



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117581101 A

(43) 申请公布日 2024. 02. 20

(21) 申请号 202180061391.6

(22) 申请日 2021.05.13

(30) 优先权数据

2007099.1 2020.05.14 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.01.12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2021/062778 2021.05.13

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2021/229032 EN 2021.11.18

(71) 申请人 凯玛布有限公司

地址 英国剑桥

(72) 发明人 R·C·A·圣松 C·迪安托尼奥

C·H·徐 L·C·陆 L·A·谢里

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494

专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

G01N 33/50 (2006.01)

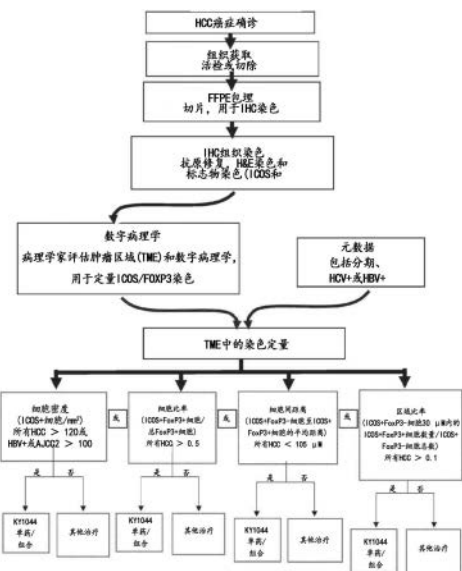
权利要求书8页 说明书66页
序列表46页 附图13页

(54) 发明名称

用于免疫疗法的肿瘤生物标志

(57) 摘要

提供了用于肝细胞癌和其他癌症中的肿瘤的预后的生物标志。提供了用于开具靶向ICOS+调节性T细胞(TReg)的抗癌免疫疗法的处方的生物标志的测量值,例如选择用抗ICOS抗体进行治疗的患者。提供了生物标志,其包括:(i) ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS FOXP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率、(ii) 每个ICOS阳性FOXP3阴性细胞与其最近的ICOS FOXP3双阳性细胞之间的平均距离、(iii) 呈ICOS阳性的FOXP3阳性细胞的比例和(iv) ICOS阳性细胞的密度。



1. 一种用于患者的癌性实体瘤的预后的方法,所述方法包括提供从所述患者获得的肿瘤核心组织的样品,确定所述样品中的以下生物标志中的一个或多个:
 - (i) ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS F0XP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率,
 - (ii) 每个ICOS阳性F0XP3阴性细胞与其最近的ICOS F0XP3双阳性细胞之间的平均距离,
 - (iii) 呈ICOS阳性的F0XP3阳性细胞的比例,和
 - (iv) ICOS阳性细胞的密度,以及基于所述一个或多个生物标志为所述患者提供预后,其中患者存活期、无复发存活期(RFS)、无进展存活期(PFS)或进展时间(TTP)的持续时间较短由以下指示:
ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS F0XP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比比较大,
每个ICOS阳性F0XP3阴性细胞与其最近的ICOS F0XP3双阳性细胞之间的平均距离较短,
呈ICOS阳性的F0XP3阳性细胞的比例较高,和/或
ICOS阳性细胞的密度较高。
2. 根据权利要求1所述的方法,所述方法包括确定ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS F0XP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率,以及
将所述比率与参考值进行比较,其中
高于所述参考值的比率指示存活期、RFS、PFS或TTP的持续时间较短的预后。
3. 根据权利要求2所述的方法,其中所述肿瘤是肝细胞癌,并且所述参考值是ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS F0XP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率为0.1比率。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的方法,所述方法包括确定每个ICOS阳性F0XP3阴性细胞与其最近的ICOS F0XP3双阳性细胞之间的平均距离,以及
将所述距离与参考值进行比较,其中
小于所述参考值的距离指示存活期、RFS、PFS或TTP的持续时间较短的预后。
5. 根据权利要求4所述的方法,其中所述肿瘤是肝细胞癌,并且所述参考值是每个ICOS阳性F0XP3阴性细胞与其最近的ICOS F0XP3双阳性细胞之间的平均距离为105 μ m。
6. 根据权利要求1至5中任一项所述的方法,所述方法包括确定呈ICOS阳性的F0XP3阳性细胞的比例,以及
将所述比例与参考值进行比较,其中
高于所述参考值的比例指示存活期、RFS、PFS或TTP的持续时间较短的预后。
7. 根据权利要求6所述的方法,其中所述肿瘤是肝细胞癌,并且所述参考值是呈ICOS阳性的F0XP3阳性细胞的一半。
8. 根据权利要求1至7中任一项所述的方法,所述方法包括确定ICOS阳性细胞的密度,以及
将所述密度与参考值进行比较,其中

高于所述参考值的密度指示存活期、RFS、PFS或TTP的持续时间较短的预后。

9. 根据权利要求7所述的方法, 其中所述肿瘤是肝细胞癌, 并且所述参考值是密度为120个ICOS阳性细胞/ mm^2 。

10. 根据权利要求7所述的方法, 其中所述肿瘤是与乙型肝炎病毒感染相关的肝细胞癌或者是2期或更晚期肝细胞癌, 并且其中所述参考值是密度为100个ICOS阳性细胞/ mm^2 。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的方法, 所述方法包括根据所述一个或多个生物标志确定所述患者具有存活期、RFS、PFS或TTP的持续时间较短的预后。

12. 根据权利要求11所述的方法, 所述方法包括确定ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS FOXP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率, 以及

将所述比率与参考值进行比较, 其中高于所述参考值的比率指示存活期、RFS、PFS或TTP的持续时间较短的预后,

确定所述比率高于所述参考值, 以及

提供存活期、RFS、PFS或TTP的持续时间较短的预后。

13. 根据权利要求1至10中任一项所述的方法, 所述方法包括根据所述一个或多个生物标志确定所述患者具有存活期、RFS、PFS或TTP的持续时间较长的预后。

14. 根据权利要求13所述的方法, 所述方法包括确定ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS FOXP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率, 以及

将所述比率与参考值进行比较, 其中高于所述参考值的比率指示存活期、RFS、PFS或TTP的持续时间较短的预后,

确定所述比率低于所述参考值, 以及

提供存活期、RFS、PFS或TTP的持续时间较长的预后。

15. 生物标志用于患者的癌性实体瘤的预后的用途, 其中所述生物标志是如在来自所述患者的肿瘤核心组织中所确定的以下中的一个或多个:

(i) ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS FOXP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率,

(ii) 每个ICOS阳性FOXP3阴性细胞与其最近的ICOS FOXP3双阳性细胞之间的平均距离,

(iii) 呈ICOS阳性的FOXP3阳性细胞的比例, 和

(iv) ICOS阳性细胞的密度。

16. 一种确定患者的癌性实体瘤对抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂有反应的可能性的方法, 所述方法包括

提供从所述患者获得的肿瘤核心组织的样品, 以及

确定所述样品中的以下生物标志中的一个或多个:

(i) ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS FOXP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率,

(ii) 每个ICOS阳性FOXP3阴性细胞与其最近的ICOS FOXP3双阳性细胞之间的平均距离,

(iii) 呈ICOS阳性的FOXP3阳性细胞的比例, 和

(iv) ICOS阳性细胞的密度, 其中

所述患者对所述免疫治疗剂有反应的可能性较大由以下指示：

ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS FOXP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率较大，

每个ICOS阳性FOXP3阴性细胞与其最近的ICOS FOXP3双阳性细胞之间的平均距离较短，

呈ICOS阳性的FOXP3阳性细胞的比例较高，和/或

ICOS阳性细胞的密度较高。

17. 根据权利要求16所述的方法，所述方法包括确定ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS FOXP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率，以及

将所述数值与参考值进行比较，其中

高于所述参考值的比率指示对所述免疫治疗剂有反应的可能性增加。

18. 根据权利要求17所述的方法，其中所述肿瘤是肝细胞癌，并且所述参考值是ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内的ICOS FOXP3双阳性细胞与ICOS单阳性细胞的总数的比率为0.1。

19. 根据权利要求16至18中任一项所述的方法，所述方法包括确定每个ICOS阳性FOXP3阴性细胞与其最近的ICOS FOXP3双阳性细胞之间的平均距离，以及

将所述距离与参考值进行比较，其中

小于所述参考值的距离指示对所述免疫治疗剂有反应的可能性增加。

20. 根据权利要求19所述的方法，其中所述肿瘤是肝细胞癌，并且所述参考值是每个ICOS阳性FOXP3阴性细胞与其最近的ICOS FOXP3双阳性细胞之间的平均距离为105 μm 。

21. 根据权利要求16至20中任一项所述的方法，所述方法包括确定呈ICOS阳性的FOXP3阳性细胞的比例，以及

将所述比例与参考值进行比较，其中

高于所述参考值的比例指示对所述免疫治疗剂有反应的可能性增加。

22. 根据权利要求21所述的方法，其中所述肿瘤是肝细胞癌，并且所述参考值是呈ICOS阳性的FOXP3阳性细胞的一半。

23. 根据权利要求16至22中任一项所述的方法，所述方法包括确定ICOS阳性细胞的密度，以及

将所述密度与参考值进行比较，其中

高于所述参考值的密度指示对所述免疫治疗剂有反应的可能性增加。

24. 根据权利要求23所述的方法，其中所述肿瘤是肝细胞癌，并且所述参考值是密度为120个ICOS阳性细胞/ mm^2 。

25. 根据权利要求23所述的方法，其中所述肿瘤是与乙型肝炎病毒感染相关的肝细胞癌或者是2期或更晚期肝细胞癌，并且其中所述参考值是密度为100个ICOS阳性细胞/ mm^2 。

26. 根据权利要求16至25中任一项所述的方法，所述方法包括将所述患者鉴定为对所述免疫治疗剂有反应的可能性增加，以及任选地从而选择抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂来治疗所述患者。

27. 根据权利要求26所述的方法，所述方法包括确定ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS FOXP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率，

将所述比率与参考值进行比较,其中高于所述参考值的比率指示对所述免疫治疗剂有反应的可能性增加,

确定所述比率高于所述参考值,从而将所述患者鉴定为对所述免疫治疗剂有反应的可能性增加。

28.根据权利要求26或权利要求27所述的方法,所述方法包括向所述患者施用所述抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂。

29.生物标志用于确定患者的癌性肿瘤对抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂有反应的可能性的用途,其中所述生物标志是如在来自所述患者的肿瘤核心组织中所确定的以下中的一个或多个:

(i) ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS FOXP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率,

(ii) 每个ICOS阳性FOXP3阴性细胞与其最近的ICOS FOXP3双阳性细胞之间的平均距离,

(iii) 呈ICOS阳性的FOXP3阳性细胞的比例,和

(iv) ICOS阳性细胞的密度。

30.一种治疗患者的癌性实体瘤的方法,其中已经确定所述肿瘤包括以下生物标志中的一个或多个:

ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS FOXP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率,其中所述比率高于参考值,

每个ICOS阳性FOXP3阴性细胞与其最近的ICOS FOXP3双阳性细胞之间的平均距离,其中所述距离小于参考值,

呈ICOS阳性的FOXP3阳性细胞的比例,其中所述比例高于参考值,以及

ICOS阳性细胞的密度,其中所述密度高于参考值,

所述方法包括向所述患者施用抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂。

31.一种抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂,其用于治疗患者的癌性实体瘤的方法,其中已经确定所述肿瘤包括以下生物标志中的一个或多个:

ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS FOXP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率,其中所述比率高于参考值,

每个ICOS阳性FOXP3阴性细胞与其最近的ICOS FOXP3双阳性细胞之间的平均距离,其中所述距离小于参考值,

呈ICOS阳性的FOXP3阳性细胞的比例,其中所述比例高于参考值,以及

ICOS阳性细胞的密度,其中所述密度高于参考值。

32.根据权利要求30所述的方法或根据权利要求31所述的用于所述用途的药剂,其中所述肿瘤是肝细胞癌,并且已经确定所述肿瘤包括以下生物标志:

ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS FOXP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率,其中所述比率高于0.1,

每个ICOS阳性FOXP3阴性细胞与其最近的ICOS FOXP3双阳性细胞之间的平均距离,其中所述距离小于105 μm ,

呈ICOS阳性的FOXP3阳性细胞的比例,其中所述比例高于一半,以及

ICOS阳性细胞的密度,其中所述密度高于120个细胞/ mm^2 。

33. 根据权利要求30所述的方法或根据权利要求31所述的用于所述用途的药剂,其中所述肿瘤是与乙型肝炎病毒感染相关的肝细胞癌或者是2级或更高级肝细胞癌,并且其中已经确定所述肿瘤包括以下生物标志:

ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS FOXP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率,其中所述比率高于0.1,

每个ICOS阳性FOXP3阴性细胞与其最近的ICOS FOXP3双阳性细胞之间的平均距离,其中所述距离小于105 μm ,

呈ICOS阳性的FOXP3阳性细胞的比例,其中所述比例高于一半,以及

ICOS阳性细胞的密度,其中所述密度高于100个细胞/ mm^2 。

34. 一种抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂,其用于治疗患者的癌性实体瘤的方法,所述方法包括

选择抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂用于治疗如权利要求26中所定义的患者,以及向所述患者施用所述抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂。

35. 一种监测患者对用于癌性实体瘤的抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂的反应的方法,所述方法包括

提供从已经接受抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂的患者获得的肿瘤核心组织的样品,确定所述样品中的以下生物标志中的一个或多个:

(i) ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS FOXP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率,

(ii) 每个ICOS阳性FOXP3阴性细胞与其最近的ICOS FOXP3双阳性细胞之间的平均距离,

(iii) 呈ICOS阳性的FOXP3阳性细胞的比例,和

(iv) ICOS阳性细胞的密度,

将所述样品中的所述一个或多个生物标志与在施用所述免疫治疗剂之前从所述患者获得的肿瘤核心组织的样品中的相同的一个或多个生物标志进行比较,以及

确定在所述一个或多个生物标志中是否发生了变化,从而评估所述患者是否对所述免疫治疗剂有反应,其中反应由在施用所述免疫治疗剂之前来自所述样品的以下变化中的一个或多个来指示:

ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS FOXP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率降低,

每个ICOS阳性FOXP3阴性细胞与其最近的ICOS FOXP3双阳性细胞之间的平均距离增加,

呈ICOS阳性的FOXP3阳性细胞比例降低,和/或

ICOS阳性细胞的密度降低。

36. 根据权利要求35所述的方法,所述方法包括

测量到ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS FOXP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率与治疗前相比降低,以及

给所述患者开具用所述抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂继续治疗的处方。

37. 根据权利要求35或权利要求36所述的方法,所述方法包括
测量到每个ICOS阳性FOXP3阴性细胞与其最近的ICOS FOXP3双阳性细胞之间的平均距离增加,以及

给所述患者开具用所述抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂继续治疗的处方。

38. 根据权利要求35至37中任一项所述的方法,所述方法包括

测量到呈ICOS阳性的FOXP3阳性细胞的比例降低,以及

给所述患者开具用所述抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂继续治疗的处方。

39. 根据权利要求35至38中任一项所述的方法,所述方法包括

测量到ICOS阳性细胞的密度降低,以及

给所述患者开具用所述抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂继续治疗的处方。

40. 生物标志用于监测患者对用于癌性实体瘤的抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂的反应的用途,其中所述生物标志是如在来自所述患者的肿瘤核心组织中所确定的以下中的一个或多个:

(i) ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS FOXP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率,

(ii) 每个ICOS阳性FOXP3阴性细胞与其最近的ICOS FOXP3双阳性细胞之间的平均距离,

(iii) 呈ICOS阳性的FOXP3阳性细胞的比例,和

(iv) ICOS阳性细胞的密度,

其中对所述免疫治疗剂的反应由与在施用所述免疫治疗剂之前获得的肿瘤核心组织的样品相比的以下变化中的一个或多个来指示:

ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS FOXP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率降低,

每个ICOS阳性FOXP3阴性细胞与其最近的ICOS FOXP3双阳性细胞之间的平均距离增加,

呈ICOS阳性的FOXP3阳性细胞的比例降低,以及

ICOS阳性细胞的密度降低。

41. 一种鉴定用于根据患者的预测的预后或对抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂的预测的反应对患有癌性实体瘤的患者进行分类的参考值的方法,所述方法包括

提供从患有相同类型的癌性实体瘤的患者群体中的每一名获得的肿瘤核心组织的样品,已知所述患者的疾病结局或者已知所述患者对所述抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂的反应,

确定所述样品中每一个中的以下生物标志中的一个或多个:

(i) ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS FOXP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率,

(ii) 每个ICOS阳性FOXP3阴性细胞与其最近的ICOS FOXP3双阳性细胞之间的平均距离,

(iii) 呈ICOS阳性的FOXP3阳性细胞的比例,和

(iv) ICOS阳性细胞的密度,

将所述一个或多个生物标志中的每一个的数据与每名患者的疾病结局或对所述抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂的反应的数据配对,以及

将所述一个或多个生物标志中的每一个的数据分组以鉴定数值截止值,所述数值截止值定义了疾病结局或对所述抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂的反应的两组统计学上显著的数据,

其中所述截止值表示用于根据患者的预测的预后或对所述抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂的预测的反应对患有相同类型的癌性实体瘤的患者进行分类的参考值。

42. 根据权利要求41所述的方法,其中所述样品是从患有肝癌、肾细胞癌、头颈癌、黑色素瘤、非小细胞肺癌、膀胱癌、卵巢癌、宫颈癌、胃癌、胰腺癌、乳腺癌(包括三阴性乳腺癌)、癌、平滑肌肉瘤、肛门癌、鳞状细胞癌和食管癌的患者群体获得的。

43. 根据权利要求42所述的方法,其中所述样品是从患有肝细胞癌的患者群体获得的。

44. 根据权利要求16至43中任一项所述的方法、用途或用于所述用途的免疫治疗剂,其中所述免疫治疗剂是抗ICOS抗体。

45. 根据权利要求16至44中任一项所述的方法、用途或用于所述用途的免疫治疗剂,其中所述免疫治疗剂选择性地耗竭或抑制TReg。

46. 根据权利要求16至45中任一项所述的方法、用途或用于所述用途的免疫治疗剂,其中所述免疫治疗剂是结合TReg并介导细胞效应子功能的抗体。

47. 根据权利要求46所述的方法、用途或用于所述用途的免疫治疗剂,其中所述抗体是包含介导细胞效应子功能的Fc区的IgG。

48. 根据权利要求45至47中任一项所述的方法、用途或用于所述用途的免疫治疗剂,其中所述免疫治疗剂是结合ICOS、CD25、CCR8、CTLA-4、GITR或MHC展示的FOXP3表位的抗体。

49. 根据权利要求48所述的方法、用途或用于所述用途的免疫治疗剂,其中所述抗体结合ICOS。

50. 根据权利要求44或权利要求49所述的方法、用途或用于所述用途的免疫治疗剂,其中所述一个或多个生物标志包括ICOS阳性细胞的密度。

51. 根据权利要求49或权利要求50所述的方法、用途或用于所述用途的免疫治疗剂,其中所述抗体包含ICOS结合位点,所述ICOS结合位点包含KY1044的CDR,其中

HCDR1是SEQ ID NO:1

HCDR2是SEQ ID NO:2

HCDR3是SEQ ID NO:3

LCDR1是SEQ ID NO:8

LCDR2是SEQ ID NO:9,并且

LCDR3是SEQ ID NO:10。

52. 根据权利要求49至51中任一项所述的方法、用途或用于所述用途的免疫治疗剂,其中所述抗体包含与KY1044 VH结构域SEQ ID NO:5至少90%相同的VH结构域氨基酸序列和与KY1044 VL结构域SEQ ID NO:12至少90%相同的VL结构域氨基酸序列。

53. 根据权利要求52所述的方法、用途或用于所述用途的免疫治疗剂,其中抗体包含KY1044 VH结构域SEQ ID NO:5和KY1044 VL结构域SEQ ID NO:12。

54. 根据权利要求53所述的方法、用途或用于所述用途的免疫治疗剂,其中所述抗体是

包含KY1044重链SEQ ID NO:7和KY1044轻链SEQ ID NO:14的人IgG1κ。

55.根据权利要求48所述的方法、用途或免疫治疗剂,其中所述抗体结合CD25、CCR8、CTLA-4、GITR或MHC展示的FOXP3表位。

56.根据权利要求55所述的方法、用途或免疫治疗剂,其中所述一个或多个生物标志包括ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS FOXP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率、每个ICOS阳性FOXP3阴性细胞与其最近的ICOS FOXP3双阳性细胞之间的平均距离和/或呈ICOS阳性的FOXP3阳性细胞的比例。

57.TME中表达ICOS和/或FOXP3的免疫细胞的空间排列作为疾病预后或对用抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂进行的治疗的反应的生物标志的用途。

用于免疫疗法的肿瘤生物标志

技术领域

[0001] 本发明涉及靶向表达T细胞表面受体ICOS(可诱导T细胞共刺激分子)的调节性T细胞的抗癌免疫疗法,包括抗ICOS抗体和抑制或杀死ICOS+调节性T细胞(TReg)的其他治疗剂。本发明涉及指示肿瘤对这种免疫疗法的易感性并提供患者对免疫疗法的反应的早期指示的生物标志。

背景技术

[0002] 调节患者自身的免疫系统以对抗疾病的免疫疗法已经跃升为许多类型的癌症的一线治疗。使用靶向药物下调抑制T细胞激活的信号(“免疫检查点阻断”),使得T细胞能够产生有效的抗肿瘤反应[1]。在对免疫疗法有反应的患者中,抗肿瘤结果可以是引人注目且挽救生命的,激发了对此领域的兴趣。用免疫检查点抑制剂如靶向程序性细胞死亡蛋白1(PD-1)、程序性死亡配体-1(PD-L1)和细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4(CTLA-4)的单克隆抗体进行的免疫疗法已经成为多种癌症的重要治疗。目前正在用免疫检查点抑制剂进行数百项临床试验,来测试新药物和新药物组合。

[0003] 除了免疫检查点共抑制受体(如PD-1和CTLA-4)之外,共刺激受体也影响T细胞的功能状态,并且对于癌症免疫监视是关键的。当配体与共刺激受体结合时,下游信号被激活,驱动T细胞的功能、存活和/或增殖。ICOS是仅在T细胞上发现的共刺激受体,并且已经被鉴定为免疫疗法的靶标以激活患者的抗肿瘤T细胞反应。参见例如,WO 2019/122884和其中的参考文献。

[0004] 在肿瘤以及涉及免疫组分的其他疾病和病症中,在发挥抗原特异性T细胞免疫反应的效应T细胞(TEff,如CD8+细胞毒性T淋巴细胞,CTL)与通过下调TEff抑制该免疫反应的调节性T细胞(TReg)之间存在平衡。肿瘤中TReg水平升高与包括肝细胞癌(HCC)在内的至少一些类型的癌症的不良预后有关[2,3]。Tu等人(2016)报道到TReg(特别是ICOS+FOXP3+TReg)导致HCC肿瘤中的免疫抑制,并且与患者存活率降低有关[3]。ICOS是TEff上的重要共刺激受体,但是由于其在TReg上的高表达也促进肿瘤生长。体外研究已经表明,表达ICOS的(ICOS+)TReg比ICOS阴性TReg更具免疫抑制性[4,5]。抗ICOS抗体免疫疗法旨在调节TEff/TReg平衡以有利于TEff的数量和活性。触发ICOS阳性TReg的耗竭(例如,经由Fc介导的效应子功能,如抗体依赖性细胞毒性,ADCC)的抗体将减轻TEff的抑制并改善TEff/TReg比率,因此将具有促进TEff抗肿瘤反应的净效应。抗ICOS抗体也可以在ICOS受体水平上发挥激动活性以直接刺激TEff产生细胞因子。这两种TEff增强效应的组合对于抗ICOS抗体是可能的,因为ICOS在TReg上以显著高于TEff的水平呈现;例如,人IgG1抗ICOS抗体可以通过刺激ICOS^低TEff和耗竭ICOS^高TReg来增强抗肿瘤免疫[6;7]。因此,抗ICOS抗体代表一类潜在有价值的用于肿瘤免疫疗法(其中TEff免疫反应被动员)的治疗剂。已经描述了许多抗ICOS抗体,并且证明它们可影响T细胞群体/活性[8;WO 2016/120789;WO 2016/154177;WO 2018/029474;WO 2018/187613;WO 2019/122884]。几种抗ICOS抗体正在癌症患者中进行临床试验:JTX-2011[25]、GSK-3359609[9]、MEDI-570、BMS-986226[WO 2018/187613;

NCT03251924]和KY1044[7]。

[0005] 尽管迄今为止免疫肿瘤学的进展一直是引人瞩目的,但免疫治疗性治疗失败的患者仍然多于它们挽救的患者。30%或更低的反应率是免疫疗法在一系列肿瘤类型中的常态。抗PD-1抗体纳武单抗在黑素瘤中的反应率为约30%。在晚期HCC的I/II期研究中,其反应率为15%-20%[10]。派姆单抗是另一种抗PD-1抗体,其在先前已经用索拉非尼治疗的HCC患者的II期研究中获得了与纳武单抗类似的反应率[11]。美国食品药品监督管理局(FDA)分别于2017年和2018年加速批准了纳武单抗和派姆单抗用于治疗HCC。然而,分别在一线和二线环境中测试纳武单抗和派姆单抗的晚期HCC的后续III期试验未能获得积极结果[12, 13]。在抗PD-L1抗体阿替利珠单抗在尿路上皮癌中的II期临床试验中,反应率在患有PD-L1+肿瘤的患者中为约26%,总体为约15%(在不考虑肿瘤上PD-L1表达的患者中),并且在患有PD-L1阴性肿瘤的患者中为约10%。后一例子说明了生物标志物用于将免疫疗法与一组癌症患者相匹配的价值,所述癌症患者具有更好的从免疫疗法中受益的机会(虽然仍然只有26%)。Calderaro等人还报道了HCC中的PD-L1表达与临床和病理学特征之间的关系[14]。

[0006] 已经研究了组合疗法作为改善免疫检查点抑制剂在HCC和其他癌症中的功效的方式。最近,将纳武单抗与抗CTLA-4抗体伊匹单抗组合的试验队列报道了约30%的客观反应率[15],随后,美国FDA加速批准了纳武单抗/伊匹单抗组合用于先前已经用索拉非尼治疗的HCC患者。另一项最近的试验测试了抗PD-L1抗体阿替利珠单抗和抗VEGF抗体贝伐单抗的组合对比索拉非尼作为晚期HCC患者的一线疗法,并且该试验报道了阿替利珠单抗加贝伐单抗的组合的积极结果,将ORR提高到约30%[16]。

[0007] 一般说来,不清楚为什么一些患者对免疫疗法有反应而其他患者没有反应。在表面上类似的患者中观察到反应的显著差异,其中一名患者完全有反应,而其他患者几乎没有或根本没有从相同的治疗中获得临床益处。这可能可归因于基线肿瘤微环境(TME)的差异,但是细节尚不了解。虽然已经鉴定出一些预测性生物标志物(例如,在上述阿替利珠单抗研究中肿瘤和免疫细胞上的PD-L1表达),但仍然存在用免疫疗法治疗的大部分患者没有从治疗中受益的情况。将患者与最可能起作用的疗法相匹配的任何进步都将带来临床功效的可喜改善,并且限制接受无效医疗干预的患者的数量。

[0008] 癌症类型和亚型的传统诊断以解剖学分类和基于组织的分类为基础,例如肺癌、胰腺癌等。然而,考虑到在此类肿瘤类别内和跨此类肿瘤类别对免疫疗法的低反应率,这些定义仅部分有助于鉴定将从特定治疗中受益的患者群组。因此,临床医生和监管机构现在认识到“组织未定性(tissue-agnostic)”方法的价值,在所述方法中治疗是基于与肿瘤起源的组织或细胞类型分开(但是可能与其相关)的肿瘤和/或患者生物标志物。例如,美国FDA已经批准抗PD-1抗体派姆单抗用于治疗患有不可切除的或转移性的、高微卫星不稳定性或错配修复缺陷的实体瘤的患者。组织类型和组织未定性肿瘤分类的组合也是可能的。

[0009] 肿瘤的突变状态影响它们的微环境。肿瘤细胞群体可能进化以产生使它们免于免疫检测和影响局部组织以支持肿瘤生长的表型,从而建立促肿瘤环境。此类肿瘤可能难以被免疫细胞浸润,并且被称为是免疫学上“冷的”。在其他情况下,肿瘤细胞中的高突变率(例如,由DNA错配修复中的缺陷引起)产生大量新表位,导致细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的高浸润和免疫学“热”肿瘤。肿瘤基因型与表型之间联系的性质和程度以及它们随时间的共同进展是广泛且快速发现的课题。希望反应性肿瘤与非反应性肿瘤之间差异的解决将最终导

致许多患者亚类的鉴定,对于所述患者亚类,特定的免疫疗法过程是可靠地有疗效的。由于据报道大多数患有转移性肿瘤的患者具有许多不同的基因组改变,因此成功的治疗可能需要多种治疗剂的定制组合以实现治疗与癌症特征之间的密切匹配[17]。

[0010] 已经基于TME的表征开发出各种诊断系统,包括免疫浸润和局部炎症反应[18;19;20;21]。对用免疫检查点阻断剂(如抗CTLA-4和抗PD-1)治疗的患者群体的回顾性分析已经表明肿瘤免疫环境的差异与其对治疗的反应能力有关[21]。据报道,“肿瘤突变负荷”和“T细胞炎症基因表达谱”与采用抗PD-1抗体派姆单抗的积极治疗结局相关[22]。据报道,计算模型“TIDE”(肿瘤免疫功能障碍和排斥)(其基于与CTL浸润和患者存活相关的基因标签(来自治疗前RNA-Seq或NanoString谱)模拟肿瘤的CTL逃避)比其他生物标志(如PD-L1表达和突变负荷)更准确地预测用一线抗PD-1或抗CTLA-4治疗的黑素瘤患者的结局[23]。据报道,抗CTLA-4抗体伊匹单抗的作用模式涉及表达Fc γ RIIIA的非经典单核细胞,与非反应患者相比,它们在反应患者中以更高的基线外周频率被发现[24]。

[0011] 研究表明抗ICOS抗体可以为对ICOS和/或FOXP3(TReg的标志物)表达呈阳性的肿瘤提供特定治疗价值[6;WO 2018/029474;WO 2019/122884]。基于来自采用抗ICOS抗体JTX2011进行的ICONIC试验NCT02904226的数据,据报道在肿瘤中具有高ICOS表达的患者中疾病控制和肿瘤减少的速率更高[25]。然而,ICOS和/或FOXP3表达仅提供抗ICOS抗体疗法是否将对给定患者起作用的“粗略”指标。

[0012] WO 2014/009535描述了用于确定患有实体癌的患者是否将对治疗(化疗、放疗或免疫疗法)有反应的方法,其涉及测定来自患者的肿瘤样品中选自CCR2、CD3D、CD3E、CD3G、CD8A、CXCL10、CXCL11、GZMA、GZMB、GZMK、GZMM、IL15、IRF1、PRF1、STAT1、CD69、ICOS、CXCR3、STAT4、CCL2和TBX21的一组基因的表达水平。据报道,此组中基因的表达水平也与癌症预后有关。

[0013] WO 2014/023706描述了用于确定癌症患者是具有良好还是不良适应性免疫反应以及是具有良好还是不良免疫抑制反应的方法,其涉及测定来自患者的肿瘤样品中限定基因集的表达水平。

[0014] WO 15/103037描述了测定癌症样品的体细胞突变以鉴定作为用免疫检查点调节剂进行治疗的候选者的患者的方法。

[0015] WO 16/109546描述了基于从患者获得的生物样品中的“免疫细胞基因标签”选择用免疫疗法进行治疗的患者,所述免疫细胞标签包括来自限定基因集的一种或多种基因的表达水平。

[0016] WO 2017/070423描述了测定患者样品中来自限定基因集的mRNA水平以鉴定用抗ICOS抗体进行治疗的患者的方法。

[0017] WO 2018/225062和WO 2018/225063描述了预测癌症患者对用至少一种免疫检查点抑制剂进行的治疗的响应的方法,其包括测定“宿主驱动的”生物标志物,如细胞因子、趋化因子、生长因子、酶或可溶性受体。

[0018] WO 2020/245155描述了用于在患有癌症的患者中确定采用化疗剂进行的治疗方案的方法,所述方法包括定量来自患者的肿瘤样品中的CD8和CD3。描述了定量肿瘤和肿瘤侵袭性边缘中的CD8+和CD3+细胞密度的方法。

[0019] 除了鉴定使得能够给个体患者开具适当的治疗和治疗组合的处方的合适生物标

志,鉴定处于治疗早期的患者的预后生物标志也是有用的。免疫疗法治疗方案持续时间长,持续至少数月,并且通常持续数年。这与几乎立即杀死细胞/缩小肿瘤的化疗治疗不同。对免疫疗法的反应可以视为三步过程:当药物激活免疫系统的细胞时的细胞反应;当免疫细胞攻击肿瘤时的抗肿瘤反应;以及当抗肿瘤效应降低肿瘤负荷并改善患者结局时的治疗反应。如果可以鉴定与最终治疗反应相关的早期标志,如可以在治疗的最初几周内患者在患者中检测到并指示更长期预后的生物标志,这将为表现出阳性生物标志的患者提供继续治疗的信心,而缺乏该生物标志的患者可以切换到替代疗法。

[0020] Feng等人[26]报道到口腔鳞状细胞癌患者的预后信息可能来源于肿瘤组织切片中T细胞的频率。侵袭性边缘的大量CD8+T细胞与总存活率呈正相关,而CD8+T细胞30um内FOXP3+细胞的数量与总存活率呈负相关。作者将这些和其他测量值整合到与总存活率相关的“累积抑制指数”中。

[0021] WO 2019/222188鉴定到ICOS和T-bet水平升高与患者对抗ICOS抗体的反应有关。

[0022] 最近,Kagamu等人[27]报道到患者外周血中CD4+T细胞的状态可以用于鉴定在用纳武单抗(抗PD-1)进行治疗之后呈现早期疾病进展的非小细胞肺癌患者,使得能够将患者分类为非反应者或反应者。发现反应者在PD-1阻断之前具有显著($p < 0.0001$)更高百分比的效应物CD62L^低CD4+T细胞。相反,非反应者中CD25+FOXP3+CD4+T细胞的百分比显著($p = 0.034$)更高。基因表达分析揭示到CCL19、CLEC-2A、IFNA、IL7、TGFB3、CXCR3和HDAC9优先在来源于反应者的CD62L^低CD4+T细胞中表达。值得注意的是,具有>500天的无进展存活期的长期反应者在PD-1阻断疗法之前显示出显著更高数量的CD62L^低CD4+T细胞。治疗后CD62L^低CD4+T细胞百分比降低导致获得性抗性,长期存活者维持高CD62L^低CD4+T细胞百分比。

发明内容

[0023] 我们已经发现肿瘤微环境(TME)内的细胞组成、免疫环境和细胞的特定空间排列的特征可以告知患者临床进展的可能性以及他们是否可能从用免疫疗法进行的治疗中受益。我们已经鉴定出TME的生物标志,其与患者存活期的持续时间和对免疫疗法(包括用抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂进行治疗)的反映的可能性相关。这些生物标志有助于癌症患者的疾病预后,允许对患者进行分析以鉴定其从免疫疗法中受益的可能性,并且当在治疗之前和之后都进行监测时,提供患者是否对疗法有反应的有价值的早期指示。

[0024] 这些生物标志包括TME的以下特征,其可以从患者的肿瘤中鉴定,例如经由分析切除的肿瘤或活检样品进行鉴定:

[0025] (i) ICOS+密度:表达ICOS蛋白的细胞(即,ICOS阳性(ICOS+)细胞)的密度或浓度,

[0026] (ii) ICOS+TReg比例:呈ICOS+的FOXP3+细胞的比例,表示呈ICOS阳性的TReg的比例,

[0027] (iii) 细胞间接近度:ICOS+FOXP3+: ICOS+FOXP3-细胞间接近度,是每个ICOS单阳性(即,ICOS阳性FOXP3阴性)细胞与其最近的ICOS FOXP3双阳性细胞之间的平均(均值)距离,表示ICOS阳性TReg与其他ICOS阳性细胞(包括ICOS+TEff)之间的接近度,以及

[0028] (iv) 区域影响比率:任何ICOS单阳性细胞的限定区域(“影响半径”)内ICOS FOXP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率,其中影响半径表示在ICOS FOXP3双阳性细胞与ICOS单阳性细胞之间可以发生细胞-细胞和/或细胞因子依赖性通信的距离(例

如,30 μm)。

[0029] 这些生物标志中的每一个都与患者将从抗ICOS和/或抗TReg免疫疗法中受益的预期呈正相关。通常,生物标志越高(密度、比例、接近度或区域影响越大),在没有治疗的情况下患者的预后越差,但是患者将对抗ICOS和/或抗TReg干预有反应的可能性越大。因此,如本文所述的生物标志的测量有助于适当选择用于治疗的患者,使得能够将免疫疗法选择性地施用给最可能产生有益抗肿瘤反应的那些患者。

[0030] 这些生物标志的细节总结在附表B中并且在下文有描述。生物标志(ii)、(iii)和(iv)是免疫抑制性TME的指标。

[0031] FOXP3是TReg的已知标志物,并且表达ICOS和FOXP3两者的细胞可被鉴定为TReg的高度免疫抑制性亚群。虽然我们在本文中描述了FOXP3作为TReg的鉴定标志物的用途,但将理解,替代标志物可以容易地用于选择性地鉴定TReg。如我们在本文中所公开的,ICOS+细胞的密度更大、呈ICOS+的TReg的比例更大以及ICOS+TReg与其他ICOS+T细胞(FOXP3-)之间的接近度更近都与患者的预后更差相关,表现为例如相对于患有相同肿瘤类型的其他患者,存活期持续时间缩短或者无复发存活期(RFS)、无进展存活期(PFS)或进展时间(TTP)的持续时间缩短。然而,从积极的方面来看,此类患者代表特别可能对抗ICOS和/或抗TReg免疫疗法有反应的亚组。

[0032] 用抗TReg治疗剂如Fc效应物阳性抗ICOS抗体(如本文所述的KY1044抗体)进行治疗减少了TReg的数量,改善了TME中TEff/TReg之间的比率,从而可以增强患者对肿瘤的免疫反应,导致肿瘤生长减少,并且优选导致患者中一个或多个肿瘤的大小减小和最终根除。其他非TReg耗竭性抗ICOS抗体将类似地通过增强TEff的细胞因子产生并从而增强TEff活性来改善抗肿瘤免疫反应。

[0033] 我们在本文中描述了如何在个体肿瘤样品和患者群组中测量和定量所定义的生物标志,提供有效地将患者分类为反应者与非反应者群组的截止值。考虑到肿瘤生物学的复杂性和患者的多样性,使用这些生物标志做出的预测不能100%准确,但是它们仍将基于概率提供有用的指导。因此,本发明增加了将患者与该患者将从中受益的疗法适当相匹配的概率。因此,可以使用根据本发明的生物标志筛选癌症患者以提供对疗法的反应的相对可能性的指示,此信息对于临床医生和患者在决定是否开始根据本发明的免疫疗法过程和/或确定采用哪种免疫疗法过程(例如,哪种单药疗法或哪种药剂组合)方面都是有价值的。

[0034] 参考肝细胞癌(HCC)公开了本发明的实施方案,由在TME中基于研究的患者队列的以下定量量度举例说明:

[0035] -高密度的ICOS+细胞,测量为多于120个细胞/ mm^2 ;

[0036] -高密度的ICOS+细胞,多于100个细胞/ mm^2 ,其中已知HCC与乙型肝炎病毒(HBV)感染相关,或根据美国癌症联合委员会(AJCC)的标准[28]为2期或更晚期HCC;

[0037] -高比例的呈ICOS+的FOXP3+细胞,测量为超过一半的呈ICOS+的FOXP3+细胞;

[0038] -紧密的ICOS+FOXP3-阴性(ICOS单阳性)细胞与其最近的相邻ICOS+FOXP3+双阳性细胞之间的接近度,测量为小于105 μm 的平均细胞间距离;

[0039] -高比率的ICOS单阳性细胞的30 μm 影响半径内ICOS FOXP3双阳性细胞的数量与所有ICOS单阳性细胞。

[0040] 可以选择满足这些标准中的一个或多个(优选全部)的HCC患者用于用如本文所述的抗ICOS和/或抗TReg免疫疗法进行治疗。

[0041] 参考值将通常关于具有特定临床特征(如癌症亚型)的患者来确定,并且最好用于可比患者的预后。以上是本文举例说明的HCC患者群组的说明性实施方案,并且可以参考其他肿瘤类型和/或患者群体来确定其他合适的截止值。因此,尽管本文举例说明的参考值可以任选地应用于患有除HCC之外的其他癌症的患者的预后,但如果可能,应当首先通过评价来自患有靶癌症类型或分子亚型(组织学未定性)的患者的数据来证实它们在此类更广泛的背景中的用途。我们描述了根据预测的癌症预后以及可能从抗ICOS和/或抗TReg免疫疗法中受益来确定用于区分患者的合适参考值和公式的方法。用于HCC的参考值的确定和使用在实施例中有说明,并且等效方法可以用于确定和利用关于其他癌症的参考值。

[0042] 本发明涉及生物标志在医学背景中的应用,包括以下方面:

