



(10) 授权公告号 CN 115066435 B

(45) 授权公告日 2025.05.02

(21) 申请号 202080065196.6

(22) 申请日 2020.09.18

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 115066435 A

(43) 申请公布日 2022.09.16

(30) 优先权数据
19306148.8 2019.09.20 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2022.03.17

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2020/076198 2020.09.18

(87) PCT国际申请的公布数据
W02021/053199 EN 2021.03.25

(73) 专利权人 英韦克泰斯股份公司
地址 法国巴黎

(72) 发明人 玛丽亚·卢斯塔乌

莉丝·胡诺尔特

皮埃尔·兰格拉德-德莫延

朱利安·考马丁

(74) 专利代理机构 中原信达知识产权代理有限
责任公司 11219

专利代理师 金海霞 刘慧

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

(56) 对比文件

US 2019194327 A1, 2019.06.27

审查员 王烟岚

权利要求书2页 说明书20页

序列表19页 附图7页

(54) 发明名称

针对LILRB2的单域抗体

(57) 摘要

本发明涉及针对白细胞免疫球蛋白样受体亚家族B成员2 (LILRB2) 的单域抗体 (sdAb)、包括其的药物组合物及其在诊断和治疗中的用途。

1. 一种单域抗体(sdAb),所述单域抗体(sdAb)特异性结合至白细胞免疫球蛋白样受体亚家族B成员2(LILRB2),其中所述sdAb包含三个互补决定区(CDR),其中CDR1由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成,CDR2由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成,并且CDR3由SEQ ID NO:3的氨基酸序列组成。

2. 根据权利要求1所述的sdAb,其中所述LILRB2为人LILRB2。

3. 根据权利要求1所述的sdAb,其中所述sdAb不结合至白细胞免疫球蛋白样受体亚家族B成员1(LILRB1)。

4. 根据权利要求3所述的sdAb,其中所述LILRB1为人LILRB1。

5. 根据权利要求1所述的sdAb,所述sdAb包括SEQ ID NO:34的氨基酸序列或与其具有至少90%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

6. 根据权利要求1所述的sdAb,所述sdAb包括SEQ ID NO:34的氨基酸序列或与其具有至少92%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

7. 根据权利要求1所述的sdAb,所述sdAb包括SEQ ID NO:34的氨基酸序列或与其具有至少94%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

8. 根据权利要求1所述的sdAb,所述sdAb包括SEQ ID NO:34的氨基酸序列或与其具有至少95%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

9. 根据权利要求1所述的sdAb,所述sdAb包括SEQ ID NO:34的氨基酸序列或与其具有至少96%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

10. 根据权利要求1所述的sdAb,所述sdAb包括SEQ ID NO:34的氨基酸序列或与其具有至少97%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

11. 根据权利要求1所述的sdAb,所述sdAb包括SEQ ID NO:34的氨基酸序列或与其具有至少98%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

12. 根据权利要求1所述的sdAb,所述sdAb包括SEQ ID NO:34的氨基酸序列或与其具有至少99%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

13. 根据权利要求1所述的sdAb,所述sdAb包括SEQ ID NO:34的氨基酸序列或与其具有大于99%的氨基酸序列同一性的氨基酸序列。

14. 根据权利要求1所述的sdAb,所述sdAb包括SEQ ID NO:34的氨基酸序列。

15. 根据权利要求1所述的sdAb,其中所述sdAb抑制LILRB2与人白细胞抗原-G(HLA-G)之间的相互作用。

16. 根据权利要求1所述的sdAb,其中所述sdAb抑制LILRB2与血管生成素样2(ANGPTL2)之间的相互作用。

17. 根据权利要求1-16中任一项所述的sdAb,其中所述sdAb与至少一个分子结合,其中所述至少一个分子是药物、成像分子、诊断剂、示踪剂、标签或染料。

18. 根据权利要求1-16中任一项所述的sdAb,其中所述sdAb与稳定基团结合。

19. 根据权利要求18所述的sdAb,其中所述稳定基团是Fc或IgG。

20. 一种分离的核酸,所述分离的核酸包括编码根据权利要求1至19中任一项所述的sdAb的核酸序列。

21. 根据权利要求20所述的分离的核酸,其中所述分离的核酸包括SEQ ID NO:45的序列。

22. 一种载体,所述载体包括根据权利要求20或21所述的分离的核酸。
23. 一种嵌合抗原受体 (CAR),所述嵌合抗原受体 (CAR) 包括根据权利要求1至19中任一项所述的sdAb。
24. 一种细胞,所述细胞包括根据权利要求20或21所述的分离的核酸。
25. 根据权利要求24所述的细胞,其中所述细胞选自:T细胞、B细胞、NK细胞、单核细胞和树突状细胞。
26. 根据权利要求25所述的细胞,其中所述T细胞是CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞或NKT细胞。
27. 一种药物组合物,所述药物组合物包括根据权利要求1至19中任一项所述的sdAb,和药学上可接受的载体。
28. 根据权利要求27所述的药物组合物在制备用于治疗癌症的药物中的用途,其中所述癌症过表达LILRB2。
29. 根据权利要求27所述的药物组合物在制备用于检测肿瘤细胞或组织上的LILRB2的试剂中的用途,其中所述肿瘤过表达LILRB2。
30. 根据权利要求28或29所述的用途,其中所述癌症或肿瘤选自:肺癌、胰腺癌、子宫内膜癌、肝细胞癌、黑色素瘤、卵巢癌、乳腺癌、结直肠癌、神经胶质瘤、胃癌、肾癌、睾丸癌、食道癌、宫颈癌、白血病、甲状腺癌、尿路上皮癌和头颈癌。
31. 根据权利要求30所述的用途,其中所述肺癌是小鼠路易斯肺癌。
32. 根据权利要求28或29所述的用途,其中所述癌症或肿瘤选自:非小细胞肺癌 (NSCLC)、胰腺导管癌、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、急性髓细胞白血病 (AML) 和肝癌。

针对LILRB2的单域抗体

技术领域

[0001] 本发明属于免疫治疗和免疫诊断领域。本发明提供针对白细胞免疫球蛋白样受体亚家族B成员2 (LILRB2) 的单域抗体 (sdAb)。

技术背景

[0002] 白细胞免疫球蛋白 (Ig) 样受体 (LILBR) 是抑制性受体,其细胞质尾部由ITIM(基于免疫受体酪氨酸的抑制基序) 构成。虽然LILRB1在所有免疫细胞亚群上表达,但LILRB2表达仅限于抗原呈递细胞 (APC),例如单核细胞、树突状细胞和巨噬细胞。

[0003] LILRB2与CD1d、补体级联中的几种分子 (C4d、C3d、C4b、C3b和iC3b)、血管生成素样2和5 (ANGPTL2/5) 蛋白、B-淀粉样蛋白1-42和髓磷脂衍生抑制剂 (Nogo66, MAG) 并且与经典 (HLA-A、-B和-C) 或非经典MHC I类分子 (HLA-E、F和G) 相互作用。特别证明了在免疫细胞上表达的LILRB2与HLA-G之间的相互作用抑制细胞功能并能够诱导免疫抑制细胞。事实上,树突状细胞 (DC) 中存在的HLA-G与LILRB2之间的相互作用抑制了它们的成熟并使它们产生耐受性。

[0004] 有趣的是,显示LILRB2受体在几种类型的癌症中表达,并且经常与转移相关。尽管LILRB2是一种抑制性受体,但其在肿瘤中的表达显示可增加肿瘤细胞的增殖和运动性。事实上,在与HLA-G或ANGPTL2结合后,LILRB2受体抑制遏制肿瘤细胞增殖、生长和传播的途径。值得注意的是,LILRB2由肿瘤相关巨噬细胞 (TAM) 表达,尤其是在实体肿瘤的情况下。这些巨噬细胞显示出与抑制免疫细胞浸润和有利于癌细胞增殖的功能相关的M2表型。由于LILRB2受体表达仅限于健康个体中的APC,其在肿瘤中的新表达以及其由耐受源性DC和TAM的强烈上调使LILRB2受体成为免疫治疗靶向的极好肿瘤相关抗原 (TAA)。

[0005] 然而,迄今为止,还没有能够阻断LILRB2的有效免疫治疗剂。阻断性抗LILRB2单克隆抗体 (mAb) 的生成将为新的免疫治疗铺平道路。然而,mAb的大尺寸 (约150kDa) 是一个主要缺点,因为大尺寸抑制了它们的肿瘤渗透,且因此限制了它们在实体癌中的应用,实体癌仍然是最难治疗的癌症。因此,本领域中仍然非常需要靶向此类癌症的新的和改进的药剂。

[0006] 骆驼科成员自然产生不同类别的抗体:(i) 含有两条轻链和两条重链 (约150kDa) 的常规重链抗体,(ii) 仅包括H链的同源二聚重链抗体 (HcAb; 约95kDa),以及(iii) 基于独特重链的其它IgG同型。这些仅重链抗体已证明对其抗原具有高结合亲和力和特异性,类似于传统的mAb。

[0007] 来自HcAb的重链可变域 (即单域抗体 (sdAb) 或 **Nanobodies**[®] (Nb)) 负责抗原结合和特异性,并且可以从HcAb中分离出来而不会失去其结合特性。它们的体积较小,通常约为15-20kDa,在靶向实体肿瘤时是一个重要的优势。事实上,它们应该能够更有效地穿透癌细胞周围的纤维微环境,并到达定居在这种基质中的例如巨噬细胞等靶细胞。然后,在靶向实体肿瘤和TAM上展示的LILRB2受体方面,sdAb是极好的候选者。

[0008] 本发明人现在已在开发抗LILRB2单域抗体 (sdAb) 方面对本领域作出了重大的技术贡献。

发明内容

[0009] 本发明涉及特异性结合或特异性识别白细胞免疫球蛋白样受体亚家族B成员2 (LILRB2), 优选人LILRB2的单域抗体(sdAb)。

[0010] 优选地, 所述sdAb抗LILRB2不结合白细胞免疫球蛋白样受体亚家族B成员1 (LILRB1), 优选人LILRB1。

[0011] 在一个方面, 根据本发明的sdAb包括至少一个互补决定区(CDR), 其包括SEQ ID NO: 3、6、9、12、15、18、21、24、27、30或33中所示的序列或由所述序列组成, 或包括由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO: 3、6、9、12、15、18、21、24、27、30或33不同的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

[0012] 优选地, 根据本发明的sdAb包括三个CDR, 其中:

[0013] (a) CDR1包括或具有SEQ ID NO: 1, 或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO: 1不同的氨基酸序列, 且

[0014] CDR2包括或具有SEQ ID NO: 2, 或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO: 2不同的氨基酸序列, 且

[0015] CDR3包括或具有SEQ ID NO: 3, 或具有由于一个、两个、三个或四个氨基酸修饰而与SEQ ID NO: 3不同的氨基酸序列; 或

[0016] (b) CDR1包括或具有SEQ ID NO: 4, 或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO: 4不同的氨基酸序列, 且

[0017] CDR2包括或具有SEQ ID NO: 5, 或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO: 5不同的氨基酸序列, 且

[0018] CDR3包括或具有SEQ ID NO: 6, 或具有由于一个、两个、三个或四个氨基酸修饰而与SEQ ID NO: 6不同的氨基酸序列; 或

[0019] (c) CDR1包括或具有SEQ ID NO: 7, 或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO: 7不同的氨基酸序列, 且

[0020] CDR2包括或具有SEQ ID NO: 8, 或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO: 8不同的氨基酸序列, 且

[0021] CDR3包括或具有SEQ ID NO: 9, 或具有由于一个、两个、三个或四个氨基酸修饰而与SEQ ID NO: 9不同的氨基酸序列; 或

[0022] (d) CDR1包括或具有SEQ ID NO: 10, 或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO: 10不同的氨基酸序列, 且

[0023] CDR2包括或具有SEQ ID NO: 11, 或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO: 11不同的氨基酸序列, 且

[0024] CDR3包括或具有SEQ ID NO: 12, 或具有由于一个、两个、三个或四个氨基酸修饰而与SEQ ID NO: 12不同的氨基酸序列; 或

[0025] (e) CDR1包括或具有SEQ ID NO: 13, 或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO: 13不同的氨基酸序列, 且

[0026] CDR2包括或具有SEQ ID NO: 14, 或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO: 14不同的氨基酸序列, 且

[0027] CDR3包括或具有SEQ ID NO: 15, 或具有由于一个、两个、三个或四个氨基酸修饰而

与SEQ ID NO:15不同的氨基酸序列;或

[0028] (f) CDR1包括或具有SEQ ID NO:16,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:16不同的氨基酸序列,且

[0029] CDR2包括或具有SEQ ID NO:17,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:17不同的氨基酸序列,且

[0030] CDR3包括或具有SEQ ID NO:18,或具有由于一个、两个、三个或四个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:18不同的氨基酸序列;或

[0031] (g) CDR1包括或具有SEQ ID NO:19,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:19不同的氨基酸序列,且

[0032] CDR2包括或具有SEQ ID NO:20,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:20不同的氨基酸序列,且

[0033] CDR3包括或具有SEQ ID NO:21,或具有由于一个、两个、三个或四个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:21不同的氨基酸序列;或

[0034] (h) CDR1包括或具有SEQ ID NO:22,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:22不同的氨基酸序列,且

[0035] CDR2包括或具有SEQ ID NO:23,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:23不同的氨基酸序列,且

[0036] CDR3包括或具有SEQ ID NO:24,或具有由于一个、两个、三个或四个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:24不同的氨基酸序列;或

[0037] (i) CDR1包括或具有SEQ ID NO:25,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:25不同的氨基酸序列,且

[0038] CDR2包括或具有SEQ ID NO:26,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:26不同的氨基酸序列,且

[0039] CDR3包括或具有SEQ ID NO:27,或具有由于一个、两个、三个或四个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:27不同的氨基酸序列;或

[0040] (j) CDR1包括或具有SEQ ID NO:28,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:28不同的氨基酸序列,且

[0041] CDR2包括或具有SEQ ID NO:29,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:29不同的氨基酸序列,且

[0042] CDR3包括或具有SEQ ID NO:30,或具有由于一个、两个、三个或四个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:30不同的氨基酸序列;或

[0043] (k) CDR1包括或具有SEQ ID NO:31,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:31不同的氨基酸序列,且

[0044] CDR2包括或具有SEQ ID NO:32,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:32不同的氨基酸序列,且

[0045] CDR3包括或具有SEQ ID NO:33,或具有由于一个、两个、三个或四个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:33不同的氨基酸序列。

[0046] 特别地,抗LILRB2 sdAb包括三个CDR,其中CDR1包括或具有SEQ ID NO:1,CDR2包括或具有SEQ ID NO:2,且CDR3包括或具有SEQ ID NO:3。

[0047] 在一个特定方面, sdAb抗LILRB2包括下列者或由下列者组成: 序列SEQ ID No: 34至SEQ ID No: 44中的任一个中定义的序列或与其具有至少80%序列同一性, 优选与其具有至少90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的氨基酸序列同一性的序列。

[0048] 特别地, 抗LILRB2 sdAb包括SEQ ID No: 34中定义的序列或由所述序列组成。

[0049] 优选地, 根据本发明的sdAb抗LILRB2抑制LILRB2与人白细胞抗原-G (HLA-G) 之间的相互作用和/或LILRB2与血管生成素样2 (ANGPTL2) 之间的相互作用。

[0050] 在另一方面, 本发明涉及包括编码根据本发明的sdAb抗LILRB2的序列的分离的核酸, 优选地由选自由SEQ ID: 45-55组成的组的序列定义。

[0051] 本发明还涉及包括根据本发明的分离的核酸的载体, 而且还涉及包括根据本发明的sdAb或分离的核酸的嵌合抗原受体 (CAR)。

[0052] 在一个特定方面, 本发明涉及包括根据本发明的分离的核酸或载体或表达本文公开的CAR的细胞。优选地, 所述细胞选自由以下组成的组: T细胞、CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、B细胞、NK细胞、NKT细胞、单核细胞和树突状细胞, 优选地, 所述细胞为T细胞、B细胞或NK细胞。

[0053] 本发明还涉及药物组合物, 其包含根据本发明的sdAb、分离的核酸、载体、CAR或表达CAR的细胞, 以及任选的药学上可接受的载体。

[0054] 在一个方面, 根据本发明的sdAb、分离的核酸、载体、CAR、细胞或药物组合物用于治疗癌症, 优选地其中癌症过表达LILBR2, 更优选地癌症选自由以下组成的组: 肺癌、非小细胞肺癌 (NSCLC)、胰腺癌、胰腺导管癌、慢性淋巴细胞白血病 (CLL)、急性髓细胞白血病 (AML)、子宫内膜癌、肝细胞癌、黑色素瘤、卵巢癌、乳腺癌、结直肠癌、神经胶质瘤、胃癌、肾癌、睾丸癌、食道癌、宫颈癌、小鼠路易斯肺癌、白血病、甲状腺癌、肝癌、尿路上皮癌和头颈癌。

