, Immunity. 1:247-60, Green等, 1994, Nat Genet. 7:13-21, Jakobovits等, 1993, Nature. 362:255-58, Jakobovits等, 1993, Proc Natl Acad Sci U S A. 90:2551-55, Chen, J., M. Trounstine, F.W. Alt, F. Young, C. Kurahara, J. Loring, D. Huszar. Inter' l Immunol. 5(1993):647-656, Choi等, 1993, Nature Genetics 4:117-23, Fishwild等, 1996, Nature Biotech. 14:845-51, Harding等, 1995, Annals of the New York Academy of Sciences, Lonberg等, 1994, Nature 368:856-59, Lonberg, 1994, Transgenic Approaches to Human Monoclonal Antibodies in Handbook of Experimental Pharmacology 113: 49-101, Lonberg等, 1995, Internal Review of Immunology 13:65-93, Neuberger, 1996, Nature Biotechnology 14:826, Taylor等, 1992, Nucleic Acids Res. 20:6287-95, Taylor等, 1994, Inter' l Immunol. 6:579-91, Tomizuka等, 1997, Nature Genetics 16:133-43, Tomizuka等, 2000, Pro. Nat' l Acad. Sci. USA 97:722-27, Tuaiillon等, 1993, Pro. Nat' l Acad. Sci. USA 90:3720-24, 和Tuaiillon等, 1994, J. Immunol. 152:2912-20。

[0198] 本公开的抗原结合蛋白(例如,抗体、抗体片段和抗体衍生物)可以包含本领域公知的任何恒定区。轻链恒定区可以是例如 κ 或 λ 型轻链恒定区,例如,人 κ 或 λ 型轻链恒定区。重链恒定区可以是例如 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 或 μ 型重链恒定区,例如,人 α 、 δ 、 ϵ 、 γ 或 μ 型重链恒定区。在一个实施方式中,轻链或重链恒定区是天然存在的恒定区的片段、衍生物、变体或突变蛋白。

[0199] 用于从目标抗体衍生不同亚类或同种型抗体的技术是公知的,即亚类转换。因此,IgG抗体可以来源于IgM抗体,例如,反之亦然。此类技术能够制备具有给定抗体(亲本抗体)的抗原结合性质的新抗体,但也表现出与同亲本抗体不同的抗体同种型或亚类相关的生物学性质。编码特定抗体多肽的克隆DNA可用于此类程序,例如,编码所需同种型抗体恒定结构域的DNA。亦然参见Lantto等,2002,Methods Mol.Biol.178:303-16。

[0200] 在一个实施方式中,本公开的抗原结合蛋白包含任何A1-A28(H1-H28)的IgG1重链结构域或任何A1-A28(H1-H28)的IgG1重链结构域的片段。在另一个实施方式中,本公开的抗原结合蛋白包含A1-A28(L1-L28)的 κ 轻链恒定区,或A1-A28(L1-L28)的 κ 轻链恒定区的片段。在另一个实施方式中,本公开的抗原结合蛋白包含A1-A28(L1-L28)的IgG1重链结构域或其片段和A1-A28(L1-L28)的 κ 轻链结构域或其片段两者。

[0201] 因此,本公开的抗原结合蛋白包括包含以下的那些:例如可变结构域组合L1H1、L2H2、L3H3、L4H4、L5H5、L6H6、L7H7、L8H8、L9H9、L10H10、L11H11、L12H12、L13H13、……和L28H28,其具有所需同种型(例如,IgA、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgE和IgD)以及其Fab或F(ab')₂片段。此外,如果IgG4是所需要的,则也可能需要在铰链区中引入点突变(CPSCP(SEQ ID NO:11969)->CPPCP(SEQ ID NO:11970)),如在Bloom等,1997,Protein Science 6:407中所描述的(通过引用并入本文),以减轻形成H链内二硫键的趋势,这可能导致IgG4抗体的异质性。

[0202] 在一个实施方式中,抗原结合蛋白具有 $1 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$ 或更低的 K_{off} 。在另一个实施方式中, K_{off} 是 $5 \times 10^{-5} \text{ s}^{-1}$ 或更低。在另一个实施方式中, K_{off} 与具有选自由以下组成的组合的轻链和重链可变结构域序列组合的抗体基本相同:L1H1、L2H2、L3H3、L4H4、L5H5、L6H6、……和L28H28。在另一个实施方式中,抗原结合蛋白以与包含一个或多个来自具有选自以下的轻链和重链可变结构域序列的组合的抗体的CDR的抗体基本相同的 K_{off} 结合CTLA-4:L1H1、L2H2、L3H3、L4H4、L5H5、L6H6、……和L23H28。在另一个实施方式中,抗原结合蛋白以与包含上述氨基酸序列之一的抗体基本相同的 K_{off} 结合CTLA-4。在另一个实施方式中,抗原结合蛋白以与包含一个或多个来自包含上述氨基酸序列之一的抗体的CDR的抗体基本相同的 K_{off} 结合CTLA-4。

[0203] 在一个方面中,本公开提供了本公开的抗CTLA-4抗体的抗原结合片段。此类片段可以完全由抗体衍生序列组成或可以包含另外的序列。抗原结合片段的实例包括Fab、F(ab')₂、单链抗体、双体抗体、三体抗体、四体抗体和域抗体。在Lunde等,2002,Biochem.Soc.Trans.30:500-06中提供了其他实例。

[0204] 单链抗体(scFv)可以通过经由氨基酸桥(短肽接头,例如,氨基酸残基的合成序列)连接重链和轻链可变结构域(Fv区)片段来形成,从而产生单一多肽链。此类单链Fv(scFv)已通过在编码两种可变结构域多肽(V_L和V_H)的DNA之间融合编码肽接头的DNA来制备。所得多肽能够自身折叠形成抗原结合单体,或者其能够形成多聚体(例如,二聚体、三聚体或四聚体),这取决于两个可变结构域之间的柔性接头的长度(Kortt等,1997,

Prot.Eng.10:423;Kortt等,2001,Biomol.Eng.18:95-108,Bird等,1988,Science 242:423-26和Huston等,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-83)。通过将不同的包含V_L和V_H的多肽组合,可以形成结合不同表位的多聚化scFv(Kriangkum等,2001,Biomol.Eng.18:31-40)。为了产生单链抗体而开发的技术包括在美国专利号4,946,778;Bird,1988,Science 242:423;Huston等,1988,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879;Ward等,1989,Nature 334:544,de Graaf等,2002,Methods Mol Biol.178:379-87中描述的那些。本公开涵盖了包含可变结构域组合L1H1、L2H2、L3H3、L4H4、L5H5、L6H6……和L28H28的scFv。

[0205] 7.7. 单克隆抗体

[0206] 在另一个方面中,本公开提供了结合CTLA-4的单克隆抗体。本公开的单克隆抗体可以使用各种公知技术产生。在通常情况下,可以通过本领域技术人员公知的方法获得结合特定抗原的单克隆抗体(参见,例如,Kohler等,Nature 256:495,1975;Coligan等(编著),Current Protocols in Immunology,1:2.5.12.6.7(John Wiley&Sons 1991);美国专利号RE 32,011、4,902,614、4,543,439和4,411,993;Monoclonal Antibodies,Hybridomas:A New Dimension in Biological Analyses,Plenum Press,Kennett,McKearn和Bechtol(编著)(1980);和Antibodies:A Laboratory Manual,Harlow和Lane(编著),Cold Spring Harbor Laboratory Press(1988);Picksley等,“Production of monoclonal antibodies against proteins expressed in E.coli,”DNA Cloning 2:Expression Systems,第2版,Glover等(编著),第93页(Oxford University Press 1995))。抗体片段可以使用任何合适的标准技术,如蛋白水解消化,或任选地通过蛋白水解消化(例如,使用木瓜蛋白酶或胃蛋白酶),随后二硫键的温和还原和烷基化来从起衍生。或者,此类片段还可以通过如本文所述的重组遗传工程技术产生。

[0207] 根据本领域公知和本文所述的方法,单克隆抗体可以通过使用包含人CTLA-4[序列SEQ ID 7001]或其片段的免疫原注射动物获得,例如,大鼠、仓鼠、兔、或优选地小鼠,包括例如转基因或敲除的,如本领域公知的。可以在初始注射后和/或强化注射后,通过获取血清样品并使用本领域公知的和本文所述的几种免疫检测方法中的任何一种检测与人CTLA-4或肽结合的抗体的存在来监测特异性抗体产生的存在。从产生所需抗体的动物身上,取出淋巴样细胞,最常见的是来自脾细胞或淋巴结的细胞,以获得B淋巴细胞。然后,将B淋巴细胞与药物致敏的骨髓瘤细胞融合伴体融合,优选是与免疫的动物同源并且任选地具有其他所需性质(例如,不能表达内源性Ig基因产物,例如,P3X63-Ag 8.653(ATCC No.CRL 1580);NS0,SP20)的融合伴体,以产生杂交瘤,其是永生化的真核细胞系。

[0208] 淋巴样(例如,脾)细胞和骨髓瘤细胞可以与膜融合促进剂(如聚乙二醇或非离子去垢剂)组合几分钟,然后以低密度接种在支持杂交瘤细胞而非未融合骨髓瘤细胞的生长的选择培养基上。优选的选择培养基是HAT(次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸腺嘧啶)。经过足够的时间,通常约一到两周后,观察到细胞集落。分离单集落,并且可以使用本领域公知的和本文所述的多种免疫测定法中的任一种来测试由细胞产生的抗体对人CTLA-4的结合活性。将杂交瘤克隆(例如,通过有限稀释克隆或通过软琼脂噬菌斑分离),并且选择和培养产生对CTLA-4特异性的抗体的阳性克隆。可以从杂交瘤培养物上清液分离来自杂交瘤培养物的单克隆抗体。

[0209] 用于产生小鼠单克隆抗体的另一种方法是将杂交瘤细胞注射到同基因小鼠的腹

腔中,例如,已进行处理(例如,降植烷激发)的小鼠,以促进包含单克隆抗体的腹水形成。可以通过各种已良好建立的技术分离和纯化单克隆抗体。此类分离技术包括使用蛋白A琼脂糖的亲和层析、体积排阻层析和离子交换层析(参见,例如,Coligan,在第2.7.1-2.7.12页和第2.9.1-2.9.3页;Baines等,“Purification of Immunoglobulin G(IgG),”Methods in Molecular Biology,Vol.10,第79-104页(The Humana Press,Inc.1992))。单克隆抗体可以通过亲和层析使用基于抗体的特定特性(例如,重链或轻链同种型、结合特异性等)选择的适当配体来纯化。固定在固体支持物上的合适的配体的实例包括蛋白A、蛋白G、抗体恒定区(轻链或重链)抗体、抗独特型抗体和TGF β 结合蛋白或者其片段或变体。

[0210] 可以使用本领域公知的任何技术产生单克隆抗体,例如,通过永生化从完成免疫程序后的转基因动物中收获的脾细胞。脾细胞可以通过使用本领域公知的任何技术永生化,例如,通过将其与骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤。鉴定产生结合CTLA-4多肽的抗体的杂交瘤细胞系。本公开包括此类杂交瘤细胞系和由其产生的抗CTLA-4单克隆抗体。用于产生杂交瘤的融合程序的骨髓瘤细胞优选是非产生抗体的、具有高融合效率和酶缺陷,这使得其不能在仅支持所需融合细胞(杂交瘤)生长的某些选择性培养基中生长。用于小鼠融合的合适的细胞系的实例包括Sp-20、P3-X63/Ag8、P3-X63-Ag8.653、NS1/1.Ag41、Sp210-Ag14、F0、NS0/U、MPC-11、MPC11-X45-GTG 1.7和S194/5XX0 Bu1;用于大鼠融合的细胞系的实例包括R210.RCY3、Y3-Ag 1.2.3、IR983F和4B210。可用于细胞融合的其他细胞系是U-266、GM1500-GRG2、LICR-LON-HMy2和UC729-6。可以进一步筛选杂交瘤或mAb以鉴定具有特定性质的mAb,如阻断CTLA-4诱导的活性的能力。

[0211] 本公开的抗体还可以是全人单克隆抗体。提供了一种与CTLA-4特异性结合的分离的全人抗体,其中抗原结合蛋白具有人抗CTLA-4抗体的至少一种体内生物学活性。

[0212] 7.8.产生抗体的方法

[0213] 可以通过本领域普通技术人员熟知的多种技术产生全人单克隆抗体。此类方法包括但不限于人外周血细胞(例如,包含B淋巴细胞)的爱泼斯坦巴尔病毒(EBV)转化、人B细胞的体外免疫、来自携带插入的人免疫球蛋白基因的免疫转基因小鼠的脾细胞的融合、从人免疫球蛋白V区噬菌体文库中分离或如本领域公知的和基于本公开的其他程序。例如,全人单克隆抗体可以从转基因小鼠中获得,这些小鼠经过工程改造以响应于抗原激发产生特异性强人抗体。在以下中描述了用于从转基因小鼠获得全人抗体的方法,例如,Green等,Nature Genet.7:13,1994;Lonberg等,Nature 368:856,1994;Taylor等,Int.Immun.6:579,1994;美国专利号5,877,397;Bruggemann等,1997Curr.Opin.Biotechnol.8:455 58;Jakobovits等,1995Ann.N.Y.Acad.Sci.764:525 35。在这项技术中,将人重链和轻链基因座的元件引入来源于胚胎干细胞系的小鼠品系中,其包含内源性重链和轻链基因座的靶向破坏(亦参见Bruggemann等,Curr.Opin.Biotechnol.8:455 58(1997))。例如,人免疫球蛋白转基因可以是小基因构建体,或酵母人工染色体上的转座点(translocus),其在小鼠淋巴组织中经历B细胞特异性DNA重排和超突变。全人单克隆抗体通过对转基因小鼠进行免疫获得,其进而产生对CTLA-4特异性的抗体。根据本文所述的方法,经免疫的转基因小鼠的淋巴样细胞可用于产生分泌人抗体的杂交瘤。还可以从免疫动物的血液中获得包含全人抗体的多克隆血清。

[0214] 用于产生本公开的人抗体的另一种方法包括通过EBV转化来永生化人外周血细

胞。参见,例如,美国专利号4,464,456。这种产生与CTLA-4特异性结合的单克隆抗体的永生化B细胞系(或类淋巴母细胞系)可以通过如本文提供的免疫检测方法例如ELISA来鉴定,然后通过标准克隆技术分离。根据本领域公知的方法,通过将转化细胞系与小鼠骨髓瘤融合以产生小鼠人杂交细胞系,可以提高产生抗CTLA-4抗体的类淋巴母细胞系的稳定性(参见,例如,Glasky等,Hybridoma 8:377 89(1989))。产生人单克隆抗体的又一种方法是体外免疫,其包括使用人CTLA-4启动人脾脏B细胞。然后将启动的B细胞与异源杂交融合伴体融合。参见,例如,Boerner等,1991J. Immunol. 147:86 95。

[0215] 在某些实施方式中,选择产生人CTLA-4抗体的B细胞,并根据本领域公知(WO 92/02551;美国专利5,627,052;Babcock等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7843 48(1996))和本文所述的分子生物学技术从B细胞中克隆轻链和重链可变区。通过选择产生与CTLA-4特异性结合的抗体的细胞,可以从脾脏、淋巴结或外周血样品中分离来自免疫动物的B细胞。还可以从人(例如,从外周血样品)中分离B细胞。

[0216] 检测产生具有所需特异性的抗体的单一B细胞的方法是本领域公知的,例如,通过噬斑形成、荧光激活细胞分选、体外刺激然后检测特异性抗体等。选择产生特异性抗体的B细胞的方法包括,例如,在包含人CTLA-4的软琼脂中制备B细胞的单细胞悬液。B细胞产生的特异性抗体与抗原的结合导致形成复合物,其可以作为免疫沉淀物可见。

[0217] 在一些实施方式中,通过使用允许鉴定天然配对抗体的方法来选择产生特异性抗体的B细胞。例如,可以使用在Adler等,A natively paired antibody library yields drug leads with higher sensitivity and specificity than a randomly paired antibody library, MAbs (2018) 中描述的方法,其全部内容通过引用并入本文。如来自Adler等中采用的图1中所总结的,该方法组合了微流体技术、分子基因组学、酵母单链可变片段(scFv)展示、荧光激活细胞分选(FACS)和深度测序。简言之,可以从免疫动物中分离B细胞,然后合并。将B细胞用oligo-dT珠和裂解液包封在液滴中,从液滴纯化mRNA结合的珠,然后注射到包含OE-RT-PCR扩增混合物的第二乳液中其生成编码具有天然重链和轻链Ig对的scFv的DNA扩增子。然后将天然配对的扩增子的文库电穿孔到酵母中用于scFv展示。将FACS用于鉴定高亲和力scFv。最后,可以将深度抗体测序用于鉴定分选前和分选后scFv文库中的所有克隆。

[0218] 在选择产生所述抗体的B细胞后,可以根据本领域公知和本文所述的方法通过分离和扩增DNA或mRNA来克隆特异性抗体基因。

[0219] 获得本公开抗体的方法也可以采用本领域公知的各种噬菌体展示技术。参见,例如,Winter等,1994 Annu. Rev. Immunol. 12:433 55;Burton等,1994 Adv. Immunol. 57:191 280。可以在噬菌体载体中建立人或小鼠免疫球蛋白可变区基因组合文库,可以对噬菌体载体进行筛选,以选择与CTLA-4结合蛋白或其变体或片段特异性结合的Ig片段(Fab、Fv、sFv或其多聚体)。参见,例如,美国专利号5,223,409;Huse等,1989 Science 246:1275 81;Sastry等,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:5728 32(1989);Alting Mees等,Strategies in Molecular Biology 3:1 9(1990);Kang等,1991 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4363 66;Hoogenboom等,1992 J. Molec. Biol. 227:381 388;Schlebusch等,1997 Hybridoma 16:47 52以及其中引用的参考文献。例如,包含多个编码Ig可变区片段的多核苷酸序列的文库可以与编码噬菌体衣壳蛋白的序列同框地插入丝状噬菌体如M13或其变体的基因组中。融合蛋

白可以是衣壳蛋白与轻链可变区结构域和/或与重链可变区结构域的融合体。根据某些实施方式,还可以在噬菌体颗粒上展示免疫球蛋白Fab片段(参见,例如,美国专利号5,698,426)。

[0220] 与另一种蛋白(如次要衣壳蛋白)融合的抗体片段也可以用于使用抗原富集噬菌体。然后,使用来自对抗原(例如,CTLA-4)的小鼠免疫的重排重(V_H)和轻(V_L)链的随机组合文库,在噬菌体表面展示多样的抗体片段文库。可以筛选这些文库的互补性可变结构域,并且结构域通过例如亲和柱纯化。参见Clackson等,Nature,V.352pp.624-628(1991)。

[0221] 还可以在 λ 噬菌体重制备重链和轻链免疫球蛋白cDNA表达文库,例如,使用 λ ImmunoZapTM(H)和 λ ImmunoZapTM(L)载体(Stratagene, La Jolla, California)。简言之,从B细胞群重分离mRNA,并用于在 λ ImmunoZap(H)和 λ ImmunoZap(L)载体重形成重链和轻链免疫球蛋白cDNA表达文库。可以单独筛选这些载体或共表达以形成Fab片段或抗体(参见Huse等,同上;亦参见Sastry等,同上)。随后可以将阳性噬菌斑转化为非裂解质粒,该质粒允许来自大肠杆菌的单克隆抗体片段的高水平表达。

[0222] 在一个实施方式中,在杂交瘤中,使用核昔酸引物扩增表达目标单克隆抗体基因的可变区。这些引物可以由本领域普通技术人员合成,或者可以从市售来源购买。(参见,例如,Stratagene (La Jolla, California),该公司销售小鼠和人可变区引物,其中包括 $V_{H\alpha}$ 、 $V_{H\beta}$ 、 $V_{H\gamma}$ 、 $V_{H\delta}$ 、 C_{H1} 、 V_L 和 C_L 区的引物。)这些引物可以用于扩增重链或轻链可变区,然后可以将其分别插入载体,如ImmunoZAPTMH或ImmunoZAPTML(Stratagene)。然后可以将这些载体引入大肠杆菌、酵母或基于哺乳动物的表达系统中。可以使用这些方法产生大量包含 V_H 和 V_L 结构域的融合蛋白的单链蛋白(参见Bird等,Science 242:423-426,1988)。

[0223] 一旦使用任何上述免疫和其他技术获得产生根据本公开的抗体的细胞,可以根据本文所述的标准程序通过从中分离和扩增DNA或mRNA来克隆特异性抗体基因。可以对由此产生的抗体进行测序并且鉴定CDR并且可以如先前描述的那样操作编码CDR的DNA以产生根据本公开的其他抗体。

[0224] 本公开的CTLA-4结合剂优选地在本文所述的基于细胞的测定中和/或在本文所述的体内测定中调节CTLA-4功能和/或结合一个或多个本文所述的结构域和/或交叉阻断在本申请中所述的抗体之一的结合和/或被在本申请中所述的抗体之一交叉阻断与CTLA-4的结合。因此,可以使用本文所述的测定鉴定此类结合剂。

[0225] 在某些实施方式中,通过首先鉴定结合一个或多个本文提供的结构域和/或在本文所述的基于细胞的测定和/或在体内测定中中和和/或交叉阻断在本申请中所述的抗体和/或被在本申请中所述的抗体之一交叉阻断与CTLA-4的结合产生的抗体。然后来自这些抗体的CDR区用于插入适当的生物相容性框架中以产生CTLA-4结合剂。结合剂的非CDR部分可以由氨基酸组成,或者可以是非蛋白分子。本文中所述的测定允许鉴定结合剂。优选地,本公开的结合剂是如本文所定义的抗体。

[0226] 根据本公开的其他抗体可以通过如本文所述和本领域公知的常规免疫和细胞融合程序获得。

[0227] 抗体结合位点中心的互补性决定区(CDR)的分子进化也已用于分离亲和力增加的抗体,例如,对c-erbB-2具有增加的亲和力的抗体,如在Schier等,1996,J.Mol.Biol.263:551中所描述的。因此,此类技术可用于制备针对CTLA-4的抗体。例如,在体外或在体内检测

CTLA-4多肽存在情况的测定中,可以使用针对CTLA-4的抗原结合蛋白。抗原结合蛋白还可用于通过免疫亲和色谱纯化CTLA-4蛋白。

[0228] 尽管人抗体、部分人抗体或人源化抗体适用于很多应用,特别是涉及将抗体施用于人受试者的那些应用,但其他类型的抗原结合蛋白也适用于某些应用。本公开的非人抗体例如可来源于任何产生抗体的动物,如小鼠、大鼠、兔、山羊、驴或非人灵长类(如,猴(例如,食蟹猴或恒河猴)或猿(例如,黑猩猩))。来自特定物种的抗体可以通过以下方式制备:例如,用所需免疫原(例如,CTLA-4多肽)免疫该物种的动物或使用用于产生该物种的抗体的人工系统(例如,用于产生特定物种的抗体的基于细菌或噬菌体展示的系统),或通过例如用来自其他物种的恒定区替换抗体的恒定区,或通过替换抗体的一个或多个氨基酸残基将来自一个物种的抗体转化为来自另一物种的抗体,以使得其更密切类似于来自其他物种的抗体序列。在一个实施方式中,抗体是嵌合抗体,其包含来源于来自两个或更多个不同物种的抗体的氨基酸序列。

[0229] 可以通过多种常规技术中的任何一种来制备抗原结合蛋白,并筛选所需特性。某些技术涉及分离编码目标抗原结合蛋白(例如,抗CTLA-4抗体)多肽链(或其部分)的核酸,并通过重组DNA技术操纵该核酸。例如,核酸可以与另一目标核酸融合,或进行改变(例如,通过诱变或其他常规技术)以添加、缺失或置换一个或多个氨基酸残基。此外,可以使用本领域公知的任何技术从天然表达抗原结合蛋白的细胞中纯化(例如,抗体可以从产生其的杂交瘤中纯化)或在重组表达系统中产生抗原结合蛋白。参见,例如,Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses, Kennet等(编著), Plenum Press, New York (1980); 和Antibodies: A Laboratory Manual, Harlow和Land(编著), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988)。

[0230] 可以将本领域公知的任何表达系统用于制备本公开的重组多肽。表达载体已在上文中全面详述。在通常情况下,使用包含编码所需多肽的DNA的重组表达载体转化宿主细胞。可以使用的宿主细胞包括原核细胞、酵母或高等真核细胞。原核生物包括革兰氏阴性或革兰氏阳性生物,例如大肠杆菌或杆菌。高等真核细胞包括昆虫细胞和哺乳动物来源的已建立细胞系。合适的哺乳动物宿主细胞系的实例包括猴肾细胞的COS-7细胞系(ATCC CRL 1651) (Gluzman等, 1981, Cell 23:175)、L细胞、293细胞、C127细胞、3T3细胞(ATCC CCL 163) 中国仓鼠卵巢(CHO) 细胞、HeLa细胞、BHK (ATCC CRL 10) 细胞系和来源于非洲绿猴肾细胞系CVI的CVI/EBNA细胞系(ATCC CCL 70), 如McMahan等, 1991, EMBO J. 10:2821所描述的。Pouwels等(Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, New York, 1985) 描述了用于细菌、真菌、酵母和哺乳动物细胞宿主的合适的克隆和表达载体。

