(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109563169 B
(45)授权公告日 2022.07.01

(21)申请号 201780048691.4

(22)申请日 2017.06.02

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109563169 A

(43)申请公布日 2019.04.02

(30)优先权数据
16305650.0 2016.06.03 EP

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2019.02.02

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2017/063503 2017.06.02

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/207775 EN 2017.12.07

(73)专利权人 英韦克泰斯公司
地址 法国巴黎

(72)发明人 P·朗格拉德德穆瓦扬 T·于埃
J·科马丹 M·卢斯托 M·韦贝

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司 72002
专利代理师 区斌

(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
C07K 7/08(2006.01)

(56)对比文件
WO 2014072534 A1,2014.05.15
WO 9631604 A1,1996.10.10
CN 101967191 A,2011.02.09
CN 1718588 A,2006.01.11
CN 102086459 A,2011.06.08
EP 2264067 A1,2010.12.22
WO 2008121894 A3,2009.04.23
EP 2184070 A1,2010.05.12

Craig S. Clements等.Crystal structure of HLA-G a nonclassical MHC class I molecule expressed at the fetal-maternal interface.《PNAS》.2005,第102卷(第9期),

张天骄等.可溶性人白细胞抗原G的研究进展.《国外医学计划生育/生殖健康分册》.2007,第26卷(第6期),第305-308页.

Gill Chumbley等.Generation of an antibody to HLA-G in transgenic mice and demonstration of the tissue reactivity of this antibody.《Journal of Reproductive Immunology》.1994,第27卷(第3期),第173-186页.

A.Lin等.HLA-G expression in human ovarian carcinoma counteracts NK cell function.《Annals of Oncology》.2007,第18卷(第11期),第1804-1809页.

审查员 关维

权利要求书1页 说明书32页
序列表30页 附图20页

(54)发明名称
抗HLA-G特异性抗体

(57)摘要
本发明涉及针对人白细胞抗原-G(HLA-G)蛋白识别并针对源自HLA-G蛋白的α3结构域的免疫原性肽产生的抗体或其抗原结合片段。本发明进一步涉及所述免疫原性肽,以及产生所述抗HLA-G特异性抗体的方法。具体实施方案涉及具有提供了序列的任意指定15E7的单克隆抗体。还产生抗HLA-G单链抗体基因文库,并从该文库中鉴定出六种特异性结合物。

1.抗HLA-G抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段包含:

(a)重链可变区(VH),其包含SEQ ID NO:8的重链互补决定区1(HC CDR1)、SEQ ID NO:10的重链互补决定区2(HC CDR2)、和SEQ ID NO:12的重链互补决定区3(HC CDR3);和

(b)轻链可变区(VL),其包含SEQ ID NO:2的轻链互补决定区1(LC CDR1)、序列KVS的轻链互补决定区2(LC CDR2)、和SEQ ID NO:5的轻链互补决定区3(LC CDR3)。

2.权利要求1的抗体或抗原结合片段,其中所述VH包含SEQ ID NO:64和所述VL包含SEQ ID NO:63。

3.权利要求1或2的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体是全长免疫球蛋白G,其包含两条重链和两条轻链。

4.权利要求1的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体或抗原结合片段是嵌合或人源化抗体。

5.权利要求1或4的抗体或抗原结合片段,其中所述VH、所述VL、或VH以及VL二者包含人免疫球蛋白框架区序列。

6.权利要求1或2的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体包含免疫球蛋白恒定区。

7.权利要求1的抗体或抗原结合片段,其中所述抗原结合片段是Fv、dsFv、scFv、Fab、Fab'或$F(ab')_2$。

8.权利要求1或2的抗体或抗原结合片段,其中所述抗体是单克隆抗体。

9.一种缀合物,其包含与细胞毒性剂连接的权利要求1或2的抗体或抗原结合片段。

10.一种药物组合物,其包含权利要求1-8任一项的抗体或抗原结合片段和药物载体。

11.一种药物组合物,其包含权利要求9的缀合物和药物载体。

12.一种核酸,其包含编码权利要求1或2的抗体或抗原结合片段的VH和VL的核苷酸序列。

13.载体,其包含权利要求12的核酸。

14.权利要求13的载体,其中所述载体是表达载体。

15.宿主细胞,其包含权利要求12的核酸。

16.宿主细胞,其包含权利要求13的载体。

17.一种产生抗HLA-G单克隆抗体或其抗原结合片段的方法,包括在允许所述抗体或抗原结合片段表达的条件下培养权利要求16的宿主细胞。

18.权利要求1或2的抗体或抗原结合片段,其用于治疗癌症或病毒感染。

19.权利要求9的缀合物,其用于治疗癌症或病毒感染。

20.权利要求1或2的抗体或抗原结合片段在制备用于检测或监测生物样品中的HLA-G的诊断试剂盒中的用途。

21.诊断试剂盒,其包含权利要求1或2的抗体或抗原结合片段。

抗HLA-G特异性抗体

技术领域

[0001] 本发明涉及针对源自人白细胞抗原G(HLA-G)蛋白的α3结构域的免疫原性肽产生的抗体或其抗原结合片段。

技术背景

[0002] 在癌症中，一种主要的免疫逃逸机制是在细胞表面上抑制T细胞信号传导的抑制性分子的表达。许多这些抑制性分子被认为是免疫检查点(ICP)，并且指的是许多抑制途径，其首先已证明保持自身耐受性并且调节外周组织内生理免疫应答的持续时间和幅度以避免附带组织损伤。

[0003] HLA-G最近被鉴定为ICP分子，其通过与其特异性受体的相互作用抑制浸润免疫细胞亚群的效应功能，并且经常在肿瘤细胞中上调(Carosella等，2015)。

[0004] 此外，HLA-G还能在病理状况(如病毒感染、自身免疫和炎性疾病)中或同种异体移植后新表达(neo-expressed)和/或上调。

[0005] 例如，HCMV(人巨细胞病毒)、HSV-1(单纯疱疹病毒)、RABV(狂犬病病毒)、HCV(丙型肝炎病毒)、IAV(甲型流感病毒)和HIV-1(人类免疫缺陷病毒I型)似乎上调HLA-G的表达，以防止被感染的细胞被CTL和NK细胞识别和攻击。HLA-G还能通过指导CD8细胞凋亡并通过影响其细胞毒性来控制针对HIV感染细胞的CD8T细胞应答(Tripathi和Agrawal，2007)。

[0006] HLA-G是一种非经典的MHC I类分子，最初在绒毛膜癌细胞中被鉴定出来。MHC I类抗原包括经典抗原HLA-A、HLA-B和HLA-C，其表现出与β2-微球蛋白(β2M)缔合的三个细胞外球状结构域(α1、α2和α3)，以及包括非经典抗原HLA-E、HLA-F和HLA-G。

[0007] 与经典MHC I类分子不同，HLA-G的特征在于(i)有限的多态性，(ii)组织限制性表达，和(iii)功能也不同。

[0008] 编码HLA-G分子的8个外显子基因在6号染色体上跨越4.4kb(Geraghty等，1987；Ellis等，1990)。外显子2、3和4分别编码α1、α2和α3胞外结构域。初级RNA转录物能选择性剪接，导致7种同种型的表达，其中4种是膜结合的(HLA-G1、HLA-G2、HLA-G3和HLA-G4)，以及3种是可溶性的(HLA-G5、HLA-G6和HLA-G7)。HLA-G1和HLA-G5是所描述的最突出的同种型，部分可能是因为有限的HLA-G试剂(如抗体)。它们的结构典型属于经典HLA I类分子：包含与β2-微球蛋白(β2M)和肽非共价缔合的三个细胞外球状结构域的重链，而其他同种型较短，缺少重链的一个或两个球状结构域，且没有β2M缔合。

[0009] HLA-G的免疫抑制活性通过与三种抑制性受体的特异性结合而发生：白细胞免疫球蛋白样受体B1(LILRB1/ILT2/CD85j)、LILRB2(ILT4/CD85d)和KIR2DL4(或CD158d)。

[0010] 通过与这些受体的相互作用，与经典MHC I类分子相反，HLA-G作为免疫系统主要功能的下调因子，并且至今刺激功能或针对同种异体HLA-G的反应均尚未报道(Carosella等，2008a)。

[0011] 以与其他MHC I类分子类似的方式，LILRB受体与HLA-G的α3结构域相互作用。LILRB1受体在B细胞、一些T细胞、一些NK细胞和所有APC(单核细胞和树突细胞)上表达，而

LILRB2表达仅限于髓系，且仅在单核细胞和树突细胞上表达。

[0012] LILRB1和LILRB2受体分别通过α3结构域/β2M复合物或仅α3结构域结合多种经典MHC分子。实际上，LILRB1仅结合β2M缔合的HLA-G复合物，而LILRB2识别β2M缔合的和无β2M的HLA-G分子以及截短的α1-α3结构域同种型。

[0013] 与经典的MHC I类分子相比，HLA-G是对LILRB2受体具有最高亲和力的配体。HLA-G对LILRB1和LILRB2受体的更高亲和力特别地通过以下事实说明：在肿瘤细胞表面展示的HLA-G能够占据LILRB1和/或LILRB2受体，即使经典的MHC I类分子也表达在它们的表面。HLA-G对LILRB受体的这种优先相互作用足以抑制免疫效应细胞的细胞溶解功能。

[0014] LILRB1和2受体不结合相同的HLA-G形式，并且对HLA-G多聚体存在高于单体结构的亲和力(Ho Wang Yin等，2012)。LIRB受体对HLA-G的这种更高亲和力被证明与HLA-G的α3结构域内芳香族氨基酸Phe195和Tyr197的存在有关，其在经典MHC I类分子中不存在。

[0015] HLA-G表达作为肿瘤细胞运用的逃避机制来抑制效应细胞的相关性已得到广泛证实(Loustau等，2013)。已经开发了几种靶向HLA-G的方法，其目的是介导肿瘤细胞排斥(Carosella等，2008b；Yan，2011)。已经产生了很少的抗HLA-G抗体，并且仅有一种阻断抗体可用(87G)(Blaschitz等，2000；Menier等，2003)。该单克隆抗体87G与β2M缔合的HLA-G重链的α1结构域相互作用。虽然它已被描述为能够中和HLA-G，并从而在体外和体内恢复肿瘤排斥(Agaugue等，2011)，但其适用性因为HLA-G经常表达为无β2M全长分子或截短的同种型而受到损害。这些多种同种型也能结合LILRB2抑制性受体。

[0016] HLA-G免疫非常困难，产生的特异性抗体很少。已经阐明了这种不能产生中和抗体的原因。在肾脏移植的患者中，证明HLA-G的存在不利于抗体产生(Qiu等人，2006)。最近的体外研究已经证实，HLA-G/LILRB1相互作用损害人类中B细胞的成熟和抗体产生(Naji等，2014)。还已知HLA-G在小鼠中发挥耐受原功能，小鼠是通常用于产生单克隆抗体的物种(Favier等，2001)。HLA-G与PIR-B受体相互作用，其在鼠B细胞中表达并且与人LILRB1和LILRB2功能性同源(Liang等，2002)。HLA-G/PIR-B相互作用将导致B细胞抑制，从而阻止小鼠中的抗体产生。

[0017] 已经开发了一种明显针对经典MHC I类分子的α3结构域的单克隆抗体，命名为TP25.99(Tanabe等，1992)。然而，其他人已经表明它不结合HLA-G的α3结构域(Desai等，2000；Moy等，2000)。这种不一致可以通过HLA-Gα3结构域的疏水特征来解释，该特征对抗体产生是不利的。

[0018] 虽然国际专利申请WO2014/072534提出了通过DNA免疫用HLA-G的完整α3结构域来产生和开发抗HLA-G抗体的方法，但是仍然需要抗HLA-G抗体，其识别所有HLA-G同种型并且对于HLA-G表现出增进的特异性。

[0019] 发明简述

[0020] 通过设计来自HLA-G蛋白的α3结构域的免疫原性肽，本发明人现已成功地避免了产生特异性抗HLA-G抗体的困难。

[0021] 本发明的第一个目的是由序列X1-THHPVFDYEATLR-X2(SEQ ID NO:49)组成的分离的肽，其中X1是不存在、半胱氨酸、缬氨酸、或者是选自由KTHV(SEQ ID NO:50)或CKTHV(SEQ ID NO:51)组成的组的序列，并且X2是不存在或半胱氨酸。

[0022] 这种肽适用作免疫原，用于产生对HLA-G蛋白同种型的α3结构域特异的抗体，优选

单克隆抗体。

[0023]　本发明的另一个目的是抗HLA-G抗体，优选单克隆抗体，其特异性识别如本文所定义的肽。

[0024]　所述抗体可以是全长抗体、其抗原结合片段或双特异性抗体。

[0025]　本发明的另一个目的是包含这种抗体和药学上可接受的载体的组合物。

[0026]　本发明的另一主题是包含编码如本文定义的抗体的抗体重链可变区(VH)、抗体轻链可变区(VL)或两者的核苷酸序列的核酸。

[0027]　还提供了包含所述核酸的载体，优选表达载体。

[0028]　进一步描述了包含所述核酸或所述载体的宿主细胞。

[0029]　进一步提供了产生抗HLA-G抗体的方法。在一个优选的实施方案中，公开了一种产生抗HLA-G单克隆抗体的方法，包括在允许所述抗体表达的条件下培养包含所述核酸或所述载体的所述宿主细胞。

[0030]　所述抗体、表达所述抗体的核酸或载体特别适用于治疗癌症或病毒感染。

[0031]　本发明的另一主题是本文所述的抗HLA-G抗体在用于检测或监测生物样品中的HLA-G的体外诊断方法中的用途。

[0032]　进一步包括包含所述抗体的诊断试剂盒。

附图说明

[0033]　图1.免疫原的设计、免疫和抗HLA-G抗体的产生。A.人HLA-G蛋白与HLA-E、A2、B7、B44和CW3的氨基酸序列比对。为HLA-G的三个免疫球蛋白结构域：α1、α2和α3提供序列比对。以灰色突出的残基代表与HLA-G的差异。涉及LILRB1/2结合的α3结构域中的区域用黑色双头箭头突出。HLA-G特异性PC-1肽的氨基酸序列加下划线并以粗体显示。B.免疫小鼠中抗HLA-G抗体的产生。来自免疫的BALB/c小鼠(深黑色线/深灰色直方图)和来自未免疫的对照小鼠(浅灰色线和直方图)的抗HLA-G血清反应性的代表性流式细胞术直方图。虚线表示阈值，高于该阈值，信号被认为是正的。制备、稀释血清，并用HLA-G5包被的珠孵育，并然后与FITC缀合的山羊抗小鼠IgG二抗孵育。通过流式细胞术分析荧光。显示了四种血清的稀释。C.通过ELISA评估R4C-C3(菱形符号/点线)和R5C-D8(圆圈符号/虚线)scFv抗体对生物素偶联的PC1肽的反应性。将ScFv抗体连续稀释并使用包被在链霉亲合素微型板上的生物素-PC1通过直接ELISA进行测试。非HLA-G生物素化肽用作对照(正方形和三角形符号/粗线)。

[0034]　图2 A.15E7的κ轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列。显示“互补决定区”(CDR1，CDR2和CDR3)的位置，以及抗体的“框架区”(FR1，FR2，FR3和FR4)的位置。B.15E7的κ轻链可变区和相应的小鼠原始氨基酸基因的氨基酸序列的序列比对。15E7κ轻链序列中与种系序列不同的氨基酸以粗体显示。指示了CDR的位置。

[0035]　图3 A.15E7的重链可变区的核苷酸和氨基酸序列。显示CDR1、CDR2和CDR3序列的位置，以及抗体的FR的位置。B.15E7的重链可变区和相应的小鼠原始氨基酸基因的氨基酸序列的序列比对。15E7重链序列中与种系序列不同的氨基酸以粗体显示。指示了CDR的位置。

[0036]　图4 A.scFv R4C-C3的κ轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列。显示CDR1，CDR2和CDR3序列的位置，以及scFv的FR的位置。B.scFv R4C-C3的κ轻链可变区与相应的小鼠原始

氨基酸基因的氨基酸序列的序列比对。scFv R4C-C3κ轻链序列中与种系序列不同的氨基酸以粗体显示。指示了CDR的位置。

[0037] 图5 A.scFv抗体R4C-C3的重链可变区的核苷酸和氨基酸序列。显示CDR1,CDR2和CDR3序列的位置,以及scFv抗体的FR的位置。B.scFv抗体R4C-C3的重链可变区和相应的小鼠原始氨基酸基因的氨基酸序列的序列比对。scFv抗体R4C-C3重链序列中与种系序列不同的氨基酸以粗体显示。指示了CDR的位置。

[0038] 图6 A.15E7单克隆抗体的SDS-PAGE分析。泳道1:分子量标记-从上到下依次为75kDa,50kDa,37kDa,25kDa和20kDa。泳道2:小鼠IgG作为对照。泳道3:15E7单克隆抗体。通过SDS-PAGE分离蛋白质并用考马斯亮蓝着色。B.使用Blitz生物层干涉测量系统对15E7单克隆抗体与PC-1肽的结合进行动力学分析。通过氨基偶联将15E7单克隆抗体固定在AR2G芯片上。将多种浓度的PC-1肽/BSA (5至600nM)与偶联于生物传感器表面的15E7一起孵育。分析在时间点30秒开始持续120秒(缔合阶段),之后仅将缓冲液孵育100秒以记录PC-1/BSA从15E7的解离。点线的左侧(150秒)显示缔合动力学,而右侧显示解离阶段。上面的线对应于15E7与肽的最高浓度(600nM)的结合,且下面的线对应于与肽的最低浓度(5nM)的结合。所述结合与所述肽浓度(中间线)成比例。

[0039] 图7.单克隆抗体15E7与其靶标cPC-1肽的剂量依赖性结合(图7A);HLA-G5重组蛋白(图7B)或HLA-G6重组蛋白(两种蛋白均没有β2M缔合)(图7C)。多种连续浓度的15E7用于确定剂量依赖性结合活性。使用PE缀合的山羊抗小鼠抗体通过流式细胞术进行结合检测。结合表示为与用同种型对照(IgG2a)染色相比,以15E7阳性标记的珠子的百分比。评估15E7的EC50,在cPC-1肽上为2ng/mL,在HLA-G5上为28ng/mL,在HLA-G6蛋白上为120ng/mL。测量一式三份进行(n=3);误差条表示SD。深色线代表15E7与配体包被的珠子的结合,而灰线代表15E7与对照珠子的结合[用突变肽包被的珠子(图7A)或未偶联的珠子(图7B和7C)]。

[0040] 图8.抗-HLA-G单克隆抗体15E7与K562细胞表面上表达的无β2M的HLA-G1的剂量依赖性结合。使用多种浓度(0-80μg/mL)的15E7来确定15E7对HLA-G1阳性细胞(K562-G1) vs.HLA-G阴性对照细胞(K562-PV)的特异性剂量依赖性结合活性。使用PE缀合的山羊抗小鼠抗体通过流式细胞术进行15E7的检测。15E7表现出对靶K562-G1细胞(黑线)的剂量依赖性结合,而在对照细胞系K562-PV(灰线)上未检测到结合。

[0041] 图9.未处理或酸处理的K562-G1和K562-PV细胞(A,B)和JEG-3细胞(C)上的表面HLA-G抗原的流式细胞术分析。通过以下mAb分析表面HLA-G抗原:MEM-G/9(对天然HLA-G复合物特异)、抗hβ2M和15E7。直方图:浅灰色:未染色;灰色:同种型对照(抗β2M的IgM,15E7mAb的IgG2a和4H84的IgG1);深灰色;指示抗体。

[0042] 图10. 15E7单克隆抗体特异性结合HLA-G而非经典MHC I类分子。使用在其表面表达人经典MHC I类分子而非HLA-G的淋巴瘤细胞系(LCL DES,LCL BRO和RPMI8866)进行这些评估15E7特异性的结合试验,并通过流式细胞术分析。使用终浓度为20μg/mL的15E7。结合表示为与同种型对照(IgG2a)相比,以15E7阳性染色的细胞的百分比。K562-G1和K562-PV细胞分别用作阳性和阴性对照。

[0043] 发明详述

[0044] 由于在B细胞成熟和抗体分泌上的HLA-G致耐受(tolerogenic)功能,缺乏HLA-G治疗和诊断抗体。本发明人设法通过使用衍生自HLA-G-α3结构域的肽来绕过该抑制,所述肽