[0055] 本发明最后涉及根据本发明的sdAb抗LILRB2在体外或离体检测肿瘤细胞或组织上的LILRB2的用途。

[0056] 附图

[0057] 图1. 羊驼免疫和VHH特异性鉴定。A) 使用rhLILRB2-Fc蛋白的羊驼免疫方案。B) 免疫羊驼的血清在不同稀释度的ELISA中进行测试。C) 使用噬菌体展示载体和生物淘选技术选择VHH, 并针对rhLILRB2-Fc进行评估。阳性抗LILRB2 VHH用实线圈出, 而阴性用虚线圈出。

[0058] 图2. B8、C7和C9 Nb识别rhLILRB2的线性表位。通过蛋白质印迹将变性的rhLILRB2-Fc (rhILT4-Fc)、rhLILRB2 (rhILT4) 和rhLILRB1 (rhILT2) 蛋白转移到膜上。A) rhLILRB2-Fc、rhLILRB2和rhLILRB1蛋白与对照抗LILRB2 Ab (H-300和42D1)、对照抗LILRB1 (GHI/75和HP-F1) 一起培育。B) rhLILRB2-Fc、rhLILRB2和rhLILRB1蛋白与B8、C7和C9 Nb一起培育。使用针对H-300的HRP标记的山羊抗大鼠抗体和针对42D1、GHI/75和HP-F1的HRP标记的山羊抗小鼠Ab以及HRP标记的小鼠抗c-Myc标记Nb来检测Ab结合。

[0059] 图3. Nb (B8、C7、C9) 与rhILT4变性 (D1-D4域) 的结合以及Nb (B8、C7、C9) 与rhILT2变性 (D1-D4) 的缺失或结合。

[0060] 图4. LILRB2转导的D1.1细胞系的Nb特异性。LILRB2 D1.1细胞系与42D1对照抗体或抗LILRB2 Nb共培育, 并通过流式细胞术进行分析。

[0061] 图5. PBMC单核细胞上LILRB2受体的Nb特异性。从PBMC中分离出单核细胞, 且接着

用42D1对照抗体和Nb针对LILRB2受体表达进行染色,与不相关的对照Nb进行比较,并通过流式细胞术进行分析。用抗CD14和抗LILRB1 Ab从其它白细胞中鉴定单核细胞。

[0062] 图6.抗LILRB2 Nb对LILRB2/HLA-G6相互作用的阻断能力。如研究设计图(右上)所示,微量滴定板在与单个Nb共培育之前涂有rhLILRB2-Fc蛋白。接着添加HLA-G6 V5标记蛋白,并使用HRP结合的抗V5 Ab进行HLA-G6-V5蛋白的检测。将值标准化为阴性对照(仅与HLA-G6-V5蛋白在不存在Nb或对照Ab的情况下一起培育的rhLILRB2-Fc) (n=3)的平均吸光度强度。

[0063] 图7.抗LILRB2 Nb对LILRB2/ANGPTL2相互作用的阻断能力。如研究设计图(右上)所示,微量滴定板在与单个Nb共培育之前涂有rhLILRB2-Fc蛋白。接着添加ANGPTL2蛋白,并使用抗ANGPTL2纯化的Ab,接着使用HRP结合的抗兔Ab进行ANGPTL2的检测。将值标准化为阴性对照(仅与ANGPTL2蛋白在不存在Nb或对照Ab的情况下一起培育的rhLILRB2-Fc (n=1)的平均吸光度强度(MFI)。

[0064] 发明详述

[0065] ■ 定义

[0066] 如本文所用,“白细胞免疫球蛋白样受体亚家族B成员2”或“LILRB2”是指白细胞免疫球蛋白样受体(LIR)家族的成员,特别是指含有两个或四个胞外免疫球蛋白域、跨膜域和两个到四个基于细胞质免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)的LIR受体亚家族B类的成员。LILRB2在免疫细胞上表达,它在免疫细胞中与抗原呈递细胞上的MHC I类分子结合并转导抑制免疫反应刺激的负信号。它被认为可以控制炎症反应和细胞毒性,以帮助聚焦免疫反应并限制自身反应性。LILRB2具有已知的替代名称,例如LIR2、CD85抗原样家族成员D、CD85D、免疫球蛋白样转录物4、ILT4、单核细胞/巨噬细胞免疫球蛋白样受体10或MIR-10。在本发明的上下文中,此术语特别是指人LILRB2。人LILRB2在本领域中是已知的,例如在UniProt登录号Q8N423下。例如,人LILRB2氨基酸序列约为598个氨基酸,所述基因位于染色体区19q13.4的簇中。人LILRB2具有四种已知的通过可变剪接产生的同种型。同种型1已被选为规范序列,并在登录号Uniprot Q8N423-1下进行了描述,同种型2与同种型1的不同之处在于位置437处的氨基酸的缺失,并在登录号Uniprot Q8N423-2下进行了描述,同种型3与同种型1的不同之处在于位置495-510和511-598处的氨基酸的缺失,并在登录号Uniprot Q8N423-3下进行了描述,异构体4与异构体1的不同之处在于位置1-116处的氨基酸的缺失,并在登录号Uniprot Q8N423-4下进行了描述。在本发明的上下文中,术语“LILRB2”包括LILRB2的所有同种型。

[0067] 如本文所用,“重链抗体”(HCAb)是指不含轻链并由两条重链组成的免疫球蛋白。每条重链包括一个恒定区(CH)和一个可变区(VH),这使得能够结合特定的抗原、表位或配体。如本文所用,HCAb包括骆驼科型重链抗体,其中每条重链包括称为VHH的可变域和两个恒定域(CH2和CH3)。值得注意的是,骆驼科HCAb缺乏第一恒定域(CH1)。此类针对特定抗原的重链抗体可以从免疫的骆驼科动物中获得。如本文所用,“骆驼科动物”包括单峰驼、骆驼、美洲驼(lama)和羊驼。Hamers-Casterman等,Nature,1993,363:446描述了骆驼科HCAb。HCAb的其它实例是来自软骨鱼类,例如护士鲨(nurse shark/Ginglymostoma cirratum)和须鲨(wobbegong shark/Orectolobus maculates)的免疫球蛋白样结构(Ig-NAR)。

[0068] 如本文所用,“单域抗体”(sdAb或Nb)是指衍生自仅重链抗体的单一可变域,其能

够单独结合抗原、表位或配体,也就是说,不需要另一个结合域。单域抗体可以衍生自VHH或V-NAR或由VHH或V-NAR组成。VHH是指在骆驼科的HCAb中发现的可变域。V-NAR是指在软骨鱼类中发现的免疫球蛋白样结构(Ig-NAR)中发现的可变域。作为替代方案,单域抗体可以从初始合成文库中获得。关于单域抗体的综述,可以参考Saerens等,Current Opinion in Pharmacology,2008,8:600-608,Muyldermans等,Vet Immunol Immunopathol.2009年3月15日;128(1-3):178-83,和/或Muyldermans 2013,Annu Rev Biochem.2013;82:775-97,其公开内容以引用方式并入。

[0069] 如本文所用,“结合(bind)”或“结合(binding)”是指识别和接触抗原的肽、多肽、蛋白质、融合蛋白和抗体(包括sdAb)。“特异性结合”或“免疫特异性结合”意指抗体识别特异性抗原,但基本上不识别也不结合样品中的其它分子或抗原。在一些情况下,术语“特异性结合”或“特异性结合”可用于指抗体、蛋白质或肽与第二化学物质的相互作用,以表示所述相互作用取决于特定结构(例如抗原决定簇或表位)的存在。如本文所用,术语“特异性结合”意指抗体与抗原之间以至少 10^{-6} 或 10^{-7} M的结合亲和力接触。在某些方面,抗体以至少约 10^{-8} M,且优选 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M、 10^{-12} M的亲和力结合。

[0070] 如本文所用,术语“特异性结合至LILRB2的sdAb”和类似术语是指特异性识别LILRB2并且不识别或弱识别其它抗原(包括LILR家族的其它成员,例如LILRB1)的sdAb。优选地,当与对其它抗原或其片段(包括其它LILR家族成员,例如LILRB1)的亲和力相比时,特异性结合至LILRB2的sdAb对此抗原具有更高的亲和力,优选至少10、100或1000倍。

[0071] 抗体或sdAb的亲和力可以衡量其在单个抗原-抗体位点处与特定抗原的结合,并且本质上是抗体的抗原结合位点与特定表位之间相互作用中存在的所有吸引力和排斥力的总和。抗体或sdAb对特定抗原(例如LILRB2)的亲和力可以用解离平衡常数K表示,由方程式 $K_d = [Ag][Ab]/[Ag-Ab]$ 定义,它表示抗体结合位点的亲和力;其中[Ag]是游离抗原的浓度(M),[Ab]是游离抗体的浓度(M),且[Ag-Ab]是抗原-抗体复合物的浓度(M)。当抗原和抗体或sdAb在一起强烈反应时,游离抗原或游离抗体或sdAb将非常少,且因此抗体或sdAb的平衡常数或亲和力将较低。

[0072] 两个氨基酸序列(A)与(B)之间的“百分比同一性”或“同一性”是通过比较窗口比较以最佳方式比对的两个序列来确定的。所述序列比对可以通过众所周知的方法进行,例如使用Needleman-Wunsch全局比对算法。蛋白质分析软件使用分配给各种取代、缺失和其它修饰,包括保守氨基酸取代的相似性量度来匹配相似序列。一旦获得总比对,便可以通过将比对的相同氨基酸残基的总数除以序列(A)与(B)之间的最长序列中所含的残基的总数来获得同一性百分比。序列同一性典型地使用序列分析软件来确定。为了比较两个氨基酸序列,可以使用“Emboss needle”工具进行蛋白质成对序列比对,所述工具由EMBL-EBI提供且可在以下网站获得:

[0073] http://www.ebi.ac.uk/Tools/services/web/toolform.ebi?tool=emboss_needle&context=protein,使用以下默认设置:(I)矩阵:BLOSUM62,(ii)空位开放:10,(iii)空位扩展:0.5,(iv)输出格式:成对,(v)端部空位罚分:错误,(vi)端部空位开放:10,(vii)端部空位扩展:0.5。

[0074] 如本文所用,“氨基酸修饰”意指多肽氨基酸序列的改变。“氨基酸修饰”在本文中也可称为“氨基酸改变”,包括氨基酸突变,例如多肽序列中的取代、插入和/或缺失。本文中

的“氨基酸取代”或“取代”意指用另一氨基酸取代亲本多肽序列中特定位置处的氨基酸。优选地,取代是沉默取代。“氨基酸插入”或“插入”意指在亲本多肽序列的特定位置处添加氨基酸。“氨基酸缺失”或“缺失”意指去除亲本多肽序列中的特定位置处的氨基酸。氨基酸取代可以是保守的。保守取代是将给定氨基酸残基替换为具有相似化学特性(例如,电荷、体积和/或疏水性)的侧链(“R-基团”)的另一个残基。一般来说,保守氨基酸取代不会显著改变蛋白质的功能特性。保守替换和相应的规则在现有技术中得到了充分描述。

[0075] 如本文所用,“亲本多肽”或“多肽亲本”是指未修饰的多肽,其随后被修饰以生成变体。在本发明的上下文中,亲本多肽可以是来自天然存在的HCAb的VHH。

[0076] 如本文所用,“变体多肽”、“多肽变体”或“变体”是指由于至少一个氨基酸修饰而与亲本多肽序列不同的多肽序列。例如,在本发明的上下文中,变体可以是来自天然存在的HCAb的VHH的变体。典型地,变体包括1至50个氨基酸修饰,优选1至40个氨基酸修饰。特别地,变体与其亲本相比可具有1至30个氨基酸改变,例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸改变。变体可以包括一个或几个氨基酸取代,和/或一个或几个氨基酸插入,和/或一个或几个氨基酸缺失。在一些实施方案中,变体可以包括一个或几个保守取代,例如如上文所示。在一些进一步的实施方案中,sdAb的变体可以在亲本sdAb的CDR域中包括一个或几个氨基酸修饰。由于CDR3通常用于定义具有相同识别模式的sdAb家族,因此CDR3中的此类修饰可能导致新的sdAb家族与亲本sdAb相比具有不同的结合特性(例如增加的结合特性),而CDR1或CDR2中的修饰可能导致定义同一家族的不同成员(即具有相同的CDR3但不同的CDR1和/或CDR2)。在一些其它实施方案中,亲本sdAb的变体可以在至少一个框架域中包括一个或几个氨基酸修饰。

[0077] 术语“治疗”是指旨在改善患者健康状况的任何行为,例如疾病或疾病症状的治疗、预防、防治和延缓。它表示疾病的治愈性治疗和/或防治性治疗两者。治愈性治疗被定义为引起治愈的治疗或减轻、改善和/或消除、减少和/或稳定疾病或疾病症状或其直接或间接引起的痛苦的治疗。防治性治疗包括引起疾病预防的治疗和减少和/或延迟疾病进展和/或疾病发生率或其发生风险的治疗。在某些实施方案中,此类术语是指疾病、病症、感染或与之相关的症状的改善或根除。在其它实施方案中,此术语是指使癌症的扩散或恶化最小化。根据本发明的治疗不一定意味着100%或完全治疗。更确切地,存在本领域普通技术人员认为具有潜在益处或治疗效果的不同程度的治疗。

[0078] 如本文所用,术语“病症”或“疾病”是指由于遗传或发育错误、感染、毒物、营养缺乏或失衡、毒性或不利环境因素的影响而导致的身体器官、部分、结构或系统功能不正常。优选地,这些术语是指健康病症或疾病,例如破坏正常身体或精神功能的病患。更优选地,术语病症是指影响动物和/或人类的免疫和/或炎症性疾病,例如癌症。

[0079] 如本文所用,术语“癌症”定义为以异常细胞快速且不受控制的生长为特征的疾病。癌细胞可以在局部或通过血流和淋巴系统扩散到身体的其它部位,例如转移。

[0080] 如本文所用,术语“受试者”、“宿主”、“个体”或“患者”是指人类和兽医受试者,特别是动物,优选哺乳动物,甚至更优选人类,包括成人和儿童。然而,术语“受试者”还包括非人类动物,特别是哺乳动物,例如狗、猫、马、牛、猪、羊和非人类灵长类动物等。

[0081] 如本文所用,“药物组合物”是指一种或多种活性剂的制剂,例如包括根据本发明的抗LILRB2抗体或sdAb的抗原结合域,以及任选的其它化学组分,例如生理上合适的载体

和赋形剂。药物或兽药组合物的目的是促进将活性剂施用于生物体。本发明的组合物可以是适用于任何常规施用或使用途径的形式。在一个实施方案中，“药物组合物”典型地是指活性剂(例如化合物或组合物)和天然存在的或非天然存在的载体的组合，所述载体是惰性的(例如，可检测的试剂或标记)或活性的，例如佐剂、稀释剂、粘合剂、稳定剂、缓冲剂、盐、亲脂性溶剂、防腐剂、佐剂等，并且包括药学上可接受的载体。

[0082] 如本文所指的“可接受的媒剂”或“可接受的载体”是本领域技术人员已知可用于配制药物组合物或兽医组合物的任何已知化合物或化合物组合。

[0083] “治疗有效量”是当施用于受试者时，为治疗目标疾病或病症或产生所需效果所需的活性剂的量。“有效量”将根据药剂、疾病和其严重程度以及待治疗受试者的年龄、体重和特征而变化。

[0084] 如本文所用，术语“药剂”是指具有针对病症和/或疾病的治疗或预防特性的任何物质或组合物。

[0085] ■ 针对LILRB2的单域抗体

[0086] 如上所述，sdAb分子对应于天然缺乏轻链的仅抗体重链的可变区。sdAb的抗原结合表面通常比常规抗体的表面更凸(或突出)，常规抗体的表面通常是平的或凹的。

[0087] 根据本发明的单域抗体包括源自能够单独结合抗原或表位(例如LILRB2)的抗体的单一可变域，也就是说，不需要另一个结合域。特别地，根据本发明的单域抗体缺乏轻链或其片段。根据本发明的sdAb分子是如下多肽：包括可从骆驼科、软骨鱼、初始文库或抗体的重可变域的工程化形式分离的仅重链抗体(HcAb)的抗原结合域，或由其组成，或基本上由其组成。优选地，sdAb源自骆驼科HcAb，优选源自羊驼HcAb。

[0088] 在一些优选的实施方案中，单域抗体选自由以下组成的组：VHH、来自Ig-NAR的V-NAR、工程化V-NAR、VHH变体，特别是人源化VHH或优化的VHH，以及其组合。

[0089] 在一个实施方案中，针对LILRB2的sdAb是优化的sdAb。优化的sdAb是指源自分离的HcAb的sdAb变体，与天然存在的sdAb相比，优化的sdAb包括一个或几个氨基酸修饰，所述修饰例如能够增加sdAb的稳定性或增加sdAb变体对LILRB2的亲合力和/或选择性。