[0043] 在患者的癌症预后方面,例如以预测存活期,其可以是存活期、无复发存活期(RFS)、无进展存活期(PFS)和/或进展时间(TTP)的长度;

[0044] 在将患者与适当的治疗相匹配方面,例如选择用抗ICOS和/或抗TReg免疫疗法进行治疗的患者和给被鉴定为更可能受益的患者开具抗ICOS和/或抗TReg免疫疗法的处方;

[0045] 在监测对抗ICOS和/或抗TReg免疫疗法的细胞反应作为患者是否对治疗有反应的早期指标方面;

[0046] 在医学研究方面,其中将来自患者的生物标志数据相对于其病史和/或对疗法的反应作图,以提供或改进模型,其可以改善未来患者的临床评估和治疗。

[0047] 一个或多个生物标志可以用于患者的癌性实体瘤的预后,包括如在来自患者的肿瘤核心组织中所确定的以下生物标志中的一个或多个:

[0048] (i) ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS⁺FOXP3⁺双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率,

[0049] (ii) 每个ICOS阳性FOXP3阴性细胞与其最近的ICOS⁺FOXP3⁺双阳性细胞之间的平均距离,

[0050] (iii) 呈ICOS阳性的FOXP3阳性细胞的比例,和

[0051] (iv) ICOS阳性细胞的密度。

[0052] 因此,在第一方面,本发明提供了一种用于患者的癌性实体瘤的预后的方法,所述方法包括

[0053] 提供从所述患者获得的肿瘤核心组织的样品,

[0054] 确定所述样品中的以下生物标志中的一个或多个:

[0055] (i) ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS⁺FOXP3⁺双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率,

[0056] (ii) 每个ICOS阳性FOXP3阴性细胞与其最近的ICOS⁺FOXP3⁺双阳性细胞之间的平均距离,

[0057] (iii) 呈ICOS阳性的FOXP3阳性细胞的比例,和

[0058] (iv) ICOS阳性细胞的密度,以及

[0059] 基于所述一个或多个生物标志为所述患者提供预后,其中较短的存活期由以下指示:

[0060] ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS⁺FOXP3⁺双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率较大,

[0061] 每个ICOS阳性FOXP3⁻阴性细胞与其最近的ICOS⁺FOXP3⁺双阳性细胞之间的平均距离较短,

[0062] 呈ICOS阳性的FOXP3⁺阳性细胞的比例较高,和/或

[0063] ICOS阳性细胞的密度较高。

[0064] 可以确定ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS⁺FOXP3⁺双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率,并且将其与参考值进行比较。高于参考值的数值指示较短存活期的预后,并且低于参考值的数值指示较长存活期的预后。例如,在HCC中,对于30 μ m (30微米)的影响半径,我们确定患者分类的参考值为0.1。因此,在确定在ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS⁺FOXP3⁺双阳性细胞与ICOS单阳性细胞的总数的比率大于0.1的情况下,这指示存活期较短。

[0065] 类似地,可以确定每个ICOS⁺FOXP3⁻ (ICOS单阳性)细胞与其最近的ICOS⁺FOXP3⁺ (ICOS⁺FOXP3⁺双阳性)细胞之间的平均距离,并且将其与参考值进行比较。小于参考值的距离指示较短存活期持续时间的预后,而大于参考值的距离指示较长存活期的预后。例如,在肿瘤是HCC的情况下,可以使用105 μ m的参考值。因此,每个ICOS单阳性细胞与其最近的ICOS⁺FOXP3⁺双阳性细胞之间的平均距离小于105 μ m指示HCC的存活期较短,而每个ICOS单阳性细胞与其最近的ICOS⁺FOXP3⁺双阳性细胞之间的平均距离大于105 μ m指示HCC的存活期较长。

[0066] 可以确定呈ICOS阳性的FOXP3⁺阳性细胞的比例,并且将其与参考值进行比较。高于参考值的比例指示较短存活期的预后,而低于参考值的比例指示较长存活期的预后。例如,在肿瘤是HCC的情况下,可以使用0.5的参考值。因此,如果超过一半的FOXP3⁺阳性细胞呈ICOS阳性,这指示存活期较短,而如果不到一半的FOXP3⁺阳性细胞呈ICOS阳性,这指示存活期较长。

[0067] 可以确定ICOS阳性细胞的密度,并且将其与参考值进行比较。高于参考值的密度指示较短存活期的预后,而低于参考值的密度指示较长存活期的预后。例如,在肿瘤是HCC的情况下,可以使用120个ICOS阳性细胞/ mm^2 的参考值。因此,大于120/ mm^2 的ICOS⁺细胞密度指示存活期较短,而低于120/ mm^2 的密度指示存活期较长。在肿瘤为与乙型肝炎病毒感染相关的HCC或者为2期或更晚期HCC的情况下,可以使用100个ICOS阳性细胞/ mm^2 的参考值。因此,呈现为HCC的这些亚型的患者的预后可以使用此较低的参考值,而呈现为另一种类型的HCC或者尚未被鉴定为与HBV相关或者为2期或更晚期HCC的HCC的患者的预后可以使用120个细胞/ mm^2 的较高参考值。后者包括诊断患有1期HCC的患者。

[0068] 如将由所附实施例所说明的,参考值得自统计建模,并且虽然参考值可以代表对从中得到所述参考值的模型中的数据中的“最佳拟合”,但它仅可以用作患者分类和预后的近似指导,因此不应当被视为是绝对决定性的。将理解,本文提供的精确值,如“30 μ m半径内有0.1个ICOS⁺FOXP3⁺双阳性细胞”、“每个ICOS⁺FOXP3⁻细胞与其最近的ICOS⁺FOXP3⁺细胞之间的平均距离为105 μ m”、“50%的FOXP3⁺阳性细胞呈ICOS阳性”、“120个ICOS⁺细胞/ mm^2 ”或“100个ICOS⁺细胞/ mm^2 ”仅代表示例性实施方案,并且本发明可以使用这些精确值的变体来实施,同时仍然保留预测价值。例如,如果将影响半径定义为25 μ m,并且将ICOS⁺FOXP3⁺双阳性

细胞的阈值数量定义为0.2,则将仍然预期能够有效地估计患者是否是可能预期存活期相对较长的患者,以及这种患者是否将或多或少可能从用抗ICOS和/或抗TReg治疗剂进行的治疗中受益。

[0069] 可以以不同的方式定义和测量存活期。最简单地,存活期可以被定义为总存活期(OS)的持续时间,即直到患者死亡的时间长度。其他存活期相关的临床终点包括在测量的存活时间内患者疾病状态的量度,如包括无复发存活期(RFS)、无进展存活期(PFS)和进展时间(TTP)。简言之,RFS是直到治疗的癌症复发或恢复的时间长度,PFS是直到癌症恶化(进展)的时间长度,并且TTP类似于PFS,但是不对死于与其癌症无关的原因的患者进行计数。本发明的生物标志预测患者在疾病中存活的能力,因此预期其与OS、RFS、PFS和TTP中每一个的持续时间相关。在这种情况下,预测的存活期持续时间是在没有用抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂进行治疗的情况下的存活期,即,进行预后而不考虑患者如何或是否将接受如本文别处所述的抗ICOS和/或抗TReg免疫疗法。

[0070] 因此,提供预后可以包括预测患者相对于其他可比患者是否将享有更长的存活期。提供预后可以包括预测存活时间,如预测OS、RFS、PFS和TTP的持续时间,例如作为估计的月数或年数。将患者的预测的存活期(例如,OS)的持续时间任选地估计为自采集组织样品之日起的月数。根据一个或多个生物标志是高于还是低于其相应的一个或多个参考值,可以将存活期持续时间估计为例如小于x个月或大于x个月的范围。例如,在本文所述的HCC患者群体中,中值OS为100.3个月。对于呈现HCC的另一患者,将确定区域影响、细胞间接近度、ICOS+TReg比例和/或ICOS+细胞密度的生物标志读数,并且将其与为此群体定义的参考值进行比较,以便提供大于或小于100.3个月的存活期预后。

[0071] 与预后更乐观的患者相比,如由一个或多个此类生物标志所预测的因此被鉴定为具有相对较差的预后的患者对根据本发明的免疫疗法有反应的概率可以更大。换句话说,尽管预测患者具有相对较短的存活期持续时间,但更可能通过用抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂进行治疗来延长患者的存活期。

[0072] 因此,本发明的第二方面涉及鉴定比其他患者更可能对用抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂进行治疗有反应的患者。本发明的此方面提供了患者亚组(例如,HCC患者亚组)的鉴定,其中所述亚组由生物标志或生物标志组合的存在或值来定义,并且其中预测所述亚组内的患者比所述亚组外的患者(即,与不表现出所定义的一个或多个生物标志的患者相比)对抗ICOS和/或抗TReg免疫疗法更具反应性。

[0073] 在此第二方面,本发明提供了一种确定患者的癌性实体瘤对抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂有反应的可能性的方法,所述方法包括

[0074] 提供从所述患者获得的肿瘤核心组织的样品,以及

[0075] 确定所述样品中的以下生物标志中的一个或多个:

[0076] (i) ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS⁺FOXP3⁺双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率,

[0077] (ii) 每个ICOS⁺FOXP3⁻细胞与其最近的ICOS⁺FOXP3⁺细胞之间的平均距离,

[0078] (iii) 呈ICOS阳性的FOXP3阳性细胞的比例,和

[0079] (iv) ICOS阳性细胞的密度,其中

[0080] 所述患者对所述抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂有反应的可能性较大由以下指

示:

[0081] ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS F0XP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率较大,

[0082] 每个ICOS阳性F0XP3阴性细胞与其最近的ICOS+F0XP3+阳性细胞之间的平均距离较短,

[0083] 呈ICOS阳性的F0XP3阳性细胞的比例较高,和/或

[0084] ICOS阳性细胞的密度较高。

[0085] 因此,使用以上生物标志中的一个或多个来确定患者的癌性肿瘤对抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂有反应的可能性。可以确定患者相对于其他患者对治疗有反应的可能性是增加还是降低,和/或可以对反应的可能性进行数值估计。

[0086] 任选地,所述方法包括将所述一个或多个生物标志与相应的参考值进行比较,其方式与针对本发明的第一方面所述的方式相同并且如本文别处所举例说明的。计算参考患者群体的参考值,例如,可以将针对HCC患者确定的生物标志与来自HCC患者群体的参考值进行比较。因此,相对于参考群体对治疗的反应的预期,确定对治疗有反应的可能性增加或降低。

[0087] 方法可以进一步包括将患者鉴定为对免疫疗法有反应的可能性增加,从而选择抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂来治疗所述患者。因此,以上生物标志中的一个或多个可以用于鉴定更可能从抗ICOS和/或抗TReg免疫疗法中受益的患者,并且任选地相应地选择用抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂进行治疗的患者。例如,在TME中显示出ICOS+细胞数量增加超过所定义的参考值的HCC患者可以被鉴定为适合于用抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂进行治疗。任选地,然后将抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂开具处方和/或施用给患者。

[0088] 在生物标志读数指示患者不太可能对免疫疗法有反应(非反应者)的情况下,可以推荐此患者进行不同的治疗。可替代地,此类生物标志读数可以指示患者应当用抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂与一种或多种其他治疗进行组合治疗,在所述组合中更可能获得反应。例如,一些治疗可以影响本文所述的生物标志,并且可以导致生物标志在指示免疫疗法作用增加的方向上变化。免疫疗法可以与这种其他治疗组合施用,多种治疗一起(同时)或以任何顺序依次施用。图1。

[0089] 在第三方面,本发明涉及用抗ICOS和/或抗TReg免疫疗法治疗癌症患者,其中所述患者由本文所述的生物标志来鉴定,并且涉及用于治疗由本文所述的生物标志鉴定的患者的抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂。可以提供包含抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂的药物组合物以用于此类患者。此外,抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂可以用于制造用以治疗这种患者的癌性实体瘤的药物。治疗可以包括延长患者的存活期。

[0090] 根据本发明的此第三方面的方法包括治疗患者的癌性实体瘤,其中所述方法包括

[0091] 将患者鉴定为对抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂有反应的可能性增加,其中所述患者被或已经被鉴定为如本发明的第二方面中所述的那样。因此,例如,可以由来自肿瘤的以下生物标志读数中的一个或多个来鉴定患者:

[0092] ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS F0XP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率,其中所述比率高于参考值,

[0093] 每个ICOS阳性F0XP3阴性细胞与其最近的ICOS阳性F0XP3阳性细胞之间的平均距

离,其中所述距离小于参考值,

[0094] 呈ICOS阳性的FOXP3阳性细胞的比例,其中所述比例高于参考值,以及ICOS阳性细胞的密度,其中所述密度高于参考值,以及

[0095] 向患者施用抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂。

[0096] 因此,使用抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂来治疗患者的癌性实体瘤,其中已经确定肿瘤包括所定义的生物标志中的一个或多个。因此,在用抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂进行治疗之前,可以已经确定先前从患者获得的肿瘤核心组织的样品中的生物标志中的一个或多个,以通过与如本文所述的生物标志的参考值进行比较来指示疗法的适合性。以HCC为例,肿瘤可以已经被确定为包括以下生物标志中的一个或多个:

[0097] ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS FOXP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率,其中所述比率高于0.1,

[0098] 每个ICOS阳性FOXP3阴性细胞与其最近的ICOS阳性FOXP3阳性细胞之间的平均距离,其中所述距离小于105 μm ,

[0099] 呈ICOS阳性的FOXP3阳性细胞的比例,其中所述比例高于一半,以及

[0100] ICOS阳性细胞的密度,其中所述密度高于120个细胞/ mm^2 。

[0101] 对于与HBV相关的HCC,或者对于2期或更晚期HCC,肿瘤可以已经被确定为包括以下生物标志中的一个或多个:

[0102] ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS FOXP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率,其中所述比率高于0.1,

[0103] 每个ICOS阳性FOXP3阴性细胞与其最近的ICOS阳性FOXP3阴性细胞之间的平均距离,其中所述距离小于105 μm ,

[0104] 呈ICOS阳性的FOXP3阳性细胞的比例,其中所述比例高于一半,以及

[0105] ICOS阳性细胞的密度,其中所述密度高于100个细胞/ mm^2 。

[0106] 本发明的第四方面涉及通过检测本文所述的一个或多个生物标志的变化来测量癌症患者对抗ICOS和/或抗TReg免疫疗法的反应。此类变化可以代表反应标签,并且可以比外部可见的临床征象明显更早地可检测到,提供治疗是否实现将抑制疾病进展的生物效应的有用指示。

[0107] 监测患者对已经被施用以治疗癌性实体瘤的抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂的反应的方法可以包括

[0108] 提供在施用抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂之后从患者获得的肿瘤核心组织的测试样品,

[0109] 确定所述样品中的以下生物标志中的一个或多个:

[0110] (i) ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS FOXP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率,

[0111] (ii) 每个ICOS+FOXP3-细胞与其最近的ICOS+FOXP3+细胞之间的平均距离,

[0112] (iii) 呈ICOS阳性的FOXP3阳性细胞的比例,和

[0113] (iv) ICOS阳性细胞的密度,

[0114] 将所述测试样品中的所述一个或多个生物标志与从所述患者获得的肿瘤核心组织的早期样品中的相同的一个或多个生物标志进行比较,以及

[0115] 确定所述一个或多个生物标志是否已经发生变化。

[0116] 在施用免疫治疗剂之后,在允许免疫治疗剂发挥作用一段时间之后获得测试样品。例如,可以在免疫治疗剂的所述施用之后至少3天采集测试样品。优选在所述施用的2、4、6或8周内采集测试样品。

[0117] 在患者治疗的早期时间点,在获得测试样品的时间之前,优选在免疫治疗剂的所述施用之前,从患者获得早期样品。可以在免疫治疗剂的所述施用之前(任选地在之前不久,例如之前长达14天)、之时(例如,在同一天)或之后不久(例如,在次日)获得早期样品。早期样品可以是在用免疫治疗剂进行治疗的过程开始之前或开始时(例如,之前长达14天)、在最初施用免疫治疗剂之时(例如,在同一天)或之后不久(例如,在次日)获得的初始样品。

[0118] 通常在与之进行比较的早期样品之后至少2周获得测试样品。

[0119] 由此可以评估患者是否对免疫治疗剂有反应,其中反应由来自早期样品的以下变化中的一个或多个来指示:

[0120] ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS⁺FOXP3⁺双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率降低,

[0121] 每个ICOS⁺FOXP3⁺细胞与其最近的ICOS⁺FOXP3⁺细胞之间的平均距离增加,

[0122] 呈ICOS阳性的FOXP3阳性细胞的比例降低,以及

[0123] ICOS阳性细胞的密度降低。

[0124] 实际上,使用早期样品来提供所述一个或多个生物标志的参考值,然后将来自测试样品的所述一个或多个生物标志与其进行比较。

[0125] 所述方法可以包括观察测试样品中所述生物标志中的一个或多个与早期样品相比的变化,其中所述变化指示患者对免疫疗法有反应。

[0126] 本发明的此第四方面的方法可以用于连续评估或监测进行抗ICOS和/或抗TReg免疫疗法的患者,因此在治疗过程期间任选地周期性地重复,其中将所述一个或多个生物标志的读数与先前的读数进行比较,从而绘制所述一个或多个生物标志随时间的变化。除了优选在向患者第一次施用抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂之前获得的初始样品之外,还可以任选地在每次施用抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂之后,或者仅在某些施用之后(例如,在第一次施用之后并且再次以大约每月、每两个月或每三个月的间隔,其中任选地对组织取样进行定时以与患者到诊所就诊以进行治疗相一致)采集样品以用于生物标志的测量。因此,可以将来自测试样品的读数与来自多个早期样品的读数进行比较,以便监测生物标志在延长的时间段内的变化。因此,方法可以包括检测测试样品中生物标志中的一个或多个与早期样品相比的变化,所述变化任选地在一系列多个样品中检测(将测试样品与多个早期样品(例如,在数周或数月的延长时段内的样品)进行比较),以及检测反应标签(优选地,与多个早期样品相比在测试样品中观察到的持续反应标签),其中反应标签指示患者对治疗有反应。

[0127] 生物标志读数可以用于告知关于患者进一步治疗的临床决定。在检测到阳性信号(所述一个或多个生物标志指示患者对治疗有反应)的情况下,可以继续抗ICOS和/或抗TReg免疫疗法。如果不是这种情况,或者如果在延长的治疗期间不再是这种情况,则可以终止免疫疗法,并且患者可以任选地切换到替代治疗。可替代地,可以指示用一种或多种另外

的治疗来补充免疫疗法。任选地,这种替代治疗的选择由在样品中确定的生物标志来指导。当然,任何此类治疗决定也将考虑患者的疾病或临床反应的任何其他症状或征象,但是生物标志读数提供了对治疗的药效学的有价值的早期洞察,因此提供了重要的信号以审查和更新患者的预后并指导医师的决策。

[0128] 通常,预期多个生物标志的变化将趋向于彼此相同的方向,例如,所有变化都指示对治疗有反应,而不是一个生物标志强烈指示对变化有反应,而另一个生物标志则指示相反。通过根据公式对多个生物标志读数的输出进行积分可以获得更高的准确度和更大的预测价值,其中如本文别处所述,在样品之间和/或与参考值比较公式的输出。

[0129] 可以观察反应标签,其中一个或多个生物标志读数或由其计算的公式指示对治疗的反应,反应标签通过以下来鉴定:

[0130] 测量到ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS FOXP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率的降低,

[0131] 测量到每个ICOS单阳性细胞与其最近的ICOS FOXP3双阳性细胞之间的平均距离的增加,

[0132] 测量到呈ICOS阳性的FOXP3阳性细胞的比例的降低,和/或

[0133] 测量到ICOS阳性细胞的密度的降低。

[0134] 可以通过比较治疗之前和之后的生物标志读数来鉴定变化。

[0135] 当观察到在测试样品中存在反应标签时,可以给患者开具用抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂继续治疗的处方。

[0136] 生物标志的变化程度可以用于告知疗法的给药和/或时间表。可以反复地调整治疗以最大化生物标志的积极变化,即指示对治疗有反应的变化,基于最近的生物标志数据调整所施用的治疗剂的量和/或时机。

[0137] 如果生物标志没有积极变化,即生物标志不指示患者对治疗有反应,特别是如果在重复取样的长期监测中未观察到积极变化,则可以中断所述患者的抗ICOS和/或抗TReg癌症免疫疗法治疗,或者可以改变治疗方案,例如从单药疗法治疗改变为组合治疗。

[0138] 反应标签可以指示抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂已经使患者倾向于对其他治疗(如免疫检查点阻断剂)有反应。这允许组合疗法的定制方法,其中选择性地开具另一治疗剂的处方以用于治疗检测到反应标签的患者。生物标志中的一个或多个的变化可以指示例如肿瘤对其他治疗(除现有的抗ICOS和/或抗TReg免疫疗法之外)(如施用另一治疗剂)的易感性增加,并且可以监测生物标志以确定这种其他治疗的适当施用时机。这种其他治疗的例子包括施用不同的抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂、免疫检查点阻断剂、化疗剂、靶向疗法(如抗血管生成和酪氨酸激酶抑制剂)或放疗(或多种此类其他治疗的组合)。可以使用诱导免疫细胞死亡的药剂。任何这种其他治疗都可以与先前的抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂组合施用给患者(即,先前的治疗不中断),或者可以替代它(即,先前的治疗中断,患者切换到其他治疗)。

[0139] 在第五方面,本发明涉及确定用于在新的患者亚组中使用生物标志的参数,包括将一个或多个生物标志与患者预后或对治疗的反应相关联,以及鉴定生物标志的定量值,所述定量值允许在肿瘤预后或对治疗的反应方面区分患者。如此确定的参考值可以用于本发明的其他方面,如疾病预后和选择用于治疗的患者。

[0140] 本发明的此第五方面提供了一种鉴定用于根据患者的预测的预后或对抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂的预测的反应对患有癌性实体瘤的患者进行分类的参考值的方法,所述方法包括

[0141] 提供从患有单一肿瘤类型(相同组织学和/或分子类型(任选组织学未定性)的癌性实体瘤)的患者群体(统计学上有意义的数量,例如至少20名、至少100名)中的每一名获得的肿瘤核心组织的样品,已知所述患者的疾病结局或者已知所述患者对所述抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂的反应,

[0142] 确定所述样品中每一个中的以下生物标志中的一个或多个:

[0143] (i) ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS FOXP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率,

[0144] (ii) 每个ICOS单阳性细胞与其最近的ICOS FOXP3双阳性细胞之间的平均距离,

[0145] (iii) 呈ICOS阳性的FOXP3阳性细胞的比例,和

[0146] (iv) ICOS阳性细胞的密度,

[0147] 将所述一个或多个生物标志中的每一个的数据与每名患者的疾病结局或对所述抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂的反应的数据配对,以及

[0148] 将所述一个或多个生物标志中的每一个的数据分组以鉴定数值截止值,所述数值截止值定义了疾病结局或对所述抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂的反应的两组统计学上显著的数据,

[0149] 其中所述截止值表示用于根据患者的预测的预后或对所述抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂的预测的反应对患有相同类型的癌性实体瘤的患者进行分类的参考值。

[0150] 在此所述的生物标志中的每一个都可以单独使用或与一个或多个其他生物标志组合使用。癌症的病因和进展是多因素的,并且使用生物标志的组合可以获得更大的预测价值。统计建模方法(如逻辑回归)可以用于确定哪些生物标志和生物标志组合提供最佳预测价值。可以组合多个生物标志的参考值以提供公式,通过所述公式可以根据患者的预后和/或对治疗的反应的可能性对患者进行分类。这种公式可以应用于确定患者是否可能从抗ICOS和/或抗TReg疗法中受益,因此可以应用于鉴定用抗ICOS和/或抗TReg治疗剂进行治疗的患者,其中满足或超过根据公式计算的参考值的患者接受用抗ICOS和/或抗TReg治疗剂进行的治疗。

[0151] 现在将参考附图更详细地描述本发明的实施方案。本领域技术人员仅使用常规实验就将认识到或者将能够确定本文所述的本发明的具体实施方案的许多等同方案。此类等同方案旨在落入所附权利要求的保护范围内。

附图说明

[0152] 图1是根据本发明的方法的流程图,其中生物标志用于选择用抗ICOS癌症免疫疗法进行治疗的患者,显示了数据收集过程的实施方案,以评估癌症免疫环境并预测确诊为HCC的患者对抗ICOS治疗的资格和需要。向生物标志读数积极的患者(“是”组)施用抗ICOS抗体KY1044,任选地与其他治疗组合。不给生物标志读数消极的患者(“否”组)开具抗ICOS疗法的处方,或者向其给予抗ICOS疗法与一种或多种其他治疗的组合(例如,施用将具有影响生物标志并超过“是/否”阈值的效果的其他药剂)。

[0153] 图2是显示TME中ICOS FOXP3双阳性TReg的密度相对于正常邻近组织(肿瘤周围)显著增加的条形图。

[0154] 图3是显示TME中ICOS FOXP3双阳性TReg与总TReg(所有FOXP3+)细胞的比率相对于正常邻近组织(肿瘤周围)显著增加的条形图。

[0155] 图4显示了总存活率随时间的Kaplan-Meier曲线,根据HCC肿瘤活检的TME中ICOS阳性细胞的密度进行分离($n=142$ 名患者)。来自台湾大学队列的142个HCC样品根据每 mm^2 的ICOS细胞密度的最高四分位数(虚线)对下3个四分位数(实线)进行分层,表示120个细胞/ mm^2 的截止密度。对数秩(Mantel-Cox)检验 $p<0.05$ 。

[0156] 图5显示了总存活率随时间的Kaplan-Meier曲线,根据HCC肿瘤活检的TME中ICOS+FOXP3+与总FOXP3+细胞比率进行分离($n=142$ 名患者)。使用0.5的截止比率来分离高(虚线)与低(实线)比率群体。对数秩(Mantel-Cox)检验 $p=0.0451$ 。

[0157] 图6显示了总存活率随时间的Kaplan-Meier曲线,根据HBV感染的HCC肿瘤活检的TME中ICOS阳性细胞的密度进行分离($n=87$ 名患者)。来自台湾大学队列的87个HCC样品根据每 mm^2 的ICOS细胞密度的最高四分位数(虚线)对下3个四分位数(实线)进行分层,表示100个细胞/ mm^2 的截止值。对数秩(Mantel-Cox)检验 $p<0.05$ 。

[0158] 图7显示了总存活率随时间的Kaplan-Meier曲线,根据AJCC 2期HCC肿瘤样品的TME中ICOS阳性细胞的密度进行分离($n=41$ 名患者)。来自台湾大学队列的41个AJCC 2期HCC样品根据每 mm^2 的ICOS细胞密度的最高四分位数(虚线)对下3个四分位数(实线)进行分层,表示100个细胞/ mm^2 的截止值。对数秩(Mantel-Cox)检验 $p<0.01$ 。

[0159] 图8显示了无复发存活率(%RFS)的Kaplan-Meier曲线,根据AJCC 2期HCC肿瘤活检的TME中ICOS阳性细胞的总密度进行分离($n=41$ 名患者)。来自台湾大学队列的41个AJCC 2期HCC样品根据每 mm^2 的ICOS细胞密度的最高四分位数(虚线)对下3个四分位数(实线)进行分层,表示100个细胞/ mm^2 的截止值。对数秩(Mantel-Cox)检验 $p<0.05$ 。

[0160] 图9显示了总存活率随时间的Kaplan-Meier曲线,根据TME中ICOS单阳性细胞与到其最近的ICOS FOXP3双阳性细胞的平均距离进行分离。来自台湾大学队列的142个HCC样品根据中值平均距离进行分层:低距离(实线, $<105\mu\text{m}$)与高距离(虚线, $\geq 105\mu\text{m}$)。对数秩(Mantel-Cox)检验 $p<0.05$ 。

[0161] 图10显示了总存活率随时间的Kaplan-Meier曲线,根据HCC的TME中ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS FOXP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率进行分离。来自台湾大学队列的142个HCC样品根据ICOS单阳性细胞30 μm 内多于或少于0.1个双阳性细胞的平均值进行分层。低发生率(实线, <0.1)与高发生率(虚线, ≥ 0.1)。对数秩(Mantel-Cox)检验 $p<0.05$ 。

[0162] 图11显示了在施用抗ICOS单克隆抗体KY1044之前和之后人类患者中ICOS FOXP3双阳性细胞与总FOXP3阳性细胞的比率(表示所有TReg内的ICOS+TReg比例)的降低。A)队列1(0.8mg平剂量,Q3W),平滑肌肉瘤患者;B)队列2(2.4mg平剂量,Q3W),患有原发灶不明癌(圆形)、肾细胞癌(三角形)和胰腺癌(正方形)的患者;C)队列3(8mg平剂量,Q3W),患有转移性前列腺癌的患者;D)队列4(24mg平剂量,Q3W),患有胰腺癌(圆形)和食管癌(三角形)的患者;以及E)队列5(80mg平剂量,Q3W),患有结肠腺癌(圆形)、胰腺癌(三角形)和间皮瘤(正方形)的患者。

[0163] 图12 (A) 是组织切片图像,在其上已经绘制了限定肿瘤核心的边界,限定了大约2cm x 1cm的区域,其包括超过一半的组织切片。标记非肿瘤特征以从肿瘤核心区域中排除。仅包括标记的边界内的肿瘤组织作为TME进行评估。

[0164] (B) 是 (A) 的区域的放大。IHC染色是可见的,包括对所有细胞核染色的苏木精染料,以及分别用于ICOS和FOXP3的两种不同色原的深色染色剂。

[0165] (C) 是与 (B) 相同的视图,另外显示了代表ICOS FOXP3双阳性细胞(通过双重染色鉴定)的方形框和代表ICOS单阳性细胞(仅通过ICOS特异性染色鉴定,FOXP3阴性)的圆圈。“最近邻”线将每个ICOS单阳性细胞连接到其最近的ICOS FOXP3双阳性细胞。并非所有的ICOS FOXP3双阳性细胞都被连接,因为组织中的一些ICOS FOXP3双阳性细胞不是与任何ICOS单阳性细胞最近的ICOS FOXP3双阳性细胞。

[0166] (D) 是 (C) 的区域的放大。测量TME中每个ICOS单阳性细胞与ICOS FOXP3双阳性细胞之间的距离。从每个ICOS单阳性细胞到ICOS FOXP3双阳性细胞的最短距离(即,到最近的ICOS FOXP3双阳性细胞的距离)由连接线指示。显示了从ICOS单阳性细胞的子集到其最近的ICOS FOXP3双阳性细胞的单独距离测量值,这些测量值分别为50.7、36.6、45.4和39.5 μ m-将记录每个ICOS单阳性细胞的此类测量值。使用Halo®软件包测量这些距离。

[0167] 图13 (A) 是由图12 (A) 中的边界限定的肿瘤核心区域的Halo®图,标记了ICOS单阳性细胞(黑色)和ICOS FOXP3双阳性细胞(灰色),没有下面的组织图像。

[0168] (B) 是 (A) 的区域的放大。

[0169] (C) 是 (B) 的区域的放大,并且是图12 (C) 中所示的区域的Halo®图。显示了从每个ICOS单阳性细胞(圆形)到其最近的ICOS FOXP3双阳性细胞(正方形)的最近邻线。

[0170] 图14 (A) 是图12 (A) 所描绘的组织切片的区域的放大,该区域与图12 (B) 所示的区域重叠。

[0171] (B) 是与 (A) 相同的视图,另外显示了代表ICOS单阳性细胞(仅通过ICOS特异性染色鉴定,FOXP3阴性)的圆圈和代表任何ICOS单阳性细胞30 μ m内的ICOS FOXP3双阳性细胞(通过双重染色鉴定)的方形框。线将每个ICOS单阳性细胞连接到30 μ m内的ICOS FOXP3双阳性细胞。未标记不在任何ICOS单阳性细胞的30 μ m内的ICOS FOXP3双阳性细胞。未标记不在任何ICOS FOXP3双阳性细胞的30 μ m内的ICOS单阳性细胞。

[0172] (C) 是 (B) 的区域的放大。显示了ICOS单阳性细胞与30 μ m内的ICOS FOXP3双阳性细胞之间的示例性距离测量值。这些距离分别为7.4 μ m、7.6 μ m和15.6 μ m。将测量整个TME中从每个ICOS单阳性细胞到在其30 μ m内的每个ICOS FOXP3双阳性细胞的这些距离。使用Halo®软件包测量这些距离。

[0173] (D) 是对应于 (B) 的稍微放大的区域的Halo®图,没有下面的组织图像,并且标记了所有检测到的ICOS单阳性细胞(圆形)和ICOS FOXP3双阳性细胞(正方形)。线将每个ICOS单阳性细胞连接到30 μ m内的ICOS FOXP3双阳性细胞。

[0174] 图15 (A) 是组织切片图像,在其上已经绘制了限定肿瘤核心的边界,限定了大约2cm x 2cm的区域,其包括大部分组织切片。标记非肿瘤特征以从肿瘤核心区域中排除。仅包括标记的边界内的肿瘤组织作为TME进行评估。

[0175] (B) 是由 (A) 中的边界限定的肿瘤核心区域的Halo®图,标记了ICOS FOXP3双阳性细胞(灰色圆形)和FOXP3单阳性细胞(黑色三角形),没有下面的组织图像。

[0176] (C) 是 (B) 的区域的放大。

[0177] (D) 和 (E) 分别是 (C) 内的区域的扫描图像和Halo®图。圈出了从TME区域中排除的组织特征。IHC染色在 (D) 中是可见的,包括对所有细胞核染色的苏木精染料,以及分别用于ICOS和FOXP3的两种不同色原的深色染色剂。(E) 将ICOS FOXP3双阳性细胞标记为灰色圆形,并且将FOXP3单阳性细胞标记为黑色三角形,并且未显示下面的组织图像。

具体实施方式

[0178] 肿瘤样品的提供

[0179] 为了评估TME内的细胞组成、免疫环境和特定空间排列,在体外提供肿瘤组织的样品。样品可以从治愈性手术(切除肿瘤的手术)后切除的肿瘤获得,或从获自在体内残留的肿瘤的活检样品获得。考虑到通常可获得的更大体积的组织,为了便于分析,切除的组织是优选的,但是活检材料(例如,来自针穿活检)同样可以使用。细针活检是一种替代方法,尽管样品应当包含足够的肿瘤核心组织用于代表性分析,因此更大的取样(例如,切开活检)方法是优选的。可替代地,在体内成像系统允许在TME内直接原位评估生物标志的情况下,可以省略手术取样步骤。然而,一般说来,本发明的方法通常在体外样品上进行。

[0180] 除了构成大部分肿瘤核心的癌细胞之外,TME还包括各种免疫细胞,如各种亚型的T淋巴细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、树突状细胞和巨噬细胞。

[0181] 在临床活检中蛋白质表达的评估通常在福尔马林固定石蜡包埋(FFPE)载玻片上进行,以评估肿瘤特征和指示性预后标志物的表达。这些可以用于帮助为给定患者定制正确治疗或回顾性地通过鉴定新生物标志来区分对于给定疗法的反应者和非反应者患者。

[0182] 一旦已经获得组织样品(例如,从切除的组织或活检标本获得),通常就将对它进行处理以保持其完整性并将其准备用于测试。可以将组织固定在10%福尔马林中,随后包埋在石蜡中,标准块形为0.5x 1x 1cm。此方法的替代方法是新鲜冷冻程序,其中可以将组织包埋在最适切割温度(OCT)化合物中,并且在干冰中快速冷冻,之后转移到液氮中用于长期储存。FFPE方法提供了在室温下长期储存的益处,而新鲜冷冻是用于储存组织的更快速的方法,并且将抗原保持呈天然形式,但是需要使用干冰用于制备和运输以及液氮用于长期储存。

[0183] 可以提供组织样品的二维切片以用于测试。每名患者或每个肿瘤制备至少一个切片。任选地,可以从同一组织样品或从多个样品,例如从一个肿瘤的不同区域或从多个肿瘤制备多个切片。对于FFPE样品,将块装载到切片机上以切成直径在4-5微米之间的切片,并且封固到适合于染色的载玻片(通常标准大小为25mm x 75mm)上。以类似的方式经由低温恒温器切割和封固新鲜冷冻块,低温恒温器实质上是冷冻机中的切片机,允许切片在该过程期间保持冷冻。然后提供组织切片以用于测试以确定生物标志读数,例如通过免疫组织化学(IHC)和数字图像分析进行确定。

[0184] 可以限定组织切片中的肿瘤核心区域以用于评估。除了肿瘤组织之外,切除的组织通常还将包含非肿瘤组织。活检的组织也可以是这种情况,尽管活检样品可以简单地由肿瘤核心组织组成。肿瘤的范围通常由病理学家确定,病理学家可以限定组织样品中肿瘤的边缘。肿瘤内的区域(边缘向内>500μm)被称为肿瘤核心,并且肿瘤微环境是指此区域。TME可以与肿瘤周围基质形成对比,肿瘤周围基质被定义为从肿瘤边缘向外>500μm的组织

并且通常包含正常的非癌性组织,其可以具有或不具有肿瘤所来源的相同组织类型或器官。代表肿瘤边缘的边界可以直接绘制在物理IHC载玻片上(例如,在载玻片上手动绘制)或优选以电子方式绘制为组织切片的数字图像上的视觉叠加。肿瘤边缘通常是自由形状的,并且在两个维度上,在组织切片上,它可以表示为单个环,或者例如,在肿瘤/非肿瘤组织的多个斑块出现在切片中的情况下,可以包括多个环。组织切片的注释还可以限定待从TME中排除的一个或多个区域周围的边界,如伪影或组织褶皱。图12。

[0185] ICOS的检测

[0186] 人、小鼠和食蟹猴ICOS的序列可作为人NCBI ID:NP_036224.1、小鼠NCBI ID:NP_059508.2和食蟹猴GenBank ID:EHH55098.1从NCBI获得。由于本发明中的患者优选为人类患者,因此除非上下文另有规定,否则在本文中提及ICOS是指或包括人类ICOS。

[0187] ICOS是激活T细胞的标志物。可以通过检测细胞表面上的ICOS受体来鉴定ICOS阳性细胞。使ICOS结合剂(如抗体,例如抗ICOS克隆D1K2T)在允许试剂与ICOS(如果存在)之间结合的条件下与组织切片接触。该试剂自身是可检测的(例如,携带可检测标记),或者可通过将标记的第二试剂特异性地结合到抗ICOS试剂(例如,携带可检测标记的第二抗体)而间接地检测。例如,使用IHC,抗ICOS抗体(例如,D1K2T,其为兔IgG)结合至ICOS阳性细胞,并且通过携带可检测标记的第二抗体(例如,针对兔IgG Fc的抗体)进行检测。通过洗涤除去过量的未结合试剂,然后检测可检测标记以定位组织中的ICOS,从而鉴定ICOS阳性细胞的存在和位置。

[0188] ICOS阳性(ICOS+)细胞是表达如可使用如在此概述的此类方法检测的ICOS的细胞。ICOS阳性细胞可以表达除ICOS之外的其他标志物,如FOXP3。ICOS阳性细胞对FOXP3可以呈阴性,在这种情况下,它也可以被称为ICOS单阳性细胞(特别是当ICOS是在多种染色抗原中检测到的唯一抗原时)或被称为ICOS+FOXP3-(ICOS阳性FOXP3阴性)细胞。ICOS阳性细胞对FOXP3可以呈阳性,在这种情况下,它也可以被称为ICOS FOXP3双阳性细胞或ICOS+FOXP3+细胞。相反,ICOS阴性(ICOS-)细胞是使用如在此概述的此类方法在其上检测不到ICOS的细胞(例如,细胞在IHC中不表现出显著高于背景的ICOS标记)。

[0189] FOXP3的检测

[0190] FOXP3是TReg的标志物。可以通过检测细胞内的FOXP3来鉴定FOXP3阳性细胞。FOXP3是一种胞内分子,因此应当处理组织样品以暴露抗原,例如通过与洗涤剂一起孵育进行处理。使FOXP3结合剂(如抗体,例如抗FOXP3克隆236A/E7)在允许试剂与FOXP3(如果存在)之间结合的条件下与组织切片接触。该试剂自身是可检测的(例如,携带可检测标记),或者可通过将标记的第二试剂特异性地结合到抗FOXP3试剂(例如,携带可检测标记的第二抗体)而间接地检测。例如,使用IHC,抗FOXP3抗体(例如,克隆236A/E7)结合至ICOS阳性细胞,并且通过携带可检测标记的第二抗体进行检测。通过洗涤除去过量的未结合试剂,然后检测可检测标记以定位组织中的FOXP3,从而鉴定FOXP3阳性细胞的存在和位置。

[0191] FOXP3阳性(FOXP3+)细胞是表达如可使用如在此概述的此类方法检测的FOXP3的细胞。FOXP3阳性细胞可以表达除FOXP3之外的其他标志物,如ICOS。FOXP3阳性细胞对ICOS可以呈阴性,在这种情况下,它也可以被称为FOXP3单阳性细胞(特别是当FOXP3是在多种染色抗原中检测到的唯一抗原时)或ICOS-FOXP3+(ICOS阴性FOXP3阳性)细胞。FOXP3阳性细胞对ICOS可以呈阳性,在这种情况下,它也可以被称为ICOS FOXP3双阳性细胞或ICOS+FOXP3+