能够诱导抗HLA-G特异性抗体。

[0045] 本发明提供了抗HLA-G单克隆抗体，其特异性结合HLA-G并且其表现出许多所需的特征。实际上，在不存在与经典MHC I类分子的交叉反应性下，产生的所述抗HLA-G抗体与重组或内源HLA-G蛋白强烈结合。

[0046] 本发明还涉及这些抗体的用途，以恢复由一些患者细胞表面上HLA-G的病理表达引起的免疫系统。因此，当病症由于HLA-G蛋白的存在而利用患者中免疫系统的下调时，所述抗体适合用以治疗或减轻患者中诊断的所述病症。本发明的抗体还可用于诊断或监测患者的病症。

[0047] 定义

[0048] 如果其以比其结合其他物质更大的亲和力、亲合力、更容易和/或更长的持续时间结合靶抗原，则抗体“特异性结合”靶抗原。“特异性结合”或“优先结合”不一定需要(尽管它能包括)排他性结合。通常但不是必须地，提及结合意味着优先结合。结合的亲和力由缔合和解离速率常数或K_D(平衡解离)定义。通常，当针对抗体使用时特异性结合是指以亲和力(K_D)值小于10^{-8}M(例如小于10^{-9}M或10^{-10}M)特异性结合(“识别”)其靶标的抗体。较低的K_D值表示较高的结合亲和力(即，更强的结合)，使得10^{-9}M的K_D值表示比10^{-8}M的K_D值更高的结合亲和力。

[0049] 在本发明的上下文中，通过本发明的抗体或抗原结合片段的“HLA-G蛋白结合”是指本发明的抗体或抗原结合片段识别HLA-G蛋白同种型，所述同种型表现出α3结构域或发现与α3结构域缔合，同时进一步发现与β2-微球蛋白或其片段缔合或不缔合。

[0050] 通过“缔合的”，它是指所考虑的结构域之间或结构域与蛋白质之间的紧密(非共价)相互作用。这种相互作用能通过形成氢键、或范德华相互作用、或离子键来实现。

[0051] 本发明抗体或其抗原结合片段的“特异性结合”特性是指抗体或其抗原结合片段直接结合HLA-G蛋白的α3结构域，排除HLA-G蛋白的其它结构域或排除与其他人蛋白的结合，特别是排除与其他HLA蛋白的结合。根据本发明领域中已知的常规测试，可以通过确定HLA-G蛋白的α3结构域的结合亲和力来测量结合能力，特别是能通过ELISA或Western印迹分析测定结合亲和力。根据一个具体实施方案，“特异性结合”是指通过这种特异性结合，本发明的抗体或抗原结合片段与HLA-G蛋白的α3结构域之间的相互作用比本发明的抗体或抗原结合片段和其他人蛋白质、或其他HLA-G结构域或其他HLA蛋白质之间的相互作用更稳定。稳定性能从以下了解：通过比较抗原-抗体复合物随时间或在竞争条件下的持久性，以及特别是通过测量识别HLA-G蛋白的α3结构域的抗体的解离常数。

[0052] “阻断抗体”是一种抑制HLA-G蛋白与任何或所有其受体(例如，LILRB1受体和/或LILRB2受体)相互作用的抗体。因此，“阻断”通常是指在存在本发明的抗体或抗原结合片段的情况下，HLA-G蛋白质通过α3结构域与其受体结合之后的生物学功能被消除或强烈减少。如本文所公开并在文献中评估，本文中提到的生物学功能是表现出α3结构域的HLA-G蛋白的免疫抑制活性。因此，能说抗体或抗原结合片段是HLA-G蛋白的拮抗剂，或具有α3结构域的HLA-G蛋白的作用的拮抗剂，因为干扰了这些HLA-G蛋白的活性和/或至少部分或完全、直接或间接地抵制其活性。优选地，与任何或所有HLA-G受体的相互作用(即结合)的降低为至少20％、更优选至少30％、更优选至少40％、更优选至少50％、更优选至少60％、更优选至少70％、更优选至少80％、更优选至少90％、以及最优选100％。可以通过本领域已知的结合测

定来测量活性。

[0053] 术语“Kabat编号”,“Kabat定义”和“Kabat标记”在本文中可互换使用。这些术语在本领域中是公认的,是指编号氨基酸残基的系统,所述氨基酸残基比抗体的重链和轻链可变区或其抗原结合部分中的其他氨基酸残基更可变(即高变)的(Kabat等,1971;Kabat等,1991)。

[0054] 如本文所用,术语“CDR”是指抗体可变序列内的互补决定区。在重链和轻链的每个可变区中存在三个CDR,其对于每个可变区被称为CDR1,CDR2和CDR3。如本文所用的术语“CDR组”是指在能够结合抗体的单个可变区中出现的一组三个CDR。根据不同的系统,这些CDR的确切边界已经被不同地定义。Kabat描述的系统(Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest(National Institutes of Health),Bethesda,Md.(1987)和(1991))不仅提供了适用于抗体的任何可变区域的明确的残基编号系统,也提供定义所述三个CDR的精确残基边界。这些CDR可称为Kabat CDR。Chothia及其同事(Chothia等,1987和Chothia等,1989)发现Kabat CDR中的某些子部分采用尽管在氨基酸序列水平上具有很大的多样性,但几乎相同的肽骨架构象。

[0055] 本发明抗体的“抗原结合片段”是指抗体的一部分,即对应于本发明抗体结构的一部分的分子,其表现出对HLA-G蛋白的α3结构域的抗原结合能力。在一个特定的实施方案中,所述片段对于所述结构域表现出与具有完整抗体结构的抗体的抗原结合能力基本相同的抗原结合能力。抗原结合能力能通过测量抗体和所考虑的抗原结合片段对靶抗原的亲和力来确定。。

[0056] 抗体的抗原结合片段涵盖包含称为CDR的高变结构域的片段,或涵盖其包含免疫原性肽的识别位点的部分。四链免疫球蛋白的每条轻链和重链(分别为VL和VH)具有三个CDR,分别称为VL-CDR1、VL-CDR2、VL-CDR3和VH-CDR1、VH-CDR2、VH-CDR3。因此,本发明涉及本发明的抗体的片段(抗原结合片段),其包括或存在VL-CDR1、VL-CDR2、VL-CDR3和VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3之中的全部或选自其中的CDR,或其功能部分,即对HLA-G蛋白的α3结构域表现出所需结合能力(优选具有高亲和力)的部分。

[0057] 术语“单克隆抗体”是指衍生自单个克隆的抗体,包括任何真核、原核或噬菌体克隆,而不是产生它的方法。因此,它不限于通过杂交瘤技术产生的抗体。

[0058] “多克隆血清”是指包含针对特定抗原产生的许多不同抗体或其片段的异质群体的血清,其因此对在所述特异性抗原上发现的许多不同的抗原决定簇具有特异性。

[0059] 如本文所用,“嵌合抗体”是指一种抗体,其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的其余部分与衍生自另一物种或属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,还有此类抗体的片段,只要它们表现出所需的生物活性。如本文所用,“人源化抗体”是“嵌合抗体”的子集。

[0060] “人源化”形式的非人(例如鼠)抗体是嵌合抗体,其含有源自非人免疫球蛋白的最小序列。在一个实施方案中,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的高变区(HVR)的残基被具有所需的特异性,亲和力和/或其靶标的能力的来自非人物种(例如小鼠,大鼠,兔或非人灵长类动物)(供体抗体)的HVR的残基取代。在一些情况下,人免疫球蛋白的互补决定区的残基被相应的非人残基取代。此外,人源化抗体可包含在受体抗体或供

体抗体中未发现的残基。可以进行这些修饰以进一步改善抗体性能(例如结合亲和力)。通常,人源化抗体将包含至少一个、通常两个可变结构域的基本上全部,所述可变结构域中的高变环的全部或基本上全部对应于非人免疫球蛋白序列的高变环,并且框架区(FR)的全部或基本上全部是人免疫球蛋白序列的FR,尽管FR区可包括改善抗体性能(例如结合亲和力,异构化,免疫原性等)的一个或多个单个FR残基取代。FR中这些氨基酸取代的数目在H链中通常不超过6,并在L链中不超过3。人源化抗体任选还包含至少一部分免疫球蛋白恒定区(Fc),通常是人免疫球蛋白的Fc。

[0061] “人抗体”是具有对应于人产生的和/或使用本领域已知的任何制备人抗体的技术(包括噬菌体展示文库)制备的抗体的氨基酸序列的抗体。人抗体的这种定义特异性地排除了包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0062] 两个氨基酸序列的“百分比相同性”可以使用Karlin和Altschul,1990的算法(如Karlin和Altschul,1993中所修改的)确定。这样的算法被并入Altschul等,1990的NBLAST和XBLAST程序(版本2.0)。能用XBLAST程序(score=50,wordlength=3)进行BLAST蛋白质搜索,以获得与感兴趣的蛋白质分子同源的氨基酸序列。对于两个序列之间存在间隙,能如Altschul等,1997中所述利用Gapped BLAST。当使用BLAST和Gapped BLAST程序时,能使用各个程序(例如,XBLAST和NBLAST)的默认参数。

[0063] “保守取代”将产生具有与进行这种修饰的分子类似的功能和化学特征的分子。例如,“保守氨基酸取代”可以涉及用另一个残基取代氨基酸残基,使得对该位置的氨基酸残基的极性或电荷几乎没有影响或没有影响。所需氨基酸取代(无论是保守的还是非保守的)能由本领域技术人员确定。例如,氨基酸取代能用于鉴定分子序列的重要残基,或增加或降低本文所述分子的亲和力。包含一个或多个保守氨基酸取代的变体能根据改变本领域普通技术人员已知的多肽序列的方法制备,例如参见编制这些方法的参考文献,例如,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,J.Sambrook等编辑,Second Edition,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,New York,1989,或Current Protocols in Molecular Biology,F.M.Ausubel等编辑,John Wiley&Sons,Inc.,New York。氨基酸的保守取代包括在下列组中的氨基酸之间进行的取代:(a)M,I,L,V;(b)F,Y,W;(c)K,R,H;(d)A,G;(e)S,T;(f)Q,N;以及(g)E,D。

[0064] 术语“对象”,“个体”和“患者”在本文中可互换使用,并且是指被评估用于治疗和/或被治疗的哺乳动物。对象可以是人,但也包括其他哺乳动物,特别是那些可用作人类疾病的实验室模型的哺乳动物,例如,小鼠、大鼠、兔子、狗等

[0065] 术语“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”是指动作、应用或疗法,其中包括人在内的对象受到医疗帮助,其目的是直接或间接地改善对象的状况。特别地,该术语是指在一些实施方案中降低发病或减轻症状,消除复发,预防复发,预防发病,改善症状,改善预后或其组合。本领域技术人员将理解,治疗不一定导致完全缺乏或消除症状。例如,关于癌症,“治疗”或“治疗”可以指减缓肿瘤或恶性细胞生长、增殖或转移,预防或延迟肿瘤或恶性细胞生长、增殖或转移的发展,或它们的某种组合。

[0066] 免疫原性肽

[0067] 本发明人设计了一种免疫原性肽,以开发对HLA-G特异而对经典的MHC I类分子没有交叉反应性的抗HLA-G抗体。

[0068] HLA-G氨基酸序列不同于其他MHC I类分子(HLA-E,A2,B7,B44和CW3),如图1A所示。与HLA-G序列相比,MHC I类序列的氨基酸变异以灰色突出显示,显示不同结构域内的许多热点。特别地,鉴定出HLA-G在α3结构域内的位置194-197处的高度特异性序列。HLA-Gα3结构域的这部分包含HLA-G及其受体之间相互作用所必需的氨基酸(图1A)。

[0069] 在此基础上,本发明人设计了一种免疫原性肽,其由序列X1-THHPVFDYEATLR-X2(SEQ ID NO:49)组成,其中X1为不存在、半胱氨酸、缬氨酸或为选自由KTHV(SEQ ID NO:50)或CKTHV(SEQ ID NO:51)组成的组的序列,并且X2为不存在或半胱氨酸。

[0070] 在优选的实施方案中,所述肽是环状的并且由以下序列组成:

[0071] a. CTHHPVFDYEATLRC(SEQ ID NO: 52),
b. CKTHVTHHPVFDYEATLRC(SEQ ID NO: 53),

[0072] 其中二硫键连接N-末端和C-末端的半胱氨酸残基。

[0073] 在另一个优选的实施方案中,所述肽是线性的并且由选自下组的序列组成:

[0074] THHPVFDYEATLR(SEQ ID NO: 54);
THHPVFDYEATLRC(SEQ ID NO: 55);
VTHHPVFDYEATLRC(SEQ ID NO: 56);
VTHHPVFDYEATLR(SEQ ID NO: 57);
CTHHPVFDYEATLR(SEQ ID NO: 58);
KTHVTHHPVFDYEATLR(SEQ ID NO: 59);

[0075] KTHVTHHPVFDYEATLRC(SEQ ID NO: 60)和

[0076] CKTHVTHHPVFDYEATLR(SEQ ID NO: 61)。

[0077] 所述肽可以通过本领域已知的任何技术产生,例如,化学合成或通过重组。

[0078] 还提供了编码所述肽的核酸。

[0079] 本发明还涉及用于克隆和/或表达核酸的载体,尤其是适于在宿主细胞中克隆和/或表达的质粒。根据特定实施方案,可以添加用于转录和表达的调节序列。

[0080] 重组表达载体通常含有编码用于表达的序列的核酸,其可与启动子(组成型或诱导型)可操作地连接。所述载体能适用于在原核生物、真核生物或两者的复制和整合。典型的载体含有转录和翻译终止子、起始序列和可用于调节编码所述免疫原性肽的核酸表达的启动子。所述载体任选地含有通用表达盒,其含有至少一个独立的终止子序列、允许盒在真核生物和原核生物中复制的序列(即穿梭载体)、以及用于原核和真核系统的选择标记。

[0081] 如下文更详细描述的,所述免疫原性肽可用于通过免疫产生抗HLA-G抗体。

[0082] 抗HLA G抗体

[0083] 本发明涉及特异性结合上述免疫原性肽的抗体或其抗原结合片段。

[0084] 本发明的抗HLA-G抗体均识别HLA-G蛋白的α3结构域。

[0085] 在一个具体实施方案中,所述抗体或其抗原结合片段特异性结合HLA-G蛋白的α3结构域,所述HLA-G蛋白具有在表达HLA-G的细胞中天然发现的构象。换句话说,本发明的这种抗体或其抗原结合片段识别如在表达HLA-G的细胞中天然发现的HLA-G的α3结构域的特定表位。

[0086] 本发明的目的是产生特异性抗HLA-G抗体，其针对包含α3结构域的HLA-G同种型，或识别与α3结构域缔合的HLA-G同种型。因此，当提及与HLA-G蛋白的结合时，本发明尤其涉及与表现出α3结构域的HLA-G同种型的结合。

[0087] 在一个具体实施方案中，提供了识别可溶形式的HLA-G的抗体或其抗原结合片段。

[0088] 在另一个实施方案中，提供了识别膜锚定形式的HLA-G的抗体或其抗原结合片段。

[0089] 在最优选的实施方案中，本发明的抗体识别线性形式或环形形式的免疫原性肽，以及可溶形式的HLA-G蛋白和细胞表面的HLA-G蛋白(即天然构象)。

[0090] 如上所述，能发现在几种结构(或三维)形式下HLA-G蛋白，其通常称为同种型。HLA-G1和HLA-G5分别是膜结合或分泌的HLA-G蛋白，其发现与β2-微球蛋白缔合或不缔合。相比之下，HLA-G2、HLA-G3和HLA-G4是膜结合的HLA-G蛋白同种型，不同时表现出所有的α2和α3结构域。还能在细胞表面发现HLA-G1同种型为二聚体形式。HLA-G6和HLA-G7是分泌的HLA-G蛋白同种型，也不同时表现出所有的α2和α3结构域。

[0091] 有利地，本发明的抗HLA-G抗体识别所有表现出α3结构域的HLA-G同种型。

[0092] 在一个优选的实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段结合至少一种或几种选自HLA-G1、HLA-G2、HLA-G5和HLA-G6的HLA-G蛋白同种型(单体和二聚体同种型)。

[0093] 在一个具体实施方案中，本发明的抗HLA-G抗体识别HLA-G蛋白，无论它们是否与β2-微球蛋白缔合。

[0094] 然而，在某些情况下，能发现与HLA-G蛋白缔合的所述β2-微球蛋白不是系统地存在于所述HLA-G蛋白的所有同种型中。如上所述，缔合的β2-微球蛋白蛋白的存在对于使HLA-G蛋白与LILRB2抑制性受体的结合也不是必需的。

[0095] 因此，在本发明的上下文中，“无β2-微球蛋白HLA-G蛋白”涉及不与β2-微球蛋白缔合的HLA-G蛋白。“无β2-微球蛋白的截短的HLA-G蛋白同种型”或“无β2-微球蛋白的截短的表现出α3结构域的HLA-G蛋白同种型”指一种HLA-G蛋白，其不表现出可能在HLA-G蛋白中发现的所有结构域，并且不与β2-微球蛋白缔合。

[0096] 在本发明的一个具体实施方案中，当存在于HLA-G时，所述抗体或其抗原结合片段特异性结合所述α3结构域，特别是存在于无β2-微球蛋白HLA-G，即无β2-微球蛋白的表现出α3结构域的HLA-G或无β2-微球蛋白的截短的表现出α3结构域的HLA-G。

[0097] 在一个具体实施方案中，提供了抗体或其抗原结合片段，当HLA-G蛋白处于单体或二聚体形式时，其结合HLA-G蛋白的所述α3结构域。

[0098] 根据一个具体实施方案，不论所述β2-微球蛋白是否与之缔合或不缔合，本发明的抗体或其抗原结合片段均当HLA-G蛋白为单体和/或二聚体形式时结合HLA-G蛋白的所述α3结构域，并当α3结构域存在于HLA-G蛋白中时结合所述α3结构域。

[0099] 为了说明本发明的具体实施方案，含有包含所述抗体的CDR的所述可变结构域的抗体的抗原结合片段包括Fv、dsFv、scFv、Fab、Fab′、F(ab′)2，它们参考Kabat以及Roitt I.等(Fundamental and Applied Immunology MEDSI/McGraw-Hill)很好的定义。Fv片段由通过疏水相互作用缔合在一起的抗体的VL和VH结构域组成；在dsFv片段中，VH:VL异二聚体通过二硫键稳定；在scFv片段中，VL和VH结构域通过柔性肽接头彼此连接，从而形成单链蛋白质。Fab片段是通过木瓜蛋白酶消化抗体可获得的单体片段；它们包含整个L链和H链的VH-CH1片段，通过二硫键结合在一起。F(ab′)2片段能通过胃蛋白酶消化抗体铰链二硫化物以

下产生;它包含两个Fab'片段,以及另外的免疫球蛋白分子的铰链区的一部分。通过切割铰链区中的二硫键,从F(ab')2片段可获得Fab'片段。F(ab')2片段是二价的,即它们像天然免疫球蛋白分子那样包含两个抗原结合位点;另一方面,Fv(构成Fab的可变部分的VH-VL二聚体)、dsFv、scFv、Fab和Fab'片段是单价的,即它们包含单个抗原结合位点。

[0100] 在最优选的实施方案中,提供scFv片段。

[0101] 当CDR3区似乎是抗原识别特异性的决定因素时,包含或由VH-CDR3和/或VL-CDR3或其功能部分组成的片段是特别优选的。特定的抗原结合片段包含抗体的VH和/或VL的CDR1、CDR2和CDR3结构域。

[0102] 本发明的这些抗原结合片段能组合在一起以获得多价抗原结合片段,例如双抗体、三抗体或四抗体。这些多价抗原结合片段也是本发明的一部分。

[0103] 还包括双特异性或多特异性抗体,其能够在相同或不同的抗原上同时结合两个不同的表位。双特异性或多特异性抗体能通过不同的生物化学方法获得,例如两种抗体的化学缀合、两种抗体产生细胞系的融合、或产生重组双特异性或多特异性抗体分子的遗传方法。

[0104] 在本发明的一个具体实施方案中,本发明的抗体是单克隆抗体。因此,本发明还涉及单克隆抗体,意指这些抗体的组合物包含就抗原结合特异性而言并因此就可变区组成而言相同的抗体。