[0090] 在另一个或进一步的实施方案中，针对LILRB2的sdAb是人源化sdAb。人源化sdAb是指与天然存在的sdAb相比包括一个或几个氨基酸修饰的sdAb变体，所述修饰能够降低其对受试者的免疫原性而不显著降低对LILRB2的亲合力。根据本发明的人源化sdAb可以通过将骆驼科或软骨鱼sdAb序列中的一个或多个氨基酸替换为其人对应物，优选如在人共同序列中发现的那样，条件是所述氨基酸修饰不会显著影响所得sdAb的抗原结合能力，也不会显著影响其特性，例如抑制LILRB2与人白细胞抗原-G(HLA-G)之间相互作用的能力。此类方法是本领域技术人员熟知的。本领域现有技术提供了可用于本发明上下文中的VHH的人源化支架的几个实例。人源化sdAb包括部分人源化sdAb和完全人源化sdAb。

[0091] 潜在有用的人源化氨基酸修饰，特别是取代，可以通过将天然存在的VHH序列的框架区序列与一个或多个密切相关的人VH序列的对应框架区序列进行比较来确定，之后可以将一个或多个如此确定的潜在有用的人源化取代(或其组合)引入所述VHH序列中(以本身已知的任何方式)，并且可以测试所得人源化VHH序列对靶标的亲合力、稳定性、表达简易性和表达水平，和/或其它所需特性。以这种方式，通过有限程度的试验和错误，本领域技术人员可以确定合适的人源化取代(或其合适的组合)。作为替代方案，本领域技术人员可以将

VHH的CDR移植到本领域现有技术中描述的VHH人源化支架内,以获得针对LILRB2的所需人源化sdAb。用于人源化sdAb的方法以及人源化sdAb支架提供于例如专利申请US 2010/0215664、W02011/117423或出版物,如Conrath等,Journal of Molecular Biology,2005,350:112-125和Vincke,Journal of Biological Chemistry,2009,284,3273-3284中。

[0092] 作为替代方案,本领域技术人员可以将CDR移植到本领域现有技术中描述的sdAb通用支架内(Saerens等,J.Mol.Biol.(2005)352,597-607),因此获得针对LILRB2的所需sdAb。本发明的sdAb可以是包括通用框架支架的VHH,例如如Saerens等中所示,并且包括至少一个CDR,优选三个如下文所定义的CDR。

[0093] 本发明的单域抗体包括至少一个,优选三个决定其结合特异性的互补决定区(CDR)。优选地,单域抗体包括几个、优选3个CDR,它们分布在框架区(FR)之间。CDR和FR优选是来自天然存在的抗体可变域的片段、变体或衍生物。CDR通常具有5至30个氨基酸的长度,并且在序列内容和结构构象上均表现出高度可变性,其参与抗原结合并提供抗原特异性。

[0094] 优选地,单域抗体包括四个框架区或“FR”,其在本领域中和本文中分别称为“框架区1”或“FR1”;“框架区2”或“FR2”;“框架区3”或“FR3”;以及“框架区4”或“FR4”。这些框架区被三个互补决定区或“CDR”中断,所述三者在本领域中分别称为“互补决定区1”或“CDR1”;“互补决定区2”或“CDR2”;和“互补决定区3”或“CDR3”。这些框架区和互补决定区优选按以下顺序可操作地连接:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4(从氨基末端到羧基末端)。

[0095] 可以通过本领域技术人员可用的任何方法来确定给定sdAb的CDR。例如,并且以非限制性方式,Chlothia或Kabat方法可用于确定CDR(Chothia等,Nature 342,877-883;Kabat等,1991,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第5版,United States Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda)。也可以使用确定CDR的替代方法,例如Chlothia与Kabat之间的中间方法,称为AbM(Oxford Molecular AbM抗体建模软件)或基于对可用复杂结构的分析的所谓“Contact”方法(Saerens等,Mol Biol.2005)或IMGT方法,例如如Lefranc等,Dev.Comp.Immunol.,2003,27:55-77(“IMGT”编号方案)中所公开。

[0096] 与传统的人抗体VH相比,sdAb的FR2区和CDR中有几个氨基酸可以被取代。例如,FR2区中高度保守的疏水氨基酸(如Val47、Gly49、Leu50和/或Trp52)经常被亲水氨基酸(Phe42、Glu49、Arg50、Gly52)取代,从而使整体结构更加亲水并有助于高稳定性、溶解性和抗聚集性。

[0097] 在一些具体实施方案中,本发明的单域抗体包括CDR3,其包括SEQ ID NO:3、6、9、12、15、18、21、24、27、30或33中所示的序列或由所述序列组成,或包括由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与3、6、9、12、15、18、21、24、27、30或33不同的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。优选地,本发明的单域抗体包括CDR3,其包括SEQ ID NO:3、6或9中所示的序列或由所述序列组成,或包括由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:3、6或9不同的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。优选地,此类氨基酸修饰不显著影响所得sdAb的抗原结合能力,也不显著影响其性质,例如抑制LILRB2与人白细胞抗原-G(HLA-G)之间相互作用的能力。优选地,此类氨基酸修饰是取代,例如沉默取代。

[0098] 在一些具体实施方案中,本发明的单域抗体包括CDR2,其包括SEQ ID NO:2、5、8、11、14、17、20、23、26、29或32中所示的序列或由所述序列组成,或具有由于一个、两个或三

个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:2、5、8、11、14、17、20、23、26、29或32不同的氨基酸序列。优选地,本发明的单域抗体包括CDR2,其包括SEQ ID NO:2、5或8中所示的序列或由所述序列组成,或包括由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:2、5或8不同的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。优选地,此类氨基酸修饰不显著影响所得sdAb的抗原结合能力,也不显著影响其性质,例如抑制LILRB2与人白细胞抗原-G(HLA-G)之间相互作用的能力。优选地,此类氨基酸修饰是取代,例如沉默取代。

[0099] 在一些具体实施方案中,本发明的单域抗体包括CDR1,其包括SEQ ID NO:1、4、7、10、13、16、19、22、25、28或31中所示的序列或由所述序列组成,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与1、4、7、10、13、16、19、22、25、28或31不同的氨基酸序列。优选地,本发明的单域抗体包括CDR1,其包括SEQ ID NO:1、4或7中所示的序列或由所述序列组成,或包括由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:1、4或7不同的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。优选地,此类氨基酸修饰不显著影响所得sdAb的抗原结合能力,也不显著影响其性质,例如抑制LILRB2与人白细胞抗原-G(HLA-G)之间相互作用的能力。优选地,此类氨基酸修饰是取代,例如沉默取代。

[0100] 在一些具体实施方案中,本发明的单域抗体包括三个CDR,其包括下列者或由下列者组成:

[0101] (a) CDR1包括或具有SEQ ID NO:1,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:1不同的氨基酸序列,且

[0102] CDR2包括或具有SEQ ID NO:2,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:2不同的氨基酸序列,且

[0103] CDR3包括或具有SEQ ID NO:3,或具有由于一个、两个、三个或四个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:3不同的氨基酸序列;或

[0104] (b) CDR1包括或具有SEQ ID NO:4,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:4不同的氨基酸序列,且

[0105] CDR2包括或具有SEQ ID NO:5,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:5不同的氨基酸序列,且

[0106] CDR3包括或具有SEQ ID NO:6,或具有由于一个、两个、三个或四个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:6不同的氨基酸序列;或

[0107] (c) CDR1包括或具有SEQ ID NO:7,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:7不同的氨基酸序列,且

[0108] CDR2包括或具有SEQ ID NO:8,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:8不同的氨基酸序列,且

[0109] CDR3包括或具有SEQ ID NO:9,或具有由于一个、两个、三个或四个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:9不同的氨基酸序列;或

[0110] (d) CDR1包括或具有SEQ ID NO:10,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:10不同的氨基酸序列,且

[0111] CDR2包括或具有SEQ ID NO:11,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:11不同的氨基酸序列,且

[0112] CDR3包括或具有SEQ ID NO:12,或具有由于一个、两个、三个或四个氨基酸修饰而

与SEQ ID NO:12不同的氨基酸序列;或

[0113] (e) CDR1包括或具有SEQ ID NO:13,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:13不同的氨基酸序列,且

[0114] CDR2包括或具有SEQ ID NO:14,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:14不同的氨基酸序列,且

[0115] CDR3包括或具有SEQ ID NO:15,或具有由于一个、两个、三个或四个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:15不同的氨基酸序列;或

[0116] (f) CDR1包括或具有SEQ ID NO:16,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:16不同的氨基酸序列,且

[0117] CDR2包括或具有SEQ ID NO:17,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:17不同的氨基酸序列,且

[0118] CDR3包括或具有SEQ ID NO:18,或具有由于一个、两个、三个或四个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:18不同的氨基酸序列;或

[0119] (g) CDR1包括或具有SEQ ID NO:19,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:19不同的氨基酸序列,且

[0120] CDR2包括或具有SEQ ID NO:20,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:20不同的氨基酸序列,且

[0121] CDR3包括或具有SEQ ID NO:21,或具有由于一个、两个、三个或四个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:21不同的氨基酸序列;或

[0122] (h) CDR1包括或具有SEQ ID NO:22,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:22不同的氨基酸序列,且

[0123] CDR2包括或具有SEQ ID NO:23,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:23不同的氨基酸序列,且

[0124] CDR3包括或具有SEQ ID NO:24,或具有由于一个、两个、三个或四个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:24不同的氨基酸序列;或

[0125] (i) CDR1包括或具有SEQ ID NO:25,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:25不同的氨基酸序列,且

[0126] CDR2包括或具有SEQ ID NO:26,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:26不同的氨基酸序列,且

[0127] CDR3包括或具有SEQ ID NO:27,或具有由于一个、两个、三个或四个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:27不同的氨基酸序列;或

[0128] (j) CDR1包括或具有SEQ ID NO:28,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:28不同的氨基酸序列,且

[0129] CDR2包括或具有SEQ ID NO:29,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:29不同的氨基酸序列,且

[0130] CDR3包括或具有SEQ ID NO:30,或具有由于一个、两个、三个或四个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:30不同的氨基酸序列;或

[0131] (k) CDR1包括或具有SEQ ID NO:31,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:31不同的氨基酸序列,且

[0132] CDR2包括或具有SEQ ID NO:32,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:32不同的氨基酸序列,且

[0133] CDR3包括或具有SEQ ID NO:33,或具有由于一个、两个、三个或四个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:33不同的氨基酸序列。

[0134] 优选地,抗LILRB2 sdAb包括三个CDR,其中:

[0135] (a) CDR1包括或具有SEQ ID NO:1,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:1不同的氨基酸序列,且

[0136] CDR2包括或具有SEQ ID NO:2,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:2不同的氨基酸序列,且

[0137] CDR3包括或具有SEQ ID NO:3,或具有由于一个、两个、三个或四个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:3不同的氨基酸序列;或

[0138] (b) CDR1包括或具有SEQ ID NO:4,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:4不同的氨基酸序列,且

[0139] CDR2包括或具有SEQ ID NO:5,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:5不同的氨基酸序列,且

[0140] CDR3包括或具有SEQ ID NO:6,或具有由于一个、两个、三个或四个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:6不同的氨基酸序列;或

[0141] (c) CDR1包括或具有SEQ ID NO:7,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:7不同的氨基酸序列,且

[0142] CDR2包括或具有SEQ ID NO:8,或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:8不同的氨基酸序列,且

[0143] CDR3包括或具有SEQ ID NO:9,或具有由于一个、两个、三个或四个氨基酸修饰而与SEQ ID NO:9不同的氨基酸序列。

[0144] 优选地,此类氨基酸修饰不显著影响所得sdAb的抗原结合能力,也不显著影响其性质,例如抑制LILRB2与人白细胞抗原-G(HLA-G)之间相互作用的能力。优选地,此类氨基酸修饰是取代,例如沉默取代。

[0145] 甚至更优选地,抗LILRB2 sdAb包括三个CDR,其中CDR1包括或具有SEQ ID NO:1或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰,优选一个、两个或三个沉默突变,甚至更优选一个、两个或三个沉默取代而与SEQ ID NO:1不同的氨基酸序列;且CDR2包括或具有SEQ ID NO:2或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰,优选一个、两个或三个沉默突变,甚至更优选一个、两个或三个沉默取代而与SEQ ID NO:2不同的氨基酸序列;且CDR3包括或具有SEQ ID NO:3或具有由于一个、两个或三个氨基酸修饰,优选一个、两个或三个沉默突变,甚至更优选一个、两个或三个沉默取代而与SEQ ID NO:3不同的氨基酸序列。

[0146] 在一些实施方案中,抗LILRB2 sdAb包括下列者或基本上由下列者组成:序列SEQ ID No:34至SEQ ID No:44中的任一个中定义的序列或与其具有至少80%序列同一性,优选与其具有至少90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的氨基酸序列同一性的序列。

[0147] 优选地,抗LILRB2 sdAb包括下列者或由下列者组成:选自由SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36组成的组的序列或与其具有至少80%序列同一性,优选与其具有

至少90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的氨基酸序列同一性的序列。

[0148] 在一个实施方案中,抗LILRB2 sdAb包括下列者或基本上由下列者组成:SEQ ID No:34中定义的序列或与其具有至少80%序列同一性,优选与其具有至少90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的氨基酸序列同一性的序列。优选地,包括与SEQ ID NO:34具有至少80%、90%、92%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更大的氨基酸序列同一性的序列或由所述序列组成的抗LILRB2 sdAb仍然能够结合LILRB2,优选以与包括SEQ ID NO:34中定义的序列或由所述序列组成的抗LILRB2 sdAb相似的亲和力,并保留相同的特性,例如抑制LILRB2与人白细胞抗原-G(HLA-G)相互作用的能力。

[0149] 在一些具体实施方案中,本发明的sdAb具有约11kDa至约18kDa,例如11kDa至17kDa,如14至16kDa或14.5至15.5kDa,如约15kDa的分子量。

[0150] 在某些方面,sdAb以至少约 10^{-6} M或 10^{-7} M,且优选至少 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M或 10^{-11} M的亲和力结合LILRB2。特别地,表观 K_d 介于0.1nM与10 μ M之间,特别是介于1 μ M与1nM之间。结合亲和力可以通过本领域技术人员可用的任何方法来测量,特别是通过表面等离子共振(SPR)。

[0151] 在一个优选的实施方案中,抗LILRB2 sdAb不识别除LILRB2之外的LILRB家族的其它成员。优选地,抗LILRB2 sdAb不识别LILRB1。或者,抗LILRB2 sdAb弱识别LILRB1。优选地,抗LILRB2 sdAb识别的LILRB1少于LILRB2,特别是少10、100或1000倍。

[0152] 在一个具体实施方案中,抗LILRB2 sdAb竞争性抑制LILRB2与人白细胞抗原-G(HLA-G)之间的相互作用或竞争性抑制人白细胞抗原-G(HLA-G)与LILRB2的结合。

[0153] 术语“竞争性抑制”表示根据本发明的sdAb可以减少或抑制或取代蛋白质、抗体或配体与LILRB2的结合,或任何蛋白质、抗体或配体与LILRB2之间的相互作用,特别是在体外、离体或在体内。竞争分析可以使用标准技术,例如竞争性ELISA或其它结合分析来进行。当sdAb抑制或取代蛋白质、抗体或配体与LILRB2结合的至少30%、40%、50%、60%、70%或80%时,它被认为是竞争性的。优选的竞争性sdAb结合的表位与LILRB2上的蛋白质、抗体或配体所识别或结合的表位具有共同的氨基酸残基。

[0154] 如本文所用,术语“HLA-G”指人白细胞抗原G,其包括至少七种同种型,其中四种是膜结合的(HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3和HLA-G4),且三种是可溶性的(HLA-G5、HLA-G6和HLA-G7)。HLA-G人同种型例如在以下Uniprot登录号下描述:针对HLA-G1的P17693-1、针对HLA-G2的P17693-2、针对HLA-G3的P17693-3、针对HLA-G4的P17693-4、针对HLA-G5的P17693-5、针对HLA-G6的P17693-6和针对HLA-G7的P17693-7。

[0155] 在一个具体实施方案中,抗LILRB2 sdAb竞争性抑制LILRB2与HLA-G6之间的相互作用或竞争性抑制HLA-G6与LILRB2的结合。

[0156] 在另一个实施方案中,根据本发明的sdAb竞争性抑制血管生成素样2(ANGPTL2)与LILRB2的结合或竞争性抑制LILRB2和ANGPTL2之间的相互作用。如本文所用,“ANGPTL2”是由于促血管生成和抗凋亡能力而在本领域中已知的血管内皮生长因子家族的成员。此术语优选指人ANGPTL2。人ANGPTL2例如在Uniprot登录号O15123下描述。

[0157] 本发明还涉及包括与至少一个分子结合的一种或多种如上文所定义的抗LILRB2 sdAb的嵌合剂(在本文中也可互换地称为“结合物”)。与sdAb结合的分子可以是例如任何可用于医学的活性化合物,例如药物、成像分子、诊断剂、示踪剂、标签或染料。除了所述活性

化合物之外或代替所述活性化合物,嵌合剂还可含有稳定基团(例如,Fc或IgG)以增加sdAb或结合物的血浆半衰期。此类嵌合剂可以通过本领域已知的任何方法,优选通过化学、生物化学或酶途径,或通过基因工程,使用sdAb与分子之间的偶联来制备。