细胞。相反,FOXP3阴性(FOXP3⁻)细胞是使用如在此概述的此类方法在其上检测不到FOXP3的细胞(例如,细胞在IHC中不表现出显著高于背景的FOXP3标记)。

[0192] 免疫组织化学

[0193] 可以使用IHC对组织切片染色以可视化抗原。简言之,IHC涉及将组织切片与抗原特异性试剂(例如,抗体)一起孵育以允许试剂与其同源抗原结合,洗涤过量的未结合试剂,并且检测结合试剂的存在,从而可视化抗原在组织中的存在和位置。IHC可以使用直接连接的报告抗体直接进行,或者通过第一抗体的结合抗原,随后是连接或缀合第二抗体的结合抗原间接进行。虽然前者可以更具时效性,但后者可以提供更灵活的方法并具有信号放大的益处。IHC可以用多种不同的抗原特异性试剂在同一组织切片上多重地进行,以便使用针对不同抗原的不同信号/报告物/标记检测和定位多种不同抗原,例如荧光或酶多重IHC[29;30;31;32;33]。

[0194] IHC通常用于FFPE和新鲜冷冻组织的切片上。为了在FFPE载玻片上开始IHC过程,首先通过在二甲苯、乙醇和水中的一系列孵育除去组织上的石蜡。由于抗原表位被固定剂覆盖,FFPE载玻片通常需要经历称为抗原修复的过程,该过程分解固定剂亚甲基桥以“暴露”目的抗原,允许抗体结合。这可以通过两种主要方法实现:热诱导的表位修复(HIER)和蛋白酶诱导的表位修复(PIER)[34;35]。在HIER中,将封固组织的载玻片在洗涤前煮沸几分钟,并且通常通过使用压力锅、微波炉或蔬菜蒸锅进行,而PIER是在洗涤前在37℃下与特定酶(如胰蛋白酶或蛋白酶K)一起孵育几分钟的过程。注意,每个过程的确切时间需要根据所使用的技术和被修复的抗原来优化,以进行最佳修复并避免损伤组织。相比之下,新鲜冷冻载玻片不需要抗原修复步骤,但是如果针对胞内靶标(如FOXP3)进行染色,则需要短的固定步骤。这通常用醇进行,与多聚甲醛不同,醇不掩蔽抗原表位。

[0195] 为了针对胞内靶标(如FOXP3)进行染色,将FFPE和固定的新鲜冷冻载玻片在洗涤剂(如0.25% Triton-X 100的PBS溶液)中在室温下孵育15-30分钟,之后洗涤。然后通过室温下与封闭缓冲液一起孵育1小时来封闭组织以防止第一抗体的非特异性结合。组织中的内源性碱性磷酸酶(AP)在由冷冻组织制备的载玻片中也可能普遍存在,并且在此阶段需要用左旋咪唑封闭。一旦组织样品被封闭,然后就可以用抗原特异性第一抗体(抗ICOS和抗FOXP3)对目的抗原染色。注意,需要确认抗原特异性抗体以用于IHC染色,因为它们需要按照上述过程结合靶标。第一抗体必须对目的靶标上的给定表位具有特异性,并且必须不与其他非相关靶标结合以避免背景染色或假阳性染色。抗体特异性的最令人信服的证据是在敲除组织或细胞中缺乏对所讨论抗原的结合。通过洗涤除去过量的未结合抗体。对于显色IHC,接下来应当通过在过氧化氢的甲醇溶液中孵育来封闭载玻片的过氧化物酶活性。如果未直接标记第一抗体,则孵育报告物缀合的第二抗体,并且在最后的洗涤步骤后检测报告物。

[0196] 使用不同的报告物可以提供不同的优点和缺点。显色IHC利用催化底物转化为不溶性有色沉淀物的酶连接部分,从而允许可视化给定抗原[29;30]。染色是永久性的,不可能随时间降解,并且可以与组织学染料(如苏木精和伊红)平行使用。然而,由于可商购的酶和酶底物的数量少,只能评估少量的抗原。免疫荧光(IF)IHC使用与荧光部分连接的抗原特异性抗体,从而允许平行使用增加数量的染色标志物。此方法的缺点包括当评估多种抗原时信号随时间劣化和荧光团之间的光谱重叠[31;33]。出于本发明的目的,两种形式的IHC

对于针对ICOS和FOXP3进行染色都是绰绰有余的。作为使用显色IHC的染色过程的例子,应当使用不同物种的两种第一抗体(例如小鼠和绵羊IgG),随后使用与辣根过氧化物酶(HRP)或碱性磷酸酶(AP)缀合的靶向两种不同物种的第一抗体的两种第二抗体(抗小鼠和抗绵羊)来对组织针对ICOS和FOXP3两者进行染色。然后通过应用与HRP或AP反应的两种不同染料(例如DAB和BCIP/NBT,分别将组织染成棕色和蓝色/黑色)可以揭示ICOS和FOXP3的表达。

[0197] 连续染色免疫荧光(如芯片细胞术(chipcytometry))是一种能够经由用与FFPE或新鲜冷冻组织上的荧光部分连接的抗原特异性抗体进行染色来定量地分析多种抗原的方法。荧光可以用高动态范围成像结合人工智能软件进行评估,以生成切片中细胞类型的分析[36]。如前所解释,新鲜冷冻切片不需要抗原修复,因此使用此方法产生比FFPE组织更好的质量结果。然而,芯片细胞术技术在FFPE载玻片上仍然是可能的,并添加了类似于此分析所需的暴露抗原的抗原修复步骤。在此之后,然后FFPE和新鲜得到的组织的组织都可以通过标准方法重新固定到细胞术芯片中。然后可以以与上文针对使用五种直接标记的第一抗体的标准IHC所述的方法类似的方法对组织针对多达五种单独的抗原进行染色。例如,直接与两种不同荧光团(例如APC和GFP)缀合的靶向ICOS和FOXP3的两种第一抗体将允许在分析时区分组织中的ICOS和FOXP3抗原表达。然后可以评估组织中的空间排列,优选通过软件辅助。此技术与标准IHC之间的一个主要区别是固定过程使组织稳定,允许在室温下储存长达2年。另外,这允许使组织脱色以便在不受到损伤的情况下猝灭荧光抗体,允许对组织针对另外的五种抗原进行再次染色。通过重复染色和脱色的过程,几乎无限的蛋白质生物标志物可以在同一载玻片上以高清晰度和低背景荧光染色。

[0198] 质量细胞术成像(Mass Cytometry Imaging,MCI)是上述标准酶或荧光IHC方法的替代方法。成像质量细胞术(Imaging Mass Cytometry,IMC)和多重离子束成像(MIBI)是两种形式的新型质量细胞术成像,其可以提供给定区域中来自FFPE和新鲜冷冻样品两者的多种抗原的极其详细的表达[37;38]。在IMC中,用金属标记的抗原特异性第一抗体对组织染色,然后通过用集中激光束连续消融非常小的组织区域(例如, $1\mu\text{m}^2$)并经由使用细胞术飞行时间(Cytometry Time-Of-Flight,CyTOF)检测它们的比质量来分析特定金属离子的比例来评估每种抗原的表达。可替代地,使用MIBI,该方法非常类似,除了使用氧气双等离子体管一次离子束来将组织光栅化,连续消融薄层并释放金属同位素作为离子[39;40;41;42;43]。在两种方式中,每个切片中抗原特异性抗体的量都可以经由将金属标签的比质量定量到1Da的分辨率来评估,然后使用获得的信息重建整个组织的高度详细的数字图像。例如,按照与针对标准IHC所概述的染色过程类似的染色过程,并且如果需要使用抗原修复,用与稀土重金属同种型(如 ^{102}Pd 和 ^{209}Bi (许多其他重金属同种型将是可能的))连接的抗ICOS和抗FOXP3第一抗体对组织染色[44]。然后将使用上述方法逐步分析组织中ICOS和FOXP3的表达。由于此技术的分辨率,它可以用于评估本文所述的任何组织参数和生物标志。将同种型区分低至1Da的能力允许MCI平行分析多达40种标志物,同时避免光谱重叠的问题。因此,可以在同一载玻片上同时评估多种细胞类型。另外,该技术不受信号衰减或背景荧光的限制。

[0199] 数字图像分析

[0200] 可以通过显微术观察作为切片提供的组织样品。明场照明适合于可视化IHC的对比染料。可以扫描组织样品以提供组织的数字图像(例如,放大的明场图像)。图像放大(例

如,20倍或40倍)有助于分析。可以对图像进行注释以限定肿瘤核心区域,如所描述的。在本文所述的工作中,我们使用Hamamatsu Nanoscope数字扫描仪以明场模式在20倍放大率下扫描了5 μ m IHC染色的组织载玻片。

[0201] 可以对细胞进行计数并测量细胞间距离,以便从限定的肿瘤核心区域获得生物标志物读数。优选地,使用数字图像的软件分析来自动化细胞计数和距离测量。我们使用HALO®平台(Indica Labs)进行数字图像分析。简言之,该过程涉及3色原颜色解卷积以分离分别用于ICOS和FOXP3的IHC色原以及核复染。通过应用各个色原的加权光密度值形成细胞对象。然后使用确定的大小、形状和亚细胞区室染色参数鉴定每种阳性细胞类型。鉴定并扣除与细胞标记不对应的背景染色,使得通过高于背景水平的染色指示ICOS或FOXP3的存在。开发了分类器,并且将其集成到算法中以自动分割目的组织区域进行分析。将完成的算法以自动化且客观的方式应用于研究中的所有组织切片图像,以生成详细的逐细胞数据。

[0202] 细胞密度

[0203] TME中一类细胞的密度是那些细胞的总数除以TME的面积,并且通常表示为每mm²的细胞数。可以通过如本文别处所详述的检测标志物(如ICOS和FOXP3)在组织切片(或其图像)上鉴定目的细胞类型,允许对细胞进行计数。如所描述的,可以使用软件自动化计数以对指定视野中满足所定义的标准的所有对象进行计数,因此可以指示软件对肿瘤核心中的所有ICOS阳性细胞进行计数。在检测到除ICOS之外的其他细胞标志物的情况下,此细胞计数可以包括多个不同的群体,例如ICOS单阳性细胞和ICOS FOXP3双阳性细胞。ICOS阳性细胞的总数是在其上以高于背景的水平检测到ICOS的所有细胞,因此包括ICOS单阳性细胞以及除了其他检测到的标志物之外在其上存在ICOS的细胞(包括ICOS FOXP3双阳性细胞)。肿瘤核心(TME)区域也可以使用自动化软件来确定,如本文所述的通过围绕肿瘤核心绘制边界来指导软件。将TME中ICOS阳性细胞的数量除以所述TME的面积以得到密度。

[0204] TME中ICOS阳性细胞密度的增加是对抗ICOS免疫治疗剂(其也可以耗竭或抑制TReg,如抗ICOS抗体KY1044)有反应的生物标志物。实施例2、3、4和8说明了此生物标志物的确定和使用。

[0205] $(\text{ICOS} + \text{FOXP3}) / \text{总FOXP3}$ 比例

[0206] 此比例或比率通过以下方式来计算:确定TME中ICOS FOXP3双阳性细胞的数量,确定TME中FOXP3阳性细胞的数量,并且将前者除以后者。可以通过如本文别处所详述的检测标志物(ICOS、FOXP3)在组织切片(或其图像)上鉴定目的细胞类型,允许对细胞进行计数。如所描述的,可以使用软件自动化计数以对指定视野中满足所定义的标准的所有对象进行计数,因此可以指示软件对肿瘤核心中的所有FOXP3阳性细胞进行计数。在检测到除FOXP3之外的其他细胞标志物的情况下,此细胞计数可以包括多个不同的群体,例如FOXP3单阳性细胞和ICOS FOXP3双阳性细胞。FOXP3阳性细胞的总数是在其上以高于背景的水平检测到FOXP3的所有细胞,因此包括FOXP3单阳性细胞以及除了其他检测到的标志物之外在其上存在FOXP3的细胞(包括ICOS FOXP3双阳性细胞)。肿瘤核心(TME)区域也可以使用自动化软件来确定,如本文所述的通过围绕肿瘤核心绘制边界来指导软件。将TME中ICOS FOXP3双阳性细胞的数量除以TME中FOXP3阳性细胞的数量以得到比率。

[0207] 由于FOXP3是TReg的标志物,此比率可以被称为ICOS+TReg比例。高比例的呈ICOS+

的TReg是指示抑制免疫的TME的生物标志。此生物标志的存在表明免疫治疗剂可能有益于患者。在一个实施方案中,使用50% (比率0.5) 的截止值来对患者进行分类。因此,例如,如果来自患者的肿瘤样品的测试表明TME中多于50%的FOXP3+ (TReg) 细胞呈ICOS+,则选择HCC患者进行抗ICOS和/或抗TReg治疗。实施例1、2、8和9说明了此生物标志的确定和使用。

[0208] 细胞间接接近度

[0209] 已经通过检测如所描述的标志鉴定出细胞类型的位置后,可以测量那些细胞之间的距离。应当从核中心到核中心进行测量,核中心通常代表T细胞中细胞的中间,T细胞在TME中具有紧凑的圆形形状。

[0210] 每个ICOS单阳性细胞与其最近的ICOS FOXP3双阳性细胞之间的平均距离通过以下方式来确定:测量从ICOS单阳性细胞到ICOS FOXP3双阳性细胞的最短距离,对每个ICOS单阳性细胞重复此操作,并且将这些最短距离的总和除以ICOS单阳性细胞的数量。与本文所述的其他生物标志一样,在组织样品的肿瘤核心(TME)区域中(例如,在组织切片的数字图像上)进行测量。

[0211] ICOS FOXP3双阳性细胞与ICOS单阳性细胞之间的接近度表示强烈免疫抑制性细胞与TEff的接近度。紧密接近度(短距离)是指示抑制免疫的TME的生物标志。此生物标志的存在表明免疫治疗剂可能有益于患者。实施例5和8说明了此生物标志的确定和使用。

[0212] 区域影响

[0213] 我们将区域影响比率定义为ICOS单阳性细胞周围的限定影响半径内ICOS FOXP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率。

[0214] 该比率可以通过以下方式找到:鉴定TME中的所有ICOS FOXP3双阳性细胞,鉴定TME中的所有ICOS单阳性(即,ICOS+FOXP3-)细胞,然后选择在TME中的任何(一个或多个)ICOS单阳性细胞的限定半径内的ICOS FOXP3双阳性细胞的子集,并且将此子集中的数量除以ICOS单阳性细胞的数量。

[0215] 如果ICOS FOXP3双阳性细胞在任何ICOS单阳性细胞的限定半径内,则对其进行计数。如果它不在任何ICOS单阳性细胞的限定半径内,则不对它进行计数。仅对在多个ICOS单阳性细胞的限定半径内的ICOS FOXP3双阳性细胞进行一次计数。因此,计数细胞的此子集包括在TME中的任何ICOS单阳性细胞的限定影响半径内的所有ICOS FOXP3双阳性细胞。

[0216] 然后将ICOS FOXP3双阳性细胞的计数数量除以TME中ICOS单阳性细胞的数量。ICOS单阳性细胞的计数是包括TME中的所有ICOS单阳性细胞的总计数,无论这些细胞是否在其限定半径内具有ICOS FOXP3双阳性细胞。

[0217] 此计算提供了区域影响比率。30 μ m的半径是优选的。淋巴细胞的细胞大小的直径在7-15 μ m之间变化。直接的胞外环境影响细胞,并且在两个细胞在大约30 μ m内的情况下,可以预期经由可溶性细胞间介质和潜在地经由直接的细胞:细胞接触进行通信。免疫抑制性TReg(如ICOS FOXP3双阳性细胞)可以通过直接相互作用或通过释放免疫抑制性细胞因子(如IL10和TGF β)来抑制FOXP3阴性淋巴细胞。因此,为了鉴定在彼此的影响区域内的细胞,我们在目的细胞(在这种情况下为ICOS+FOXP3-细胞)周围限定了30 μ m的半径。本发明不受此半径的精确距离的限制,并且可以绘制更宽(例如,50 μ m)或更窄(例如,20 μ m)的区域,例如在所建议的30 μ m值的大约50% (15-45 μ m)或20% (24-30 μ m)内。实施例6和8说明了区域影响生物标志的确定和使用。

[0218] 癌性实体瘤

[0219] 癌症通常根据癌症起源的组织类型(组织学类型)或根据原发部位(癌症首次发生的身体位置)分类。癌症分类是世界卫生组织制定的国际标准ICD-0-3[45]的主题,将其通过引用并入本文。形态学轴线提供了从M-8000/0到M-9989/3的五位数字代码。前四位数字指示特定的组织学术语。斜线(/)之后的第五位数字是行为代码,其指示肿瘤是恶性的、良性的、原位的还是不确定的(良性的还是恶性的)。还提供了单独的一位数代码用于组织学分级(分化)。

[0220] 当考虑患者队列和由其计算的生物标志的参考值时,优选的是,参考值由患有相同类型肿瘤的患者计算。肿瘤可以是相同的生理类别(例如,所有癌、所有肉瘤或所有骨髓瘤,任选地包括跨越多于一个类别的混合型肿瘤),并且优选地是相同的组织类型,任选地通过ICD-0-3分类的形态学类型(例如,HCC M-8170/3)。肿瘤类型可以是例如肝癌例如HCC(例如,ICD-0-3M-8170/3、M-8171/3、M-8172/3、M-8173/3、M-8174/3或M-8175/3)、肾细胞癌(任选地肾细胞癌,例如透明细胞肾细胞癌)、头颈癌、黑素瘤(任选地恶性黑素瘤)、非小细胞肺癌(例如,腺癌)、膀胱癌、卵巢癌、宫颈癌、胃癌、胰腺癌、乳腺癌或睾丸生殖细胞癌,包括任何实体瘤如所列那些的转移。

[0221] 已经发现,如果患者的肿瘤已经转移到肝脏,则他们不太可能对全身性抗PD-1免疫疗法有反应。肝转移患者通常被排除在临床试验之外。Lee等人[46]表明抗原特异性TReg在肝脏中被激活,并且这些“肝脏训练的”TReg然后抑制患者中更广泛的抗肿瘤免疫反应。临床前研究表明,对于肝转移患者,肿瘤对免疫检查点抑制剂如抗PD-1的敏感性可通过耗竭TReg来改善。

[0222] 这一理论可扩展到转移到其他身体组织如骨和肺的HCC。此处,原发性肿瘤在肝脏中并且转移远距离,但是Lee等人描述的效应可能发生,即肿瘤抗原特异性TReg在肝脏中被激活并传播免疫抑制效应,从而降低了其他组织中的肿瘤对用免疫检查点抑制剂进行的治疗的敏感性。

[0223] 在本发明的实施方案中,肿瘤因此可以是:

[0224] -肝脏的原发性肿瘤(例如HCC);

[0225] -肝转移,即非肝起源的肿瘤,其起源于身体的其他地方并且已经转移至肝脏;或

[0226] -除肝脏以外的部位的肿瘤,其中所述患者在肝脏中也具有肿瘤转移。

[0227] 在本发明的实施方案中,患者是在肝脏中具有肿瘤的患者,所述肿瘤任选地是肝脏的原发性肿瘤(例如HCC)或肝转移。

[0228] 本发明可以涉及鉴别具有适合于用抗TReg免疫疗法进行治疗的此类肿瘤的患者,其中此类治疗还涉及施用免疫检查点抑制剂(例如,抗PD-1或抗PD-L1)。

[0229] 肝细胞癌(HCC)

[0230] 原发性肝癌目前是全球癌症死亡的第四大原因,并且大多数肝癌病例是HCC。HCC的致癌作用归因于肝脏的慢性炎症,主要来自乙型肝炎病毒(HBV)或丙型肝炎病毒(HCV)的感染或来自肝硬化。

[0231] 血液中甲胎蛋白(AFP)水平升高是原发性肝癌或生殖细胞肿瘤存在的已知指标。该蛋白通常由胎儿产生,并在健康成年男性和非妊娠健康女性的血液中检测不到。已发现AFP水平与HCC患者的存活率呈负相关。

[0232] 目前为HCC选择的治疗通常受疾病分期的影响。AJCC分期系统是美国癌症联合委员会开发的分类系统,用于描述癌症患者的疾病进展程度[28]。对于患有早期局部化HCC的患者,治愈目的的治疗方式包括切除、消融和肝移植,而对于患有中期局部化HCC的患者,图像引导的经导管肿瘤疗法如经动脉化疗栓塞已获得存活益处。然而,大多数HCC患者进展为或发展为原发性局部晚期或转移性疾病,并且适用于全身治疗[47]。

[0233] 索拉非尼,一种多激酶抑制剂,是首次批准用于HCC的全身性疗法[48,49]。自2016年以来,已经在III期临床试验中证明4种其他靶向药物(包括3种多激酶抑制剂和一种抗血管内皮生长因子受体(VEGFR)单克隆抗体)可为晚期HCC患者提供存活益处[50,51,52,53]。因此,多个国家的监管机构已经批准乐伐替尼作为HCC的一线全身性疗法,并且批准瑞戈非尼、卡博替尼和雷莫芦单抗(限于甲胎蛋白>400ng/mL的患者)用于治疗先前已经用索拉非尼治疗的HCC患者。抗PD-1抗体也已被用作晚期HCC的二线治疗。

[0234] 根据本发明的患者可患有与HBV和/或HCV感染相关或与HBV和/或HCV感染无关的HCC。HCC可以是任何分期(根据AJCC分期手册第8版确定),例如1期、2期或3期。患者可以是男性或女性,成人或儿童(<18岁)。患者可能已经或可能打算进行肿瘤的肝切除术。患者可能已经接受先前的HCC治疗,例如用索拉非尼和/或上述任何其他药剂进行的治疗。患者可以或可以不接受先前通过免疫疗法治疗癌症。

[0235] 预后

[0236] 总存活期(OS)定义为从疾病(如癌症)的诊断或治疗开始之日直到死亡的时间长度。当用于描述诊断患有该疾病的患者群体(而不是个体患者)时,OS通常表达为中值,表示从诊断或治疗开始之日到该组中一半患者仍存活的时间长度。在本文所述的HCC患者队列中,从肝切除术之日到患者死亡之日或其最后随访日计算OS。

[0237] 癌症中的无复发存活期(RFS)是指在癌症的初次治疗结束后患者存活而没有该癌症的任何征象或症状的时间长度。也称为无病存活期(DFS)、无复发存活期。

[0238] 无进展存活期(PFS)是指患者在治疗期间和治疗后带病生活但没有恶化的时间长度。

[0239] 进展时间(TTP)是指从诊断或治疗开始之日到疾病开始恶化或扩散到身体其他部分的时间长度。

[0240] 通常,对于队列内的所有患者(例如,在从中生成参考值的患者群体中)获得相同的一个或多个存活量度的数据,以便通过相同的一个或多个量度提供存活预后的数据。

[0241] 免疫治疗剂

[0242] 根据本发明的免疫治疗剂(用于免疫疗法的药剂)可以是抗ICOS药剂和/或它可以是抗TReg免疫治疗剂。抗ICOS药剂是结合ICOS,优选ICOS胞外结构域的药剂。抗TReg免疫治疗剂是耗竭或抑制TReg的免疫治疗剂,优选选择性地,即不耗竭或抑制其他T细胞如TEff,或者其中对这些其他T细胞的作用小于对TReg的作用。结合ICOS并耗竭或抑制TReg的药剂是抗ICOS和抗TReg免疫治疗剂。实例包括抗ICOS抗体KY1044和具有Fc效应子功能的其他抗ICOS抗体(例如,抗ICOS人类IgG1)。

[0243] 抗TReg免疫疗法包括抗体、其他生物药剂、小分子和细胞疗法。抗TReg免疫治疗剂可以是结合TReg并介导细胞效应子功能(例如经由效应子阳性Fc区)以耗竭或抑制TReg的抗体。抗TReg免疫治疗剂可以结合TReg的标志物,其在TReg上(例如,在TReg细胞表面上)选

择性或差异表达。此类表面标志物的例子包括ICOS、CD25、CCR8、CTLA-4和糖皮质激素诱导的TNF相关蛋白(GITR)。MHC展示的表位也可以代表此类标志物,并且提供了经由不包含胞外部分的胞内蛋白如FOXP3靶向TReg的机会。FOXP3和其他胞内标志物的消化肽呈现在MHC I类的TReg表面上,因此它们可被特异性结合MHC沟中展示的表位的药剂识别。Dao等人描述了结合胞内FOXP3的表位的TCR模拟抗体[54]。如Dao等人所总结的,已经描述的其他TReg免疫治疗剂包括针对CD25的靶向剂(例如,抗CD25抗体达克珠单抗)、针对IL-2受体的药剂(例如,IL-2毒素融合体,如作为IL-2和白喉毒素的融合蛋白的地尼白介素)、耗竭TReg的抗GITR抗体、抑制TReg功能的抗CTLA-4抗体和通过TReg破坏肿瘤归巢和/或调节T细胞可塑性的药剂。针对趋化因子受体-4(CCR4)的抗体显示选择性耗竭表达较高水平FOXP3的TReg,这导致NY-ESO-1肽特异性CD8+T细胞反应的增强。CCR4在激活的T细胞、T辅助细胞2、NK细胞、巨噬细胞和树突状细胞上表达,因此混淆了选择性效应。脱岩藻糖基化的人源化抗CCR4 mAb莫格利珠单抗(mogamulizumab)已经在各种癌症中进行了临床试验。趋化因子受体-8(CCR8)优先在乳腺癌患者的TReg上表达并与不良预后相关。CCR8也在组织驻留记忆CD8+T细胞和NK-T细胞上表达,因此,靶向该分子的治疗潜力有待研究。此外,还尝试了调节转化生长因子(TGF)- β ,其为TReg功能的关键细胞因子。已经证明环磷酸胺可抑制TReg。

[0244] 最近,WO 2020053833中描述了包含抗CD36和/或PPAR β 抑制剂的抗TReg疗法。其公开了减少受试者的瘤内TReg(例如CD4+细胞)数量的方法,其包括例如施用CD36抑制剂。在一些实施方案中,所述方法包括施用PPAR β 抑制剂。

[0245] 抗体

[0246] 优选的免疫治疗剂是抗体,它们可以是完整的免疫球蛋白或其包含免疫球蛋白结构域的抗原结合片段,无论是天然的还是部分或全部合成产生的。抗体可以是IgG、IgM、IgA、IgD或IgE分子或其抗原特异性抗体片段(包括但不限于Fab、F(ab')₂、Fv、二硫键连接的Fv、scFv、单结构域抗体、闭合构象多特异性抗体、二硫键连接的scfv、双抗体),无论是源自天然产生抗体的任何物种,还是通过重组DNA技术产生;无论分离自血清、B细胞、杂交瘤、转染瘤、酵母还是细菌。可以使用常规技术将抗体人源化。

[0247] 抗体包含抗体抗原结合位点(互补位),其结合并互补于其靶抗原的表位。术语“表位”是指由抗体结合的抗原区域。表位可能被定义为结构性的或功能性的。功能性表位通常是结构性表位的子集,并且具有直接促进相互作用的亲和力的那些残基。表位也可以是构象的,也就是由非线性氨基酸构成。在某些实施方案中,表位可以包括决定簇,即分子的化学活性表面基团(如氨基酸、糖侧链、磷酸基或磺酰基),并且在某些实施方案中,可具有特定的三维结构特征,和/或特定的电荷特征。

[0248] 抗体片段的例子包括:

[0249] (i) Fab片段,即由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂片段,即包括在铰链区通过二硫键连接的两个Fab片段的二价片段;

[0250] (iii) 由VH和CH1结构域组成的Fd片段;

[0251] (iv) 由抗体的单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段,

[0252] (v) dAb片段(Ward等人,(1989)Nature 341:544-546;将其通过引用以其整体并入本文),其由VH或VL结构域组成;以及

[0253] (vi) 分离的互补决定区(CDR),其保留特异性抗原结合功能。

[0254] 抗体的其他例子为包含重链二聚体(5'-VH-(任选的铰链)-CH₂-CH₃-3')且不含轻链的H2抗体。

[0255] 单链抗体(例如scFv)是常用的片段。多特异性抗体可由抗体片段形成。本发明的抗体可以适当地采用任何这样的形式。

[0256] 用木瓜蛋白酶消化整个免疫球蛋白产生两个相同的抗原结合片段(也称为“Fab”片段)和“Fc”片段(不具有抗原结合活性但具有结晶能力)。“Fab”当用于本文时指抗体片段,其包括重链和轻链中每一个的一个恒定区和一个可变区。本文的术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的C末端区,包括天然序列Fc区和变体Fc区。“Fc片段”是指通过二硫键保持在一起的两条H链的羧基末端部分。抗体的效应子功能由Fc区中的序列决定,该区域也由在某些类型的细胞上发现的Fc受体(FcR)识别。用胃蛋白酶消化抗体产生F(ab')₂片段,其中抗体分子的两个臂保持连接并包含两个抗原结合位点。F(ab')₂片段具有交联抗原的能力。

[0257] mAb²包含来自完整抗体的VH和VL结构域,其与修饰的恒定区融合,该恒定区已被工程化以形成称为“Fcab”的抗原结合位点。Fcab/mAb²形式背后的技术更详细地描述于WO 2008/003103中,并且将mAb²形式的描述通过引用并入本文。这种形式的进一步描述可以在WO 2006/072620、WO 2008/003116、WO 2009/000006和WO 2009/0132876中找到。

[0258] 当在本文中使用时,“Fv”是指抗体的保留抗原识别和抗原结合位点两者的最小片段。此区域由紧密非共价或共价缔合的一个重链可变结构域和一个轻链可变结构域的二聚体组成。在此构型中,每个可变结构域的三个CDR相互作用以将抗原结合位点限定在VH-VL二聚体的表面上。这六个CDR共同为抗体赋予抗原结合特异性。然而,即使单个可变结构域(或仅包含三个对抗原具有特异性的CDR的半个Fv)也具有识别和结合抗原的能力,但其亲和力和力低于整个结合位点。

[0259] 在Fab中,抗体抗原结合位点可以由一个或多个抗体可变结构域来提供。在一个例子中,抗体结合位点由单个可变结构域提供,例如由重链可变结构域(VH结构域)或轻链可变结构域(VL结构域)提供。在另一个例子中,结合位点包含VH/VL对或两个或更多个这样的对。因此,抗体抗原结合位点可以包含VH和VL。

[0260] 任选地,抗体免疫球蛋白结构域可以与另外的多肽序列和/或标记、标签、毒素或其他分子融合或缀合。抗体免疫球蛋白结构域可以与一个或多个不同的抗原结合区融合或缀合,从而提供能够结合第二抗原的分子。本发明的抗体可以是多特异性抗体,例如双特异性抗体,其包含(i)针对ICOS的抗体抗原结合位点和(ii)识别另一抗原的另一抗原结合位点(任选地抗体抗原结合位点,如本文所述)。

[0261] 抗体可变结构域包括互补决定区(CDR;即CDR1、CDR2、和CDR3)和框架区(FR)的氨基酸。因此,在每个VH和VL结构域内是CDR和FR。术语“高变区”、“CDR区”或“CDR”是指抗体可变结构域的区域,其在序列上是高变的和/或形成结构上确定的环。通常,抗体的抗原结合位点包括六个高变区:VH中的三个(HCDR1、HCDR2、HCDR3),以及VL中的三个(LCDR1、LCDR2、LCDR3)。抗体的重链和轻链的这些区域赋予抗体抗原结合特异性。VH结构域包含一组HCDR,并且VL结构域包含一组LCDR。VH是指重链的可变结构域。VL是指轻链的可变结构域。每个VH和VL通常由三个CDR和四个FR构成,按照以下顺序从氨基末端到羧基末端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。抗体可以包含抗体VH结构域,所述抗体VH结构域包含VH CDR1、CDR2和CDR3以及框架。它可替代地或还包含抗体VL结构域,所述抗体VL结构域包含VL

CDR1、CDR2和CDR3以及框架。根据本发明的抗体VH和VL结构域和CDR的例子列于形成本公开文本的一部分的所附序列列表和表格中。如本文所述,“CDR组”包含CDR1、CDR2和CDR3。因此,HCDR组是指HCDR1、HCDR2和HCDR3,而LCDR组是指LCDR1、LCDR2和LCDR3。除非另有说明,否则“CDR组”包括HCDR和LCDR。

[0262] CDR可以根据Kabat系统[55]、Chothia系统[56]或IMGT系统[57,58]定义。默认使用IMGT,所以除非相反地陈述,否则本文中的CDR和可变结构域编号是根据IMGT。

[0263] 根据本发明的抗体和其他生物药剂可以以分离或纯化的形式提供。分离的抗体或蛋白质是已经从其产生环境的组分(例如,天然的或重组的)中鉴定、分离和/或回收的抗体或蛋白质。例如,抗体或蛋白质基本上不含来自衍生抗体的细胞或组织来源的细胞物质或其他污染蛋白,或当化学合成时基本上不含化学前体或其他化学物质。术语“基本上不含细胞物质”包括抗体制剂,其中抗体与分离或重组产生抗体的细胞的细胞组分分离。因此,基本上不含细胞物质的抗体包括具有少于约30%、20%、10%或5%(干重计)异源蛋白(本文中也称为“污染蛋白”)的抗体制剂。当重组产生抗体时,其还优选基本上不含培养基,即培养基占蛋白制剂体积的小于约20%、10%或5%。当抗体通过化学合成产生时,其优选基本上不含化学前体或其他化学物质,即,其与化学前体或参与蛋白质合成的其他化学物质分离。因此,这种抗体制剂具有少于约30%、20%、10%、5%(按干重计)的化学前体或不是目的抗体的化合物。在优选的实施方案中,分离或纯化本发明的抗体。

[0264] 抗体可以包含与本文所述和/或所附序列列表中所示的任何抗体的VH结构域具有至少60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%或99%氨基酸序列同一性的VH结构域,和/或包含与任何那些抗体的VL结构域具有至少60%、70%、80%、85%、90%、95%、98%或99%氨基酸序列同一性的VL结构域。可用于计算两个氨基酸序列的%同一性的算法包括例如BLAST、FASTA或Smith-Waterman算法,例如采用默认参数。特定变体可以包括一个或多个氨基酸序列改变(氨基酸残基的添加、缺失、取代和/或插入)。

[0265] 可以在一个或多个框架区和/或一个或多个CDR中进行改变。任选地通过CDR诱变提供变体。改变通常不会导致功能丧失,因此包含由此改变的氨基酸序列的抗体可以保留结合抗原(例如ICOS)的能力。它可以保留与其中不进行改变的抗体相同的定量结合能力,例如在本文所述的测定中所测量的。包含由此改变的氨基酸序列的抗体可具有改进的结合抗原的能力。

[0266] 改变可以包括用非天然存在的或非标准的氨基酸替代一个或多个氨基酸残基,将一个或多个氨基酸残基修饰成非天然存在的或非标准的形式,或将一个或多个非天然存在的或非标准的氨基酸插入序列中。本文别处描述了本发明序列中改变的数目和位置的例子。天然存在的氨基酸包括20种“标准”L-氨基酸,通过它们的标准单字母码标识为G、A、V、L、I、M、P、F、W、S、T、N、Q、Y、C、K、R、H、D、E。非标准氨基酸包括可并入多肽主链中或由修饰现有氨基酸残基产生的任何其他残基。非标准氨基酸可以是天然存在的或非天然存在的。

[0267] 如本文所用的术语“变体”是指与亲本多肽或核酸相差一个或多个氨基酸或核酸缺失、取代或添加,但保留亲本分子的一种或多种特定功能或生物活性的肽或核酸。氨基酸取代包括其中氨基酸被不同的天然存在的氨基酸残基替代的改变。这样的取代可以被分类为“保守的”,在这种情况下,包含在多肽中的氨基酸残基被另一种天然存在的在极性、侧链功能或大小方面具有类似特征的氨基酸替代。这种保守取代是本领域熟知的。本发明涵盖

的取代也可以是“非保守的”,其中肽中存在的氨基酸残基被具有不同特性的氨基酸,如来自不同组的天然存在的氨基酸取代(例如,用丙氨酸取代带电荷或疏水性氨基酸),或可替代地,其中天然存在的氨基酸被非常规氨基酸取代。在一些实施方案中,氨基酸取代是保守的。当用于提及多核苷酸或多肽时,术语变体还涵盖指分别与参考多核苷酸或多肽相比(例如,与野生型多核苷酸或多肽相比)可在一级、二级或三级结构上变化的多核苷酸或多肽。

[0268] 在一些方面,可以使用通过使用本领域熟知的方法分离或产生的“合成变体”、“重组变体”或“化学修饰的”多核苷酸变体或多肽变体。“修饰的变体”可以包括保守的或非保守的氨基酸改变,如下所述。多核苷酸改变可导致由参考序列编码的多肽中的氨基酸取代、添加、缺失、融合和截短。一些方面使用包括插入变体、缺失变体或具有氨基酸取代的取代变体,包括通常不存在于作为变体基础的肽序列中的氨基酸和其他分子的插入和取代,例如但不限于通常不存在于人蛋白质中的鸟氨酸的插入。当描述多肽时,术语“保守取代”是指基本上不改变多肽活性的多肽氨基酸组成的改变。例如,保守取代是指用氨基酸残基取代具有类似化学特性(例如,酸性、碱性、带正电荷或带负电荷、极性或非极性等)的不同氨基酸残基。保守氨基酸取代包括用异亮氨酸或缬氨酸替代亮氨酸、用谷氨酸替代天冬氨酸、或用丝氨酸替代苏氨酸。提供功能类似的氨基酸的保守取代表是本领域熟知的。例如,以下六组各自含有彼此保守取代的氨基酸:1) 丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T);2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E);3) 天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);4) 精氨酸(R)、赖氨酸(K);5) 异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V);和6) 苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W) [59]。在一些实施方案中,如果改变、添加或缺失单个氨基酸或小百分比的氨基酸的单独取代、缺失或添加不降低肽的活性,则这些变化也可认为是“保守取代”。插入或缺失通常在约1至5个氨基酸的范围内。保守氨基酸的选择可以基于以下来选择:肽中要取代的氨基酸的位置,例如如果氨基酸在肽的外部并且暴露于溶剂,或者在内部并且不暴露于溶剂。

[0269] 可以基于以下来选择将取代现有氨基酸的氨基酸:现有氨基酸的位置,包括其暴露于溶剂(即,如果与未暴露于溶剂的内部定位的氨基酸相比,氨基酸暴露于溶剂或存在于肽或多肽的外表面上)。这种保守氨基酸取代的选择是本领域熟知的[60,61,62]。因此,可以选择适合于在蛋白质或肽外部的氨基酸(即暴露于溶剂的氨基酸)的保守氨基酸取代,例如但不限于,可以使用以下取代:Y被F取代,T被S或K取代,P被A取代,E被D或Q取代,N被D或G取代,R被K取代,G被N或A取代,T被S或K取代,D被N或E取代,I被L或V取代,F被Y取代,S被T或A取代,R被K取代,G被N或A取代,K被R取代,A被S、K或P取代。

[0270] 在替代的实施方案中,还可以选择适合于在蛋白质或肽内部的氨基酸的所涵盖的保守氨基酸取代,例如可以使用适合于在蛋白质或肽内部的氨基酸(即氨基酸不暴露于溶剂)的保守取代,例如但不限于,可以使用以下保守取代:其中Y被F取代,T被A或S取代,I被L或V取代,W被Y取代,M被L取代,N被D取代,G被A取代,T被A或S取代,D被N取代,I被L或V取代,F被Y或L取代,S被A或T取代且A被S、G、T或V取代。在一些实施方案中,非保守氨基酸取代也被涵盖在变体的术语中。

[0271] 本文公开的抗体可以被修饰以增加或减少血清半衰期,例如通过一个或多个抗体恒定区的序列工程化和/或与其他分子的融合,例如聚乙二醇化或通过与白蛋白结合,例如掺入白蛋白结合单结构域抗体(dAb)。已经描述了各种半衰期延长的融合体[63]。

[0272] 本发明的抗体可以是人抗体或包含人可变区和非人(例如小鼠)恒定区的嵌合抗

体。本发明的抗体例如具有人可变区,并且任选地还具有人恒定区。

[0273] 因此,抗体任选地包括恒定区或其部分,例如人抗体恒定区或其部分。例如,VL结构域可以在其C末端附接至抗体轻链 κ 或 λ 恒定结构域。类似地,抗体VH结构域可以在其C末端附接至衍生自任何抗体同种型(例如IgG、IgA、IgE和IgM)和同种型亚类中任一个(如IgG1或IgG4)的免疫球蛋白重链恒定区的全部或部分(例如CH1结构域或Fc区)。人抗体恒定结构域的例子示于表C中。

[0274] 可替代地,本发明抗体的恒定区可以是非人恒定区。例如,当在转基因动物(其例子在本文别处描述)中产生抗体时,可以产生包含人可变区和非人(宿主动物)恒定区的嵌合抗体。一些转基因动物产生完全人抗体。其他已经被工程化以产生包含嵌合重链和完全人轻链的抗体。在抗体包含一个或多个非人恒定区的情况下,这些可以被非人恒定区替代以提供更适合作为治疗组合物施用给人的抗体,因为它们的免疫原性由此降低。Fc效应子功能ADCC、ADCP和CDC