[0105] 在本发明的另一个实施方案中,抗体或其抗原结合片段作为多克隆血清提供或从多克隆血清中纯化。

[0106] 根据本发明,所述抗体可以是非人哺乳动物抗体(如鼠抗体),或嵌合抗体。在优选的实施方案中,所述抗体可以是人源化的。在一个具体实施方案中,包括人抗体。

[0107] 在另一个实施方案中,本发明还涉及构建体,其包含根据本文提供的任何定义的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其抗原结合片段与功能不同的分子缀合。

[0108] 本发明的构建体可以是由任何合适的连接形式产生的融合蛋白或缀合物,所述连接形式包括共价连接、接合、与以下的化学键合:与化学或生物基团或分子(例如适于针对体内蛋白酶切割的保护的保护基团或分子),用于改善抗体或抗原结合片段的稳定性和/或半衰期、与生物活性分子(尤其是治疗活性成分,例如一种毒素或细胞毒性剂)、适用于将抗体或抗原结合片段靶向人体特定细胞或组织的载体(尤其包括蛋白质载体)、或者与标记物(例如放射性元件),或与接头(尤其是当使用抗体片段时)。

[0109] 优选抗体或其抗原结合片段的实例在下文中描述。

[0110] 在一个具体实施方案中,提供了抗HLA-G抗体,其包含:

[0111] (a)重链可变区(VH),其包含SEQ ID NO:8的重链互补决定区1(HC CDR1),和/或SEQ ID NO:10的重链互补决定区2(HC CDR2),和/或SEQ ID NO:12的重链互补决定区3(HC CDR3);和/或

[0112] (b)轻链可变区(VL),其包含SEQ ID NO:2的轻链互补决定区1(LC CDR1),和/或序列KVS的轻链互补决定区2(LC CDR2)和/或SEQ ID NO:5的轻链互补决定区3(LC CDR3)。

[0113] 优选地,这种抗体包含:

[0114] (a)重链可变区(VH),其包含SEQ ID NO:8的重链互补决定区1(HC CDR1),SEQ ID NO:10的重链互补决定区2(HC CDR2),和SEQ ID NO:12的重链互补决定区3(HC CDR3);和/

或

[0115] (b)轻链可变区(VL),其包含SEQ ID NO:2的轻链互补决定区1(LC CDR1),序列KVS的轻链互补决定区2(LC CDR2)和SEQ ID NO:5的轻链互补决定区3(LC CDR3)。

[0116] 更优选地,此类抗体可包含:

[0117] (a)重链可变区(VH),其包含SEQ ID NO:64或与SEQ ID NO:64显示超过80%、优选超过90%、更优选超过95%相同性的同源序列和/或

[0118] (b)轻链可变区(VL),其包含SEQ ID NO:63或与SEQ ID NO:63显示超过80%、优选超过90%、更优选超过95%相同性的同源序列。

[0119] 在一个具体实施方案中,所述同源序列仅通过氨基酸的组成型取代而不同。

[0120] 在另一个实施方案中,所述同源序列是人源化序列。

[0121] 在一个具体方面,所述抗体是全长免疫球蛋白G,其包含两条重链以及两条轻链,所述重链包括可变区(VH),所述可变区(VH)包含SEQ ID NO:64的;所述轻链包括可变区(VL),所述可变区(VL)包含SEQ ID NO:63。这种抗体命名为15E7并在实验部分中更详细地描述。

[0122] 在另一个具体实施方案中,提供了一种抗体,其包含:

[0123] (a)重链可变区(VH),其包含SEQ ID NO:23的重链互补决定区1(HC CDR1),和/或SEQ ID NO:25的重链互补决定区2(HC CDR2),和/或SEQ ID NO:27的重链互补决定区3(HC CDR3);和/或

[0124] (b)轻链可变区(VL),其包含SEQ ID NO:15的轻链互补决定区1(LC CDR1),和/或序列KVS的轻链互补决定区2(LC CDR2),和/或SEQ ID NO:18的轻链互补决定区3(LC CDR3)。

[0125] 优选地,这种抗体包含:

[0126] (a)重链可变区(VH),其包含SEQ ID NO:23的重链互补决定区1(HC CDR1),SEQ ID NO:25的重链互补决定区2(HC CDR2),和SEQ ID NO:27的重链互补决定区3(HC CDR3);和/或

[0127] (b)轻链可变区(VL),其包含SEQ ID NO:15的轻链互补决定区1(LC CDR1),序列KVS的轻链互补决定区2(LC CDR2)和SEQ ID NO:18的轻链互补决定区3(LC CDR3)。

[0128] 更优选地,此类抗体可包含:

[0129] (a)重链可变区(VH),其包含SEQ ID NO:67或与SEQ ID NO:67显示超过80%、优选超过90%、更优选超过95%相同性的同源序列;和/或

[0130] (b)轻链可变区(VL),其包含SEQ ID NO:65或与SEQ ID NO:65显示超过80%、优选超过90%、更优选超过95%相同性的同源序列。

[0131] 在一个具体实施方案中,所述同源序列仅通过氨基酸的组成型取代而不同。

[0132] 在另一个实施方案中,所述同源序列是人源化序列。

[0133] 在一个优选的方面,提供了scFv,其包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)含有SEQ ID NO:67,所述轻链可变区(VL)含有SEQ ID NO:65。这种scFv片段命名为R4C-C3并在实验部分中更详细地描述。

[0134] 在另一个具体实施方案中,提供了一种抗体,其包含:

[0135] (a)重链可变区(VH),其包含SEQ ID NO:23的重链互补决定区1(HC CDR1),和/或

SEQ ID NO:25的重链互补决定区2(HC CDR2),和/或SEQ ID NO:27的重链互补决定区3(HC CDR3);和/或

[0136] (b)轻链可变区(VL),其包含SEQ ID NO:15的轻链互补决定区1(LC CDR1),和/或序列KVS的轻链互补决定区2(LC CDR2),和/或SEQ ID NO:20的轻链互补决定区3(LC CDR3)。

[0137] 优选地,这种抗体包含:

[0138] (a)重链可变区(VH),其包含SEQ ID NO:23的重链互补决定区1(HC CDR1),SEQ ID NO:25的重链互补决定区2(HC CDR2),和SEQ ID NO:27的重链互补决定区3(HC CDR3);和/或

[0139] (b)轻链可变区(VL),其包含SEQ ID NO:15的轻链互补决定区1(LC CDR1),序列KVS的轻链互补决定区2(LC CDR2)和SEQ ID NO:20的轻链互补决定区3(LC CDR3)。

[0140] 更优选地,此类抗体可包含:

[0141] (a)重链可变区(VH),其包含SEQ ID NO:67或与SEQ ID NO:67显示超过80%、优选超过90%、更优选超过95%相同性的同源序列;和/或

[0142] (b)轻链可变区(VL),其包含SEQ ID NO:66或与SEQ ID NO:66显示超过80%、优选超过90%、更优选超过95%相同性的同源序列。

[0143] 在一个具体实施方案中,所述同源序列仅通过氨基酸的组成型取代而不同。

[0144] 在另一个实施方案中,所述同源序列是人源化序列。

[0145] 另一方面,提供了scFv,其包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)含有SEQ ID NO:67,所述轻链可变区(VL)含有SEQ ID NO:66。这种scFv片段命名为R5C-D8。

[0146] 所述抗体的可变区的序列列于序列表中,并描述如下。

[0147] 抗体15E7的VLκ链:

FR1: DVLMTQIPFSLPVSLGDQASISCRSS(SEQ ID NO: 1)

CDR1: QSIVHRSGNTY(SEQ ID NO: 2)

FR2: LEWYLQKPGQSPKLLIY(SEQ ID NO: 3)

[0148] CDR2: KVS

FR3: NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC(SEQ ID NO: 4)

CDR3: FQGSHLPPT(SEQ ID NO: 5)

FR4: FGGTTLEIK(SEQ ID NO: 6)

[0149] 抗体15E7的VH链:

FR1: QVQLQQPGAELVRPGSSVKLSCKAS(SEQ ID NO: 7)

CDR1: GYTFTDYW(SEQ ID NO: 8)

FR2: MDWVKQRPGQGLEWIGT(SEQ ID NO: 9)

[0150] CDR2: IYPSDSST(SEQ ID NO: 10)

FR3: HYNQEFKGKATMTVDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYYC(SEQ ID NO: 11)

CDR3: AREGLAGVFYFDY(SEQ ID NO: 12)

FR4: WGQGTTLTVSS(SEQ ID NO: 13)

[0151] scFv R4C-C3的VLκ链

FR1: DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS(SEQ ID NO: 14)

CDR1: QSLVHSNGNTY(SEQ ID NO: 15)

FR2: LHWYLQKPGQSPKLLIY(SEQ ID NO: 16)

[0152] CDR2: KVS

FR3: NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC(SEQ ID NO: 17)

CDR3: SQSTHFPPT(SEQ ID NO: 18)

FR4: FGGGTKLEII(SEQ ID NO: 19)

[0153] scFv R5C-D8的VLκ链

FR1: DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS(SEQ ID NO: 14)

CDR1: QSLVHSNGNTY(SEQ ID NO: 15)

FR2: LHWYLQKPGQSPKLLIY(SEQ ID NO: 16)

[0154] CDR2: KVS

FR3: NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC(SEQ ID NO: 17)

CDR3: SQSTHVPPT(SEQ ID NO: 20)

FR4: FGAGTKLELK(SEQ ID NO: 21)

[0155] R4C-C3和R5C-D8的scFv的VH链

FR1: QVQLKQSGPQLVRPGASVKIPCKAS(SEQ ID NO: 22)

CDR1: GYSFTNYW(SEQ ID NO: 23)

FR2: MHWVKQRPGQGLEWIGM(SEQ ID NO: 24)

[0156] CDR2: IAPSDSDS(SEQ ID NO: 25)

FR3: RLNQNFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYC(SEQ ID NO: 26)

CDR3: AREGVTMITTGLDY(SEQ ID NO: 27)

FR4: WGQGTTLTVSS(SEQ ID NO: 28)

[0157] 已经产生了另外的抗体(命名为N27F12和N38F4)和scFv(命名为3157-C57-R6B-C10、3157-C57-R6B-G3和3157-C57-R6B-H10)。所述另外的抗体和scFv的可变区的序列列于序列表中，并描述如下。

[0158] 抗体N27F12的VLκ链：

FR1: ENVLTQSPAIMAASLGEKVTMTCSAS(SEQ ID NO: 68)

CDR1: SSVSSNF(SEQ ID NO: 69)

FR2: LHWYQQKSGTSPKLWIY(SEQ ID NO: 70)

[0159] CDR2: GTS

FR3: NLASGVPARFSGSGTGISYSLTVSNMEAENDAAYYC(SEQ ID NO: 71)

CDR3: QQWNAYPFT(SEQ ID NO: 72)

FR4: FGAGTKLELK(SEQ ID NO: 21)

[0160] 抗体N27F12的VH链：

FR1: EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVAS(SEQ ID NO: 73)

CDR1: GFTFSSYW(SEQ ID NO: 74)

FR2: LSWVRQSPEKGLEWVAE(SEQ ID NO: 75)

[0161] CDR2: VRLKSDNYAT(SEQ ID NO: 76)

FR3: SYAESVKGKFTISRDDANSRLYLQMNSLRPEDTGIYYC(SEQ ID NO: 77)

CDR3: TTGDY(SEQ ID NO: 78)

FR4: WGQGTTLTVSS(SEQ ID NO: 13)

[0162] 抗体N38F4的VLκ链：

FR1: DVVMTQIPLSLPVSLGDQASISCRSS(SEQ ID NO: 79)

CDR1: QSLVNSNGNTL(SEQ ID NO: 80)

FR2: LHWYLQKPGQSPKLLIY(SEQ ID NO: 16)

[0163] CDR2: KVS

FR3: NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC(SEQ ID NO: 17)

CDR3: SQSTHVPWT(SEQ ID NO: 81)

FR4: FGGGTKLEIK(SEQ ID NO: 82)

[0164] 抗体N38F4的VH链：

FR1: EVKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVAS(SEQ ID NO: 73)

CDR1: GLTFSSYW(SEQ ID NO: 83)

FR2: MSWVRQSPEKGLEWVAE(SEQ ID NO: 84)

[0165] CDR2: IRLRSDNYVK(SEQ ID NO: 85)

FR3: QYADSVKGRFTISRDDSKGRLYLQMNRLRGDDTGIYFC(SEQ ID NO: 86)

CDR3: TTGDY(SEQ ID NO: 78)

FR4: WGQGTTLTVSS(SEQ ID NO: 13)

[0166] scFv 3157-C57-R6B-C10和3157-C57-R6B-G3的VLκ链

FR1: DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS(SEQ ID NO: 14)
CDR1: QTIVHSNGNTY(SEQ ID NO: 87)
FR2: LEWYLQKPGQSPKLLIY(SEQ ID NO: 3)
[0167] CDR2: KVS
FR3: NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC(SEQ ID NO: 4)
CDR3: FQGSHVPPT(SEQ ID NO: 88)
FR4: FGGGTKLEIK(SEQ ID NO: 82)

[0168] scFv 3157-C57-R6B-C10的VH链

FR1: EVQLQQSGAELVKPGTSVKLSCKAS(SEQ ID NO: 89)
CDR1: GYTFTRNW(SEQ ID NO: 90)
FR2: ITWVRLRPGQGLEWIGD(SEQ ID NO: 91)
[0169] CDR2: IYPGDAST(SEQ ID NO: 92)
FR3: HYNGKFKNKATLTVDTSSSTAYLQVSSLTSEDSAVYYC(SEQ ID NO: 93)
CDR3: AREQVQFAMFFDV(SEQ ID NO: 94)
FR4: WGTGATVTVSS(SEQ ID NO: 95)

[0170] scFv 3157-C57-R6B-G3的VH链

FR1: QVQLQQPRAELVKPGASVKMSCKAS(SEQ ID NO: 96)
CDR1: GYTFARYW(SEQ ID NO: 97)
FR2: ISWLKLRPGQGLEWIGD(SEQ ID NO: 98)
[0171] CDR2: IYPGDDST(SEQ ID NO: 99)
FR3: HYNGKFKNKATLTVDTSTSTAYIQLSSLTSEDSAVYYC(SEQ ID NO: 100)
CDR3: AREQVQFAMFFDV(SEQ ID NO: 94)
FR4: WGTGATVTVSS(SEQ ID NO: 95)

[0172] scFv 3157-C57-R6B-H10的VLκ链

FR1: DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS(SEQ ID NO: 14)
CDR1: QSIVHSNGNTY(SEQ ID NO: 101)
[0173] FR2: LEWYLQKPGQSPKLLIY(SEQ ID NO: 3)
CDR2: KVS
FR3: NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC(SEQ ID NO: 4)
[0174] CDR3: FQGSHVPPT(SEQ ID NO: 88)
FR4: FGGGTKLEIK(SEQ ID NO: 82)

[0175] scFv 3157-C57-R6B-H10的VH链

FR1: QVQLQQPGAELVRPGSSVKLSCKAS(SEQ ID NO: 7)
CDR1: GYTFTDYW(SEQ ID NO: 8)
FR2: MDWVKQRPGQGLEWIGT(SEQ ID NO: 9)
[0176] CDR2: IYPSDSST(SEQ ID NO: 10)
FR3: HYNQEFKGKATMTVDKSSSTAYMHLGSLTSEDSAVYYC(SEQ ID NO: 102)
CDR3: AREGLAGVFYFDY(SEQ ID NO: 12)
FR4: WGQGTTLTVSS(SEQ ID NO: 13)

[0177] 本公开内容还提供了上述优选抗体的抗体变体，其具有改善的所述抗体的生物学特性，例如更高的结合亲和力。能通过将合适的核苷酸变化引入所述抗体核酸中或通过肽合成来制备所述抗体的氨基酸序列变体。此类修饰包括，例如所述抗体的氨基酸序列内残基的缺失、和/或插入和/或取代。进行缺失、插入和取代的任何组合以实现最终构建体，以使得最终构建体具有所需特征。编码抗体的氨基酸序列变体的核酸分子能通过本领域已知的多种方法制备。这些方法包括但不限于寡核苷酸介导的(或定点)诱变、PCR诱变和抗体的早期制备的变体或非变体(天然)形式的盒式诱变。在一个实施方案中，本发明的抗体的平衡解离常数(K_D)值小于10^{-8}M，特别是小于10^{-9}M或10^{-10}M。结合亲和力可以使用本领域已知的技术(例如ELISA或生物特异性相互作用分析)，或本领域已知的其他技术测定。

[0178] 能按照常规方法检查本文所述的任何抗体以确定它们的性质，例如抗原结合活性、抗原结合特异性和生物学功能。

[0179] 能例如通过聚乙二醇化、糖基化等修饰本文所述的任何抗体以包含本领域已知的并且容易获得的另外地非蛋白质部分。能增强血清半衰期的修饰是感兴趣的。

[0180] 通过免疫产生抗HLA-G抗体

[0181] 在本发明的一个方面，上述免疫原性肽可用作免疫原，用于产生对HLA-G蛋白的α3结构域特异的抗体。

[0182] 为了说明的目的，本发明的抗体或其片段因此可以通过用如上所述的免疫原性肽免疫哺乳动物(特别是啮齿动物，尤其是小鼠或大鼠)来获得。能得出结论，多种哺乳动物基因型适于通过免疫哺乳动物来实施本发明。

[0183] 免疫方案可以包括初免和加强步骤，如下面更详细描述的。

[0184] 因此，本发明还涉及根据本发明的抗体或其抗原结合片段的产生的方法，其包括：

[0185] a.给非人动物施用如上所述的免疫原性肽，

[0186] b.从动物获得的血清或血浆样品中回收引发的抗体并检查它们对HLA-G蛋白的α3结构域的特异性，并且：

[0187] c.任选地，克隆所述回收的抗体，和

[0188] d.任选地，从所述回收的抗体制备抗原结合片段。

[0189] 施用、回收生成的抗体或抗原结合片段以及随后的克隆能通过本领域的常规方法实现。克隆之前使用例如高级测序方法的表征方法也是本领域熟知的。

[0190] 来自回收的抗体的抗原结合片段的制备也能通过本领域的常规方法实现，特别是通过高通量合成技术。

[0191] 用于抗体或抗原结合片段产生的宿主动物能是排除人的哺乳动物，特别是啮齿动

物，特别是小鼠。

[0192] 根据一个具体实施方案，本文公开的产生的方法还包括处死用于产生本发明抗体的所述宿主动物的步骤。

[0193] 根据一个具体实施方案，根据本发明的抗体或其抗原结合片段的产生的方法包括在步骤a中伴随施用佐剂，后者定义为任何成分，特别是化合物，当与施用的抗原或免疫原性抗原片段组合使用时，所述佐剂起到协助、加速、延长或增强抗原特异性免疫应答的作用。佐剂在免疫(或疫苗接种)和免疫疗法领域中是众所周知的。

[0194] 根据特定实施方案，使用初免-加强免疫方案进行上述公开方法步骤a的施用，所述方案意味着第一次施用(初次免疫或初次施用)活性免疫原性试剂，并然后至少一次进一步施用(加强免疫或加强施用)，其在时间上与免疫方案过程中的第一次施用分开。加强免疫包括一次、两次、三次或更多次施用。

[0195] 在一个具体实施方案中，使用的初免-加强免疫方案是同源或异源免疫方案，意味着施用的活性、免疫原性、成分(例如抗体或片段)在初免和加强施用中分别相同或不同。

[0196] 在一个具体实施方案中，包括当进行初次给药时和/或当进行加强免疫时，上述方法的在步骤a中施用活性、免疫原性、成分，与佐剂(例如弗氏佐剂)同时进行。佐剂是本领域熟知的物质。