[0158] 在一个具体实施方案中,本发明的抗LILRB2 sdAb可以融合或结合至标记物质,例如选自以下的分子或蛋白:酶,例如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶;荧光蛋白,例如GFP;荧光标记,例如荧光素罗丹明;标记;化学发光标记或生物发光标记,例如鲁米那(luminal);发色团;放射性同位素,例如适用于体内、离体或体外成像或诊断。

[0159] 在另一具体实施方案中,根据本发明的sdAb包括在CAR构建体中。如本文所用,术语“嵌合抗原受体”(CAR)、“工程化细胞受体”或“嵌合免疫受体”(ICR)是指工程化受体,其将抗原结合特异性移植到免疫细胞上,从而组合抗原结合域的抗原结合特性与免疫细胞的免疫原性活性,如T细胞的裂解能力和自我更新。特别地,CAR是指融合蛋白,其包括任意的信号肽、能够结合抗原的胞外域、跨膜域、任意的铰链域和至少一个胞内域。在一个优选的实施方案中,CAR包括如本文所公开的抗LILRB2 sdAb作为胞外域或抗原结合域、跨膜域、任意的铰链域和至少一个胞内域。

[0160] ■核酸、载体和宿主细胞

[0161] 本发明的另一方面涉及编码如上文所定义的sdAb的分离的核酸构建体或多肽构建体。核酸可以是单股或双股的或两者的混合物。核酸可以是DNA(cDNA或gDNA)、RNA或其混合物。它可以包括修饰的核苷酸,例如包括修饰的键、修饰的嘌呤或嘧啶碱基或修饰的糖。它可以通过本领域技术人员已知的任何方法制备,包括化学合成、重组和/或诱变。

[0162] 根据本发明的核酸可以从根据本发明的sdAb分子的氨基酸序列中推导出来,并且密码子使用可以根据在其中核酸应被转录的宿主细胞进行调整。这些步骤可以根据本领域技术人员熟知的方法进行,其中一些方法描述于参考手册Sambrook等(Sambrook J, Russell D(2001)Molecular cloning:a laboratory manual,第三版Cold Spring Harbor)中。此类核酸序列的具体实例包括含有SEQ ID NO:61-75中任一个的序列,以及与其互补的序列。

[0163] 本发明还涉及含有此类分离的核酸的载体,任选地在调节序列(例如启动子、终止子等)的控制下。载体可以是例如质粒、病毒、粘粒、噬菌粒或人工染色体。

[0164] 本发明进一步涉及根据本发明的核酸或载体在转化、转染或转导宿主细胞中的用途。

[0165] 因此,本发明还提供包括一种或几种本发明的核酸和/或一种或几种本发明的载体和/或一种或几种编码本发明的sdAb的多肽的宿主细胞。

[0166] 宿主细胞可以是能够表达或产生本发明的sdAb的任何宿主细胞,包括例如原核宿主细胞,例如大肠杆菌,或(培养的)哺乳动物、植物、昆虫、真菌或酵母宿主细胞,包括例如CHO-细胞、BHK-细胞、人类细胞系(包括HeLa、COS和PER C6)、Sf9细胞和Sf+细胞。合适的宿主细胞包括真核微生物,如酵母和丝状真菌的细胞。优选的酵母宿主细胞包括酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*)和乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)。术语“宿主细胞”还包括由于复制期间发生的突变而与亲本宿主细胞不同的亲本宿主细胞的任何后代。优选地,所述细胞不是人胚胎干细胞。

[0167] 本发明的另一个目标是产生根据本发明的sdAb的方法,其中所述方法包括以下步骤:

[0168] a) 培养如先前所定义的宿主细胞,和

[0169] b) 从细胞培养物中回收编码如上文所定义的sdAb的所述核酸、载体或多肽。

[0170] 不言而喻,步骤a)在允许宿主细胞表达所需核酸、载体或多肽的条件下进行。合适的表达条件可以包括使用合适的培养基、合适的食物来源和/或合适的养分的存在、合适的温度和任选地合适的诱导因子或化合物的存在(例如当本发明的核苷酸序列受诱导型启动子控制时);所有这些都可以通过本领域技术人员选择。

[0171] 在此类条件下,本发明的sdAb可以组成型方式、以瞬时方式或仅在适当诱导时表达。

[0172] 然后可以使用本身已知的蛋白质分离和/或纯化技术,例如色谱和/或电泳技术、差异沉淀技术、亲和技术等从宿主细胞和/或从培养所述宿主细胞的培养基中分离本发明的sdAb。sdAb还可以包括标签,例如组氨酸或链霉亲和素标签,用于纯化目的。

[0173] 本发明还提供一种获得如本文所定义的针对LILRB2的sdAb的方法。根据本发明的用于获得和/或选择sdAb的方法可以基于蛋白质选择技术,例如但不限于细胞展示、噬菌体展示、核糖体展示、mRNA展示、DNA展示或质粒展示。这些技术充分描述于现有技术中。例如,为了生成在噬菌体上展示的VHH文库,技术人员可以参考Muydermans等, *Molecular Biotechnology*, 2001, 74, 277-302, 特别是标题为Recombinant VHH的部分,所述文献的公开内容以引用方式并入本文中。为了生成在噬菌体上展示的V-NAR文库,技术人员可以参考Dooley等, *Mol Immunol*, 2003, 40:25-30。在某些实施方案中,本发明的方法可以包括一个或几个步骤,从而能够选择功能性sdAb,特别是能够识别LILRB2或竞争性抑制LILRB2与HLA-G之间的相互作用和/或竞争性抑制LILRB2与ANGPTL2之间的相互作用的sdAb。

[0174] 在一个具体实施方案中,包括根据本发明的sdAb的CAR由细胞表达。所述细胞可以是原核细胞或真核细胞。优选地,所述细胞是真核细胞,例如哺乳动物细胞。优选地,表达包括根据本发明的sdAb的CAR的细胞是免疫细胞。细胞可以选自巨噬细胞、T细胞、B细胞、NK细胞、NKT、单核细胞和树突状细胞。优选地,所述细胞不是人胚胎干细胞。

[0175] ■ 药物组合物

[0176] 本发明还涉及一种药物组合物,其特征在于它包含至少一种如上文所定义的sdAb、CAR或细胞和任选的一种或多种药学上可接受的赋形剂。

[0177] 本发明的药物组合物可以根据标准方法配制,例如在Remington: *The Science and Practice of Pharmacy* (Lippincott Williams&Wilkins;第二十一版,2005)中描述的那些方法。可使用的药学上可接受的赋形剂尤其描述于 *Handbook of Pharmaceuticals Excipients*, American Pharmaceutical Association (Pharmaceutical Press;第6次修订版,2009)中。

[0178] 在一个方面,本发明的组合物有利地包含药学上可接受的载体或赋形剂。药学上可接受的载体可以选自根据每种施用方式经典使用的载体,例如(a) 填充剂或稀释剂,例如淀粉、乳糖、蔗糖、葡萄糖、甘露醇、微晶纤维素和硅胶;(b) 粘合剂,例如羧甲基纤维素、明胶、聚乙烯吡咯烷酮、蔗糖;(c) 保湿剂,例如甘油;(d) 崩解剂,例如琼脂、碳酸钙、马铃薯或木薯淀粉、海藻酸、某些复合硅酸盐、交联羧甲基纤维素钠和碳酸钠;(e) 溶液缓凝剂,例如

石蜡；(f) 吸收促进剂，例如季铵化合物；(g) 润湿剂，例如单硬脂酸甘油酯；(h) 吸附剂，例如高岭土和膨润土；(i) 润滑剂，例如滑石、硬脂酸钙、硬脂酸镁、固体聚乙二醇、十二烷基硫酸钠；(j) 抗氧化剂；(k) 缓冲剂，例如柠檬酸钠或磷酸钠；(l) 防腐剂；(m) 香料和香精等。

[0179] 本发明的药物组合物可以通过将具有适当纯度的本发明的sdAb、CAR、细胞或多肽与至少一种如上所述的常规赋形剂(或载体)混合而获得。具体地，本发明的sdAb、CAR、细胞或多肽是组合物的活性成分。

[0180] 不言而喻，待与活性成分组合的赋形剂可随以下因素变化：(i) 所述活性成分的物理化学性质，包括稳定性，(ii) 所述活性成分所需的药物动力学特征，(iii) 盖仑剂型(galenic form)和(iv) 施用途径。

[0181] 药物组合物典型地包含有效剂量的本发明的sdAb、CAR或细胞。如本文所述的“治疗有效剂量”是指对给定病况和施用方案产生治疗效果的剂量。活性物质的“治疗有效剂量”不一定治愈疾病或病症，但会为这种疾病或病症提供治疗，从而延迟、阻碍或预防其出现，或减轻其症状，或改变其期限或减轻其严重程度，或加速患者康复。

[0182] 本发明的药物组合物可以配制成适合通过任何常规途径施用，包括通过肠内途径(即口服)，例如以片剂、胶囊剂的形式，通过肠胃外、肌内、透皮、静脉内途径，例如以可注射溶液或悬浮液形式，以及通过局部途径，例如以凝胶、软膏、凝胶、洗剂、贴剂、栓剂等形式。

[0183] 在一些具体实施方案中，药物组合物可以是冻干物或冻干粉末，其可以在即将施用于受试者之前溶解在合适的媒剂中。

[0184] 本发明还涉及一种诊断组合物，其特征在于它包含如上文所定义的sdAb或sdAb诊断或医学显像剂结合物化合物。

[0185] ■ 根据本发明的用途

[0186] 根据本发明的sdAb、CAR、细胞、组合物和构建体(即分离的核酸、多肽和/或载体)可用于各种领域，包括生物学研究、生化工业或医学。

[0187] 特别地，本发明的sdAb、CAR、细胞、组合物和构建体在患有或怀疑患有癌症的受试者中得到应用，特别是用于在这些受试者中减小肿瘤的大小或防止肿瘤的生长或再生长或防止免疫抑制微环境的诱导。

[0188] 在一个实施方案中，待治疗的受试者是非人类动物，特别是哺乳动物，例如狗、猫、马、牛、猪、羊和非人类灵长类动物。或者，待治疗的受试者可以是人，具体来说任何年龄的人，包括儿童、青少年或成人。

[0189] 特别地，受试者患有涉及LILBR2表达，特别是LILBR2过表达的疾病。在一个实施方案中，受试者患有癌症、炎性病症，例如由细菌、病毒或真菌引起的传染病，或患有自身免疫疾病。

[0190] 优选地，受试者患有癌症，甚至更优选地患有LILBR2阳性癌症。例如，可以通过检查此类受试者是否携带LILBR2阳性细胞，特别是LILBR2阳性癌细胞，优选此类过表达LILBR2的细胞来鉴定适合治疗疾病，例如癌症的受试者。下文更具体地描述疾病和癌症的实例。

[0191] 本发明的另一个目标是根据本发明的sdAb、CAR、细胞、多肽构建体或药物组合物，用于治疗涉及LILBR2受体的病症或疾病，优选例如癌症，和/或用作药剂或疫苗。因此，本文描述了在有需要的受试者中抑制肿瘤生长或转移扩散和/或在有需要的患者中治疗癌症的

方法。肿瘤可以是实体肿瘤或液体肿瘤,优选实体肿瘤。在一些实施方案中,肿瘤或癌症表达或过表达LILRB2。

[0192] 在某些实施方案中,这些方法包括下列者,或可选地基本上由下列者组成,或进一步由下列者组成:向受试者或患者施用治疗有效量的本发明的sdAb、CAR、细胞、组合物和构建体。在另一方面,受试者先前已通过诊断选择用于治疗,优选评估肿瘤是否表达或过表达LILRB2。

[0193] 由于人LILRB2是治疗疾病或病症,特别是例如癌症的相关靶标,因此抗LILRB2 sdAb可用作药物、药剂或疫苗。根据本发明的sdAb、CAR、细胞或多肽构建体可以用作药剂或疫苗,或用于制造治疗受试者的疾病、病症或病况的药剂或疫苗。在一些实施方案中,此类药物或疫苗可用于治疗癌症。

[0194] 在一个实施方案中,本发明的sdAb、CAR、细胞、组合物和构建体用于治疗可以通过抑制HLA和/或ANGPTL2与LILRB2的结合来预防或治疗的病理、疾病和/或病症。因此,本发明涉及治疗可以通过抑制HLA和/或ANGPTL2与LILRB2的结合来预防或治疗的病理、疾病和/或病症的方法。

[0195] 本发明还涉及治疗患有涉及LILRB2受体的病症或疾病的受试者的方法,其中所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的根据本发明的sdAb、CAR、细胞、构建体或药物组合物。

[0196] 在一个具体实施方案中,疾病或病症是癌症,优选实体肿瘤,甚至更优选地选自由以下组成的组:肺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、胰腺癌、胰腺导管癌、慢性淋巴细胞白血病(CLL)、急性髓细胞白血病(AML)、子宫内膜癌、肝细胞癌、黑色素瘤、卵巢癌、乳腺癌、结直肠癌、神经胶质瘤、胃癌、肾癌、睾丸癌、食道癌、宫颈癌、小鼠路易斯肺癌、白血病、甲状腺癌、肝癌、尿路上皮癌和头颈癌。

[0197] 因此,本发明还涉及在有需要的受试者中抑制肿瘤生长和/或抑制转移生长和/或扩散的方法。肿瘤可以是实体肿瘤或液体肿瘤。在一些实施方案中,肿瘤或癌症表达或过表达LILRB2。

[0198] 本文所述的sdAb、CAR、细胞或药物组合物可以与其它治疗剂同时或相继施用,包括例如小分子、放射疗法、化学疗法、手术,特别是抗癌剂。“抗癌”剂能够对受试者的癌症产生负面影响,例如,通过杀死癌细胞、诱导癌细胞凋亡、降低癌细胞的生长速率、降低转移的发生率或数量、减小肿瘤大小,抑制肿瘤生长、减少对肿瘤或癌细胞的血液供应、促进针对癌细胞或肿瘤的免疫反应、预防或抑制癌症的进展或增加患有癌症的受试者的寿命。更一般地,这些其它组合物可以有效杀死细胞或抑制细胞增殖的组合量提供。

[0199] 医学领域普通技术人员已知的常规方法可用于将本文公开的sdAb、组合物、构建体或CAR施用于受试者,其取决于待治疗的疾病类型或疾病部位。此组合物可以通过常规途径施用,例如肠胃外施用(例如通过静脉内、皮下、皮内或肌肉内途径),或通过经口、经鼻或经肺途径。

[0200] 用于诊断和预后

[0201] 单域抗体可用作纯化LILRB2的配体。它们也可以用作结晶伴侣以促进LILRB2受体的结晶。

[0202] 本发明的sdAb和多肽也可用于细胞免疫染色、体内或体外成像以及用于诊断目

的。本发明还涉及如上文所述的sdAb、结合物或组合物,用于诊断、成像或治疗表达LILRB2,优选过表达LILRB2的细胞,例如癌细胞。

[0203] 它们还可以用作体外分析中的生物试剂,例如用于鉴定、筛选或表征靶向LILRB2受体的潜在药物的测试化合物或竞争性结合剂。

[0204] 本文公开的抗LILRB2 sdAb可以诊断方式用于监测组织或细胞中的LILRB2表达水平,作为体外或离体以及体内临床测试程序的一部分,例如,以确定给定治疗方案的功效。

[0205] 本发明的检测方法可用于在体外或离体以及在体内检测生物样品中LILRB2的表达水平,例如在器官或组织活检后,以测试细胞是否为癌性的。用于通过本发明的sdAb检测LILRB2的体外或离体技术包括酶联免疫吸附分析(ELISA)、RIA、EIA和其它“夹心分析”、蛋白质印迹、流式细胞术、免疫沉淀、放射免疫分析和免疫荧光(例如IHC)。此外,用于检测LILRB2多肽的体内技术包括将标记的抗LILRB2 sdAb引入受试者体内。在通过本发明的sdAb检测LILRB2的体内技术中,sdAb可以用放射性标记来标记,所述放射性标记在受试者中的存在和位置可以通过标准成像技术检测。

[0206] 本发明还提供诊断、预后或预测分析,用于确定受试者是否有患上与增加的LILRB2表达或活性相关的医学疾病或病况的风险(例如,检测过表达LILRB2的癌前细胞或癌细胞)。此类分析可用于预后或预测目的,从而在以LILBR2表达或过表达为特征或与LILBR2表达或过表达相关的医学疾病或病况发作之前预防性治疗个体。

[0207] 本发明还提供诊断预后或预测分析方法,其中根据本发明的sdAb用于选择适合用抗LILRB2 sdAb治疗的受试者,例如其中LILRB2是用于选择患者的生物标记,其中LILRB2在细胞,如肿瘤细胞中过表达。

[0208] ■ 试剂盒

[0209] 本文所述的任何sdAb、组合物、CAR、细胞、载体、多肽或核酸构建体均可包括于本发明提供的试剂盒中。

[0210] 在某些实施方案中,试剂盒包括例如合适的容器构件、细胞、缓冲液、细胞培养基、载体、引物、限制酶、盐等。试剂盒还可以包括用于容纳无菌、药学上可接受的缓冲液和/或其它稀释剂的构件。