[0231] 将认识到的是,本公开的抗体可以具有至少一个氨基酸置换,条件是该抗体保留结合特异性。因此,对抗体结构的修饰包括在本公开的范围内。这些可以包括氨基酸置换,其可以是保守的或非保守的(其不会破坏抗体的CTLA-4结合能力)。保守氨基酸置换可包括非天然存在的氨基酸残基,其通常通过化学肽合成而非通过生物系统中的合成来掺入。这些包括肽模拟物和其他反向或倒置形式的氨基酸部分。保守氨基酸置换还可以涉及用标准残基取代天然氨基酸残基的置换,使得对该位置氨基酸残基的极性或电荷几乎没有影响或没有影响。

[0232] 非保守性置换可能涉及将一类氨基酸或氨基酸模拟物的成员交换为具有不同物

理性质(例如,尺寸、极性、疏水性、电荷)的另一类成员。可以将此类置换的残基引入人抗体与非人抗体同源的区域中,或引入分子的非同源区域中。

[0233] 此外,本领域技术人员可以产生在每个所需氨基酸残基处包含单个氨基酸置换的测试变体。然后,可以使用本领域技术人员公知的活性测定筛选变体。此类变体可用于收集有关合适的变体的信息。例如,如果发现对特定氨基酸残基的改变导致活性破坏、活性不需要的降低或不合适的活性,则可以避免具有这种改变的变体。换言之,基于从此类常规实验收集的信息,本领域技术人员能够容易地确定应避免的单独或与其他突变组合的进一步置换的氨基酸。

[0234] 本领域技术人员将能够使用众所周知的技术来确定本文所述多肽的合适的变体。在某些实施方式中,本领域技术人员可以通过靶向被认为对活性不重要的区域来鉴定可以在不破坏活性的情况下改变的分子的合适区域。在某些实施方式中,能够识别在相似多肽中保守的分子残基和部分。在某些实施方式中,甚至对生物学活性或结构可能重要的区域也可以进行保守的氨基酸置换而不破坏生物学活性或对多肽结构没有不利影响。

[0235] 此外,本领域技术人员可以回顾结构-功能研究,以鉴定相似多肽中对活性或结构很重要的残基。鉴于这种比较,人们可以预测蛋白中氨基酸残基的重要性,该氨基酸残基对应于对相似蛋白中的活性或结构很重要的氨基酸残基。本领域技术人员可以选择化学上相似的氨基酸置换来替代这种预测的重要氨基酸残基。

[0236] 本领域技术人员还可以分析类似多肽中与该结构相关的三维结构和氨基酸序列。鉴于这些信息,本领域技术人员可以针对其三维结构预测抗体的氨基酸残基的比对。在某些实施方式中,本领域技术人员可以选择不对预测在蛋白表面上的氨基酸残基进行彻底改变,因为这些残基可能涉及与其他分子的重要相互作用。

[0237] 许多科学出版物都致力于预测二级结构。参见Moult J., Curr.Op.in Biotech., 7 (4):422-427(1996), Chou等,Biochem., 13(2):222-245(1974); Chou等,Biochem., 113(2): 211-222(1974); Chou等,Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol., 47:45-148(1978); Chou等,Ann. Rev. Biochem., 47:251-276和Chou等,Biophys. J., 26:367-384(1979)。此外,目前可以使用计算机程序来帮助预测二级结构。预测二级结构的一种方法是基于同源性建模。例如,序列同一性大于30%,或相似性大于40%的两种多肽或蛋白质往往具有相似的结构拓扑。蛋白结构数据库(PDB)最近的发展增强了二级结构的可预测性,包括多肽或蛋白质结构内的潜在折叠数。参见Holm等,Nucl. Acid. Res., 27(1):244-247(1999)。有人建议(Brenner等,Curr. Op. Struct. Biol., 7(3):369-376(1997))给定的多肽或蛋白的折叠数量有限,一旦确定了关键数量的结构,结构预测将变得更加准确。

[0238] 预测二级结构的其他方法包括“穿线”(Jones, D., Curr. Opin. Struct. Biol., 7 (3):377-87(1997); Sippl等,Structure, 4(1):15-19(1996))、“性质分析”(Bowie等, Science, 253:164-170(1991); Gribskov等,Meth. Enzym., 183:146-159(1990); Gribskov等, Proc. Nat. Acad. Sci., 84(13):4355-4358(1987)), 和“进化连接”(参见Holm, 同上(1999), 和Brenner, 同上(1997))。

[0239] 在某些实施方式中,抗体的变体包括糖基化变体,其中糖基化位点的数量和/或类型与亲本多肽的氨基酸序列相比已经改变。在某些实施方式中,变体包含与天然蛋白相比更多或更少数量的N连接糖基化位点。N连接糖基化位点可以通过以下序列表征:Asn-X-Ser

或Asn-X-Thr,其中指定为X的氨基酸残基可以是除脯氨酸以外的任何氨基酸残基。氨基酸残基的置换以产生该序列为添加N-连接的碳水化合物链提供了潜在的新位点。或者,消除该序列的置换将除去现有N连接的碳水化合物链。还提供了一种N-连接的碳水化合物链的重排,其中一个或多个N-连接的糖基化位点(通常是天然存在的)被消除并产生一个或多个新的N-连接的位点。其他优选的抗体变体包括半胱氨酸变体,其中与亲本氨基酸序列相比,一个或多个半胱氨酸残基从另一氨基酸(例如,丝氨酸)中缺失或置换。当抗体必须重新折叠成生物学活性构象时,例如在分离不溶性包涵体之后,半胱氨酸变体可能很有用。半胱氨酸变体通常具有比天然蛋白质更少的半胱氨酸残基,并且通常具有偶数以最小化由未配对的半胱氨酸导致的相互作用。

[0240] 所需的氨基酸置换(无论是保守的还是非保守的)可由本领域技术人员在需要此类置换时确定。在某些实施方式中,氨基酸置换可用于鉴定针对CTLA-4的抗体的重要残基,或用于增加或降低本文所述的针对CTLA-4的抗体的亲和力。

[0241] 根据某些实施方式,优选的氨基酸置换是以下那些:(1)降低对蛋白水解的敏感性,(2)降低对氧化的敏感性,(3)改变蛋白复合物的结合亲和力,(4)改变结合亲和力,和/或(4)赋予或改变此类多肽的其他生理化学或功能性质。根据某些实施方式,单个或多个氨基酸置换(在某些实施方式中,保守性氨基酸置换)可以是在天然存在的序列中(在某些实施方式中,在形成分子间接触的一个或多个结构域外的多肽部分中)。在某些实施方式中,保守性氨基酸置换通常不会显著改变亲本序列的结构特征(例如,替换氨基酸不应倾向于破坏亲本序列中出现的螺旋,或破坏表征亲本序列的其他类型的二级结构)。在蛋白、结构和分子原理(Creighton,Ed.,W.H.Freeman and Company,New York(1984));蛋白结构介绍(C.Branden和J.Tooze编著,Garland Publishing,New York,N.Y.(1991));和Thornton等,Nature 354:105(1991)中描述了本领域公认的多肽的二级和三级结构的实例,其每一个通过引用并入本文。

[0242] 在某些实施方式中,本公开的抗体可以与多具体、脂质或其他部分化学键合。

[0243] 结合剂可以包含并入生物相容性框架结构中的至少一种本文所述的CDR。在一个实例中,生物相容性框架结构包含足以形成构象稳定的结构支持物或框架或支架的多肽或其部分,其能够在局部表面区域展示一种或多种与抗原结合的氨基酸序列(例如,CDR、可变区等)。这样的结构可以是天然存在的多肽或多肽“折叠”(结构基序),或者相对于天然存在的多肽或折叠可以具有一个或多个修饰,如氨基酸的添加、缺失或置换。这些支架可以源自任何物种(或多个物种)的多肽,如人、其他哺乳动物、其他脊椎动物、无脊椎动物、植物、细菌或病毒。

[0244] 通常,生物相容性框架结构基于除免疫球蛋白结构域之外的蛋白支架或骨架。例如,可以使用基于纤连蛋白、锚蛋白、脂质运载蛋白、新制癌素、细胞色素b、CP1锌指、PST1、卷曲螺旋、LACI-D1、Z结构域和tendamist结构域的那些(参见例如,Nygren和Uhlen,1997,Curr.Opin.in Struct.Biol.,7,463-469)。

[0245] 可以使用本领域公知的技术产生人源化抗体,如本文所述的那些(Zhang,W.,等,Molecular Immunology.42(12):1445-1451,2005;Hwang W.等,Methods.36(1):35-42,2005;Dall'Acqua WF,等,Methods 36(1):43-60,2005;和Clark,M.,Immunology Today.21(8):397-402,2000)。

[0246] 此外,本领域技术人员将认识到合适的结合剂包括这些抗体的部分,如具有SEQ ID NO 1001-1028的CDR1-L1至28;具有SEQ ID NO 2001-2028的CDR2-L1至28;具有SEQ ID NO 3001-3028的CDR3-L1至28;具有SEQ ID NO 4001-4028的CDR1-H1至28;具有SEQ ID NO 5001-5028的CDR2-H1至28;和具有SEQ ID NO 6001-6028的CDR3-H1至28的一个或多个,如本文所具体公开的。CDR区的至少一个区域可以具有与本文提供的序列的至少一个氨基酸置换,条件是抗体保留未置换的CDR的结合特异性。抗体的非CDR部分可以是非蛋白质分子,其中结合剂交叉阻断本文公开的抗体与CTLA-4的结合和/或中和CTLA-4。抗体的非CDR部分可以是非蛋白质分子,其中抗体在竞争结合测定中表现出与抗体A1-A28中的至少一种相似的与人CTLA-4肽的结合模式,和/或中和CTLA-4。抗体的非CDR部分可由氨基酸组成,其中抗体是重组结合蛋白或合成肽,并且重组结合蛋白交叉阻断本文公开的抗体与CTLA-4的结合和/或中和CTLA-4。抗体的非CDR部分可由氨基酸组成,其中抗体是重组结合蛋白或合成肽,并且重组结合蛋白交叉阻断本文公开的抗体与CTLA-4结合和/或中和CTLA-4。抗体的非CDR部分可由氨基酸组成,其中抗体是重组抗体,并且该重组抗体在人CTLA-4肽表位竞争结合测定中表现出与人CTLA-4肽相似的结合模式(下文中描述的),如抗体A1-A28中的至少一种所表现的,和/或中和CTLA-4。

[0247] 当抗体包含如上所述的CDR1-H、CDR2-H、CDR3-H、CDR1-L、CDR2-L和CDR3-L中的一种或多种时,其可以通过从包含编码这些序列的DNA的宿主细胞中表达而获得。可以根据CDR的氨基酸序列确定编码每个CDR序列的DNA,并酌情使用寡核苷酸合成技术、定点诱变和聚合酶链反应(PCR)技术与任何所需的抗体可变区框架和恒定区DNA序列一起合成。本领域技术人员可从基因序列数据库如**GenBank®**中广泛获得编码可变区框架和恒定区的DNA。

[0248] 一旦合成,编码本公开的抗体或其片段的DNA可以根据用于核酸切除、连接、转化和转染的多种熟知程序中的任一种使用任何数量的已知表达载体增殖和表达。因此,在某些实施方式中,抗体片段的表达可以优选地在原核宿主中,如大肠杆菌(参见,例如,Pluckthun等,1989Methods Enzymol.178:497-515)。在某些其他实施方式中,抗体或其片段的表达可以优选地在真核宿主细胞中,包括酵母(例如,酿酒酵母、粟酒裂殖酵母和毕赤酵母)、动物细胞(包括哺乳动物细胞)或植物细胞。合适的动物细胞的实例包括但不限于骨髓瘤(如小鼠NS0细胞系)、COS、CHO或杂交瘤细胞。植物细胞的实例包括烟草、玉米、大豆和水稻细胞。

[0249] 可以制备一种或多种包含编码抗体可变区和/或恒定区的DNA可复制表达载体,并将其用于转化合适的细胞系,例如,非产生性骨髓瘤细胞系,如小鼠NS0细胞系或细菌,如大肠杆菌,其中将进行抗体产生。为了获得有效的转录和翻译,在每个载体中的DNA序列应包含合适的调控序列,特别是与可变结构域序列可操作地连接的启动子和前导序列。以这种方式产生抗体的具体方法通常是众所周知的并且是常规使用的。例如,在Maniatis等,(Molecular Cloning,A Laboratory Manual,2nd ed.,Cold Spring Harbor Laboratory,New York,1989;亦参见Maniatis等,3rd ed.,Cold Spring Harbor Laboratory,New York,(2001))中描述了基本分子生物学操作。可以根据Sanger等,(PNAS 74:5463,(1977))和Amersham International plc测序手册中所描述的进行DNA测序,并且根据本领域公知的方法进行定点诱变(Kramer等,Nucleic Acids Res.12:9441,(1984);Kunkel Proc.Natl.Acad.Sci.USA 82:488-92(1985);Kunkel等,Methods in Enzymol.154:367-82

(1987); Anglian Biotechnology Ltd. 手册)。此外,很多出版物描述了适用于通过操作DNA、创建表达载体以及转化和培养适当细胞来制备抗体的技术(Mountain A和Adair, J R, Biotechnology and Genetic Engineering Reviews (Tombs, M P编著, 10, 第1章, 1992, Intercept, Andover, UK); “Current Protocols in Molecular Biology”, 1999, F.M.Ausubel(ed.), Wiley Interscience, New York)。

[0250] 当需要提高根据本公开的抗体的亲和力时,包含一个或多个上述CDR的抗体可以通过多种亲和力成熟方案获得,包括保持CDR(Yang等,J.Mol.Biol., 254, 392-403, 1995)、链改组(Marks等,Bio/Technology, 10, 779-783, 1992)、使用大肠杆菌突变菌株(Low等,J.Mol.Biol., 250, 350-368, 1996)、DNA改组(Patten等,Curr.Opin.Biotechnol., 8, 724-733, 1997)、噬菌体展示(Thompson等,J.Mol.Biol., 256, 7-88, 1996)和有性PCR(Crameri等,Nature, 391, 288-291, 1998)。在Vaughan等,(Nature Biotech., 16, 535-539, 1998)中讨论了亲和力成熟的所有这些方法。

[0251] 本领域技术人员将理解,一些蛋白(如抗体)可以经历多种翻译后修饰。这些修饰的类型和程度通常取决于用于表达蛋白的宿主细胞系以及培养条件。此类修饰可包括在糖基化、甲硫氨酸氧化、二酮哌嗪形成、天冬氨酸异构化和天冬酰胺脱酰胺中的变化。一种常见的修饰是由于羧肽酶的作用失去了羧基末端的碱性残基(如赖氨酸或精氨酸)(如在Harris, R.J. Journal of Chromatography 705:129-134, 1995中所描述的)。

[0252] 7.9. 序列

[0253] 抗体A1-A28包含重链和轻链V(J)D多核苷酸(在本文中分别称为L1-L28和H1-H28)。抗体A1-A28包含在表5中列出的序列。例如,抗体A1包含轻链L1(SEQ ID NO:1)和重链H1(SEQ ID NO:101)。在轻链(L1-L28)和重链(H1-H28)重的CDR序列也以特定SEQ ID NO提供。例如,针对L1的三个CDR序列(CDR1、CDR2和CDR3)分别是CDR1-L1(SEQ ID NO:1001)、CDR2-L1(SEQ ID NO:2001)和CDR3-L1(SEQ ID NO:3001)和针对H1的三个CDR序列(CDR1、CDR2和CDR3)是CDR1-H1(SEQ ID NO:4001)、CDR2-H1(SEQ ID NO:5001)和CDR3-H1(SEQ ID NO:6001)。

表 5

抗体	轻链	重链
A1	L1 (SEQ ID NO:1) L1 包含 CDR1-L1 (SEQ ID NO:1001), CDR2-L1 (SEQ ID NO:2001)和 CDR3-L1 (SEQ ID NO:3001)	H1 (SEQ ID NO: 101) H1 包含 CDR1-H1 (SEQ ID NO: 4001), CDR2-H1 (SEQ ID NO: 5001)和 CDR3-H1 (SEQ ID NO: 6001)
A2	L2 (SEQ ID NO:2) L2 包含 CDR1-L2 (SEQ ID NO:1002), CDR2-L2 (SEQ ID NO:2002)和 CDR3-L2 (SEQ ID NO:3002)	H2 (SEQ ID NO: 102) H2 包含 CDR1-H2 (SEQ ID NO: 4002), CDR2-H2 (SEQ ID NO: 5002)和 CDR3-H2 (SEQ ID NO: 6002)
A3	L3 (SEQ ID NO:3) L3 包含 CDR1-L3 (SEQ ID NO:1003), CDR2-L3 (SEQ ID NO:2003)和 CDR3-L3 (SEQ ID NO:3003)	H3 (SEQ ID NO: 103) H3 包含 CDR1-H3 (SEQ ID NO:4003), CDR2-H3 (SEQ ID NO:5003)和 CDR3-H3 (SEQ ID NO:6003)
A4	L4 (SEQ ID NO:4) L4 包含 CDR1-L4 (SEQ ID NO:1004), CDR2-L4 (SEQ ID NO:2004)和 CDR3-L4 (SEQ ID NO:3004)	H4 (SEQ ID NO:104) H4 包含 CDR1-H4 (SEQ ID NO:4004), CDR2-H4 (SEQ ID NO:5004)和 CDR3-H4 (SEQ ID NO:6004)
A5	L5 (SEQ ID NO:5) L5 包含 CDR1-L5 (SEQ ID NO:1005), CDR2-L5 (SEQ ID NO:2005)和 CDR3-L5 (SEQ ID NO:3005)	H5 (SEQ ID NO:105) H5 包含 CDR1-H5 (SEQ ID NO:4005), CDR2-H5 (SEQ ID NO:5005)和 CDR3-H5 (SEQ ID NO:6005)
A6	L6 (SEQ ID NO:6) L6 包含 CDR1-L6 (SEQ ID NO:1006), CDR2-L6 (SEQ ID NO:2006)和 CDR3-L6 (SEQ ID NO:3006)	H6 (SEQ ID NO:106) H6 包含 CDR1-H6 (SEQ ID NO:4006), CDR2-H6 (SEQ ID NO:5006)和 CDR3-H6 (SEQ ID NO:6006)
A7	L7 (SEQ ID NO:7) L7 包含 CDR1-L7 (SEQ ID NO:1007), CDR2-L7 (SEQ ID NO:2007)和 CDR3-L7 (SEQ ID NO:3007)	H7 (SEQ ID NO:107) H7 包含 CDR1-H7 (SEQ ID NO:4007), CDR2-H7 (SEQ ID NO:5007)和 CDR3-H7 (SEQ ID NO:6007)
A8	L8 (SEQ ID NO:8) L8 包含 CDR1-L8 (SEQ ID NO:1008), CDR2-L8 (SEQ ID NO:2008)和 CDR3-L8 (SEQ ID NO:3008)	H8 (SEQ ID NO:108) H8 包含 CDR1-H8 (SEQ ID NO:4008), CDR2-H8 (SEQ ID NO:5008)和 CDR3-H8 (SEQ ID NO:6008)
A9	L9 (SEQ ID NO:9) L9 包含 CDR1-L9 (SEQ ID NO:1009), CDR2-L9 (SEQ ID NO:2009)和 CDR3-L9 (SEQ ID NO:3009)	H9 (SEQ ID NO:109) H9 包含 CDR1-H9 (SEQ ID NO:4009), CDR2-H9 (SEQ ID NO:5009)和 CDR3-H9 (SEQ ID NO:6009)
A10	L10 (SEQ ID NO:10) L10 包含 CDR1-L10 (SEQ ID NO:1010),	H10 (SEQ ID NO:110) H10 包含 CDR1-H10 (SEQ ID NO:4010),

[0254]

[0255]

	CDR2-L10 (SEQ ID NO:2010)和 CDR3-L10 (SEQ ID NO:3010)	CDR2-H10 (SEQ ID NO:5010)和 CDR3-H10 (SEQ ID NO:6010)
A11	L11 (SEQ ID NO:11) L11 包含 CDR1-L11 (SEQ ID NO:1011), CDR2-L11 (SEQ ID NO:2011)和 CDR3-L11 (SEQ ID NO:3011)	H11 (SEQ ID NO:111) H11 包含 CDR1-H11 (SEQ ID NO:4011), CDR2-H11 (SEQ ID NO:5011)和 CDR3-H11 (SEQ ID NO:6011)
A12	L12 (SEQ ID NO:12) L12 包含 CDR1-L12 (SEQ ID NO:1012), CDR2-L12 (SEQ ID NO:2012)和 CDR3-L12 (SEQ ID NO:3012)	H12 (SEQ ID NO:112) H12 包含 CDR1-H12 (SEQ ID NO:4012), CDR2-H12 (SEQ ID NO:5012)和 CDR3-H12 (SEQ ID NO:6012)
A13	L13 (SEQ ID NO:13) L13 包含 CDR1-L13 (SEQ ID NO:1013), CDR2-L13 (SEQ ID NO:2013)和 CDR3-L13 (SEQ ID NO:3013)	H13 (SEQ ID NO:113) H13 包含 CDR1-H13 (SEQ ID NO:4013), CDR2-H13 (SEQ ID NO:5013)和 CDR3-H13 (SEQ ID NO:6013)
A14	L14 (SEQ ID NO:14) L14 包含 CDR1-L14 (SEQ ID NO:1014), CDR2-L14 (SEQ ID NO:2014)和 CDR3-L14 (SEQ ID NO:3014)	H14 (SEQ ID NO:114) H14 包含 CDR1-H14 (SEQ ID NO:4014), CDR2-H14 (SEQ ID NO:5014)和 CDR3-H14 (SEQ ID NO:6014)
A15	L15 (SEQ ID NO:15) L15 包含 CDR1-L15 (SEQ ID NO:1015), CDR2-L15 (SEQ ID NO:2015)和 CDR3-L15 (SEQ ID NO:3015)	H15 (SEQ ID NO:115) H15 包含 CDR1-H15 (SEQ ID NO:4015), CDR2-H15 (SEQ ID NO:5015)和 CDR3-H15 (SEQ ID NO:6015)
A16	L16 (SEQ ID NO:16) L16 包含 CDR1-L16 (SEQ ID NO:1016), CDR2-L16 (SEQ ID NO:2016)和 CDR3-L16 (SEQ ID NO:3016)	H16 (SEQ ID NO:116) H16 包含 CDR1-H16 (SEQ ID NO:4016), CDR2-H16 (SEQ ID NO:5016)和 CDR3-H16 (SEQ ID NO:6016)
A17	L17 (SEQ ID NO:17) L17 包含 CDR1-L17 (SEQ ID NO:1017), CDR2-L17 (SEQ ID NO:2017)和 CDR3-L17 (SEQ ID NO:3017)	H17 (SEQ ID NO:117) H17 包含 CDR1-H17 (SEQ ID NO:4017), CDR2-H17 (SEQ ID NO:5017)和 CDR3-H17 (SEQ ID NO:6017)
A18	L18 (SEQ ID NO:18) L18 包含 CDR1-L18 (SEQ ID NO:1018), CDR2-L18 (SEQ ID NO:2018)和 CDR3-L18 (SEQ ID NO:3018)	H18 (SEQ ID NO:118) H18 包含 CDR1-H18 (SEQ ID NO:4018), CDR2-H18 (SEQ ID NO:5018)和 CDR3-H18 (SEQ ID NO:6018)
A19	L19 (SEQ ID NO:19) L19 包含 CDR1-L19 (SEQ ID NO:1019), CDR2-L19 (SEQ ID NO:2019)和 CDR3-L19 (SEQ ID NO:3019)	H19 (SEQ ID NO:119) H19 包含 CDR1-H19 (SEQ ID NO:4019), CDR2-H19 (SEQ ID NO:5019)和 CDR3-H19 (SEQ ID NO:6019)
A20	L20 (SEQ ID NO:20) L20 包含 CDR1-L20 (SEQ ID NO:1020), CDR2-L20 (SEQ ID NO:2020)和 CDR3-L20 (SEQ ID NO:3020)	H20 (SEQ ID NO:120) H20 包含 CDR1-H20 (SEQ ID NO:4020), CDR2-H20 (SEQ ID NO:5020)和 CDR3-H20 (SEQ ID NO:6020)
A21	L21 (SEQ ID NO:21) L21 包含 CDR1-L21 (SEQ ID NO:1021), CDR2-L21 (SEQ ID NO:2021)和 CDR3-L21 (SEQ ID NO:3021)	H21 (SEQ ID NO:121) H21 包含 CDR1-H21 (SEQ ID NO:4021), CDR2-H21 (SEQ ID NO:5021)和 CDR3-H21 (SEQ ID NO:6021)
A22	L22 (SEQ ID NO:22) L22 包含 CDR1-L22 (SEQ ID NO:1022), CDR2-L22 (SEQ ID NO:2022)和 CDR3-L22 (SEQ ID NO:3022)	H22 (SEQ ID NO:122) H22 包含 CDR1-H22 (SEQ ID NO:4022), CDR2-H22 (SEQ ID NO:5022)和 CDR3-H22 (SEQ ID NO:6022)
A23	L23 (SEQ ID NO:23) L23 包含 CDR1-L23 (SEQ ID NO:1023), CDR2-L23 (SEQ ID NO:2023)和 CDR3-L23 (SEQ ID NO:3023)	H23 (SEQ ID NO:123) H23 包含 CDR1-H23 (SEQ ID NO:4023), CDR2-H23 (SEQ ID NO:5023)和 CDR3-H23 (SEQ ID NO:6023)
A24	L24 (SEQ ID NO:24) L24 包含 CDR1-L24 (SEQ ID NO:1024),	H24 (SEQ ID NO:124) H24 包含 CDR1-H24 (SEQ ID NO:4024),