[0197] 在一个具体实施方案中，在初免和加强免疫中进行佐剂施用，特别是当多肽或其免疫原性片段用于免疫时。

[0198] 可以原样使用或用作设计旨在使用免疫产生抗体或其抗原结合片段的免疫方案的基础的免疫方案的细节在下面的实施例部分中给出。

[0199] 在另一个实施方案中，用编码所述免疫原性肽的核酸或载体免疫哺乳动物，例如通过DNA免疫接种。

[0200] 常见有几种用于DNA免疫的递送方法，例如在盐溶液中肌内或皮内注射所述核酸或载体，其将DNA递送至细胞外空间。该方法可以通过“电穿孔”辅助，其使用生物组织的电刺激来瞬时透化细胞膜。或者，可以使用“基因枪递送”，其涉及通过运用弹道装置用质粒包被的金颗粒轰击皮肤，这使得DNA能够直接递送到细胞质中。或者，可以使用“无针装置”，其依赖于压缩以迫使质粒DNA进入表皮和真皮中的细胞。

[0201] 对于多克隆抗体制备，从免疫的非人动物获得血清，并通过众所周知的技术分离其中存在的抗体。可以使用与固体支持物连接的如上所示的免疫原性肽亲和纯化所述血清，以获得抗HLA-G抗体。

[0202] 在另一个实施方案中，分离来自未免疫的非人哺乳动物的淋巴细胞，在体外生长，然后在细胞培养物中暴露于免疫原。然后收获所述淋巴细胞并进行下述融合步骤。

[0203] 对于单克隆抗体，下一步是从免疫的非人哺乳动物中分离脾细胞，并然后将那些脾细胞与永生化细胞融合以形成产生抗体的杂交瘤，如Harlow等，1988；Hammerling等，1981所描述。

[0204] 或者，能使用任何其他已知技术制备本发明的单克隆抗体或其片段，包括使用重组和噬菌体展示技术，或其组合。

[0205] 所述单克隆抗体或其片段的重组产生涉及在合适的宿主细胞中表达编码所述抗体或其片段的核酸，如下所述。

[0206] 重组产生抗HLA-G抗体

[0207] 本发明还涉及编码本文公开的本发明的抗体或其抗原结合片段的核酸分子。

[0208] 特别地,提供了包含编码如上所述的抗HLA-G抗体的抗体重链可变区(VH)、抗体轻链可变区(VL)或两者的核苷酸序列的核酸。

[0209] 本文描述的CDR的核苷酸序列能容易地设计或测序。

[0210] 为了说明的目的,单克隆抗体15E7的轻链和重链可变区的核苷酸序列分别是SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:38,分别如图2A和3A所示。

[0211] scFv R4C-C3的轻链可变区的核苷酸序列是图4A中所示的SEQ ID NO:41,而R4C-C3重链核苷酸序列,即SEQ ID NO:46,显示在图5A中。

[0212] 进一步描述了用于产生重组抗体或其片段的方法。

[0213] 将编码本发明抗体的重链和轻链的核酸插入表达载体中。所述轻链和重链能克隆在相同或不同的表达载体中。编码免疫球蛋白链的DNA区段与所述表达载体中的控制序列可操作地连接,所述控制序列确保免疫球蛋白多肽的表达。此类控制序列包括信号序列、启动子、增强子和转录终止序列。表达载体通常作为游离基因或作为宿主染色体DNA的组成部分在宿主生物体中可复制。通常,表达载体含有选择标记,例如四环素或新霉素,以允许检测用所需DNA序列转化的那些细胞。

[0214] 在一个实例中,重链和轻链编码序列都包括在一个表达载体中。在另一个实例中,将抗体的每一个重链和轻链克隆到单个载体中。在后一种情况下,编码所述重链和轻链的所述表达载体能共转染到一个宿主细胞中以表达两条链,这些链可以在体内或体外组装形成完整的抗体。或者,能将编码所述重链和编码所述轻链的所述表达载体引入不同的宿主细胞中以表达每一个所述重链和轻链,然后能将其纯化并在体外组装以形成完整的抗体。

[0215] 如本文所述的抗体或其片段可以在原核或真核表达系统中产生,例如细菌、酵母、丝状真菌、昆虫和哺乳动物细胞。本发明的重组抗体不必在真核细胞中糖基化或表达;然而,通常优选在哺乳动物细胞中表达。可用的哺乳动物宿主细胞系的实例是人胚肾细胞系(293细胞)、幼仓鼠肾细胞(BHK细胞)、中国仓鼠卵巢细胞/-或+DHFR(CHO、CHO-S、CHO-DG44、Flp-in CHO)细胞、非洲绿猴肾细胞(VERO细胞)和人肝细胞(Hep G2细胞)。

[0216] 优选哺乳动物组织细胞培养以表达和产生多肽,因为本领域已经开发了许多能够分泌完整免疫球蛋白的合适宿主细胞系,并且包括CHO细胞系、多种Cos细胞系、HeLa细胞、优选骨髓瘤细胞系或转化的B细胞或杂交瘤。

[0217] 这些细胞的表达载体能包括表达控制序列,例如复制起点、启动子和增强子,以及必需的加工信息位点,例如核糖体结合位点、RNA剪接位点、多腺苷酸化位点和转录终止子序列。优选的表达控制序列是衍生自免疫球蛋白基因、SV40、腺病毒、牛乳头瘤病毒、巨细胞病毒等的启动子。

[0218] 含有感兴趣的多核苷酸序列的载体(例如重链和轻链编码序列和表达控制序列)能通过众所周知的方法转移到宿主细胞中,这些方法根据细胞宿主的类型而变化。例如,磷酸钙处理或电穿孔可用于其他细胞宿主。(一般参见Sambrook等,Molecular Cloning:A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Press,2nd ed,1989))。当将重链和轻链克隆到单独的表达载体上时,将所述载体共转染以获得完整免疫球蛋白的表达和组装。

[0219] 用载体转化或转染宿主细胞(例如,通过化学转染或电穿孔方法)并在常规营养培

养基中培养(或适当修饰)以诱导启动子、筛选转化株或扩增编码所需序列的基因。

[0220] 一旦表达,可以进一步分离或纯化本发明的抗体或其片段,以获得基本上同质的制剂,用于进一步的测定和应用。能使用本领域已知的标准蛋白质纯化方法。例如,合适的纯化程序可包括在免疫亲和或离子交换柱上分馏、乙醇沉淀、高效液相色谱(HPLC)、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)、硫酸铵沉淀和凝胶过滤(一般参见Scopes,Protein Purification,Springer-Verlag,NY,1982)。对于药物用途,优选至少约90至95%同质性的基本上纯的免疫球蛋白,并且最优选98至99%或更高的同质性。

[0221] 噬菌体展示方法

[0222] 还能使用噬菌体展示文库和筛选产生具有所需结合特征的抗体。

[0223] 在某些噬菌体展示方法中,通过聚合酶链反应(PCR)分别克隆VH和VL基因的库,并在噬菌体文库中随机重组,然后能如Winter等,Ann.J.Pharmacol,12:433-455(1994)中所述筛选抗原结合噬菌体。噬菌体通常显示抗体片段,作为单链Fv(scFv)片段或作为Fab片段。来自免疫来源的文库提供针对免疫原的高亲和力抗体,而不需要构建杂交瘤。或者,能克隆天然库(例如,来自人)以提供针对多种非自身以及自身抗原的单一抗体来源而无需任何免疫。最后,也能通过从干细胞克隆非重排的V基因区段,并使用含有随机序列的PCR引物以编码高度可变的CDR3区域并在体外完成重排来合成地制备天然文库。

[0224] 治疗用途

[0225] 所述抗HLA-G抗体或其抗原结合片段、编码这些抗体或片段的核酸、或表达这些抗体或片段的载体,可用于治疗诸如癌症或致癌疾病以及相关的或关联的疾病或病症的病理,当这些病理与涉及HLA-G的肿瘤逃逸机制关联。更一般地,所述抗HLA-G抗体或其抗原结合片段可用于治疗涉及宿主中HLA-G蛋白不适当表达的病理。

[0226] 更具体地,本文描述了治疗癌症或病毒感染的方法,该方法包括在有此需要的患者中施用包含以下的组合物:抗HLA-G抗体或其抗原结合片段、编码这些抗体或片段的核酸、或表达这些抗体或片段的载体。

[0227] 所述抗HLA-G抗体或其抗原结合片段可以用作唯一的活性成分,或与另一种治疗方法(例如化学治疗、放射疗法治疗、或包括治疗性疫苗接种的其他免疫疗法治疗)组合使用。

[0228] 这里描述的所述抗HLA-G抗体单独或与其他疗法组合,可用于抵消与HLA-G相关的免疫逃逸机制并强化整体抗肿瘤作用并使癌症患者受益。

[0229] 在一个具体实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段可以是阻断抗体。“阻断抗体”或“中和抗体”是指抑制HLA-G与至少白细胞免疫球蛋白样受体B1(LILRB1/ILT2/CD85j)或LILRB2(ILT4/CD85d)结合的抗体。

[0230] 根据一个具体实施方案,阻止了至少一种或几种下列HLA-G蛋白同种型之间的结合:HLA-G1、HLA-G2、HLA-G5或HLA-G6及其受α3结构域识别的受体。

[0231] 在一个具体实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段阻断表现出α3结构域的HLA-G蛋白与LILRB1或LILRB2受体中的至少一种的结合,特别是阻断所述HLA-G蛋白与LILRB1和LILRB2受体两者的结合。

[0232] 在另一个实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段可以与细胞毒性剂偶联。在一些方面,这种构建体(也称为抗体-药物缀合物或ADC)进一步包含至少一个间隔物或接

头(能是肽接头或非肽接头)。这种接头可以是可切割的或不可切割的。将抗体与细胞毒性剂连接的几种方法是本领域技术人员已知的。ADC通常通过细胞毒性剂与抗体经表面暴露的赖氨酸或由还原链间二硫键产生的游离半胱氨酸的侧链的缀合而产生。

[0233] 细胞毒性剂或细胞毒素能是本领域已知的任何抑制或阻止细胞功能和/或引起细胞破坏(细胞死亡)和/或发挥抗肿瘤/抗增殖作用的分子。已知许多类细胞毒性剂在ADC分子中具有潜在用途。这些包括但不限于:鹅膏亭类(amanitins),奥瑞他汀类(auristatin),柔红霉素类(daunomycins),多柔比星类(doxorubicins),多卡米星类(duocarmycins),多拉司他汀类(dolastatins),烯二炔类(enediynes),来系菌素(lexitropsins),紫杉烷类(taxanes),嘌呤霉素(puromycins),美登素类化合物(maytansinoids),长春花生物碱类(vinca alkaloids),微管菌素(tubulysins)和吡咯并苯二氮卓类(pyrrolobenzodiazepines)。毒素,包括植物毒素和细菌毒素,可用作细胞毒性剂,例如破伤风或白喉毒素、蓖麻毒素、皂苷、内毒素A等

[0234] 在一个具体实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段可以与放射性核素缀合。

[0235] 在另一个实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段可以被工程化(例如修饰或嵌合),使得它们包含促进抗体依赖性细胞介导的毒性(ADCC)或补体依赖的细胞毒性(CDC)的Fc区。已经为此目的描述了许多Fc变体,例如,Lazar等,2006;Moore等,2010。

[0236] 此类抗体或缀合物可用于治疗癌症。

[0237] 癌症是指任何类型的癌症,并且可以优选地选自膀胱癌、肾癌、泌尿生殖系统癌和黑素瘤。癌症疾病或瘤形成的病症的其他非限制性实例是白血病、基底细胞癌、乳腺癌、恶性间皮瘤、光化性角化病、透明细胞肾癌、视网膜母细胞瘤、棘突癌、原位癌、结肠直肠癌、卵巢癌、皮肤T细胞淋巴瘤、子宫内膜腺癌、经典霍奇金淋巴瘤、肺癌、皮肤B细胞淋巴瘤、胃癌、壶腹癌、胆管癌、胰腺导管腺癌、食管鳞状细胞癌、葡萄胎。

[0238] 在病毒感染期间,HLA-G表达的上调形成了一些病毒用于逃避免疫系统破坏的策略的一部分。

[0239] 能根据本发明治疗的病毒感染的非限制性实例是HIV感染、狂犬病毒感染或乙型肝炎或丙型肝炎病毒感染,以及HCMV(人巨细胞病毒)、HSV-1(单纯性疱疹病毒)或IAV(甲型流感病毒(的感染。

[0240] 另一方面,本发明提供一种组合物(例如药物组合物),其含有与药物载体一起配制的如本文所定义的抗体或其片段。如本文所用,“药物载体”包括生理上相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。优选地,所述载体适用于静脉内、肌肉内、皮下、肠胃外、脊柱或表皮施用(例如通过注射或输液)。

[0241] 本发明的组合物能通过本领域已知的多种方法施用。施用途径和/或方式将根据所需结果而变化。

[0242] 所选择的剂量水平将取决于多种因素,包括施用途径、所治疗患者的年龄、性别、体重、病症、一般健康状况和既往病史等。例如,本发明的抗体能是以3次/周至1次/月0.2-20mg/kg的剂量施用。

[0243] 另一方面,所述药剂或疫苗是含有编码所述抗体或片段的核酸的组合物,或含有所述核酸的载体。

[0244] 所述载体可以有利地是病毒载体，例如选自由以下组成的组的载体：逆转录病毒载体、慢病毒载体、腺病毒载体、痘苗病毒载体、痘病毒载体、麻疹病毒载体和腺病毒缔合载体。

[0245] 所述核酸、载体或组合物能直接施用，或者能在施用前包装在脂质体中或包被在胶体金颗粒上。在一个具体实施方案中，编码本发明的抗体的所述核酸能以裸露形式施用。

[0246] 对于遗传免疫，所述疫苗组合物优选通过注射或通过气体驱动的粒子轰击，皮内、皮下、肌肉内施用于肿瘤或任何类型的淋巴器官中，并以有效刺激宿主生物体中免疫应答的量递送。在本发明的一个优选实施方案中，除注射步骤外，施用包括电穿孔步骤，在本文中也称为术语“电转移”。

[0247] 还可以使用脂质体转染、粒子轰击或病毒转导(包括共培养技术)将所述核酸离体施用于淋巴或骨髓细胞。然后将处理过的细胞重新引入待免疫的对象内。

[0248] 在另一方面，所述免疫原性肽、编码所述肽的核酸或表达所述肽的载体用于在患者体内产生抗HLA-G抗体。

[0249] 诊断方法和试剂盒

[0250] 本发明还提供了适用于体外检测HLA-G蛋白或监测或诊断健康状态或病理状况的手段，以及用于监测或诊断健康状态或病理状况的手段，涉及易于呈现这种状态或状况的患者。

[0251] 在一个具体实施方案中，所述病症是癌症或病毒感染。

[0252] 特别地，本发明涉及通过分析先前从易于呈现特定健康状态或具有病理状况的患者获得的样品来检测样品中的HLA-G蛋白和/或监测或诊断健康状态或病理状况的体外方法，所述方法包括：

[0253] a.在能够形成免疫复合物的条件下，使所述样品与本文公开的抗体或其抗原结合片段接触，和

[0254] b.体外检测在所述抗体或其抗原结合片段与HLA-G蛋白之间形成的所得免疫复合物。

[0255] 根据一个具体实施方案，本发明能够体外检测样品中的HLA-G蛋白，例如先前从易于怀孕的患者获得的样品，或从经受器官或组织或细胞移植的患者获得的样品。结果，能进行健康状态(即不一定涉及病理状况存在的生理状态)的监测。因此也能进行病理状况存在或不存在的后续诊断。

[0256] 当先前从易于呈现病理状况的患者获得所述样品时，也可以进行这种病理状况的随后监测或诊断。在一个具体实施方案中，所提到的病理状况是上面公开的那些。

[0257] 本发明还涉及用于如上公开的体外测定或诊断方法的试剂盒，所述试剂盒包括：

[0258] a.本文公开的抗体或其抗原结合片段，

[0259] b.适于在(a)的抗体或其抗原结合片段与待测样品之间形成免疫复合物的试剂；

[0260] c.任选地，适于检测步骤b的免疫复合物形成的试剂。

[0261] HLA-G蛋白的检测可以通过本领域已知的任何技术实现，例如免疫组织化学或液相检测(例如ELISA测定)。根据一个具体实施方案，提供了试剂盒，其包含：(a)具有与其结合的固定化抗HLA-G抗体的支持物，其中所述抗HLA-G抗体是本发明的抗体；(b)具有与其结合的报告分子的可移动的抗HLA-G抗体(其结合所述HLA G蛋白的另一表位)。所述报告分子

可以是以定量或接近定量的方式可检测的任何分子。例如,报告分子可以是比色剂、荧光测定剂、放射性同位素或具有可检测终点的酶促剂。

[0262] 根据本发明的方法可任选地包括通过与HLA-G标准比较生物样品中检测到的标记物的量来测量HLA-G的步骤。

[0263] 根据本发明的方法涉及生物样品。这样的样品可以选自但不限于组织样品,例如肿瘤组织样品、血液样品、接触组织样品的培养基和接触细胞的培养基(例如当使用分离的细胞)、羊水、接触胚胎的培养基。本发明的方法可用于诊断或检测HLA-G指示性病症。在该实施方案中,能将HLA-G指示性病症的对照值与样品中发现的HLA-G的量进行比较。如果HLA-G低或不存在,则可以指示某些病症,而其他病症可以通过增加的HLA-G水平来指示。本领域技术人员可以容易地确定用于诊断病症的指示性水平。此类HLA-G指示性病症可包括但不限于先兆子痫、先兆子痫风险增加、胎儿不良后果、胎儿不良后果风险增加、癌症或癌症发展风险增加。

[0264] 可溶性HLA-G(sHLA-G)也被报道为人体外受精(IVF)中胚胎质量的生物标志物。在一个具体实施方案中,本发明的抗体因此可用于监测胚胎培养上清液(ES)中HLA-G蛋白的存在,以评估在IVF背景下植入成功的可能性。

[0265] 通过参考以下实施例将更容易地理解如上所述的本发明,这些实施例是以举例说明的方式提供的,并不意图限制本发明。

[0266] 缩写

[0267] APC:抗原呈递细胞

[0268] ATCC:美国典型培养物保藏中心

[0269] β2M:β-2-微球蛋白

[0270] BSA:牛血清白蛋白

[0271] CDR:互补决定区

[0272] CFA:完全弗氏佐剂

[0273] CTL:细胞毒性T淋巴细胞

[0274] CTLA-4:细胞毒性T淋巴细胞相关抗原4

[0275] DC:树突状细胞

[0276] DIC:二异丙基碳二亚胺

[0277] DNA:脱氧核糖核酸

[0278] DMEM:Dulbecco的改良Eagle培养基

[0279] ELISA:酶联免疫吸附测定

[0280] EC:有效浓度

[0281] FACS:流式细胞荧光分选技术

[0282] FCS:胎牛血清

[0283] FITC:异硫氰酸荧光素

[0284] FR:框架区

[0285] h:小时

[0286] HAT:次黄嘌呤-氨蝶呤-胸苷

[0287] HES:羟乙基淀粉

[0288] HLA:人白细胞抗原

[0289] HPLC:高效液相色谱

[0290] HRP:辣根过氧化物酶

[0291] ICP:免疫检查点

[0292] ID:身份

[0293] IFA:不完全弗氏佐剂

[0294] IgG:免疫球蛋白G.