[0211] 在一些实施方案中,可在试剂盒中提供从个体采集样品和/或分析样品的构件。

[0212] 在一些实施方案中,试剂盒进一步包括用于治疗癌症或传染病的额外药剂,并且所述额外药剂可以与本发明的试剂盒的sdAb、组合物、CAR、细胞、载体、多肽或核酸构建体或其它组分组合或可以在试剂盒中单独提供。

[0213] 在本发明的一些情况下,试剂盒还包括第二癌症疗法,例如化学疗法和/或其它免疫疗法。试剂盒可针对特定癌症,例如表达或过表达LILRB2的癌症进行定制。

[0214] 容器可以是单位剂量、散装包装(例如多剂量包装)或亚单位剂量。在一个实施方案中,本发明涉及如上定义的用于单剂量施用单元的试剂盒。本发明的试剂盒还可含有包括干燥/冻干双功能分子的第一容器和包括水性配制物的第二容器。在本发明的某些实施方案中,提供了含有单腔和多腔预填充注射器(例如,液体注射器和冻干注射器)的试剂盒。本发明的试剂盒采用合适的包装。合适的包装包括但不限于小瓶、瓶子、罐子、软包装(例如密封的聚酯薄膜(Mylar)或塑料袋)等。

[0215] 与本文所述的sdAb、组合物、CAR、细胞、载体、多肽或核酸构建体的使用相关的说

说明书通常包括关于剂量、给药方案、用于预期治疗的施用途径或用于复原或稀释此类组分的方法的信息。本发明的试剂盒中提供的说明书典型地是标签或包装插页(例如,以传单或说明手册的形式包括在试剂盒中的纸页)上的书面说明书。在一些实施方案中,所述试剂盒可以包括根据本文所述的任何方法的使用说明书。所包括的说明书可以包括对本文所述的sdAb、组合物、CAR、细胞、载体、多肽或核酸构建体的施用的描述,特别是在治疗如本文所述的疾病,例如癌症的背景下。试剂盒可进一步包括基于鉴定个体是否患有与LILRB2相关的疾病(例如本文所述的那些疾病)来选择适合治疗的个体的描述。

[0216] 在考虑以下实施例后,本发明的其它方面和优点将变得显而易见,所述实施例仅为说明性的,并且不限制本申请的范围。

实施例

[0217] LILRB2-Fc特异性VHH的鉴定。

[0218] 羊驼首先用含LILRB2-Fc蛋白的完全弗氏佐剂免疫,且随后用含LILRB2-Fc蛋白的不完全弗氏佐剂加强免疫两次。从羊驼血清中分离出常规抗体亚类(即IgG1)和VHH。将血清连续稀释并通过ELISA对LILRB2-Fc蛋白进行测试。然后,从羊驼中纯化B淋巴细胞,且得到含有 $3.5 \cdot 10^7$ 个克隆的文库。使用针对LILRB2-Fc的展示进行生物淘选,且对所选VHH进行预血浆(PE)-ELISA。测试了400个菌落,且鉴定了130个针对LILRB2的阳性克隆,它们以实线圈出,而阴性克隆以虚线圈出(图1)。对所有阳性克隆进行测序,且生成并纯化12个独特的VHH序列。

[0219] B8、C7和C9识别rhLILRB2的线性表位。

[0220] 本发明人首先研究了生成的Nb是否对LILRB2受体具有特异性,而对LILRB1受体没有任何交叉反应性。为此,在还原条件下进行蛋白质印迹。纯化的二聚体rhLILRB2-Fc、单体rhLILRB2和单体rhLILRB1蛋白用于比较不同Nb的抗原特异性。针对对照抗体H-300(对LILRB1、-2、-4、-5、-6具有特异性)、42D1(对LILRB2具有特异性)、GHI/75(对LILRB1具有特异性)和HP-F1(对LILRB1具有特异性)评估Nb特异性。用H-300多克隆抗体(对LILRB1、-2、-4、-5和-6蛋白具有特异性)标记的膜显示约105kDa和在77kDa处的条带,分别对应于rhLILRB2-Fc和rhLILRB2的大小(图2)。与42D1单克隆抗体(对LILRB2-Fc受体具有特异性)一起培育的膜在105kDa处显示与rhLILRB2-Fc大小对应的独特条带,且在77kDa处没有条带,表明42D1 mAb不识别rhLILRB2。与GHI/75和HP-F1单克隆抗体一起培育的膜显示84kDa处的条带,对应于rhLILRB1的大小。在15个Nb中,只有B8、C7和C9显示与rhLILRB2-Fc的分子量对应的约105kDa的条带(图3),以及与rhLILRB2的D1和D2域的分子量对应的约77kDa的条带。此外,与B8和C7 Nb一起培育未显示84kDa附近的任何条带。这意味着B8和C7 Nb不与rhLILRB1结合。然而,C9 Nb在84kDa附近显示出一个弱条带,表明C9特异性不完全限于rhLILRB2受体。总之,这些数据表明,Nb能够识别变性二聚体LILRB2-Fc(D1-D2-Fc)蛋白,所述蛋白是用于诱导Nb的免疫原,以及变性单体LILRB2(D1-D2-D3-D4域)蛋白。对于蛋白质印迹实验,使用c-Myc《 $.9E10$ 》纯(E-Bioscience, Ref 14-6784-82)抗体。

[0221] Nb对LILRB2转导的D1.1细胞系上的LILRB2受体的特异性。

[0222] 然后,发明人试图确定获得的Nb是否能够与构象LILRB2受体结合。他们评估了15个Nb对构象LILRB2受体的结合特异性。为此,发明人评估了Nb对由Invectys生成的LILRB2-

D1.1转导细胞系的特异性。为此,将LILRB2-D1.1细胞系与Nb一起培育,并与42D1对照Ab进行比较。如图4所示,62.6%的LILRB2-D1.1细胞被42D1对照Ab标记。有趣的是,93.2%、76.4%和75.2%的LILRB2-D1.1细胞系分别被B8、C9和C7 Nb标记(图7),而不到40%的LILRB2-D1.1细胞系被其它Nb,例如A2标记(数据未显示)。发明人假设B8、C7和C9识别的表位比42D1对照抗体和其它Nb的表位更容易接近。对于流式细胞术,使用了针对Myc标签-藻红蛋白(Abcam,Ref:ab72468)的小鼠单克隆抗体[9E10]。

[0223] Nb对单核细胞表达的LILRB2受体的特异性

[0224] 单核细胞在其表面强烈表达单体或二聚体LILRB2受体,且为研究巨噬细胞LILRB2表达的相关模型。因此,发明人评估了抗LILRB2Nb对从健康供体PBMC纯化的单核细胞的特异性。单核细胞通过用抗CD14、抗LILRB1 Ab和抗LILRB2 Nb标记进行表型。38%的单核细胞对42D1对照Ab呈阳性,且5%对不相关的Nb(例如,在羊驼中针对非ILT4抗原产生的Nb)呈阳性。使用抗LILRB2 Nb,超过50%的单核细胞被标记:A2 Nb为68.3%,B8 Nb为50.8%,C7 Nb为62%,C9 Nb为58.1%,D8 Nb为53.5%,G3 Nb为57%且G10 Nb为46.7%(图5)。然而,单核细胞对D12、F5和H12 Nb呈阴性(数据未显示)。总之,本发明人确定B8、C7和C9 Nb对单体或二聚体LILRB2受体内的线性表位均具有很强的特异性。相比于Nb,对照Ab 42D1的LILRB2表位对体外LILRB2-D1.1生成的细胞系或离体单核细胞的可接近性可能更难。42D1单克隆抗体的这种弱结合可能与不影响抗LILRB2 Nb,尤其是B8、C7和C9 Nb的空间位阻有关。

[0225] Nb抗LILRB2抑制LILRB2/HLA-G相互作用。

[0226] LILRB2受体与HLA-G和ANGPTL2相互作用以分别抑制免疫细胞反应和诱导肿瘤发展。然后,本发明人研究了抗LILRB2是否能够阻断这些相互作用以恢复免疫细胞功能并防止肿瘤生长。为了研究LILRB2/HLA-G相互作用的抑制,本发明人首先设计了ELISA分析来评估Nb的阻断能力。为此,将rhLILRB2-Fc蛋白涂布在微量滴定板上,然后在存在或不存在Nb的情况下与HLA-G6蛋白共培育。已证明rh-LILRB2-Fc受体对可溶性HLA-G6同种型具有很强的亲和力。如图6所示,同型对照单克隆抗体干扰HLA-G6/LILRB2相互作用(24%阻断)以及未报道为阻断的H-300多克隆抗体(26%阻断)。然而,抗LILRB2单克隆阻断抗体27D6强烈消除了HLA-G6与LILRB2受体之间的相互作用(100%阻断)。关于抗LILRB2 Nb,本发明人确定7个Nb(A2、C7、C9、D8、E7、F5和G10)弱抑制相互作用(<30%),3个Nb显示部分抑制:D12(44.8%)、G3(39.4%)和H12(50%),而B8 Nb完全抑制HLA-G6/LILRB2相互作用(100%阻断)。

[0227] B8 Nb部分抑制LILRB2/ANGPTL2相互作用

[0228] 已证明LILRB2/ANGPTL2相互作用促进肿瘤发展。事实上,癌细胞表达的LILRB2受体与自分泌表达的ANGPTL2蛋白之间的相互作用导致肿瘤增殖、肿瘤凋亡抑制和肿瘤细胞分化。为了确定抗LILRB2 Nb是否能够阻断这种相互作用,本发明人建立了ELISA来评估rhLILRB2-Fc与ANGPTL2蛋白之间的相互作用。如前所述,将rhLILRB2-Fc蛋白涂布在微量滴定板上,然后在存在或不存在抗LILRB2抗体或Nb的情况下与rhANGPTL2共培育。一些Nb部分阻断了LILRB2/ANGPTL2相互作用(<24%结合抑制)(数据未显示)。与不含Nb的对照相比,B8 Nb强烈阻断了这种相互作用(51.4%结合抑制),而A2、H12和G10显示出弱阻断(分别为24%、20%和8%)(图7)。

- [0001] 序列表
- [0002] <110> Invectys
- [0003] <120> 针对LILRB2的单域抗体
- [0004] <130> B3095PC00
- [0005] <160> 55
- [0006] <170> PatentIn version 3.5
- [0007] <210> 1
- [0008] <211> 8
- [0009] <212> PRT
- [0010] <213> 人工(artificial)
- [0011] <220>
- [0012] <223> ILT4-B8 CDR1
- [0013] <400> 1
- [0014] Gly Phe Thr Leu Asp Tyr Tyr Ala
- [0015] 1 5
- [0016] <210> 2
- [0017] <211> 8
- [0018] <212> PRT
- [0019] <213> 人工(artificial)
- [0020] <220>
- [0021] <223> ILT4-B8 CDR2
- [0022] <400> 2
- [0023] Ile Gly Asn Ser Gly Asp Ser Thr
- [0024] 1 5
- [0025] <210> 3
- [0026] <211> 27
- [0027] <212> PRT
- [0028] <213> 人工(artificial)
- [0029] <220>
- [0030] <223> ILT4-B8 CDR3
- [0031] <400> 3
- [0032] Ala Ala Arg Lys Gly Phe Ala Ser Ser Cys His Gly Leu Gly Ala Ala
- [0033] 1 5 10 15
- [0034] Tyr Asp Ser Asp Tyr Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr
- [0035] 20 25
- [0036] <210> 4
- [0037] <211> 8
- [0038] <212> PRT

- [0039] <213> 人工(artificial)
[0040] <220>
[0041] <223> ILT4-C7 CDR1
[0042] <400> 4
[0043] Gly Phe Ala Leu Glu His Tyr Ser
[0044] 1 5
[0045] <210> 5
[0046] <211> 8
[0047] <212> PRT
[0048] <213> 人工(artificial)
[0049] <220>
[0050] <223> ILT4-C7 CDR2
[0051] <400> 5
[0052] Ile Ser Asn Ser Gly His Thr Thr
[0053] 1 5
[0054] <210> 6
[0055] <211> 16
[0056] <212> PRT
[0057] <213> 人工(artificial)
[0058] <220>
[0059] <223> ILT4-C7 CDR3
[0060] <400> 6
[0061] Ala Ala Thr Pro Arg Gly Trp Gly Leu Thr Ser Asn Gln Tyr Glu Tyr
[0062] 1 5 10 15
[0063] <210> 7
[0064] <211> 8
[0065] <212> PRT
[0066] <213> 人工(artificial)
[0067] <220>
[0068] <223> ILT4-C9 CDR1
[0069] <400> 7
[0070] Gly Arg Thr Leu Asn Gly Tyr Thr
[0071] 1 5
[0072] <210> 8
[0073] <211> 8
[0074] <212> PRT
[0075] <213> 人工(artificial)
[0076] <220>
[0077] <223> ILT4-C9 CDR2

[0078] <400> 8
[0079] Ile Arg Ala Ile Asp Gly Ser Thr
[0080] 1 5
[0081] <210> 9
[0082] <211> 19
[0083] <212> PRT
[0084] <213> 人工(artificial)
[0085] <220>
[0086] <223> ILT4-C9 CDR3
[0087] <400> 9
[0088] Ala Ala Arg Leu Arg Val Ser Asn Gly Asn Ala Trp Ser Ser Ser Ser
[0089] 1 5 10 15
[0090] Tyr Leu His
[0091] <210> 10
[0092] <211> 8
[0093] <212> PRT
[0094] <213> 人工(artificial)
[0095] <220>
[0096] <223> ILT4-A2 CDR1
[0097] <400> 10
[0098] Gly Phe Asn Val Asn Ala Tyr His
[0099] 1 5
[0100] <210> 11
[0101] <211> 7
[0102] <212> PRT
[0103] <213> 人工(artificial)
[0104] <220>
[0105] <223> ILT4-A2 CDR2
[0106] <400> 11
[0107] Ile Ser Ser Asp His Ser Thr
[0108] 1 5
[0109] <210> 12
[0110] <211> 16
[0111] <212> PRT
[0112] <213> 人工(artificial)
[0113] <220>
[0114] <223> ILT4-A2 CDR3
[0115] <400> 12
[0116] Ala Ala Thr Ala Asn Gln Leu Trp Gln Val Trp Met Gly Ile Thr Ser

| | | | | |
|--------|---|---|----|----|
| [0117] | 1 | 5 | 10 | 15 |
| [0118] | <210> 13 | | | |
| [0119] | <211> 8 | | | |
| [0120] | <212> PRT | | | |
| [0121] | <213> 人工(artificial) | | | |
| [0122] | <220> | | | |
| [0123] | <223> ILT4-D8 CDR1 | | | |
| [0124] | <400> 13 | | | |
| [0125] | Gly Leu Thr Ser Arg Pro Tyr Tyr | | | |
| [0126] | 1 | 5 | | |
| [0127] | <210> 14 | | | |
| [0128] | <211> 8 | | | |
| [0129] | <212> PRT | | | |
| [0130] | <213> 人工(artificial) | | | |
| [0131] | <220> | | | |
| [0132] | <223> ILT4-D8 CDR2 | | | |
| [0133] | <400> 14 | | | |
| [0134] | Ile Ser Ser Arg Glu Gly Ser Thr | | | |
| [0135] | 1 | 5 | | |
| [0136] | <210> 15 | | | |
| [0137] | <211> 16 | | | |
| [0138] | <212> PRT | | | |
| [0139] | <213> 人工(artificial) | | | |
| [0140] | <220> | | | |
| [0141] | <223> ILT4-D8 CDR3 | | | |
| [0142] | <400> 15 | | | |
| [0143] | Ala Gly Arg Tyr Ser Thr Cys Ser Gly Met Ala Arg Asp Tyr Asn Tyr | | | |
| [0144] | 1 | 5 | 10 | 15 |
| [0145] | <210> 16 | | | |
| [0146] | <211> 8 | | | |
| [0147] | <212> PRT | | | |
| [0148] | <213> 人工(artificial) | | | |
| [0149] | <220> | | | |
| [0150] | <223> ILT4-D12 CDR1 | | | |
| [0151] | <400> 16 | | | |
| [0152] | Gly Phe Thr Leu Asp His Tyr Ala | | | |
| [0153] | 1 | 5 | | |
| [0154] | <210> 17 | | | |
| [0155] | <211> 8 | | | |

[0156] <212> PRT
[0157] <213> 人工(artificial)
[0158] <220>
[0159] <223> ILT4-D12 CDR2
[0160] <400> 17
[0161] Ile Asn Val Asn Arg Gly Thr Ser
[0162] 1 5
[0163] <210> 18
[0164] <211> 23
[0165] <212> PRT
[0166] <213> 人工(artificial)
[0167] <220>
[0168] <223> ILT4-D12 CDR3
[0169] <400> 18
[0170] Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Gly Asp Val Cys Asp Asp Val Asn
[0171] 1 5 10 15
[0172] Gln Asn Tyr Gly Met Asp Tyr
[0173] 20
[0174] <210> 19
[0175] <211> 8
[0176] <212> PRT
[0177] <213> 人工(artificial)
[0178] <220>
[0179] <223> ILT4-E7 CDR1
[0180] <400> 19
[0181] Gly Ser Thr Ser Arg His Tyr Tyr
[0182] 1 5
[0183] <210> 20
[0184] <211> 8
[0185] <212> PRT
[0186] <213> 人工(artificial)
[0187] <220>
[0188] <223> ILT4-E7 CDR2
[0189] <400> 20
[0190] Ile Thr Ser Arg Glu Gly Ser Thr
[0191] 1 5
[0192] <210> 21
[0193] <211> 16
[0194] <212> PRT