	CDR2-L24 (SEQ ID NO:2024)和 CDR3-L24 (SEQ ID NO:3024)	CDR2-H24 (SEQ ID NO:5024)和 CDR3-H24 (SEQ ID NO:6024)
[0256]	A25 L25 (SEQ ID NO:25) L25 包含 CDR1-L25 (SEQ ID NO:1025), CDR2-L25 (SEQ ID NO:2025)和 CDR3-L25 (SEQ ID NO:3025)	H25 (SEQ ID NO:125) H25 包含 CDR1-H25 (SEQ ID NO:4025), CDR2-H25 (SEQ ID NO:5025)和 CDR3-H25 (SEQ ID NO:6025)
	A26 L26 (SEQ ID NO:26) L26 包含 CDR1-L26 (SEQ ID NO:1026), CDR2-L26 (SEQ ID NO:2026)和 CDR3-L26 (SEQ ID NO:3026)	H26 (SEQ ID NO:126) H26 包含 CDR1-H26 (SEQ ID NO:4026), CDR2-H26 (SEQ ID NO:5026)和 CDR3-H26 (SEQ ID NO:6026)
	A27 L27 (SEQ ID NO:27) L27 包含 CDR1-L27 (SEQ ID NO:1027), CDR2-L27 (SEQ ID NO:2027)和 CDR3-L27 (SEQ ID NO:3027)	H27 (SEQ ID NO:127) H27 包含 CDR1-H27 (SEQ ID NO:4027), CDR2-H27 (SEQ ID NO:5027)和 CDR3-H27 (SEQ ID NO:6027)
	A28 L28 (SEQ ID NO:28) L28 包含 CDR1-L28 (SEQ ID NO:1028), CDR2-L28 (SEQ ID NO:2028)和 CDR3-L28 (SEQ ID NO:3028)	H28 (SEQ ID NO:128) H28 包含 CDR1-H28 (SEQ ID NO:4028), CDR2-H28 (SEQ ID NO:5028)和 CDR3-H28 (SEQ ID NO:6028)

[0257] 7.10. 药物组合物

[0258] 还提供了包含本公开的蛋白质和多肽的药物组合物。此类组合物包含与药学上可接受的材料和生理学上可接受的制剂材料混合的治疗或预防有效量的多肽或蛋白。

[0259] 所述药物组合物可包含用于改变、维持或保存例如组合物的pH、渗透压、粘度、澄清度、颜色、等渗性、气味、无菌性、稳定性、溶解或释放速率、吸收或渗透的制剂材料。

[0260] 合适的制剂材料包括但不限于氨基酸(如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、精氨酸或赖氨酸)；抗菌剂；抗氧化剂(如抗坏血酸、亚硫酸钠或亚硫酸氢钠)；缓冲剂(如硼酸盐、碳酸氢盐、Tris-HCl、柠檬酸盐、磷酸盐、其他有机酸)；蓬松剂(如甘露醇或甘氨酸)、螯合剂(如乙二胺四乙酸(EDTA))；络合剂(如咖啡因、聚乙烯吡咯烷酮或羟丙基-β-环糊精)；填充剂；单糖；二糖和其他碳水化合物(如葡萄糖、甘露糖或糊精)；蛋白(如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白)；染色剂；调味剂和稀释剂；乳化剂；亲水性聚合物(如聚乙烯吡咯烷酮)；低分子量多肽；成盐反离子(如钠)；防腐剂(如苯扎氯铵、苯甲酸、水杨酸、硫柳汞、苯乙醇、对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、氯己定、山梨酸或过氧化氢)；溶剂(如甘油、丙二醇或聚乙二醇)；糖醇(如甘露醇或山梨糖醇)；悬浮剂；表面活性剂或润湿剂(如普朗尼克、PEG、脱水山梨醇酯、聚山梨醇酯，如聚山梨酯20、聚山梨酯80、triton、氨丁三醇、卵磷脂、胆固醇、泰洛沙帕)；稳定性增强剂(蔗糖或山梨糖醇)；张力增强剂(如碱金属卤化物(优选氯化钠或氯化钾、甘露醇、山梨糖醇)；递送载体；稀释剂；赋形剂和/或药物佐剂。中性缓冲盐水或与同种血清白蛋白混合的盐水是合适稀释剂的实例。根据适当的行业标准，还可以添加防腐剂，例如苯甲醇。可以使用合适的赋形剂溶液(如蔗糖)作为稀释剂将组合物配制成冻干物。在所采用的剂量和浓度下，合适的组分对受体是无毒的。药物制剂中可以使用的组分的其他实例可以参见Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th Ed. (1980) 和20th Ed. (2000) , Mack Publishing Company, Easton, PA。

[0261] 任选地，所述组合物另外包含一种或多种生理学活性剂，例如，抗血管生成物质、化学治疗物质(如卡培他滨、5-氟尿嘧啶或多柔比星)、镇痛物质等，其中的非穷尽性实例在此提供。在各种特定实施方式中，除了CTLA-4结合蛋白以外，组合物包含1、2、3、4、5或6种生理学活性剂。

[0262] 在本公开的另一个实施方式中，可以将本文公开的组合物以中性或盐形式制剂加

成盐。示例性的药学上可接受的盐包括酸加成盐(与蛋白的游离氨基形成),并且其与无机酸,例如,盐酸或磷酸,或诸如乙酸、草酸、酒石酸、扁桃酸等的有机酸形成。与游离羧基形成的盐也可以衍生自无机碱,例如氢氧化钠、氢氧化钾、氢氧化铵、氢氧化钙或氢氧化铁,以及有机碱,例如异丙胺、三甲胺、组氨酸、普鲁卡因等。在配制时,溶液将以与制剂相容的方式并且以治疗有效量施用。

[0263] 载体还可包括任何和所有溶剂、分散介质、载体、包衣、稀释剂、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂、缓冲剂、载体溶液、悬浮液、胶体等。此类介质和药剂用于药物活性物质的用途是本领域公知的。除非任何常规介质或药剂与活性成分不相容,否则考虑其在治疗组合物中的用途。还可以将补充活性成分加入组合物中。短语“药学上可接受的”是指当施用于人时不产生过敏或类似不良反应的分子实体和组合物。

[0264] 最佳药物组合物将由本领域技术人员根据例如预期的给药途径、递送形式和所需剂量来确定。参见例如,Remington's Pharmaceutical Sciences,同上。此类组合物可影响多肽的物理状态、稳定性、体内释放速率和体内清除速率。例如,合适的组合物可以是注射用水、胃肠外施用的生理盐水溶液。

[0265] 7.10.1. 药物活性成分的含量

[0266] 在典型的实施方式中,活性成分(即,本公开的蛋白质和多肽)以至少0.01mg/ml、至少0.1mg/ml、至少0.5mg/ml或至少1mg/ml的浓度存在于药物组合物中。在某些实施方式中,活性成分以至少1mg/ml、2mg/ml、3mg/ml、4mg/ml、5mg/ml、10mg/ml、15mg/ml、20mg/ml或25mg/ml的浓度存在于药物组合物中。在某些实施方式中,活性成分以至少30mg/ml、35mg/ml、40mg/ml、45mg/ml或50mg/ml的浓度存在于药物组合物中。

[0267] 在一些实施方式中,除了本公开的蛋白质或多肽以外,药物组合物包含一种或多种另外的活性成分。一种或多种另外的活性成分可以是靶向不同检查点受体的药物,如CTLA-4抑制剂(例如,抗CTLA-4抗体)或TIGIT抑制剂(例如,抗TIGIT抗体)。

[0268] 7.10.2. 一般制剂

[0269] 所述药物组合物可以是任何适用于人或兽药的形式,包括液体、油、乳剂、凝胶、胶体、气雾剂或固体。

[0270] 可以配制药物组合物以通过适合于人或兽药的任何施用途径施用,包括肠内和胃肠外施用途径。

[0271] 在各种实施方式中,所述药物组合物配制成用于吸入施用。在这些实施方式的某些中,所述药物组合物配制成用于通过蒸发器施用。在这些实施方式的某些中,所述药物组合物配制成用于通过雾化器施用。在这些实施方式的某些中,所述药物组合物配制成用于通过气雾器施用。

[0272] 在各种实施方式中,所述药物组合物配制成用于口服施用、用于口腔施用或用于舌下施用。

[0273] 在一些实施方式中,所述药物组合物配制成用于静脉内、肌内或皮下施用。

[0274] 在一些实施方式中,所述药物组合物配制成用于鞘内或脑室内施用。

[0275] 在一些实施方式中,所述药物组合物配制成用于局部施用。

[0276] 7.10.3. 适于注射的药物组合物

[0277] 对于静脉内、皮肤或皮下注射,或在患病部位注射,活性成分将是无热原的,并具

有合适的pH、等渗性和稳定性的肠胃外可接受的水溶液形式。本领域相关技术人员能够很好地使用例如等渗载体如氯化钠注射液、林格注射液、乳酸林格注射液制备合适的溶液。根据需要,可以包含防腐剂、稳定剂、缓冲剂、抗氧化剂和/或其他添加剂。

[0278] 在各种实施方式中,所述单位剂型是小瓶、安瓿、瓶或预充式注射器。在一些实施方式中,所述单位剂型包含0.01mg、0.1mg、0.5mg、1mg、2.5mg、5mg、10mg、12.5mg、25mg、50mg、75mg或100mg药物组合物。在一些实施方式中,所述单位剂型包含125mg、150mg、175mg或200mg药物组合物。在一些实施方式中,所述单位剂型包含250mg药物组合物。

[0279] 在典型实施方式中,在单位剂型中的药物组合物是在液体形式中。在各种实施方式中,所述单位剂型包含0.1mL至50mL之间的药物组合物。在一些实施方式中,所述单位剂型包含1mL、2.5mL、5mL、7.5mL、10mL、25mL或50mL药物组合物。

[0280] 在特定实施方式中,所述单位剂型是小瓶,其包含浓度为0.01mg/mL、0.1mg/mL、0.5mg/mL或1mg/mL的1mL药物组合物。在一些实施方式中,所述单位剂型是小瓶,其包含浓度为0.01mg/mL、0.1mg/mL、0.5mg/mL或1mg/mL的2mL药物组合物。

[0281] 在一些实施方式中,在单位剂型中的药物组合物是固体形式,如适合溶解的冻干物。

[0282] 适用于皮下、皮内或肌肉内给药的单位剂型实施方式包括预装注射器、自动注射器和自动注射笔,各自包含预定量的上文所述的药物组合物。

[0283] 在各种实施方式中,所述单位剂型是预加载注射器,其包含注射器和预定量的药物组合物。在某些预加载注射器的实施方式中,注射器适于皮下施用。在某些实施方式中,注射器适于自我施用。在特定实施方式中,预加载注射器是一次性注射器。

[0284] 在各种实施方式中,预加载注射器包含约0.1mL至约0.5mL药物组合物。在某些实施方式中,注射器包含约0.5mL药物组合物。在特定实施方式中,注射器包含约1.0mL药物组合物。在特定实施方式中,注射器包含约2.0mL药物组合物。

[0285] 在某些实施方式中,所述单位剂型是自动注射笔。自动注射笔包含如本文所述的药物组合物的自动注射笔。在一些实施方式中,自动注射笔递送预定体积的药物组合物。在其他实施方式中,自动注射笔被配置为递送由用户设定的一定体积的药物组合物。

[0286] 在各种实施方式中,自动注射笔包含约0.1mL至约5.0mL药物组合物。在特定实施方式中,自动注射笔包含约0.5mL药物组合物。在特定实施方式中,自动注射笔包含约1.0mL药物组合物。在其他实施方式中,自动注射笔包含约5.0mL药物组合物。

[0287] 7.11. 单位剂型

[0288] 药物组合物可以方便地以单位剂型存在。

[0289] 单位剂型通常适于药物组合物的一种或多种特定施用途径。

[0290] 在各种实施方式中,所述单位剂型适于通过吸入施用。在这些实施方式的某些中,所述单位剂型适于通过蒸发器施用。在这些实施方式的某些中,所述单位剂型适于通过雾化器施用。在这些实施方式的某些中,所述单位剂型适于通过气雾器施用。

[0291] 在各种实施方式中,所述单位剂型适于通过口服施用、通过口腔施用或通过舌下施用。

[0292] 在一些实施方式中,所述单位剂型适于通过静脉内、肌内或皮下施用。

[0293] 在一些实施方式中,所述单位剂型适于通过鞘内或脑室内施用。

- [0294] 在一些实施方式中,所述药物组合物配制成用于局部施用。
- [0295] 可与载体材料组合以产生单一剂型的活性成分的量通常是产生治疗效果的化合物的量。
- [0296] 7.12. 使用方法
- [0297] 可以使用与完整CTLA-4特异性结合的治疗性抗体。
- [0298] 可以任选地采用体内和/或体外测定来帮助确定最佳剂量范围。制剂中使用的精确剂量还取决于给药途径和病情的严重程度,应根据从业者的判断和每个受试者的情况来决定。有效剂量可以从体外或动物模型试验系统的剂量反应曲线中推断出来。
- [0299] 如果寡肽或多肽的氨基酸序列与本文提供的至少一个CDR;和/或与交叉阻断抗体A1-A28的至少一种与CTLA-4结合的CTLA-4结合剂的CDR,和/或被抗体A1-A28的至少一种交叉阻断与CTLA-4的结合的CDR;和/或与CTLA-4结合剂的CDR(其中所述结合剂可为阻断CTLA-4与其配体的结合)具有至少75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性,则该寡肽或多肽在本公开的范围内。
- [0300] 如果CTLA-4结合剂多肽和抗体具有与抗体A1-A28的至少一种的可变区具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列,并且交叉阻断抗体A1-A28的至少一种结合CTLA-4,和/或被抗体A1-A28的至少一种交叉阻断与CTLA-4的结合;和/或可阻断CTLA-4对其配体的抑制作用,则CTLA-4结合剂多肽和抗体在本公开的范围内。
- [0301] 根据本公开的抗体针对人CTLA-4可以具有小于或等于 5×10^{-7} M、小于或等于 1×10^{-7} M、小于或等于 0.5×10^{-7} M、小于或等于 1×10^{-8} M、小于或等于 1×10^{-10} M、小于或等于 1×10^{-11} M或小于或等于 1×10^{-12} M的结合亲和力。
- [0302] 抗体或结合伴侣体的亲和力,以及抗体抑制结合的程度,可由本领域普通技术人员使用常规技术确定,例如,Scatchard等,(Ann.N.Y.Acad.Sci.51:660 672 (1949))描述的那些,或通过表面等离子体共振(SPR; BIACore, Biosensor, Piscataway, NJ)。对于表面等离子体共振,将靶分子固定在固相上,并与流动池中流动相中的配体接触。如果配体与固定靶标发生结合,局部折射率会发生变化,从而导致SPR角度发生变化,这可以通过检测反射光强度的变化来实时监测。可以分析SPR信号的变化率以产生结合反应的结合和解离阶段的表观速率常数。这些值的比率给出了表观平衡常数(亲和力)(参见,例如,Wolff等,Cancer Res. 53:2560 65 (1993))。
- [0303] 根据本公开的抗体可以属于任何免疫球蛋白类别,例如IgG、IgE、IgM、IgD或IgA。其可以从动物获得或来源于动物,例如,家禽(例如,鸡)和哺乳动物,包括但不限于小鼠、大鼠、仓鼠、兔或其他啮齿动物、牛、马、绵羊、山羊、骆驼、人类或其他灵长类动物。抗体可以是内化抗体。在美国专利公开号2004/0146888 A1中一般地公开了抗体的产生。
- [0304] 在上文所述根据本公开的产生抗体的方法中,包括将特定A1-A28 CDR操纵到新的框架和/或恒定区中,选择所需抗体的适当测定是可用的(即,用于确定与CTLA-4的结合亲和力的测定;交叉阻断测定;基于Biacore的竞争结合测定;体内测定)。
- [0305] 7.12.1. 治疗对CTLA-4抑制剂产生应答的疾病的方法
- [0306] 在另一个方面中,提出了用于治疗患有对CTLA-4抑制剂或激活剂有反应的疾病的

受试者的方法。所述疾病可以是癌症、AIDS、阿尔茨海默氏病或者病毒或细菌感染。

[0307] 术语“治疗”、“治疗”等在本文中用于一般意指获得期望的药理学和/或生理学效果。就完全或部分预防疾病、病况或其症状而言，效果可以是预防性的，和/或就部分或完全治愈疾病或病况和/或副作用(如归因于疾病或病况的症状)而言，可以是治疗性的。如本文所用，“治疗”涵盖对哺乳动物，特别是人疾病或病况的任何治疗，并且包括：(a) 在可能易患该疾病或病况但尚未被诊断为患有该疾病或病况的受试者中预防该疾病或病况的发生；(b) 抑制疾病或病况(例如，阻止其进展)；或者(c) 缓解疾病或病况(例如，使疾病或病况消退，改善一种或多种症状)。根据本领域已知的标准方法和技术，可以容易地评估任何条件的改善。通过疾病的方法治疗的受试者群体包括患有不希望的病症或疾病的受试者，以及处于发展成病况或疾病的风险中的受试者。

[0308] 术语“治疗有效剂量”或“有效量”是指产生所施用的所需效果的剂量或量。确切的剂量或量将取决于治疗的目的，并且本领域技术人员可以使用已知技术确定(参见，例如，Lloyd (1999) *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding*)。

[0309] 术语“足够的量”指足以产生所需作用的量。

[0310] 术语“治疗有效量”是有效改善疾病症状的量。治疗有效量可以是“预防有效量”，因为预防可以被认为是治疗。

[0311] 术语“改善”指在治疗疾病状态(例如，神经变性疾病状态)重的任何治疗上有益的结果，包括预防、减轻其严重性或进展、缓解或治愈。

[0312] 实际给药量、给药速率和时程将取决于所治疗的蛋白质聚集疾病的性质和严重程度。治疗处方(例如，决定剂量等)由全科医生和其他医生负责，并且通常会考虑待治疗的病症、个体患者的状况、递送部位、施用方法和从业者已知的其他因素。上文提及的技术和方案的实例可以参见Remington's *Pharmaceutical Sciences*, 第16版, Osol, A. (ed), 1980。

[0313] 在一些实施方式中，所述药物组合物通过吸入施用、口服、通过口腔施用、通过舌下施用、通过注射或通过局部应用。

[0314] 在一些实施方式中，所述药物组合物以足以调节神经元存活或多巴胺释放的量施用。在一些实施方式中，以每剂低于1g、低于500mg、低于100mg、低于10mg的量施用主要大麻素。

[0315] 在一些实施方式中，所述药物组合物每天施用一次、每天2-4次、每周2-4次、每周一次或每两周一次。

[0316] 组合物可以单独施用或与其他治疗组合施用，根据待治疗的病况同时或顺序地施用。例如，药物组合物可以与一种或多种靶向不同检查点受体的药物联合施用，如CTLA-4抑制剂(例如，抗CTLA-4抗体)或TIGIT抑制剂(例如，抗TIGIT抗体)。

[0317] 8. 实施例

[0318] 以下是用于实施本公开的具体实施方式的实施例。提供这些实施例仅用于说明目的，并不旨在以任何方式限制本公开的范围。已努力确保所用数字(例如，量、温度等)的准确性，但当然应允许一些实验误差和偏差。

[0319] 除非另有说明，否则本公开的实践将采用本领域技术范围内的蛋白质化学、生物化学、重组DNA技术和药理学的常规方法。在文献中充分解释了这些技术。参见，例如，T.E.Creighton, *Proteins: Structures and Molecular Properties* (W.H.Freeman and

Company, 1993); A.L. Lehninger, Biochemistry (Worth Publishers, Inc., 当前版本); Sambrook, 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版, 1989); Methods In Enzymology (S. Colowick和N. Kaplan编著, Academic Press, Inc.); Remington's Pharmaceutical Sciences, 第18版 (Easton, Pennsylvania: Mack Publishing Company, 1990); Carey和Sundberg Advanced Organic Chemistry, 第3版 (Plenum Press), A和B卷 (1992)。此外, 可以使用在Adler等, A natively paired antibody library yields drug leads with higher sensitivity and specificity than a randomly paired antibody library, MAbs (2018), 和Adler等, Rare, high-affinity mouse anti-CTLA-4 antibodies that function in checkpoint blockade, discovered using microfluidics and molecular genomics, MAbs (2017) 中解释的产生和选择抗体的方法, 其全部内容通过引用并入本文。

[0320] 8.1.1. 实施例1: 抗原结合蛋白的产生

[0321] 小鼠免疫和样品制备:

[0322] 首先, 使用TiterMax作为佐剂, 用SEQ ID NO:7001的可溶性CTLA-4免疫原(即, 带有His标记的CTLA-4蛋白 (R&D Systems))对携带插入的人免疫球蛋白基因的转基因小鼠进行免疫。将1 μ g免疫原注射至每只爪中, 将3 μ g免疫原腹膜内施用, 每3天一次持续15天。从1:200稀释开始, 在每只动物血清的1:2系列稀释液上, 通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 评估效价。在收获前每只动物给予2.5 μ g/爪(无佐剂)进行最终的静脉内强化。处死后, 手术取出淋巴结(腘窝、腹股沟、腋窝和肠系膜)。通过手动破坏然后通过70 μ m过滤器制备每只动物的单细胞悬液。接下来, 将EasySepTM小鼠泛B细胞分离试剂盒 (Stemcell Technologies) 负性选择试剂盒用于从每个样品分离B细胞。通过在C-Chip血细胞计数仪 (Incyto) 上计数来定量淋巴结B细胞群, 并使用台盼蓝评估存活活力。然后, 在含12% OptiPrepTM密度梯度介质 (Sigma) 的磷酸盐缓冲液 (PBS) 中将细胞稀释至5,000-6,000个细胞/mL。将该细胞混合物用于微流体包封。通过乳液液滴微流体平台运行来自六只动物中每一只的大约一百万的B细胞。

[0323] 产生配对重链和轻链文库:

[0324] 使用乳液液滴微流体平台或涡流乳液产生具有天然重链Ig配对完整的编码单细胞RNA的scFV的DNA文库。将用于产生DNA文库的方法分为1) poly (A) +mRNA捕获, 2) 多路复用重叠延伸逆转录酶聚合酶链反应 (OE-RT-PCR), 和3) 巢式PCR, 以除去人工物并添加用于深度测序或酵母展示文库的衔接子。scFV文库由来自达到阳性ELISA滴度的每只动物的大约一百万B细胞产生。

[0325] 对于poly (A) +mRNA捕获, 使用由玻璃 (Dolomite) 制造的定制设计的融合乳液液滴微流体芯片。微流体芯片具有两个用于氟碳油 (Dolomite) 的输入通道, 一个上述细胞悬液混合物的输入通道, 和一个输入通道, 用于1.25mg/ml的oligo-DT珠 (NEB) 的细胞裂解缓冲液 (20mM Tris pH 7.5, 0.5M NaCl, 1mM乙二胺四乙酸 (EDTA), 0.5%吐温-20和20mM二硫苏糖醇)。对于大多数芯片长度, 在大部分芯片的长度下蚀刻到50 μ m乘以150 μ m的输入通道, 在液滴结处窄到55 μ m, 并用疏水性Pico-Glide (Dolomite) 涂覆。使用三个Mitos P泵压力泵 (Dolomite) 来泵送液体通过芯片。液滴尺寸取决于压力, 但通常直径~45mm的液滴是最佳稳定的。将乳液收集到冷却的2mL微量纤维管中, 并在40°C下温育15分钟以进行mRNA捕获。

使Pico-Glide (Dolomite) 从液滴中提取珠。在一些实施方式中, 使用涡旋制备类似的单细胞分区乳液。

[0326] 对于多路复用OE-RT-PCR, 使用玻璃Telos液滴乳液微流体芯片 (Dolomite)。将 mRNA结合的珠重悬到OE-RT-PCR混合物中, 并在产生27 μ m液滴的压力下用矿物油基表面活性剂混合物(可从GigaGen购买获得)注射至微流体芯片中。OE-RT-PCR混合物包含2x一步 RT-PCR缓冲液、2.0mM MgSO₄、SuperScript III逆转录酶和Platinum Taq (Thermo Fisher Scientific), 以及针对IgK C区、IgG C区和所有V区的引物的混合物(图2)。重叠区是编码富含Gly-Ser的scFv接头序列的DNA序列。使用液滴破碎溶液(可从GigaGen购买获得)从液滴中回收DNA片段, 然后使用QIAquick PCR纯化试剂盒(Qiagen)纯化。在一些实施方式中, 使用涡旋制备类似的OE-RT-PCR乳液。