[0275] 如上所讨论,抗体可以以各种同种型和具有不同的恒定区提供。人IgG抗体重链恒定区序列的例子如表C所示。抗体的Fc区主要在Fc结合、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)活性、补体依赖性细胞毒性(CDC)活性和抗体依赖性细胞吞噬(ADCP)活性方面决定其效应子功能。这些与效应T细胞功能不同的“细胞效应子功能”涉及将携带Fc受体的细胞募集到靶细胞的位点,从而杀死抗体结合的细胞。除了ADCC和CDC之外,ADCP机制[64]代表耗竭抗体结合的T细胞的手段,并因此靶向高ICOS表达的TReg以进行删除。

[0276] 细胞效应子功能ADCC、ADCP和/或CDC也可由缺乏Fc区的抗体表现。抗体可以包含多个不同的抗原结合位点,一个针对ICOS,另一个针对靶分子,其中靶分子的接合诱导ADCC、ADCP和/或CDC,例如包含通过接头连接的两个scFv区的抗体,其中一个scFv可以接合效应细胞。

[0277] 根据本发明的抗体可以是表现出ADCC、ADCP和/或CDC的抗体。可替代地,根据本发明的抗体可能缺乏ADCC、ADCP和/或CDC活性。在任一情况下,根据本发明的抗体可以包含或可任选地缺乏与一种或多种类型的Fc受体结合的Fc区。使用不同的抗体形式,以及存在或不存在FcR结合和细胞效应子功能允许定制抗体以用于如本文别处所述的特定治疗目的。

[0278] 用于一些治疗应用的合适的抗体形式使用野生型人IgG1恒定区。恒定区可以是激活效应子的IgG1恒定区,任选地具有ADCC和/或CDC和/或ADCP活性。合适的野生型人IgG1恒定区序列是IGHG1*01。本文显示了人IgG1恒定区的其他例子。

[0279] 可以工程化恒定区以增强ADCC和/或CDC和/或ADCP。Fc介导的效应的效力可以通过用各种已建立的技术工程化Fc结构域来增强。这样的方法增加了对某些Fc受体的亲和力,因此产生了激活增强的潜在的不同特征。这可以通过修饰一个或几个氨基酸残基来实现[65]。已经证明在残基Asn297上含有特定突变或改变的糖基化(例如,N297Q,EU索引编号)的人IgG1恒定区可增强与Fc受体的结合。示例性突变是选自人IgG1恒定区239、332和330(或其他IgG同种型中的等同位置)的一个或多个残基。因此,抗体可以包含具有一个或多个独立地选自N297Q、S239D、I332E和A330L(EU索引编号)的突变的人IgG1恒定区。三重突变(M252Y/S254T/T256E)可用于增强与FcRn的结合,影响FcRn结合的其他突变论述于[66]的表2中,其中任一各可用于本发明中。

[0280] 对Fc受体的增加的亲和力还可以通过改变Fc结构域的天然糖基化特征来实现,例

如通过产生低岩藻糖基化或去岩藻糖基化变体[67]。非岩藻糖基化抗体具有没有岩藻糖残基的Fc的复合型N-聚糖的三甘露糖基核心结构。由于Fc γ RIIIa结合能力的增强,这些缺乏来自Fc N-聚糖的核心岩藻糖残基的糖工程化抗体可表现出比岩藻糖基化等价物更强的ADCC。根据本发明的抗体可以是岩藻糖基化的、无岩藻糖基化的、去岩藻糖基化的或低岩藻糖基化的。

[0281] 为了增加ADCC,可以改变铰链区中的残基以增加与Fc- γ RIII的结合[68]。因此,抗体可以包含人IgG重链恒定区,其是野生型人IgG重链恒定区的变体,其中所述变体人IgG重链恒定区以比野生型人IgG重链恒定区结合人Fc γ 受体更高的亲和力结合选自Fc γ RIIB和Fc γ RIIA的人Fc γ 受体。抗体可以包含人IgG重链恒定区,其是野生型人IgG重链恒定区的变体,其中所述变体人IgG重链恒定区以比野生型人IgG重链恒定区结合人Fc γ RIIB更高的亲和力结合人Fc γ RIIB。变体人IgG重链恒定区可以是变体人IgG1、变体人IgG2或变体人IgG4重链恒定区。在一个实施方案中,变体人IgG重链恒定区包含选自G236D、P238D、S239D、S267E、L328F和L328E (EU索引编号系统)的一个或多个氨基酸突变。在另一个实施方案中,变体人IgG重链恒定区包含选自以下的一组氨基酸突变:S267E和L328F;P238D和L328E;P238D以及选自E233D、G237D、H268D、P271G和A330R的一个或多个取代;P238D、E233D、G237D、H268D、P271G和A330R;G236D和S267E;S239D和S267E;V262E、S267E和L328F;以及V264E、S267E和L328F (EU索引编号系统)。CDC的增强可以通过增加对经典补体激活级联的第一组分C1q的亲合力的氨基酸改变来实现[69]。另一种方法是产生由人IgG1和人IgG3区段创建的嵌合Fc结构域,其利用IgG3对C1q的更高亲和力[70]。本发明的抗体可以在残基329、331和/或322处包含突变的氨基酸以改变C1q结合和/或降低或消除CDC活性。在另一个实施方案中,本文公开的抗体或抗体片段可以含有在残基231和239处具有修饰的Fc区,由此替换氨基酸以改变抗体固定补体的能力。在一个实施方案中,抗体或片段具有恒定区,所述恒定区包含一个或多个选自E345K、E430G、R344D和D356R的突变,特别是包含R344D和D356R的双突变 (EU索引编号系统)。

[0282] WO 2008/137915描述了具有修饰的Fc区的抗ICOS抗体,其具有增强的效应子功能。据报道,与包含VH和VK结构域和野生型Fc区的亲本抗体介导的ADCC活性水平相比,所述抗体介导增强的ADCC活性。根据本发明的抗体可使用具有本文所述效应子功能的这些变体Fc区。

[0283] 抗体的ADCC活性可以在本文所述的测定中测定。可以使用本文所述的ICOS阳性T细胞系体外测定抗ICOS抗体的ADCC活性。更一般地,抗体的ADCC活性可以在ADCC测定中使用表现出细胞表面展示被抗体识别的抗原的细胞在体外测定。

[0284] 对于一些患者,优选使用不具有Fc效应子功能的抗体。可提供不含恒定区或不含Fc区的抗体-此类抗体形式的例子在本文别处描述。可替代地,抗体可具有无效效应子的恒定区。抗体可具有不结合Fc γ 受体的重链恒定区,例如恒定区可以包含Leu235Glu突变(即,其中野生型亮氨酸残基突变为谷氨酸残基)。重链恒定区的另一任选突变是Ser228Pro,其增加稳定性。重链恒定区可以是包含Leu235Glu突变和Ser228Pro突变两者的IgG4。此“IgG4-PE”重链恒定区是效应子无效的。

[0285] 替代的效应子无效的人恒定区是失能的IgG1。失能的IgG1重链恒定区可以在位置235和/或237 (EU索引编号) 含有丙氨酸,例如,它可以是包含L235A和/或G237A突变

(“LAGA”)的IgG1*01序列。

[0286] 变体人IgG重链恒定区可以包含一个或多个氨基酸突变,所述突变降低IgG对人Fc γ RIIIA、人Fc γ RIIA或人Fc γ RI的亲和力。在一个实施方案中,Fc γ RIIB在选自巨噬细胞、单核细胞、B细胞、树突状细胞、内皮细胞和激活的T细胞的细胞上表达。在一个实施方案中,变体人IgG重链恒定区包含一个或多个以下氨基酸突变:G236A、S239D、F243L、T256A、K290A、R292P、S298A、Y300L、V305I、A330L、I332E、E333A、K334A、A339T和P396L(EU索引编号系统)。在一个实施方案中,变体人IgG重链恒定区包含选自以下的一组氨基酸突变:S239D;T256A;K290A;S298A;I332E;E333A;K334A;A339T;S239D和I332E;S239D、A330L和I332E;S298A、E333A和K334A;G236A、S239D和I332E;以及F243L、R292P、Y300L、V305I和P396L(EU索引编号系统)。在一个实施方案中,变体人IgG重链恒定区包含S239D、A330L或I332E氨基酸突变(EU索引编号系统)。在一个实施方案中,变体人IgG重链恒定区包含S239D和I332E氨基酸突变(EU索引编号系统)。在一个实施方案中,变体人IgG重链恒定区是包含S239D和I332E氨基酸突变(EU索引编号系统)的变体人IgG1重链恒定区。

[0287] 抗体可具有结合一种或多种类型的Fc受体但不诱导细胞效应子功能(即不介导ADCC、CDC或ADCP活性)的重链恒定区。这种恒定区可能不能结合负责触发ADCC、CDC或ADCP活性的一种或多种特定Fc受体。

[0288] 抗ICOS抗体

[0289] 抗ICOS药剂可以是针对ICOS的抗体,其结合ICOS胞外结构域,从而靶向表达ICOS的T细胞。

[0290] 据报道,抗ICOS抗体具有由结合ICOS+T细胞产生的抗肿瘤作用。抗ICOS抗体可通过各种机制提供免疫治疗效果。例如,抗ICOS抗体可对ICOS具有激动作用,因此增强TEff细胞的功能,如增加IFN γ 表达和分泌的能力所指示。抗ICOS抗体可任选地被工程化以耗竭其结合的细胞,其应具有优先下调ICOS+TReg的作用,从而移开这些细胞对效应T细胞反应的抑制作用,因此整体促进效应T细胞反应。抗ICOS抗体KY1044具有在本发明中用作免疫治疗剂的理想功能特征,但也可替代地使用其他抗ICOS药剂。

[0291] 抗ICOS抗体可以为以下抗体中的任一种,可以包含以下抗体中的任一种的VH和VL结构域,或者可以包含以下抗体中的任一种的HCDR和/或LCDR:

[0292] (a) KY1044

[0293] (b) PCT/GB2017/052352、WO 2018/029474或US 9957323中所述的抗ICOS抗体,将其内容通过引用并入本文(例如,STIM001、STIM002、STIM002B、STIM003、STIM004、STIM005、STIM006、STIM007、STIM008或STIM009)

[0294] (c) PCT/GB2018/053701、WO 2019/122884中所述的抗ICOS抗体,将其内容通过引用并入本文(例如,STIM017、STIM020、STIM021、STIM022、STIM023、STIM039、STIM040、STIM041、STIM042、STIM043、STIM044、STIM050、STIM051、STIM052、STIM053、STIM054、STIM055、STIM056、STIM057、STIM058、STIM059、STIM060、STIM061、STIM062、STIM063、STIM064、STIM065或STIM066)

[0295] (d) PCT/GB2018/053698、WO 2019/122882中所述的抗ICOS/PD-L1 mAb²双特异性抗体(e) 伏派利单抗(vopratelimab)

[0296] (f) WO 2016/154177或US2016/0304610中所述的抗ICOS抗体(例如,37A10S713、

7F12、37A10、35A9、36E10、16G10、37A10S714、37A10S715、37A10S716、37A10S717、37A10S718、16G10S71、16G10S72、16G10S73、16G10S83、35A9S79、35A9S710或35A9S89)

[0297] (g) WO 2016/120789或US2016/0215059中所述的抗ICOS抗体(例如,422.2H2L5)

[0298] (h) 如WO 2018/187613或US2018/0289790中所述的抗体C398.4或其人源化抗体,例如ICOS.33IgG1f S267E、ICOS.4、ICOS34 G1f、ICOS35 G1f、17C4、9D5、3E8、1D7a、1D7b或2644(序列参见WO 2018187613表35),例如NCT03251924中的抗体BMS-986226

[0299] (i) WO 2010/056804中所述的抗体JMAb 136、“136”或任何其他抗体

[0300] (j) WO 2012/131004、WO 2014/033327或US2015/0239978中所述的抗体314-8、从杂交瘤CNCM I-4180产生的抗体、或任何其他抗ICOS抗体

[0301] (k) WO 2012/131004、US 9,376,493或US2016/0264666中所述的抗体Icos145-1、从杂交瘤CNCM I-4179产生的抗体、或任何其他抗体

[0302] (l) WO 99/15553、US 7,259,247、US 7,132,099、US 7,125,551、US 7,306,800、US 7,722,872、WO 05/103086、US 8,318,905或US 8,916,155中所述的抗体MIC-944(来自杂交瘤DSMZ 2645)、9F3(DSMZ 2646)或任何其他抗ICOS抗体

[0303] (m) WO 98/3821、US 7,932,358B2、US2002/156242、US 7,030,225、US 7,045,615、US 7,279,560、US 7,226,909、US 7,196,175、US 7,932,358、US 8,389,690、WO 02/070010、US 7,438,905、US 7,438,905、WO 01/87981、US 6,803,039、US 7,166,283、US 7,988,965、WO 01/15732、US 7,465,445或US 7,998,478中所述的抗ICOS抗体(例如,JMAb-124、JMAb-126、JMAb-127、JMAb-128、JMAb-135、JMAb-136、JMAb-137、JMAb-138、JMAb-139、JMAb-140或JMAb-141,例如JMAb136)

[0304] (n) WO 2014/08911中所述的抗ICOS抗体

[0305] (o) WO 2012/174338中所述的抗ICOS抗体

[0306] (p) US2016/0145344中所述的抗ICOS抗体

[0307] (q) WO 2011/020024、US2016/002336、US2016/024211或US 8,840,889中所述的抗ICOS抗体

[0308] (r) US 8,497,244中所述的抗ICOS抗体

[0309] (s) 抗体克隆ISA-3(eBioscience)、克隆SP98(Novus Biologicals)、克隆1G1、克隆3G4(Abnova Corporation)、克隆669222(R&D Systems)、克隆TQ09(Creative Diagnostics)、克隆2C7(Deng等人Hybridoma Hybridomics 2004)、克隆ISA-3(eBioscience)或克隆17G9(McAdam等人J Immunol 2000)。

[0310] KY1044是人抗ICOS亚类G1 κ 单克隆抗体。开发意图是具有双重作用机制,即TReg的耗竭和TEff细胞的共刺激(激动作用)[7]。抗体KY1044的序列示于本文表K中。

[0311] 抗ICOS抗体可以是与包含KY1044的重链和轻链CDR的抗体(例如,人IgG1或scFv)竞争结合人ICOS的抗体。抗ICOS抗体可以以与KY1044至少相同的亲和力结合ICOS,或以KY1044亲和力的50%内、25%内或10%内的亲和力(例如,如通过用芯片结合的抗原或芯片结合的IgG抗ICOS抗体的表面等离子体进行的共振所确定的)。

[0312] 本发明的抗ICOS抗体可以包含如本文所述的KY1044的一个或多个CDR(例如,所有6个CDR,或一组HCDR和/或LCDR)或其变体。

[0313] 抗体可以包含抗体VH结构域和抗体VL结构域,所述抗体VH结构域包含CDR HCDR1、

HCDR2和HCDR3,所述抗体VL结构域包含CDR LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中所述HCDR3是KY1044 HCDR3或包含具有1、2、3、4或5个氨基酸改变的HCDR3。HCDR2可以是KY1044的HCDR2,或者它可以包含具有1、2、3、4或5个氨基酸改变的HCDR2。HCDR1可以是KY1044的HCDR1,或者它可以包含具有1、2、3、4或5个氨基酸改变的HCDR1。

[0314] 抗体可以包含抗体VL结构域和抗体VH结构域,所述抗体VH结构域包含CDR HCDR1、HCDR2和HCDR3,所述抗体VL结构域包含CDR LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中所述LCDR3是KY1044的LCDR3或包含具有1、2、3、4或5个氨基酸改变的LCDR3。LCDR2可以是KY1044 LCDR2,或者它可以包含具有1、2、3、4或5个氨基酸改变的LCDR2。LCDR1可以是KY1044 LCDR1,或者它可以包含具有1、2、3、4或5个氨基酸改变的LCDR1。

[0315] 抗体可以包含:

[0316] 包含HCDR HCDR1、HCDR2和HCDR3的抗体VH结构域,以及

[0317] 包含LCDR LCDR1、LCDR2和LCDR3的抗体VL结构域,

[0318] 其中所述HCDR为KY1044的那些或包含具有1、2、3、4或5个氨基酸改变的KY1044HCDR;和/或

[0319] 其中所述LCDR是抗体KY1044的那些或包含具有1、2、3、4或5个氨基酸改变的KY1044LCDR。

[0320] 抗体可以包含VH结构域,所述VH结构域包含一组HCDR HCDR1、HCDR2和HCDR3,其中

[0321] HCDR1是KY1044的HCDR1 SEQ ID NO:1,

[0322] HCDR2是KY1044的HCDR2 SEQ ID NO:2,

[0323] HCDR3是KY1044的HCDR3 SEQ ID NO:3,

[0324] 或包含具有1、2、3、4、5或6个氨基酸改变的该组HCDR。

[0325] 抗体可以包含VL结构域,所述VL结构域包含一组LCDR LCDR1、LCDR2和LCDR3,其中

[0326] LCDR1是KY1044的LCDR1 SEQ ID NO:8,

[0327] LCDR2是KY1044的LCDR2 SEQ ID NO:9,

[0328] LCDR3是KY1044的LCDR3 SEQ ID NO:10,

[0329] 或包含具有1、2、3或4个氨基酸改变的该组LCDR。

[0330] 氨基酸改变(例如,取代)可以在CDR中的任何残基位置。

[0331] 优选地,抗体包含ICOS结合位点,所述ICOS结合位点包含KY1044的整组6个CDR。

[0332] 根据本发明的抗ICOS抗体可以包含抗体VH结构域,其为KY1044的VH结构域SEQ ID NO 5或其具有与KY1044抗体VH结构域序列至少90%相同的氨基酸序列。氨基酸序列同一性可以是至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%。

[0333] 根据本发明的抗ICOS抗体可以包含抗体VL结构域,其为KY1044的VL结构域SEQ ID NO:12或其具有与KY1044抗体VL结构域序列至少90%相同的氨基酸序列。氨基酸序列同一性可以是至少95%。

[0334] 优选地,抗体包含KY1044 VH和VL结构域。

[0335] 如本文别处所详述的,抗体可以包括恒定区,任选地人重链和/或轻链恒定区。示例性同种型是IgG,例如人IgG1。抗ICOS抗体可以包含KY1044重链SEQ ID NO:7和/或KY1044轻链SEQ ID NO:14。KY1044可重组产生为各454个氨基酸残基的两条重链和各215个氨基酸残基的两条轻链,其具有IgG1抗体典型的链间和链内二硫键。

[0336] 免疫疗法

[0337] 免疫疗法包括用免疫治疗剂进行治疗,所述免疫治疗剂可以是抗ICOS药剂和/或抗TReg药剂。它可以作为药物配制品施用给患者,例如通过静脉内或皮下注射。在优选的实施方案中,抗ICOS和/或抗TReg免疫疗法包括向患者施用抗ICOS抗体如KY1044。

[0338] 患者还可以同时、之前或之后根据其癌症护理标准接受治疗,任选地包括手术。索拉非尼(一种多激酶抑制剂)是首个批准用于HCC的全身性疗法。自2016年以来,已经在III期临床试验中证明4种其他靶向药物(包括3种多激酶抑制剂和一种抗血管内皮生长因子受体(VEGFR)单克隆抗体)可为晚期HCC患者提供存活益处[71,72,73,74]。多个国家的监管机构已经批准乐伐替尼作为HCC的一线全身性疗法,并且批准瑞戈非尼、卡博替尼和雷莫芦单抗(限于甲胎蛋白>400ng/mL的患者)用于治疗先前已经用索拉非尼治疗的HCC患者。抗PD-1抗体也已被用作晚期HCC的二线治疗。

[0339] 可与抗ICOS和/或抗TReg免疫疗法组合或替代抗ICOS和/或抗TReg免疫疗法的治疗包括诱导免疫细胞死亡的那些,其特征在ATP和HMGB1从细胞中释放以及暴露质膜上的钙网蛋白[75,76]。诱导免疫细胞死亡的治疗包括辐射(例如,使用UVC光或 γ 射线对细胞进行电离照射)、化疗剂(例如,奥沙利铂、蒽环类如多柔比星、伊达比星或米托蒽醌、BK通道激动剂如根皮素或海松酸、硼替佐米、强心苷、环磷酰胺、GADD34/PP1抑制剂与丝裂霉素、PDT与金丝桃素、聚肌胞、5-氟尿嘧啶、吉西他滨、吉非替尼、埃罗替尼或毒胡萝卜素与顺铂)和针对肿瘤相关抗原的抗体。肿瘤相关抗原可以是相对于相同组织的非肿瘤细胞而言由肿瘤细胞过表达的任何抗原,例如HER2、CD20、EGFR。合适的抗体包括赫赛汀(抗HER2)、利妥昔单抗(抗CD20)或西妥昔单抗(抗EGFR)。

[0340] 可与抗ICOS和/或抗TReg免疫疗法组合的其他治疗以及施用抗ICOS治疗和/或组合疗法的方法描述于WO 2018/029474中,将其通过引用以其整体并入本文。

[0341] 本发明的方法,包括测定生物标志的方法和监测患者样品的反应标签(包括一个或多个生物标志的变化)的方法,可用于告知开具这些或其他治疗的处方。

[0342] 接受手术以除去或减少肿瘤的患者可以在手术之前和/或之后接受免疫疗法。手术后的免疫疗法可以治疗残留的肿瘤组织和/或其他残留的原发性肿瘤或转移。

[0343] 统计方法和建模

[0344] Kaplan-Meier曲线和对数秩检验是单变量分析的例子。它们仅根据所选调查因素描述存活率。另一种方法是Cox比例风险(COX-PH)回归分析,其用于定量预测变量和分类变量两者。此外,Cox回归模型扩展了存活分析方法以同时评估几种风险因素对存活时间的影响。

[0345] 如所附实施例中所证明的,参考(截止)值可以被确定为患者可以在临床量度(例如OS)方面以统计学显著性被区分的值。截止值可以通过测试一系列截止值来凭经验确定,以鉴定提供统计学显著性的值(例如, $p < 0.05$,通过对数秩检验得到),优选具有最高统计学显著性的值。优选地,截止值通过ROC分析由数据确定-参见[77],通过引用并入本文。任选地,截止值是生物标志的中值读数、生物标志的上四分位数读数或生物标志的下四分位数读数。

[0346] 在计算参考值的情况下,可以方便地包括乘法或除法因子,以便以期望的数量级表示该值。例如,如果截止值被确定为0.001,这可以通过包括乘法因子1000方便地表示为

1.然后将来自测试样品的生物标志读数乘以相同的因子,用于与参考值比较。类似地,可以对参考数值和生物标志进行转换以生成任何所需尺度上的其他值(无论是数字、视觉(例如,彩色图表)、听觉或其他),并且如果一致地进行相同的转换,则生物标志读数仍然可以与所述参考值有效地进行比较。因此,本发明不必受生物标志数据呈现方式的限制。相反,在本发明中使用的读数和参考值将是代表基础数据的那些,使得(例如)表示100个ICOS阳性细胞/ mm^2 肿瘤核心的密度的生物标志参考值可表达为“100个细胞/ mm^2 ”或“0”。在后一种情况下,应用100的减法,因此计算出密度110个细胞/ mm^2 的肿瘤样品然后被转换为10,用于与0参考值比较。

[0347] 在Kagamu等人[27]的研究中发现了使用逻辑回归分析来鉴定可用于指导患者预后和治疗的生物标志变量的例子。该研究将患者外周血中CD4+T细胞的状态鉴定为生物标志,其可以鉴定在纳武单抗治疗后呈现早期疾病进展的患者,使得能够将患者分类为非反应者或反应者。作者描述了基于非小细胞肺癌患者外周血中CD62L^低CD4+T细胞和CD25+FOXP3+细胞百分比的公式,以预测非反应者。使用发现队列数据和逻辑回归模型得出预测公式。使用独立验证队列数据评价预测公式的性能。使用Kaplan-Meier法估计存活曲线。所有P值都是双侧的,并且 $p < 0.05$ 被认为具有统计学显著性。使用学生t检验进行两个群体之间差异的检验。使用单因素ANOVA和Tukey事后分析进行多组比较。

[0348] 这种类型的建模通常可以应用于来自癌症患者的临床数据,以便鉴定生物标志和生物标志的组合,其允许例如根据预测的存活期和/或对治疗有反应的可能性对患者进行有意义的分类。许多软件包可用于运行统计分析和建模,包括SAS 9.4(SAS Institute Inc.)和Prism 8(GraphPad)。

[0349] 实施例

[0350] 可以从肿瘤组织切片读取许多信息,并且通过观察细胞的空间排列了解TME的性质,所述空间排列包括各种不同细胞类型彼此之间的分布、扩散、聚集和接近。先前,报道了黑素瘤细胞的20 μm 内的免疫细胞密度与对免疫检查点阻断剂的反应相关(Gide等人2020)。在本发明中,我们揭示到TME中表达ICOS和/或FOXP3的免疫细胞的空间排列是疾病预后和对免疫疗法的反应的生物标志。在下面的实施例中,我们描述了HCC样品的TME中ICOS阳性细胞、FOXP3阳性细胞和ICOS FOXP3双阳性细胞的分析,根据这些细胞的密度、比率、细胞间距离和数量表征TME。我们针对ICOS和FOXP3进行了共染色,并且测量了每 mm^2 的ICOS单阳性细胞、FOXP3单阳性细胞和ICOS FOXP3双阳性细胞的密度、不同染色细胞的比率(例如,FOXP3单阳性细胞与ICOS FOXP3双阳性细胞的比率)、不同染色细胞之间的距离(例如,ICOS FOXP3双阳性细胞与ICOS单阳性细胞的平均距离)和ICOS单阳性细胞周围的影响区域(由30 μm 的半径定义)中ICOS FOXP3双阳性细胞的数量。

[0351] 我们寻找TME的这些测量值与临床结局或临床元数据之间的关联。我们描述了此类测量值如何代表疾病预后(包括总存活期)和对抗ICOS和/或抗TReg免疫疗法的反应的生物标志。

[0352] ICOS FOXP3双阳性细胞被鉴定为免疫抑制性TME特有的活性TReg。发现HCC肿瘤含有高比例的ICOS+TReg,意味着强烈免疫抑制性的环境。ICOS+细胞的密度更高、ICOS+FOXP3+双阳性细胞与总FOXP3+细胞的比率更高、ICOS+TReg与其他ICOS+细胞之间的接近度更近以及影响区域中ICOS+TReg的数量更高都与总存活期更差相关。

[0353] 我们描述了抗TReg和/或抗ICOS免疫疗法如何在TME中表现出这些生物标志的患者中提供临床益处,包括延长存活期。抗ICOS抗体KY1044是理想的候选治疗剂,因为它能够靶向ICOS阳性细胞并选择性地耗竭具有高ICOS表达的细胞,除去高度免疫抑制性TReg并增强抗肿瘤免疫反应。

[0354] 实施例1.TME中ICOS阳性TReg的数量和比率相对于肿瘤周围增加

[0355] 先前报道到在20名HCC患者的队列中,与邻近正常组织相比,TME中的ICOS FOXP3双阳性细胞增加[3]。在本研究中,我们评估了来自一大群患者的数据,从而证实并扩展了先前的发现。我们发现在HCC样品中,与肿瘤周围组织相比,TME中的ICOS FOXP3双阳性细胞显著增加。我们还观察到肿瘤核心中ICOS阳性TReg (ICOS FOXP3双阳性细胞)与总TReg (FOXP3阳性细胞)的比率相对于肿瘤周围显著增加 ($p < 0.001$)。高密度的肿瘤浸润性TReg被认为是HCC的不利预后指标。鉴于据报道ICOS+FOXP3+细胞通过产生TGF- β 和IL-10两者而具有高度免疫抑制性[78]的事实,我们的发现表明,HCC肿瘤应当强烈从旨在耗竭ICOS FOXP3双阳性细胞的策略中受益。ICOS FOXP3双阳性细胞与ICOS阴性FOXP3阳性细胞的比率较高的肿瘤应当最受益。

[0356] 肿瘤样品

[0357] 肿瘤组织最初收集自在中国台湾台北市台湾大学医院接受肝切除术的HCC患者。本研究从存档组织中取出福尔马林固定石蜡包埋的组织切片(5 μ m厚)。

[0358] 患者数据

[0359] 共有142名患者(男性:女性=112:30,中值年龄61.0岁)入组研究队列。其中,87人(61.3%)患有慢性乙型肝炎病毒(HBV)感染,33人(23.2%)患有慢性丙型肝炎病毒(HCV)感染,并且22人(15.5%)未患HBV/HCV感染。没有患者呈HBV和HCV双阳性。AFP<20ng/mL或患有早期疾病的患者具有显著改善的中值总存活期(OS)。从肝切除术之日到患者死亡之日或其最后随访日计算OS。中值OS计算为诊断后队列中一半的患者仍在研究的时间长度。在此队列中,中值OS为100.3个月。年龄、性别和病毒病因与OS的变化无显著相关性。

[0360] 免疫组织化学

[0361] 如下进行连续双多重IHC测定以检测5 μ m组织切片中的表达ICOS和FOXP3的细胞。将组织载玻片脱蜡,再水合,并且在柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)中高压灭菌10分钟,使用显现室(decloaking chamber)进行抗原修复,随后用过氧化氢封闭,然后用含酪蛋白的封闭试剂(Background Sniper,BioCare Medical)封闭以减少非特异性背景染色。然后将载玻片与抗ICOS抗体(稀释度1:800;克隆D1K2T;Cell Signaling)在4 $^{\circ}$ C下一起孵育过夜。应用MACH1通用型HRP-聚合物检测试剂盒(BioCare Medical),包括检测D1K2T的第二抗体,并且按照制造商的建议进行自动化DAB检测。DAB(3,3'-二氨基联苯胺)是苯的衍生物,并且提供棕色染色。

[0362] 重复封闭步骤,然后将载玻片与抗FOXP3抗体(稀释度1:800;克隆236A/E7;Abcam)在4 $^{\circ}$ C下一起孵育过夜。应用MACH1通用型HRP-聚合物检测试剂盒,包括用于检测的第二抗体,并且按照制造商的建议使用Vina Green Chromogen试剂盒(BioCare Medical)。Vina Green Chromagen提供绿色染色,在此用作FOXP3的二次染色。将载玻片用苏木精和返蓝试剂复染,所述返蓝试剂将核内苏木精的初始可溶性红色转化为不溶性蓝色。返蓝溶液的碱性pH还导致媒染剂染料色淀在组织中重新形成并变得更持久。结果是所有细胞核的染色,

其显示了组织的整体结构并提供了可以观察两种IHC色原的环境背景,有助于病理学家或计算机进行后续分析。最后,按照标准IHC程序将所有载玻片从仪器中取出,洗涤,脱水并封固在永久封固剂中。

[0363] 数字病理学

[0364] 使用Hamamatsu Nanozoomer数字扫描仪以明场模式在20倍放大率下扫描5 μ m IHC染色的组织载玻片。用Indica Labs HALO[®]平台对整个载玻片图像进行双重IHC分析。简言之,该过程涉及3色原颜色解卷积以分离IHC色原(x2)和核复染。通过应用各个色原的加权光密度值形成细胞对象。然后使用确定的大小、形状和亚细胞区室染色参数鉴定每种阳性细胞类型。开发了分类器,并且将其集成到算法中以自动分割目的组织区域进行分析。将完成的算法以自动化且客观的方式应用于研究中的所有组织切片图像,以生成详细的逐细胞数据。对所有扫描图像都进行了审查,并且对以下区域进行了定义和手动注释:

[0365] • 侵袭性边缘: 如由病理学家限定的肿瘤边缘

[0366] • 核心(TME): 肿瘤中心,从侵袭性边缘向内>500 μ m

[0367] • 肿瘤周围基质: 肿瘤周围组织,从侵袭性边缘向外>500 μ m。

[0368] 通过手动排除从分析中省略组织褶皱和/或染色伪影。

[0369] 结果和结论

[0370] TME(肿瘤核心)中ICOS+FOXP3+细胞的密度显著高于($p<0.001$,通过配对T检验得到)肿瘤周围区域。图2。

[0371] TME(肿瘤核心)中ICOS阳性TReg(ICOS⁺FOXP3双阳性细胞)与总FOXP3细胞的比率也显著高于肿瘤周围区域($p<0.001$,通过配对T检验得到)。图3。

[0372] 这些发现与HCC的早期工作一致,其中在TME中ICOS⁺TReg比在肿瘤周围区域中更普遍[3]。

[0373] HCC中高数量和比例的表达ICOS的TReg意味着这些肿瘤中的强烈免疫抑制性的环境。抗ICOS和/或抗TReg免疫疗法在具有这些特征的HCC中可能是有益的。

[0374] 这些效应在病毒相关癌症中更显著,这表明病毒相关或病毒诱导的癌症(例如,HBV阳性HCC、HCV阳性HCC)可能更可能对抗ICOS和/或抗TReg免疫疗法有反应,尽管结果在本研究中未达到统计学显著性。

[0375] 实施例2. ICOS是疾病预后的生物标志物

[0376] 使用与实施例1相同的HCC患者队列,我们揭开了患者存活期与肿瘤样品中ICOS+细胞密度和ICOS+TReg比例之间的联系。ICOS阳性细胞的密度更高与OS更短有关。ICOS阳性TReg的比例更高也与OS更短有关。

[0377] 样品处理

[0378] 如实施例1所述,处理肿瘤样品并且进行IHC和数字病理学工作。

[0379] 数据分析

[0380] 通过构建根据不同细胞测量值划分的患者群体的Kaplan-Meier曲线来分析细胞测量值与存活期之间的关联。通过对数秩检验比较患者群体之间的存活期差异。使用Graphpad Prism 8.3.1进行Kaplan-Meier对数秩分析。

[0381] 使用SAS统计软件(9.4版,SAS Institute Inc.,美国北卡罗来纳州卡里)进行统计分析。双侧 p 值<0.05被认为具有统计学显著性。使用Kaplan-Meier方法估计不同亚组的

患者的OS和RFS,并且使用对数秩检验进行比较。使用非配对T检验来比较细胞密度的差异。

[0382] 还使用具有95%置信区间(CI)的风险比(HR,Mantel-Haenszel)来估计ICOS+TReg与总TReg的比率和HCC癌症预后之间的关联程度。

[0383] 结果和结论

[0384] 通过构建Kaplan-Meier曲线检查ICOS+TReg比例和ICOS+细胞密度对HCC预后的影响,并且通过对数秩检验比较OS的差异。TME中ICOS⁺F0XP3⁺/总F0XP3⁺细胞比率高($p=0.074$)或ICOS+细胞密度高的患者与OS较短相关($p<0.05$)。

[0385] 结果证明了高ICOS细胞密度与不良预后(存活差)之间的显著相关性,表明低ICOS表达(表现为TME中ICOS+细胞密度较低)是HCC患者存活较好的预测因子。我们发现对于在TME中每 mm^2 具有120个或更多个ICOS阳性细胞的患者,中值OS与其他患者相比减半以上。低密度(<120 个细胞/ mm^2)患者的中值存活期为147.3个月,而高密度(≥ 120 个细胞/ mm^2)患者的中值存活期为68.9个月。图4。120个细胞的截止值为舍入值。对于其他类似的截止数量,例如123个细胞/ mm^2 ,观察到统计学显著性。ICOS+细胞密度与HCC癌症预后之间关联的具有95%置信区间(CI)的风险比(HR,Mantel-Haenszel)计算为0.5774,CI为0.3346-0.9963; $p<0.05$ 。

[0386] 当用无复发存活期(RFS)而不是总存活期(OS)的数据进行分析时,对数秩(Mantel-Cox)检验未表明根据最高四分位数(≤ 120 个细胞/ mm^2)与下3个四分位数(<120 个细胞/ mm^2)分层的患者群体的%RFS的差异具有统计学显著性。

[0387] TReg群体中ICOS阳性TReg的高比例也与存活期的较差预后相关。我们发现对于50%或更多的TReg呈ICOS阳性的患者,中值OS与其他患者相比减半。低比率(<0.5)患者的中值存活期为147.3个月,而高比率(≥ 0.5)患者的中值存活期为61.6个月。图5。关联的风险比为0.5870,置信区间为CI 0.3486-0.9885; $p=0.0451$ 。

[0388] 将此群体中0.5的截止比率凭经验确定为患者可以在存活时间方面以统计学显著性被区分的比率。使用中值比率(0.33)的队列分割类似地将患者分为存活期较长和较短的患者,并且比率较高的患者具有较长的存活期,但不满足统计学显著性。当将队列分为比率为上四分位数与下四分位数的患者时,这同样适用,即观察到差异,但是不满足统计学显著性。

[0389] 当评估对RFS(而不是OS)的影响时,以0.5的截止比率分离队列,我们看到数据明显分离,在比率 <0.50 的患者中%RFS更高。这反映了对于OS观察到的相同趋势,但是根据对数秩(Mantel-Cox)检验,RFS的差异不具有统计学显著性。

[0390] 总之,在TME中ICOS+细胞密度较高和/或ICOS+TReg与总TReg的比率较高的患者具有较差的存活期,并且用抗TReg治疗剂进行治疗应当通过减少ICOS+TReg的数量并产生抗肿瘤反应以改善存活期来解决至少一种原因。

[0391] 实施例3. ICOS是HBV阳性HCC中的预后生物标志物

[0392] 乙型肝炎病毒(HBV)的慢性感染与HCC的发病机制有关。通过进一步分析来自实施例2的数据,我们发现HBV阳性肿瘤的TME中高密度的ICOS阳性细胞/ mm^2 与不良预后相关。当关注HBV阳性HCC肿瘤时,结果证明了高ICOS细胞密度与不良预后之间的显著相关性,表明低ICOS表达(表现为TME中ICOS+细胞密度较低)是患有与HBV感染相关的HCC的患者存活较好的预测因子。

[0393] 尽管使用120个细胞/ mm^2 的截止值来区分HBV不可知HCC的患者群体(实施例2),但对于HBV阳性HCC,确定了100个细胞/ mm^2 的较低截止值。在TME中每 mm^2 具有100个或更多个ICOS阳性细胞的患者(上四分位数)表现出26.1个月的中值OS,而对于每 mm^2 具有少于100个ICOS细胞的患者(下三个四分位数),OS是未定义的/未达到的。图6。通过对数秩(Mantel-Cox)检验得到的统计学显著性为 $p < 0.05$ 。对RFS而不是OS的相同分析不满足统计学显著性。

[0394] 还使用具有95%置信区间(CI)的风险比(HR, Mantel-Haenszel)来估计ICOS阳性细胞密度与HCC癌症预后(OS)之间的关联程度。HR为0.4345,并且CI为0.2131-0.8861, $p = 0.0219$ 。

[0395] 实施例4. ICOS是AJCC 2期HCC中的预后生物标志物

[0396] 通过进一步分析来自实施例2的数据,我们发现AJCC 2期HCC肿瘤的TME中高密度的ICOS阳性细胞/ mm^2 与不良预后相关。与实施例3类似,我们发现当关注AJCC2 HCC肿瘤时,结果证明了高ICOS细胞密度与不良预后之间的显著相关性,表明低ICOS表达(表现为TME中ICOS+细胞密度较低)是AJCC2 HCC患者的存活较好的预测因子。

[0397] 尽管使用120个细胞/ mm^2 的截止值来区分HBV不可知HCC的患者群体(实施例2),但对于AJCC 2期HCC,确定了100个细胞/ mm^2 的较低截止值。与每 mm^2 具有少于100个ICOS细胞的患者(下三个四分位数)相比,在TME中每 mm^2 具有100个或更多个ICOS阳性细胞的患者(上四分位数)表现出更低的中值OS。图7。通过对数秩(Mantel-Cox)检验得到的统计学显著性为 $p < 0.01$ 。

[0398] 与每 mm^2 具有少于100个ICOS细胞的患者(下三个四分位数)相比,在TME中每 mm^2 具有100个或更多个ICOS阳性细胞的患者(上四分位数)还表现出更低的%RFS。图8。通过对数秩(Mantel-Cox)检验得到的统计学显著性为 $p < 0.05$ 。

[0399] 我们认为,100个细胞/ mm^2 的较低截止值也将适用于更晚期的HCC,例如3期HCC。这可以通过分析本队列中18名3期AJCC患者的样品和存活期数据来验证。

[0400] 实施例5. 细胞间距离是预后的生物标志

[0401] 免疫细胞相对于彼此的分布不仅可以影响患者的抗肿瘤免疫状态,而且可以影响患者的存活期。使用来自与先前实施例相同的HCC患者队列的肿瘤样品,我们测量了ICOS FOXP3双阳性细胞与ICOS单阳性(ICOS阳性FOXP3阴性)细胞之间的距离。ICOS FOXP3双阳性细胞代表对CD8+细胞毒性T细胞和CD4+T辅助细胞具有高度免疫抑制性的活性TReg。ICOS单阳性细胞被认为是非TReg淋巴细胞,如激活的CD8+细胞毒性T细胞和CD4+T辅助细胞。因此,在本研究中,我们研究了可以介导抗肿瘤免疫反应的效应T细胞与可以抑制该反应的活性TReg之间的间距。尽管在此研究了死组织中的细胞间距离,但据信用于取样和保存组织的方法以及所使用的IHC和数字病理学技术保持了组织的完整性,使得细胞之间的距离代表恰在取样前体内肿瘤中的那些。

[0402] 我们发现从ICOS单阳性细胞到最近的ICOS FOXP3双阳性细胞的平均距离与总存活期相关。细胞之间的距离更短与存活期更短相关。

[0403] 细胞:细胞接近度测量

[0404] 如下通过数字病理学定量肿瘤核心、边缘和肿瘤周围区域中单一表达ICOS或FOXP3的细胞和双重表达ICOS/FOXP3的细胞的细胞密度及其之间的距离。

[0405] 对限定区域内的对多种显色标志物呈阳性的细胞进行了定量。对多种显色标志物

共定位的细胞进行了定量。

[0406] 研究了所鉴定的不同细胞群体的空间关系。使用随机森林方法开发了分类算法,并且将其应用于每个完整载玻片图像以鉴定每个区域(边缘/核心/肿瘤周围)内的活组织。开发了单独定制的多重IHC算法以定量FOXP3和ICOS单阳性染色细胞以及双ICOS/FOXP3IHC阳性染色细胞。具体地,苏木精和IHC色原染色剂被差异加权以分割区域内的细胞并建立准确的细胞计数。调整每种色原的阈值以确定呈仅FOXP3阳性(青色核色原)、仅ICOS阳性(3,3'-二氨基联苯胺(DAB)棕色色原)和双FOXP3/ICOS阳性的细胞。将FOXP3和ICOS单细胞计数以及双细胞计数在每个区域的活组织面积上归一化,以获得每个完整载玻片图像的每个区域每 mm^2 组织的阳性细胞数。

[0407] 进一步利用基于细胞的分析数据来绘制肿瘤核心内检测到的细胞表型的空间位置。随后使用这些图来使用嵌入Ha1o平台内的空间分析模块生成ICOS单细胞和双FOXP3/ICOS细胞的接近度和相对空间分布数据。对于每种癌症类型的每组切片,最初生成了每个完整载玻片图像的肿瘤核心内每个ICOS单阳性细胞与其最近的双FOXP3/ICOS阳性细胞的平均距离数据。随后测量了每个完整载玻片图像的肿瘤核心内每个ICOS单阳性细胞的30 μm 内双FOXP3/ICOS阳性细胞的数量。然后对ICOS单阳性细胞30 μm 内的双FOXP3/ICOS阳性细胞进行接近度分析,以生成这些细胞距其最近的ICOS单阳性细胞的平均距离。

[0408] 数据分析

[0409] 总体上如实施例2所述进行数据分析。

[0410] 结果和结论

[0411] 我们计算了来自台湾大学队列的142个HCC样品中的每一个中从ICOS单阳性细胞到其最近的ICOS FOXP3双阳性细胞的平均(均值)距离。此队列的中值平均距离为105 μm 。使用此中值作为截止值对队列进行分层,我们发现平均距离小于105 μm 的患者的总存活期显著低于平均距离为105 μm 或更大的患者。图9。此分层未显示出与RFS的统计学显著关联。使用具有95%置信区间(CI)的风险比(HR,Mantel-Haenszel)来估计ICOS+单阳性细胞到最近的ICOS FOXP3双阳性细胞的距离与HCC癌症的总存活期之间的关联程度。我们计算出HR为1.692(高距离与低距离),并且CI为1.063-2.694; $p=0.0266$ 。

[0412] 因此,ICOS+FOXP3+细胞与ICOS+FOXP3-细胞之间的距离更短与OS更短显著相关($p<0.05$),这表明ICOS+TReg在HCC的TME中积极免疫抑制ICOS+TEff。

[0413] 实施例6. TEff的半径内免疫抑制性TReg的区域影响

[0414] 继先前的实施例之后,我们进一步研究了ICOS+FOXP3+和ICOS+单阳性细胞的空间分布,以确定在ICOS+单阳性细胞(潜在效应细胞)旁边具有高密度的高度免疫抑制性ICOS+FOXP3+双阳性TReg的潜在含义。针对TME,我们鉴定了在任何ICOS单阳性细胞的30 μm 内的ICOS FOXP3双阳性细胞并对其数量进行了计数。

[0415] 通过在每个ICOS单阳性细胞周围取30 μm 的半径来定义区域,我们测量了TME中落入任何一个或多个此类区域内的ICOS FOXP3双阳性细胞的总数,然后将此细胞计数除以TME区域中ICOS单阳性细胞的总数,以得到我们称为区域影响比率的比率。

[0416] 我们确定了总存活期与区域影响比率之间的统计学显著关联。在区域影响比率 <0.1 的患者样品中,患者OS(但不是RFS)显著大于平均值 ≥ 0.1 的样品。图10和表E6-1。

[0417]	中值存活期		
	下3个四分位数	未定义	
	上四分位数	79.00	
	风险比 (Mantel-Haenszel)	A/B	B/A
	比率 (及其倒数)	0.6099	1.640
[0418]	比率的95% CI	0.3819至0.9741	1.027至2.618

[0419] 表E6-1.