[0295] ILT-2:免疫球蛋白样转录物2

[0296] ILT-4:免疫球蛋白样转录物4

[0297] IMDM:Iscove的改良Dulbecco培养基

[0298] IP:腹腔内的

[0299] IPTG:异丙基β-D-1-硫代吡喃半乳糖苷

[0300] IV:静脉内的

[0301] IVF:体外受精

[0302] KDa:千道尔顿

[0303] KIR2DL4:杀伤细胞免疫球蛋白样受体2Ig结构域和长细胞质尾部4(Killer cell Immunoglobulin like Receptor 2 Ig Domains and Long cytoplasmic tail 4)

[0304] KLH:钥孔虫戚血兰素(Keyhole Limpet Hemocyanin)

[0305] LILRB1:白细胞免疫球蛋白样受体B1

[0306] LILRB2:白细胞免疫球蛋白样受体B2

[0307] M:摩尔

[0308] MEM:最小基本培养基

[0309] MHC:主要组织相容性复合物

[0310] mL:毫升

[0311] NK:自然杀伤细胞

[0312] nM:毫微摩尔

[0313] OD:光密度

[0314] ON:过夜

[0315] PAGE:聚丙烯酰胺凝胶电泳

[0316] PBS:磷酸盐缓冲盐水

[0317] PC-1:约束型肽-1

[0318] PCR:聚合酶链反应

[0319] PD-1:程序性细胞死亡蛋白1

[0320] PD-L1:程序化细胞死亡配体1

[0321] PE:藻红素(PhycoErythrin)

[0322] PIR-B:配对免疫球蛋白样受体B

[0323] PS:青霉素/链霉素

[0324] RNA:核糖核酸

[0325] RPM:每分钟转数

[0326] RT:室温

[0327] SB:超级肉汤

[0328] scFv:单链可变片段

[0329] SDS:十二烷基硫酸钠

[0330] Sec:秒

[0331] SEQ:序列

[0332] sHLA-G:可溶性HLA-G

[0333] TBS:Tris缓冲盐水

[0334] TMB:四甲基联苯胺

[0335] UV:紫外线

[0336] V:音量

[0337] VH:可变重链

[0338] VL:可变轻链

[0339] μL:微升

实施例

[0340] 材料和方法

[0341] 肽合成

[0342] 使用DIC作为来自MultiSynTech的Syro上的活化剂,通过Fmoc标准化学合成用于产生单克隆抗体的PC-1肽[VTHHPVFDYEATLRC(SEQ ID NO:56)],随后通过反相HPLC(RP-HPLC)纯化。

[0343] 通过液相色谱-质谱(LCMS)分析PC1肽。

[0344] 免疫原的制备

[0345] 如下通过侧链C-末端半胱氨酸将PC1肽偶联至KLH:5mg肽用于缀合。溶解于PBS中的KLH蛋白(77600,ThermoFisher,Paris,France)用磺基-MBS接头(22312,ThermoFisher,Paris,France)活化。通过透析除去游离接头。将溶解在PBS中的肽与活化的KLH一起孵育。通过透析除去游离肽。将PC-1-KLH复合物溶于PBS 1X(pH7.2)中并储存在-20℃。

[0346] 小鼠免疫

[0347] 从Janvier实验室(Le Genest-St-Isle,France)购买并在Pasteur研究所动物设施(Paris,France)繁殖的两种不同的小鼠品系(C57BL/6J和BALB/cJ)用于免疫。第一次免疫原注射后是在小鼠为7周龄。它们用50μg与KLH偶联的PC-1肽与完全弗氏佐剂(CFA F5881;Sigma,Lyon,France)(v/v)混合的乳液进行腹膜内(IP)免疫,随后1 IP注射10天后用50μgPC-1-KLH与不完全弗氏佐剂(IFA;F5506;Sigma,Lyon,France)混合,并然后在第一次注射后第20、30和185天用25μg PC-1-KLH/IFA注射3次。

[0348] 通过在室温下在黑暗中涡旋30分钟来制备PC1-KLH/CFA或IFA乳液。

[0349] 通过流式细胞术(FACS)和ELISA分析(如下所述),通过免疫后的小鼠的眼球后出血获得的血液监测血浆中的抗体应答。

[0350] 杂交瘤的产生

[0351] 在安乐死前3天用免疫原静脉内(IV)强化小鼠。收获脾脏并纯化脾细胞用于随后

与永生化骨髓瘤细胞系sp2/0-Ag14的融合以获得产生抗体的杂交瘤。基于标准方案(Köhler,G.,C.Milstein.Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity.Nature,1975.256(5517):p.495-7)使用聚乙二醇进行融合。然后将得到的杂交瘤在补充有L-谷氨酰胺(4mM),热灭活的FCS(20%),HAT(次黄嘌呤-氨蝶呤-胸苷,1X),HES(羟乙基淀粉130,2%)和青霉素/链霉素(1%)的选择性DMEM培养基中培养。允许杂交瘤在选择培养基中生长7至14天,用于集落形成和抗体产生。分别通过ELISA和流式细胞术分析评估特异性识别线性和环状PC-1肽的抗体的产生。克隆并培养阳性杂交瘤,以鉴定分泌感兴趣的单克隆抗体的单细胞衍生克隆。

[0352] 噬菌体展示技术

[0353] 构建抗HLA-G单链抗体基因文库

[0354] 在最后一次强化后对每只动物的脾进行取样,以使用Tri Reagent试剂盒(Molecular Research Center Inc.,Cincinnati,USA)根据制造商的说明分离RNA。通过RT-PCR逆转录RNA,并得到的cDNA使用用于扩增编码鼠VH、VLκ和VLλ的DNA的引物通过PCR扩增。首先根据制造商的说明将PCR产物首先克隆到pGEM®-T easy载体(Promega,Madison,Wisconsin)中,得到编码重链(VH)或轻链(VLk+VLλ)的两个抗体基因亚文库。

[0355] 如下进行单链抗体(scFv)文库的构建:首先,将VL(VLk和VLλ)PCR产物克隆到噬菌粒载体pTH中;其次,将VH PCR产物克隆到含有VLk或VLλ库的pTH中。克隆位点含有$(Gly_4Ser)_3$接头序列,其侧翼为用于VH和VL克隆的限制酶位点,接着是六组氨酸标签和c-myc标签。质粒和噬菌粒在大肠杆菌XL1-Blue MRF′细菌(Stratagene,Amsterdam,Netherlands)中生长。收获含有scFv基因文库的转化细菌,并使用Nucleobond Plasmid Midi试剂盒(Macherey-Nagel;Düren,Germany)根据制造商的说明分离来自文库的质粒/噬菌粒,然后等分并储存在-80℃。

[0356] 最终scFv文库的大小由1.2×10^7个克隆构成,这些克隆含有通过PCR确定的约93%的全尺寸插入物。然后使用辅助噬菌体M13K07将细菌文库包装为噬菌体/scFv文库。在30℃和250rpm下16小时产生噬菌体/scFv。通过离心沉淀细胞,并使用聚乙二醇程序沉淀含有噬菌体的上清液。将沉淀的噬菌体重悬浮,通过0.45μM过滤器过滤并在噬菌体滴定前在4℃下储存。

[0357] 筛选文库

[0358] 使用包被在链霉亲和素ELISA高容量平板(15501,片)上的1μg/mL生物素化的PC1肽进行噬菌体/scFv文库的筛选。采用五轮淘选,严格程度越来越高(每次连续一轮淘选进行2、4、8和15次洗涤)。游离HLA-G PC1肽(TBS-吐温20中的10μg/mL,0.1%)用作噬菌体/scFv洗脱的竞争物。为了回收和扩增所选噬菌体,在每轮淘选后用洗脱的噬菌体悬浮液感染指数生长的大肠杆菌培养物。

[0359] 为了评估所选噬菌体的反应性,在每轮淘选后使用生物素化的HLA-G PC1肽作为抗原进行噬菌体-ELISA。第一轮和第二轮淘选后,信号与背景处于同一水平;在第四轮淘选后,信号增加到背景的三倍。根据噬菌体展示技术,这种信号增加对应于特异性结合物的富集。在第五轮淘选后从文库中提取噬菌粒DNA。分离并在深孔微量滴定板(Maxisorp,Nunc,Danemark)上产生96个克隆。通过噬菌体-ELISA方法测试含有噬菌体粒的上清液,并鉴定6种PC1特异性结合物(R4C-C3,R4C-B1,R4C-F2,R4C-F1,R4C-F12和R5C-D8)并测序。

[0360]　scFv产生

[0361]　为了蛋白质表达，将从鉴定的阳性结合物中分离的噬菌粒DNA转化到非抑制性大肠杆菌菌株HB2151中。将从所选平板中随机选择的单菌落接种到5mL补充有羧苄青霉素和葡萄糖(1%)的SB培养基(Super Broth)中。将培养物在37℃搅拌下孵育过夜，并然后转移至更大规模的SB培养物(500μL培养物转移至500mL新鲜SB培养基中)。当培养物达到OD_{600}为1时，通过加入1mM IPTG(异丙基β-D-1-硫代吡喃半乳糖苷)诱导靶蛋白的表达。细胞在16℃生长过夜(ON)，并然后通过离心收获。根据制造商的说明，使用镍柱(Ni-NTA旋转柱，Qiagen,Valencia,CA)提取和纯化scFv。

[0362]　流式细胞术分析

[0363]　细胞系

[0364]　K562细胞是购自ATCC(美国典型培养物保藏中心CCL-243)的人白血病细胞。通过分别用HLA-G1编码载体或相应的模拟载体对K562野生型细胞进行核转染获得K562-G1和K562-PV。将这些细胞系在补充有10%热灭活的FCS和1%青霉素/链霉素的IMDM培养基中培养。

[0365]　表达经典MHC I类分子而非HLA-G的淋巴母细胞样细胞系LCL-DES、LCL-BRO和RPMI8866由D.Wiels(Institut Gustave Roussy,Villejuif,France)友情赠送。将这些细胞培养在补充有10%热灭活的FCS、1%青霉素/链霉素、10mM丙酮酸钠和200g/L D-葡萄糖的RPMI 1640培养基中。

[0366]　Bioplex珠子、受体和单克隆抗体

[0367]　Bioplex珠子(MC10028-01和MC 10062-01)购自Bio-Rad(Mames-la-Coquette，France)，和PE缀合的小鼠IgG1(克隆P.3.6.8.2.1.12-4714)购自eBiosciences(Paris;France)以及FITC缀合的大鼠IgG2a购自BD Biosciences(克隆:R35-95553929,Le Pont de Claix;France)。

[0368]　HLA-G6和HLA-G5蛋白的产生

[0369]　将HLA-G6的α1α3结构域和HLA-G5基因的α1α2α3结构域的编码序列克隆到pAcGP67杆状病毒转移载体中。含有不同插入物的pAcGP67杆状病毒载体的遗传构建和质粒扩增由Genecust(Luxembourg)产生。在Institut Pasteur(Paris,France)的Proteople设施中在DH5细菌宿主中扩增质粒。将转移载体和AcMNPV线性化DNA(来自BD的BaculoGold™)共转染到草地夜蛾(Spodoptera frugiperda)(Sf9)细胞中，所述细胞允许同源位点之间的重组，使插入物从转移载体转移至AcMNPV DNA。产生编码每种蛋白质的重组病毒并用于感染Sf9细胞，该细胞然后产生重组蛋白。

[0370]　一旦表达重组蛋白后，裂解细胞，并将裂解物加入固定的StrepTactin亲和树脂柱中。在几次洗涤步骤以除去非特异性结合的蛋白质后，用2.5mM脱硫生物素洗脱结合的StrepTag蛋白质。通过SDS-PAGE分析纯化的洗脱蛋白质以验证HLA-G5的存在，并然后等分并储存在-20℃。

[0371]　Bioplex珠子的偶联

[0372]　根据供应商的说明，使用Bio-Rad(Mames-la-Coquette;France)提供的试剂盒，用标准胺偶联化学方法，用重组HLA-G5、HLA-G6蛋白或用合成环状cPC-1肽(CTHHPVFDYEATLRC,SEQ ID NO:52)包被Bioplex珠子。分别使用未偶联的珠子或用突变肽

CTHHPVADAEATLRC(SEQ ID NO:62)包被的珠子作为特异性(阴性)对照。

[0373] 设计环状cPC-1肽来模拟由先前的晶体学研究(Clements等人,2005)确定的HLA-G的α3结构域中位置189-203处的VTHHPVFDYEATLRC(SEQ ID NO:56)氨基酸区域的构象结构。通过用半胱氨酸残基取代PC-1肽的N-末端缬氨酸残基获得构象模拟,导致在N-和C-末端半胱氨酸残基之间形成二硫键。

[0374] 分析抗HLA-G血清和单克隆抗体

[0375] 通过流式细胞术评估免疫小鼠血清或克隆形成杂交瘤细胞培养物上清液中的特异性抗HLA-G抗体的检测。首先使用HLA-G5、HLA-G6和cPC-1肽包被的珠子进行流式细胞术。

[0376] 将珠子与不同稀释度的血清或含有单克隆抗体的细胞培养物上清液在室温下孵育1小时,然后洗涤两次并在室温下与PE缀合的山羊抗小鼠IgG抗体(405307,Biolegend,USA)孵育30分钟。使用LSR FORTESSA(Beckton Dickinson,Le Pont-de-Claix,France)进行流式细胞术分析;用FlowJo X软件(Tree star,Ashland,USA)分析数据。为了确定阳性染色珠子的百分比,设置电子门以排除99%的具有同种型对照的荧光珠子。因此,阳性染色珠子被定义为高于99%同种型对照所表现出的染色强度的染色珠子。

[0377] ELISA测定

[0378] 将96孔微量板用PBS中的1μg/mL的PC-1肽(100μL/孔)包被,在室温下孵育过夜,并然后在室温下用150μL/孔的PBS干燥的脱脂乳封闭1小时。用PBS吐温0.05%洗涤一次后,在室温下加入(50μL/孔)稀释的血清或单克隆抗体2小时。将板洗涤三次,并将过氧化物酶(HRP)缀合的山羊抗小鼠IgG以1/10000在PBS-吐温0.05%、1%BSA(50μL/孔)中于室温下加入1小时。洗涤三次后,将板用TMB底物(KPL,Gaithersburg,USA)染色并在OD_{450}读数。

[0379] 对于噬菌体展示,将HLA-G PC1游离肽或与BSA偶联的肽包被在96孔微量滴定板(Maxisorp,Nunc,Danemark)上。使用抗组氨酸标签抗体(Qiagen,Courtaboeuf,France)评估检测。

[0380] 单克隆抗体15E7的其他表征

[0381] 分型

[0382] 根据制造商的说明,使用Clonotyping Southern试剂盒(Clinisciences,Nanterre,France)通过ELISA测定确定15E7同种型。简言之,用捕获抗体(对每种同种型特异)在4℃下包被板过夜,并然后用PBS 0.05%吐温洗涤两次。然后使板在室温下温热,并在室温下加入含有15E7单克隆抗体的杂交瘤上清液1小时。使用1/2000的试剂盒中提供的HRP缀合的抗同种型二抗。将板用TMB底物(Eurobio/KPL,Gaithersburg,USA)染色并在OD_{450}读数。

[0383] 15E7单克隆抗体的产生

[0384] 15E7杂交瘤在小鼠体内作为腹水生长。在充分生长以产生所需的单克隆抗体后,纯化含有单克隆抗体的腹水。使用标准蛋白A-sepharose柱通过色谱法实现纯化。合并含有15E7的洗脱级分,透析,并根据需要浓缩。用UV扫描在OD_{280}确定浓度,并调节至2mg/mL。

[0385] 结合亲和力的确定(BLITZ技术)

[0386] 通过BLITZ技术测定结合亲和力和结合动力学。使用标准胺偶联化学,通过伯胺将15E7单克隆抗体与生物传感器芯片AR2G(Pall ForteBio)共价连接。通过将与15E7偶联的芯片与不同浓度的与BSA偶联的PC-1肽一起孵育来测量结合。遵循抗原-抗体缔合动力学

120秒并且遵循解离动力学100秒。缔合和解离曲线适合1:1。

[0387] 实施例1:在小鼠中产生抗HLA-G抗体

[0388] 免疫原的设计

[0389] 本发明人设计了对应于HLA-G的α3氨基酸区域189-203的高度HLA-G特异性肽,称为“约束型肽:PC-1”(图1A;粗体和下划线),并用于免疫老鼠。

[0390] PC-1序列:VTHHPVFDYEATLRC(SEQ ID NO:56)

[0391] 预期PC-1免疫原来生成对与β2M缔合无关的含有HLA-Gα3的同种型特异性的适合治疗的抗HLA-G单克隆抗体。

[0392] 免疫、杂交瘤生成和scFv产生

[0393] 使用与KLH偶联的PC-1肽的免疫方案描述于材料和方法部分。C57BL/6和BALB/c小鼠用于肽免疫。

[0394] 简而言之,用CFA中的PC-1-KLH缀合物腹膜内初免小鼠,并在IFA中用4IP加强免疫。在免疫程序的不同时间点收集来自免疫小鼠的血清,并使用Bioplex-HLA-G5、HLA-G6和cPC-1偶联的珠子进行测试。对于每个实验,建立阳性和阴性对照以确定获得的多克隆抗体的特异性亲和力。如果与用来自未免疫小鼠的血清标记的那些相比,HLA-G-肽珠子在FACS中显示出峰值移位,则认为血清是阳性的。

[0395] 当用PC-1-KLH肽免疫BALB/c和C57BL/6小鼠时,在每次IP加强后在血清中检测到显著水平的抗HLA-G IgG抗体。图1B显示在从免疫的Balb/c小鼠和未接种的对照小鼠收集的血清存在下获得的HLA-G5-包被的珠子的染色。即使在最低剂量的血清(稀释度1/1000)下,也以剂量依赖性方式显著检测到抗HLA-G抗体。使用对照未偶联珠子未检测到特异性结合(数据未显示)。

[0396] 具有最高抗HLA-G抗体滴度的小鼠用于生成杂交瘤或用于噬菌体展示。

[0397] 如材料和方法部分所述完成融合。随后克隆ELISA阳性杂交瘤并通过ELISA再次确认以检测产生抗HLA-G单克隆抗体的感兴趣的克隆。

[0398] 噬菌体展示过程如材料和方法中详述的那样进行。通过ELISA评估scFv克隆R4C-C3、R4C-B1、R4C-F2、R4C-F1和R5C-D8对HLA-G肽的反应性。R4C-C3和R5C-D8克隆显示出对生物素偶联的PC1肽的高反应性(图1C)。R4C-C3与HLAG蛋白同种型反应。

[0399] 选择杂交瘤克隆15E7和scFv克隆R4C-C3用于进一步分析。

[0400] 实施例2:小鼠单克隆抗体15E7和scFv R4C-C3的遗传表征

[0401] 使用标准PCR和DNA测序方法获得编码单克隆抗体15E7和R4C-C3scFv的轻链和重链可变区的cDNA序列。

[0402] 单克隆抗体15E7

[0403] 15E7的轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列示于图2A中。

[0404] 15E7的重链可变区的核苷酸和氨基酸序列示于图3A中。

[0405] 轻链和重链的最大变异性主要位于称为互补决定区(CDR)的高变区内,其定义了抗体的特异性。如图2A和3A所示,对15E7VL和VH序列的分析分别导致轻链和重链的CDR1、CDR2和CDR3区域的划定。

[0406] 将15E7κ轻链的序列与已知的小鼠种系免疫球蛋白轻链序列进行比较(图2B)。15E7轻链利用来自小鼠种系IGKV1-117的VL区段和来自小鼠种系IGKJ1的JK区段。

[0407] 15E7重链(γ)序列与已知小鼠种系免疫球蛋白重链序列的比较证明15E7重链利用来自小鼠种系IGHV1-61的VH区段、来自小鼠种系IGHJ2的JH区段和来自小鼠种系IGHD4-1的DH区段(图3B)。

[0408] 这些氨基酸序列比较突出了15E7的重链(93.1%)和轻链(94.6%)与相应的小鼠种系的强同源性。轻链序列的变化分布在整个FR1和FR4以及CDR1和CDR3区(图2B),而重链序列的变异主要局限于CDR区和FR3(图3B)。因此,这些结果证明15E7单克隆抗体是经历亲和力成熟过程并且对特定HLA-G表位获得强特异性/亲和力的小鼠IgG。

[0409] scFv克隆R4C-C3

[0410] scFv R4C-C3的轻链可变区的核苷酸和氨基酸序列示于图4A中。

[0411] R4C-C3重链核苷酸和氨基酸序列如图5A所示。分析scFv R4C-C3的VL和VH序列,并如图4A和5A所示划定出轻链和重链的CDR区。

[0412] 将scFv R4C-C3κ轻链的序列与已知的小鼠种系免疫球蛋白轻链序列进行比较。该比对证明scFv R4C-C3轻链利用来自小鼠种系IGKV1-110的VL区段和来自小鼠种系IGKJ1的JK区段。scFv R4C-C3与其相应的小鼠种系区段之间的序列比对显示在图4B和5B中。

[0413] scFv重链(γ)序列与已知小鼠种系免疫球蛋白重链序列的比较证明该链利用来自小鼠种系IGHV1S126的VH区段、来自小鼠种系IGHJ2的JH区段和来自小鼠种系IGHD2-12的DH区段。scFv R4C-C3VH和相应的小鼠种系之间的序列比对显示在图5B中。这些氨基酸比对显示scFv R4C-C3的轻链和重链序列与种系序列具有96.4%和82.8%的同源性。轻链序列的变化主要位于CDR3区(图4B),而重链序列的变化分布在整个FR1、FR2、FR3和所有CDR中(图5B)。重链序列中的高突变率证明scFv R4C-C3已经历亲和力成熟过程并获得对HLA-G衍生肽的强亲和力。