[0327] 对于巢式PCR(图2), 首先在1.7%琼脂糖凝胶上在150V下运行纯化的OE-RT-PCR产物80分钟。切下与连接产物相对应的1200-1500个碱基对(bp)的条带, 并使用NucleoSpin凝胶和PCR Clean-up试剂盒(Macherey Nage1)纯化。然后进行PCR以添加用于 Illumina测序或酵母展示的衔接子; 对于测序, 加入7个核苷酸的随机物以在随后的新一代测序步骤中增加碱基呼读准确度。巢式PCR用2x NeBNext高保真扩增混合物(NEB)进行, 其具有包含引物的 Illumina衔接子或用于克隆进入酵母表达载体的引物。在1.2%琼脂糖凝胶上在150V下运行巢式PCR产物50分钟。切下800-1100bp的条带, 并使用NucleoSpin凝胶和PCR Clean-up试剂盒(Macherey Nage1)纯化。

[0328] 在一些实施方式中, scFv文库不是天然配对的, 例如, 通过直接从B细胞分离的RNA扩增scFv随机配对。

[0329] 8.1.2. 实施例2: 通过酵母展示分离CTLA-4结合物

[0330] 文库筛选:

[0331] 使用EZ-Link Micro Sulfo-NHS-LC-生物素化试剂盒(Thermo Fisher Scientific)对人IgG1-Fc(Thermo Fisher Scientific)和CTLA-4(R&D Systems)蛋白进行生物素化。将生物素化试剂重悬至9mM并以50倍摩尔过量加入到蛋白质。将反应物在冰上孵育2小时, 然后使用Zeba脱盐柱(Thermo Fisher Scientific)去除生物素化试剂。使用Bradford测定计算最终蛋白质浓度。

[0332] 接下来, 6种DNA文库在酵母中作为表面scFv表达。构建了包含GAL1/10启动子、Aga2细胞壁系链和C末端c-Myc标记的酵母表面展示载体(pYD)。GAL1/10启动子在包含半乳糖的培养基中诱导scFv蛋白的表达。需要Aga2细胞壁系链将scFv穿梭到酵母细胞表面并将scFv栓系到细胞外空间。c-Myc标记在流式分选过程中用于对表达框内scFv蛋白的酵母细胞进行染色。用凝胶纯化的巢式PCR产物和线性化的pYD载体对酿酒酵母细胞(ATCC)进行电穿孔(Bio-Rad Gene Pulser II; 0.54kV, 25uF, 电阻设置为无穷大)用于体内同源重组。扩增转化细胞, 并用半乳糖诱导以产生酵母scFv展示文库。

[0333] 将来自扩增的scFv文库的200万个酵母细胞用抗-c-Myc(Thermo Fisher Scientific A21281)和AF488缀合的二抗(Thermo Fisher Scientific A11039)染色。为了选择与CTLA-4结合的scFv表达细胞, 在一抗孵育期间将生物素化的CTLA-4抗原添加到酵母培养物中(最终7nM), 然后用PE-抗生物素蛋白链菌素(Thermo Fisher Scientific)染色。酵母细胞在BD Influx(Stanford Shared FACS Facility)上流式分选双阳性细胞

(AF488C/PEC),然后将回收的克隆接种在包含卡那霉素、链霉素和青霉素(Teknova)的SD-CAA平板上进行扩增。然后将扩增的第一轮FACS克隆以相同摩尔浓度(最终7nM)使用相同抗原进行第二轮FACS。使用从最终FACS分选回收的酵母进行质粒小量制备(Zymo Research)。尾端PCR用于将Illumina衔接子添加到质粒文库以进行深度测序。

[0334] 在典型FACS点图中,右上象限包含针对抗原结合和scFv表达(由C末端c-Myc标记识别)染色的酵母。左下象限包含未针对抗原或scFv表达染色的酵母。右下象限包含表达scFv但不结合抗原的酵母。通过将针对抗原和scFv表达双重染色的酵母计数除以表达scFv的酵母计数来估计每个库中结合物的频率。当以7nM最终抗原浓度分选时,从免疫的小鼠生成的文库产生低scFv结合物百分比(范围0.08%-1.28%)。血清效价和在库中结合物的频率之间没有明确的关联。在这些分选的细胞扩增后,使用7nM最终抗原浓度的第二轮FACS用于增加筛选的特异性。在第二FACS中结合物的频率总是显著高于第一FACS,其范围8.39%-84.4%。通常,在第一分选中结合物的较低频率在第二分选中产生较低结合物频率。据推测,这是由于对于在原始库中真正结合物较少的样品的较低门控特异性。

[0335] 深度库测序:

[0336] 将CTLA-4结合克隆作为文库(“CTLA-4结合克隆文库”)回收,并进行深度库测序。CTLA-4结合克隆文库于2018年11月20日根据布达佩斯条约以ATCC登录号PTA-125512保藏,ATCC帐户号197361(美国典型培养物保藏中心(ATCC),10801 University Boulevard, Manassas, VA 20110 USA)。文库中的每个克隆包含scFv,其包含来源于单一细胞的重链和轻链序列的配对可变(V(D)J)区。深度库测序确定了重链和轻链序列的所有配对可变(V(D)J)区的序列。在SEQ ID NO:1-28和SEQ ID NO:101-128中提供了从酵母scFv文库测序获得的一些重链和轻链序列。在SEQ ID NO 8001-8991中提供了从酵母scFv文库测序获得的另外的序列。具体地,其可变轻链(V_L)序列包括SEQ ID NO:8001-8495。其可变重链(V_H)序列包括SEQ ID NO:8496-8991。

[0337] 使用定量PCR Illumina文库定量试剂盒(KAPA)对深度抗体测序文库进行定量并稀释至17.5pM。根据产生厂商的说明书,使用500次循环MiSeq试剂盒v2在MiSeq(Illumina)上对文库进行测序。为了获得具有保持重链和轻链连接的高质量序列读数,在两个单独的运行中进行测序。在第一个运行(“连接的运行”)中,对scFv文库直接测序以获得针对轻链V-基因和CDR3的340个循环的正向读取,以及覆盖重链CDR3和重链V-基因的一部分的162个循环的反向读取。在第二个运行(“未连接的运行”)中,将scFv文库首先用作PCR的模板,以分别扩增重链和轻链V-基因。然后,分别获得重链和轻链Ig的340个循环的正向读取和162个循环的反向读取。这会产生在CDR3和部分V-基因重叠的正向和反向读取,这增加了对核苷酸检出的置信度。

[0338] 为消除碱基检出错误,读取的预期错误数(E)是根据其Phred分数计算的。在默认情况下,弃去E>1的读取,留下最可能的碱基检出错误数为零的读取。作为另外的质量过滤器,单例核苷酸读数被弃去,因为发现两次或更多次的序列很可能是正确的。最后,通过合并来自连接的和未连接的运行的过滤序列,生成了高质量的连接的抗体序列。简言之,首先合并来自未连接的运行的正向和反向度数的一系列脚本是用Python编写的。弃去任何包含错配的正向和反向序列对。接下来,来自连接的运行的核苷酸序列用于查询未连接的运行中的合并序列。脚本的最终输出是一系列全长、高质量的可变(V(D)J)序列,具有天然的重

链和轻链Ig配对。

[0339] 为了识别阅读框架和FR/CDR连接,首先处理精心策划的免疫球蛋白序列数据库,以生成每个FR/CDR连接的位置特异性序列矩阵(PSSM)。将这些PSSM用于鉴定使用上述过程生成的每个合并核苷酸序列的FR/CDR连接。这确定了每个核苷酸序列的蛋白质阅读框架。对PSSM具有低鉴定分数的CDR序列用感叹号表示。然后,将Python脚本用于翻译序列。读取需要具有有效的预测CDR3序列,因此,例如,在V和J区段之间具有移码的读取被弃去。接下来,UBLAST使用scFv核苷酸序列作为查询和来自IMGT数据库的V和J基因序列作为参考序列运行。具有最低E-值的UBLAST比对用于分配V和J基因家族并计算种系的% ID。

[0340] 在第二FACS选择后,每只动物产生了38-50个以0.1%或更高频率存在的独特scFv序列,包括总共28个独特的scFv候选结合物(轻链:SEQ ID No:1-28;重链:SEQ ID No:101-128)。具有SEQ ID NO:[n]的序列的轻链和具有SEQ ID NO:[100+n]的序列的重链是来自单细胞的同源对,并形成单个scFv。例如,SEQ ID NO:1的轻链和SEQ ID NO:101的重链是同源对,SEQ ID NO:28的轻链和SEQ ID NO:128的重链是同源对,等等。

[0341] 在该方法中,两轮FACS导致CTLA-4结合scFv的富集。此外,在来自免疫小鼠的初始B细胞群的测序数据中未检测到很多scFv,并且在FACS后消除了预分选小鼠库中存在的大部分scFv。因此,这项工作表明,免疫小鼠的库中存在的大多数抗体都不是免疫原的强结合物,并且这种方法可以从免疫小鼠的初始B细胞群中富集稀有的nM亲和力结合物。

[0342] 8.1.3. 实施例3:抗体结合蛋白的生物学特征

[0343] 然后在中国仓鼠卵巢(CHO)细胞中合成在分选前文库中以低频率出现并在分选后文库中变为高频率的scFv序列作为全长mAb。这些mAb包含针对每只动物在第二轮FACS中2-3个丰度最高的序列。CTLA-4靶结合性质:

[0344] 使用生物层干涉法(BLI)和/或表面等离子体共振(SPR)确定每个全长抗体对CTLA-4的结合特异性和亲和力。使用ForteBio(BLI)检测抗cyno CTLA-4和抗小鼠CTLA-4的亲和力。使用Carterra(SPR)检测抗人CTLA-4的亲和力。

[0345] 对于BLI,使用Octet Red96系统(ForteBio)将抗体加载到抗人IgG Fc(AHC)生物传感器上。将加载的生物传感器从300nM开始浸入抗原稀释液中,以1:3的比率进行6次系列稀释。使用1:1结合模型和全局拟合进行动力学分析。

[0346] 对于SPR,将中等密度(>>1,000个反应单位)的抗人IgG-Fc试剂(Southern Biotech 2047-01)胺缀合至Xantec CMD-50M芯片(50nm羧甲基葡聚糖中等密度的官能团)上,使用含133mM EDC(Sigma)和33.3mM S-NHS(ThermoFisher)的100mM MES pH 5.5激活。然后,将山羊抗人IgG Fc(Southern Biotech 2047-01)在10mM乙酸钠pH 4.5(Carterra Inc.)中以25mg/m L缀合10分钟。然后,用1M乙醇胺pH 8.5(Carterra Inc.)来将表面灭活。用平板固定的运行缓冲液是HBS-EPC(10mM HEPES、150mM NaCl、3mM EDTA、0.05%吐温20,pH 7.4;Teknova)。

[0347] 然后将传感器芯片转移到连续流微点仪(CFM; Carterra Inc.)进行阵列捕获。将mAb上清液稀释50倍(最终浓度为3-10mg/mL)到包含1mg/mL BSA的HBS-EPC中。将样品分别在第一次和第二次打印上以15分钟和4分钟的捕获步骤捕获两次,以使用65mL/min流速建立多个密度。在CFM中运行缓冲液也是HBS-EPC。

[0348] 接下来,将传感器芯片加载到SPR阅读器(MX-96系统; Ibis Technologies)上进行

动力学分析。CTLA-4在运行缓冲液(含1.0mg/mL BSA的HBS-EPC)中以浓度1.95、7.8、31.25、125和500nM的四倍稀释系列的五个递增浓度进样。CTLA-4进样时间为5分钟,在非再生动力学系列中以8mL/秒解离15分钟。在系列结束时进样75mg/mL的山羊抗人IgG Fc捕获抗体以验证每个mAb的捕获水平。结合数据通过扣除点间(interspot)表面和空白进样来双重参考,并使用Kinetic Interaction Tool软件(Carterra Inc.)分析ka(结合速率)、kd(解离速率)和KD(亲和力)。

[0349] 对于细胞表面结合研究,生成稳定表达CTLA-4的F1p-In CHO(Thermo Fisher Scientific)细胞,并以50:50的比率混合。使用含1 μ g抗CTLA-4重组抗体的200 μ l MACS缓冲液(含0.5%牛血清白蛋白和2mM EDTA的DPBS)将1百万个细胞在4℃下染色30分钟。然后,将细胞用抗人无关靶标APC和抗人IgG Fc-PE[M1310G05](BioLegend 41070)抗体在4℃下共染色30分钟。将抗人CTLA-4-FITC抗体作为这些混合实验的对照,并使用DAPI评估细胞存活力。在Stanford Shared FACS Facility的BD Influx上进行流式细胞术分析,并使用FlowJo分析数据。

[0350] 鉴定了与CTLA-4特异性结合的抗体。表6中提供了每种抗体对CTLA-4(K_D)的亲和力。相对于最强的抑制剂,即抗体A5,计算Promega测定抑制%。每种抗体对人CTLA-4的亲和力、结合速率、解离速率和KD显示在表7中。

表 6

Ab#	通过 FACS 结 合?	Promega 测定拮 抗剂(EC50, ug/mL)	Promega 测 定抑制%	对人 CTLA-4 的 亲和力(nM)	对 Cyno CTLA4 的亲 和力(nM)	对小鼠 CTLA-4 的亲 和力(nM)
[0351]	伊匹 单抗	是	0.51	50.2%	4.9	1.3
	A1	是	0.13	43.2%	0.77	0.96
	A2	是	0.12	75.4%	5.1	3.1
	A3	是	0.18	49.8%	1.5	1.2
	A4	是	0.15	81%	3	1.2
	A5	是	0.18	100%	4.6	2.2
	A6	是	0.18	61.7%	5.7	1.6
	A7	是	0.17	11.5%	5.7	0.75
	A8	是	0.15	54.7%	4.6	1
	A9	是	0.19	60.8%	6.8	0.92
	A10	是	0.26	24.5%	22	3.1
	A11	是	0.42	26.6%	7.5	1.6
	A12	是	无阻断	0%	5.3	4.5
	A13	是	0.09	13.3%	3.2	9.6
	A14	是	0.09	6%	9.8	23.6
	A15	是	无阻断	0%	10	2.6
	A16	是	无阻断	0%	23	2.8
	A17	是	无阻断	0%	51	6.3
	A18	是	0.89	8.6%	48	无结合
	A19	是	未检测	未检测	3.3	未检测
	A20	是	未检测	未检测	20	未检测
	A21	是	未检测	未检测	31	未检测
	A22	是	未检测	未检测	32	未检测
	A23	是	无阻断	0%	35	未检测
	A24	是	未检测	未检测	55	未检测
	A25	是	未检测	未检测	58	未检测
	A26	是	未检测	未检测	74	未检测
	A27	是	未检测	未检测	120	未检测
	A28	是	无阻断	0%	46	未检测

表 7			
	kon (M-1 s-1)	koff (s-1)	KD (M)
[0352]	伊匹单抗	6.50E+04	3.20E-04
	A1	2.10E+05	1.60E-04
	A2	1.00E+05	5.20E-04
	A3	1.90E+05	2.80E-04
	A4	7.60E+04	2.30E-04
	A5	9.00E+04	4.20E-04
	A6	6.10E+04	3.50E-04
	A7	6.40E+04	3.60E-04
	A8	8.50E+04	3.90E-04
	A9	6.30E+04	4.30E-04
	A10	2.30E+04	5.10E-04
	A11	4.70E+04	3.50E-04
	A12	5.10E+04	2.70E-04
	A13	1.30E+05	4.20E-04
	A14	5.40E+04	5.20E-04
	A15	7.00E+04	7.30E-04
	A16	3.10E+04	7.20E-04
	A17	6.60E+04	3.40E-03
	A18	4.20E+03	2.00E-04
	A19	1.20E+05	3.80E-04
	A20	3.20E+04	6.40E-04
	A21	1.80E+04	5.50E-04
	A22	1.10E+04	3.60E-04
	A23	3.40E+04	1.20E-03
	A24	2.50E+04	1.40E-03
	A25	3.00E+04	1.80E-03
	A26	3.50E+03	2.60E-04
	A27	3.10E+04	3.60E-03
	A28	5.20E+04	2.40E-03

[0353] CTLA-4配体阻断测定：

[0354] 为了分析抗体阻断CTLA-4/配体相互作用的能力,根据产生厂商的说明书使用CTLA-4阻断生物测定(Promega)。在测定前一天,将表达CTLA-4配体CD80和CD86的aAPC/Raji细胞解冻到90%Ham F-12/10%胎牛血清(FBS)中,并接种到两个96孔板的内部60个孔中。将细胞在37℃、5%CO₂下孵育过夜。在测定当天,在99%RPMI/1%FBS中稀释抗体。将抗体稀释液添加到含表达CTLA-4配体的aAPC/Raji细胞的孔中,随后添加CTLA-4效应细胞(解冻到99%RPMI/1%FBS中)。将细胞/抗体混合物在37℃、5%CO₂下孵育6小时,随后添加Bio-Glo试剂,并使用Spectramax i3x酶标仪(Molecular Devices)读取。通过计算[有抗体的信号]/[无抗体的信号]的比率绘制倍数诱导,并且使用SoftMax Pro(Molecular Devices)将这些图用于计算EC50。将内部产生的伊匹单抗用作阳性对照,并将结合无关抗原的抗体用作阴性对照。

[0355] CTLA-4与其配体的结合导致T细胞信号传导的抑制。因此,结合CTLA-4并拮抗CTLA-4/配体相互作用的抗体可以消除这种抑制作用,从而允许激活T细胞。CTLA-4/配体检查点阻断通过体外细胞激活T细胞核因子(NFAT)荧光素酶报告分析进行测试。在该测定中,抗CTLA-4表位落在配体结合结构域内的抗体拮抗CTLA-4/配体相互作用,导致NFAT-荧光素酶报告体的增加。测定了可以结合CHO细胞中表达的CTLA-4的全长mAb候选物。为产生针对每种mAb的EC50值,在对多个浓度上进行了测量。发现一些全长mAb以剂量依赖性方式在检

查点阻断中起作用,如表6中总结的。

[0356] 使用ELISA评估CTLA4抗体(表8中所示)阻止CD80或CD86与板结合的CTLA4结合的能力。EC50和每个相互作用的抑制%如表8中所示。板用rhCTLA4-Fc包被,然后用含5%w/v脱脂奶粉的1xPBST封闭。封闭后,将一系列稀释的指定抗体加入板中。然后,为了确定多少CD80或CD86仍然能够结合板结合的CTLA4,在洗涤板后,分别将rhCD80-His或rhCD86-His添加到板中。洗去未结合的CD80-His/CD86-His并添加小鼠抗His-HRP。在存在每种抗体的情况下,TMB用于确定结合CTLA4的板结合了多少CD80-His/CD86-His。

[0357] 在本公开的一些实施方式中,抗CTLA-4抗体通过抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)发挥药理学作用。在本公开的一些实施方式中,与抗CTLA-4抗体疗法相关的免疫相关毒性被在ADCC中起作用但在检查点阻断中不起作用的抗体消除。

表 8				
抗体	CD80 EC50 (ug/mL)	CD80 抑制%	CD86 EC50 (ug/ml)	CD86 抑制%
伊匹单抗	0.08211	96.5%	0.1136	90.6%
CTLA4.A7	0.9955	92.1%	1.98	78.8%
CTLA4.A2	0.1006	95.4%	0.1452	91.5%
CTLA4.A12	0.2427	89.2%	0.3704	77.4%
CTLA4.A14	0.2262	83.7%	0.2442	54.5%
CTLA4.A5	0.07049	96.3%	0.1218	90.6%

[0359] 表位分箱:

[0360] 使用高通量阵列SPR以改良的经典夹心方法进行表位分箱。使用Carterra CFM和类似于SPR亲和力研究的方法对传感器芯片进行官能化,不同之处在于使用CMD-200M芯片类型(200nm羧甲基葡聚糖,Xantec)并以50mg/mL偶联mAb,以形成具有更高结合容量的表面(固定了~3,000个反应单位)。根据上清液中mAb的浓度,将mAb上清液在运行缓冲液中以1:1或1:10的比率稀释。

[0361] 将传感器芯片置于MX-96仪器中,使用二价胺反应性接头双(磺基琥珀酰亚胺)辛二酸酯(BS3,ThermoFisher)将捕获的mAb(“配体”)交联到表面,在10分钟内以0.87nM进样到水中。将过量激活的BS3用1M乙醇胺pH 8.5中和。对于每个分箱循环,将7分钟进样250mg/mL人IgG(Jackson ImmunoResearch 009-000-003)用于封闭参考表面和靶标的任何剩余容量。

[0362] 接下来,将250nM CTLA4蛋白注射到传感器芯片上,然后注射稀释的mAb上清液(“分析物”)或缓冲液空白作为阴性对照。因此,如果分析物mAb不与配体mAb竞争,则其仅与抗原结合。在每个循环结束时,使用4份Pierce IgG洗脱缓冲液(ThermoFisher#21004)、一份5M NaCl(最终0.83M)和1.25份0.85%H₃PO₄(最终0.17%)的溶液进行一分钟的再生注射。通过多次再生,仅有18种mAb作为配体保持活性,因此分箱分析包含18x 46的竞争矩阵。

[0363] 然后在SPR表位数据分析软件包(Carterra Inc.)中使用网络社区图算法来确定表位分箱。值得注意的是,聚类算法将仅有分析物数据可用的mAb与配体和分析物数据都可用的mAb分开聚类。这种现象是不完全竞争矩阵的假象。具有配体和分析物数据两者的mAb具有更多mAb-mAb测量值,其导致更多mAb-mAb连接,从而导致社区图中更密切的关系。

[0364] 表位分箱显示所有mAb都在与伊匹单抗不同的分箱中(图3)。

[0365] 8.4.实施例4:CTLA-4 ABP对肿瘤生长的影响

[0366] 表达人CTLA-4的转基因小鼠(hCTLA-4 KI小鼠)在右侧肋腹部皮下植入MC38肿瘤

细胞。hCTLA-4 KI小鼠在植入后第8、11和14天用1mg/kg指定的CTLA-4抗体治疗。具体而言，使用对照抗体(n=8)、伊匹单抗(n=8)、CTLA4.A2抗体(n=8)、CTLA4.A14抗体(n=9)、CTLA4.A14.2a抗体(n=8)、CTLA4.A7抗体(n=9)、CTLA4.A7抗体(n=9)和CTLA4.A12抗体(n=8)治疗小鼠。CTLA-4.A14.2a抗体是在小鼠IgG2a骨架上克隆的A14抗体，其可增强抗体依赖性细胞毒性(ADCC)活性。测量肿瘤体积并使用以下公式计算肿瘤生长抑制：

[0367] 平均抑制% = (平均值(C) - 平均值(T)) / 平均值(C) * 100%

[0368] T - 当前组的值

[0369] C - 对照组的值

[0370] 以在0.1ml PBS中的MC38肿瘤细胞(1×10^6 个)，将肿瘤皮下植入右侧肋腹部区域用于肿瘤发展。在肿瘤植入前收获指数生长期的细胞并通过细胞计数器进行定量。使用卡尺在两个维度上每周测量两次肿瘤体积，体积将使用公式以 mm^3 表示：“ $V = (L \times W \times W)/2$ ”，其中V是肿瘤体积，L是肿瘤长度(最常肿瘤尺寸)和W是肿瘤宽度(垂直于L的最长肿瘤尺寸)。在层流柜中进行给药以及瘤重和体重测量。通过使用StudyDirector™软件(3.1.399.19版)测量体重和肿瘤体积。使用含指定蛋白的无菌盐水溶液i.p.(腹腔内)向动物给药，所述无菌盐水溶液包含0.1mg/ml指定蛋白。每只小鼠按照每克体重接受10微升指定溶液，这使得给药剂量为1mg/kg。在随机分组后第0天、第3天和第6天向动物给药。

[0371] 表9显示了其肿瘤对治疗具有完全应答(CR)的小鼠的百分比。

[0372] 治疗开始后至少2次连续的 0mm^3 肿瘤测量值符合CR。

表 9

抗体	具有 CR 的肿瘤%
对照	12.5% (1/8)
伊匹单抗	75% (6/8)
CTLA4.A2	100% (8/8)
CTLA4.A14	66.67% (6/9)
CTLA4.A14.2a	75% (6/8)
CTLA4.A7	55.6% (5/9)
CTLA4.A12	50% (4/8)

[0374] 表10显示了具有CR但后来在第56天肿瘤复发的小鼠百分比。此前显示CR的CTLA4.A14.2a治疗组在第56天时复发率为0%，表明ADCC可以延长抗肿瘤免疫。

表 10

抗体	此前已显示 CDR 的肿瘤在第 56 天的复发%
伊匹单抗	16.67% (1/6)
CTLA4.A2	25% (2/8)
CTLA4.A14	33.3% (2/6)
CTLA4.A14.2a	0% (0/6)