[0420] 实施例7.免疫疗法的价值

[0421] 以上实施例表明以下特征都与OS更差相关:

[0422] -肿瘤核心 (TME) 中ICOS的表达更大 (ICOS+细胞的密度更高)

[0423] -ICOS⁺FOXP3⁺/总FOXP3⁺细胞的比率更大

[0424] -ICOS⁺TReg与其他ICOS+细胞之间的接近度更大 (距离更短)

[0425] -在ICOS单阳性细胞的30μm内的ICOS+FOXP3+TReg的数量更大。

[0426] 我们得出结论,免疫抑制性TME在HCC中具有临床意义。TReg可以抑制CD4⁺和CD8⁺ T_H17的功能和增殖。这与早期研究一致,其中TME中TReg的增加和CD8⁺T细胞的减少与患有实体瘤 (包括HCC) 的患者的不良预后相关[2]。

[0427] 例如用诸如KY1044的抗体耗竭/减少此类肿瘤中ICOS^高阳性TReg应当通过减少免疫抑制来改善免疫环境,并且在患有HCC和以这些特征为特征的其他肿瘤的患者中提供临床益处。

[0428] 已经证明KY1044可耗竭癌症患者中的ICOS+FOXP3+TReg。在采用KY1044单药疗法进行的临床试验的多个患者队列中,从基线 (筛选) 到第二给药周期后8天 (C2D8),以3周间隔给药,KY1044降低了ICOS+FOXP3+TReg与所有FOXP3+TReg的比率。图11。

[0429] 实施例8.从患者肿瘤样品计算生物标志

[0430] 我们说明了从来自实施例1至6所述的患者队列的肿瘤样品中确定生物标志读数。

[0431] 如实施例1所述,从肿瘤样品制备组织载玻片,针对ICOS和FOXP3进行染色,并且进行数字分析。图12至14。

[0432] 定义并定量了肿瘤核心区域 (AREA_TME)。

[0433] 记录了肿瘤核心内细胞的以下数据:

[0434] -ICOS单阳性细胞的数量 (SPICOS_NB_TME);

[0435] -FOXP3阳性细胞的数量 (TOTFOXP_NB_TME);

[0436] -ICOS FOXP3双阳性细胞的数量 (DP_NB_TME);

[0437] -从每个ICOS单阳性细胞到其最近的ICOS FOXP3双阳性细胞的平均 (均值) 距离 (DIST_SPICOS_TME),表示ICOS+FOXP3+细胞与ICOS+FOXP3-细胞之间的细胞间接接近度;此平均值的计算由Halo®软件根据其距离测量值和细胞计数数据自动化进行;以及

[0438] -在任何ICOS单阳性细胞的30μm内的ICOS FOXP3双阳性细胞的数量 (DP_NB_30UMSPICOSROI_TME)。

[0439] 将ICOS单阳性细胞的数量和ICOS FOXP3双阳性细胞的数量相加得到ICOS阳性细胞的总数 (TOTICOS_NB_TME)。

[0440] 将ICOS阳性细胞的总数除以肿瘤核心的面积得到ICOS阳性细胞的密度 (TOTICOS_

DEN_TME)。

[0441] 将ICOS FOXP3双阳性细胞的数量除以FOXP3阳性细胞的总数得到呈ICOS阳性的FOXP3阳性细胞的比例(“ICOS+TReg比例”(RATIO_DP_TO_TOTFOXP_TME))。

[0442] 将在任何ICOS单阳性细胞的30 μ m内的ICOS FOXP3双阳性细胞的数量除以TME中ICOS单阳性细胞的总数得到区域影响比率(RATIO_DP_30UMSPICOSROI_TO_SPICOS_TME)。

	样品	截止值
[0443]	AREA_TME	168.49
	TOTICOS_NB_TME	43347
	TOTICOS_DEN_TME	257
[0444]		100
	SPICOS_NB_TME	29254
	TOTFOXP_NB_TME	21825
	DP_NB_TME	14093
	RATIO_DP_TO_TOTFOXP_TME	0.646154
	DIST_SPICOS_DP_TME	0.5
	DP_NB_30UMSPICOSROI_TME	105
	RATIO_DP_30UMSPICOSROI_TO_SPICOS_TME	0.234600397
		0.1

[0445] 表E8-1.来自从HCC 1期HBV+肿瘤获得的组织样品的数据。从整个患者队列计算的生物标志参考值显示在最右列中。

[0446] ICOS+细胞密度、细胞间接近度、ICOS+TReg比例和区域影响比率中的每一个都是本发明中用于患者预后和治疗的生物标志。可以将患者的生物标志读数与队列的参考值进行比较。来自样品的示例性生物标志数据将指示不良预后,因为ICOS阳性细胞的密度大于100mm²,ICOS+FOXP3+细胞与总FOXP3+细胞的比率大于0.5,从ICOS+FOXP3-细胞到其最近的ICOS+FOXP3+细胞的平均距离小于105 μ m,并且区域影响比率大于0.1。呈现此数据的HCC肿瘤患者将预期与其他HCC患者相比具有相对较短的存活期。生物标志数据表明患者将从用抗ICOS和/或抗TReg免疫治疗剂进行的治疗中受益,这可以延长患者的存活期。

[0447] 实施例9. 计算ICOS+TReg比例

[0448] 从来自实施例1至6所述的患者队列的另一个肿瘤样品制备组织载玻片。如实施例1所述,对组织切片针对ICOS和FOXP3进行染色,并且进行数字分析。图15。

[0449] ICOS+TReg比例的分析读出如下:

[0450] TME中ICOS FOXP3双阳性细胞的数量=11,066

[0451] TME中FOXP3单阳性细胞的数量=10,842

[0452] TME中的总FOXP3细胞=21,908

[0453] 比率=11,066/21,908=0.51

[0454] 参考文献

[0455] 1 Wei,Duffy&Allison,Cancer Discov.2018

[0456] 2 Gao Q,et al.J Clin Oncol 25:2586-93 2007

[0457] 3 Tu JF,et al.Sci Rep 6:35056 2016

[0458] 4 Strauss L,et al J Immunol 180:2967-2980 2008

[0459] 5 Kornete M,Sgouroudis E,Piccirillo CA.J Immunol 188:1064-1074 2012

[0460] 6 32nd Annual Meeting and Pre-Conference Programs of the Society for

Immunotherapy of Cancer(SITC 2017):Part Two.Poster P288 Journal for ImmunoTherapy of Cancer 5:87 2017

[0461] 7 Sainson et al.,BioRxiv Sep 2019doi:10.1101/771493

[0462] 8 Mo et al Vaccine 35:5932-5938 2017

[0463] 9 Hansen A,et al.Annals of Oncology 29 2018

[0464] 10 El-Khoueiry AB,et al.Lancet 389:2492-2502 2017

[0465] 11 Zhu AX,et al.Lancet Oncol 19:940-952 2018

[0466] 12 Yau T,et al.Annals of Oncology 30 2019

[0467] 13 Finn RS,et al.J Clin Oncol 1901307 2019

[0468] 14 Calderaro,J.et al.Programmed death ligand 1 expression in hepatocellular carcinoma:Relationship With clinical and pathological features.Hepatology 64,2038-2046 2016

[0469] 15 Yau T,et al.J Clin Oncol 37:4012-4012 2019

[0470] 16 Cheng A-L,et al.Annals of Oncology 30 2019

[0471] 17 Sicklick et al.,Nat Med,Apr 2019 doi:10.1038/s41591-019-0407-5

[0472] 18 Ali et al.,PLoS Med.13:e1002194 2016

[0473] 19 Newman et al.,Nat Methods 12:453-457 2015

[0474] 20 Aran,Hu&Butte,Genome Biol 18:220 2017

[0475] 21 Binneweis et al.,Nat Med 24:541-550 2018

[0476] 22 Cristescu et al.,Science 362 2018

[0477] 23 Jiang et al.Nat Med.2018

[0478] 24 Romano et al.,PNAS 112(19):6140-6145 2015

[0479] 25 Yap TA,et al J Clin Oncol 36:3000 2018

[0480] 26 Feng et al.,JCI Insight 2(14):e93652 2017

[0481] 27 Kagamu et al.,Cancer Immunology Research 8:334-344 2020 DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-19-0574

[0482] 28 AJCC Cancer Staging Manual,Eighth Edition 2018

[0483] 29 Malik,N.&Daymon,M.Improved double immunoenzyme labelling using alkaline phosphatase and horseradish peroxidase.J.Clin.Pathol.35,1092-1094 1982

[0484] 30 Lan,H.Y.,Mu,W.,Nikolic-Paterson,D.J.&Atkins,R.C.A novel,simple, reliable,and sensitive method for multiple immunoenzyme staining:use of microwave oven heating to block antibody crossreactivity and retrieve antigens.:J.Histochem.Cytochem.2017 doi:10.1177/43.1.7822770.

[0485] 31 Ferri,G.-L.,Gaudio,R.M.,Castello,I.F.,Berger,P.&Giro,G.Quadruple Immunofluorescence:A Direct Visualization Method: J.Histochem.Cytochem.2016doi:10.1177/002215549704500201

[0486] 32 Boorsma,D.M.Direct immunoenzyme double staining applicable for monoclonal antibodies.Histochemistry 80,103-106 1984

- [0487] 33 Zhang, W. et al. Fully automated 5-plex fluorescent immunohistochemistry with tyramide signal amplification and same species antibodies. *Lab. Invest.* 97, 873-885 2017
- [0488] 34 Shi, S. R., Key, M. E. & Kalra, K. L. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: an enhancement method for immunohistochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J. Histochem. Cytochem. Off. J. Histochem. Soc.* 39, 741-748 1991
- [0489] 35 Shi, S.-R., Shi, Y. & Taylor, C. R. Antigen Retrieval Immunohistochemistry. *J. Histochem. Cytochem.* 59, 13-32 2011
- [0490] 36 Hennig, C., Adams, N. & Hansen, G. A versatile platform for comprehensive chip-based explorative cytometry. *Cytometry A* 75A, 362-370 2009
- [0491] 37 Giesen, C. et al. Highly multiplexed imaging of tumor tissues with subcellular resolution by mass cytometry. *Nat. Methods* 11, 417-422 2014
- [0492] 38 Angelo, M. et al. Multiplexed ion beam imaging (MIBI) of human breast tumors. *Nat. Med.* 20, 436-442 2014
- [0493] 39 Bandura, D. R. et al. Mass Cytometry: Technique for Real Time Single Cell Multitarget Immunoassay Based on Inductively Coupled Plasma Time-of-Flight Mass Spectrometry. *Anal. Chem.* 81, 6813-6822 2009
- [0494] 40 Mavropoulos, A. et al. Equivalence of Imaging Mass Cytometry and Immunofluorescence on FFPE Tissue Sections, 2017
- [0495] 41 Wagner, J. et al. A Single-Cell Atlas of the Tumor and Immune Ecosystem of Human Breast Cancer. *Cell* 177, 1330-1345.e18 2019
- [0496] 42 Zhang, T. et al. Immunocyte Profiling Using Single-Cell Mass Cytometry Reveals EpCAM⁺CD4⁺T Cells Abnormal in Colon Cancer. *Front. Immunol.* 10 2019
- [0497] 43 Ijsselsteijn, M. E., van der Breggen, R., Farina Sarasqueta, A., Koning, F. & de Miranda, N. F. C. C. A 40-Marker Panel for High Dimensional Characterization of Cancer Immune Microenvironments by Imaging Mass Cytometry. *Front. Immunol.* 10 2019
- [0498] 44 Han, G., Spitzer, M. H., Bendall, S. C., Fantl, W. J. & Nolan, G. P. Metal-isotope-tagged monoclonal antibodies for high-dimensional mass cytometry. *Nat. Protoc.* 13, 2121-2148 2018
- [0499] 45 International Classification of Diseases for Oncology, Third Edition (ICD-O-3) WHO 2000
- [0500] 46 Lee et al., *Science Immunology* 5 eaba0759 2020
- [0501] 47 Forner A, Reig M, Bruix J, *Lancet* 391:1301-1314 2018
- [0502] 48 Llovet JM et al. *N Engl J Med* 359:378-90 2008
- [0503] 49 Cheng AL, et al. *Lancet Oncol* 10:25-34 2009
- [0504] 50 Bruix J, et al. *Lancet* 389:56-66 2017

- [0505] 51 Kudo M,et al.Lancet 391:1163-1173 2018
- [0506] 52 Abou-Alfa GK,et al.N Engl J Med 379:54-63 2018
- [0507] 53 Zhu AX,et al.Lancet Oncol 20:282-296 2019
- [0508] 54 Dao,Tao et al.Oncoimmunology 8(7)1570778 2019
- [0509] doi:10.1080/2162402X.2019.1570778
- [0510] 55 Kabat,E.A.et al.,1991,“Sequences of Proteins of Immunological Interest”,5th edit.,NIH Publication no.91-3242,U.S.Department of Health and Human Services
- [0511] 56 Chothia,C.&Lesk,A.M.,1987,“Canonical structures for the hypervariable regions of immunoglobulins”,J.Mol.Biol.,196,901-917
- [0512] 57 Lefranc,M.P.,“Unique database numbering system for immunogenetic analysis”,Immunol.Today,18,50 1997
- [0513] 58 Lefranc M.P.,IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor variable domains and Ig superfamily V-like domains,Dev Comp Immunol.27(1):55-77 2003
- [0514] 59 Creighton,Proteins,W.H.Freeman and Company(1984)
- [0515] 60 Dordo et al,J.Mol Biol,1999,217,721-739
- [0516] 61 Taylor et al,J.Theor.Biol.119(1986);205-218
- [0517] 62 S.French and B.Robson,J.Mol.Evol.19(1983)171
- [0518] 63 Strohl,BioDrugs(2015)29:215-239
- [0519] 64 Gül et al.,“Antibody-Dependent Phagocytosis of Tumor Cells by Macrophages:A Potent Effector Mechanism of Monoclonal Antibody Therapy of Cancer”,Cancer Res.,75(23),December 1,2015
- [0520] 65 Lazar et al.,2006,Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,Mar 14;103(11):4005-10
- [0521] 66 Dall et al.,Immunol 2002;169:5171-5180
- [0522] 67 Natsume et al.,2009,Drug Des.Devel.Ther.,3:7-16 or by Zhou Q., Biotechnol.Bioeng.,2008,Feb 15,99(3):652-65)
- [0523] 68 Shields et al.,2001,J.Biol.Chem.,Mar 2;276(9):6591-604)
- [0524] 69 Idusogie et al.,J.Immunol.,2001,166:2571-2575
- [0525] 70 Natsume et al.,2008,Cancer Res.,68:3863-3872
- [0526] 71 Bruix J,et al.Lancet 389:56-66 2017
- [0527] 72 Kudo M,et al.Lancet 391:1163-1173 2018
- [0528] 73 Abou-Alfa GK,et al.N Engl J Med 379:54-63 2018
- [0529] 74 Zhu AX,et al.Lancet Oncol 20:282-296 2019
- [0530] 75 Kroemer et al.Immunologic Cell Death in Cancer Therapy,Ann Rev Immunol.31:51-72 2013
- [0531] 76 Galluzzi,Zitvogel&Kroemer Canc.Imm.Res.4:895-902 2016
- [0532] 77 NCSS Statistical Software,Chapter 546,One ROC Curve and Cutoff Analysis.

[0533] Documentation for NCSS 2020 Stastistical Software.

[0534] 78 Ito T,et al.Immunity 28(6):870-880 2008

[0535]

表B. 生物标志总结

在组织切片的肿瘤核心区域中，评估了TME内的以下生物标志中的一个或多个。

生物标志	细节	优选方法的注解	单位	示例性测量值（例如，在HCC中）
ICOS+密度	表达ICOS蛋白的细胞（即，ICOS阳性（ICOS+）细胞）的密度或浓度	对所有ICOS+细胞（包括ICOS单阳性细胞和ICOS FOXP3双阳性细胞）进行计数	每个区域或面积的细胞数，例如细胞/mm ²	> 120个细胞/mm ² > 100个细胞/mm ² ，在已知与乙型肝炎病毒（HBV）感染相关的HCC中，或根据美国癌症联合委员会的标准为2期或更晚期HCC（AJCC2）
ICOS+ TReg比例	呈ICOS+的FOXP3+细胞的比例，表示呈ICOS阳性的TReg的比例	TReg活性的量度，指示TME中的免疫抑制水平	分数或%	> 0.5
细胞间接近度	ICOS+ FOXP3-: ICOS+ FOXP3+细胞间接近度，是每个ICOS单阳性细胞（ICOS+ FOXP3-细胞）与其最近的ICOS FOXP3双阳性（ICOS+ FOXP3+）细胞之间的平均（均值）距离，表示ICOS阳性TReg与其他ICOS阳性细胞（包括ICOS+ TReg）之间的接近度	从核中心到核中心测量	距离，例如μm	< 105 μm
区域影响比率	在一个或多个ICOS单阳性细胞的限定接近度（“影响半径”）内ICOS FOXP3双阳性细胞的数量与ICOS单阳性细胞的总数的比率。影响半径表示在ICOS FOXP3双阳性细胞与ICOS单阳性细胞之间可以发生细胞-细胞和/或细胞因子依赖性通信的距离（例如，30 μm），因此双阳性细胞的比子集代表定位成能够抑制一个或多个TReg的TReg	从ICOS单阳性细胞的核中心测量的半径，对由半径定义的区域内的所有ICOS+ FOXP3+细胞进行计数	分数或%	> 0.1

[0536]

表 C. 抗体恒定区序列

Seq ID No:	人 IgG1 恒定区	IGHG1*01	描述	序列
15			人重链恒定区 (IGHG1*01) 核苷酸序列	gcctccaccaaggccccatcggtcttccccctggcacctctcctccaagacacctctg ggggcacaggccctggctgctgggtcaaggactactctcccgaccgggtgacgggt gtcgtgaaactcaggccctgaccagcgcgtgcacaccttcccggtctctctacag tcttcaggactctactcctcagcgcgtggtgacctgacctccagcagcttgggca cccagacctacatctgcaactgaatcacagccacgcaacaccaaagtggaagaa agttgagcccaaatcttgacaaaactcacacatgccaccgtgccagcacctgaa ctcctgggggaccglcagtccttccctcttcccccaaaaccccaaggacacctcalga tctccggaccctgaggtcacatgctggtggtgacgtgagccacgacacacctga ggtcaagttcaactggtacgtgacggcgtggagtgataatgccaaagacaaagccg cgggagcagtaacaacgacgtaccgggtggtcagctcctcacctcctgcacc aggactggtgaatggcaaggagtacaagtcaaggtctccaaacaaagccctccagc ccccatcgagaaacccatctccaaagccaaaggcagcccgagaaacacaggtgtac acctgccccatccccggatgagctgaccaagaccaggtcagctgacctgacctgg tcaaaggcttctatccagcgacatcccggtggagtgagaggaatggcagccgga gaacaactacaagaccacgcctcccggtgctggactccgacggctctctctctac agcaagctcaccgtggacaagagcaggtggcagcagggaacgtcttctcatgccg tgatgcatgaggctctgcacaaccactacaacgcagaagagcctctccctgtctccggg Laaa
16			人重链恒定区 (IGHG1*01) 蛋白质序列 (P01857)	ASTKGFSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKVEPKSCDKTHCTCPCPAPE LILGGPSVFLPPPKKDTLMI.SRTPVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI.SKAKGQPREPQVY TLPF.SRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTFPV.LDSDGSGFFLY SKLTIVDKSRWQQGNV.FSCSVMHLELNHTYQKLSLSLSPGK

[0537]

17	人 IgG1 恒定区	IGHG1*02 或 IGHG1*05	人重链恒定区 (IGHG1*02 或 IGHG1*05) 核苷酸序列	ggctccacccaaggggcccatcgggtctcccccctgggacccctccccaagagacacclctlg ggggcacagcgccctgggtgcctgggtcaaggactactccccaacccgtgacgggt gctgtgaactcagcgccctgacacagcggtgacacactcccggtgctccctacag tctcaggactctactccctcagcagctggtgacggtgcccctccagcagcttggtgga ccagacctacatctgcaacgtaatacaagcccagcaacccaaggtggacagaa agttgagcccaaatcttgacaaaactcacatgccacgtgccacgtgcccagcacctgaa ctcctgggggacgtcagttctctctctcccccaaaacccaagacacccctcatga tctcccgaccctgaggtcacatggtggtggcgtgagcgtgagccagaaacccctga ggtcaagtccaactggtacgtggacggtggaggtgcataatgccaaagacaaagccg cgggagagcagtaacaacagcacgtaccgtggtcagctcctcaccgtcctgcacc aggactggtgaatggcaaggagtacaadtgcaaggtctccaacaaagccctccagc cccatcgagaaaacccatctccaaagccaaaggcagcccgagaaacacaggtgtac acctgccccatcccggtgagctgaccaaagaaacaggtcagcctgacctgctgg tcaaggctctctccagcgacatcgctgggtggagagcaatgggagccgga gaacaactacaagaccacgctccgtgctgactcggacggtcctctctctctac agcaagctcacgtggacaaagagcagtggtgaggggaacgtctctctctctccg tgatgcatgaggtctctgcacacccactacacgacgagagcctcctctctccggg Taaa
18			人重链恒定区 (IGHG1*02) 蛋白质序列	A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F F A V L Q S S G L Y S L S S V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K K V E P K S C D K T H T C P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K P R E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

[0538]

19	人 IgG1 恒定区	IGHG1*03	人重链恒定区 (IGHG1*03) 核苷酸序列 (Y14737)	gcctccaccgaaggcccatcgggtcttcccccctggagccctctcccaagagacacctctg ggggcacagcgccctgggtgcctggtcaaggactactcccccgaacccgtgacgggt gtcgtggaactcaggccctgacccagcggtgcaacacctcccggtgctcctacag tctcaggactctactccctcagcagctggtgacccgtgccctccagcagcttgggca cccagacctacatctgaacgtgaatcaagaagcccaagcaacccaggtggacagag agttagcccaaatctgtgacaaaactcacatgccacccgtgccagcacctgaa ctcctgggggacgtcagctctctctctcccccaaaacccaagacacccctcatga tctccggacccctgaggtcacatgctggtggtgacgtgagccacgaagaccctga ggtcaagttcaactggtacgtggacggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccg cgggaggagcagtaacaacgacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcacc aggactggtgaatggcaaggagtacaagtgaagtgcaaggtctccaaacaaagccctccagc cccatcgagaaacacatctccaaagccaaaggcagcccgagacccacaggtgtac acctgccccatccccggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgaectgectgg tcaaggcttctatccagcgacatccgtggagtggagagcaatgggcagccgga gaacaactacaagacacgcctccgtgctgactcagacggctccttctctctat agcaagctcaccgtggacaagagcagtggtggcagcagggaacgtcttctatgctccg tgatgcatgaggctctgacaaacccactacacgcagagaagcctctcctgtccccggg taaa
20			人重链恒定区 (IGHG1*03) 蛋白质序列	A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F F E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V T V P S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K T K F R E E Q Y N S T Y R V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y K T T P F V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K

[0539]

21	人 IgG1 恒定区	IGHG1*04	人重链恒定区 (IGHG1*04) 核苷酸序列	gctctccacaaaggcccatcggtcttctccctctggcaaccctctccaaagagacacctctg ggggcacagcgccctggctgctgctggtcaaggactacttcccgaacccgtgacgggt gtcgtggaactcagccctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctgacctg tcctcaggactctactcctcagcagcgtgtgacctgacctcagcagcagcgttgggca ccagacctacatctgcaacgtgaatcacagcccaagcaacccaaggtggacaagaa agttgagcccaaatcttctgacaaaactcacacatgccaccgtgccacagcactgaa ctcctgggggacgtcagttcttcttcccccaaaaaccccaaggacacctcatga tctccggaccctgaggtcacatgctggtggtggcgtgagccacgaagacctga ggtcaagttcaactggtacgtgagcggcgtgaggtgcataatgccaaagcaaaagccg cgggagagcagtacaaacagcacgtacctgtggtcagcgtcctcaccgtcctgacc aggactggtgaatggcaaggagtacaagtcaaggtctccaacaaagccctccagc cccatcgagaaaaccatctccaaagccaaaggcagcccgagaccacacaggtgtac acctgccccatccccggatgagctgaccagaaccaggtcagcctgacctggtg tcaaagctctatccccagcacatcgccgtgagtgaggagagcaatggcagccgga gaacaactacaagaccacgctccctgctgactccgacggtcctctctctctac agcaagctcacgtggacaagagcaggtggcagcagggggaacatcttctcatgctccg tgatgcatgaggtctgcacaaccactacacgcagagaagagcctctctctccggg taaa
22			人重链恒定区 (IGHG1*04) 蛋白质序列	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAALGLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVWTVFSSSIIGTQTYICNVNHKPSNTKYDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVY TLPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPFVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNIFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0540]

23	失能的人 IgG1 重链恒定区	失能的人 IGHG1*01	失能的人 IGHG1*01 重链恒定区核苷酸序列	gctccacacaaaggcccaatcggctcttcccccctggcaccctccccaagagacacctctg ggggcacagcgccctggcctgctgctgcaaggactacttccccgaacccgtgacgggt gtdtggaactcagcgccctgacagcgctgcaacacttccccgtgctctacag tctcaggaactctactcctcagcagcgtgtgacogtgcctccagcagcttgggca ccagacctacatctgcaacgtgaatcacagccacagcaacacaaagtggaacagaa agtgagcccaaatcttgtagcaaaactcacacatgccacccgtgccacacccctgaa ctgagggggacccgtcagctcttctcttcccccaaaacccaaagacacccctatga tctccggaccctgaggtcacatgctggtggtgagcgtgagccacgaagacccctga ggtcaagttcaactggtacgtgacgcggtgaggtgcataatgccaaagcaaaagccg cgggagagcagtagtaaacagcacgtacogtgtggtcagcgtcctcaccgtgaccc aggaactgctgaatggcaaggagtagaagtgcaaggtctccaaacaaagccctccagc cccatcgagaaaacccatctccaaagccaaagggcagcccgagaccacacaggtgac accctgccccatccccggatgagctgacaaagaaacaggtcagcctgacctgtgg tcaaagcttctatcccagcacatcgccgtgagtgaggagagcaatgggcagccgga gaacaactacaagaccacgcctcccgctgctgactccgacgctcctctctctac agcaagctcacogtggaacagagcaggtggcagcagggggaacgtctctcatgctccg tgatgcatgaggtctctgcacacacacacacacagcagagaagcctctctctccggg taaa
24			失能的人 IGHG1*01 重链恒定区氨基酸序列。 与野生型序列不同的两个 残基用 粗体 标识	ASTKGPSVFPLAPELLSSKSTSGGTAALGLVLDYFEPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVWTFPSSSLGTOTYICNVNHPKNTKVDKVEPKSCDKTHTCPPCPAPE LAG APSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVGVHNAKTKP REQVNSTYRVSVLTVHLQDNLNGKEYKCVSNKALPAPIETISKAKGQPREPQVY TLPFSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPFVLDSDGSFFLY SKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0541]

25	人 IgG2 恒定区	IGHG2*01 或 IGHG2*04 或 IGHG2*05	人重链恒定区 (IGHG2*01 或 IGHG2*05) 核苷酸序列	gctccacaaaggcccatcgctcttccccctggccccctgctccagaggagacacctccg agagcacagcccgctggctcctggtcaaggactacttccccgaacccggtgacgggt gtggtggaactcaggcgtctgacacggcgtgcaacaccttccagctgtcctacag tccctcaggactctactcctcagcagcgtgtgacccgtgccctccagcaacttcggca ccagacctacactgcaacgtagatcacaagcccagcaacccaaggtggacaagac agttgagcgcaaatgttggtcgagtgccccacgtgccagcaccaacctgtggcagga ccgtgctcttcttcccccaaaacccaaggacacctcatgatctccccggcccc ctgaggtcacgtgctggtggtgagctgagccacgaagacccccgaggtccagtcaa ctggtacgtggacggcgtggagtgcaaatgccaaagacaagcccagggagcag ttcaacagcacgttcctgtggtcagcgtccctcacccgtgtgacaccaggaactgga acggcaaggagtacaagtcaaggtctccaaagggcctccccagcccccatcgaga aacctctccaaaaccaaaggcagccccgagaaacacagglgtacacctggccccca tccccggaggagatgacaaagacccaggtcagcctgacctgctgtcaaggcttct acccagcgacatcgccgtggagtgaggagacaatggcagccggagaaacactaaa gaccacctcccatgctggactccgagcgtctcttctctacagcaagctcacc gtggacaagagcagtgggcagcaggggaacgtctctcatgctcgtgatgcatgagg ctctgcaacaaccactacacgcagaagacgtctcctgtctccgggtaaa
26			人重链恒定区 (IGHG2*01) 蛋白质序列	ASTKGPSVFPLAFCRSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SGLYSLSVTVFSSNFGTQTYTCNVVDHKSNTKVDKTKVERKCCVECPCPAPPVAG PSVFLFPPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPRREEQ FNSTFRVVSIVLTIVVHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTIISKTKGQPRFPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDSGSFFLYSKLT VDKSRWQOGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0542]

27	人 IgG2 恒定区	IGHG2*02	人重链恒定区 (IGHG2*02) 核苷酸序列	GGCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCGCCCTGCTCCAGGAGACACCTCCG ACAGCACAGCGCCCTGGGCTGCTGCTCAAGAGCTACTTCCCGAACCCGCTGACGGT GTGCTGGAATCAGGGCTCTGACAGCGGCTGACAGCGGCTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAG TCCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGTGACCGTGACCTCCAGCAACTTCGGCA CCCAGACCTACCTGCAACGTAGATCACAAGCCAGCAACCAAGTGGACAAGAC AGTTGAGCGCAAAATGTTGTGAGTGCACCGTGCCAGCGTGCACACCACTGTGGCAGGA CCGTCACTCTTCTCTTCCCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCC CTGAGTCACGTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCAGCAAGACCCCGAGGTCAGTTCAA CTGGTACGTGGACGGCATGGAGGTGCATGATGCCAAGACAAAGCCAGGGAGGAGCAG TTCAACAGCAGCTTCCGTGTGTGTCAGCGTCTCACCGTCTGCACCAAGGACTGGTGA ACGGCAAGGAGTACAAGTCCAAGGTCTCCAACAAAGGCTCCAGCCGCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAACCAAGGGCAGCCCGAGAACCAACAGGTGTACACCTGCCCCCA TCCCGGAGGAGATGACCAAGACCAAGGTGAGCTGACCTGCTGCTGCTCAAAGGCTCT ACCCAGCGACATCGCGTGGAGTGGAGAGCAATGGCAGCGCGGAGAACAACTACAA GACCACCTCCCATGCTGGACTCCGAGCGTCTTCTTCTCTCTACAGCAAGCTCACC GTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG CTCTGCACACCACTACACACAGAGAGCTCTCCCTGTCTCCGGGTAA
28			人重链恒定区 (IGHG2*02) 蛋白质序列	ASTKGPSVFPLAAPSRSSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVTVTSSNEGTQTYTCNVDPKPSNTKVDKTVKRCCKVECPGPCPAPVAG PSVFLFPFKPDTLMLSRPEVTGVVDVSHEDPEVQFNWYVDGMEVHNATKPREEQ ENSTFRVSVLTVVHQDMLNGKEYCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSPFLYSKLT VDKSRWQOGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0543]

29	人 IgG2 恒定区	IGHG2*04	人重链恒定区 (IGHG2*04) 核苷酸序列	gccctccaccgaaggcccatcgggtcttccccctggcgccctgctccaggagcagcactccg agagcacagggccctgggtgctgctggtcaaggactacttccccgaacccggtgacgggt gtctggaaactcagcgtctgtaccagcgggtgcacacttccagctgtctctacag tcctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacctgccctccagcagcttgggca ccagaccctacacctgcaacgtagatcacagccagcaaacacacaggtggagacagac agttgagcgcaaatgttgtgtcgtgagtgccacccgtgcccagcacccctgtggcagga ccgtcagttcttctcccccaaaccaaggacacccctcatgatctccccgaccc ctgaggtcacgtgcgtggtggtgagctgagccagcaagaccccgaggtccagttcaa ctggtacgtggaacggcgtggaggtgataatgcaagacaaagccacggagggagcag ttcaacagcagttccgtgtggtcagctcctcacccgttgtgacacaggactggctga acggcaaggagtacaagtcaaggtctccaaaggtcccccagccccccatcgagaa aacctctccaaaacccaaagggcagccccgagaaacacacaggtgtacacctgccccca tccccggaggagatgaccaaagaccaggtcagctgacctgctggtcgaaggcttct acccagcgacatgccgtggagtgaggagcaatgggagccgagccgagaaacactacaa gaccacacctccatgctgactccgacggctcctctctctctacagcagctcacc gtggacaagagcaggtggcagcaggggaacgtctctctcgtccgtgatgcatgaggtg ctctgcacacccactacacgacagaagacctcctgtctccgggtaaa ASTKGFVFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYTCNVDRKPSNTKVDKTVKRCCKVECPCPAPPVAG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKREEQ FNSTFRVSVLTWVHODWLNKGYKC KVSNGKGLPAPIEKTISKTKGQRPPEPVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDSGSFYLYSKLT VDKSRWQOGNVFSCSVMHREALHNYTQKSLSLSPGK
30			人重链恒定区 (IGHG2*04) 蛋白质序列	

[0544]

31	人 IgG2 恒定区	IGHG2*06	人重链恒定区 (IGHG2*06) 核苷酸序列	GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCTGGGCCCCCTGCTCCAGGAGCACCTCCG ACAGCACAGCGGCCCTGGGCTGCTGCTCAAGGACTACTTCCCGAACCGGTGACGGT GTGCTGGAACCTCAGGCGCTTGACACAGCGCGGTGCACACCTTCCCGGCTCTCTACAG TCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGTGACCGTGCCCTCCAGCAACTTCCGGCA CCCAGACCTACACCTGCAACGTAGATCACAGCCAGCAACACCAAGGTGGACAAAGAC AGTTGAGCGCAATGTTGTGTCGAGTGCCACCGTGCCCGAGCACACCTGTGGCAGGA CCGTCACTCTTCTCTTCCCGCCCAAAACCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACCC CTGAGGTCAGGTGCGGTGGTGGAGGTGCATTAATGCCAAGACAAAGCCACGGAGAGCAG TTCAACAGCACGTTCCGTGTGCTCAGCTCCTCACGCTGTCACCCAGGACTGGCTGA ACGGCAAGGATACAAGTGCAAGGTCTCCAAACAAAGGCCCTCCAGCCCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAACCAAGGCGAGCCCGAGAGACACAGGTGTACACCTGCCCCCA TCCCGGAGGAGATGACCAAGAACAGGTGACCTGACCTGCTGCTCAAAGGCTTCT ACCCAGCGACATCTCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGACGCGGAGAGAACAACTACAA GACCAACCTCCCATGCTGGACTCCGACGGCTCTTCTTCTCTACAGCAAGCTCACC GTGGACAAGACAGGTGGCAGCGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGG CTCTGCACACCACTACACAGAGAGCCCTCCCTGTCTCCGGTAAA ASTKGFSVFPLAPCSRSTSESTAAALCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVTVTPSPSNFGTQTYTCNVDRHPSTKVDKTVKRCVCECPFPAPFVAG PSVFLPPKPKDTLMTSRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVVHNKATKPREEQ FNSTFRVSVLTWVHQDLNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPRFPQVYTLPP SREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGQPENNYKTPPPMLDSDGSFFFLYSKLT VDKSRWQQGNVSCFVSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
32			人重链恒定区 (IGHG2*06) 蛋白质序列	

[0545]