[0414] 实施例3:抗HLA-G单克隆抗体15E7的表征

[0415] 蛋白质分析

[0416] 通过SDS-PAGE凝胶电泳分析15E7单克隆抗体(图6A)。重链分子量约为50kDa,轻链约为25kDa。每个具有两个拷贝,15E7的分子量估计为150kDa,证实单克隆抗体15E7属于鼠IgG 2a类。

[0417] 同种型和亲和力确定

[0418] 通过ELISA评估15E7的同种型。确定15E7同种型是IgG2a。

[0419] 如材料和方法部分中所述,通过BLITZ技术评估15E7的亲和力。代表性数据显示在图6B中。将从5至600nM多种浓度的与BSA缀合的PC-1肽与偶联于生物传感器芯片的15E7一起孵育。对于每种浓度,测量缔合(k_a)和解离(k_d)速率并用于计算亲和常数KD(k_a/k_d),在此评估为1.57nM。

[0420] 对HLA-G蛋白和肽的特异性

[0421] 为了确定15E7与HLA-G5和G6蛋白和cPC-1肽的反应性,进行基于流式细胞术的滴定。

[0422] 在无h2M的HLA-G5;HLA-G6和cPC-1肽包被的珠子以及它们的阴性对应物(未偶联的珠子或用突变的肽包被的珠子)上连续稀释来滴定15E7抗体。图7A、7B和7C中描绘的结果显示15E7分别强烈结合EC_{50}值2ng/mL的cPC-1肽、EC_{50}值为28ng/mL的重组HLA-G5蛋白和EC_{50}值120ng/mL的重组蛋白HLA-G6。该分析证明了15E7特异性结合不同的无β2M的HLA-G同种型

的能力。

[0423] 还评估了15E7结合在细胞表面上表达的无β2M的HLA-G1同种型的能力。实际上，将表达无HLA-G1同种型的K562-G1和K562-PV细胞与15E7抗体的连续稀释液一起孵育，并且与同种型对照(IgG2a)相比，通过流式细胞术分析特异性结合。图8中描绘的结果显示15E7特异性结合K562-G1细胞但不结合K562-PV细胞，EC50值为5.0μg/mL。

[0424] 温和的酸处理释放细胞表面β2M分子，留下附着于细胞表面的HLA I类游离重链(Polakova等，1993；Storkus等，1993)。使用针对天然HLA-G/β2M复合物的MEM-G/9mAb，通过流式细胞术分析HLA-G抗原在未处理和pH3.0处理的K562-G1细胞上的表达。另外，使用针对人β2m的mAb来控制实验并验证后者的释放。MEM-G/9mAb以及抗β2M mAb与未处理的K562-G1细胞结合，然而，酸处理降低了它们的结合。相反，15E7mAb的标记增加表明其识别无β2M的HLA-G重链(图9A)。K562-PV细胞用作阴性对照(图9B)。

[0425] 对表达内源性HLA-G1/β2M复合物的JEG-3细胞进行相同的实验。15E7mAb不结合未处理的JEG-3细胞，但是酸处理后染色增加，而MEM-G/9和抗β2M mAb的染色降至接近背景值(图9C)。

[0426] 这些结果证实15E7Mab识别免疫原性cPC-1肽和在β2M不存在下在细胞表面HLA-G上表达的表位。

[0427] 对经典MHCI类分子没有交叉反应性

[0428] 如上所述，开发抗HLA-G单克隆抗体的主要问题之一是获得对HLA-G的高度特异性抗体，而其对经典MHC I类(MHC-I)分子没有交叉反应性。使用不表达HLA-G的不同人MHC-1阳性细胞系，通过流式细胞术评估15E7对HLA-G的特异性及其缺乏与经典MHC-I分子的交叉反应性。

[0429] 实际上，在其表面表达人经典MHC-I分子但不表达HLA-G的人淋巴瘤细胞系(LCL-DES、LCL-BRO和RPMI8866)，用固定浓度的15E7(20μg/mL；133nM)染色。使用该浓度，因为80％的K562-G1细胞被染色，并且在该剂量下未检测到与同种型对照的非特异性结合。K562-G1和K562-PV细胞分别用作阳性和阴性对照。图10显示15E7强烈结合表达HLA-G1的细胞(K562-G1)，而表达经典MHC-I分子的HLA-G阴性细胞未染色。它证明15E7单克隆抗体对HLA-G蛋白具有特异性，并且不存在与经典MHC I类分子的任何交叉反应性。

[0430] <u>讨论</u>

[0431] 目前的工作，展示了如何基于HLA-G肽免疫方法产生抗HLA-G抗体。用于免疫的肽(PC-1)被设计为与经典MHC I类分子相比对HLA-G具有高度特异性，并且含有参与全长HLA-G与其受体LILRB1和LILRB2相互作用的氨基酸。

[0432] 本发明人表明，尽管该HLA-Gα3区域具有疏水性，但有可能使用不同的技术，融合(杂交瘤的产生)和噬菌体展示来开发抗HLA-G单克隆抗体。

[0433] 上述抗HLA-G抗体能够识别几种HLA-G同种型。这些抗体与内源性细胞表面无β2M的HLA-G1结合。由于它们不与经典的MHC I类分子交叉反应，因此这些HLA-G特异性抗体能用于诊断和治疗目的。

[0434] 参考文献

[0435] Agaugue S，Carosella ED，Rouas-Freiss N.Role of HLA-G in tumor escape through expansion of myeloid-derived suppressor cells and cytokinic balance in favor of Th2-versus Th1/Th17.Blood 2011;117:7021-31.

[0436] Altschul SF,Gish W,Miller W,Myers EW,Lipman DJ.Basic local alignment search tool.J Mol Biol1990;215:403-10.

[0437] Altschul SF,Madden TL,Schäffer AA,Zhang J,Zhang Z,Miller W,Lipman DJ.Gapped BLAST and PSI-BLAST:a new generation of protein database search programs.Nucleic Acids Res 1997;25:3389-402.

[0438] Blaschitz A,Hutter H,Leitner V,Pilz S,Wintersteiger R,Dohr G,Sedlmayr P.Reaction patterns of monoclonal antibodies to HLA-G in human tissues and on cell lines:a comparative study.Hum Immunol2000;61:1074-85.

[0439] Carosella ED,et al.,HLA-G:from biology to clinical benefits.Trends Immunol 2008;29:125-32.

[0440] Carosella ED,et al.,Beyond the increasing complexity of the immunomodulatory HLA-G molecule.Blood 2008;111:4862-70.

[0441] Carosella ED,et al.,HLA-G:An Immune Checkpoint Molecule.Adv Immunol 2015;127:33-144.

[0442] Clements CS,Kjer-Nielsen L,Kostenko L,Hoare HL,Dunstone MA,Moses E,Freed K,Brooks AG,Rossjohn J,McCluskey J.Crystal structure of HLA-G:a nonclassical MHC class I molecule expressed at the fetal-maternal interface.Proc Natl Acad Sci USA 2005;102:3360-5.

[0443] Desai SA,et al.,Structural relatedness of distinct determinants recognized by monoclonal antibody TP25.99 on beta 2-microglobulin-associated and beta 2-microglobulin-free HLA class I heavy chains.J Immunol 2000;165:3275-83.

[0444] Ellis SA,Palmet MS,McMichael AJ.Human trophoblast and the choriocarcinoma cell line BeWo express a truncated HLA Class I molecule.J Immunol 1990;144:731-5.

[0445] Favier,B.,HoWangYin KY,Wu J,Caumartin J,Daouya M,Horuzsko A,Carosella ED,LeMaoult J.Tolerogenic function of dimeric forms of HLA-G recombinant proteins:a comparative study in vivo.PLoS One 2011;6:e21011.

[0446] Geraghty DE,Koller BH,Orr HR A human major histocompatibility complex class I gene that encodes a protein with a shortened cytoplasmic segment.Proc Natl Acad Sci USA 1987.84:9145-9.

[0447] HoWangYin KY,Loustau M,Wu J,Alegre E,Daouya M,Caumartin J,Sousa S,Horuzsko A,Carosella ED.LeMaoult J.Multimeric structures of HLA-G isoforms function through differential binding to LILRB receptors.Cell Mol Life Sci 2012;69:4041-9

[0448] Karlin S,Altschul SF.Methods for assessing the statistical significance of molecular sequence features by using general scoring schemes.Proc Natl Acad Sci USA 1990;87:2264-8.

[0449] Karlin S,Altschul SF.Applications and statistics for multiple high-scoring segments in molecular sequences.Proc Natl Acad Sci USA 1993;90:5873-7.

[0450] Lazar GA,Dang W,Karki S,Vafa O,Peng JS,Hyun L,Chan C,Chung HS,Eivazi A,Yoder SC,Vielmetter J,Carmichael DF,Hayes RJ,Dahiyat BI.Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function.Proc Natl Acad Sci U S A.2006;103:4005-4010.

[0451] Liang S,Baibakov B,Horuzsko A.HLA-G inhibits the functions of murine dendritic cells via the PIR-B immune inhibitory receptor.Eur J Immunol 2002;32:2418-26.

[0452] Menier C,et al.,Characterization of monoclonal antibodies recognizing HLA-G or HLA-E:new tools to analyze the expression of nonclassical HLA class I molecules.Hum Immunol 2003;64:315-26.

[0453] Moore GL,Chen H,Karki S,Lazar GA.Engineered Fc variant antibodies with enhanced ability to recruit complement and mediate effector functions.MAbs.2010Mar-Apr;2(2):181-9.

[0454] Moy FJ,et al.,Analysis by NMR spectroscopy of the struetural homology between the linear and the cyclic peptide recognized by anti-human leukocyte antigen class I monoclonal antibody TP25.99*.J Biol Chem 2000;275:24679-85.

[0455] Naji A,et al.,Binding of HLA-G to ITIM-bearing Ig-like transcript 2 receptor suppresses B cell responses.J Immunol 2014;192:1536-46.

[0456] Polakova K,Karpatova M,Russ G.Dissociation of beta 2-microglobulin is responsible for selective reduction of HLA class I antigenicity following acid treatment of cells.Mol Immunol 1993;30:1223-30.

[0457] Qiu J,et al.,Soluble HLA-G expression and renal graft acceptance.Am J Transplant 2006;6:2152-6.

[0458] Storkus WJ,Zej HJ,Salter RD,Lotze MT.Identification of T-cell epitopes:rapid isolation of class I-presented peptides from viable cells by mild acid elution.J Immunother Emphasis Tumor Immunol 1993;14:94-103.

[0459] Tanabe M,Sekimata M,Ferrone S,Takiguchi M.Structural and functional analysis of monomorphic determinants recognized by monoclonal antibodies reacting with the HLA class I alpha 3 domain.J Immunol 1992;148:3202-9.

[0460] Tripathi P,Agrawal S.The role of human leukocyte antigen E and G in HIV infection.AIDS 2007;21:1395-404

[0461] Yan WH,HLA-G expression in cancers:potential role in diagnosis,prognosis and therapy.Endocr Metab Immune Disord Drug Targets 2011;11:76-89

[0001] 序列表
[0002] <110> 英韦克泰斯公司
[0003] <120> 抗HLA-G特异性抗体
[0004] <130> B2258PC00
[0005] <160> 102
[0006] <170> PatentIn version 3.5
[0007] <210> 1
[0008] <211> 26
[0009] <212> PRT
[0010] <213> 小鼠
[0011] <400> 1
[0012] Asp Val Leu Met Thr Gln Ile Pro Phe Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
[0013] 1 5 10 15
[0014] Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
[0015] 20 25
[0016] <210> 2
[0017] <211> 11
[0018] <212> PRT
[0019] <213> 小鼠
[0020] <400> 2
[0021] Gln Ser Ile Val His Arg Ser Gly Asn Thr Tyr
[0022] 1 5 10
[0023] <210> 3
[0024] <211> 17
[0025] <212> PRT
[0026] <213> 小鼠
[0027] <400> 3
[0028] Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
[0029] 1 5 10 15
[0030] Tyr
[0031] <210> 4
[0032] <211> 36
[0033] <212> PRT
[0034] <213> 小鼠
[0035] <400> 4
[0036] Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
[0037] 1 5 10 15
[0038] Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly

[0039] 20 25 30

[0040] Val Tyr Tyr Cys

[0041] 35

[0042] <210> 5

[0043] <211> 9

[0044] <212> PRT

[0045] <213> 小鼠

[0046] <400> 5

[0047] Phe Gln Gly Ser His Leu Pro Pro Thr

[0048] 1 5

[0049] <210> 6

[0050] <211> 9

[0051] <212> PRT

[0052] <213> 小鼠

[0053] <400> 6

[0054] Phe Gly Gly Thr Thr Leu Glu Ile Lys

[0055] 1 5

[0056] <210> 7

[0057] <211> 25

[0058] <212> PRT

[0059] <213> 小鼠

[0060] <400> 7

[0061] Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser

[0062] 1 5 10 15

[0063] Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser

[0064] 20 25

[0065] <210> 8

[0066] <211> 8

[0067] <212> PRT

[0068] <213> 小鼠

[0069] <400> 8

[0070] Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Trp

[0071] 1 5

[0072] <210> 9

[0073] <211> 17

[0074] <212> PRT

[0075] <213> 小鼠

[0076] <400> 9

[0077] Met Asp Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

[0078] 1 5 10 15

[0079] Thr

[0080] <210> 10

[0081] <211> 8

[0082] <212> PRT

[0083] <213> 小鼠

[0084] <400> 10

[0085] Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Ser Thr

[0086] 1 5

[0087] <210> 11

[0088] <211> 38

[0089] <212> PRT

[0090] <213> 小鼠

[0091] <400> 11

[0092] His Tyr Asn Gln Glu Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys

[0093] 1 5 10 15

[0094] Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp

[0095] 20 25 30

[0096] Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

[0097] 35

[0098] <210> 12

[0099] <211> 13

[0100] <212> PRT

[0101] <213> 小鼠

[0102] <400> 12

[0103] Ala Arg Glu Gly Leu Ala Gly Val Phe Tyr Phe Asp Tyr

[0104] 1 5 10

[0105] <210> 13

[0106] <211> 11

[0107] <212> PRT

[0108] <213> 小鼠

[0109] <400> 13

[0110] Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

[0111] 1 5 10

[0112] <210> 14

[0113] <211> 26

[0114] <212> PRT

[0115] <213> 小鼠

[0116] <400> 14

[0117] Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
[0118] 1 5 10 15
[0119] Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
[0120] 20 25
[0121] <210> 15
[0122] <211> 11
[0123] <212> PRT
[0124] <213> 小鼠
[0125] <400> 15
[0126] Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
[0127] 1 5 10
[0128] <210> 16
[0129] <211> 17
[0130] <212> PRT
[0131] <213> 小鼠
[0132] <400> 16
[0133] Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
[0134] 1 5 10 15
[0135] Tyr
[0136] <210> 17
[0137] <211> 36
[0138] <212> PRT
[0139] <213> 小鼠
[0140] <400> 17
[0141] Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
[0142] 1 5 10 15
[0143] Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly
[0144] 20 25 30
[0145] Val Tyr Phe Cys
[0146] 35
[0147] <210> 18
[0148] <211> 9
[0149] <212> PRT
[0150] <213> 小鼠
[0151] <400> 18
[0152] Ser Gln Ser Thr His Phe Pro Pro Thr
[0153] 1 5
[0154] <210> 19
[0155] <211> 10

[0156] <212> PRT

[0157] <213> 小鼠

[0158] <400> 19

[0159] Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Ile

[0160] 1 5 10

[0161] <210> 20

[0162] <211> 9

[0163] <212> PRT

[0164] <213> 小鼠

[0165] <400> 20

[0166] Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Thr

[0167] 1 5

[0168] <210> 21

[0169] <211> 10

[0170] <212> PRT

[0171] <213> 小鼠

[0172] <400> 21

[0173] Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

[0174] 1 5 10

[0175] <210> 22

[0176] <211> 25

[0177] <212> PRT

[0178] <213> 小鼠

[0179] <400> 22

[0180] Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gln Leu Val Arg Pro Gly Ala

[0181] 1 5 10 15

[0182] Ser Val Lys Ile Pro Cys Lys Ala Ser

[0183] 20 25

[0184] <210> 23

[0185] <211> 8

[0186] <212> PRT

[0187] <213> 小鼠

[0188] <400> 23

[0189] Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr Trp

[0190] 1 5

[0191] <210> 24

[0192] <211> 17

[0193] <212> PRT

[0194] <213> 小鼠

[0195] <400> 24
[0196] Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
[0197] 1 5 10 15
[0198] Met
[0199] <210> 25
[0200] <211> 8
[0201] <212> PRT
[0202] <213> 小鼠
[0203] <400> 25
[0204] Ile Ala Pro Ser Asp Ser Asp Ser
[0205] 1 5
[0206] <210> 26
[0207] <211> 38
[0208] <212> PRT
[0209] <213> 小鼠
[0210] <400> 26
[0211] Arg Leu Asn Gln Asn Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys
[0212] 1 5 10 15
[0213] Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp
[0214] 20 25 30
[0215] Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[0216] 35
[0217] <210> 27
[0218] <211> 14
[0219] <212> PRT
[0220] <213> 小鼠
[0221] <400> 27
[0222] Ala Arg Glu Gly Val Thr Met Ile Thr Thr Gly Leu Asp Tyr
[0223] 1 5 10
[0224] <210> 28
[0225] <211> 11
[0226] <212> PRT
[0227] <213> 小鼠
[0228] <400> 28
[0229] Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
[0230] 1 5 10
[0231] <210> 29
[0232] <211> 275
[0233] <212> PRT

[0234] <213> 人类

[0235] <400> 29

[0236] Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Ser Ala Ala Val Ser Arg Pro Gly

[0237] 1 5 10 15

[0238] Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Met Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln

[0239] 20 25 30

[0240] Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ser Ala Cys Pro Arg Met Glu Pro Arg

[0241] 35 40 45

[0242] Ala Pro Trp Val Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Glu Thr

[0243] 50 55 60

[0244] Arg Asn Thr Lys Ala His Ala Gln Thr Asp Arg Met Asn Leu Gln Thr

[0245] 65 70 75 80

[0246] Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Ser Ser His Thr Leu Gln

[0247] 85 90 95

[0248] Trp Met Ile Gly Cys Asp Leu Gly Ser Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly

[0249] 100 105 110

[0250] Tyr Glu Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Leu Ala Leu Asn Glu

[0251] 115 120 125

[0252] Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Gln Ile Ser Lys

[0253] 130 135 140

[0254] Arg Lys Cys Glu Ala Ala Asn Val Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr Leu

[0255] 145 150 155 160

[0256] Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu His Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys

[0257] 165 170 175

[0258] Glu Met Leu Gln Arg Ala Asp Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His

[0259] 180 185 190

[0260] Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe

[0261] 195 200 205

[0262] Tyr Pro Ala Glu Ile Ile Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln

[0263] 210 215 220

[0264] Thr Gln Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr

[0265] 225 230 235 240

[0266] Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg

[0267] 245 250 255

[0268] Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Met Leu

[0269] 260 265 270

[0270] Arg Trp Lys

[0271] 275

[0272] <210> 30

[0273] <211> 275

[0274] <212> PRT

[0275] <213> 人类

[0276] <400> 30

[0277] Gly Ser His Ser Leu Lys Tyr Phe His Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly

[0278] 1 5 10 15

[0279] Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ser Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln

[0280] 20 25 30

[0281] Phe Val Arg Phe Asp Asn Asp Ala Ala Ser Pro Arg Met Val Pro Arg

[0282] 35 40 45

[0283] Ala Pro Trp Met Glu Gln Glu Gly Ser Glu Tyr Trp Asp Arg Glu Thr

[0284] 50 55 60

[0285] Arg Ser Ala Arg Asp Thr Ala Gln Ile Phe Arg Val Asn Leu Arg Thr

[0286] 65 70 75 80

[0287] Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Leu Gln

[0288] 85 90 95

[0289] Trp Met His Gly Cys Glu Leu Gly Pro Asp Gly Arg Phe Leu Arg Gly

[0290] 100 105 110

[0291] Tyr Glu Gln Phe Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Leu Thr Leu Asn Glu

[0292] 115 120 125

[0293] Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Val Asp Thr Ala Ala Gln Ile Ser Glu