[0234] <400> 25
 [0235] Gly Phe Thr Ser Arg His Tyr Tyr
 [0236] 1 5
 [0237] <210> 26
 [0238] <211> 8
 [0239] <212> PRT
 [0240] <213> 人工(artificial)
 [0241] <220>
 [0242] <223> ILT4-G3 CDR2
 [0243] <400> 26
 [0244] Ile Ser Ser Arg Glu Gly Ser Thr
 [0245] 1 5
 [0246] <210> 27
 [0247] <211> 16
 [0248] <212> PRT
 [0249] <213> 人工(artificial)
 [0250] <220>
 [0251] <223> ILT4-G3 CDR3
 [0252] <400> 27
 [0253] Ala Gly Arg Tyr Ser Ser Cys Ser Gly Met Pro Arg Asp Tyr Asn Tyr
 [0254] 1 5 10 15
 [0255] <210> 28
 [0256] <211> 8
 [0257] <212> PRT
 [0258] <213> 人工(artificial)
 [0259] <220>
 [0260] <223> ILT4-G10 CDR1
 [0261] <400> 28
 [0262] Gly Phe Thr Phe Phe Ala Tyr Thr
 [0263] 1 5
 [0264] <210> 29
 [0265] <211> 8
 [0266] <212> PRT
 [0267] <213> 人工(artificial)
 [0268] <220>
 [0269] <223> ILT4-G10 CDR2
 [0270] <400> 29
 [0271] Ile Asp Trp Thr Gly Ser Ser Ser
 [0272] 1 5

[0273] <210> 30
 [0274] <211> 20
 [0275] <212> PRT
 [0276] <213> 人工(artificial)
 [0277] <220>
 [0278] <223> ILT4-G10 CDR3
 [0279] <400> 30
 [0280] Ala Thr Leu Cys Ser Leu Leu Leu Arg Val Ala Arg Pro Ile Ile Ala
 [0281] 1 5 10 15
 [0282] Asp Gly Gly Val
 [0283] 20
 [0284] <210> 31
 [0285] <211> 8
 [0286] <212> PRT
 [0287] <213> 人工(artificial)
 [0288] <220>
 [0289] <223> ILT4-H12 CDR1
 [0290] <400> 31
 [0291] Gly Phe Thr Leu Asp Ser Tyr Ala
 [0292] 1 5
 [0293] <210> 32
 [0294] <211> 8
 [0295] <212> PRT
 [0296] <213> 人工(artificial)
 [0297] <220>
 [0298] <223> ILT4-H12 CDR2
 [0299] <400> 32
 [0300] Ile Ser Ser Ser Gly Gly Ser Thr
 [0301] 1 5
 [0302] <210> 33
 [0303] <211> 21
 [0304] <212> PRT
 [0305] <213> 人工(artificial)
 [0306] <220>
 [0307] <223> ILT4-H12 CDR3
 [0308] <400> 33
 [0309] Ala Ala Leu Arg Glu Gly Ser Tyr Tyr Pro Asp Asp Asp Ala Cys Arg
 [0310] 1 5 10 15
 [0311] Asp Gly Met Asp Tyr

[0312] 20
 [0313] <210> 34
 [0314] <211> 134
 [0315] <212> PRT
 [0316] <213> 人工(artificial)
 [0317] <220>
 [0318] <223> >ILT4-B8
 [0319] <400> 34
 [0320] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0321] 1 5 10 15
 [0322] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Tyr Tyr
 [0323] 20 25 30
 [0324] Ala Ile Ser Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 [0325] 35 40 45
 [0326] Ser Cys Ile Gly Asn Ser Gly Asp Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 [0327] 50 55 60
 [0328] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
 [0329] 65 70 75 80
 [0330] Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Glu Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0331] 85 90 95
 [0332] Ala Ala Arg Lys Gly Phe Ala Ser Ser Cys His Gly Leu Gly Ala Ala
 [0333] 100 105 110
 [0334] Tyr Asp Ser Asp Tyr Glu Ser Leu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 [0335] 115 120 125
 [0336] Gln Val Thr Val Ser Ser
 [0337] 130
 [0338] <210> 35
 [0339] <211> 125
 [0340] <212> PRT
 [0341] <213> 人工(artificial)
 [0342] <220>
 [0343] <223> >ILT4-C7
 [0344] <400> 35
 [0345] Met Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 [0346] 1 5 10 15
 [0347] Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Leu Glu
 [0348] 20 25 30
 [0349] His Tyr Ser Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu
 [0350] 35 40 45

| | |
|--------|---|
| [0351] | Gly Val Ser Cys Ile Ser Asn Ser Gly His Thr Thr Lys Tyr Ala Asp |
| [0352] | 50 55 60 |
| [0353] | Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr |
| [0354] | 65 70 75 80 |
| [0355] | Val Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr |
| [0356] | 85 90 95 |
| [0357] | Tyr Cys Ala Ala Thr Pro Arg Gly Trp Gly Leu Thr Ser Asn Gln Tyr |
| [0358] | 100 105 110 |
| [0359] | Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser |
| [0360] | 115 120 125 |
| [0361] | <210> 36 |
| [0362] | <211> 126 |
| [0363] | <212> PRT |
| [0364] | <213> 人工(artificial) |
| [0365] | <220> |
| [0366] | <223> >ILT4-C9 |
| [0367] | <400> 36 |
| [0368] | Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly |
| [0369] | 1 5 10 15 |
| [0370] | Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Leu Asn Gly Tyr |
| [0371] | 20 25 30 |
| [0372] | Thr Thr Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val |
| [0373] | 35 40 45 |
| [0374] | Ala Thr Ile Arg Ala Ile Asp Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val |
| [0375] | 50 55 60 |
| [0376] | Met Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr |
| [0377] | 65 70 75 80 |
| [0378] | Leu Glu Met Asn Arg Leu Lys Pro Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Tyr Cys |
| [0379] | 85 90 95 |
| [0380] | Ala Ala Arg Leu Arg Val Ser Asn Gly Asn Ala Trp Ser Ser Ser Ser |
| [0381] | 100 105 110 |
| [0382] | Tyr Leu His Trp Gly Arg Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser |
| [0383] | 115 120 125 |
| [0384] | <210> 37 |
| [0385] | <211> 120 |
| [0386] | <212> PRT |
| [0387] | <213> 人工(artificial) |
| [0388] | <220> |
| [0389] | <223> ILT4-A2 |

[0390] <400> 37
 [0391] Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0392] 1 5 10 15
 [0393] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Val Asn Ala Tyr
 [0394] 20 25 30
 [0395] His Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 [0396] 35 40 45
 [0397] Ser Phe Ile Ser Ser Asp His Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 [0398] 50 55 60
 [0399] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Gly Thr Val Tyr Leu Gln Met
 [0400] 65 70 75 80
 [0401] Asn Arg Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Ala Thr
 [0402] 85 90 95
 [0403] Ala Asn Gln Leu Trp Gln Val Trp Met Gly Ile Thr Ser Trp Gly Gln
 [0404] 100 105 110
 [0405] Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 [0406] 115 120
 [0407] <210> 38
 [0408] <211> 123
 [0409] <212> PRT
 [0410] <213> 人工(artificial)
 [0411] <220>
 [0412] <223> >ILT4-D8
 [0413] <400> 38
 [0414] Gln Leu Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0415] 1 5 10 15
 [0416] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Ser Arg Pro Tyr
 [0417] 20 25 30
 [0418] Tyr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ser Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
 [0419] 35 40 45
 [0420] Ser Cys Ile Ser Ser Arg Glu Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 [0421] 50 55 60
 [0422] Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln Ser Met Phe Tyr
 [0423] 65 70 75 80
 [0424] Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0425] 85 90 95
 [0426] Ala Gly Arg Tyr Ser Thr Cys Ser Gly Met Ala Arg Asp Tyr Asn Tyr
 [0427] 100 105 110
 [0428] Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

| | | | |
|--------|---|-----|----------|
| [0429] | 115 | 120 | |
| [0430] | <210> 39 | | |
| [0431] | <211> 130 | | |
| [0432] | <212> PRT | | |
| [0433] | <213> 人工(artificial) | | |
| [0434] | <220> | | |
| [0435] | <223> > ILT4-D12 | | |
| [0436] | <400> 39 | | |
| [0437] | Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly | | |
| [0438] | 1 | 5 | 10 15 |
| [0439] | Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp His Tyr | | |
| [0440] | | 20 | 25 30 |
| [0441] | Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Glu Lys Arg Glu Gly Val | | |
| [0442] | | 35 | 40 45 |
| [0443] | Ser Cys Ile Asn Val Asn Arg Gly Thr Ser Ala Tyr Ala Asp Ser Val | | |
| [0444] | | 50 | 55 60 |
| [0445] | Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr | | |
| [0446] | | 65 | 70 75 80 |
| [0447] | Leu Gln Met Asp Asn Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys | | |
| [0448] | | 85 | 90 95 |
| [0449] | Ala Ala Leu Leu Glu Gly Ala Ser Gly Asp Val Cys Asp Asp Val Asn | | |
| [0450] | | 100 | 105 110 |
| [0451] | Gln Asn Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val | | |
| [0452] | | 115 | 120 125 |
| [0453] | Ser Ser | | |
| [0454] | 130 | | |
| [0455] | <210> 40 | | |
| [0456] | <211> 123 | | |
| [0457] | <212> PRT | | |
| [0458] | <213> 人工(artificial) | | |
| [0459] | <220> | | |
| [0460] | <223> > ILT4-E7 | | |
| [0461] | <400> 40 | | |
| [0462] | Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly | | |
| [0463] | 1 | 5 | 10 15 |
| [0464] | Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Ser Arg His Tyr | | |
| [0465] | | 20 | 25 30 |
| [0466] | Tyr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val | | |
| [0467] | | 35 | 40 45 |

[0468] Ser Cys Ile Thr Ser Arg Glu Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 [0469] 50 55 60
 [0470] Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Gln Asn Met Phe Tyr
 [0471] 65 70 75 80
 [0472] Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0473] 85 90 95
 [0474] Ala Ala Arg Tyr Ser Ser Cys Ser Gly Met Pro Ser Asp Tyr Asn Tyr
 [0475] 100 105 110
 [0476] Trp Gly Arg Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 [0477] 115 120
 [0478] <210> 41
 [0479] <211> 122
 [0480] <212> PRT
 [0481] <213> 人工(artificial)
 [0482] <220>
 [0483] <223> > ILT4-F5
 [0484] <400> 41
 [0485] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0486] 1 5 10 15
 [0487] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Val Asn Ala Tyr
 [0488] 20 25 30
 [0489] His Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Glu Glu Arg Glu Gly Val
 [0490] 35 40 45
 [0491] Ser Phe Ile Ser Ser Asp Arg Glu Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 [0492] 50 55 60
 [0493] Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
 [0494] 65 70 75 80
 [0495] Gln Met Asn Arg Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 [0496] 85 90 95
 [0497] Ala Thr Ala Asn Gln Leu Trp Arg Leu Trp Met Gly Ile Ser Ser Trp
 [0498] 100 105 110
 [0499] Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 [0500] 115 120
 [0501] <210> 42
 [0502] <211> 123
 [0503] <212> PRT
 [0504] <213> 人工(artificial)
 [0505] <220>
 [0506] <223> > ILT4-G3

[0507] <400> 42
 [0508] Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 [0509] 1 5 10 15
 [0510] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ser Arg His Tyr
 [0511] 20 25 30
 [0512] Tyr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ser Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Leu
 [0513] 35 40 45
 [0514] Ser Cys Ile Ser Ser Arg Glu Gly Ser Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 [0515] 50 55 60
 [0516] Gln Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Gln Asn Met Phe Tyr
 [0517] 65 70 75 80
 [0518] Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0519] 85 90 95
 [0520] Ala Gly Arg Tyr Ser Ser Cys Ser Gly Met Pro Arg Asp Tyr Asn Tyr
 [0521] 100 105 110
 [0522] Trp Gly Arg Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
 [0523] 115 120
 [0524] <210> 43
 [0525] <211> 127
 [0526] <212> PRT
 [0527] <213> 人工(artificial)
 [0528] <220>
 [0529] <223> >ILT4-G10
 [0530] <400> 43
 [0531] Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val His Pro Gly Gly
 [0532] 1 5 10 15
 [0533] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Phe Ala Tyr
 [0534] 20 25 30
 [0535] Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Val Leu
 [0536] 35 40 45
 [0537] Ser Gly Ile Asp Trp Thr Gly Ser Ser Ser Asn Tyr Ala Asp Ser Val
 [0538] 50 55 60
 [0539] Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg His Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 [0540] 65 70 75 80
 [0541] Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0542] 85 90 95
 [0543] Ala Thr Leu Cys Ser Leu Leu Leu Arg Val Ala Arg Pro Ile Ile Ala
 [0544] 100 105 110
 [0545] Asp Gly Gly Val Trp Ser Gln Val Thr Gln Val Thr Val Ser Ser

| | | | |
|--------|---|-----|-----|
| [0546] | 115 | 120 | 125 |
| [0547] | <210> 44 | | |
| [0548] | <211> 128 | | |
| [0549] | <212> PRT | | |
| [0550] | <213> 人工(artificial) | | |
| [0551] | <220> | | |
| [0552] | <223> >ILT4-H12 | | |
| [0553] | <400> 44 | | |
| [0554] | Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly | | |
| [0555] | 1 5 10 15 | | |
| [0556] | Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Ser Tyr | | |
| [0557] | 20 25 30 | | |
| [0558] | Ala Val Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val | | |
| [0559] | 35 40 45 | | |
| [0560] | Ser Cys Ile Ser Ser Ser Gly Gly Ser Thr His Tyr Ala Asp Ser Val | | |
| [0561] | 50 55 60 | | |
| [0562] | Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr | | |
| [0563] | 65 70 75 80 | | |
| [0564] | Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ser Tyr Tyr Cys | | |
| [0565] | 85 90 95 | | |
| [0566] | Ala Ala Leu Arg Glu Gly Ser Tyr Tyr Pro Asp Asp Asp Ala Cys Arg | | |
| [0567] | 100 105 110 | | |
| [0568] | Asp Gly Met Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser | | |
| [0569] | 115 120 125 | | |
| [0570] | <210> 45 | | |
| [0571] | <211> 402 | | |
| [0572] | <212> DNA | | |
| [0573] | <213> 人工(artificial) | | |
| [0574] | <220> | | |
| [0575] | <223> >ILT4-B8 | | |
| [0576] | <400> 45 | | |
| [0577] | gaggtgcagc tggttgagtc ggggggaggt ttggtgcagc ctggggggtc tctgagactc 60 | | |
| [0578] | tcctgtgtag cctctggatt cactttggat tattatgcca taagctggtt ccgccgggcc 120 | | |
| [0579] | ccaggggaagg agcgtgaggg tgtctcatgt attggttaata gtggtgatag cacaaactat 180 | | |
| [0580] | gcagactccg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacggtttat 240 | | |
| [0581] | ctgcaaatga acagcctgaa acctgaggaa acagccgtttt attactgcgc agcgcgaaaa 300 | | |
| [0582] | gggttcgcta gttcctgtca cggcctcggg gctgcatacg atagtacta tgaatcgttg 360 | | |
| [0583] | tatgactact ggggccaggg gaccaggtc accgtctcct ca 402 | | |
| [0584] | <210> 46 | | |

[0585] <211> 370
 [0586] <212> DNA
 [0587] <213> 人工(artificial)
 [0588] <220>
 [0589] <223> >ILT4-C7
 [0590] <400> 46
 [0591] tcaggtgcag ctcgtggagt cggggggagg cttggtgcag cctgggggggt ctctgagact 60
 [0592] ctctgtgca gcctctggat tcgctttgga acattattcc ataggctggt tccgccaggc 120
 [0593] cccaggaag gagcgtgagg ggttctcatg tattagtaat agtgggcata ccacaaagta 180
 [0594] tgcagactcc gtgaagggcc gattcacctg ctccagagac aacgccaaga acacggtgta 240
 [0595] tctgcaaatg aacagcctga agcctgagga cacagccgtt tattactgtg cagcgacacc 300
 [0596] aaggggttgg ggctaactg cgaatcagta tgaatactgg ggccagggga cccaggtcac 360
 [0597] cgtctcatca 370
 [0598] <210> 47
 [0599] <211> 378
 [0600] <212> DNA
 [0601] <213> 人工(artificial)
 [0602] <220>
 [0603] <223> >ILT4-C9
 [0604] <400> 47
 [0605] gaggtgcagc tggtagagtc tgggggagga ttggtgcagg ctgggggctc tctgagactc 60
 [0606] tcctgtgcag cctctggacg caccctcaat ggttatacca ctggctgggt cccgccaggct 120
 [0607] ccaggaagg agcgcgagtt tgtagccact attcgcgcga ttgatggtag cacatcctat 180
 [0608] gcagactccg tgatgggccg attcaccatc tccagagaca acgccaataa tacgctctat 240
 [0609] cttgaaatga acagactgaa acctgaggac tcggccctgt attattgtgc ggcgcggtc 300
 [0610] agagtgcagc atggtaacgc atggtcatca tctagctatc tccactgggg ccgggggacc 360
 [0611] caggtcaccc tctcctca 378
 [0612] <210> 48
 [0613] <211> 361
 [0614] <212> DNA
 [0615] <213> 人工(artificial)
 [0616] <220>
 [0617] <223> ILT4-A2
 [0618] <400> 48
 [0619] tcagttgcag ctcgtggagt ctgggggagg cttggtgcag cctgggggggt ctctgagact 60
 [0620] ctctgtgca gcctctggat tcaactgaa tgcttatcac ataggctggt tccgccaggc 120
 [0621] cccaggaag gagcgtgagg ggttctcatt cattagtagt gatcatagca caaactatgc 180
 [0622] agactccgtg aaggacgat tcaccatctc cagagacagc ggtacggtgt atctgcaaat 240
 [0623] gaacagactg aaacctgagg acacagccac ttactattgt gcagcaaccg ccaatcaact 300