33	人 IgG4 恒定区	IGHG4*01 或 IGHG4*04	人重链恒定区 (IGHG4*01 或 IGHG4*04) 核苷酸序列	gtttccaccaaggcccatcgcgtcttccccctgggcccctgctccaggagcacctccg agagcacagccgctgggtgcctggtcaaggactacttccccgaacccggtgacggg gtcgtggaactcagcgccctgacccggtgcgtgcaacacttccccgcttccctacag tctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacccgtgcccctccagcagcttgggca cgaagacctacacctgaacgtatgatacaagcccagcaacacccaggtgacaaagag agttgagtcctcctggtcccccatgccccatcatgccccagcacctcatgatctccgga ggacctcagttctcctgttcccccaaacccaaaggacactctcatgatctccgga ccccctgagtcagtcggtggtggtgagctgagccaggaagaccccgaggtccagtt caactgtacgtggatggcgtggagtgcatatccaaagacaaagccgggagag cagttcaacagcacgtaccgtgtgtcagcgtcctcaccgtcctgacccaggtggc tgaacgggaaggagtaacagtgcaaggtctccaaagagcctccgctccctccatcga gaaacccatctccaaagccaaaggcagccccgagagccacaggtgtacacccctgcc ccatccagggagatgacaaagaaacccaggtcagcctgacctgctggtcaaaagct tctacccagcgacatgcgctggagtggtggagagcaatggcagccggagaaacacta cagaccacgctccgctgctggaactccgagcgtccttctctacagcagcta accgtggacaagagcaggtggcagggagggaatgtctctcatgctccgtgatgcagt aggctctgcacacacactacacacagagacccctccctgtctctgggtaaa ASTKGPSVFFLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVAVTVPSSSLGTITTCNVDDHKEPNTKVDKRVESKYGPPCPSPAPFELG GFSVFLPPPKPDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTRPREE QFNSTYRVVSVLTVQLQDWLNQKEYRCVSNKGLPSSIEKTIISKAKQFPFPQVYTLF PSQEEMTKNQVSLTCLIVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDSGSFYLSRL TVDKSRWQEGNVFSCSYMHEALHNHYTQKSLSLGLK
34			人重链恒定区 (IGHG4*01) 蛋白质序列 (P01861)	

[0546]

35	人 IgG4 恒定区	IGHG4*02	人重链恒定区 (IGHG4*02) 核苷酸序列	gcttccaccaggcccatccgtcttccccctgggcccctgctccaggagagacactccg agagcacagccgcccctgggtgcctggtcaaggactacttccccgaacccgtgacggg gtcgtggaactcaggcgcctgaccagcggtgacaccttccccgctgcctacag tctcaggactctactccctcagcagcgtggtgacgtgcccctccagcagcttggcca cgaagacctacacgtgcaacgtagatcaagaccagcaacacccagggtggacaagag agttggtccaaatatggtccccctgccatgccagcacctgagttcctcctggg ggacctcagttcctctgttccccccaaaccccaaggacactctcatgatccccgga cccctgaggtcacgtgcgtggtggtgacgtgagccaggaagacccgaggtccagt caactggtacgtggatggcgtggaggtgcataatgccaagacaacccgaggagag cagttcaacagcacgtaccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcgtgaccagactggc tgaaaggcaaggagtacaagtgaaggtctccaaaggcctccgctccctccatcga gaaaacctctccaaaggccaaaggcagcccagagagccacaggtgtacacccctccc ccatccaggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacctggtcctcaaggct tctacccagcgacatcgccgtggagtgagagcaatggcagcgggagaacaaacta caagaccacgctccctgctggactcgacggctccttctctctacacagcagcta accgtggacaagagaggtggcaggagggaatgtcttctcatgctccgtgatgatg aggctctgcacaaccactacacgacgagaagacgtcctcctgtctctgggtataa ASTKGFVFPIAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPKPKSNTKVDKRVESKYGPPCPSPAPPEFLG GESVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVOFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QENSTYRVVSVLTVVHQDMLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPL PSQEMTKNQVSLTCLIVKGFPYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPFVLDSDGSEFFLYSRL TVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG
36			人重链恒定区 (IGHG4*02) 蛋白质序列	

[0547]

37	人 IgG4 恒定区	IGHG4*03	人重链恒定区 (IGHG4*03) 核苷酸序列	gcttccacacaaagggccacatccgttctcccccctggcgcgcctgcttccagagagacacctccg agagcacagccgcctgggtgcctgggtcaaggagctacttccccgaacccgtgacggg gtctggaaactcaggccctcctcagcagcggcgtgcacaccttccccgctgtctctacag tcttcaggactctactcctcagcagcgtgtgacgtgcctcctccagcagcttgggca cgaagacatacactgcaacgtagatcaaaagccagcaacacaaagtggaacaagag agttgagtcacaataatggtcccccattgccatcatgccagacctgagttcctgggg ggacatcagttctctgttcccccaaaacccaaaggacactctcatgatctcccgga cccctgaggtcagtcggtggtggagcgtgagccaggaagaccccgaggtccagtt caactgtacgtggatggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccgcgggagag cagttcaacagcacgtacctgtgtgacgtcctcaccgtcctgcacccagactggc tgaacggcaaggagtacaagtgaaggtctccaaacaaaggcctccctccctcatcga gaaacccatctccaaagccaaaggcagccccgagagccacagglgtacacctgcc ccattcccaggaggagatgacaaagacccaggtcagctgacctgacctggtcaaggct tctacccagcgacatcgccgtggagtggaagcaatgggagccggagacaacta caagaccagcctccctgctggtgactccgacggctccttctctctacagcaagctc accgtggacaagagcaggtggcagaggaggacgtctctctatgctccgtgatgatg aggtctgcacacaccactacacgagaaagcctcctcctgtctctgggtaaa
38			人重链恒定区 (IGHG4*03) 蛋白质序列	ASTKGFSVFPLAPCSRSTSETAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSSVTVFSSSLGTQTYTCNVDRHPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPPEFLG GPSVFLFFPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSVQEDPEVQFNWYVDGVVHNAKTKFREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKQPRFPQVYTLF PSQEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKL TVDKSRWQEGNVFSCSVNHHEALHNHYTQKSLSLGLGK

[0548]

39	人 IgG4-PE 恒定区	IGHG4-PE	人重链恒定区 (IGHG4-PE) 核苷酸序列 A 版	ggctccaccgaaggggccacatccgttclcccccctggcgccclgcltccaggagacacclccg agagcacggccgcccctgggtgctcctgggtcaaggactacttcccgaacccagtgaacgtg gtcgtggaactcaggccgcttgacagcgccgtgcaeccttcccggctgtcctacag tcttcaggactctactcctcagcagcgtgtgacccgtgcccctccagcagcttgaggca cgaagacctacacctgcaacgtagatcaaaagccagcaacaacaaaggtggacaagag agttgagtcctcaaatgtgtcccatgccacatgccacgtgccagcgcctgaatttgaggg ggaccatcagttctcctgttcccccaaaacccaaggacactctcatgatctccgga ccccaggtcacgtcgtgtgtgtgacgtgagccaggaagacccagaggtccagt caactgtacgtggatggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaagccggggagag cagttcaacagcacgtaccgtgtgtgacgtcctcaccgtcctgacccagactggc tgaaaggcaaggagtacaagtgaaggtctccaaagacccctccgtcatcgatcga gaaacccatctccaaagccaaaggcagcccgagagccacaggtgtacacccctccc ccatccaggaggagatgacaaagacccaggtcagcctgacotgctgtgtcaaaagct tctacccagcgacatcccggtgagtgagagcaatggcagccggagacaacta caagaccacgctcccggtcctgactccgacggatccttctctctctacacagccta accgtggacaagagcaggtggcaggagggaatgtcttctcatgtctcctgtatgcatg aggctctgcacacacactacacagaaagacgtctcctgtctctgtgggtaaa gctccaccgaagggaactagcgtgttccctctcgcccctgttccaggtccacaagcg agtcacccgtgcccctggctgtgtgtgaaagactacttcccagacccgtgaacgt ctcctggaaatagcggagccctgacctccgctgtgcacatttccgcccgtctgcag agcagcgactgtatagcctgagcagcgtgtgacccgtgccagctccagcctcgcca ccaaacctacacctgcaacgtggacacaaagccctccaaacccaaaggtggacaagcg ggtggagagcaagtacggcccccttgcctcctgtcctgccctgaggtcgaggga ggacccctccgtgttctgttcccccaaaacccaaggacacccctgatgtctccgga cacccaggtgacctgtgtgtcgtggacgtcagccagagagacccaggtgcagtt caactgtatgtggacggcgtggaggtgcacatgccaaaccaaagccagggagag cagttcaattccacctacaggtgtgtgagcgtgtgacccgtcctgacatcaggttggc tgaaaggcaaggagtacaagtgaaggtgtccaaagggactgccagctccatcga gaagacctacagcaggctaaaggccagccgagggagccccaggtgtatccccctgct cctagccagggaagatgacaaagacccaaagtgtccctgacotgctgtgtgaaggat tctacccctccgacatcccggtggagtgagagcaatggcagcccgagacaacta caaaacacccccctcccggtcctcgtatagcagcggcagcttcttctctacagccgctg acagtggaagagcaggtggcaggagggaacgtgttctcctgttccgtgatgcacg aggccctgcacaaatcactacacccagaagacgtctcctgtccctgtgggcaag
40			人重链恒定区 (IGHG4-PE) 核苷酸序列 B 版	

[0550]

43	失活的人 IgG4 恒定区	失活的人重链恒定区 (IGHG4) 核苷酸序列	gctccacaaaggccacatccgtcttccccctggccctgctccagagacacctccg agagcacggccgcctgggtgcctgggtcaaggactacttcccogaaacagtgacggt gtcgtgaactcagcgcctgaccagcgcgtgcacaccttcccgcgtgtcctacag tctcaggaactactcctcagcagcgtgtgacctgcccctccagcagctcgggca cgaaacctaacctgcacagtagatcacagcccagcaacaacaggtggacaagag agttgagtcacaaatagttccccctgcccacatgccagcgcctccagcttgcggg ggacatcagttctctgttccccccaaaaacacacagcactctcatctccccga ccccaggtcacgtgcgtggtgagcgtgagccaggaagaccccaggtccaggt caactgtacgtggatggcgtggaggtgcataatgccaaagacaaacccggaggag cagttcaacagcacgtaccgtggtgcagcgtccctcacctgcacacagactggt tgaaaggcaaggagtagacaagtgcgaaggtctccaaaaaggctcccgctcatcgatcga gaaacacatctccaaagcgaagggcagcccagagacacaggtgtacacctgcc ccatccagggaggagatgaccaagaacacaggtcagctgacctgctgctcaaaagct tctaccccagacatccgctggagtggaagcaatgggcagcgaagacaacata caagaccacgctccggtgctgactccgcggatccttctctctacagcaggtca accgtggacaagagcaggtggcaggggaatctctctctacgtccggtgcattg aggctctgcacacacacacacagagacgtcctctctctctggtggtaaa
44		失活的人重链恒定区 (IGHG4) 蛋白质序列 (相对于人 IgG4 的失活突变以粗体显示)	ASTKGPSVFPLAAPSSTSESTAALGLVDKDYFEPVTVSNWGALTSGLVHFPVAVLQ SSGLYSLSSVTVFSSSLTKYTYTGNVDHPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPPVAG GPSVFLFPKPDKDTLMISRTEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVFNHNKTRPREE QFNSTYRVVSLTVLHQDLNGKCYKCKVSNKGLPSSIEKTIISKAKGQFREPQVYTLPL PSQEENTYKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEENESNGQPENNYKTTPVLVDSGDSFPFLYSRL TVDKSRWQEGNVPFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK
45	人 C κ 恒定区	人 C κ 轻链恒定区 (IGKC*01) 核苷酸序列	cgtacggtggccgcgtccctccgtgttcatcttcccaccttccagcagcagctgaagt ccggcacccgtcttctgtgtgcctgtgcacaaactcttacccccggagggccaaggt gcagtggaaggtggacaacccctcagctccggcgaactcccaggaatccgtgacccag caggactccagggacacacactctccctgtctctccacctgcacctgtccaaaggccg actacgagaagcaccaaggtgtacgcctgcgaagtgcaccaccagggcctgtctagccc cgtgcacaaagctcttccacccggggcgaagtgt
46		C κ 轻链恒定区 (IGKC*01) 氨基酸序列	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
47	人 C κ 恒定区	C κ 轻链恒定区 (IGKC*02) 核苷酸序列	cgaactgtggctgcacacatctgttctcatcttcccgccactctgatgacaggtgaaat ctggaaactgcctctgtgtgtgcctgtcgataaactcttctatcccagagagggccaagt acaagtgaaggtggataaacgccctccaatcggttaactcccagagagagtgtcacagag caggagagcaaggacagacacctacagctcagcagcacctcagcgtgagcaagcgag actacgagaacacaaaaagttacgcggcggaaggtcacccatcagggcctgaggtcggc cgtcacaaagagcttcaacaggggagagtgat

[0551]

48				Cκ 轻链恒定区 (IGKC*02) 氨基酸序列	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QESKDSITYSLSTLTLSKADYEKHKVYAGEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
49	人 Cκ 恒定区	IGKC*03		Cκ 轻链恒定区 (IGKC*03) 核苷酸序列	cgaactgtggctgcacatctgtcttccatctcccgccatctgatgagcagttgaaat ctggaactcctctgtgtgtcctcctgaataaactcttatccagagagggccaaagt acagcggaagtggtataacgcctccaatcggttaactccagagaggtgtcacagag caggagagcaagagacacacactacagcctcagcagcaccctgacgtgagcaaaagcag actacgagaaacacaaagtctacgctggaagtccaccatcagggcctgagctcgcc cgtcacaaagagcttcaacaggggagagtg
50				Cκ 轻链恒定区 (IGKC*03) 氨基酸序列	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QESKDSITYSLSTLTLSKADYEKHKVYAGEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
51	人 Cκ 恒定区	IGKC*04		Cκ 轻链恒定区 (IGKC*04) 核苷酸序列	cgaactgtggctgcacatctgtcttccatctcccgccatctgatgagcagttgaaat ctggaactcctctgtgtgtcctcctgaataaactcttatccagagagggccaaagt acagtgggaagtggtataacgcctccaatcggttaactccagagaggtgtcacagag caggacagcaagagacacacactacagcctcagcagcaccctgagcagcaaaagcag actacgagaaacacaaactctacgctgcgaagtccaccatcagggcctgagctcgcc cgtcacaaagagcttcaacaggggagagtg
52				Cκ 轻链恒定区 (IGKC*04) 氨基酸序列	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSITYSLSTLTLSKADYEKHKLYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
53	人 Cκ 恒定区	IGKC*05		Cκ 轻链恒定区 (IGKC*05) 核苷酸序列	cgaactgtggctgcacatctgtcttccatctcccgccatctgatgagcagttgaaat ctggaactcctctgtgtgtcctcctgaataaactcttatccagagagggccaaagt acagtgggaagtggtataacgcctccaatcggttaactccagagaggtgtcacagag caggacagcaagagacacacactacagcctcagcacaacccctgagcagcaaaagcag actacgagaaacacaaagtctacgctgcgaagtccaccatcagggcctgagctcgcc cgtcacaaagagcttcaacaggggagagtg
54				Cκ 轻链恒定区 (IGKC*05) 氨基酸序列	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTE QDSKDSITYSLSTLTLSKADYEKHKVYAGEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
55	人 Cλ 恒定区	IGLC1*01		Cλ 轻链恒定区 (IGLC1*01) 核苷酸序列 (ENST00000390321.2)	cccaaggccaaacccacgggtcactctgttcccgccctctctgagagagctccaaagcca acaaggccacactagtgtgtctgatcagtgacttctacccgggagctgtgacagtggc ttggagggcagatggcgagcccgctcaaggcggtggagagcaccacccctccaaa cagagcaacaaagtaacgcggccagcagctacgtgagcctgacgcccagcagtgga agtcaccagaaagctacagctgcgggttcacgcatgaaggaggaccacgctggagaagac agtggccctacacaaatgttca
56				Cλ 轻链恒定区 (IGLC1*01) 氨基酸序列 (A0A075B6K8)	PRANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPFKAGVETTRPSK QSNNKYAASSTLTTPQWKSHRSYSYCVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

[0552]

57	人 C λ 恒定区	IGLC1*02	C λ 轻链恒定区 (IGLC1*02) 核苷酸序列 A 版	ggtaagcccaagggcccaaccccaactgtcaactctgttcccgccctcctctgagagagctcc aagccacaagggcccaactagtgtgtctgtatcagtgaacttaccgggagctgtgac agtggctggaggagatggcagcccgctcaaggcgagtgaggagaccacaaaccc tccaaacagagcaacaacagtagcggcagcagctacctgacctgacgcccagc agtggaaagtcacacagaagtagcagtgccaggtcacgcatgaaggagacccgtgga gaagacagtgggccctacagaatttca
58			C λ 轻链恒定区 (IGLC1*02) 核苷酸序列 B 版	ggtaagcccaagggcccaaccccaactgtcaactctgttcccgccctcctctgagagagctcc aagccacaagggcccaactagtgtgtctgtatcagtgaacttaccgggagctgtgac agtggctggaggagatggcagcccgctcaaggcgagtgaggagaccacaaaccc tccaaacagagcaacaacagtagcggcagcagctacctgacctgacgcccagc agtggaaagtcacacagaagtagcagtgccaggtcacgcatgaaggagacccgtgga gaagacagtgggccctacagaatttca
59			C λ 轻链恒定区 (IGLC1*02) 氨基酸序列	GQPKANPTVTLFPFSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTKP SKQSNNKYAASLYSLTPEQWKSHRSYSQVTHEGSTVEKTVAPTECS
60	人 C λ 恒定区	IGLC2*01	C λ 轻链恒定区 (IGLC2*01) 核苷酸序列 A 版	ggcagcctaaggcgcctctctgtgacctgttcccccttccccctcctccaggaagtgc aggctaaacaggccacccctcggtgctgtatcagcagcttctacctggcgctgac cgtggcctggaggagtagctctctgtgaaggcggtggaaacccacccct tccaaagcagtcacaaacaaatacgcgcctcctctacctgtccctgacccctgagc agtggaaagtcacacagaagtagcagtgccaggtcacgcatgaaggagacccgtgga gaagacagtgggccctacagaatttca
61			C λ 轻链恒定区 (IGLC2*01) 核苷酸序列 B 版	ggcagcctaaggcgcctctctgtgacctgttcccccttccccctcctccaggaagtgc aggctaaacaggccacccctcggtgctgtatcagcagcttctacctggcgctgac cgtggctggaggagtagcctcagccctgtcaagcgcggtggagaccacaccc tccaaagcagtcacaaacaaagtagcgcgcctcagctatctcctgacccctgagc agtggaaagtcacacagaagtagcagtgccaggtcacgcatgaaggagacccgtgga aaagacagtgggccctacagaatttca
62			C λ 轻链恒定区 (IGLC1*02) 氨基酸序列	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTP SKQSNNKYAASLYSLTPEQWKSHRSYSQVTHEGSTVEKTVAPTECS
63	人 C λ 恒定区	IGLC2*02 或 IGLC2*03	C λ 轻链恒定区 (IGLC2*02 或 IGLC2*03) 核苷酸序列	ggtaagcccaagggcccaaccccaactgtcaactctgttcccgccctcctctgagagagcttc aagccacaagggcccaactagtgtgtctgtatcagtgaacttaccgggagctgtgac agtggcctggaggagatagcagcccgctcaaggcgagtgaggagaccacacaccc tccaaacaaagcaacaacagtagcggcagcagctatctgacctgacgcccagc agtggaaagtcacacagaagtagcagtgccaggtcacgcatgaaggagacccgtgga gaagacagtgggccctacagaatttca
64			C λ 轻链恒定区 (IGLC2*02) 氨基酸序列	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTP SKQSNNKYAASLYSLTPEQWKSHRSYSQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0553]

65	人 Cλ 恒定区	IGLC3*01	Cλ 轻链恒定区 (IGLC3*01) 核苷酸序列	cccaaggctgccccctcgggtcactcctgltccacacccctcctcctgaggagccllcaagcca acaaggccacactggtgtgtctctcaagtgactctacccgggagcggtgacagtggc ctggaaggcagatagcagccccgtcaaggcgggtggagaccacacccctccaaa caagcaacaacagtacgcgccagcagctacctgacctgagcctgagcagtgga agtcacacaaaagctacagctgccagtcacgcatgaaggagacacctggagaagac agtgccccctacggaatgttca PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPSK QSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
66			Cλ 轻链恒定区 (IGLC3*01) 氨基酸序列	ggteagcccaaggctgccccctcgggtcactcctggtccacacccctcctcctgaggagcttc aagccacaaggccacactggtgtgtctcctcaagtgaacttctacccgggagcggtgac agtgccctggaaggcagatagcagccccgtcaaggcgggtggagaccacacacccc tccaaaagaagcaacaagtagcgcgcagcagctacctgacctgacctgacctgagc agtggaagtcacacaaaagctacagctgccaggtcacgcatgaaggagacacccgtgga gaagacagtcggccccctacggaatgttca GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
67	人 Cλ 恒定区	IGLC3*02	Cλ 轻链恒定区 (IGLC3*02) 核苷酸序列	ggteagcccaaggctgccccctcgggtcactcctggtccacacccctcctcctgaggagcttc aagccacaaggccacactggtgtgtctcctcaagtgaacttctacccgggagcggtgac agtgccctggaaggcagatagcagccccgtcaaggcgggtggagaccacacacccc tccaaaagaagcaacaagtagcgcgcagcagctacctgacctgacctgacctgagc agtggaagtcacacaaaagctacagctgccaggtcacgcatgaaggagacacccgtgga gaagacagtcggccccctacggaatgttca GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
68			Cλ 轻链恒定区 (IGLC1*02) 氨基酸序列	ggteagcccaaggctgccccctcgggtcactcctggtccacacccctcctcctgaggagcttc aagccacaaggccacactggtgtgtctcctcaagtgaacttctacccgggagcggtgac agtgccctggaaggcagatagcagccccgtcaaggcgggtggagaccacacacccc tccaaaagaagcaacaagtagcgcgcagcagctacctgacctgacctgacctgagc agtggaagtcacacaaaagctacagctgccaggtcacgcatgaaggagacacccgtgga gaagacagtcggccccctacggaatgttca GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
69	人 Cλ 恒定区	IGLC3*03	Cλ 轻链恒定区 (IGLC3*03) 核苷酸序列	ggteagcccaaggctgccccctcgggtcactcctggtccacacccctcctcctgaggagcttc aagccacaaggccacactggtgtgtctcctcaagtgaacttctacccgggagcggtgac agtgccctggaaggcagatagcagccccgtcaaggcgggtggagaccacacacccc tccaaaagaagcaacaagtagcgcgcagcagctacctgacctgacctgacctgagc agtggaagtcacacaaaagctacagctgccaggtcacgcatgaaggagacacccgtgga gaagacagtcggccccctacggaatgttca GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
70			Cλ 轻链恒定区 (IGLC3*03) 氨基酸序列	ggteagcccaaggctgccccctcgggtcactcctggtccacacccctcctcctgaggagcttc aagccacaaggccacactggtgtgtctcctcaagtgaacttctacccgggagcggtgac agtgccctggaaggcagatagcagccccgtcaaggcgggtggagaccacacacccc tccaaaagaagcaacaagtagcgcgcagcagctacctgacctgacctgacctgagc agtggaagtcacacaaaagctacagctgccaggtcacgcatgaaggagacacccgtgga gaagacagtcggccccctacggaatgttca GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
71	人 Cλ 恒定区	IGLC3*04	Cλ 轻链恒定区 (IGLC3*04) 核苷酸序列	ggteagcccaaggctgccccctcgggtcactcctggtccacacccctcctcctgaggagcttc aagccacaaggccacactggtgtgtctcctcaagtgaacttctacccgggagcggtgac agtgccctggaaggcagatagcagccccgtcaaggcgggtggagaccacacacccc tccaaaagaagcaacaagtagcgcgcagcagctacctgacctgacctgacctgagc agtggaagtcacacaaaagctacagctgccaggtcacgcatgaaggagacacccgtgga gaagacagtcggccccctacggaatgttca GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS
72			Cλ 轻链恒定区 (IGLC3*04) 氨基酸序列	ggteagcccaaggctgccccctcgggtcactcctggtccacacccctcctcctgaggagcttc aagccacaaggccacactggtgtgtctcctcaagtgaacttctacccgggagcggtgac agtgccctggaaggcagatagcagccccgtcaaggcgggtggagaccacacacccc tccaaaagaagcaacaagtagcgcgcagcagctacctgacctgacctgacctgagc agtggaagtcacacaaaagctacagctgccaggtcacgcatgaaggagacacccgtgga gaagacagtcggccccctacggaatgttca GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHKSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS

[0554]

73	人 C λ 恒定区	IGLC6*01	C λ 轻链恒定区 (IGLC6*01) 核苷酸序列	ggtcagcccaaggctgccccctcgggtcactctgttcccgccctcctctgagagcttc aagccacaaggccacctggtgtgctgctgacgtgacttaccgggagctgtgaa agtggctggaaaggcagatggcagccccgtcaacaggagtgagaccacacccc tccaaacagagcaaacagatcgcggccagctacctgagctgacgctgagc agtggaaagtcacacagaagctacagctgccaggtcacgcatgaaggagacccgtgga gaagacagtgggccctgcagaatgttca
74			C λ 轻链恒定区 (IGLC6*01) 氨基酸序列	GQPKAAPSVTLFPPSSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVKAWKADGSPVNTGVETTP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSQVTHEGSTVEKTVAPAECS
75	人 C λ 恒定区	IGLC7*01 或 IGLC7*02	C λ 轻链恒定区 (IGLC7*01 或 IGLC7*02) 核苷酸序列	ggtcagcccaaggctgccccctcgggtcactctgttcccaacctcctctgagagcttc aagccacaaggccacctggtgtgctgtaagtgaacttaccgggagccgtgac agtggcctggaaaggcagatggcagccccgtcaagtgaggagtgagaccacacccc tccaaacaaagcaacaagatgaggccagcgctacctgagctgacgccccgagc agtggaaagtcacacagaagctacagctgccgggtcacgcatgaaggagacccgtgga gaagacagtgggccctgcagaatgctct
76			C λ 轻链恒定区 (IGLC7*01) 氨基酸序列	GQPKAAPSVTLFPPSSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAMKADGSPVKGVETTKP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSQVTHEGSTVEKTVAPAECS
77	人 C λ 恒定区	IGLC7*03	C λ 轻链恒定区 (IGLC7*03) 核苷酸序列	GGTCAGCCCAAGGCTGCCCTCGGTCACTCTGTTCCACCCCTCCTCTGAGGAGCTTC AAGCCACAAGAGCCACACTGGTGTGTCTCTGTAAGTGACTTCAACCCGGGAGCCGTGAC AGTGGCCTGGAAGGCAGATGCCGCCCGCTCAGGTGGAGTGAGACCAACAAACCC TCCAAACAAAGCAACAAGTATGGGGCCAGCAGCTACCTGAGCCTGACGCCCGAGC AGTGGAGTCCACAGAAGTACAGCTGCCGGGTACCGCATGAAGGGAGCACCCGTGGA GAACACAGTGGCCCTGCAGAAATGCTCT
78			C λ 轻链恒定区 (IGLC7*03) 氨基酸序列	GQPKAAPSVTLFPPSSSEELQANKATLVCLISDFNPGAVTVAMKADGSPVKGVETTKP SKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSQVTHEGSTVEKTVAPAECS

[0555]

表 K. KY1044 抗体序列

SEQ ID	序列
1	KY1044 的 HCDR1 的氨基酸序列 GVTFDDYG
2	KY1044 的 HCDR2 的氨基酸序列 INWNGGDT
3	KY1044 的 HCDR3 的氨基酸序列 ARDFYGSYHYHVFEDY
4	KY1044 的 VH 的核酸序列 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTGTGGTACGGCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCCTCTGGAGTCA CCTTTGATGATTATGGCATGAGCTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGCTGGARTGGGTCTCTGGTATTATTTGAATGG TGGCGACACAGATTATTCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTACAA ATGAATAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCCTTGATTACTGTGCGAGGGATTCTATGGTTCGGGGAGTTATATCACGTTC CTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAATCCTGGTCACCGCTCTCTCA EVQLVESGGGVRFPGGSLRLSCVAGSYTFDDYGMVWRQAPFGKLEWVSGINMNGDITDYSVKGRTTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDPALYYCARDPYGSGSYHYHVPFDYWGQGLIVTVSS
5	KY1044 的 VH 的氨基酸序列 MNSLRAEDPALYYCARDPYGSGSYHYHVPFDYWGQGLIVTVSS
6	KY1044 重链的 核酸序列 GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGTGTGGTACGGCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGTAGCCCTCTGGAGTCA CCTTTGATGATTATGGCATGAGCTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGCTGGARTGGGTCTCTGGTATTATTTGAATGG TGGCGACACAGATTATTCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAACGCCAAGAACTCCCTGTATCTACAA ATGAATAGTCTGAGAGCCGAGGACACGGCCTTGATTACTGTGCGAGGGATTCTATGGTTCGGGGAGTTATATCACGTTC CTTTTGACTACTGGGGCCAGGGAATCCTGGTCACCGCTCTCTCA EVQLVESGGGVRFPGGSLRLSCVAGSYTFDDYGMVWRQAPFGKLEWVSGINMNGDITDYSVKGRTTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDPALYYCARDPYGSGSYHYHVPFDYWGQGLIVTVSS
7	KY1044 重链的 氨基酸序列 EVQLVESGGGVRFPGGSLRLSCVAGSYTFDDYGMVWRQAPFGKLEWVSGINMNGDITDYSVKGRTTISRDNKNSLYLQ MNSLRAEDPALYYCARDPYGSGSYHYHVPFDYWGQGLIVTVSSASTKSPVFP LAPSSKSTSGGTAALCLVDYFPEFVTVS WNSGALTSGVHTPEAVLQSSGLYSLVATVPSSSLGTQYICNVNHPKSDTKHTCPCPAPELILGGPS VFLFPPKPKDITLMSRTPEVTGVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVFNHNAKTQPREQYNSTYRVSVLTVLHQIWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPPVLDSDGS FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0556]

8	KY1044 的 LCDR1 的氨基酸序列	QSVRSY	
9	KY1044 的 LCDR2 的氨基酸序列	GAS	
10	KY1044 的 LCDR3 的氨基酸序列	HQYDMSFFT	
11	KY1044 的 VL 的核酸序列	GAATTGTGTTGACGAGTCTCAGGGACCCCTGTTTGTCTCAGGGGAAAGAGCCACCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGA GTGTTAGCAGAAGCTACTTAGCTGGTACCCAGCAGAAACGTGGCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGTTGCATCCAGCAG GCCACTGGCATCCAGACAGGTTCACTGGCGATGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCTCCATCAGCAGACTGGAGCCTGAA GATTTGCAGTGTTACTGTCAACAGTATGATATGTCACTTCCGCTGGGACCAAAAGTGGATATCAAA	
12	KY1044 的 VL 的氨基酸序列	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQRGQAPRLIYGASSRATGI PDRFSGDGSCTDFTLSISRLEPE DEAVYYCHQYDMSFFT FGPETKVDIK	
13	KY1044 轻链的 核酸序列	GAATTGTGTTGACGAGTCTCAGGGACCCCTGTTTGTCTCAGGGGAAAGAGCCACCTCTCCTGCAGGGCCAGTCAGA GTGTTAGCAGAAGCTACTTAGCTGGTACCCAGCAGAAACGTGGCAGGCTCCAGGCTCCTCATCTATGTTGCATCCAGCAG GCCACTGGCATCCAGACAGGTTCACTGGCGATGGGTCTGGGACAGACTTCACTCTCTCCATCAGCAGACTGGAGCCTGAA GATTTGCAGTGTTACTGTCAACAGTATGATATGTCACTTCCGCTGGGACCAAAAGTGGATATCAAAcgt cggtggcgtcccccccgagggccaaaggtgcagtggaagtggaacacgcctgcagtcoggaactccaggaaatccgtg gaacaaacttaccaccccgagggccaaaggtgcagtggaagtggaacacgcctgcagtcoggaactccaggaaatccgtg accgagcaggactccaaggacagcacactactccctgtccacccctgacccctgccaagccgactacgagaagcaacaagg tgtacgcctgcgaagtgaaccacacagggcctgtctagcccgtagcccaagtttcaacccggggcgagtggt	
14	KY1044 轻链的 氨基酸序列	EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRASQSVRSYLAWYQQRGQAPRLIYGASSRATGI PDRFSGDGSCTDFTLSISRLEPE DEAVYYCHQYDMSFFT FGPETKVDIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCVLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSSTYSLSSTLTLSKADYEKKHKVYACEVTHQCLSSPFVKSFNRGEC	

序列表

<110> 凯玛布有限公司
 <120> 用于免疫疗法的肿瘤生物标志
 <130> K00061-1 W0
 <150> GB2007099.1
 <151> 2020-05-14
 <160> 78
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 1

Gly Val Thr Phe Asp Asp Tyr Gly

1 5

<210> 2

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 2

Ile Asn Trp Asn Gly Gly Asp Thr

1 5

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 3

Ala Arg Asp Phe Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr His Val Pro Phe Asp

1 5 10 15

Tyr

<210> 4

<211> 372

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 4

gaggtgcagc tggtggagtc tgggggaggt gtggtacggc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgtag cctctggagt cacctttgat gattatggca tgagctgggt ccgccaagct 120

ccagggaagg ggctggartg ggtctctggt attaattgga atggtggcga cacagattat 180

tcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240
 ctacaaatga atagtctgag agccgaggac acggccttgt attactgtgc gagggatttc 300
 tatggttcgg ggagttatta tcacgttcct tttgactact ggggccaggg aatcctggtc 360
 accgtctcct ca 372

<210> 5

<211> 124

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 5

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

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

35 40 45

Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Asp Thr Asp Tyr Ser Asp Ser Val

50 55 60

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

65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Asp Phe Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr His Val Pro Phe Asp

100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 6

<211> 1368

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 6

gaggtgcagc tgggtggagtc tggggggaggt gtggtacggc ctgggggggtc cctgagactc 60

tcctgtgtag cctctggagt cacctttgat gattatggca tgagctgggt ccgccaagct 120

ccagggaagg ggctggartg ggtctctggt attaattgga atggtggcga cacagattat 180

tcagactctg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa ctccctgtat 240

ctacaaatga atagtctgag agccgaggac acggccttgt attactgtgc gagggatttc 300

tatggttcgg ggagttatta tcacgttcct tttgactact ggggccaggg aatcctggtc 360

accgtctcct cagccagcac caagggtccc tctgtgttcc ctctggcccc ttccagcaag 420

tccacctctg gcggaacagc cgctctgggc tgacctctga aggactactt ccccgagcct 480

gtgaccgtgt cctggaactc tggcgctctg accagcggag tgcacacctt ccctgctgtg 540

```

ctgcagtcct ccggcctgta ctccctgtcc tccgtcgtga ccgtgccttc cagctctctg      600
ggcaccacaga cctacatctg caacgtgaac cacaagccct ccaacaccaa ggtggacaag      660
aaggtggaac ccaagtcctg cgacaagacc cacacctgtc ccccttgtcc tgcccctgaa      720
ctgctgggcg gaccttccgt gttcctgttc cccccaaagc ccaaggacac cctgatgac      780
tcccggaccc ccgaagtgac ctgcgtgggtg gtggatgtgt cccacgagga ccctgaagtg      840
aagttcaatt ggtacgtgga cggcgtggaa gtgcacaacg ccaagaccaa gcctagagag      900
gaacagtaca actccaccta ccgggtgggtg tccgtgctga ccgtgctgca ccaggattgg      960
ctgaacggca aagagtacaa gtgcaagggtg tccaacaagg ccctgcctgc ccccatcgaa     1020
aagaccatct ccaaggccaa gggccagccc cgggaacccc aggtgtacac actgccccct     1080
agcagggacg agctgaccaa gaaccagggtg tcctgacct gtctcgtgaa aggttcttac     1140
ccctccgata tcgccgtgga atgggagtc aacggccagc ctgagaacaa ctacaagacc     1200
acccccctg tgctggactc cgacggetca ttcttctgt acagcaagct gacagtggac     1260
aagtcccggt ggcagcaggg caacgtgttc tctgtctcg tgatgcacga ggccctgcac     1320
aaccactaca cccagaagtc cctgtccctg agccccggca agtgatga                     1368

```

<210> 7

<211> 454

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 7

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Arg Pro Gly Gly
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Val Thr Phe Asp Asp Tyr
          20           25           30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35           40           45
Ser Gly Ile Asn Trp Asn Gly Gly Asp Thr Asp Tyr Ser Asp Ser Val
          50           55           60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65           70           75           80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
          85           90           95
Ala Arg Asp Phe Tyr Gly Ser Gly Ser Tyr Tyr His Val Pro Phe Asp
          100          105          110
Tyr Trp Gly Gln Gly Ile Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
          115          120          125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
          130          135          140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145          150          155          160

```

Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr		
	165	170 175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val		
	180	185 190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn		
	195	200 205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro		
	210	215 220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu		
225	230	235 240
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp		
	245	250 255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp		
	260	265 270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly		
	275	280 285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn		
	290	295 300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp		
305	310	315 320
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro		
	325	330 335
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
	340	345 350
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn		
	355	360 365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile		
	370	375 380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr		
385	390	395 400
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys		
	405	410 415
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
	420	425 430
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
	435	440 445
Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	450	

<210> 8

<211> 7
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 8
 Gln Ser Val Ser Arg Ser Tyr
 1 5
 <210> 9
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 9
 Gly Ala Ser
 1
 <210> 10
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 10
 His Gln Tyr Asp Met Ser Pro Phe Thr
 1 5
 <210> 11
 <211> 324
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens
 <400> 11
 gaaattgtgt tgacgcagtc tccagggacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60
 ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agaagctact tagcctggta ccagcagaaa 120
 cgtggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180
 gacaggttca gtggcgatgg gtctgggaca gacttcactc tctccatcag cagactggag 240
 cctgaagatt ttgcagtgtg ttactgtcac cagtatgata tgtcaccatt cactttcggc 300
 cctgggacca aagtggatat caaa 324
 <210> 12
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 12
 Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser

	20				25				30							
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Arg	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	
	35				40				45							
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	
	50				55				60							
Gly	Asp	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	Ile	Ser	Arg	Leu	Glu	
65					70				75						80	
Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	His	Gln	Tyr	Asp	Met	Ser	Pro	
			85				90				95					
Phe	Thr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Lys	Val	Asp	Ile	Lys					
	100				105											
<210>	13															
<211>	645															
<212>	DNA															
<213>	Homo Sapiens															
<400>	13															
gaaattgtgt tgacgcagtc tccagggacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60																
ctctcctgca gggccagtca gagtgttagc agaagctact tagcctggta ccagcagaaa 120																
cgtggccagg ctcccaggct cctcatctat ggtgcatcca gcagggccac tggcatccca 180																
gacaggttca gtggcgatgg gtctgggaca gacttcactc tctccatcag cagactggag 240																
cctgaagatt ttgcagtgtta ttactgtcac cagtatgata tgtcaccatt cactttcggc 300																
cctgggacca aagtggatat caaacgtacg gtggccgctc cctccgtgtt catcttccca 360																
ccttccgacg agcagctgaa gtccggcacc gcttctgtcg tgtgcctgct gaacaacttc 420																
tacccccgcg aggccaaggt gcagtggaag gtggacaacg ccctgcagtc cggcaactcc 480																
caggaatccg tgaccgagca ggactccaag gacagcacct actccctgtc ctccaccctg 540																
accctgtcca aggccgacta cgagaagcac aaggtgtacg cctgcgaagt gaccaccag 600																
ggcctgtcta gccccgtgac caagtctttc aaccggggcg agtgt 645																
<210>	14															
<211>	215															
<212>	PRT															
<213>	Homo Sapiens															
<400>	14															
Glu	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Gly	Thr	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	
1				5					10					15		
Glu	Arg	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Ser	Arg	Ser	
			20				25				30					
Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Arg	Gly	Gln	Ala	Pro	Arg	Leu	Leu	
	35				40				45							
Ile	Tyr	Gly	Ala	Ser	Ser	Arg	Ala	Thr	Gly	Ile	Pro	Asp	Arg	Phe	Ser	

50	55	60	
Gly Asp Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Ser Arg Leu Glu			
65	70	75	80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Asp Met Ser Pro			
85	90	95	
Phe Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Val Asp Ile Lys Arg Thr Val Ala			
100	105	110	
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser			
115	120	125	
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu			
130	135	140	
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser			
145	150	155	160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu			
165	170	175	
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val			
180	185	190	
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys			
195	200	205	
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
210	215		
<210> 15			
<211> 990			
<212> DNA			
<213> Homo Sapiens			
<400> 15			
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg			60
ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg			120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcggtg cacacettcc cggtgttcct acagtctctca			180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc			240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc			300
aaatcttgtg acaaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga			360
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct			420
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg			480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac			540
agcacgtacc gggtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag			600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc			660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag			720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc			780