[0376] 表11显示了当用1mg/kg对照或1mg/kg指定CTLA-4抗体治疗植入MC38肿瘤细胞的hCTLA-4KI小鼠时，肿瘤体积随时间的平均抑制。

研究天数	表 11: 平均抑制										
	8	11	14	17	21	24	27	29	31	35	38
[0377]	对照	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	伊匹单抗	-3.81%	0.44%	31.41%	69.65%	84.04%	90.73%	96.00%	96.92%	96.61%	87.45%
	CTLA4.A7	-7.49%	10.91%	34.54%	60.11%	70.73%	81.04%	78.25%	78.75%	70.60%	50.50%
	CTLA4.A2	-6.79%	-6.10%	26.70%	61.14%	85.22%	97.98%	99.58%	100.00	100.00	99.55%
	CTLA4.A12	-5.89%	12.35%	34.21%	49.59%	70.56%	86.82%	90.22%	91.82%	91.13%	68.63%
	CTLA4.A14	-7.37%	-6.91%	26.70%	58.54%	80.64%	93.71%	95.73%	97.23%	97.26%	92.22%
	CTLA4.A14.2 a	-4.74%	-20.04%	9.74%	40.80%	65.98%	87.85%	93.48%	95.01%	93.66%	81.40%

[0378] 实施例5:CTLA4 ABP对全身性抗肿瘤免疫的影响

[0379] 携带MC38肿瘤的hCTLA4 KI小鼠在肿瘤细胞植入后第8、11和14天用指定的抗-CTLA4治疗,如上文所述。将MC38细胞植入对肿瘤显示CR的小鼠对侧肋腹部进行再次攻击。表12显示在研究的最后一天(原始肿瘤细胞植入后73天和再攻击植入后30天)具有原始或再攻击肿瘤的个体小鼠的肿瘤体积(mm^3)。在原始肿瘤保持CR的小鼠中,再攻击肿瘤没有生长。在再次攻击肿瘤中观察到的3个生长实例发生在原始肿瘤已经开始重新生长的小鼠中(见表12)。结果还表明,即使原发肿瘤(原始肿瘤)复发,CTLA4.A2也可诱导保护性全身抗肿瘤免疫(见表13)。

[0380]	表 12					
	伊匹单抗(原 始肿瘤)	伊匹单抗(再 攻击肿瘤)	CTLA4.A2 (原始肿瘤)	CTLA4.A2 (再攻击肿瘤)	CTLA4.A14 (原始肿瘤)	CTLA4.A14 (再攻击肿
[0381]	0	0	0	0	105.7	85.3
	1822.3	149.6	0	0	0	0
	0	0	0	0	913.3	98.1
	0	0	0	0	0	0
	0	0	1415	0	0	0
	0	0	0	0	0	0
			678.9	0		
			0	0		

[0382]	表 13	
	抗体	原发肿瘤复发时生长的继发肿瘤的%
	伊匹单抗	100% (1/1)
	CTLA4.A2	0% (0/2)
	CTLA4.A14	100% (2/2)

[0383] 8.5. 实施例6:CLTA-4 ABP剂量增加的影响

[0384] 使用抗CTLA-4治疗MC38肿瘤

[0385] 将2到8只表达人CTLA-4的转基因小鼠(hCTLA-4 KI小鼠)在右侧肋腹部植入MC38肿瘤细胞。当平均肿瘤尺寸达到 98.5mm^2 时开始随机分组。从随机分组后第0天开始,hCTLA-4 KI小鼠每两周用5mg/kg指定的抗CTLA4治疗,给予5剂。所施用的抗体如表14中所示。CTLA4.A14.2a是在小鼠IgG2a骨架上克隆的A14抗体,其可增强ADCC活性。297后缀表示hIgG1 Fc在N297氨基酸处发生突变以消除糖基化,从而消除包括ADCC在内的Fc效应功能。

[0386] A) 肿瘤生长抑制

[0387] 在研究过程中,使用以下公式确定肿瘤生长抑制:

[0388] 平均抑制% = (平均值(C) - 平均值(T)) / 平均值(C) * 100%

[0389] T - 当前组的值

[0390] C - 对照组的值

[0391] 结果表明, 缺乏Fc活性的抗体总体上降低了功效。这些抗体仍然能够在一些动物中诱导肿瘤消退, 表明抗CTLA4通过Fc依赖性和Fc非依赖性作用机制起作用, 并表明缺乏Fc活性的抗CTLA4, 包括ADCC和ADCP, 可以诱导抗肿瘤应答(表14和表15)。

研究天数	平均抑制						
	0	3	6	10	13	17	20
1x PBS (阴性对照)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
伊匹单抗	0.31%	-21.76%	12.56%	75.43%	91.55%	95.54%	98.71%
CTLA4.A5	0.74%	-28.09%	-6.22%	64.17%	87.32%	98.32%	100.00%
CTLA4.A14	-0.56%	-13.30%	5.33%	68.17%	86.21%	92.79%	97.52%
CTLA4.A12	0.40%	-32.59%	-14.13%	57.48%	83.00%	94.99%	98.04%
CTLA4.A8	0.26%	-18.48%	-14.18%	52.53%	78.37%	96.15%	97.96%
CTLA4.A7	-0.61%	-7.67%	10.04%	76.74%	94.36%	98.88%	100.00%
CTLA4.A2	0.27%	-23.97%	-9.95%	60.95%	89.33%	98.35%	100.00%
CTLA4.A13	-1.15%	-7.61%	6.23%	49.18%	64.82%	93.82%	95.23%
CTLA4.A5.2a	0.88%	11.78%	27.51%	66.64%	89.02%	96.85%	100.00%
CTLA4.A14.2a	1.04%	-7.89%	21.12%	45.60%	84.83%	97.30%	100.00%
伊匹单抗.297	0.68%	8.27%	21.37%	22.75%	16.02%	25.70%	26.39%
CTLA4.A5.297	-0.33%	17.56%	18.58%	5.70%	-15.40%	4.65%	13.61%

表 15	
到治疗开始后第 13 体内肿瘤开始消退的每组%	
1x PBS (阴性对照)	0%
伊匹单抗	100%
CTLA4.A5	100%
CTLA4.A14	100%
CTLA4.A12	88%
CTLA4.A8	100%
CTLA4.A7	100%
CTLA4.A2	100%
CTLA4.A13	86%
CTLA4.A5.2a	100%
CTLA4.A14.2a	100%
伊匹单抗.297	25%
CTLA4.A5.297	14%

[0394] B) 组织学分析:

[0395] 将hCTLA-4小鼠安乐死, 并收集其右肾用于组织学分析。对组织进行福尔马林固定和石蜡包埋, 切成5μm切片, 将其置于载玻片上进行标准苏木精和伊红(H&E)染色以及抗IgG和抗C3免疫组织化学(IHC)染色。将染色的载玻片制备为数字图像。具有实验室动物和毒理学病理学经验的董事会认证兽医病理学家评估了H&E图像的任何发现, 并评估了抗IgG和C3

载玻片的位置、强度和阳性染色百分比。H&E图像中的发现按0到5的等级评分(0=在正常范围内,1=最小发现或可辨别的最小变化,2=轻度发现,3=中度,4=显著,5=严重或至最大可能)。IHC图像中的发现以1到4的强度评分(0=阴性,1=最小或轻微阳性,4=非常暗),并作为肾小球中阳性细胞的百分比(审核后至少5个肾小球)。

[0396] H&E、免疫球蛋白或C3染色图像由处于盲态的病理学家评分,结果显示在图4中。H&E的主要发现是肾间质中的白细胞通常不累积肾小球。肾小球评分中的Ig和C3沉淀也显示在图4中。

[0397] C) 碱性磷酸酶:

[0398] 还针对碱性磷酸酶水平的变化对hCTLA-4小鼠进行了分析。使用ABAXIS VetScan VS2上的综合诊断转子测定血清中碱性磷酸酶的水平。

[0399] 研究发现,伊匹单抗(IPI)升高碱性磷酸酶水平,这可能是免疫接到的肝炎的指征。CTLA4抗体(例如,CTLA4.A14.2A)显示碱性磷酸酶水平升高的降低(图5)。由目前公开的CTLA4抗体诱导的碱性磷酸酶升高的这种降低可能表明其比治疗(如派姆单抗)更不可能诱导免疫介导的肝炎。

[0400] 8.6. 实施例7:CTLA-4 ABP对第二个肿瘤模型的影响

[0401] 使用抗CTLA-4治疗RM1肿瘤

[0402] 在表达人CTLA-4的转基因小鼠(hCTLA-4 KI小鼠)的右侧肋腹部植入RM1肿瘤细胞。(人IgG1同种型阴性对照n=7,阿特珠单抗n=8,针对所有其他组n=11)。用表16中所示的抗体治疗hCTLA4 KI小鼠。CTLA4抗体在随机分组后第0、3和6天以5mg/kg给药,阿特珠单抗从随机分组后第0天开始以5mg/kg每两周给药一次,持续3周。人IgG1同种型阴性对照在随机分组后第0、3和6天以5mg/kg给药。使用以下公式在第0、4、7、11、14和18天确定对肿瘤生长的平均抑制:

[0403] 平均Δ抑制% = (平均值(C) - 平均值(T)) / 平均值(C) * 100%

[0404] T-当前组的值

[0405] C-对照组的值

[0406] 表16显示了在研究过程中对照、CTLA4抗体和阿特珠单抗治疗的平均抑制值。

研究天数	平均Δ抑制					
	0	4	7	11	14	18
[0407]	人 IgG1 同种型 (阴性对照)	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	伊匹单抗	2.14%	11.33%	30.07%	41.96%	52.16%
	CTLA4.A2	0.09%	-12.28%	25.30%	43.83%	50.20%
	CTLA4.A14	-0.17%	-7.72%	22.10%	36.93%	48.84%
	阿特珠单抗	1.83%	17.66%	0.41%	-3.02%	-7.89%
	阿特珠单抗+伊 匹单抗	-0.47%	-3.31%	18.00%	29.81%	30.39%
	阿特珠单抗 +CTLA4.A2	1.50%	-6.72%	23.00%	41.64%	40.93%
	阿特珠单抗 +CTLA4.A14	0.87%	2.55%	31.58%	45.65%	47.43%
						55.18%

[0408] 8.7. 实施例8:组合治疗(派姆单抗和抗CTLA-4)

[0409] 表达人CTLA-4和PD-1的转基因小鼠(hCTLA4-hPD1 KI小鼠,每个治疗组n=8)在右侧皮下肋腹部植入 1×10^6 个MC38肿瘤细胞。hCTLA4-hPD1 KI小鼠用对照(1x磷酸盐缓冲盐水,或PBS);2mg/kg派姆单抗(pembro)或2mg/kg pembro+5mg/kg抗CTLA4治疗,腹腔内施用。从随机分组后第1天开始,每只动物的给药体积为10mL/kg,如表17中所示,每周两次,持续三周。与对照治疗相比,由每种治疗诱导的肿瘤生长的平均(%) Δ 抑制使用以下公式计算,结果显示在表17中。

[0410] 平均 Δ 抑制% = ((平均值(C) - 平均值(C0)) - (平均值(T) - 平均值(T0))) / (平均值(C) - 平均值(C0)) * 100%

[0411] T-当前组的值

[0412] T0-当前组的初始值

[0413] C-对照组的值

[0414] C0-对照组的初始值

研究天数	平均 Δ 抑制						
	4	7	10	14	17	21	24
[0415]	对照	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
	派姆单抗	44.33%	44.20%	30.78%	20.92%	10.08%	8.62%
	派姆单抗 +CTLA4.A5	29.57%	79.32%	85.83%	87.28%	86.27%	78.55%
	派姆单抗 +CTLA4.A1	-82.05%	-5.30%	41.81%	50.97%	55.73%	52.23%
							-11.94 %

[0416] 研究表明,单独用pembro治疗的小鼠在第24天没有表现出肿瘤生长抑制,但是在研究过程中添加指定的CTLA4抗体增加了肿瘤生长抑制。

[0417] 在实验结束时,收集选择的肿瘤并进行流式细胞术以研究肿瘤内的免疫细胞群。数据表明,抗CTLA4减少了瘤内Treg细胞群,同时增加了瘤内NK细胞群(图6)。

[0418] 8.8.实施例9:免疫相关不良事件

[0419] 在表达人CTLA-4的转基因小鼠(hCTLA-4 KI小鼠)的右侧肋腹部植入MC38肿瘤细胞。hCTLA-4 KI小鼠在植入后第8、11和14天用1mg/kg指定的CTLA-4抗体治疗。在植入后第8、11、14和17天对小鼠称重。动物数量为:针对伊匹单抗,n=8,针对A7,n=9,针对A2,针对A14,n=9和针对A14.2,n=8。接受指定的抗-CTLA4治疗小鼠的体重变化百分比如图7中所示。

[0420] 用CTLA4.A7、CTLA4.A14和CTLA4.A14.2a治疗的小鼠在抗CTLA4的最终剂量后似乎没有表现出体重减轻(图7)。这一发现是出乎意料的,因为据报道,当使用具有增强ADCC的抗CTLA4(例如,CTLA4.A14.2a)时,免疫相关的不良事件(irAE)会更多。该数据表明,即使在ADCC增强时,阻断活性降低的抗CTLA4也可能限制irAE的诱导。

[0421] 8.9.实施例10:外周流式细胞术

[0422] 在表达人CTLA-4的转基因小鼠(hCTLA-4 KI小鼠)的右侧肋腹部植入MC38肿瘤细胞。hCTLA-4 KI小鼠在植入后第8、11和14天用1mg/kg指定的CTLA-4抗体治疗。在第27天进行外周流式细胞术。将100 μ L血液用于染色。外周流式细胞术的结果如图8-10中所示。

[0423] 结果表明,CTLA4.A2和CTLA4.A14降低外周T细胞(CD3+)升高。用CTLA4.A14.2a增强ADCC增加了新激活的T细胞(CD69+)。CTLA4.A2和CTLA4.A14产生较少的非常规调节性细

胞(CD4+PD1+, CD4+ICOS+)。(见图8)。

[0424] 结果还表明CTLA4.A2和CTLA4.A14更好地增强了CD8+T细胞。与伊匹单抗相比, CTLA4.A2更好地增强了新激活的T细胞(CD8+CD69+)并导致T细胞耗竭减少(CD8+PD1+)。ICOS已被描述为抗CTLA4的药效学标志物。用CTLA4.A14.2a增强ADCC似乎进一步增加了CD8+ICOS+细胞(图9)。结果还表明,根据树突细胞(DC)和激活的DC(CD86+)的频率判断, CTLA4.A2和CTLA4.A14.2a导致外周免疫激活相对于伊匹单抗降低。(见图10)。

[0425] 8.10.实施例11:使用低剂量CTLA-4治疗的研究

[0426] 以在0.1ml PBS中的MC38肿瘤细胞(1E6),将肿瘤皮下植入表达人CTLA-4的转基因小鼠(hCTLA-4 KI小鼠)的右侧肋腹部区域用于肿瘤发展。在肿瘤植入前收获指数生长期的细胞并通过细胞计数器进行定量。当平均肿瘤体积为96.15mm³时,将hCTLA-4 KI小鼠随机分组,并在随机分组后第0、3和6天用0.3mg/kg指定的抗CTLA4、伊匹单抗或人IgG1同种型对照(同种型)治疗。如在实施例4中所述,确定肿瘤体积和平均抑制%。CTLA4.A2和CTLA4.A14在研究的18天内导致显著更高的肿瘤抑制。研究结果如表18和图11所示。

组别	日期/研究天数					
	12/6/2019	12/10/2019	12/13/2019	12/17/2019	12/20/2019	12/24/2019
	0	4	7	11	14	18
同种型						
伊匹单抗	-0.17%	9.33%	18.68%	22.37%	27.23%	11.84%
CTLA4.A2	0.22%	13.00%	23.03%	49.09%	60.03%	59.54%
CTLA4.A14	0.01%	23.39%	35.06%	53.05%	57.50%	45.41%

[0428] 9.通过引用并入

[0429] 本申请中引用的所有出版物、专利、专利申请和其他文件出于所有目的通过引用整体并入本文,就如同每个单独的出版物、专利、专利申请或其他文件都被单独指明为针对所有目的以引用方式并入一样。

[0430] 10.等同物

[0431] 尽管已经说明和描述了各种特定实施方式,但上述说明书不是限制性的。应当理解,在不脱离本公开的精神和范围的情况下可以进行各种改变。在阅读本说明书后,本领域技术人员将认识到很多变化。

[0432] 表19提供了抗体轻链、抗体重链、CDR和人CTLA4的序列

[0433]

表19		
SEQ ID NO	序列	链 (抗体)
1	EIVLTQSPGTLSSLSPGEGATLSCRASQSFSSNYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS SRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGTSPFTFGPGTKVDIK	L1 (A1)
2	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS SRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGRSPFTFGPGTKVDIK	L2 (A2)
3	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS SRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPPFTFGPGTKVDIK	L3 (A3)
4	EIVLTQSPGTLSSLSPGDRATLSCRASQSGSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS SRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGTSPFTSGPGTKVDIK	L4 (A4)
5	EIVLTQSPGTLSSLSPGDRATLSCRASQSGSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS SRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGTSPFTSGPGTKVDIK	L5 (A5)

[0434]	6	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASS LQSGVPSRFSGSQGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPFTFGPGTKVDIK	L6 (A6)
	7	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS SRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPPFTFGPGTKVDIK	L7 (A7)
	8	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR ATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPPFTFGPGTKVEIK	L8 (A8)
	9	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASS LQSGVPSRFSGSQGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYSTPFTFGPGTKVDIK	L9 (A9)
	10	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS SRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPPFTFGPGTKVDIK	L10 (A10)
	11	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITCRASQGISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYAAST LQSGVPSRFSGSQSGTEFTLTISLQPEDFATYYCQQQLNSYPPTFGQGTKVEIK	L11 (A11)
	12	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS SRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGTSPWTFGQGTKVEIK	L12 (A12)
	13	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS SRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPPFTFGPGTKVDIK	L13 (A13)
	14	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS SRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPPWTSGQGTKVEIK	L14 (A14)
	15	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS SRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPPFTFGPGTKVDIK	L15 (A15)
	16	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQGISNYLAWYQQKPGKVPKLLIYAAS SLQSGVPPRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYPLTFGGGTKEIK	L16 (A16)
	17	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQAIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAAS SLQSGVPPRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYPLTFGGGTKEIK	L17 (A17)
	18	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSR ATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSPPFTFGQGTKVEIK	L18 (A18)
	19	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS SRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGSSSMYTFQGQTKLEIK	L19 (A19)
	20	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS SRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGRSPFTFGPGTKVDIK	L20 (A20)
	21	DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLHSNGYNLDWYLQKPGQSPQLLI YLGSNRASGVPDFRFSQSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQTLQTPLTFGG GTKVEIK	L21 (A21)
	22	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQAIRNDLGWYQQKPGKAPKRLIYAAS SLQSGVPPRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATYYCLQHNSYPLTFGGGTKEIK	L22 (A22)
	23	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS SRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGPSPWTFGQGTKVEIK	L23 (A23)
	24	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASS LQSGVPSRFSGSQGTDFLTISLQPEDFATYYCQQSYRTPFTFGPGTKVDIK	L24 (A24)
	25	EIVMTQSPATLSPGERATLSCRASQSVSSYLSWYQQKPGQAPRLLIYGAS TRATGIPARFSGSGSGTDFLTISNLQPEDFAVYYCQQYGNLPFTAGPGTKVDIK	L25 (A25)
	26	DVVMQSPLSLPVTPLGQPAISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLI YKVSNRDGSVPDFRFSQSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWPITSG QGTRLEIK	L26 (A26)
	27	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS SRATGIPDRFSGSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYHCQQYGRSPWTLGQGTKVE	L27 (A27)

	IK	
28	EIVLTQSPGTLQLSPGERATLSCRASQS VSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGAS SRATGIPDRFSGSGTDFLTISRLEPEDFAVYYCQQYGS PWTSGQGTKVE IK	L28 (A28)
101	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVAV IWYDGRNKYYVDSVKGRFTISRDNSNNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGEF FGEFFDYWGQGTLVTVSSA	H1 (A1)
102	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSNYGMNWVRQAPGKGLEWVA VIWYDGRNKHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARG GDWGPYFDYWGQGTLVTVSSA	H2 (A2)
103	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCIASGFTFSSYGMWHWVRQAPGKGLEWVAV NWYDGSNKHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGG VWGPYFDYWGQGTLVTVSSA	H3 (A3)
104	QVQLVESGGGVVQPGRSRLRISCAASGFTFSSYGIHWVVRQAPGKGLQWVAVI WYDGRNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCSRGSF GAFDIWGQGTMVTVSSA	H4 (A4)
105	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSSYGMWHWVRQAPGKGLEWVAV IWYDGNNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMYSLRAEDTAVYYCARGGI LAAGIFDYWGQGTLVTVSSA	H5 (A5)
106	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSSYGMWHWVRQAPGKGLEWVAV IWYDGSYKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMSSLRAEDTAVYYCARAPH YAILTGYEVDYWGQGTLVTVSSA	H6 (A6)
107	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTLSSFGMHWVRQAPGKGLEWVAV IWYDGSNKYYADSVKGRFIISRDNSKTALYLQMNSLRAEDTAVYYCARAHY FGAFDIWGQGTMVTVSSA	H7 (A7)
108	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSRYGMHWVRQAPGKGLEWVAV IWYDGRNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTALYSCARAGE LGPFDYWGQGTLVTVSSA	H8 (A8)
109	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSSHGMHWVRQAPGKGLEWVAV IWYDGSNKHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGDI LTGYYGYWGQGTLVTVSSA	H9 (A9)
110	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAVASGFTLSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAV IWYDGSNKHYADSVKGRFTISRDNSKNTLSQMNSLRAEDTAVYYCARGGQ LGPFDYWGQGTLVTVSSA	H10 (A10)
111	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAV IWYDVGNKYYIDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDYY GSGSPRHFDYWGQGTLVTVSSA	H11 (A11)
112	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAV IWYDGSNKYYADSVKGRFTFSRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGG LMGAFDYWGQGTLVTVSSA	H12 (A12)
113	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAV IWYDGRNKDYADSVKGRTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGL LGPYFDYWGQGTLVTVSSA	H13 (A13)
114	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGTGLEWVAV IWYEGRNKYYADPVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRDDDAVYYCARAG DLGAFDIWGQGTMVTVSSA	H14 (A14)
115	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFRSYGMHWVRQAPGKGLEWVAV IWYDGSNKHYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARNG LIGAFDIWGQGTMVTVSSA	H15 (A15)
116	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSSYGIHWVVRQAPGKGLEWVAVI WYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGSL LGPFDYWGQGTLVTVSSA	H16 (A16)
117	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMS WVRQAPGKGLEWSAI SGGGLSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKDLLW LGFDYWGQGTLVTVSSA	H17 (A17)
118	QVQLVESGGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAV IWYDGSNKFYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARGGH LGSDFYWGQGTLVTVSSA	H18 (A18)
119	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYYMHWVRQAPGQGLEWMG	H19 (A19)

[0435]

	IINPSVGSTSQAQKFQGRVTMTRDTSTSTVYMEMLSLRSEDTAVYYCAREVR VRGVIIPFFDYWDQGTLTVSSA	
120	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMG WISAYNGNTNYAQKFQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLSRSDDTAVYYCAKV SGYFDYWGQGTLTVSSA	H20 (A20)
121	QVQLVESGGVVQPGRSRLSCAASGFTFSSYGMHWVVRQAPGKGLEWVAV IWYDGNNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLHMNSLRADDTAVYYCARML RGAPYYYGMDVWGQGTTVSSA	H21 (A21)
122	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSGI SGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKLGIA WYFDVWGRGTLTVSSA	H22 (A22)
123	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMG WISAYNGNTYYAQKFQGRVTMTDTSTSTAYVELRSLSRSDDTAVYYCARVT GRDAFDIWGQGTMVTVSSA	H23 (A23)
124	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLECMGW ISAYNGNTNYAQKFQGRVTMITDTSTSTAYMELRSLSRSDDTAVYYCARVGPI NLDYWGQGTLTVSSA	H24 (A24)
125	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTNYGISWVRQAPGQGLEWMG WISVYNGNTNYAQKFQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLSLISDDTAVYYCARLG KGLFDYWGQGTLTVSSA	H25 (A25)
126	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASDYTFTYYGISWVRQAPGQGLEWMG WISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTDTSTNTAYLELRSLSRSDDTAVYYCARD YYDSSGYFDYWGQGTLTVSSA	H26 (A26)
127	QVQLVQSGAEVKPGASVKVSCKASGYTFTSYGISWVRQAPGQGLEWMG WISAYNGNTNYAQKLQGRVTMTDTSTSTAYMELRSLSRSDDTAVYYCGRW VRGVEYWGQGTLTVSSA	H27 (A27)
128	QVQLVESGGVVQPGRSRLGLSCAASGFTFSTYGMHWVVRQAPGKGLEWVAV TLYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARASL TGSFDYWGQGTLTVSSA	H28 (A28)
[0436]	1001 QSFSSNY	CDR1-L1 (A1)
	1002 QSVSSSY	CDR1-L2 (A2)
	1003 QSVSSSY	CDR1-L3 (A3)
	1004 QSGSSSY	CDR1-L4 (A4)
	1005 QSGSSSY	CDR1-L5 (A5)
	1006 QSISSY	CDR1-L6 (A6)
	1007 QSVSSSY	CDR1-L7 (A7)
	1008 QSVSY	CDR1-L8 (A8)
	1009 QSISSY	CDR1-L9 (A9)
	1010 QSVSSSY	CDR1-L10 (A10)
	1011 QGISSY	CDR1-L11 (A11)
	1012 QSVSSSY	CDR1-L12 (A12)
	1013 QSVSSSY	CDR1-L13 (A13)
	1014 QSVSSSY	CDR1-L14 (A14)
	1015 QSVSSSY	CDR1-L15 (A15)