[0624] gtggcaagta tggatgggca ttacgtcctg gggccagggg acccagggtca cegtctcctc 360
 [0625] g 361
 [0626] <210> 49
 [0627] <211> 370
 [0628] <212> DNA
 [0629] <213> 人工(artificial)
 [0630] <220>
 [0631] <223> >ILT4-D8
 [0632] <400> 49
 [0633] tcagttgcag ctctgtggagt cggggggagg cttggtgcag cctgggggggt ctctgagact 60
 [0634] ctctgtgcag gcctctggat tgacttcgcg cccttattac ataggttggt ttcgccagtc 120
 [0635] cccaggggaag gagcgtgagg gagtctcatg tattagtagt aggggaaggta gcacaaacta 180
 [0636] cgcagactcc gtgaaggatc gattcaccat ctccagagat aacgctcaga gtatgtttta 240
 [0637] tctgcaaatg aacagcctga aatctgagga cacagccggt tattactgtg caggacgtta 300
 [0638] ttcgacatgt tcaggaatgg cccgcgatta taactactgg ggtcagggga cccaggtcac 360
 [0639] cgtctcctca 370
 [0640] <210> 50
 [0641] <211> 390
 [0642] <212> DNA
 [0643] <213> 人工(artificial)
 [0644] <220>
 [0645] <223> > ILT4-D12
 [0646] <400> 50
 [0647] gaggtgcagc tggtagagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctgggggggtc tctgaaactc 60
 [0648] tcctgtgcag cctctggatt cactttggat cattatgcca taggctgggt cccagggcc 120
 [0649] ccaggcgaaa agcgtgaagg cgtctcatgt attaatgtta atcgtgggtac ctccgcctat 180
 [0650] gcagactccg tgaagggccg ttccaccatc tcgcgagaca acgccaagaa cacgggtgtat 240
 [0651] ctgcaaattg acaacctgag acctgaggac acagccgttt attactgtgc agccctactc 300
 [0652] gagggggcct caggcgatgt gtgtgatgac gtcaatcaaa actacggcat ggactactgg 360
 [0653] ggcaaaggga ccctggtcac cgtctcctca 390
 [0654] <210> 51
 [0655] <211> 369
 [0656] <212> DNA
 [0657] <213> 人工(artificial)
 [0658] <220>
 [0659] <223> > ILT4-E7
 [0660] <400> 51
 [0661] gaggtgcagc tggttgagtc ggggggaggc ttggtgcagc ctgggggggtc tctgagactc 60
 [0662] tcctgtgcag cctctggatc gacttcgcgc cattattaca taggctgggt cccagggcc 120

[0663] ccaggaaagg agcgtgaagg tgtctcatgt attactagta gggaaggtag cacaaactac 180
 [0664] gcagactccg tgaaggaccg attcaccatc tccagagaca acgctcagaa tatgttttat 240
 [0665] ttgcaaatga acagcctgaa atctgaggac acagccgttt attactgtgc agcacgttat 300
 [0666] tcgagttggt caggaatgcc ctcagattat aactactggg gtcgggggac ccaggtcacc 360
 [0667] gtctcctca 369
 [0668] <210> 52
 [0669] <211> 366
 [0670] <212> DNA
 [0671] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0672] <220>
 [0673] <223> > ILT4-F5
 [0674] <400> 52
 [0675] gaggtgcagc tggtagagtc ggggggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgagactc 60
 [0676] tcctgtgcag cctctggatt caacgtgaat gcttatcaca taggctgggt ccgccaggcc 120
 [0677] ccaggagagg agcgtgaagg ggtctcattc attagtagtg atcgtgagac aaactatgca 180
 [0678] gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacagcg ccaagaacac ggtgtatctg 240
 [0679] caaatgaaca gactgaaacc tgaggacaca gccgtttatt actgtgcagc aaccgccaat 300
 [0680] caactgtggc gactatggat gggcattagt tcctggggcc aggggaccca ggtcaccgtc 360
 [0681] tcctca 366
 [0682] <210> 53
 [0683] <211> 369
 [0684] <212> DNA
 [0685] <213> 人工(artificial)
 [0686] <220>
 [0687] <223> > ILT4-G3
 [0688] <400> 53
 [0689] gaggtgcagc tggtagagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgagactc 60
 [0690] tcctgtgcag cctctggatt cacttcgcgc cattattaca taggttggt tcgccagtcc 120
 [0691] ccagggaagg agcgtgaggg gctctcatgt attagtagta gggaaggtag cacaaactac 180
 [0692] gcagactccg tacaggaccg attcaccatc tccagagaca acactcagaa tatgttttat 240
 [0693] ttgcaaatga acagcctgaa atctgaggac acagccgttt attactgtgc aggacgttat 300
 [0694] tcgagttggt caggaatgcc ccgggattat aactactggg gtcgggggac ccaggtcacc 360
 [0695] gtctcctca 369
 [0696] <210> 54
 [0697] <211> 381
 [0698] <212> DNA
 [0699] <213> 人工(artificial)
 [0700] <220>
 [0701] <223> >ILT4-G10

[0702] <400> 54
[0703] caggtgcagc tcgtggagtc cgggggaggc ttggtgcacc ctggggggtc tctgagactc 60
[0704] tcctgtgcag cctctggatt cacttttttt gcgtatacca tgggctggtt ccgccaggct 120
[0705] ccaggaagg agcgtgaggt tctctcaggt attgactgga cgggagtag ctcaaactat 180
[0706] gcagactccg tgaggggccc attcaccatc tccagacaca acgccaagaa tacgctgtat 240
[0707] ctacaaatga acagcctgaa acctgacgac acggccgtgt attactgtgc gacactttgt 300
[0708] tctctactgt tacgggtcgc gcggccaatt attgctgatg ggggagtttg gagccagggtg 360
[0709] acccaggtea ccgtctcctc a 381
[0710] <210> 55
[0711] <211> 384
[0712] <212> DNA
[0713] <213> 人工 (artificial)
[0714] <220>
[0715] <223> >ILT4-H12
[0716] <400> 55
[0717] gaggtgcagc tggttagagtc tgggggaggc ttggtgcagc ctggggggtc tctgagactc 60
[0718] tcctgtgcag cctctggatt cactttggat tcatatgccg taggctggtt ccgccaggcc 120
[0719] ccaggaagg agcgtgaggg agtctcatgt attagtagta gtggtggtag cacacactat 180
[0720] gcagactccg tgaagggccc attcaccatc tccagagaca acgccaagaa cacggtgtat 240
[0721] ctgcaaata gaagcctgaa acctgaggac acagccagtt attactgtgc agcacttcgc 300
[0722] gaaggttctt actatcccga cgatgacgcg tgctgtgacg gcatggacta ctggggcaaa 360
[0723] gggaccagg tcaccgtctc ctca 384

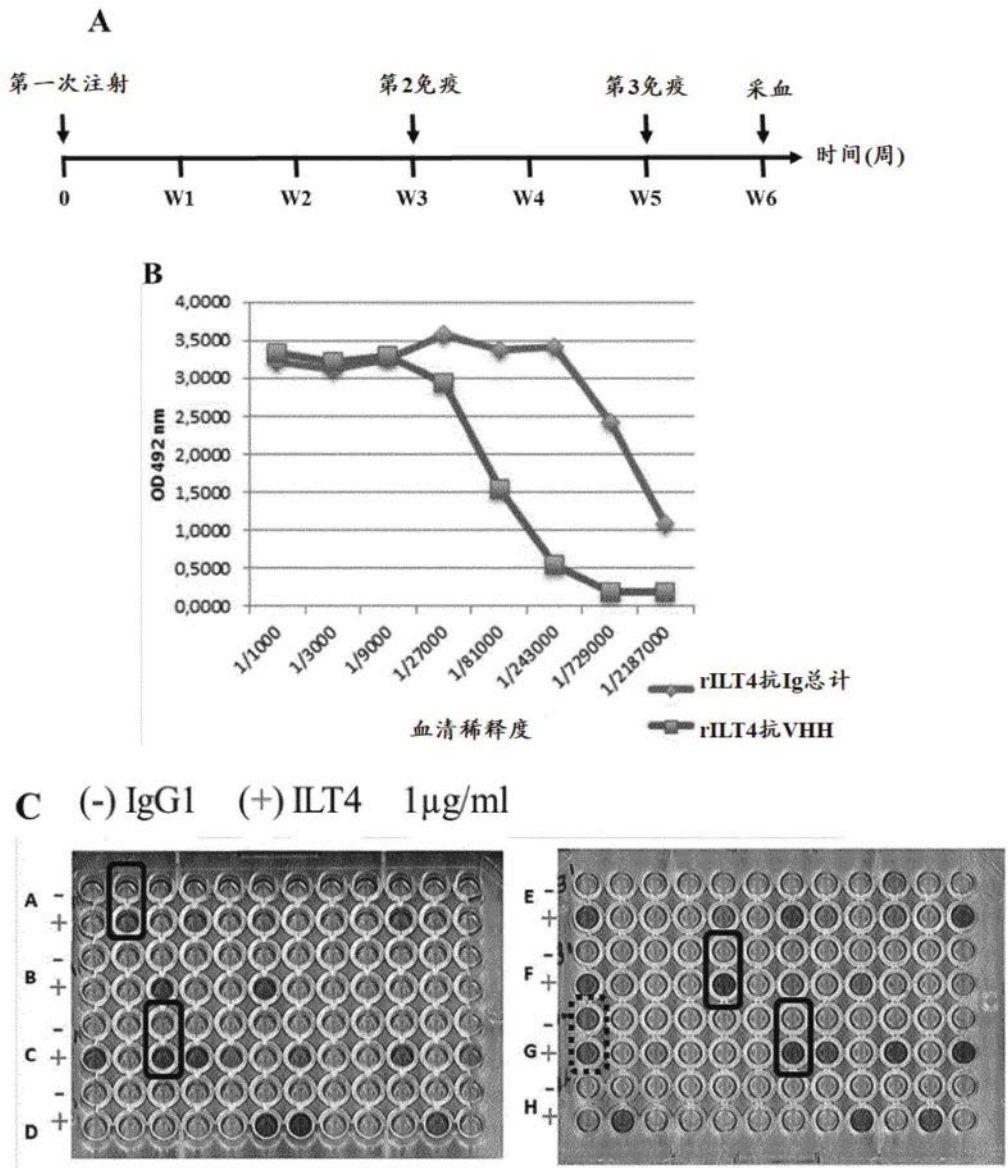
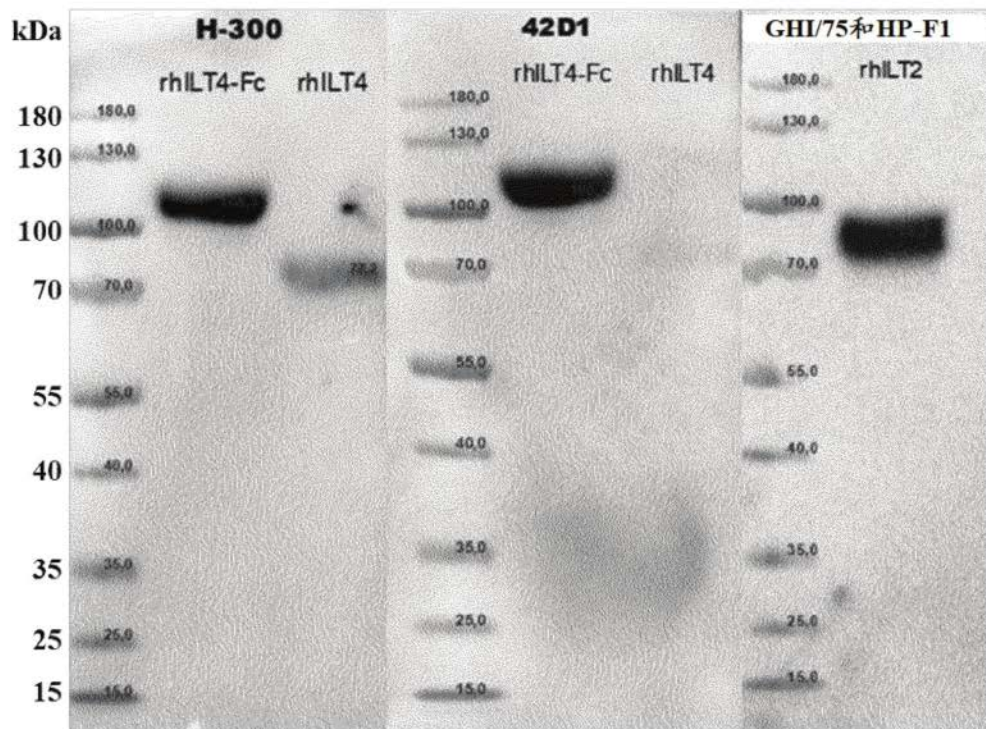