```

gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg      840
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtaggacaa gagcaggtgg      900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg      960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa      990
<210> 16
<211> 330
<212> PRT
<213> Homo Sapiens
<400> 16
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1          5          10          15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
          20          25          30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
          35          40          45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
          50          55          60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65          70          75          80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
          85          90          95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
          100          105          110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
          115          120          125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
          130          135          140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145          150          155          160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
          165          170          175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
          180          185          190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
          195          200          205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
          210          215          220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225          230          235          240

```

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr	
245	250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn	
260	265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe	
275	280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn	
290	295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr	
305	310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
325	330

<210> 17

<211> 990

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 17

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg	60
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg	120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgctg cacacettcc cggtgttcct acagtctctca	180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc	300
aaatcttgtg acaaaactca cacatgcca ccgtgccag cacctgaact cctgggggga	360
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacacce tcatgatctc ccggaacct	420
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgaggagga gcagtacaac	540
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag	600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc	660
aaagccaaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacce tgcccccatc ccgggatgag	720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaag gcttctatcc cagcgacatc	780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg	840
ctggactccg acggctcett ctctctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg	900
cagcagggga acgtcttctc atgtccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg	960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa	990

<210> 18

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 18

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70				75					80	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85					90					95		
Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
		100						105				110			
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
	115						120				125				
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
	130					135				140					
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150				155					160	
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
			165					170				175			
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
		180						185				190			
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
	195					200					205				
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
	210					215				220					
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
225					230				235					240	
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
			245					250				255			
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
		260						265				270			
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
	275						280					285			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
	290					295					300				
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr

305	310	315	320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys			
	325	330	
<210> 19			
<211> 990			
<212> DNA			
<213> Homo Sapiens			
<400> 19			
gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg			60
ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg			120
tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgctg cacaccttcc cggtctgtcct acagtctctca			180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc			240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc			300
aaatcttgtg acaaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga			360
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt			420
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg			480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac			540
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag			600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc			660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgccccatc ccgggaggag			720
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc			780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg			840
ctggactccg acggctcctt cttcctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg			900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg			960
cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa			990
<210> 20			
<211> 330			
<212> PRT			
<213> Homo Sapiens			
<400> 20			
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys			
1 5 10 15			
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr			
20 25 30			
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser			
35 40 45			
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser			
50 55 60			
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr			

65	70	75	80
Tyr Ile Cys Asn Val	Asn His Lys Pro Ser	Asn Thr Lys Val	Asp Lys
85	90	95	
Arg Val Glu Pro Lys	Ser Cys Asp Lys Thr	His Thr Cys Pro	Pro Cys
100	105	110	
Pro Ala Pro Glu Leu	Leu Gly Gly Pro Ser	Val Phe Leu Phe	Pro Pro
115	120	125	
Lys Pro Lys Asp Thr	Leu Met Ile Ser Arg	Thr Pro Glu Val	Thr Cys
130	135	140	
Val Val Val Asp Val	Ser His Glu Asp Pro	Glu Val Lys Phe	Asn Trp
145	150	155	160
Tyr Val Asp Gly Val	Glu Val His Asn Ala	Lys Thr Lys Pro	Arg Glu
165	170	175	
Glu Gln Tyr Asn Ser	Thr Tyr Arg Val Val	Ser Val Leu Thr	Val Leu
180	185	190	
His Gln Asp Trp Leu	Asn Gly Lys Glu Tyr	Lys Cys Lys Val	Ser Asn
195	200	205	
Lys Ala Leu Pro Ala	Pro Ile Glu Lys Thr	Ile Ser Lys Ala	Lys Gly
210	215	220	
Gln Pro Arg Glu Pro	Gln Val Tyr Thr Leu	Pro Pro Ser Arg	Glu Glu
225	230	235	240
Met Thr Lys Asn Gln	Val Ser Leu Thr Cys	Leu Val Lys Gly	Phe Tyr
245	250	255	
Pro Ser Asp Ile Ala	Val Glu Trp Glu Ser	Asn Gly Gln Pro	Glu Asn
260	265	270	
Asn Tyr Lys Thr Thr	Pro Pro Val Leu Asp	Ser Asp Gly Ser	Phe Phe
275	280	285	
Leu Tyr Ser Lys Leu	Thr Val Asp Lys Ser	Arg Trp Gln Gln	Gly Asn
290	295	300	
Val Phe Ser Cys Ser	Val Met His Glu Ala	Leu His Asn His	Tyr Thr
305	310	315	320
Gln Lys Ser Leu Ser	Leu Ser Pro Gly Lys		
325	330		

<210> 21

<211> 990

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 21

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg

60

```

ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg      120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca      180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc      240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agttgagccc      300
aaatcttgtg acaaaaactca cacatgccc cctgcccag cacctgaact cctgggggga      360
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt      420
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg      480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgaggagga gcagtacaac      540
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag      600
gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc      660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag      720
ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc      780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg      840
ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gacaggtgg      900
cagcagggga acatcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacag      960
cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa      990

```

<210> 22

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 22

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1           5           10           15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
          20           25           30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
          35           40           45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
          50           55           60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65           70           75           80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
          85           90           95
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
          100          105          110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
          115          120          125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
          130          135          140

```

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp	
145	150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu	
	165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu	
	180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn	
	195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly	
	210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu	
225	230 235 240
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr	
	245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn	
	260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe	
	275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn	
	290 295 300
Ile Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr	
305	310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys	
	325 330

<210> 23

<211> 990

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 23

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg	60
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg	120
tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtgtcct acagtctctca	180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc	240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagaa agtggagccc	300
aaatcttgtg acaaaaactca cacatgcccc ccgtgcccag cacctgaact cgcgggggca	360
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcattgatctc ccggaacctt	420
gaggtcacat gcgtgggtgt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg	480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac	540
agcacgtacc gtgtgggtcag gtcctcacc gtctgcacc aggactggct gaatggcaag	600

gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggatgag 720
 ctgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctgggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
 ctggactccg acggctcctt cttcctctac agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
 cagaagagcc tctccctgtc tccgggtaaa 990

<210> 24

<211> 330

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 24

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Leu Ala Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210	215	220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu		
225	230	235
Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr		240
	245	250
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn		255
	260	265
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe		270
	275	280
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn		285
	290	295
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr		300
305	310	315
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		320
	325	330

<210> 25

<211> 978

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 25

```

gcttccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag      60
agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacggtgtcg      120
tggaactcag gcgctctgac cagcggcgtg cacacattcc cagctgtcct acagtctctca      180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg caccagacc      240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc      300
aaatgttgtg tcgagtgtcc accgtgtcca gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc      360
ctcttcccc caaaaccaa ggacacctc atgatctccc ggacctctga ggtcacgtgc      420
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc      480
gtggagggtgc ataattgcaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt      540
gtggtcagcg tcctcaccgt tgtgcaccag gactgggtga acggcaagga gtacaagtgc      600
aaggtctcca acaaaggcct cccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaaggg      660
cagccccgag aaccacaggt gtacacctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac      720
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg      780
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac      840
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcagggaac      900
gtcttctcat gctccgtgat gcatgagget ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc      960
tccctgtctc cgggtaaa

```

<210> 26

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 26

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Asn	Phe	Gly	Thr	Gln	Thr
65				70					75					80	
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85					90					95		
Thr	Val	Glu	Arg	Lys	Cys	Cys	Val	Glu	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro
			100					105					110		
Pro	Val	Ala	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp
		115					120					125			
Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp
	130					135					140				
Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly
145				150					155					160	
Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn
			165					170					175		
Ser	Thr	Phe	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	Trp
		180						185					190		
Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro
	195						200					205			
Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu
	210					215					220				
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn
225				230					235					240	
Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile
			245					250					255		
Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr
		260					265						270		
Thr	Pro	Pro	Met	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys
		275					280					285			

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 27

<211> 978

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 27

```
gcctccacca agggcccatc ggttcttccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag      60
agcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg    120
tggaactcag gcgctctgac cagcggcggtg cacaccttcc cggtctgtcct acagtctctca    180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgacctcca gcaacttcgg caccagacc      240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc      300
aaatgttggtg tcgagtgcgc accgtgcccga gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc    360
ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc      420
gtgggtgggtg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc      480
atggagggtgc ataatgccaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt    540
gtgggtcagcg tcctcaccgt cgtgcaccag gactgggtga acggcaagga gtacaagtgc      600
aaggtctcca acaaaggcct cccagccccc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaggg      660
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac      720
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctaccca gcgacatcgc cgtggagtgg      780
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac      840
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcagggaac      900
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc     960
tcctgtctc cggtataa      978
```

<210> 28

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 28

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser		
50	55	60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Thr Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr		
65	70	75 80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys		
	85	90 95
Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro		
	100	105 110
Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp		
	115	120 125
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp		
	130	135 140
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly		
145	150	155 160
Met Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn		
	165	170 175
Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp		
	180	185 190
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro		
	195	200 205
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu		
	210	215 220
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn		
225	230	235 240
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile		
	245	250 255
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr		
	260	265 270
Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys		
	275	280 285
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys		
	290	295 300
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu		
305	310	315 320
Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
	325	

<210> 29

<211> 978

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 29

```

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag      60
agcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg      120
tggaactcag gcgctctgac cagcggcgctg cacaccttcc cagctgtcct acagtcctca      180
ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc      240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc      300
aaatgttgtg tcgagtgtcc accgtgtcca gcaccactg tggcaggacc gtcagtcttc      360
ctcttccccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc      420
gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc      480
gtggagggtgc ataatgccaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttcctg      540
gtggtcagcg tcctcaccgt tgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc      600
aaggtctcca acaaaggcct ccagccccc atcgagaaaa ccctctcca aaccaaaggg      660
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac      720
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatcgc cgtggagtgg      780
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac      840
ggctccttct tcctctacag caagtcacc gtggacaaga gcaggtggca gcagggaac      900
gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca gaagagcctc      960
tcctgtctc cgggtaaa

```

<210> 30

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 30

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1           5           10          15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
          20          25          30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
          35          40          45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
          50          55          60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65          70          75          80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
          85          90          95
Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
          100         105         110
Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp

```

115	120	125
Thr Leu Met Ile Ser Arg	Thr Pro Glu Val Thr	Cys Val Val Val Asp
130	135	140
Val Ser His Glu Asp Pro	Glu Val Gln Phe Asn	Trp Tyr Val Asp Gly
145	150	155
Val Glu Val His Asn Ala	Lys Thr Lys Pro Arg	Glu Glu Gln Phe Asn
165	170	175
Ser Thr Phe Arg Val Val	Ser Val Leu Thr Val	Val His Gln Asp Trp
180	185	190
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr	Lys Cys Lys Val Ser	Asn Lys Gly Leu Pro
195	200	205
Ala Pro Ile Glu Lys Thr	Ile Ser Lys Thr Lys	Gly Gln Pro Arg Glu
210	215	220
Pro Gln Val Tyr Thr Leu	Pro Pro Ser Arg Glu	Glu Met Thr Lys Asn
225	230	235
Gln Val Ser Leu Thr Cys	Leu Val Lys Gly Phe	Tyr Pro Ser Asp Ile
245	250	255
Ala Val Glu Trp Glu Ser	Asn Gly Gln Pro Glu	Asn Asn Tyr Lys Thr
260	265	270
Thr Pro Pro Met Leu Asp	Ser Asp Gly Ser Phe	Phe Leu Tyr Ser Lys
275	280	285
Leu Thr Val Asp Lys Ser	Arg Trp Gln Gln Gly	Asn Val Phe Ser Cys
290	295	300
Ser Val Met His Glu Ala	Leu His Asn His Tyr	Thr Gln Lys Ser Leu
305	310	315
Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
325		

<210> 31

<211> 978

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 31

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag	60
agcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg	120
tggaactcag gcgctctgac cagcggcgctg cacaccttcc cggctgtcct acagtctctca	180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcaacttcgg caccagacc	240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagac agttgagcgc	300
aaatgttggtg tcgagtcccc accgtgcccc gcaccacctg tggcaggacc gtcagtcttc	360
ctcttcccc caaaacccaa ggacaccctc atgatctccc ggaccctga ggtcacgtgc	420

```

gtggtggtgg acgtgagcca cgaagacccc gaggtccagt tcaactggta cgtggacggc      480
gtggaggtgc ataatgccaa gacaaagcca cgggaggagc agttcaacag cacgttccgt      540
gtggtcagcg tcctcaccgt cgtgcaccag gactggctga acggcaagga gtacaagtgc      600
aaggtctcca acaaaggcct cccagcccc atcgagaaaa ccatctccaa aaccaaagg      660
cagccccgag aaccacaggt gtacaccctg ccccatccc gggaggagat gaccaagaac      720
caggtcagcc tgacctgcct ggtcaaaggc ttctacccca gcgacatctc cgtggagtgg      780
gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacac ctcccatgct ggactccgac      840
ggctccttct tcctctacag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca gcaggggaac      900
gtctttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacaca gaagagcctc      960
tccctgtctc cgggtaaa

```

<210> 32

<211> 326

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 32

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1          5          10          15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
          20          25          30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
          35          40          45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
          50          55          60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr
65          70          75          80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
          85          90          95
Thr Val Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
          100          105          110
Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
          115          120          125
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
          130          135          140
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
145          150          155          160
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn
          165          170          175
Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp
          180          185          190

```

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro
 195 200 205
 Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu
 210 215 220
 Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
 225 230 235 240
 Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
 245 250 255
 Ser Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
 260 265 270
 Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
 275 280 285
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
 290 295 300
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
 305 310 315 320
 Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325

<210> 33

<211> 981

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 33

gcttccacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60
 agcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
 tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 240
 tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 300
 aaatatggtc ccccatgccc atcatgccc gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 360
 ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 420
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 480
 ggctggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 540
 cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 600
 tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 660
 gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgccccat cccaggagga gatgaccaag 720
 aaccaggtea gcctgacctg cctggtcaaa ggtttctacc ccagcgacat cgccgtggag 780
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 840
 gacggctcct tcttctctca cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 900
 aatgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 960

ctctccctgt ctctgggtaa a

981

<210> 34

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 34

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu
 195 200 205
 Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg
 210 215 220
 Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
 225 230 235 240
 Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
 245 250 255
 Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

	260	265	270	
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser				
275	280	285		
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser				
290	295	300		
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser				
305	310	315	320	
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys				
325				
<210>	35			
<211>	981			
<212>	DNA			
<213>	Homo Sapiens			
<400>	35			
gcttccacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag				60
agcacagccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg				120
tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggtctgtcct acagtctctca				180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc				240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc				300
aaatatggtc ccccggtgcc atcatgccc gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc				360
ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg				420
tgcgtgggtg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat				480
ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac				540
cgtgtgggtca gcgtcctcac cgtcgtgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag				600
tgcaaggctc ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa				660
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag				720
aaccagggtca gcctgacctg cctggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag				780
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgctcccgt gctggactcc				840
gacggctcct tcttcctcta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg				900
aatgtcttct catgtccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc				960
ctctccctgt ctctgggtaa a				981
<210>	36			
<211>	327			
<212>	PRT			
<213>	Homo Sapiens			
<400>	36			
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg				
1	5	10	15	
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr				

			20					25					30			
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	
			35					40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	
			50					55					60			
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	
65						70				75					80	
Tyr	Thr	Cys	Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
				85						90				95		
Arg	Val	Glu	Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Ser	Cys	Pro	Ala	Pro	
				100						105				110		
Glu	Phe	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	
			115					120					125			
Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	
			130					135				140				
Asp	Val	Ser	Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	
145						150				155					160	
Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	
				165						170				175		
Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Val	His	Gln	Asp	
			180							185				190		
Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	
			195					200						205		
Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	
			210					215					220			
Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	
225						230				235					240	
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	
				245						250				255		
Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	
			260					265						270		
Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	
			275					280					285			
Arg	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	
			290					295				300				
Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	
305						310				315					320	
Leu	Ser	Leu	Ser	Leu	Gly	Lys										
				325												

<210> 37
 <211> 981
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens
 <400> 37
 gcttccacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag 60
 agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
 tggaactcag gcgccctgac cagcggcgctg cacacettcc cggctgtcct acagtcctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 240
 tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 300
 aaatatggtc ccccatgccc atcatgccc gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 360
 ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgaggtcacg 420
 tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac ccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 480
 ggctgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 540
 cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 600
 tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 660
 gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgccccat cccaggagga gatgaccaag 720
 aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 780
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc 840
 gacggctcct tcttctctta cagcaagctc accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg 900
 aacgtcttct catgctccgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac gcagaagagc 960
 ctctccctgt ctctgggtaa a 981

<210> 38
 <211> 327
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 38
 Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro	
100	105 110
Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys	
115	120 125
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val	
130	135 140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp	
145	150 155 160
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe	
165	170 175
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp	
180	185 190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu	
195	200 205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg	
210	215 220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys	
225	230 235 240
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp	
245	250 255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys	
260	265 270
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser	
275	280 285
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser	
290	295 300
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser	
305	310 315 320
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys	
325	

<210> 39

<211> 981

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 39

gcctccacca agggcccatc cgttttcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag	60
agcacggccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccagt gacggtgtcg	120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca	180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc	240

tacacctgca	acgtagatca	caagcccagc	aacaccaagg	tggaacaagag	agttgagtcc	300
aaatatggtc	ccccatgccc	accatgccc	gcgcctgaat	ttgagggggg	accatcagtc	360
ttcctgttcc	ccccaaaacc	caaggacact	ctcatgatct	cccggacccc	tgaggtcacg	420
tgcgtggtgg	tggaactgag	ccaggaagac	cccaggttcc	agttcaactg	gtacgtggat	480
ggcgtggagg	tgcataatgc	caagacaaag	ccgcgggagg	agcagttcaa	cagcacgtac	540
cgtgtggtca	gcgtcctcac	cgtcctgcac	caggactggc	tgaacggcaa	ggagtacaag	600
tgcaaggtct	ccaacaaagg	cctcccgtca	tcgatcgaga	aaaccatctc	caaagccaaa	660
gggcagcccc	gagagccaca	ggtgtacacc	ctgcccccat	cccaggagga	gatgaccaag	720
aaccaggtca	gcctgacctg	cctggtcaaa	ggcttctacc	ccagcgacat	cgccgtggag	780
tgggagagca	atgggcagcc	ggagaacaac	tacaagacca	cgcctcccgt	gctggactcc	840
gacggatcct	tcttctctta	cagcaggeta	accgtggaca	agagcaggtg	gcaggagggg	900
aatgtcttct	catgtccgt	gatgcatgag	gctctgcaca	accactacac	acagaagagc	960
ctctccctgt	ctctgggtaa	a				981
<210>	40					
<211>	981					
<212>	DNA					
<213>	Homo Sapiens					
<400>	40					
gcctccacca	agggacctag	cgtgttcct	ctcgccccct	gttccaggtc	cacaagcgag	60
tccaccgctg	ccctcggtg	tctggtgaaa	gactactttc	ccgagcccgt	gaccgtctcc	120
tggaatagcg	gagccctgac	ctccggcgtg	cacacatttc	ccgccgtgct	gcagagcagc	180
ggactgtata	gcctgagcag	cgtggtgacc	gtgcccagct	ccagcctcgg	cacaaaacc	240
tacacctgca	acgtggacca	caagccctcc	aacaccaagg	tggaacaagc	ggtggagagc	300
aagtacggcc	ccccttgccc	tccttgtcct	gccctgagt	tcgagggagg	accctccgtg	360
ttcctgtttc	ccccaaaacc	caaggacacc	ctgatgatct	cccggacacc	cgaggtgacc	420
tgtgtggtcg	tggaactcag	ccaggaggac	cccaggtgc	agttcaactg	gtatgtggac	480
ggcgtggagg	tgcaaatgc	caaaaccaag	cccaggagg	agcagttcaa	ttccacctac	540
agggtggtga	gcgtgctgac	cgtcctgcat	caggattggc	tgaacggcaa	ggagtacaag	600
tgcaaggtgt	ccaacaagg	actgcccagc	tccatcgaga	agaccatcag	caaggctaag	660
ggccagccga	gggagcccca	ggtgtatacc	ctgcctccta	gccaggaaga	gatgaccaag	720
aaccaagtgt	ccctgacctg	cctggtgaag	ggattctacc	cctccgacat	cgccgtggag	780
tgggagagca	atggccagcc	cgagaacaac	tacaaaaca	cccctcccgt	gctcgatagc	840
gacggcagct	tctttctcta	cagccggtg	acagtggaca	agagcaggtg	gcaggagggc	900
aacgtgttct	cctgttccgt	gatgcacgag	gcctgcaca	atcactacac	ccagaagagc	960
ctctccctgt	ccctgggcaa	g				981
<210>	41					
<211>	981					
<212>	DNA					
<213>	Homo Sapiens					

<400> 41

```

gccagcacca agggcccttc cgtgttcccc ctggccccctt gcagcaggag cacctccgaa      60
tccacagctg ccctgggctg tctggtgaag gactactttc ccgagcccgt gaccgtgagc      120
tggaacagcg gcgctctgac atccggcgtc cacacctttc ctgccgtcct gcagtcctcc      180
ggcctctact ccctgtcctc cgtggtgacc gtgcctagct cctccctcgg caccaagacc      240
tacacctgta acgtggacca caaacctcc aacaccaagg tggacaaacg ggtcgagagc      300
aagtacggcc ctccctgccc tccttgtcct gcccccgagt tcgaaggcgg acccagcgtg      360
ttcctgttcc ctctaagcc caaggacacc ctcatgatca gccggacacc cgaggtgacc      420
tgcgtggtgg tggatgtgag ccaggaggac cctgaggtcc agttcaactg gtatgtggat      480
ggcgtggagg tgcacaacgc caagacaaag ccccggaag agcagttcaa ctccacctac      540
agggtgttca gcgtgctgac cgtgctgcat caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag      600
tgcaaggtca gcaataaggg actgcccagc agcatcgaga agaccatctc caaggctaaa      660
ggccagcccc gggaacctca ggtgtacacc ctgcctccca gccaggagga gatgaccaag      720
aaccaggtga gcctgacctg cctggtgaag ggattctacc cttccgacat cgccgtggag      780
tgggagtcca acggccagcc cgagaacaat tataagacca cccctcccgt cctcgacagc      840
gacggatcct tctttctgta ctccaggtg accgtggata agtccaggtg gcaggaaggc      900
aacgtgttca gctgctccgt gatgcacgag gccctgcaca atcactacac ccagaagtcc      960
ctgagcctgt ccctgggaaa g                                           981

```

<210> 42

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 42

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1           5           10           15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
          20           25           30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
          35           40           45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
          50           55           60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65           70           75           80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
          85           90           95
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
          100          105          110
Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
          115          120          125

```

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val	
130	135 140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp	
145	150 155 160
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe	
	165 170 175
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp	
	180 185 190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu	
	195 200 205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg	
	210 215 220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys	
225	230 235 240
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp	
	245 250 255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys	
	260 265 270
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser	
	275 280 285
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser	
	290 295 300
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser	
305	310 315 320
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys	
	325

<210> 43

<211> 981

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 43

gcctccacca agggcccatc cgttctcccc ctggcgccct gctccaggag cacctccgag	60
agcacggccg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccagt gacggtgtcg	120
tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgctg cacaccttcc cggtctgtct acagtctca	180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc	240
tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc	300
aaatatggtc ccccatgccc accatgccc gcgcctccag ttgcgggggg accatcagtc	360
ttctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccgacccc tgaggtcacg	420
tgcgtggtgg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat	480

```

ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac      540
cgtgtggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag      600
tgcaaggtct ccaacaaagg cctcccgta tcgatcgaga aaaccatctc caaagccaaa      660
gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag      720
aaccagggtca gcctgacctg cctgggtcaaa ggctttctacc ccagcgacat cgccgtggag      780
tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt gctggactcc      840
gacggatcct tcttcctcta cagcaggcta accgtggaca agagcaggtg gcaggagggg      900
aatgtcttct catgtcccgat gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc      960
ctctccctgt ctctgggtaa a                                             981

```

<210> 44

<211> 327

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 44