[0437]	1016	QGISNY	CDR1-L16 (A16)
	1017	QAIRND	CDR1-L17 (A17)
	1018	QSVSY	CDR1-L18 (A18)
	1019	QSVSSSY	CDR1-L19 (A19)
	1020	QSVSSSY	CDR1-L20 (A20)
	1021	QSLLHSNGYNY	CDR1-L21 (A21)
	1022	QAIRND	CDR1-L22 (A22)
	1023	QSVSSSY	CDR1-L23 (A23)
	1024	QSISSY	CDR1-L24 (A24)
	1025	QSVSSSY	CDR1-L25 (A25)
	1026	QSLVYSDGNTY	CDR1-L26 (A26)
	1027	QSVSSSY	CDR1-L27 (A27)
	1028	QSVSSSY	CDR1-L28 (A28)
	2001	GAS	CDR2-L1 (A1)
	2002	GAS	CDR2-L2 (A2)
	2003	GAS	CDR2-L3 (A3)
	2004	GAS	CDR2-L4 (A4)
	2005	GAS	CDR2-L5 (A5)
	2006	AAS	CDR2-L6 (A6)
	2007	GAS	CDR2-L7 (A7)
	2008	GAS	CDR2-L8 (A8)
	2009	AAS	CDR2-L9 (A9)
	2010	GAS	CDR2-L10 (A10)
	2011	AAS	CDR2-L11 (A11)
	2012	GAS	CDR2-L12 (A12)
	2013	GAS	CDR2-L13 (A13)
	2014	GAS	CDR2-L14 (A14)
	2015	GAS	CDR2-L15 (A15)
	2016	AAS	CDR2-L16 (A16)

[0438]	2017	AAS	CDR2-L17 (A17)
	2018	GAS	CDR2-L18 (A18)
	2019	GAS	CDR2-L19 (A19)
	2020	GAS	CDR2-L20 (A20)
	2021	LGS	CDR2-L21 (A21)
	2022	AAS	CDR2-L22 (A22)
	2023	GAS	CDR2-L23 (A23)
	2024	AAS	CDR2-L24 (A24)
	2025	GAS	CDR2-L25 (A25)
	2026	KVS	CDR2-L26 (A26)
	2027	GAS	CDR2-L27 (A27)
	2028	GAS	CDR2-L28 (A28)
	3001	QQYGTSPFT	CDR3-L1 (A1)
	3002	QQYGRSPFT	CDR3-L2 (A2)
	3003	QQYGSSPFT	CDR3-L3 (A3)
	3004	QQYGTSPFT	CDR3-L4 (A4)
	3005	QQYGTSPFT	CDR3-L5 (A5)
	3006	QQSYSTPFT	CDR3-L6 (A6)
	3007	QQYGSSPFT	CDR3-L7 (A7)
	3008	QQYGSSPWT	CDR3-L8 (A8)
	3009	QQSYSTPFT	CDR3-L9 (A9)
	3010	QQYGSSPFT	CDR3-L10 (A10)
	3011	QQLNSYPPT	CDR3-L11 (A11)
	3012	QQYGTSPWT	CDR3-L12 (A12)
	3013	QQYGSSPFT	CDR3-L13 (A13)
	3014	QQYGSSPWT	CDR3-L14 (A14)
	3015	QQYGSSPFT	CDR3-L15 (A15)
	3016	QNYNSAPWT	CDR3-L16 (A16)
	3017	LQHNSYPLT	CDR3-L17 (A17)

[0439]	3018	QQYGSSPWT	CDR3-L18 (A18)
	3019	QQYGSSMYT	CDR3-L19 (A19)
	3020	QQYGRSPFT	CDR3-L20 (A20)
	3021	MQTLQTPLT	CDR3-L21 (A21)
	3022	LQHNSYPLT	CDR3-L22 (A22)
	3023	QQYGPSPWT	CDR3-L23 (A23)
	3024	QQSYRTPFT	CDR3-L24 (A24)
	3025	QQGYNLPFT	CDR3-L25 (A25)
	3026	MQGTHWPIT	CDR3-L26 (A26)
	3027	QQYGRSPWT	CDR3-L27 (A27)
	3028	QQYGSSPWT	CDR3-L28 (A28)
	4001	GFTFSSFG	CDR1-H1 (A1)
	4002	GFTFSNYG	CDR1-H2 (A2)
	4003	GFTFSSYG	CDR1-H3 (A3)
	4004	GFTFSSYG	CDR1-H4 (A4)
	4005	GFTFSSYG	CDR1-H5 (A5)
	4006	GFTFSSYG	CDR1-H6 (A6)
	4007	GFTLSSFG	CDR1-H7 (A7)
	4008	GFTFSRYG	CDR1-H8 (A8)
	4009	GFTFSSHG	CDR1-H9 (A9)
	4010	GFTLSSYG	CDR1-H10 (A10)
	4011	GFTFSSYG	CDR1-H11 (A11)
	4012	GFTFSSYG	CDR1-H12 (A12)
	4013	GFTFSSYG	CDR1-H13 (A13)
	4014	GFTFSSYG	CDR1-H14 (A14)
	4015	GFTFRSYG	CDR1-H15 (A15)
	4016	GFTFSSYG	CDR1-H16 (A16)
	4017	GFTFSNYA	CDR1-H17 (A17)
	4018	GFTFSSYG	CDR1-H18 (A18)

[0440]	4019	GYTFTSYY	CDR1-H19 (A19)
	4020	GYTFTSYG	CDR1-H20 (A20)
	4021	GFTFSSYG	CDR1-H21 (A21)
	4022	GFTFSSYA	CDR1-H22 (A22)
	4023	GYTFTSYG	CDR1-H23 (A23)
	4024	GYTFTSYG	CDR1-H24 (A24)
	4025	GYTFTNYG	CDR1-H25 (A25)
	4026	DYTFTYYG	CDR1-H26 (A26)
	4027	GYTFTSYG	CDR1-H27 (A27)
	4028	GFTFSTYG	CDR1-H28 (A28)
	5001	IWYDGRNK	CDR2-H1 (A1)
	5002	IWYDGRNK	CDR2-H2 (A2)
	5003	NWYDGSNK	CDR2-H3 (A3)
	5004	IWYDGRNK	CDR2-H4 (A4)
	5005	IWYDGNNK	CDR2-H5 (A5)
	5006	IWYDGSYK	CDR2-H6 (A6)
	5007	IWYDGSNK	CDR2-H7 (A7)
	5008	IWYDGRNK	CDR2-H8 (A8)
	5009	IWYDGSNK	CDR2-H9 (A9)
	5010	IWYDGSNK	CDR2-H10 (A10)
	5011	IWYDVGNK	CDR2-H11 (A11)
	5012	IWYDGSNK	CDR2-H12 (A12)
	5013	IWYDGRNK	CDR2-H13 (A13)
	5014	IWYEGRNK	CDR2-H14 (A14)
	5015	IWYDGSNK	CDR2-H15 (A15)
	5016	IWYDGSNK	CDR2-H16 (A16)
	5017	ISGGGLST	CDR2-H17 (A17)
	5018	IWYDGSNK	CDR2-H18 (A18)
	5019	INPSVGST	CDR2-H19 (A19)

[0441]

5020	ISAYNGNT	CDR2-H20 (A20)
5021	IWYDGNNK	CDR2-H21 (A21)
5022	ISGSGGST	CDR2-H22 (A22)
5023	ISAYNGNT	CDR2-H23 (A23)
5024	ISAYNGNT	CDR2-H24 (A24)
5025	ISVYNGNT	CDR2-H25 (A25)
5026	ISAYNGNT	CDR2-H26 (A26)
5027	ISAYNGNT	CDR2-H27 (A27)
5028	TLYDGSNK	CDR2-H28 (A28)
6001	ARGEFFGEFFDY	CDR3-H1 (A1)
6002	ARGGDWGPYFDY	CDR3-H2 (A2)
6003	ARGGVWGPYFDY	CDR3-H3 (A3)
6004	SRSGSFGAFDI	CDR3-H4 (A4)
6005	ARGGILAAGIFDY	CDR3-H5 (A5)
6006	ARAPHYAILTGYYEDY	CDR3-H6 (A6)
6007	ARAHYFGAFDI	CDR3-H7 (A7)
6008	ARAGELGPFDY	CDR3-H8 (A8)
6009	ARGDILTGYGY	CDR3-H9 (A9)
6010	ARGGQLGPFDY	CDR3-H10 (A10)
6011	ARDYYGSGSPRHFDY	CDR3-H11 (A11)
6012	ARGGLMGAFDY	CDR3-H12 (A12)
6013	ARGGLLGPYFDY	CDR3-H13 (A13)
6014	ARAGDLGAFDI	CDR3-H14 (A14)
6015	ARNGLIGAFDI	CDR3-H15 (A15)
6016	ARGSLLGPFDY	CDR3-H16 (A16)
6017	AKDLLWLGF DY	CDR3-H17 (A17)
6018	ARGGHLGSFDY	CDR3-H18 (A18)
6019	AREVRVRGVIIIPFFDY	CDR3-H19 (A19)
6020	AKVSGYFDY	CDR3-H20 (A20)

[0442]	6021	ARMLRGAPYYGMDV	CDR3-H21 (A21)
	6022	AKLGIAWYFDV	CDR3-H22 (A22)
	6023	ARVTGRDAFDI	CDR3-H23 (A23)
	6024	ARVGPINLDY	CDR3-H24 (A24)
	6025	ARLGKGLFDY	CDR3-H25 (A25)
	6026	ARDYYDSSGYFDY	CDR3-H26 (A26)
	6027	GRWVRGVVEY	CDR3-H27 (A27)
	6028	ARASLTGSFDY	CDR3-H28 (A28)
	7001	MACLGQQRHKAQLNLAARTWPCTLLFFLLFIPVFCAMHVAQPAVVLASSR GIASFVCEYASPGKATEVRVTVLRQADSQVTCAATYMMGNELTFLDDSI CTGTSSGNQVNLTIQGLRAMDTGLYICKVELMYPPPYLGIGNGTQIYVIDPE PCPDSDFLLWILAAVSSGLFFYSFLLTAVSLSKMLKKRSPLTTGVYVKMPTE PECEKQFQPYFIPIN	人CTLA4

[0443] 表20提供了指定克隆的轻链、重链和CDR的序列标识符

抗体克隆号	轻链	重链	SEQ ID NO					
			CDR1 (轻链)	CDR2 (轻链)	CDR3 (轻链)	CDR1 (重链)	CDR2 (重链)	CDR3 (重链)
1	8000	849 6	8992	9488	9984	10480	10976	11472
2	8001	849 7	8993	9489	9985	10481	10977	11473
3	8002	849 8	8994	9490	9986	10482	10978	11474
4	8003	849 9	8995	9491	9987	10483	10979	11475
5	8004	850 0	8996	9492	9988	10484	10980	11476
6	8005	850 1	8997	9493	9989	10485	10981	11477
7	8006	850 2	8998	9494	9990	10486	10982	11478
8	8007	850 3	8999	9495	9991	10487	10983	11479
9	8008	850 4	9000	9496	9992	10488	10984	11480
10	8009	850 5	9001	9497	9993	10489	10985	11481
11	8010	850 6	9002	9498	9994	10490	10986	11482
12	8011	850 7	9003	9499	9995	10491	10987	11483
13	8012	850 8	9004	9500	9996	10492	10988	11484
14	8013	850 9	9005	9501	9997	10493	10989	11485

[0445]	15	8014	851 0	9006	9502	9998	10494	10990	11486
	16	8015	851 1	9007	9503	9999	10495	10991	11487
	17	8016	851 2	9008	9504	10000	10496	10992	11488
	18	8017	851 3	9009	9505	10001	10497	10993	11489
	19	8018	851 4	9010	9506	10002	10498	10994	11490
	20	8019	851 5	9011	9507	10003	10499	10995	11491
	21	8020	851 6	9012	9508	10004	10500	10996	11492
	22	8021	851 7	9013	9509	10005	10501	10997	11493
	23	8022	851 8	9014	9510	10006	10502	10998	11494
	24	8023	851 9	9015	9511	10007	10503	10999	11495
	25	8024	852 0	9016	9512	10008	10504	11000	11496
	26	8025	852 1	9017	9513	10009	10505	11001	11497
	27	8026	852 2	9018	9514	10010	10506	11002	11498
	28	8027	852 3	9019	9515	10011	10507	11003	11499
	29	8028	852 4	9020	9516	10012	10508	11004	11500
	30	8029	852 5	9021	9517	10013	10509	11005	11501
	31	8030	852 6	9022	9518	10014	10510	11006	11502
	32	8031	852 7	9023	9519	10015	10511	11007	11503
	33	8032	852 8	9024	9520	10016	10512	11008	11504
	34	8033	852 9	9025	9521	10017	10513	11009	11505
	35	8034	853 0	9026	9522	10018	10514	11010	11506
	36	8035	853 1	9027	9523	10019	10515	11011	11507
	37	8036	853 2	9028	9524	10020	10516	11012	11508
	38	8037	853 3	9029	9525	10021	10517	11013	11509
	39	8038	853 4	9030	9526	10022	10518	11014	11510
	40	8039	853 5	9031	9527	10023	10519	11015	11511
	41	8040	853 6	9032	9528	10024	10520	11016	11512
	42	8041	853 7	9033	9529	10025	10521	11017	11513
	43	8042	853 8	9034	9530	10026	10522	11018	11514
	44	8043	853	9035	9531	10027	10523	11019	11515

[0446]

		9						
45	8044	854 0	9036	9532	10028	10524	11020	11516
46	8045	854 1	9037	9533	10029	10525	11021	11517
47	8046	854 2	9038	9534	10030	10526	11022	11518
48	8047	854 3	9039	9535	10031	10527	11023	11519
49	8048	854 4	9040	9536	10032	10528	11024	11520
50	8049	854 5	9041	9537	10033	10529	11025	11521
51	8050	854 6	9042	9538	10034	10530	11026	11522
52	8051	854 7	9043	9539	10035	10531	11027	11523
53	8052	854 8	9044	9540	10036	10532	11028	11524
54	8053	854 9	9045	9541	10037	10533	11029	11525
55	8054	855 0	9046	9542	10038	10534	11030	11526
56	8055	855 1	9047	9543	10039	10535	11031	11527
57	8056	855 2	9048	9544	10040	10536	11032	11528
58	8057	855 3	9049	9545	10041	10537	11033	11529
59	8058	855 4	9050	9546	10042	10538	11034	11530
60	8059	855 5	9051	9547	10043	10539	11035	11531
61	8060	855 6	9052	9548	10044	10540	11036	11532
62	8061	855 7	9053	9549	10045	10541	11037	11533
63	8062	855 8	9054	9550	10046	10542	11038	11534
64	8063	855 9	9055	9551	10047	10543	11039	11535
65	8064	856 0	9056	9552	10048	10544	11040	11536
66	8065	856 1	9057	9553	10049	10545	11041	11537
67	8066	856 2	9058	9554	10050	10546	11042	11538
68	8067	856 3	9059	9555	10051	10547	11043	11539
69	8068	856 4	9060	9556	10052	10548	11044	11540
70	8069	856 5	9061	9557	10053	10549	11045	11541
71	8070	856 6	9062	9558	10054	10550	11046	11542
72	8071	856 7	9063	9559	10055	10551	11047	11543
73	8072	856 8	9064	9560	10056	10552	11048	11544

[0447]	74	8073	856 9	9065	9561	10057	10553	11049	11545
	75	8074	857 0	9066	9562	10058	10554	11050	11546
	76	8075	857 1	9067	9563	10059	10555	11051	11547
	77	8076	857 2	9068	9564	10060	10556	11052	11548
	78	8077	857 3	9069	9565	10061	10557	11053	11549
	79	8078	857 4	9070	9566	10062	10558	11054	11550
	80	8079	857 5	9071	9567	10063	10559	11055	11551
	81	8080	857 6	9072	9568	10064	10560	11056	11552
	82	8081	857 7	9073	9569	10065	10561	11057	11553
	83	8082	857 8	9074	9570	10066	10562	11058	11554
	84	8083	857 9	9075	9571	10067	10563	11059	11555
	85	8084	858 0	9076	9572	10068	10564	11060	11556
	86	8085	858 1	9077	9573	10069	10565	11061	11557
	87	8086	858 2	9078	9574	10070	10566	11062	11558
	88	8087	858 3	9079	9575	10071	10567	11063	11559
	89	8088	858 4	9080	9576	10072	10568	11064	11560
	90	8089	858 5	9081	9577	10073	10569	11065	11561
	91	8090	858 6	9082	9578	10074	10570	11066	11562
	92	8091	858 7	9083	9579	10075	10571	11067	11563
	93	8092	858 8	9084	9580	10076	10572	11068	11564
	94	8093	858 9	9085	9581	10077	10573	11069	11565
	95	8094	859 0	9086	9582	10078	10574	11070	11566
	96	8095	859 1	9087	9583	10079	10575	11071	11567
	97	8096	859 2	9088	9584	10080	10576	11072	11568
	98	8097	859 3	9089	9585	10081	10577	11073	11569
	99	8098	859 4	9090	9586	10082	10578	11074	11570
	100	8099	859 5	9091	9587	10083	10579	11075	11571
	101	8100	859 6	9092	9588	10084	10580	11076	11572
	102	8101	859 7	9093	9589	10085	10581	11077	11573
	103	8102	859	9094	9590	10086	10582	11078	11574

[0448]

		8						
104	8103	859 9	9095	9591	10087	10583	11079	11575
105	8104	860 0	9096	9592	10088	10584	11080	11576
106	8105	860 1	9097	9593	10089	10585	11081	11577
107	8106	860 2	9098	9594	10090	10586	11082	11578
108	8107	860 3	9099	9595	10091	10587	11083	11579
109	8108	860 4	9100	9596	10092	10588	11084	11580
110	8109	860 5	9101	9597	10093	10589	11085	11581
111	8110	860 6	9102	9598	10094	10590	11086	11582
112	8111	860 7	9103	9599	10095	10591	11087	11583
113	8112	860 8	9104	9600	10096	10592	11088	11584
114	8113	860 9	9105	9601	10097	10593	11089	11585
115	8114	861 0	9106	9602	10098	10594	11090	11586
116	8115	861 1	9107	9603	10099	10595	11091	11587
117	8116	861 2	9108	9604	10100	10596	11092	11588
118	8117	861 3	9109	9605	10101	10597	11093	11589
119	8118	861 4	9110	9606	10102	10598	11094	11590
120	8119	861 5	9111	9607	10103	10599	11095	11591
121	8120	861 6	9112	9608	10104	10600	11096	11592
122	8121	861 7	9113	9609	10105	10601	11097	11593
123	8122	861 8	9114	9610	10106	10602	11098	11594
124	8123	861 9	9115	9611	10107	10603	11099	11595
125	8124	862 0	9116	9612	10108	10604	11100	11596
126	8125	862 1	9117	9613	10109	10605	11101	11597
127	8126	862 2	9118	9614	10110	10606	11102	11598
128	8127	862 3	9119	9615	10111	10607	11103	11599
129	8128	862 4	9120	9616	10112	10608	11104	11600
130	8129	862 5	9121	9617	10113	10609	11105	11601
131	8130	862 6	9122	9618	10114	10610	11106	11602
132	8131	862 7	9123	9619	10115	10611	11107	11603

[0449]	133	8132	862 8	9124	9620	10116	10612	11108	11604
	134	8133	862 9	9125	9621	10117	10613	11109	11605
	135	8134	863 0	9126	9622	10118	10614	11110	11606
	136	8135	863 1	9127	9623	10119	10615	11111	11607
	137	8136	863 2	9128	9624	10120	10616	11112	11608
	138	8137	863 3	9129	9625	10121	10617	11113	11609
	139	8138	863 4	9130	9626	10122	10618	11114	11610
	140	8139	863 5	9131	9627	10123	10619	11115	11611
	141	8140	863 6	9132	9628	10124	10620	11116	11612
	142	8141	863 7	9133	9629	10125	10621	11117	11613
	143	8142	863 8	9134	9630	10126	10622	11118	11614
	144	8143	863 9	9135	9631	10127	10623	11119	11615
	145	8144	864 0	9136	9632	10128	10624	11120	11616
	146	8145	864 1	9137	9633	10129	10625	11121	11617
	147	8146	864 2	9138	9634	10130	10626	11122	11618
	148	8147	864 3	9139	9635	10131	10627	11123	11619
	149	8148	864 4	9140	9636	10132	10628	11124	11620
	150	8149	864 5	9141	9637	10133	10629	11125	11621
	151	8150	864 6	9142	9638	10134	10630	11126	11622
	152	8151	864 7	9143	9639	10135	10631	11127	11623
	153	8152	864 8	9144	9640	10136	10632	11128	11624
	154	8153	864 9	9145	9641	10137	10633	11129	11625
	155	8154	865 0	9146	9642	10138	10634	11130	11626
	156	8155	865 1	9147	9643	10139	10635	11131	11627
	157	8156	865 2	9148	9644	10140	10636	11132	11628
	158	8157	865 3	9149	9645	10141	10637	11133	11629
	159	8158	865 4	9150	9646	10142	10638	11134	11630
	160	8159	865 5	9151	9647	10143	10639	11135	11631
	161	8160	865 6	9152	9648	10144	10640	11136	11632
	162	8161	865	9153	9649	10145	10641	11137	11633

[0450]

		7						
163	8162	865 8	9154	9650	10146	10642	11138	11634
164	8163	865 9	9155	9651	10147	10643	11139	11635
165	8164	866 0	9156	9652	10148	10644	11140	11636
166	8165	866 1	9157	9653	10149	10645	11141	11637
167	8166	866 2	9158	9654	10150	10646	11142	11638
168	8167	866 3	9159	9655	10151	10647	11143	11639
169	8168	866 4	9160	9656	10152	10648	11144	11640
170	8169	866 5	9161	9657	10153	10649	11145	11641
171	8170	866 6	9162	9658	10154	10650	11146	11642
172	8171	866 7	9163	9659	10155	10651	11147	11643
173	8172	866 8	9164	9660	10156	10652	11148	11644
174	8173	866 9	9165	9661	10157	10653	11149	11645
175	8174	867 0	9166	9662	10158	10654	11150	11646
176	8175	867 1	9167	9663	10159	10655	11151	11647
177	8176	867 2	9168	9664	10160	10656	11152	11648
178	8177	867 3	9169	9665	10161	10657	11153	11649
179	8178	867 4	9170	9666	10162	10658	11154	11650
180	8179	867 5	9171	9667	10163	10659	11155	11651
181	8180	867 6	9172	9668	10164	10660	11156	11652
182	8181	867 7	9173	9669	10165	10661	11157	11653
183	8182	867 8	9174	9670	10166	10662	11158	11654
184	8183	867 9	9175	9671	10167	10663	11159	11655
185	8184	868 0	9176	9672	10168	10664	11160	11656
186	8185	868 1	9177	9673	10169	10665	11161	11657
187	8186	868 2	9178	9674	10170	10666	11162	11658
188	8187	868 3	9179	9675	10171	10667	11163	11659
189	8188	868 4	9180	9676	10172	10668	11164	11660
190	8189	868 5	9181	9677	10173	10669	11165	11661
191	8190	868 6	9182	9678	10174	10670	11166	11662

[0451]	192	8191	868 7	9183	9679	10175	10671	11167	11663
	193	8192	868 8	9184	9680	10176	10672	11168	11664
	194	8193	868 9	9185	9681	10177	10673	11169	11665
	195	8194	869 0	9186	9682	10178	10674	11170	11666
	196	8195	869 1	9187	9683	10179	10675	11171	11667
	197	8196	869 2	9188	9684	10180	10676	11172	11668
	198	8197	869 3	9189	9685	10181	10677	11173	11669
	199	8198	869 4	9190	9686	10182	10678	11174	11670
	200	8199	869 5	9191	9687	10183	10679	11175	11671
	201	8200	869 6	9192	9688	10184	10680	11176	11672
	202	8201	869 7	9193	9689	10185	10681	11177	11673
	203	8202	869 8	9194	9690	10186	10682	11178	11674
	204	8203	869 9	9195	9691	10187	10683	11179	11675
	205	8204	870 0	9196	9692	10188	10684	11180	11676
	206	8205	870 1	9197	9693	10189	10685	11181	11677
	207	8206	870 2	9198	9694	10190	10686	11182	11678
	208	8207	870 3	9199	9695	10191	10687	11183	11679
	209	8208	870 4	9200	9696	10192	10688	11184	11680
	210	8209	870 5	9201	9697	10193	10689	11185	11681
	211	8210	870 6	9202	9698	10194	10690	11186	11682
	212	8211	870 7	9203	9699	10195	10691	11187	11683
	213	8212	870 8	9204	9700	10196	10692	11188	11684
	214	8213	870 9	9205	9701	10197	10693	11189	11685
	215	8214	871 0	9206	9702	10198	10694	11190	11686
	216	8215	871 1	9207	9703	10199	10695	11191	11687
	217	8216	871 2	9208	9704	10200	10696	11192	11688
	218	8217	871 3	9209	9705	10201	10697	11193	11689
	219	8218	871 4	9210	9706	10202	10698	11194	11690
	220	8219	871 5	9211	9707	10203	10699	11195	11691
	221	8220	871	9212	9708	10204	10700	11196	11692