图1

A



B

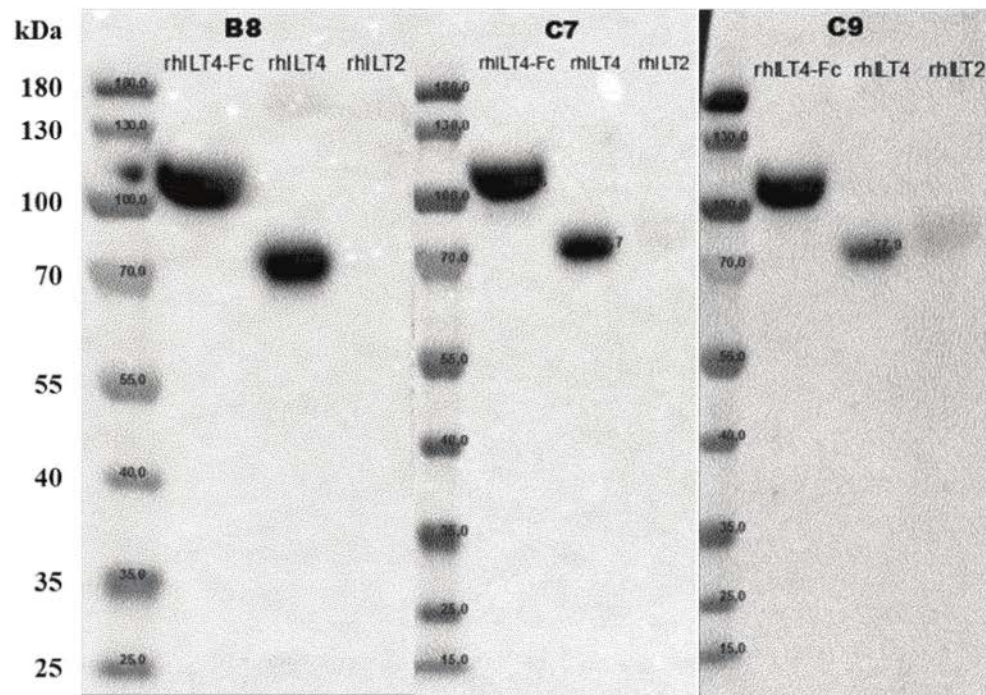


图2

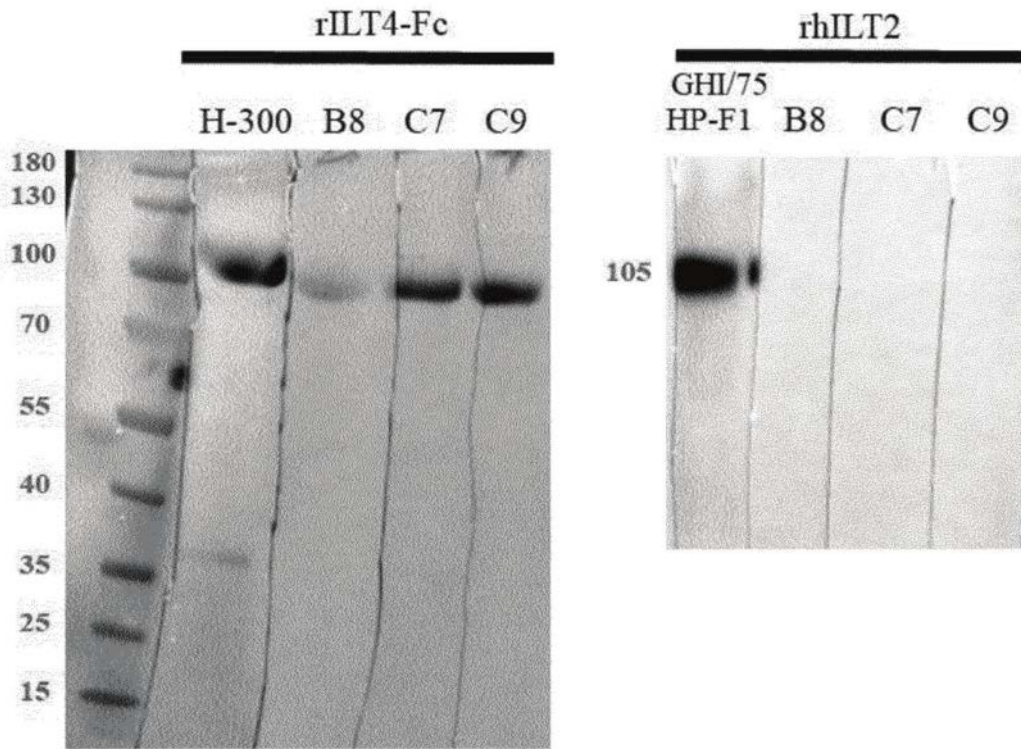


图3

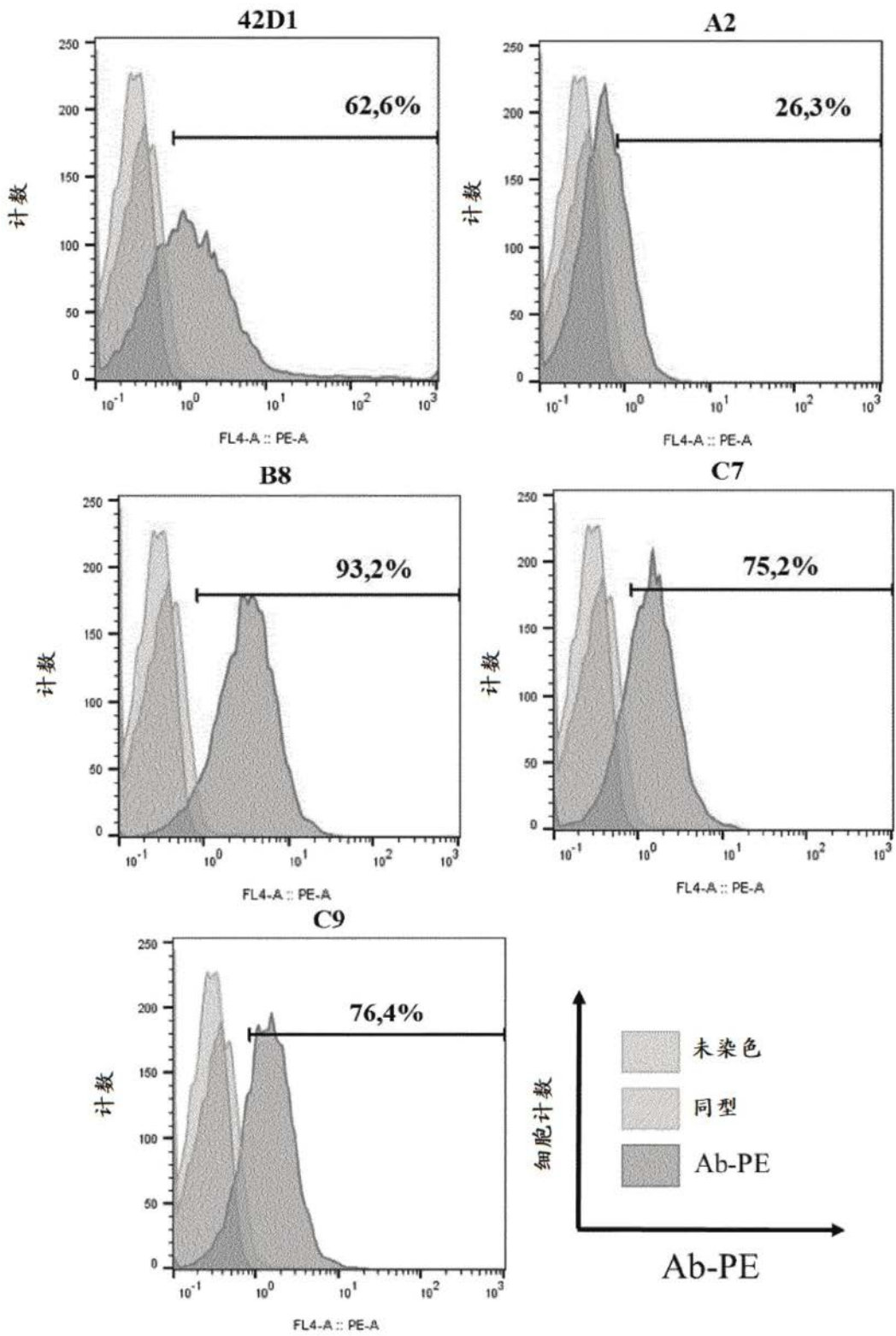


图4

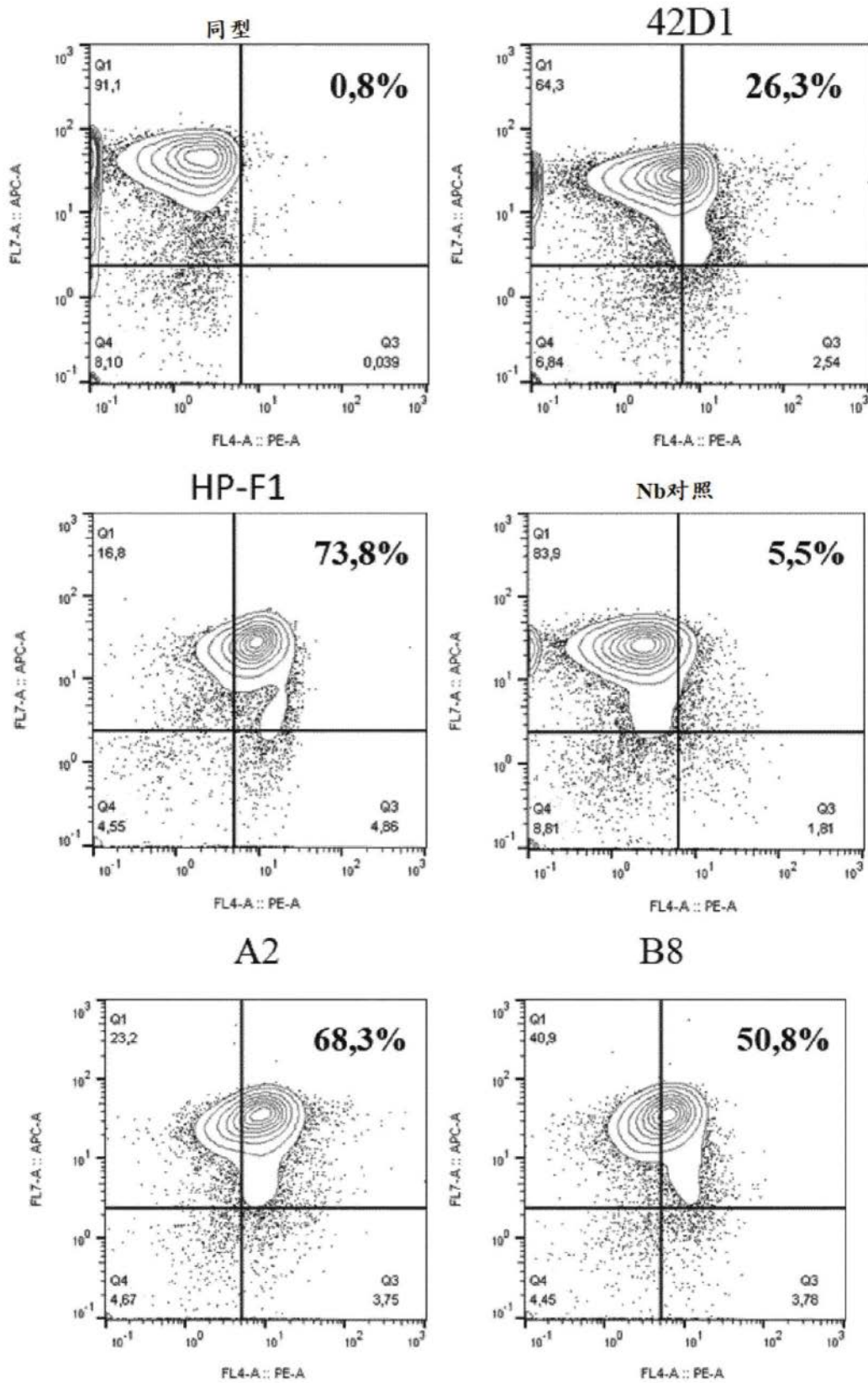


图5

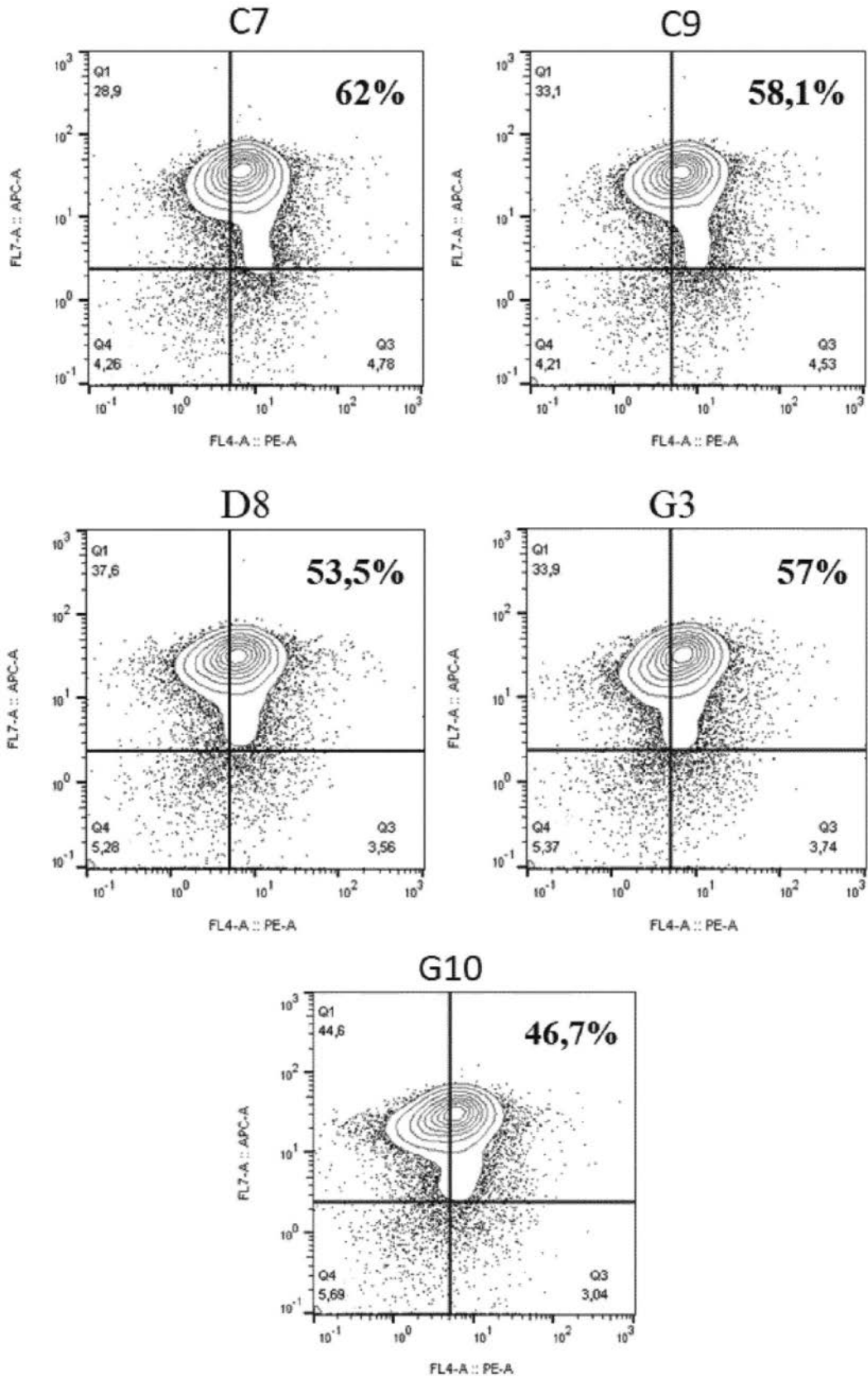


图5(续)

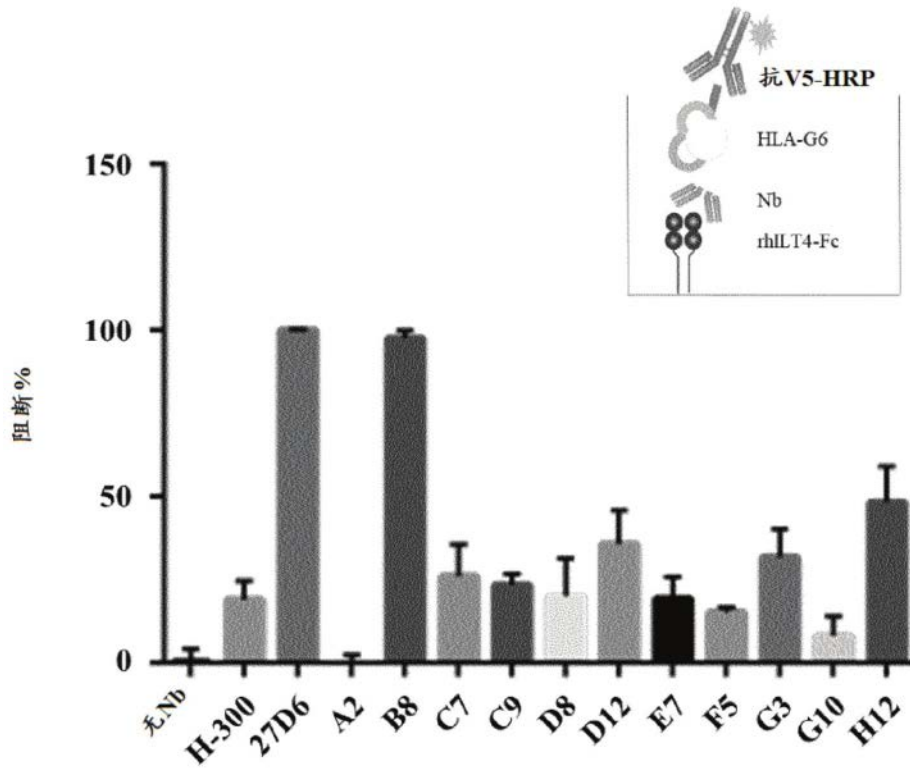


图6

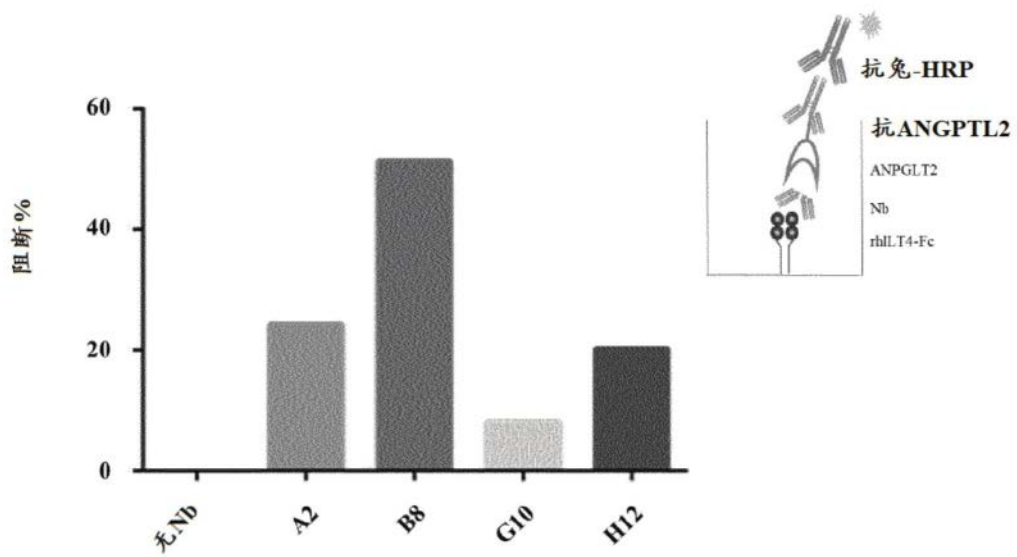


图7