[0294] 130 135 140

[0295] Gln Lys Ser Asn Asp Ala Ser Glu Ala Glu His Gln Arg Ala Tyr Leu

[0296] 145 150 155 160

[0297] Glu Asp Thr Cys Val Glu Trp Leu His Lys Tyr Leu Glu Lys Gly Lys

[0298] 165 170 175

[0299] Glu Thr Leu Leu His Leu Glu Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His

[0300] 180 185 190

[0301] Pro Ile Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe

[0302] 195 200 205

[0303] Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Gln Asp Gly Glu Gly His

[0304] 210 215 220

[0305] Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr

[0306] 225 230 235 240

[0307] Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg

[0308] 245 250 255

[0309] Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Val Thr Leu

[0310] 260 265 270

[0311] Arg Trp Lys

[0312] 275

[0313] <210> 31

[0314] <211> 275

[0315] <212> PRT

[0316] <213> 人类

[0317] <400> 31

[0318] Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Phe Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly

[0319] 1 5 10 15

[0320] Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln

[0321] 20 25 30

[0322] Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg

[0323] 35 40 45

[0324] Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr

[0325] 50 55 60

[0326] Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln Thr His Arg Val Asp Leu Gly Thr

[0327] 65 70 75 80

[0328] Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Val Gln

[0329] 85 90 95

[0330] Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly

[0331] 100 105 110

[0332] Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu

[0333] 115 120 125

[0334] Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala Gln Thr Thr Lys

[0335] 130 135 140

[0336] His Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu

[0337] 145 150 155 160

[0338] Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys

[0339] 165 170 175

[0340] Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys Thr His Met Thr His His

[0341] 180 185 190

[0342] Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe

[0343] 195 200 205

[0344] Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln

[0345] 210 215 220

[0346] Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr

[0347] 225 230 235 240

[0348] Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg

[0349] 245 250 255

[0350] Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu

[0351] 260 265 270

[0352] Arg Trp Glu

[0353] 275

[0354] <210> 32

[0355] <211> 275

[0356] <212> PRT

[0357] <213> 人类

[0358] <400> 32

[0359] Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Tyr Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly

[0360] 1 5 10 15

[0361] Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ser Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln

[0362] 20 25 30

[0363] Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Pro Arg Glu Glu Pro Arg

[0364] 35 40 45

[0365] Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Arg Asn Thr

[0366] 50 55 60

[0367] Gln Ile Tyr Lys Ala Gln Ala Gln Thr Asp Arg Glu Ser Leu Arg Asn

[0368] 65 70 75 80

[0369] Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Leu Gln

[0370] 85 90 95

[0371] Ser Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Pro Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly

[0372] 100 105 110

[0373] His Asp Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu

[0374] 115 120 125

[0375] Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Gln Ile Thr Gln

[0376] 130 135 140

[0377] Arg Lys Trp Glu Ala Ala Arg Glu Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr Leu

[0378] 145 150 155 160

[0379] Glu Gly Glu Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys

[0380] 165 170 175

[0381] Asp Lys Leu Glu Arg Ala Asp Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His

[0382] 180 185 190

[0383] Pro Ile Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe

[0384] 195 200 205

[0385] Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln

[0386] 210 215 220

[0387] Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Arg Thr

[0388] 225 230 235 240

[0389] Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg

[0390] 245 250 255

[0391] Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu

[0392] 260 265 270

[0393] Arg Trp Glu

[0394] 275

[0395] <210> 33

[0396] <211> 274

[0397] <212> PRT

[0398] <213> 人类

[0399] <400> 33

[0400] Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Cys Thr Ala Val Ser Arg Pro Gly

[0401] 1 5 10 15

[0402] Arg Gly Glu Pro His Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln

[0403] 20 25 30

[0404] Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Asp Glu Ser Pro Arg Gly Glu Pro Arg

[0405] 35 40 45

[0406] Ala Pro Trp Val Glu Arg Lys Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Arg Glu Thr

[0407] 50 55 60

[0408] Gln Lys Tyr Lys Pro Gln Ala Gln Thr Asp Arg Val Ser Leu Arg Asn

[0409] 65 70 75 80

[0410] Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Ile Ile Arg

[0411] 85 90 95

[0412] Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Pro Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly Tyr

[0413] 100 105 110

[0414] Asp Gln His Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu Asp

[0415] 115 120 125

[0416] Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asn Thr Ala Ala Gln Ile Thr Gln Arg

[0417] 130 135 140

[0418] Lys Trp Glu Ala Ala Arg Glu Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu Glu

[0419] 145 150 155 160

[0420] Gly Leu Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Lys Asn Gly Lys Glu

[0421] 165 170 175

[0422] Thr Leu Gln Gly Ala Glu His Pro Lys Thr His Val Thr His His Pro

[0423] 180 185 190

[0424] Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr

[0425] 195 200 205

[0426] Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Trp Asp Gly Glu Asp Gln Thr

[0427] 210 215 220

[0428] Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe

[0429] 225 230 235 240
[0430] Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg Tyr
[0431] 245 250 255
[0432] Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Thr Leu Arg
[0433] 260 265 270
[0434] Trp Glu
[0435] <210> 34
[0436] <211> 275
[0437] <212> PRT
[0438] <213> 人类
[0439] <400> 34
[0440] Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Tyr Thr Ala Met Ser Arg Pro Gly
[0441] 1 5 10 15
[0442] Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Thr Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Leu
[0443] 20 25 30
[0444] Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Thr Ser Pro Arg Lys Glu Pro Arg
[0445] 35 40 45
[0446] Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Arg Glu Thr
[0447] 50 55 60
[0448] Gln Ile Ser Lys Thr Asn Thr Gln Thr Tyr Arg Glu Asn Leu Arg Thr
[0449] 65 70 75 80
[0450] Ala Ala Arg Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Ile Ile Gln
[0451] 85 90 95
[0452] Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Pro Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly
[0453] 100 105 110
[0454] Tyr Asp Gln Asp Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu
[0455] 115 120 125
[0456] Asp Leu Ser Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Gln Ile Thr Gln
[0457] 130 135 140
[0458] Arg Lys Trp Glu Ala Ala Arg Val Ala Glu Gln Asp Arg Ala Tyr Leu
[0459] 145 150 155 160
[0460] Glu Gly Leu Cys Val Glu Ser Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys
[0461] 165 170 175
[0462] Glu Thr Leu Gln Arg Ala Asp Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His
[0463] 180 185 190
[0464] Pro Ile Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ser Leu Gly Phe
[0465] 195 200 205
[0466] Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln
[0467] 210 215 220

[0468] Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Arg Thr
[0469] 225 230 235 240
[0470] Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg
[0471] 245 250 255
[0472] Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu
[0473] 260 265 270
[0474] Arg Trp Glu
[0475] 275
[0476] <210> 35
[0477] <211> 336
[0478] <212> DNA
[0479] <213> 小鼠
[0480] <400> 35
[0481] gatgttttga tgacccaaat tccattctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60
[0482] atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagaagtg gaaacaccta tttagagtgg 120
[0483] tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctcctgatct acaaagtttc caaccgattt 180
[0484] tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240
[0485] agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatcttcct 300
[0486] ccgacgttcg gtggaggcac cacgctggaa atcaaa 336
[0487] <210> 36
[0488] <211> 100
[0489] <212> PRT
[0490] <213> 小鼠
[0491] <400> 36
[0492] Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
[0493] 1 5 10 15
[0494] Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
[0495] 20 25 30
[0496] Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
[0497] 35 40 45
[0498] Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
[0499] 50 55 60
[0500] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[0501] 65 70 75 80
[0502] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
[0503] 85 90 95
[0504] Ser His Val Pro
[0505] 100
[0506] <210> 37

[0507] <211> 12

[0508] <212> PRT

[0509] <213> 小鼠

[0510] <400> 37

[0511] Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

[0512] 1 5 10

[0513] <210> 38

[0514] <211> 360

[0515] <212> DNA

[0516] <213> 小鼠

[0517] <400> 38

[0518] caggtccaac tgcagcagcc tggggctgaa ctggtgaggc ctgggtcttc agtgaagctg 60

[0519] tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc gactactgga tggattgggt gaagcagagg 120

[0520] cctggacaag gccttgaatg gattggtacc atttaccctt ctgatagttc aactcactac 180

[0521] aatcaagagt tcaagggcaa ggccacaatg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240

[0522] atgcatctca gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagagaggga 300

[0523] ctagctgggg tgttctactt tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctcctca 360

[0524] <210> 39

[0525] <211> 98

[0526] <212> PRT

[0527] <213> 小鼠

[0528] <400> 39

[0529] Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser

[0530] 1 5 10 15

[0531] Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

[0532] 20 25 30

[0533] Trp Met Asp Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

[0534] 35 40 45

[0535] Gly Asn Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Glu Thr His Tyr Asn Gln Lys Phe

[0536] 50 55 60

[0537] Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

[0538] 65 70 75 80

[0539] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

[0540] 85 90 95

[0541] Ala Arg

[0542] <210> 40

[0543] <211> 15

[0544] <212> PRT

[0545] <213> 小鼠

[0546] <400> 40

[0547] Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

[0548] 1 5 10 15

[0549] <210> 41

[0550] <211> 336

[0551] <212> DNA

[0552] <213> 小鼠

[0553] <400> 41

[0554] gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

[0555] atctcttgca gatctagtca gagccttgta cacagtaatg gaaacaccta tttacattgg 120

[0556] tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctcctgatct acaaagtctc caaccgattt 180

[0557] tctggggtcc ctgacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

[0558] agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acattttcct 300

[0559] ccgacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcata 336

[0560] <210> 42

[0561] <211> 100

[0562] <212> PRT

[0563] <213> 小鼠

[0564] <400> 42

[0565] Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

[0566] 1 5 10 15

[0567] Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

[0568] 20 25 30

[0569] Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

[0570] 35 40 45

[0571] Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

[0572] 50 55 60

[0573] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

[0574] 65 70 75 80

[0575] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser

[0576] 85 90 95

[0577] Thr His Val Pro

[0578] 100

[0579] <210> 43

[0580] <211> 12

[0581] <212> PRT

[0582] <213> 小鼠

[0583] <400> 43

[0584] Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

[0585] 1 5 10

[0586] <210> 44

[0587] <211> 372

[0588] <212> DNA

[0589] <213> 小鼠

[0590] <400> 44

[0591] gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

[0592] atctcttgca gatctagtca gagccttgta cacagtaatg gaaacaccta tttacattgg 120

[0593] tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctcctgatct acaaagtttc caaccgattt 180

[0594] tctggggtcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

[0595] agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcct 300

[0596] cccacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaacggg ctgatgctgc accaactgta 360

[0597] tccgcggccg ca 372

[0598] <210> 45

[0599] <211> 12

[0600] <212> PRT

[0601] <213> 小鼠

[0602] <400> 45

[0603] Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

[0604] 1 5 10

[0605] <210> 46

[0606] <211> 363

[0607] <212> DNA

[0608] <213> 小鼠

[0609] <400> 46

[0610] caggtgcagc tgaagcagtc tgggcctcag ctggttaggc ctggggcttc agtgaagata 60

[0611] ccctgcaagg cttctggtta ctcattcacc aactactgga tgcactgggt gaagcagagg 120

[0612] cctggacaag gtcttgagtg gattggcatg attgctcctt ccgatagtga tagtaggtta 180

[0613] aatcagaatt tcaaggacaa ggccacattg actgtagaca aatcctccag cacagcctac 240

[0614] atgcaactca gcagcccgac atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagagaggga 300

[0615] gttacaatga taacgacggg ccttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc 360

[0616] tca 363

[0617] <210> 47

[0618] <211> 98

[0619] <212> PRT

[0620] <213> 小鼠

[0621] <400> 47

[0622] Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

[0623] 1 5 10 15

[0624] Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
[0625] 20 25 30
[0626] Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0627] 35 40 45
[0628] Gly Glu Ile Asp Pro Ser Asp Ser Tyr Thr Asn Asn Asn Gln Lys Phe
[0629] 50 55 60
[0630] Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[0631] 65 70 75 80
[0632] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[0633] 85 90 95
[0634] Ala Arg
[0635] <210> 48
[0636] <211> 8
[0637] <212> PRT
[0638] <213> 小鼠
[0639] <400> 48
[0640] Pro Thr Ile Val Thr Ile Val Thr
[0641] 1 5
[0642] <210> 49
[0643] <211> 15
[0644] <212> PRT
[0645] <213> 人工序列
[0646] <220>
[0647] <223> 免疫原性肽
[0648] <220>
[0649] <221> MISC_FEATURE
[0650] <222> (1)..(1)
[0651] <223> Xaa在位置1不存在、为半胱氨酸或缬氨酸或 KTHV 或 CKTHV
[0652] <220>
[0653] <221> MISC_FEATURE
[0654] <222> (15)..(15)
[0655] <223> Xaa 在位置15不存在或为半胱氨酸
[0656] <400> 49
[0657] Xaa Thr His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Xaa
[0658] 1 5 10 15
[0659] <210> 50
[0660] <211> 4
[0661] <212> PRT
[0662] <213> 人工序列

[0663] <220>
[0664] <223> 免疫原性肽片段
[0665] <400> 50
[0666] Lys Thr His Val
[0667] 1
[0668] <210> 51
[0669] <211> 5
[0670] <212> PRT
[0671] <213> 人工序列
[0672] <220>
[0673] <223> 免疫原性序列片段
[0674] <400> 51
[0675] Cys Lys Thr His Val
[0676] 1 5
[0677] <210> 52
[0678] <211> 15
[0679] <212> PRT
[0680] <213> 人工序列
[0681] <220>
[0682] <223> 免疫原性肽
[0683] <400> 52
[0684] Cys Thr His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Cys
[0685] 1 5 10 15
[0686] <210> 53
[0687] <211> 19
[0688] <212> PRT
[0689] <213> 人工序列
[0690] <220>
[0691] <223> 免疫原性肽
[0692] <400> 53
[0693] Cys Lys Thr His Val Thr His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr
[0694] 1 5 10 15
[0695] Leu Arg Cys
[0696] <210> 54
[0697] <211> 13
[0698] <212> PRT
[0699] <213> 人类
[0700] <400> 54
[0701] Thr His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg

[0702] 1 5 10

[0703] <210> 55

[0704] <211> 14

[0705] <212> PRT

[0706] <213> 人类

[0707] <400> 55

[0708] Thr His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Cys

[0709] 1 5 10

[0710] <210> 56

[0711] <211> 15

[0712] <212> PRT

[0713] <213> 人类

[0714] <400> 56

[0715] Val Thr His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Cys

[0716] 1 5 10 15

[0717] <210> 57

[0718] <211> 14

[0719] <212> PRT

[0720] <213> 人类

[0721] <400> 57

[0722] Val Thr His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg

[0723] 1 5 10

[0724] <210> 58

[0725] <211> 14

[0726] <212> PRT

[0727] <213> 人工序列

[0728] <220>

[0729] <223> 免疫原性肽

[0730] <400> 58

[0731] Cys Thr His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg

[0732] 1 5 10

[0733] <210> 59

[0734] <211> 17

[0735] <212> PRT

[0736] <213> 人类

[0737] <400> 59

[0738] Lys Thr His Val Thr His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu

[0739] 1 5 10 15

[0740] Arg

[0741] <210> 60

[0742] <211> 18

[0743] <212> PRT

[0744] <213> 人类

[0745] <400> 60

[0746] Lys Thr His Val Thr His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu

[0747] 1 5 10 15

[0748] Arg Cys

[0749] <210> 61

[0750] <211> 18

[0751] <212> PRT

[0752] <213> 人工序列

[0753] <220>

[0754] <223> 免疫原性肽

[0755] <400> 61

[0756] Cys Lys Thr His Val Thr His His Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr

[0757] 1 5 10 15

[0758] Leu Arg

[0759] <210> 62

[0760] <211> 15

[0761] <212> PRT

[0762] <213> 人工序列

[0763] <220>

[0764] <223> 突变肽

[0765] <400> 62

[0766] Cys Thr His His Pro Val Ala Asp Ala Glu Ala Thr Leu Arg Cys

[0767] 1 5 10 15

[0768] <210> 63

[0769] <211> 111

[0770] <212> PRT

[0771] <213> 小鼠

[0772] <400> 63

[0773] Asp Val Leu Met Thr Gln Ile Pro Phe Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

[0774] 1 5 10 15

[0775] Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Arg

[0776] 20 25 30

[0777] Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

[0778] 35 40 45

[0779] Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

[0780] 50 55 60

[0781] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

[0782] 65 70 75 80

[0783] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly

[0784] 85 90 95

[0785] Ser His Leu Pro Pro Thr Phe Gly Gly Thr Thr Leu Glu Ile Lys

[0786] 100 105 110

[0787] <210> 64

[0788] <211> 120

[0789] <212> PRT

[0790] <213> 小鼠

[0791] <400> 64

[0792] Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser

[0793] 1 5 10 15

[0794] Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr

[0795] 20 25 30

[0796] Trp Met Asp Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

[0797] 35 40 45

[0798] Gly Thr Ile Tyr Pro Ser Asp Ser Ser Thr His Tyr Asn Gln Glu Phe

[0799] 50 55 60

[0800] Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

[0801] 65 70 75 80

[0802] Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

[0803] 85 90 95

[0804] Ala Arg Glu Gly Leu Ala Gly Val Phe Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln

[0805] 100 105 110

[0806] Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

[0807] 115 120

[0808] <210> 65

[0809] <211> 112

[0810] <212> PRT

[0811] <213> 小鼠

[0812] <400> 65

[0813] Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

[0814] 1 5 10 15

[0815] Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

[0816] 20 25 30

[0817] Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

[0818] 35 40 45

[0819] Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
[0820] 50 55 60
[0821] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[0822] 65 70 75 80
[0823] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
[0824] 85 90 95
[0825] Thr His Phe Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Ile
[0826] 100 105 110
[0827] <210> 66
[0828] <211> 112
[0829] <212> PRT
[0830] <213> 小鼠
[0831] <400> 66
[0832] Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
[0833] 1 5 10 15
[0834] Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
[0835] 20 25 30
[0836] Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
[0837] 35 40 45
[0838] Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
[0839] 50 55 60
[0840] Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
[0841] 65 70 75 80
[0842] Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser
[0843] 85 90 95
[0844] Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
[0845] 100 105 110
[0846] <210> 67
[0847] <211> 121
[0848] <212> PRT
[0849] <213> 小鼠
[0850] <400> 67
[0851] Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gln Leu Val Arg Pro Gly Ala
[0852] 1 5 10 15
[0853] Ser Val Lys Ile Pro Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Asn Tyr
[0854] 20 25 30
[0855] Trp Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0856] 35 40 45
[0857] Gly Met Ile Ala Pro Ser Asp Ser Asp Ser Arg Leu Asn Gln Asn Phe

[0858] 50 55 60
[0859] Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[0860] 65 70 75 80
[0861] Met Gln Leu Ser Ser Pro Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[0862] 85 90 95
[0863] Ala Arg Glu Gly Val Thr Met Ile Thr Thr Gly Leu Asp Tyr Trp Gly
[0864] 100 105 110
[0865] Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
[0866] 115 120
[0867] <210> 68
[0868] <211> 26
[0869] <212> PRT
[0870] <213> 小鼠
[0871] <400> 68
[0872] Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ala Ala Ser Leu Gly
[0873] 1 5 10 15
[0874] Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
[0875] 20 25
[0876] <210> 69
[0877] <211> 7
[0878] <212> PRT
[0879] <213> 小鼠
[0880] <400> 69
[0881] Ser Ser Val Ser Ser Asn Phe
[0882] 1 5
[0883] <210> 70
[0884] <211> 17
[0885] <212> PRT
[0886] <213> 小鼠
[0887] <400> 70
[0888] Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile
[0889] 1 5 10 15
[0890] Tyr
[0891] <210> 71
[0892] <211> 36
[0893] <212> PRT
[0894] <213> 小鼠
[0895] <400> 71
[0896] Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Thr Gly