[0452]

		6						
222	8221	871 7	9213	9709	10205	10701	11197	11693
223	8222	871 8	9214	9710	10206	10702	11198	11694
224	8223	871 9	9215	9711	10207	10703	11199	11695
225	8224	872 0	9216	9712	10208	10704	11200	11696
226	8225	872 1	9217	9713	10209	10705	11201	11697
227	8226	872 2	9218	9714	10210	10706	11202	11698
228	8227	872 3	9219	9715	10211	10707	11203	11699
229	8228	872 4	9220	9716	10212	10708	11204	11700
230	8229	872 5	9221	9717	10213	10709	11205	11701
231	8230	872 6	9222	9718	10214	10710	11206	11702
232	8231	872 7	9223	9719	10215	10711	11207	11703
233	8232	872 8	9224	9720	10216	10712	11208	11704
234	8233	872 9	9225	9721	10217	10713	11209	11705
235	8234	873 0	9226	9722	10218	10714	11210	11706
236	8235	873 1	9227	9723	10219	10715	11211	11707
237	8236	873 2	9228	9724	10220	10716	11212	11708
238	8237	873 3	9229	9725	10221	10717	11213	11709
239	8238	873 4	9230	9726	10222	10718	11214	11710
240	8239	873 5	9231	9727	10223	10719	11215	11711
241	8240	873 6	9232	9728	10224	10720	11216	11712
242	8241	873 7	9233	9729	10225	10721	11217	11713
243	8242	873 8	9234	9730	10226	10722	11218	11714
244	8243	873 9	9235	9731	10227	10723	11219	11715
245	8244	874 0	9236	9732	10228	10724	11220	11716
246	8245	874 1	9237	9733	10229	10725	11221	11717
247	8246	874 2	9238	9734	10230	10726	11222	11718
248	8247	874 3	9239	9735	10231	10727	11223	11719
249	8248	874 4	9240	9736	10232	10728	11224	11720
250	8249	874 5	9241	9737	10233	10729	11225	11721

[0453]	251	8250	874 6	9242	9738	10234	10730	11226	11722
	252	8251	874 7	9243	9739	10235	10731	11227	11723
	253	8252	874 8	9244	9740	10236	10732	11228	11724
	254	8253	874 9	9245	9741	10237	10733	11229	11725
	255	8254	875 0	9246	9742	10238	10734	11230	11726
	256	8255	875 1	9247	9743	10239	10735	11231	11727
	257	8256	875 2	9248	9744	10240	10736	11232	11728
	258	8257	875 3	9249	9745	10241	10737	11233	11729
	259	8258	875 4	9250	9746	10242	10738	11234	11730
	260	8259	875 5	9251	9747	10243	10739	11235	11731
	261	8260	875 6	9252	9748	10244	10740	11236	11732
	262	8261	875 7	9253	9749	10245	10741	11237	11733
	263	8262	875 8	9254	9750	10246	10742	11238	11734
	264	8263	875 9	9255	9751	10247	10743	11239	11735
	265	8264	876 0	9256	9752	10248	10744	11240	11736
	266	8265	876 1	9257	9753	10249	10745	11241	11737
	267	8266	876 2	9258	9754	10250	10746	11242	11738
	268	8267	876 3	9259	9755	10251	10747	11243	11739
	269	8268	876 4	9260	9756	10252	10748	11244	11740
	270	8269	876 5	9261	9757	10253	10749	11245	11741
	271	8270	876 6	9262	9758	10254	10750	11246	11742
	272	8271	876 7	9263	9759	10255	10751	11247	11743
	273	8272	876 8	9264	9760	10256	10752	11248	11744
	274	8273	876 9	9265	9761	10257	10753	11249	11745
	275	8274	877 0	9266	9762	10258	10754	11250	11746
	276	8275	877 1	9267	9763	10259	10755	11251	11747
	277	8276	877 2	9268	9764	10260	10756	11252	11748
	278	8277	877 3	9269	9765	10261	10757	11253	11749
	279	8278	877 4	9270	9766	10262	10758	11254	11750
	280	8279	877	9271	9767	10263	10759	11255	11751

[0454]

		5						
281	8280	877 6	9272	9768	10264	10760	11256	11752
282	8281	877 7	9273	9769	10265	10761	11257	11753
283	8282	877 8	9274	9770	10266	10762	11258	11754
284	8283	877 9	9275	9771	10267	10763	11259	11755
285	8284	878 0	9276	9772	10268	10764	11260	11756
286	8285	878 1	9277	9773	10269	10765	11261	11757
287	8286	878 2	9278	9774	10270	10766	11262	11758
288	8287	878 3	9279	9775	10271	10767	11263	11759
289	8288	878 4	9280	9776	10272	10768	11264	11760
290	8289	878 5	9281	9777	10273	10769	11265	11761
291	8290	878 6	9282	9778	10274	10770	11266	11762
292	8291	878 7	9283	9779	10275	10771	11267	11763
293	8292	878 8	9284	9780	10276	10772	11268	11764
294	8293	878 9	9285	9781	10277	10773	11269	11765
295	8294	879 0	9286	9782	10278	10774	11270	11766
296	8295	879 1	9287	9783	10279	10775	11271	11767
297	8296	879 2	9288	9784	10280	10776	11272	11768
298	8297	879 3	9289	9785	10281	10777	11273	11769
299	8298	879 4	9290	9786	10282	10778	11274	11770
300	8299	879 5	9291	9787	10283	10779	11275	11771
301	8300	879 6	9292	9788	10284	10780	11276	11772
302	8301	879 7	9293	9789	10285	10781	11277	11773
303	8302	879 8	9294	9790	10286	10782	11278	11774
304	8303	879 9	9295	9791	10287	10783	11279	11775
305	8304	880 0	9296	9792	10288	10784	11280	11776
306	8305	880 1	9297	9793	10289	10785	11281	11777
307	8306	880 2	9298	9794	10290	10786	11282	11778
308	8307	880 3	9299	9795	10291	10787	11283	11779
309	8308	880 4	9300	9796	10292	10788	11284	11780

[0455]

310	8309	880 5	9301	9797	10293	10789	11285	11781
311	8310	880 6	9302	9798	10294	10790	11286	11782
312	8311	880 7	9303	9799	10295	10791	11287	11783
313	8312	880 8	9304	9800	10296	10792	11288	11784
314	8313	880 9	9305	9801	10297	10793	11289	11785
315	8314	881 0	9306	9802	10298	10794	11290	11786
316	8315	881 1	9307	9803	10299	10795	11291	11787
317	8316	881 2	9308	9804	10300	10796	11292	11788
318	8317	881 3	9309	9805	10301	10797	11293	11789
319	8318	881 4	9310	9806	10302	10798	11294	11790
320	8319	881 5	9311	9807	10303	10799	11295	11791
321	8320	881 6	9312	9808	10304	10800	11296	11792
322	8321	881 7	9313	9809	10305	10801	11297	11793
323	8322	881 8	9314	9810	10306	10802	11298	11794
324	8323	881 9	9315	9811	10307	10803	11299	11795
325	8324	882 0	9316	9812	10308	10804	11300	11796
326	8325	882 1	9317	9813	10309	10805	11301	11797
327	8326	882 2	9318	9814	10310	10806	11302	11798
328	8327	882 3	9319	9815	10311	10807	11303	11799
329	8328	882 4	9320	9816	10312	10808	11304	11800
330	8329	882 5	9321	9817	10313	10809	11305	11801
331	8330	882 6	9322	9818	10314	10810	11306	11802
332	8331	882 7	9323	9819	10315	10811	11307	11803
333	8332	882 8	9324	9820	10316	10812	11308	11804
334	8333	882 9	9325	9821	10317	10813	11309	11805
335	8334	883 0	9326	9822	10318	10814	11310	11806
336	8335	883 1	9327	9823	10319	10815	11311	11807
337	8336	883 2	9328	9824	10320	10816	11312	11808
338	8337	883 3	9329	9825	10321	10817	11313	11809
339	8338	883	9330	9826	10322	10818	11314	11810

[0456]

		4						
340	8339	883 5	9331	9827	10323	10819	11315	11811
341	8340	883 6	9332	9828	10324	10820	11316	11812
342	8341	883 7	9333	9829	10325	10821	11317	11813
343	8342	883 8	9334	9830	10326	10822	11318	11814
344	8343	883 9	9335	9831	10327	10823	11319	11815
345	8344	884 0	9336	9832	10328	10824	11320	11816
346	8345	884 1	9337	9833	10329	10825	11321	11817
347	8346	884 2	9338	9834	10330	10826	11322	11818
348	8347	884 3	9339	9835	10331	10827	11323	11819
349	8348	884 4	9340	9836	10332	10828	11324	11820
350	8349	884 5	9341	9837	10333	10829	11325	11821
351	8350	884 6	9342	9838	10334	10830	11326	11822
352	8351	884 7	9343	9839	10335	10831	11327	11823
353	8352	884 8	9344	9840	10336	10832	11328	11824
354	8353	884 9	9345	9841	10337	10833	11329	11825
355	8354	885 0	9346	9842	10338	10834	11330	11826
356	8355	885 1	9347	9843	10339	10835	11331	11827
357	8356	885 2	9348	9844	10340	10836	11332	11828
358	8357	885 3	9349	9845	10341	10837	11333	11829
359	8358	885 4	9350	9846	10342	10838	11334	11830
360	8359	885 5	9351	9847	10343	10839	11335	11831
361	8360	885 6	9352	9848	10344	10840	11336	11832
362	8361	885 7	9353	9849	10345	10841	11337	11833
363	8362	885 8	9354	9850	10346	10842	11338	11834
364	8363	885 9	9355	9851	10347	10843	11339	11835
365	8364	886 0	9356	9852	10348	10844	11340	11836
366	8365	886 1	9357	9853	10349	10845	11341	11837
367	8366	886 2	9358	9854	10350	10846	11342	11838
368	8367	886 3	9359	9855	10351	10847	11343	11839

[0457]	369	8368	886 4	9360	9856	10352	10848	11344	11840
	370	8369	886 5	9361	9857	10353	10849	11345	11841
	371	8370	886 6	9362	9858	10354	10850	11346	11842
	372	8371	886 7	9363	9859	10355	10851	11347	11843
	373	8372	886 8	9364	9860	10356	10852	11348	11844
	374	8373	886 9	9365	9861	10357	10853	11349	11845
	375	8374	887 0	9366	9862	10358	10854	11350	11846
	376	8375	887 1	9367	9863	10359	10855	11351	11847
	377	8376	887 2	9368	9864	10360	10856	11352	11848
	378	8377	887 3	9369	9865	10361	10857	11353	11849
	379	8378	887 4	9370	9866	10362	10858	11354	11850
	380	8379	887 5	9371	9867	10363	10859	11355	11851
	381	8380	887 6	9372	9868	10364	10860	11356	11852
	382	8381	887 7	9373	9869	10365	10861	11357	11853
	383	8382	887 8	9374	9870	10366	10862	11358	11854
	384	8383	887 9	9375	9871	10367	10863	11359	11855
	385	8384	888 0	9376	9872	10368	10864	11360	11856
	386	8385	888 1	9377	9873	10369	10865	11361	11857
	387	8386	888 2	9378	9874	10370	10866	11362	11858
	388	8387	888 3	9379	9875	10371	10867	11363	11859
	389	8388	888 4	9380	9876	10372	10868	11364	11860
	390	8389	888 5	9381	9877	10373	10869	11365	11861
	391	8390	888 6	9382	9878	10374	10870	11366	11862
	392	8391	888 7	9383	9879	10375	10871	11367	11863
	393	8392	888 8	9384	9880	10376	10872	11368	11864
	394	8393	888 9	9385	9881	10377	10873	11369	11865
	395	8394	889 0	9386	9882	10378	10874	11370	11866
	396	8395	889 1	9387	9883	10379	10875	11371	11867
	397	8396	889 2	9388	9884	10380	10876	11372	11868
	398	8397	889	9389	9885	10381	10877	11373	11869

[0458]

		3						
399	8398	889 4	9390	9886	10382	10878	11374	11870
400	8399	889 5	9391	9887	10383	10879	11375	11871
401	8400	889 6	9392	9888	10384	10880	11376	11872
402	8401	889 7	9393	9889	10385	10881	11377	11873
403	8402	889 8	9394	9890	10386	10882	11378	11874
404	8403	889 9	9395	9891	10387	10883	11379	11875
405	8404	890 0	9396	9892	10388	10884	11380	11876
406	8405	890 1	9397	9893	10389	10885	11381	11877
407	8406	890 2	9398	9894	10390	10886	11382	11878
408	8407	890 3	9399	9895	10391	10887	11383	11879
409	8408	890 4	9400	9896	10392	10888	11384	11880
410	8409	890 5	9401	9897	10393	10889	11385	11881
411	8410	890 6	9402	9898	10394	10890	11386	11882
412	8411	890 7	9403	9899	10395	10891	11387	11883
413	8412	890 8	9404	9900	10396	10892	11388	11884
414	8413	890 9	9405	9901	10397	10893	11389	11885
415	8414	891 0	9406	9902	10398	10894	11390	11886
416	8415	891 1	9407	9903	10399	10895	11391	11887
417	8416	891 2	9408	9904	10400	10896	11392	11888
418	8417	891 3	9409	9905	10401	10897	11393	11889
419	8418	891 4	9410	9906	10402	10898	11394	11890
420	8419	891 5	9411	9907	10403	10899	11395	11891
421	8420	891 6	9412	9908	10404	10900	11396	11892
422	8421	891 7	9413	9909	10405	10901	11397	11893
423	8422	891 8	9414	9910	10406	10902	11398	11894
424	8423	891 9	9415	9911	10407	10903	11399	11895
425	8424	892 0	9416	9912	10408	10904	11400	11896
426	8425	892 1	9417	9913	10409	10905	11401	11897
427	8426	892 2	9418	9914	10410	10906	11402	11898

[0459]	428	8427	892 3	9419	9915	10411	10907	11403	11899
	429	8428	892 4	9420	9916	10412	10908	11404	11900
	430	8429	892 5	9421	9917	10413	10909	11405	11901
	431	8430	892 6	9422	9918	10414	10910	11406	11902
	432	8431	892 7	9423	9919	10415	10911	11407	11903
	433	8432	892 8	9424	9920	10416	10912	11408	11904
	434	8433	892 9	9425	9921	10417	10913	11409	11905
	435	8434	893 0	9426	9922	10418	10914	11410	11906
	436	8435	893 1	9427	9923	10419	10915	11411	11907
	437	8436	893 2	9428	9924	10420	10916	11412	11908
	438	8437	893 3	9429	9925	10421	10917	11413	11909
	439	8438	893 4	9430	9926	10422	10918	11414	11910
	440	8439	893 5	9431	9927	10423	10919	11415	11911
	441	8440	893 6	9432	9928	10424	10920	11416	11912
	442	8441	893 7	9433	9929	10425	10921	11417	11913
	443	8442	893 8	9434	9930	10426	10922	11418	11914
	444	8443	893 9	9435	9931	10427	10923	11419	11915
	445	8444	894 0	9436	9932	10428	10924	11420	11916
	446	8445	894 1	9437	9933	10429	10925	11421	11917
	447	8446	894 2	9438	9934	10430	10926	11422	11918
	448	8447	894 3	9439	9935	10431	10927	11423	11919
	449	8448	894 4	9440	9936	10432	10928	11424	11920
	450	8449	894 5	9441	9937	10433	10929	11425	11921
	451	8450	894 6	9442	9938	10434	10930	11426	11922
	452	8451	894 7	9443	9939	10435	10931	11427	11923
	453	8452	894 8	9444	9940	10436	10932	11428	11924
	454	8453	894 9	9445	9941	10437	10933	11429	11925
	455	8454	895 0	9446	9942	10438	10934	11430	11926
	456	8455	895 1	9447	9943	10439	10935	11431	11927
	457	8456	895	9448	9944	10440	10936	11432	11928

		2						
458	8457	895 3	9449	9945	10441	10937	11433	11929
459	8458	895 4	9450	9946	10442	10938	11434	11930
460	8459	895 5	9451	9947	10443	10939	11435	11931
461	8460	895 6	9452	9948	10444	10940	11436	11932
462	8461	895 7	9453	9949	10445	10941	11437	11933
463	8462	895 8	9454	9950	10446	10942	11438	11934
464	8463	895 9	9455	9951	10447	10943	11439	11935
465	8464	896 0	9456	9952	10448	10944	11440	11936
466	8465	896 1	9457	9953	10449	10945	11441	11937
467	8466	896 2	9458	9954	10450	10946	11442	11938
468	8467	896 3	9459	9955	10451	10947	11443	11939
469	8468	896 4	9460	9956	10452	10948	11444	11940
470	8469	896 5	9461	9957	10453	10949	11445	11941
471	8470	896 6	9462	9958	10454	10950	11446	11942
472	8471	896 7	9463	9959	10455	10951	11447	11943
473	8472	896 8	9464	9960	10456	10952	11448	11944
474	8473	896 9	9465	9961	10457	10953	11449	11945
475	8474	897 0	9466	9962	10458	10954	11450	11946
476	8475	897 1	9467	9963	10459	10955	11451	11947
477	8476	897 2	9468	9964	10460	10956	11452	11948
478	8477	897 3	9469	9965	10461	10957	11453	11949
479	8478	897 4	9470	9966	10462	10958	11454	11950
480	8479	897 5	9471	9967	10463	10959	11455	11951
481	8480	897 6	9472	9968	10464	10960	11456	11952
482	8481	897 7	9473	9969	10465	10961	11457	11953
483	8482	897 8	9474	9970	10466	10962	11458	11954
484	8483	897 9	9475	9971	10467	10963	11459	11955
485	8484	898 0	9476	9972	10468	10964	11460	11956
486	8485	898 1	9477	9973	10469	10965	11461	11957

[0461]

487	8486	898 2	9478	9974	10470	10966	11462	11958
488	8487	898 3	9479	9975	10471	10967	11463	11959
489	8488	898 4	9480	9976	10472	10968	11464	11960
490	8489	898 5	9481	9977	10473	10969	11465	11961
491	8490	898 6	9482	9978	10474	10970	11466	11962
492	8491	898 7	9483	9979	10475	10971	11467	11963
493	8492	898 8	9484	9980	10476	10972	11468	11964
494	8493	898 9	9485	9981	10477	10973	11469	11965
495	8494	899 0	9486	9982	10478	10974	11470	11966
496	8495	899 1	9487	9983	10479	10975	11471	11967