```

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
1          5          10          15
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
          20          25          30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
          35          40          45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
          50          55          60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr
65          70          75          80
Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
          85          90          95
Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
          100          105          110
Pro Val Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
          115          120          125
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
          130          135          140
Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
145          150          155          160
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
          165          170          175
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
          180          185          190
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu

```

195	200	205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr	Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg	
210	215	220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys		
225	230	235
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
245	250	255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
260	265	270
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
275	280	285
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser		
290	295	300
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
305	310	315
Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys		
325		

<210> 45

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 45

cgtacggtgg ccgctccctc cgtgttcac	ttcccacctt ccgacgagca gctgaagtcc	60
ggcaccgctt ctgtcgtgtg cctgctgaac	aacttctacc cccgcgaggc caaggtgcag	120
tggaaggtgg acaacgccct gcagtccggc	aactcccagg aatccgtgac cgagcaggac	180
tccaaggaca gcacctactc cctgtcctcc	accctgacct tgtccaaggc cgactacgag	240
aagcacaagg tgtacgcctg cgaagtgacc	caccagggcc tgtctagccc cgtgaccaag	300
tctttcaacc ggggcgagtg t		321

<210> 46

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 46

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu	
1	5 10 15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe	
20	25 30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln	
35	40 45

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 47

<211> 321

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 47

cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcate ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
 ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
 tggaagggtg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggag 180
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
 aaacacaaag tctacgccgg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
 agcttcaaca ggggagagtg t 321

<210> 48

<211> 107

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 48

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Glu Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Gly Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 49

<211> 321
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens
 <400> 49
 cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac tccccgcat ctgatgagca gttgaaatct 60
 ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aactttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
 cggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggag 180
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
 aaacacaaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
 agcttcaaca ggggagagtg t 321

<210> 50
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 50
 Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Arg Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Glu Ser Lys Asp Ser
 50 55 60
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 65 70 75 80
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 85 90 95
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 100 105

<210> 51
 <211> 321
 <212> DNA
 <213> Homo Sapiens
 <400> 51
 cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac tccccgcat ctgatgagca gttgaaatct 60
 ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aactttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
 tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
 aaacacaaac tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300

agcttcaaca ggggagagtg t	321
<210> 52	
<211> 107	
<212> PRT	
<213> Homo Sapiens	
<400> 52	
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu	
1 5 10 15	
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe	
20 25 30	
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln	
35 40 45	
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser	
50 55 60	
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu	
65 70 75 80	
Lys His Lys Leu Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser	
85 90 95	
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys	
100 105	
<210> 53	
<211> 321	
<212> DNA	
<213> Homo Sapiens	
<400> 53	
cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct	60
ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag	120
tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac	180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcaac acctgacgc tgagcaaagc agactacgag	240
aaacacaaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag	300
agcttcaaca ggggagagtg c	321
<210> 54	
<211> 107	
<212> PRT	
<213> Homo Sapiens	
<400> 54	
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu	
1 5 10 15	
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe	

	20						25						30					
Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln			
	35						40						45					
Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser			
	50						55						60					
Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	Asn	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu			
65	70						75						80					
Lys	His	Lys	Val	Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser			
	85						90						95					
Pro	Val	Thr	Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys								
	100						105											
<210>	55																	
<211>	312																	
<212>	DNA																	
<213>	Homo Sapiens																	
<400>	55																	
cccaaggcca	acccacggt	cactctgttc	ccgccctcct	ctgaggagct	ccaagccaac	60												
aaggccacac	tagtgtgtct	gatcagtgac	ttctaccggg	gagctgtgac	agtggcttgg	120												
aaggcagatg	gcagccccgt	caaggcggga	gtggagacga	ccaaaccctc	caaacagagc	180												
aacaacaagt	acgcggccag	cagctacctg	agcctgacgc	ccgagcagtg	gaagtcccac	240												
agaagctaca	gctgccaggt	cacgcatgaa	gggagcaccg	tggagaagac	agtggcccct	300												
acagaatgtt	ca																	
<210>	56																	
<211>	104																	
<212>	PRT																	
<213>	Homo Sapiens																	
<400>	56																	
Pro	Lys	Ala	Asn	Pro	Thr	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	Glu	Glu			
1	5						10						15					
Leu	Gln	Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp	Phe	Tyr			
	20						25						30					
Pro	Gly	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Gly	Ser	Pro	Val	Lys			
	35						40						45					
Ala	Gly	Val	Glu	Thr	Thr	Lys	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn	Lys	Tyr			
	50						55						60					
Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Lys	Ser	His			
65	70						75						80					
Arg	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	Glu	Lys			
	85						90						95					

Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser

100

<210> 57

<211> 318

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 57

ggtcagccca aggccaaccc cactgtcact ctgttcccgc cctcctctga ggagctccaa	60
gccaacaagg ccacactagt gtgtctgata agtgacttct acccgggagc tgtgacagtg	120
gcctggaagg cagatggcag ccccgtaag gcgggagtg agaccaccaa accctccaaa	180
cagagcaaca acaagtacgc ggccagcagc tacctgagcc tgacgcccga gcagtggaag	240
tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg	300
gcccctacag aatgttca	318

<210> 58

<211> 318

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 58

ggtcagccca aggccaaccc cactgtcact ctgttcccgc cctcctctga ggagctccaa	60
gccaacaagg ccacactagt gtgtctgata agtgacttct acccgggagc tgtgacagtg	120
gcctggaagg cagatggcag ccccgtaag gcgggagtg agaccaccaa accctccaaa	180
cagagcaaca acaagtacgc ggccagcagc tacctgagcc tgacgcccga gcagtggaag	240
tcccacagaa gctacagctg ccaggtcacg catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg	300
gcccctacag aatgttca	318

<210> 59

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 59

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

1 5 10 15

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp

20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro

35 40 45

Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn

50 55 60

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys

65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val	
85	90
Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser	95
100	105
<210> 60	
<211> 318	
<212> DNA	
<213> Homo Sapiens	
<400> 60	
ggccagccta aggccgctcc ttctgtgacc ctgttcccc catcctccga ggaactgcag	60
gctaacaagg ccaccctcgt gtgcctgata agcgacttct accctggcgc cgtgaccgtg	120
gcctggaagg ctgatatgct tcctgtgaag gccggcgctgg aaaccaccac cccttccaag	180
cagtccaaca acaaatacgc cgctcctcc tacctgtccc tgaccctga gcagtggaag	240
tcccaccggt cctacagctg ccaagtgacc cagcagggt ccaccgtgga aaagaccgtg	300
gtcctaccg agtgctcc	318
<210> 61	
<211> 318	
<212> DNA	
<213> Homo Sapiens	
<400> 61	
ggccagccta aagctgcccc cagcgtcacc ctgtttcctc cctccagcga ggagctccag	60
gccaacaagg ccaccctcgt gtgcctgata tccgacttct atcccggcgc tgtgaccgtg	120
gcttggaag cgcactccag ccctgtcaaa gccggcgctgg agaccaccac accctccaag	180
cagtccaaca acaagtacgc cgctccagc tatctctccc tgaccctga gcagtggaag	240
tcccaccggt cctactcctg tcaggtgacc cagcagggt ccaccgtgga aaagaccgtc	300
gccccaccg agtgctcc	318
<210> 62	
<211> 106	
<212> PRT	
<213> Homo Sapiens	
<400> 62	
Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser	
1 5 10 15	
Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp	
20 25 30	
Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro	
35 40 45	
Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn	
50 55 60	

Lys	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Lys	
65					70					75					80	
Ser	His	Arg	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	
				85					90					95		
Glu	Lys	Thr	Val	Ala	Pro	Thr	Glu	Cys	Ser							
			100					105								
<210>	63															
<211>	318															
<212>	DNA															
<213>	Homo Sapiens															
<400>	63															
ggtcagccca	aggctgcccc	ctcggtcact	ctgttcccgc	cctcctctga	ggagcttcaa											60
gccacaagg	ccacactggg	gtgtctcata	agtgacttct	acccgggagc	cgtgacagtg											120
gcctggaagg	cagatagcag	ccccgtcaag	gcgggagtg	agaccaccac	accctccaaa											180
caaagcaaca	acaagtacgc	ggccagcagc	tatctgagcc	tgacgcctga	gcagtggaag											240
tcccacagaa	gctacagctg	ccaggtcacg	catgaaggga	gcaccgtgga	gaagacagtg											300
gccctacag	aatgttca															318
<210>	64															
<211>	106															
<212>	PRT															
<213>	Homo Sapiens															
<400>	64															
Gly	Gln	Pro	Lys	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Thr	Leu	Phe	Pro	Pro	Ser	Ser	
1			5					10						15		
Glu	Glu	Leu	Gln	Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ile	Ser	Asp	
			20					25					30			
Phe	Tyr	Pro	Gly	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Ser	Ser	Pro	
			35					40				45				
Val	Lys	Ala	Gly	Val	Glu	Thr	Thr	Thr	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn	
	50					55					60					
Lys	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Lys	
65					70					75					80	
Ser	His	Arg	Ser	Tyr	Ser	Cys	Gln	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val	
				85					90					95		
Glu	Lys	Thr	Val	Ala	Pro	Thr	Glu	Cys	Ser							
			100					105								
<210>	65															
<211>	312															
<212>	DNA															

<213>	Homo Sapiens	
<400>	65	
cccaaggctg	ccccctcgg	60
cactctgttc	ccaccctcct	
ctgaggagct	tcaagccaac	
aaggccacac	tgggtgtgtct	120
cataagtgac	ttctaccg	
gagccgtgac	agttgcctgg	
aaggcagata	gcagccccgt	180
caaggcgggg	gtggagacca	
ccacaccctc	caaacaaagc	
aacaacaagt	acgcggccag	240
cagctacctg	agcctgacgc	
ctgagcagtg	gaagtccac	
aaaagctaca	gctgccaggt	300
cacgcatgaa	gggagcacgc	
tggagaagac	agttgccct	
acggaatgtt	ca	312
<210>	66	
<211>	104	
<212>	PRT	
<213>	Homo Sapiens	
<400>	66	
Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu		
1 5 10 15		
Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr		
20 25 30		
Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val Lys		
35 40 45		
Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr		
50 55 60		
Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His		
65 70 75 80		
Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys		
85 90 95		
Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser		
100		
<210>	67	
<211>	318	
<212>	DNA	
<213>	Homo Sapiens	
<400>	67	
ggtcagccca	aggctgcccc	60
ctcggteact	ctgttccac	
cctcctctga	ggagcttcaa	
gccaacaagg	ccacactggt	120
gtgtctcata	agtgaattct	
acccggggcc	agtgaactgt	
gcctggaagg	cagatagcag	180
ccccgtcaag	gcgggggtgg	
agaccaccac	accctccaaa	
caaagcaaca	acaagtacgc	240
ggccagcagc	tacctgagcc	
tgacgcctga	gcagtggaag	
tcccacaaaa	gctacagctg	300
ccaggtcacg	catgaaggga	
gcaccgtgga	gaagacagtg	
gcccctacgg	aatgttca	318
<210>	68	

<210> 70
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Homo Sapiens
 <400> 70
 Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
 1 5 10 15
 Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
 20 25 30
 Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro

35	40	45	
Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn			
50	55	60	
Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys			
65	70	75	80
Ser His Lys Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val			
85	90	95	
Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser			
100	105		
<210> 71			
<211> 318			
<212> DNA			
<213> Homo Sapiens			
<400> 71			
ggtcagccca aggctgcccc ctcggteact ctgttcccg cctcctctga ggagcttcaa			60
gccaacaagg ccacactggt gtgtctcata agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg			120
gcctggaagg cagatagcag ccccgtaag gcgggagtgg agaccaccac accctccaaa			180
caaagcaaca acaagtacgc ggccagcagc tacctgagcc tgacgcctga gcagtggaag			240
tccacagaa gctacagctg ccaggtcacg catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg			300
gcccctacag aatgttca			318
<210> 72			
<211> 106			
<212> PRT			
<213> Homo Sapiens			
<400> 72			
Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser			
1 5 10 15			
Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp			
20 25 30			
Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro			
35 40 45			
Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn			
50 55 60			
Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys			
65 70 75 80			
Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val			
85 90 95			
Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser			
100 105			

<210>	73	
<211>	318	
<212>	DNA	
<213>	Homo Sapiens	
<400>	73	
ggtcagccca	aggctgcccc	atcggtcact ctgttcccgc cctcctctga ggagcttcaa 60
gccaacaagg	ccacactggt	gtgcctgata agtgacttct acccgggagc tgtgaaagtg 120
gcctggaagg	cagatggcag	ccccgtcaac acgggagtgg agaccaccac accctccaaa 180
cagagcaaca	acaagtacgc	ggccagcagc tacctgagcc tgacgcctga gcagtggaag 240
tcccacagaa	gctacagctg	ccaggtcacg catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg 300
gcccctgcag	aatgttca	318
<210>	74	
<211>	106	
<212>	PRT	
<213>	Homo Sapiens	
<400>	74	
Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser		
1	5	10 15
Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp		
	20	25 30
Phe Tyr Pro Gly Ala Val Lys Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro		
	35	40 45
Val Asn Thr Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn		
	50	55 60
Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys		
65	70	75 80
Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val		
	85	90 95
Glu Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser		
	100	105
<210>	75	
<211>	318	
<212>	DNA	
<213>	Homo Sapiens	
<400>	75	
ggtcagccca	aggctgcccc	atcggtcact ctgttcccac cctcctctga ggagcttcaa 60
gccaacaagg	ccacactggt	gtgtctcgta agtgacttct acccgggagc cgtgacagtg 120
gcctggaagg	cagatggcag	ccccgtcaag gtgggagtgg agaccaccaa accctccaaa 180
caaagcaaca	acaagtatgc	ggccagcagc tacctgagcc tgacgcccga gcagtggaag 240

tccacagaa gctacagctg ccgggtcacg catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg 300
gcccctgcag aatgctct 318

<210> 76

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 76

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

Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Val Ser Asp
20 25 30

Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro
35 40 45

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

Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65 70 75 80

Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Arg Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
85 90 95

Glu Lys Thr Val Ala Pro Ala Glu Cys Ser
100 105

<210> 77

<211> 318

<212> DNA

<213> Homo Sapiens

<400> 77

ggtcagccca aggctgcccc ctcggtcact ctgttccac cctcctctga ggagcttcaa 60

gccaacaagg ccacactggg gtgtctcgta agtgacttca acccgggagc cgtgacagtg 120

gcctggaagg cagatggcag ccccgtaag gtgggagtg agaccaccaa accctccaaa 180

caaagcaaca acaagtatgc ggccagcagc tacctgagcc tgacgcccga gcagtggaag 240

tccacagaa gctacagctg ccgggtcacg catgaaggga gcaccgtgga gaagacagtg 300

gcccctgcag aatgctct 318

<210> 78

<211> 106

<212> PRT

<213> Homo Sapiens

<400> 78

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

Glu	Glu	Leu	Gln	Ala	Asn	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Val	Ser	Asp
20				25				30							
Phe	Asn	Pro	Gly	Ala	Val	Thr	Val	Ala	Trp	Lys	Ala	Asp	Gly	Ser	Pro
35				40				45							
Val	Lys	Val	Gly	Val	Glu	Thr	Thr	Lys	Pro	Ser	Lys	Gln	Ser	Asn	Asn
50				55				60							
Lys	Tyr	Ala	Ala	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ser	Leu	Thr	Pro	Glu	Gln	Trp	Lys
65				70				75				80			
Ser	His	Arg	Ser	Tyr	Ser	Cys	Arg	Val	Thr	His	Glu	Gly	Ser	Thr	Val
85				90				95							
Glu	Lys	Thr	Val	Ala	Pro	Ala	Glu	Cys	Ser						
100				105											

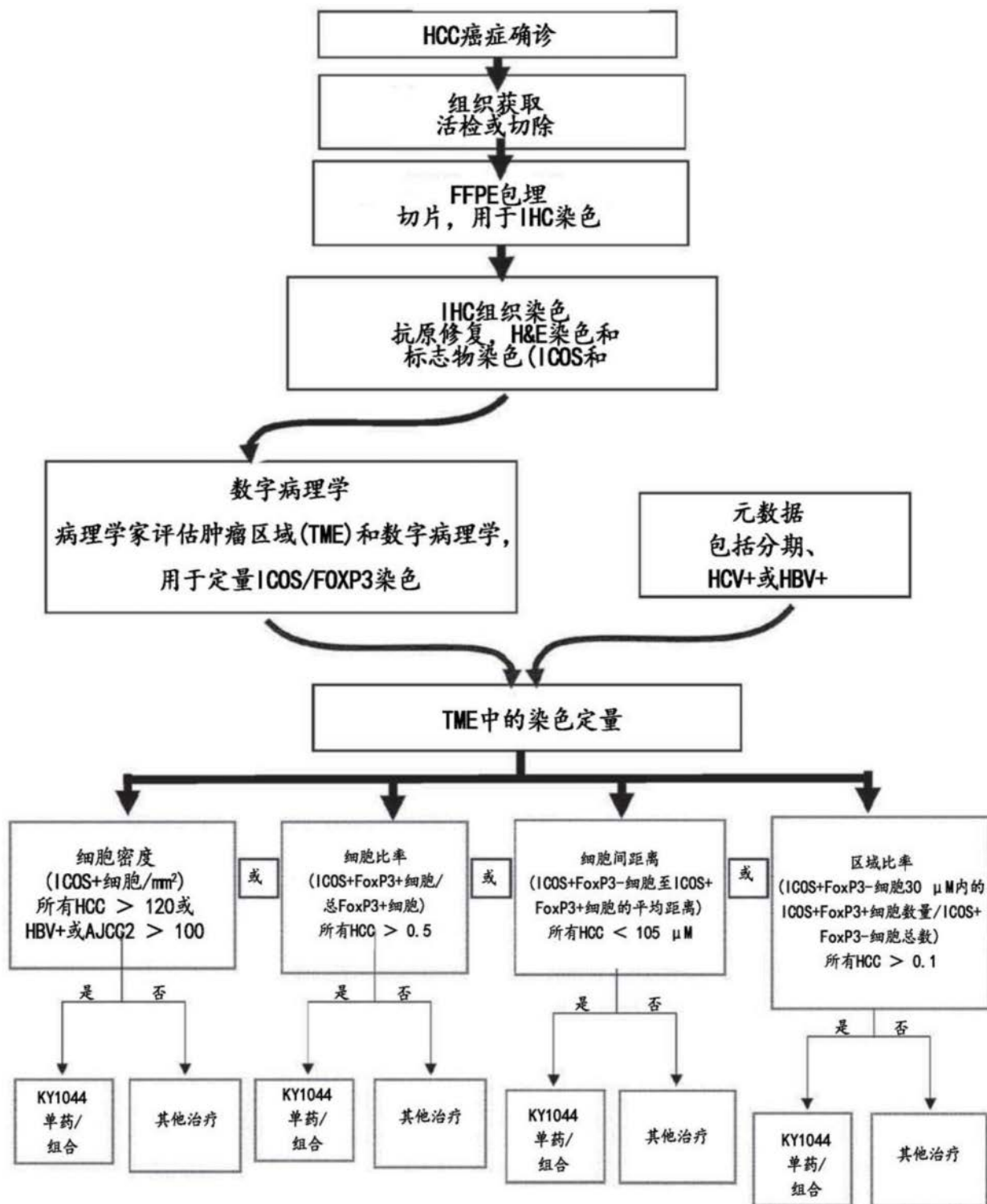


图1

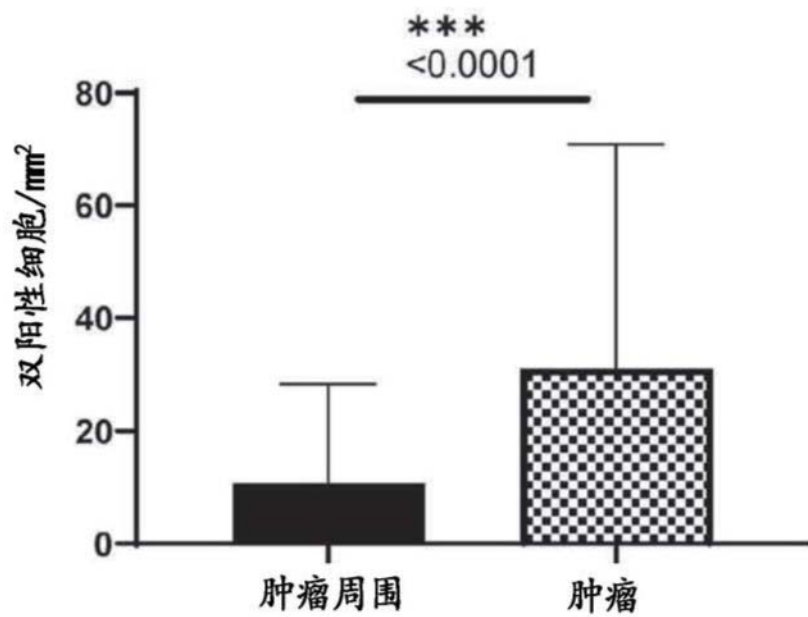


图2

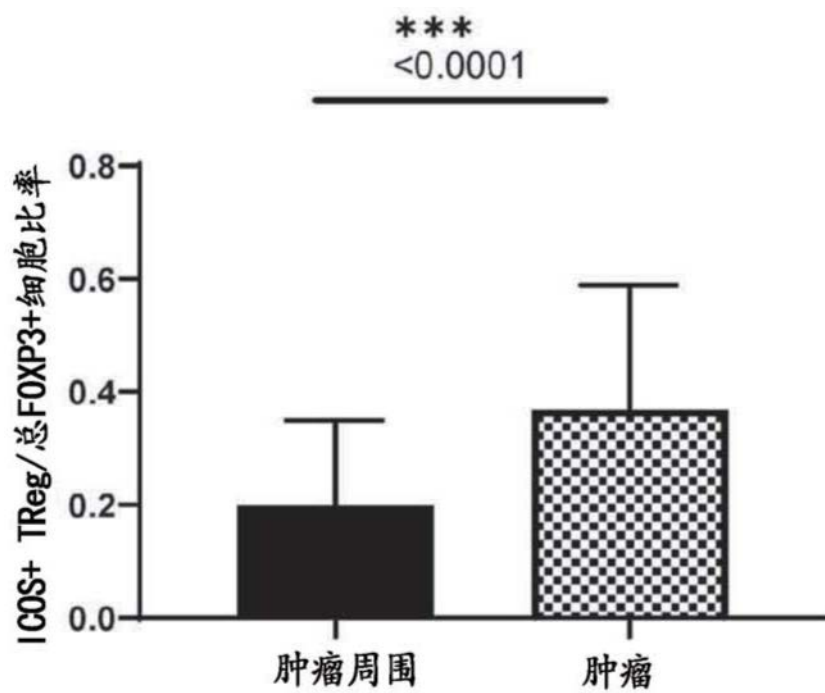


图3

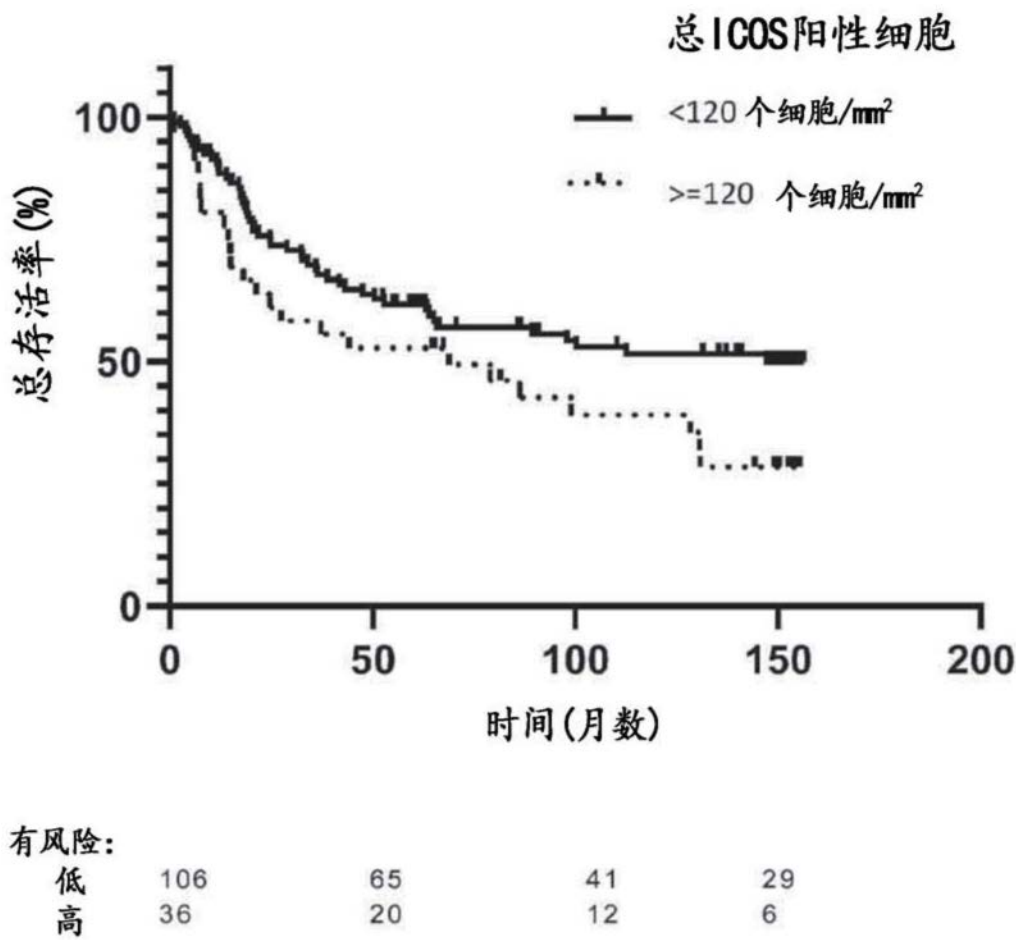


图4

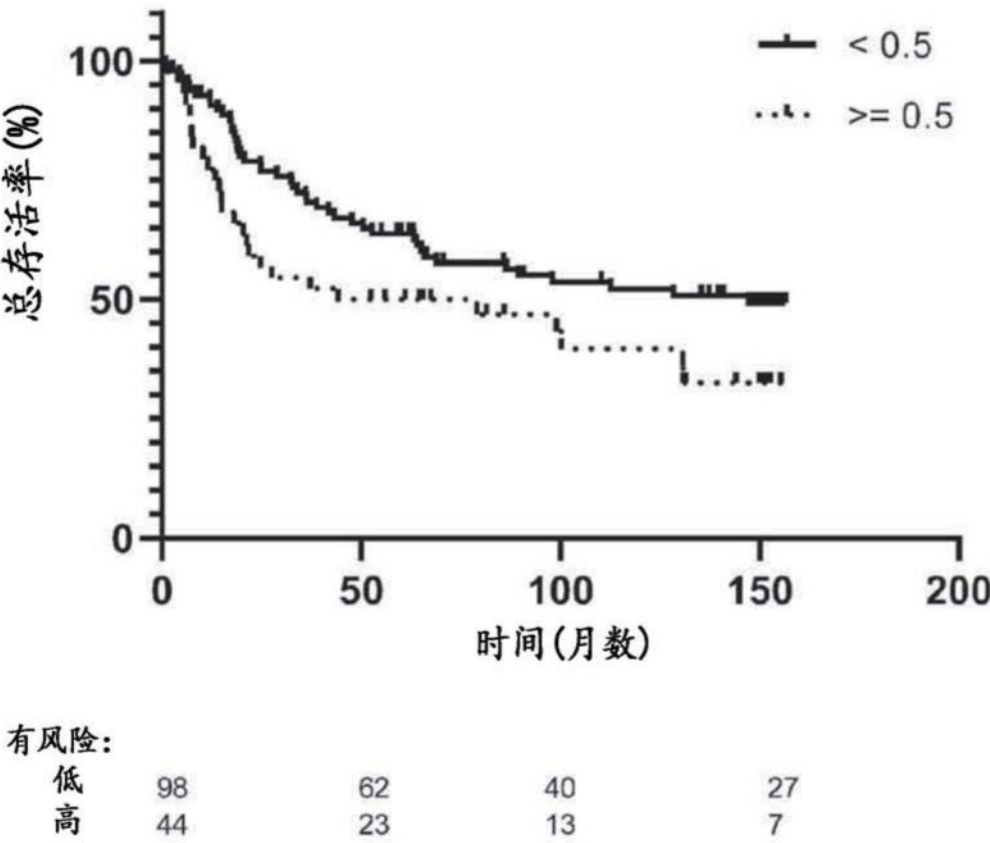


图5

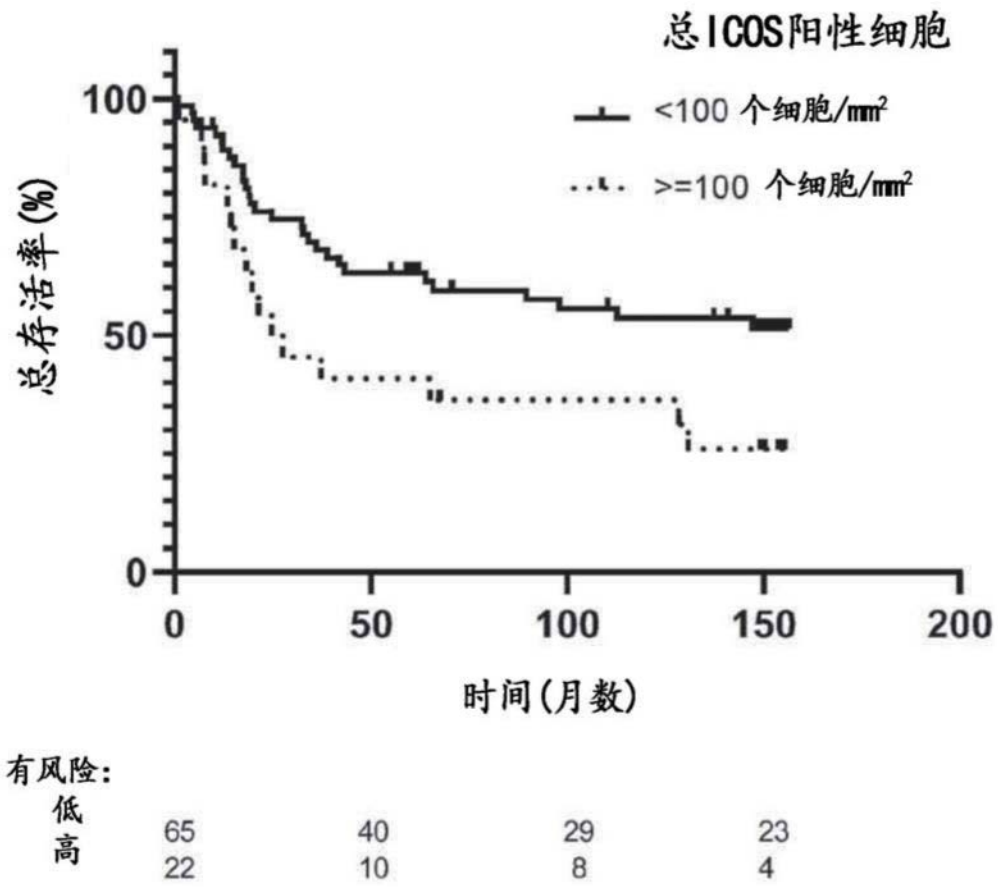


图6

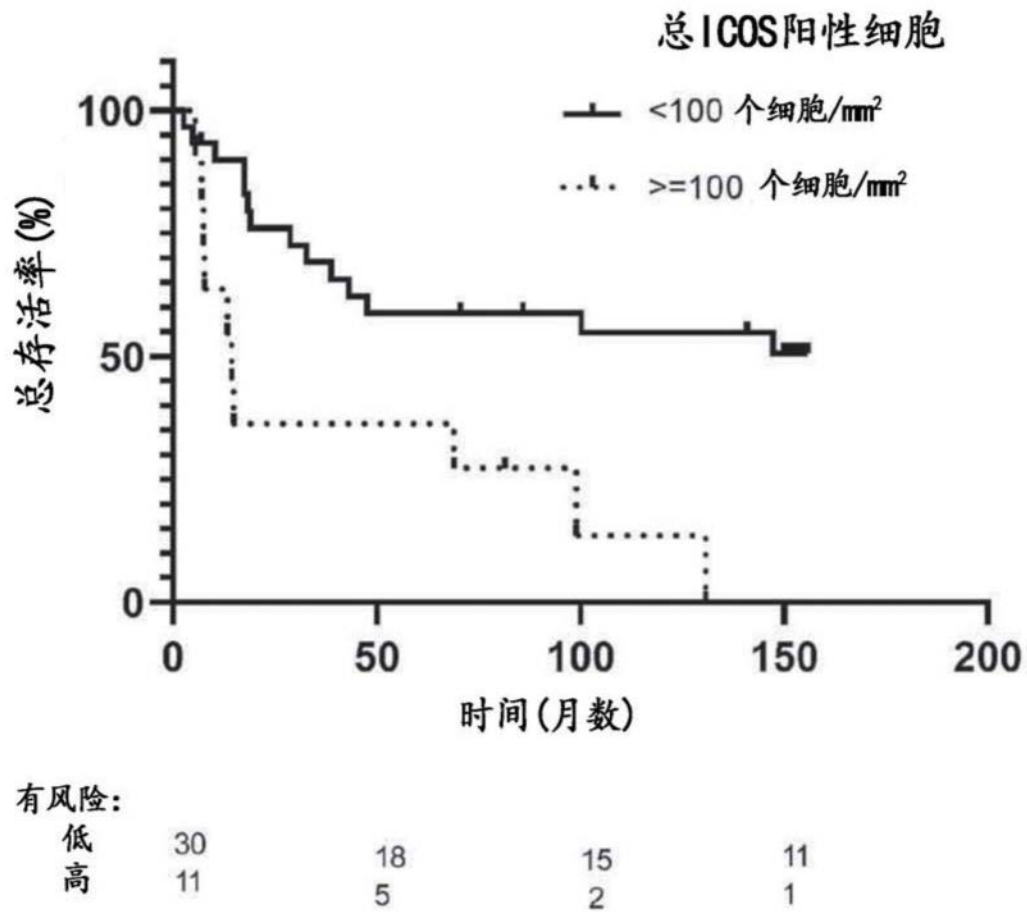


图7

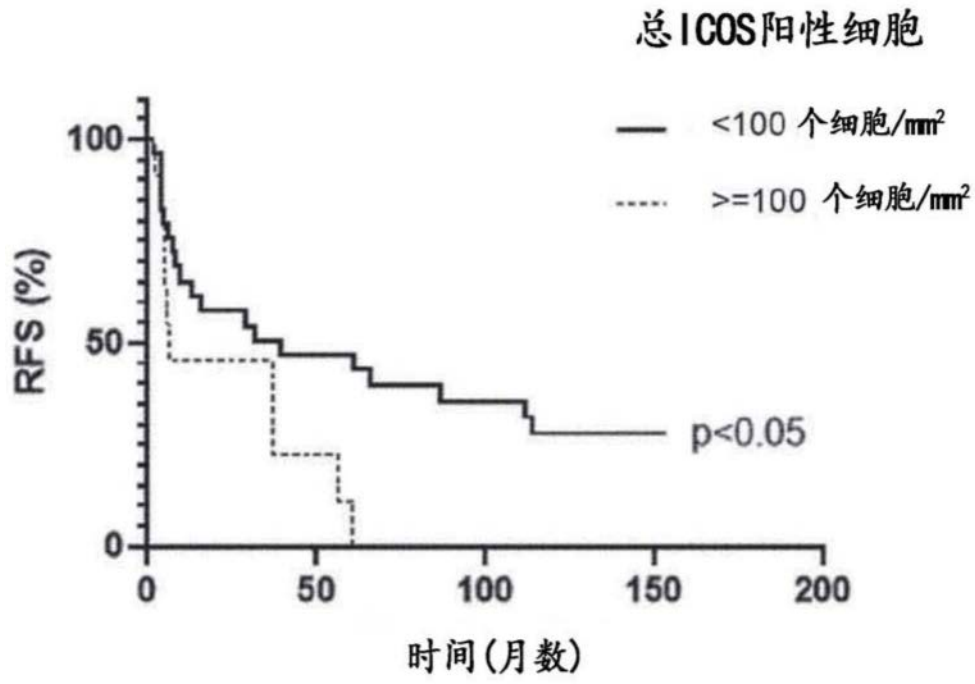
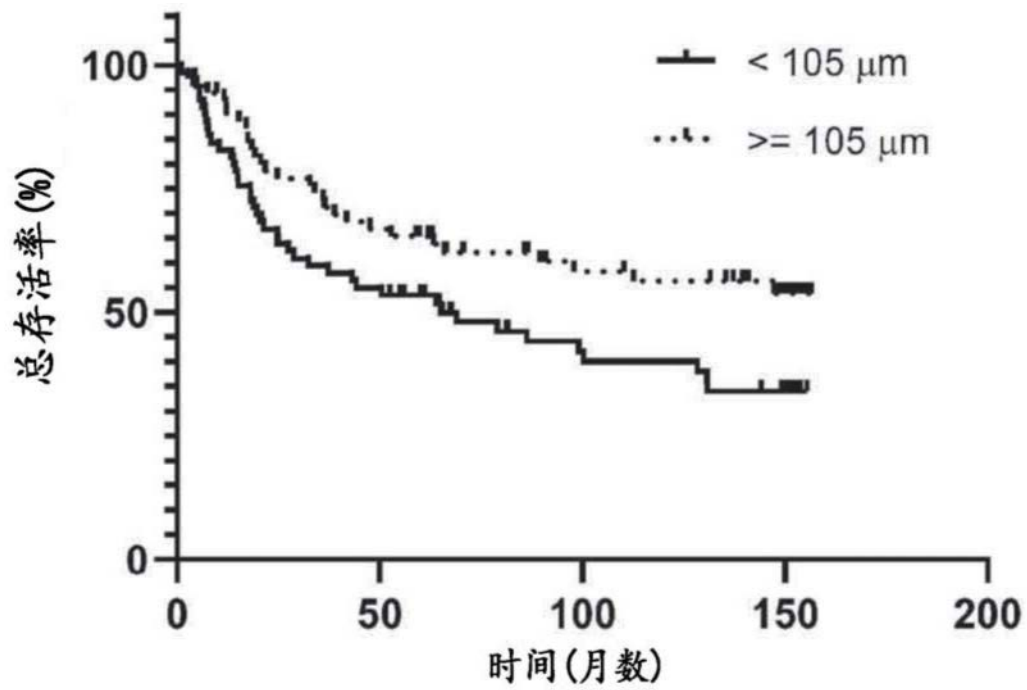


图8



有风险:

低	71	47	31	19
高	71	38	22	15

图9

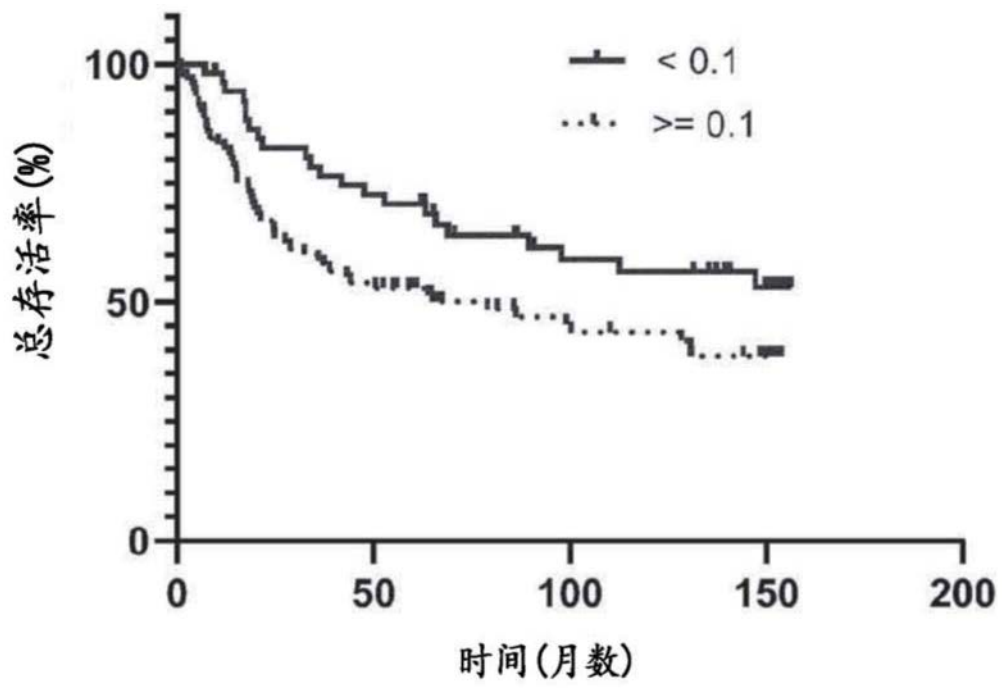


图10

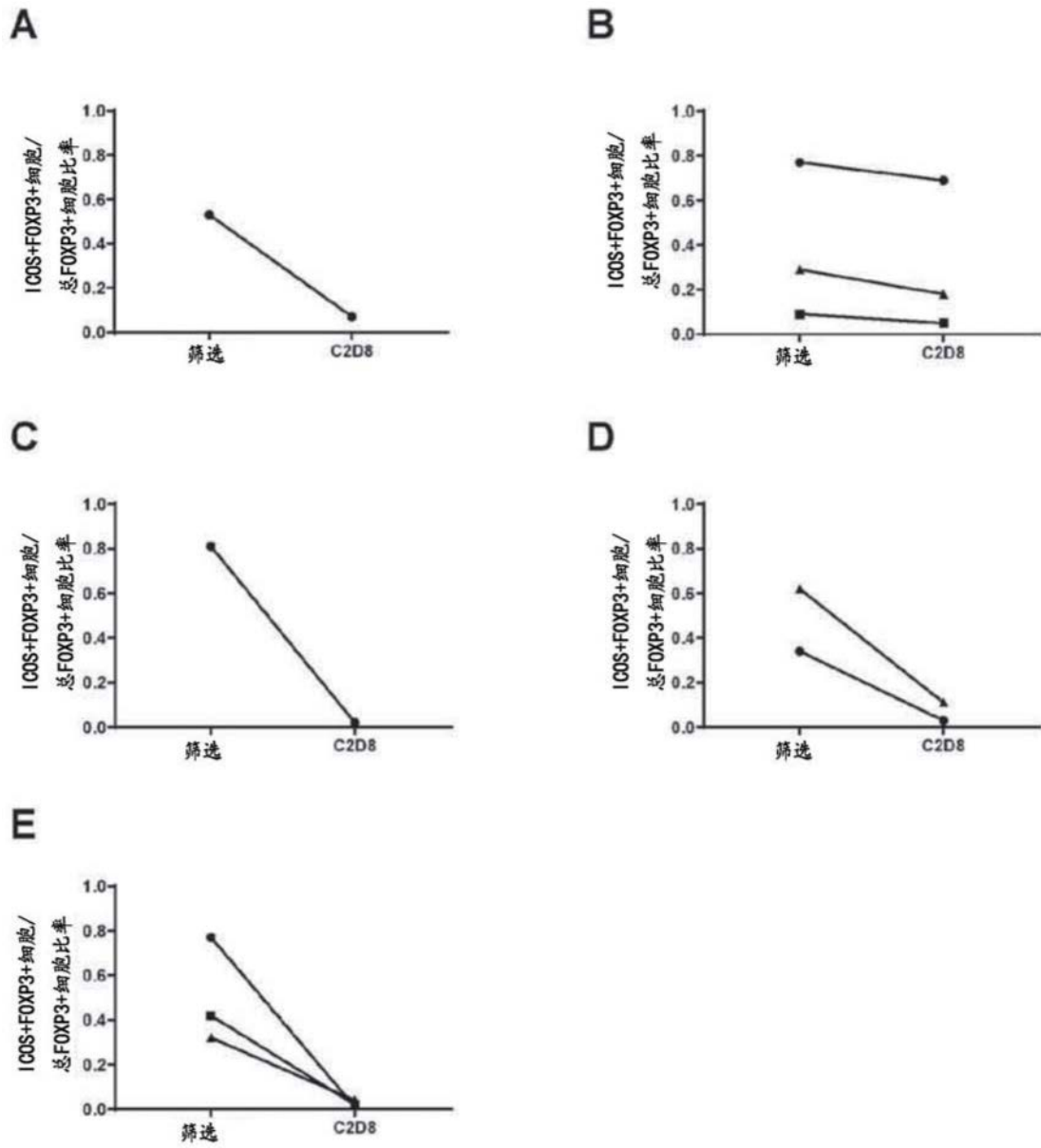


图11

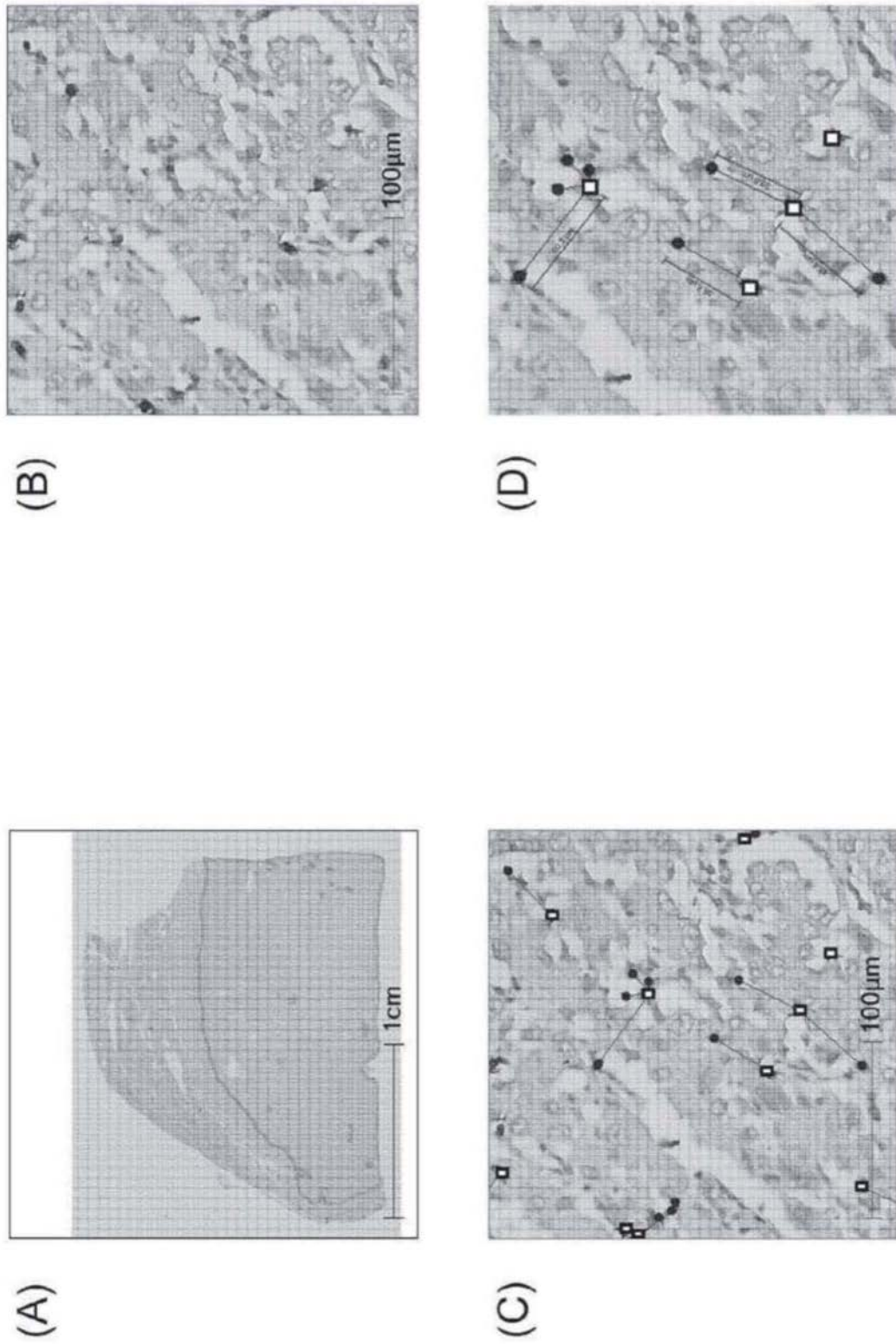


图12

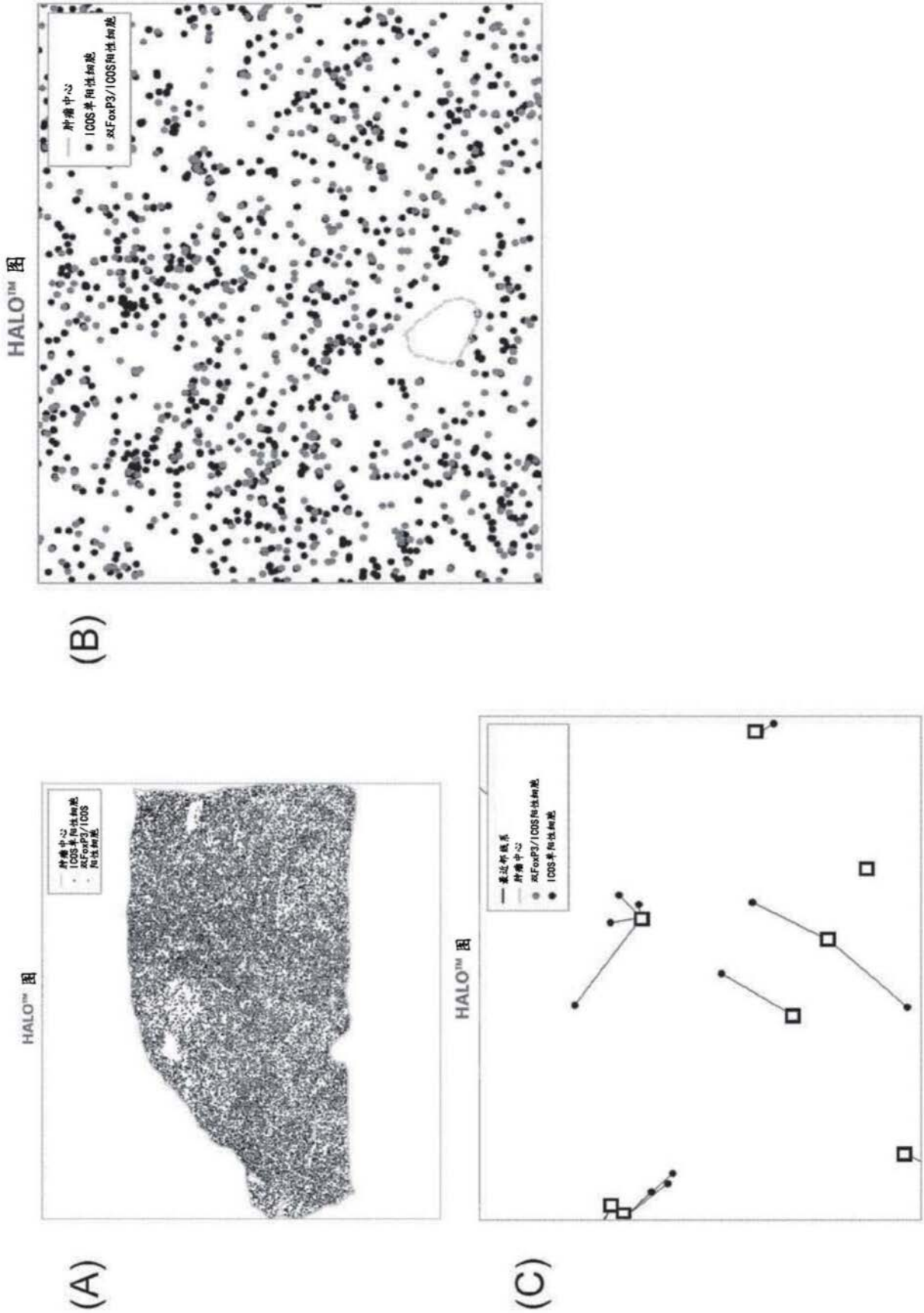
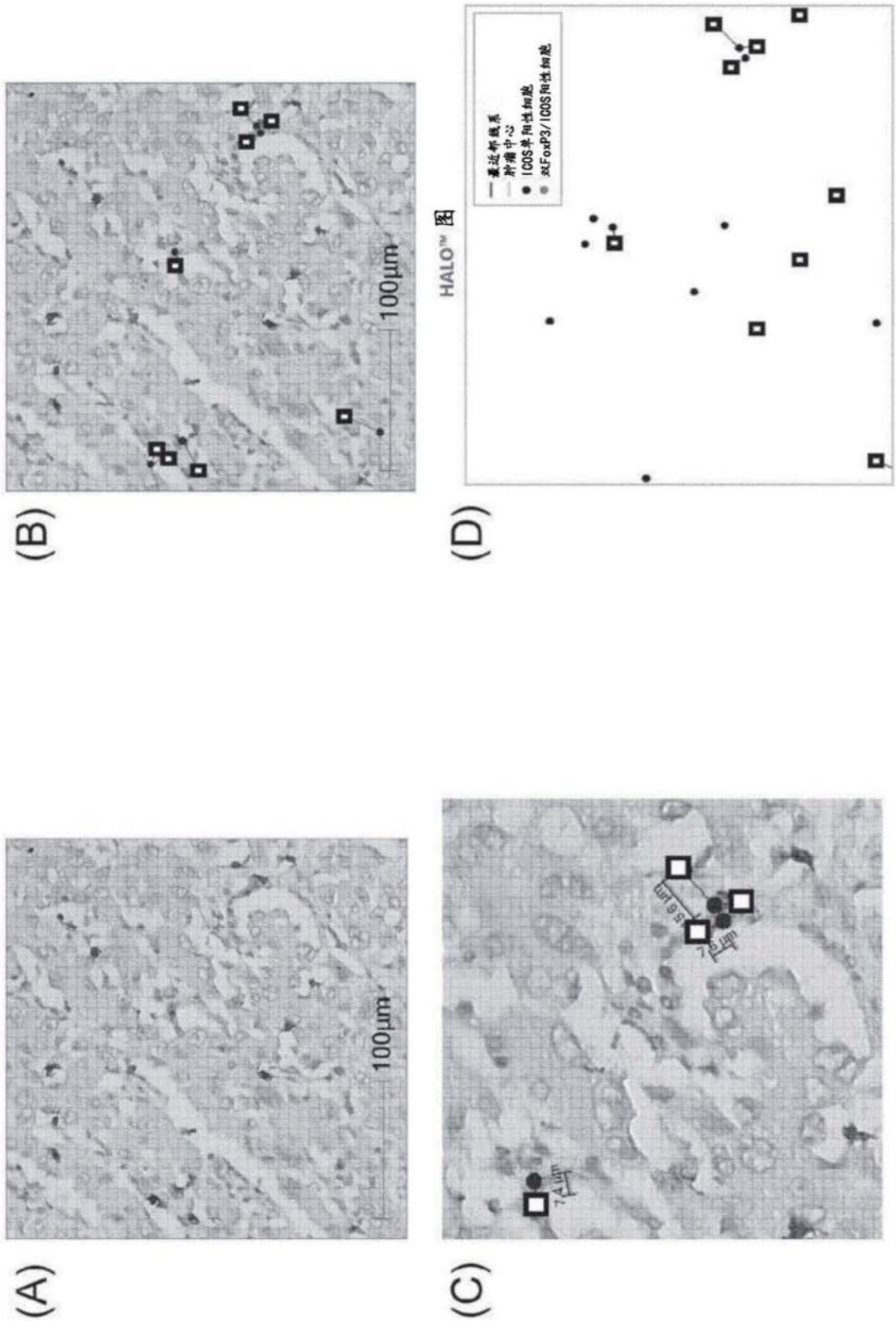


图13



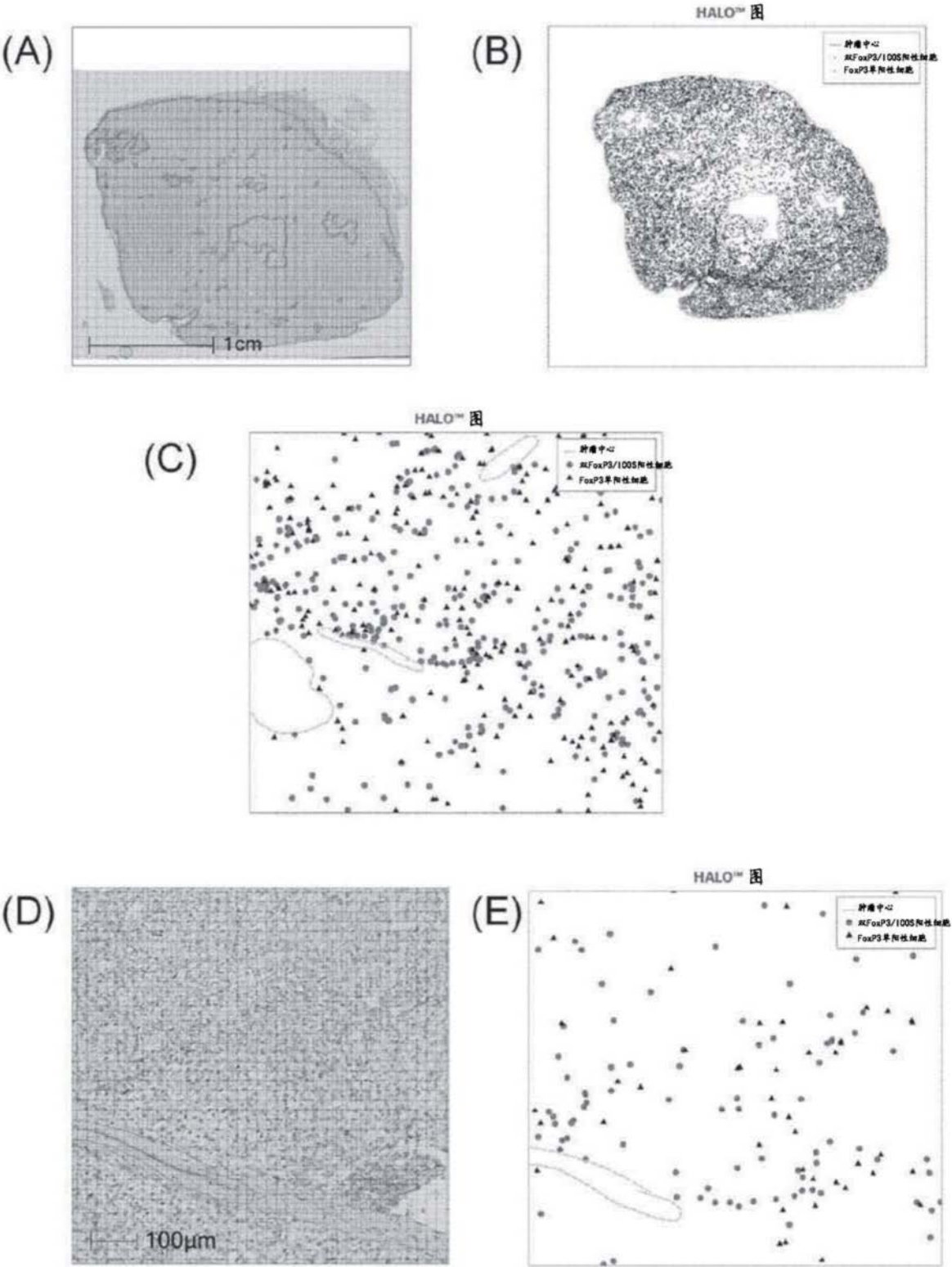


图15