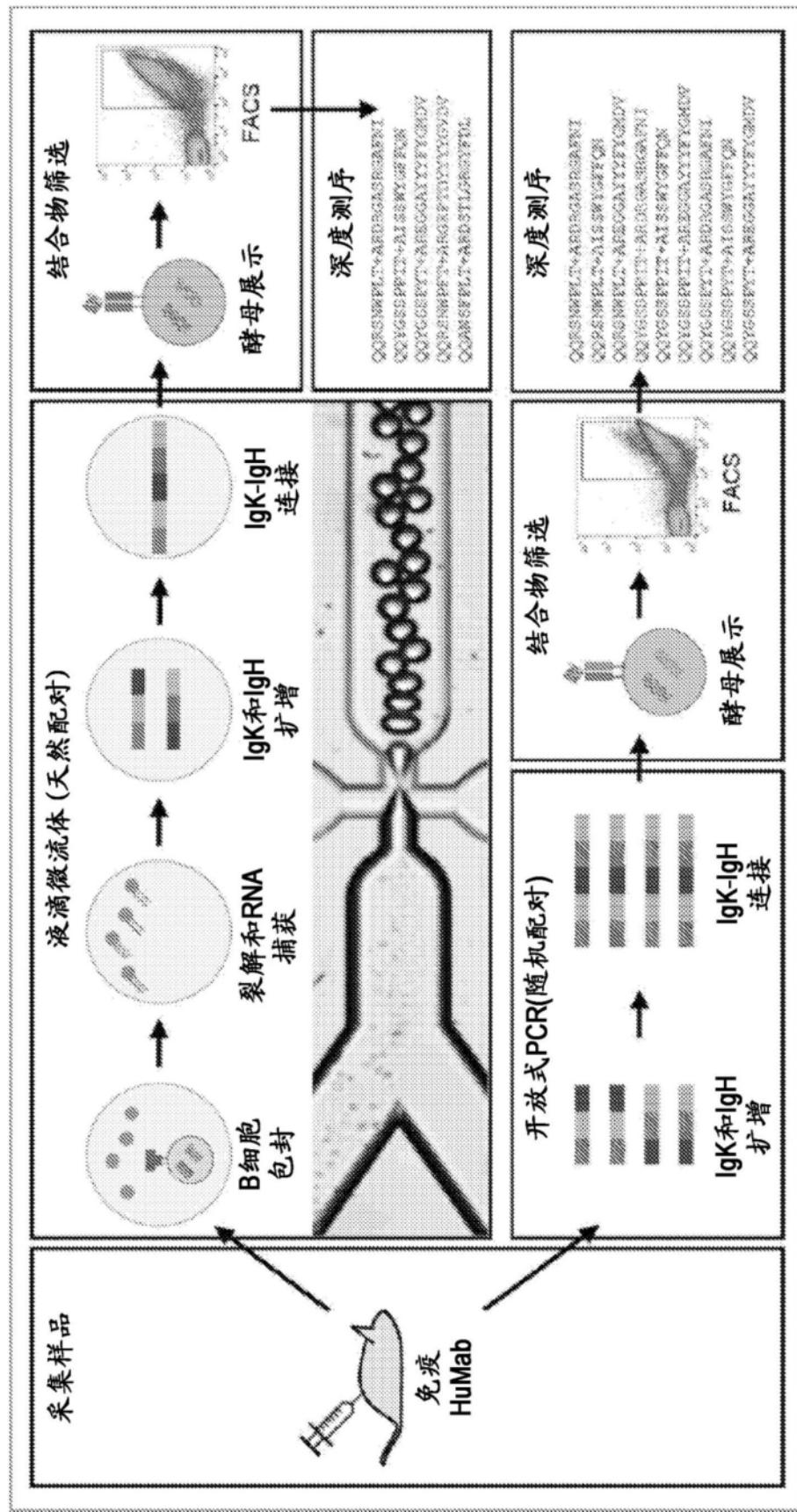


图1

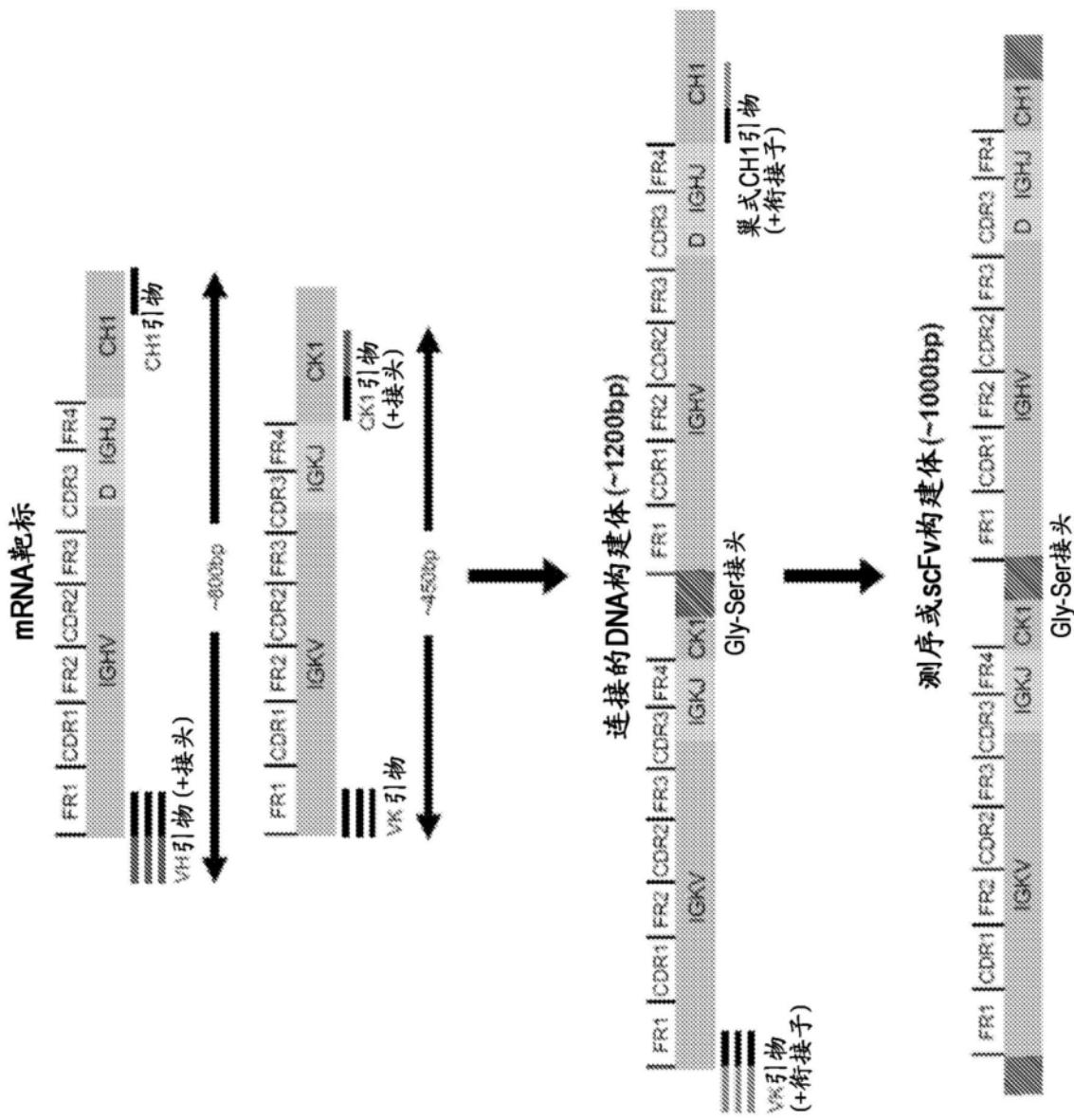


图2

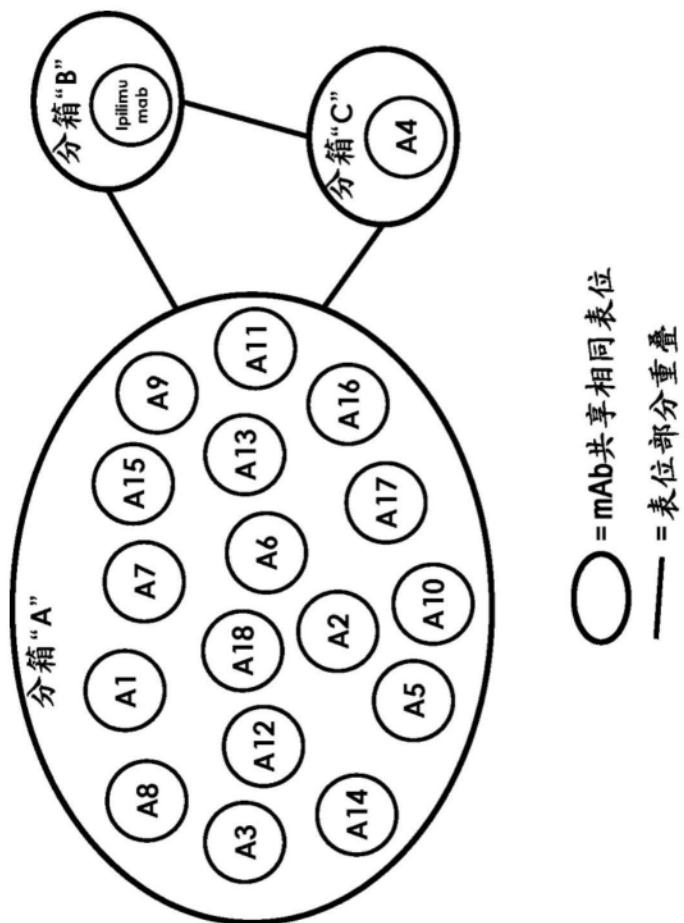


图3

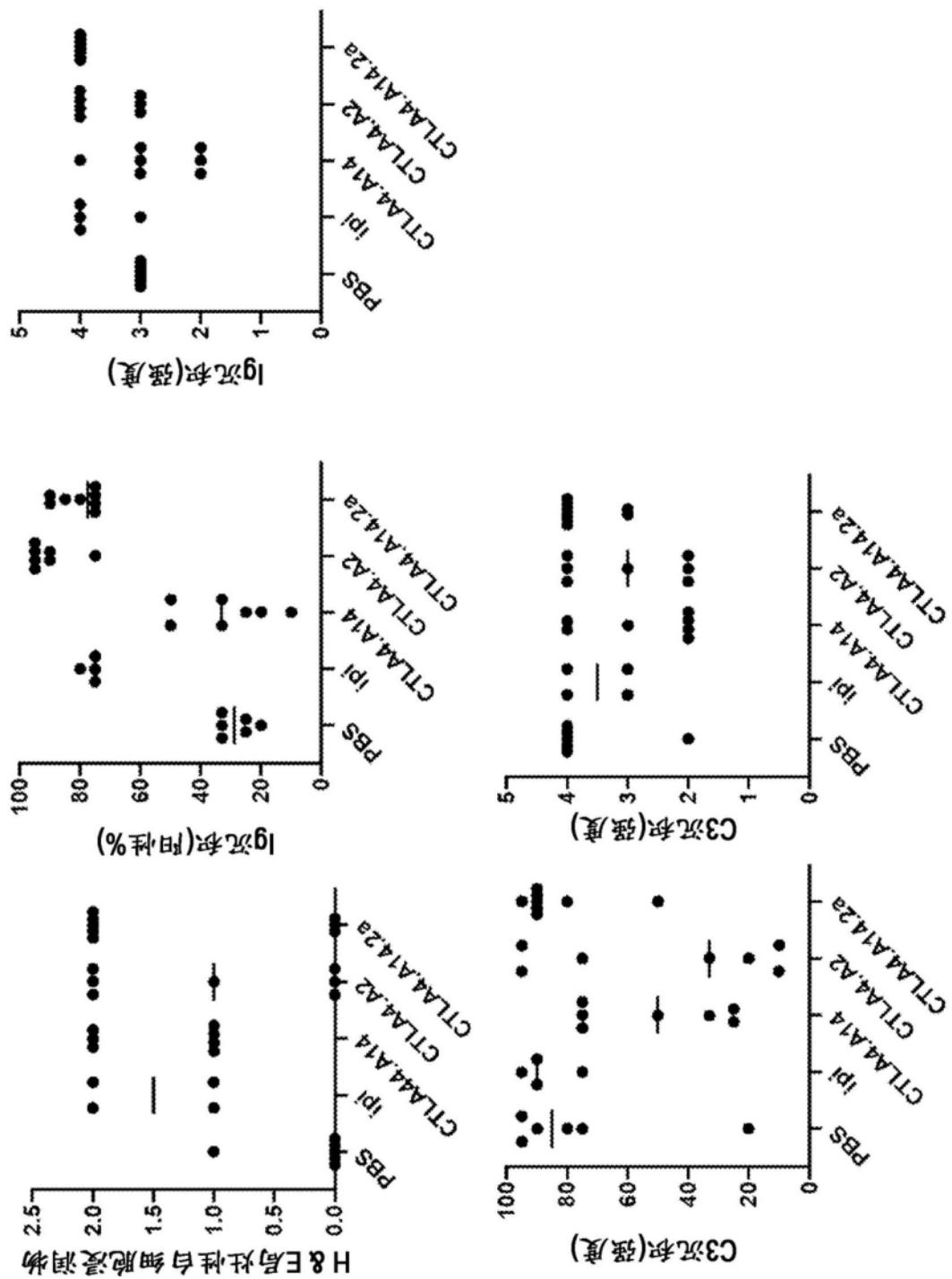


图4

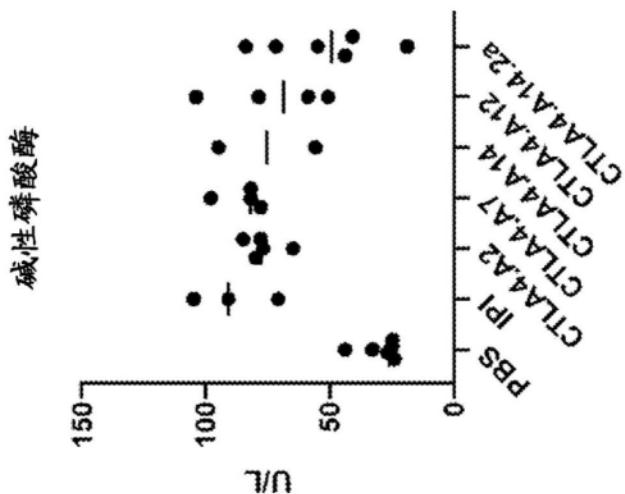


图5

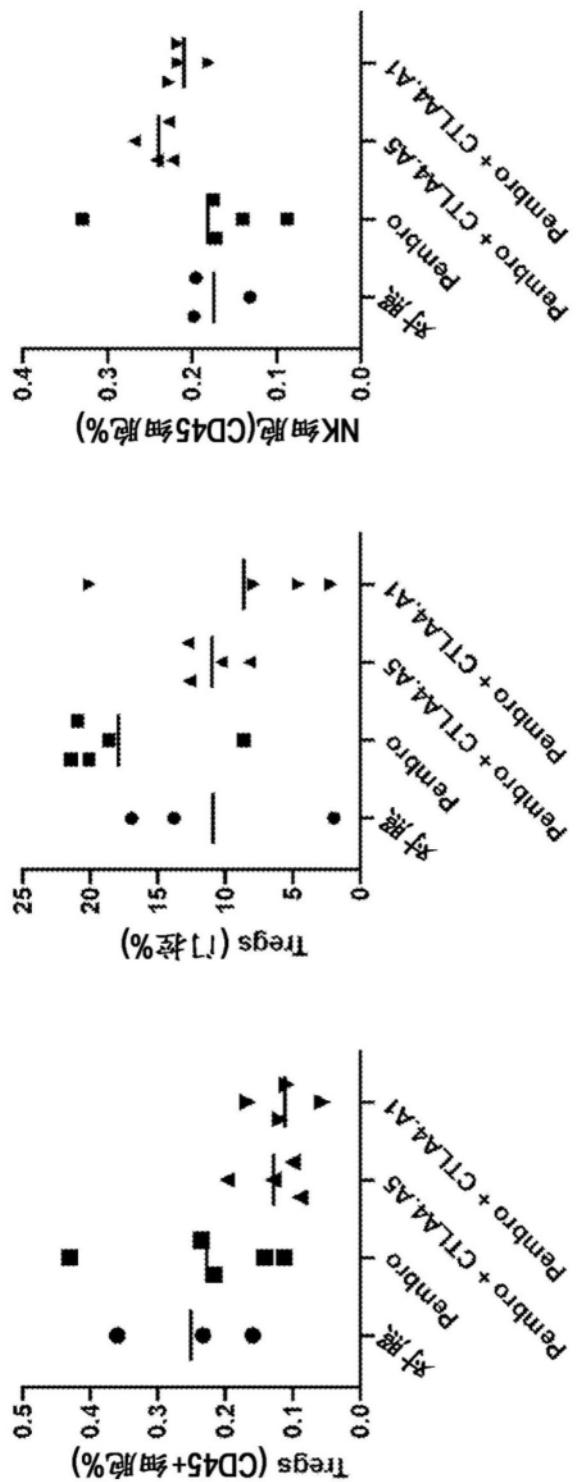


图6

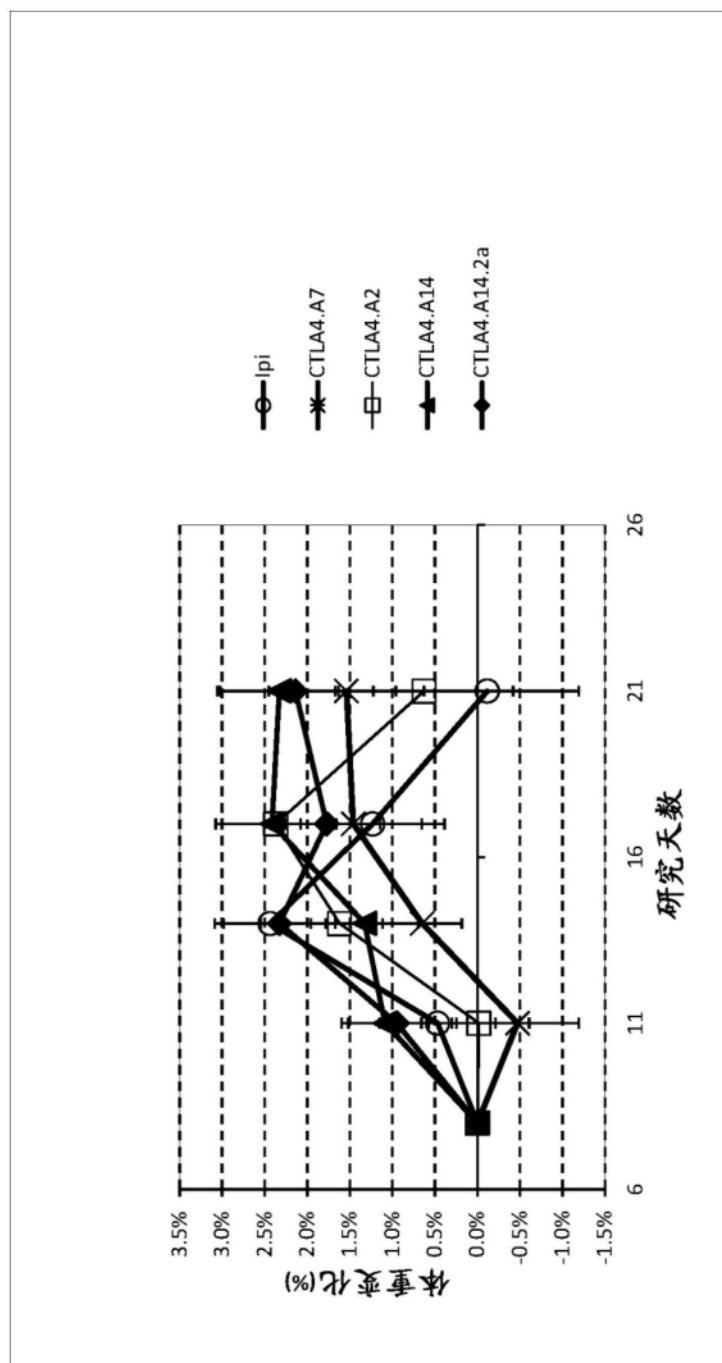


图7

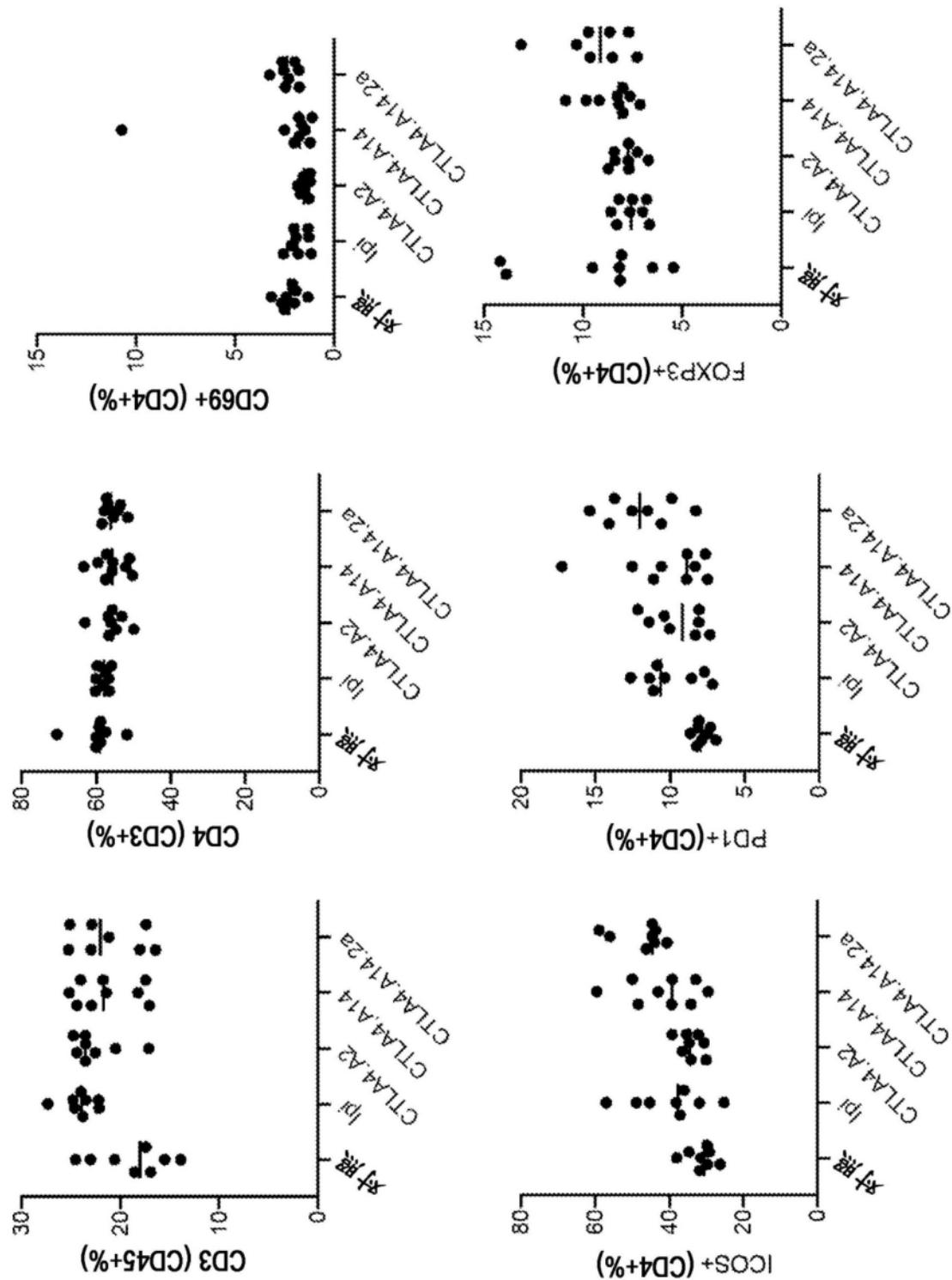


图8

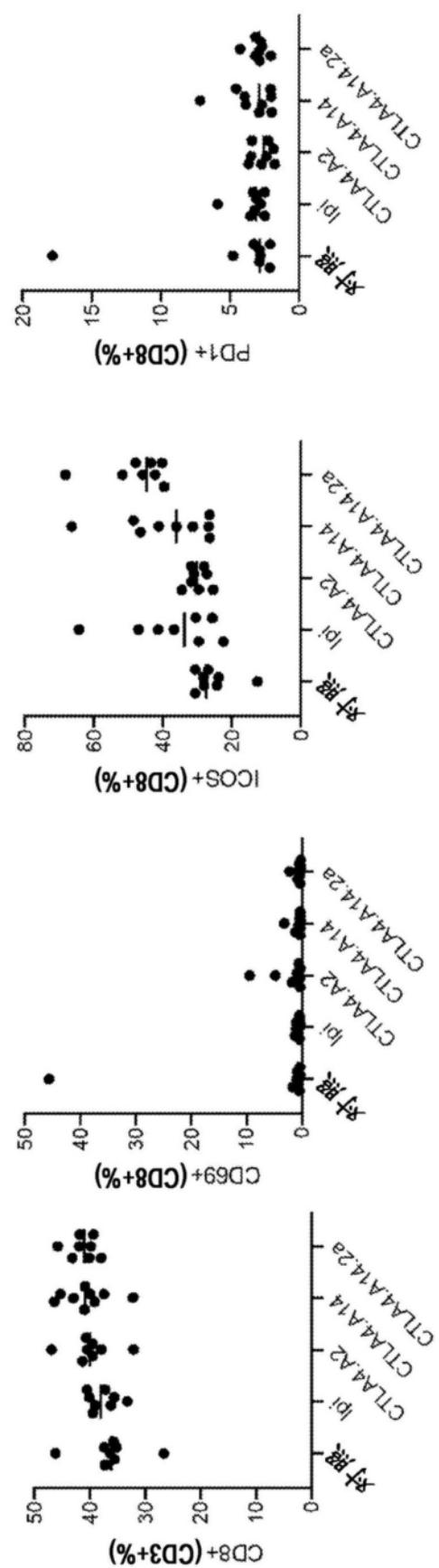


图9

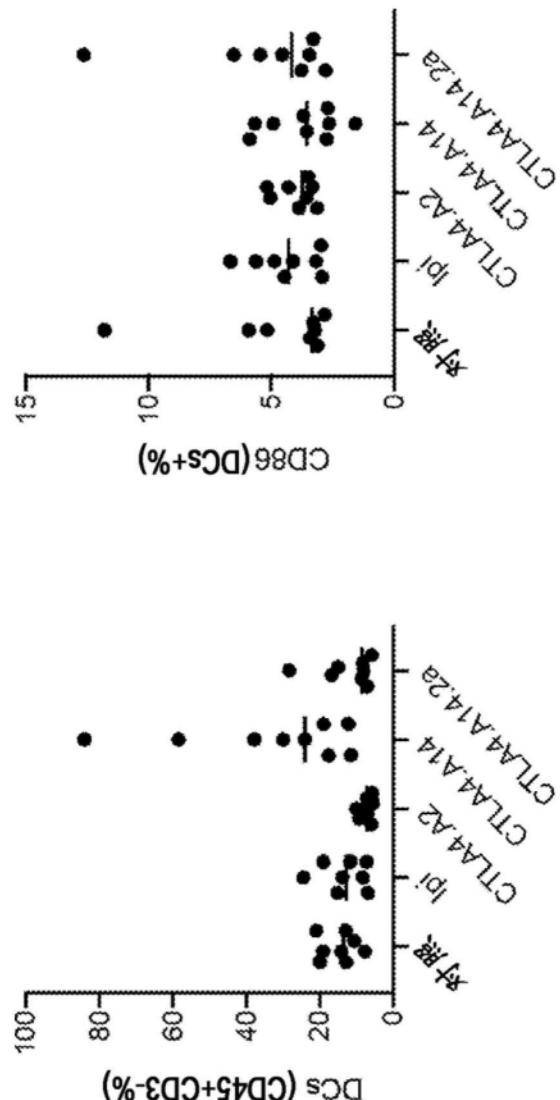


图10

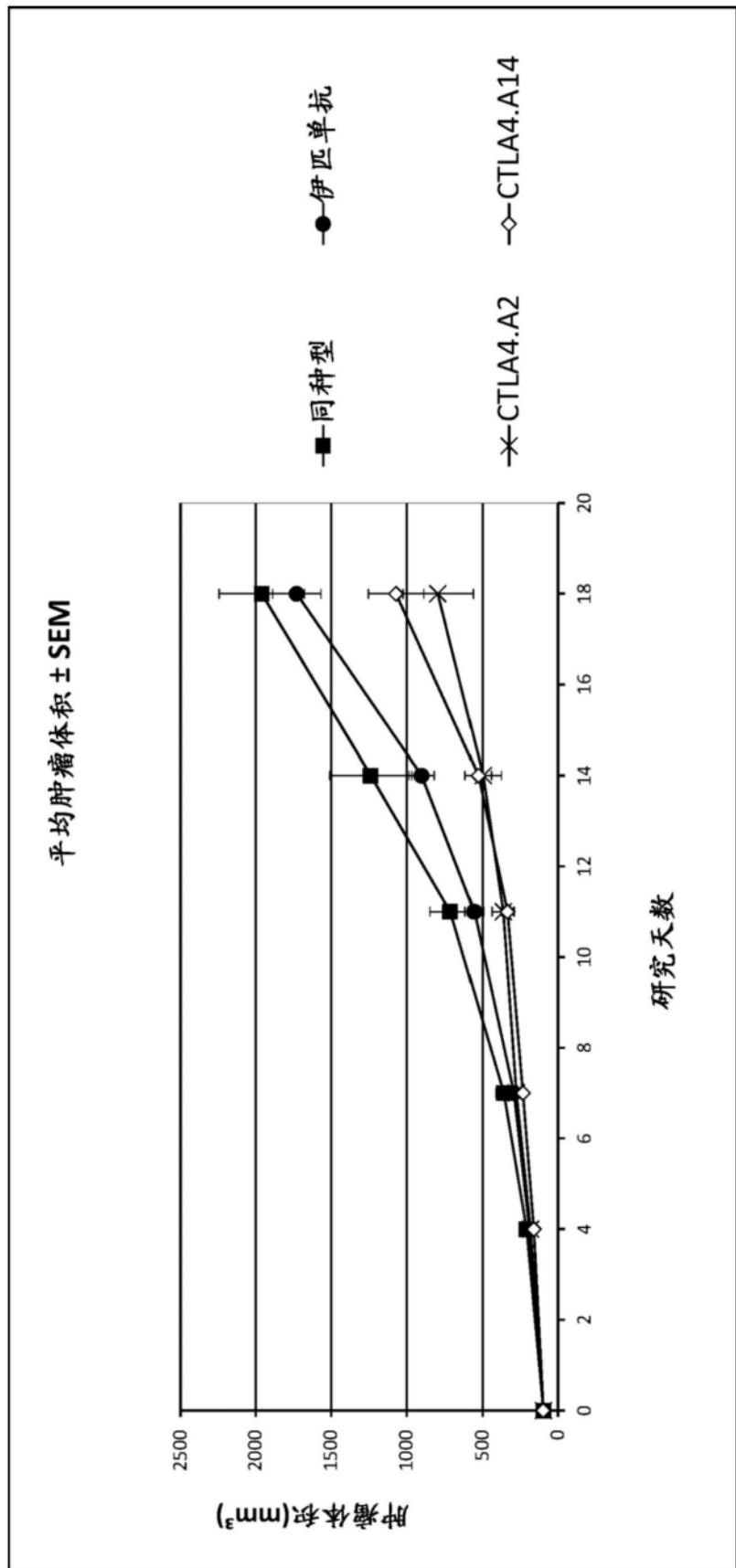


图11