[0897] 1 5 10 15

[0898] Ile Ser Tyr Ser Leu Thr Val Ser Asn Met Glu Ala Glu Asn Asp Ala

[0899] 20 25 30

[0900] Ala Tyr Tyr Cys

[0901] 35

[0902] <210> 72

[0903] <211> 9

[0904] <212> PRT

[0905] <213> 小鼠

[0906] <400> 72

[0907] Gln Gln Trp Asn Ala Tyr Pro Phe Thr

[0908] 1 5

[0909] <210> 73

[0910] <211> 25

[0911] <212> PRT

[0912] <213> 小鼠

[0913] <400> 73

[0914] Glu Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0915] 1 5 10 15

[0916] Ser Met Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser

[0917] 20 25

[0918] <210> 74

[0919] <211> 8

[0920] <212> PRT

[0921] <213> 小鼠

[0922] <400> 74

[0923] Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Trp

[0924] 1 5

[0925] <210> 75

[0926] <211> 17

[0927] <212> PRT

[0928] <213> 小鼠

[0929] <400> 75

[0930] Leu Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala

[0931] 1 5 10 15

[0932] Glu

[0933] <210> 76

[0934] <211> 10

[0935] <212> PRT

[0936] <213> 小鼠

[0937] <400> 76

[0938] Val Arg Leu Lys Ser Asp Asn Tyr Ala Thr

[0939] 1 5 10

[0940] <210> 77

[0941] <211> 38

[0942] <212> PRT

[0943] <213> 小鼠

[0944] <400> 77

[0945] Ser Tyr Ala Glu Ser Val Lys Gly Lys Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp

[0946] 1 5 10 15

[0947] Ala Asn Ser Arg Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp

[0948] 20 25 30

[0949] Thr Gly Ile Tyr Tyr Cys

[0950] 35

[0951] <210> 78

[0952] <211> 5

[0953] <212> PRT

[0954] <213> 小鼠

[0955] <400> 78

[0956] Thr Thr Gly Asp Tyr

[0957] 1 5

[0958] <210> 79

[0959] <211> 26

[0960] <212> PRT

[0961] <213> 小鼠

[0962] <400> 79

[0963] Asp Val Val Met Thr Gln Ile Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

[0964] 1 5 10 15

[0965] Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser

[0966] 20 25

[0967] <210> 80

[0968] <211> 11

[0969] <212> PRT

[0970] <213> 小鼠

[0971] <400> 80

[0972] Gln Ser Leu Val Asn Ser Asn Gly Asn Thr Leu

[0973] 1 5 10

[0974] <210> 81

[0975] <211> 9

[0976] <212> PRT

[0977] <213> 小鼠

[0978] <400> 81

[0979] Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr

[0980] 1 5

[0981] <210> 82

[0982] <211> 10

[0983] <212> PRT

[0984] <213> 小鼠

[0985] <400> 82

[0986] Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

[0987] 1 5 10

[0988] <210> 83

[0989] <211> 8

[0990] <212> PRT

[0991] <213> 小鼠

[0992] <400> 83

[0993] Gly Leu Thr Phe Ser Ser Tyr Trp

[0994] 1 5

[0995] <210> 84

[0996] <211> 17

[0997] <212> PRT

[0998] <213> 小鼠

[0999] <400> 84

[1000] Met Ser Trp Val Arg Gln Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala

[1001] 1 5 10 15

[1002] Glu

[1003] <210> 85

[1004] <211> 10

[1005] <212> PRT

[1006] <213> 小鼠

[1007] <400> 85

[1008] Ile Arg Leu Arg Ser Asp Asn Tyr Val Lys

[1009] 1 5 10

[1010] <210> 86

[1011] <211> 38

[1012] <212> PRT

[1013] <213> 小鼠

[1014] <400> 86
[1015] Gln Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp
[1016] 1 5 10 15
[1017] Ser Lys Gly Arg Leu Tyr Leu Gln Met Asn Arg Leu Arg Gly Asp Asp
[1018] 20 25 30
[1019] Thr Gly Ile Tyr Phe Cys
[1020] 35
[1021] <210> 87
[1022] <211> 11
[1023] <212> PRT
[1024] <213> 小鼠
[1025] <400> 87
[1026] Gln Thr Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
[1027] 1 5 10
[1028] <210> 88
[1029] <211> 9
[1030] <212> PRT
[1031] <213> 小鼠
[1032] <400> 88
[1033] Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr
[1034] 1 5
[1035] <210> 89
[1036] <211> 25
[1037] <212> PRT
[1038] <213> 小鼠
[1039] <400> 89
[1040] Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Thr
[1041] 1 5 10 15
[1042] Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser
[1043] 20 25
[1044] <210> 90
[1045] <211> 8
[1046] <212> PRT
[1047] <213> 小鼠
[1048] <400> 90
[1049] Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Asn Trp
[1050] 1 5
[1051] <210> 91
[1052] <211> 17

[1053] <212> PRT

[1054] <213> 小鼠

[1055] <400> 91

[1056] Ile Thr Trp Val Arg Leu Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

[1057] 1 5 10 15

[1058] Asp

[1059] <210> 92

[1060] <211> 8

[1061] <212> PRT

[1062] <213> 小鼠

[1063] <400> 92

[1064] Ile Tyr Pro Gly Asp Ala Ser Thr

[1065] 1 5

[1066] <210> 93

[1067] <211> 38

[1068] <212> PRT

[1069] <213> 小鼠

[1070] <400> 93

[1071] His Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr

[1072] 1 5 10 15

[1073] Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Leu Gln Val Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp

[1074] 20 25 30

[1075] Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

[1076] 35

[1077] <210> 94

[1078] <211> 13

[1079] <212> PRT

[1080] <213> 小鼠

[1081] <400> 94

[1082] Ala Arg Glu Gln Val Gln Phe Ala Met Phe Phe Asp Val

[1083] 1 5 10

[1084] <210> 95

[1085] <211> 11

[1086] <212> PRT

[1087] <213> 小鼠

[1088] <400> 95

[1089] Trp Gly Thr Gly Ala Thr Val Thr Val Ser Ser

[1090] 1 5 10

[1091] <210> 96

[1092] <211> 25

[1093] <212> PRT

[1094] <213> 小鼠

[1095] <400> 96

[1096] Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Arg Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

[1097] 1 5 10 15

[1098] Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser

[1099] 20 25

[1100] <210> 97

[1101] <211> 8

[1102] <212> PRT

[1103] <213> 小鼠

[1104] <400> 97

[1105] Gly Tyr Thr Phe Ala Arg Tyr Trp

[1106] 1 5

[1107] <210> 98

[1108] <211> 17

[1109] <212> PRT

[1110] <213> 小鼠

[1111] <400> 98

[1112] Ile Ser Trp Leu Lys Leu Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly

[1113] 1 5 10 15

[1114] Asp

[1115] <210> 99

[1116] <211> 8

[1117] <212> PRT

[1118] <213> 小鼠

[1119] <400> 99

[1120] Ile Tyr Pro Gly Asp Asp Ser Thr

[1121] 1 5

[1122] <210> 100

[1123] <211> 38

[1124] <212> PRT

[1125] <213> 小鼠

[1126] <400> 100

[1127] His Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Thr

[1128] 1 5 10 15

[1129] Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Ile Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp

[1130] 20 25 30

[1131] Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

[1132] 35

[1133] <210> 101

[1134] <211> 11

[1135] <212> PRT

[1136] <213> 小鼠

[1137] <400> 101

[1138] Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr

[1139] 1 5 10

[1140] <210> 102

[1141] <211> 38

[1142] <212> PRT

[1143] <213> 小鼠

[1144] <400> 102

[1145] His Tyr Asn Gln Glu Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys

[1146] 1 5 10 15

[1147] Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met His Leu Gly Ser Leu Thr Ser Glu Asp

[1148] 20 25 30

[1149] Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

[1150] 35

结构域 α 1

HLA-G	GSHSMRYFSAAVSRPGRGEPRFIAMGYVDDTQFVRFDSDSACPRMEPRAPWVEQEGPEYWEEETRNTKAHAQTDRMNLQTLRGYYNQSEA
HLA-E	GSHSLKYFHTSVSRPGRGEPRFISVGYVDDTQFVRFDNDAASPRMVPRAPWMEQEGSEYWDRETRSARDTAQIFRVNLRTLRGYYNQSEA
HLA-A2	GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDTQFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWDGETRKVKAHSQTHRVDLGTLRGYYNQSEA
HLA-B7	GSHSMRYFYTSVSRPGRGEPRFISVGYVDDTQFVRFDSDAASPREEPRAPWIEQEGPEYWDRNTQIYKAQAQTDRESLRNLRGYYNQSEA
HLA-B44	GSHSMRYFCTAVSRPGRGEPHFIAVGYVDDTQFVRFDSDDESPRGEPRAPWVERKGPEYWDRETQKYKPQAQTDRVSLRNLRGYYNQSEA
HLA-CW3	GSHSMRYFYTAMSRPGRGEPRFITVGYVDDTLFVRFDSDATSPRKEPRAPWIEQEGPEYWDRETQISKTNTQTYRENLRTAARYYNQSEA
残基	1.......10........20........30........40........50........60........70........80........90

结构域 α 2

HLA-G	SSHTLQWMIGCDLGSDGRLLRGYEQYAYDGKDYLALNEDLRSWTAADTAAQISKRKCEAANVAEQRRAYLEGTCVEWLHRYLENGKEMLQRA
HLA-E	GSHTLQWMHGCELGPDGRFLRGYEQFAYDGKDYLTLNEDLRSWTAVDTAAQISEQKSNDASEAEHQRAYLEDTCVEWLHKYLEKGKETLLHL
HLA-A2	GSHTVQRMYGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDGKDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEAAHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETLQRT
HLA-B7	GSHTLQSMYGCDVGPDGRLLRGHDQYAYDGKDYIALNEDLRSWTAADTAAQITQRKWEAAREAEQRRAYLEGECVEWLRRYLENGKDKLERA
HLA-B44	GSHIIRMYGCDVGPDGRLLRGYDQHAYDGKDYIALNEDLRSWTAANTAAQITQRKWEAAR EAEQLRAYLEGLCVEWLRRYLKNGKETLQGA
HLA-CW3	GSHIIQRMYGCDVGPDGRLLRGYDQDAYDGKDYIALNEDLSSWTAADTAAQITQRKWEAARVAEQDRAYLEGLCVESLRRYLENGKETLQRA
残基	.......100.......110.......120.......130.......140.......150.......160.......170.......180..

结构域 α 3

HLA-G	DPPKTH**VTHHPVFDYEATLRC**WALGFYPAEIILTWQRDGEDQTQDVELVETRPAGDGTFQKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLMLRWK
HLA-E	EPPKTHVTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQQDGEGHTQDTELVETRPAGDGTFQKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPVTLRWK
HLA-A2	DAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGTFQKWAAVVVPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE
HLA-B7	DPPKTHVTHHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDRTFQKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE
HLA-B44	EHPKTHVTHHPVSDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQWDGEDQTQDTELVETRPAGDGTFQKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPLTLRWE
HLA-CW3	DPPKTHVTHHPISDHEATLRCWSLGFYPAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDRTFQKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPKPLTLRWE
残基	.....190.......200.......210.......220.......230.......240.......250.......260.......270.....

图1A

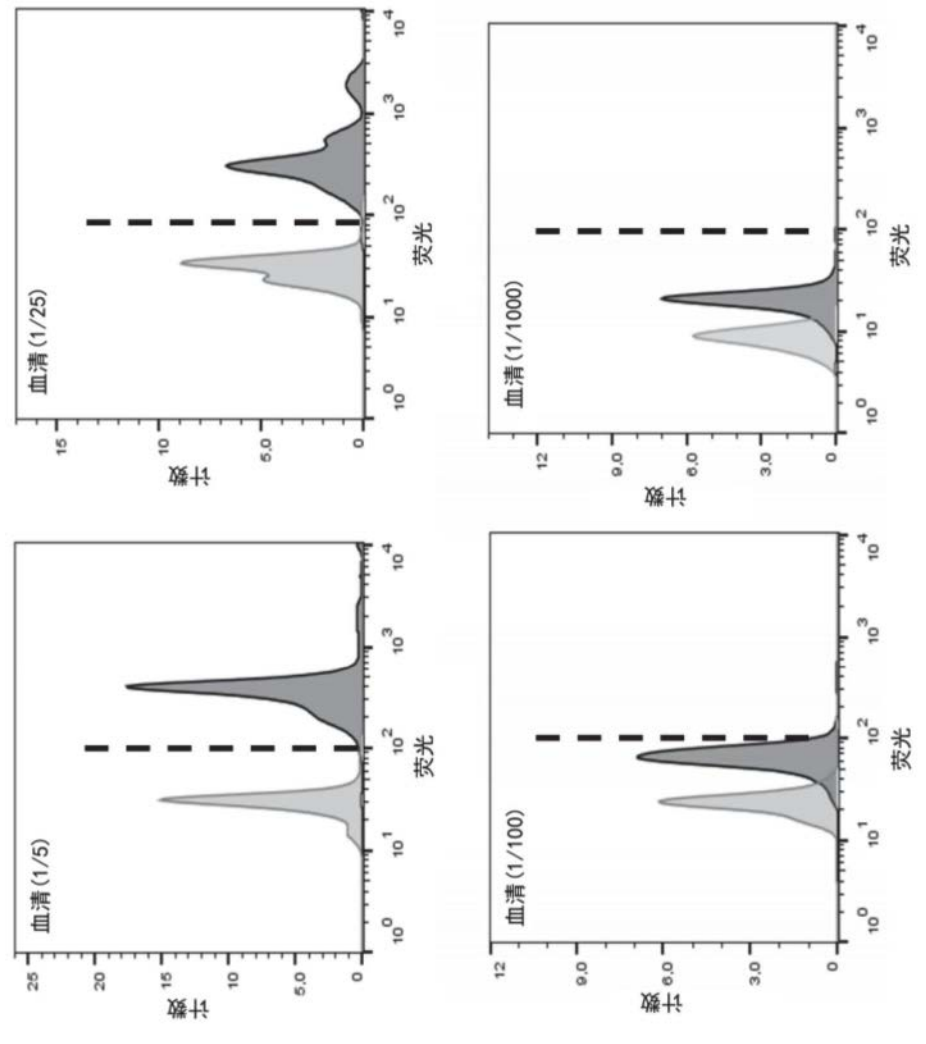

图1B

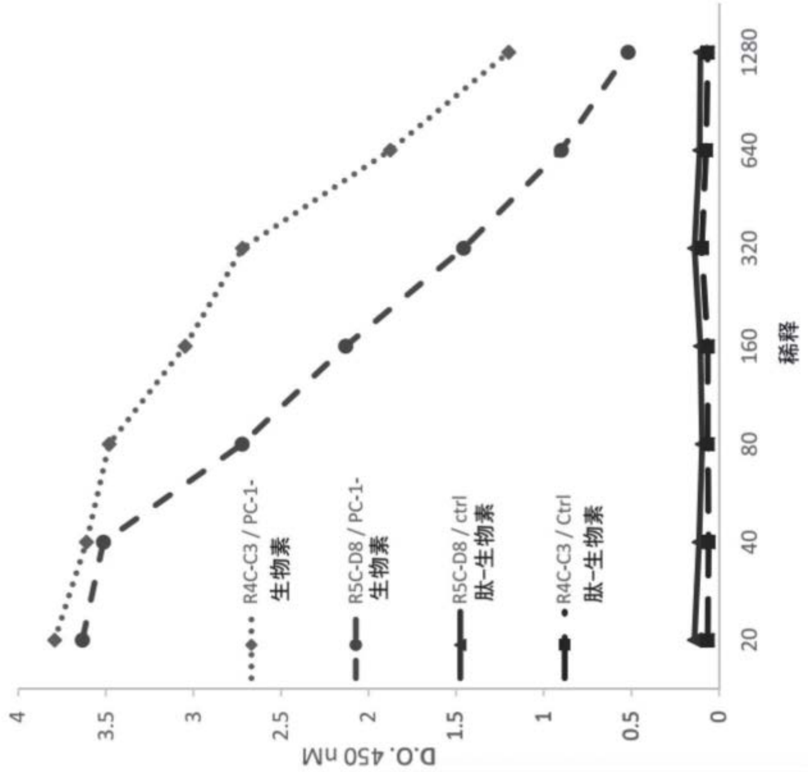
R4C-C3 / PC-1-生物素
R5C-D8 / PC-1-生物素
R5C-D8 / ctrl 肽-生物素
R4C-C3 / Ctrl 肽-生物素
D.O. 450 nM
稀释
0
0.5
1
1.5
2
2.5
3
3.5
4
20
40
80
160
320
640
1280

图1C

15E7-VLκ

GATGTTTTGATGACCCAAATTCCATTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTG
CAGATCTAGTCAGAGCATTGTACATAGAAGTGGAAACACCTATTTAGAGTGGTACCTGCAGAAGCCAG
GCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAGT
GGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTA
TTACTGCTTTCAAGGTTCACATCTTCCTCCGACGTTCGGTGGAGGCACCACGCTGGAAATCAAA

FR1	CDR1	FR2	CDR2
DVLMTQIPFSLPVSLGDQASISCRSS	QSIVHRSGNTY	LEWYLQKPGQSPKLLIY	KVS

FR3	CDR3	FR4
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYC	FQGSHLPPT	FGGTTLEIK

图2A

```
V-等位基因:
                                       CDR1                           CDR2
IGKV1-117*01: DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG
15E7:         ......I.F......................R.........................................................

                      CDR3
IGKV1-117*01: VYYCFQGSHVP
15E7:         .........L.

J-等位基因:
              CDR3
IGKJ-1*1 :    WTFGGGTKLEIK
15E7:         P......T....
```

图2B

15E7-VH

CAGGTCCAACTGCAGCAGCCTGGGGCTGAACTGGTGAGGCCTGGGTCTTCAGTGAAGCTGTCCTGCAAGG
CTTCTGGCTACACCTTCACCGACTACTGGATGGATTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAATG
GATTGGTACCATTTACCCTTCTGATAGTTCAACTCACTACAATCAAGAGTTCAAGGGCAAGGCCACAATG
ACTGTAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCATCTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCGGTCT
ATTACTGTGCAAGAGAGGGACTAGCTGGGGTGTTCTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCAC
AGTCTCCTCA

FR1	CDR1	FR2	CDR2
QVQLQQPGAELVRPGSSVKLSCKAS	GYTFTDYW	MDWVKQRPGQGLEWIGT	IYPSDSST

FR3	CDR3	FR4
HYNQEFKGKATMTVDKSSSTAYMHLSSLTSEDSAVYYC	AREGLAGVFYFDY	WGQGTTLTVSS

图3A

```
V-等位基因:
                               CDR1                  CDR2
IGHV1-61*01: QVQLQQPGAELVRPGSSVKLSCKASGYTFTSYWMDWVKQRPGQGLEWIGNIYPSDSETHYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSE
15E7:        ..............................D..................T......S.....E..G...M...........H.......

                   CDR3
IGHV1-61*01: DSAVYYCAR
15E7:        .........

D-等位基因:
              CDR3
IGHD4-1*01:  --LTG--
15E7:        EG.A.VF

J-等位基因:
             CDR3
IGHJ2*01:    YFDYWGQGTTLTVSS
15E7:        ...............
```

图3B

R4C-C3-VLκ

GATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCA
TCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCCTTGTACACAGTAATGGAAACACCTATTTACATTGGTA
CCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTCTCCAACCGATTTTCT
GGGGTCCCTGACAGGTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTCAAGATCAGCA
GAGTGGAGGCTGAGGATCTGGGAGTTTATTTCTGCTCTCAAAGTACACATTTTCCTCCGAC
GTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCATA

FR1	CDR1	FR2	CDR2
DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSS	QSLVHSNGNTY	LHWYLQKPGQSPKLLIY	KVS

FR3	CDR3	FR4
NRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFC	SQSTHFPPT	FGGGTKLEII

图4A

```
V-等位基因:
                                                 CDR1                    CDR2
IGKV1-110*01: DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTL
R4C-C3:       ..L...........................................................................

                         CDR3
IGKV1-110*01: KISRVEAEDLGVYFCSQSTHVP
R4C-C3 :      ....................F.

J-等位基因:
              CDR3
IGKJ1*01:     WTFGGGTKLEIK
R4C-C3:       P..........I
```

图4B

R4C-C3-VH

CAGGTGCAGCTGAAGCAGTCTGGGCCTCAGCTGGTTAGGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATACCCTGCAAGGCTT
CTGGTTACTCATTCACCAACTACTGGATGCACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGTCTTGAGTGGATTGG
CATGATTGCTCCTTCCGATAGTGATAGTAGGTTAAATCAGAATTTCAAGGACAAGGCCACATTGACTGTAGAC
AAATCCTCCAGCACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCCGACATCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAA
GAGAGGGAGTTACAATGATAACGACGGGCCTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

FR1　CDR1　FR2　CDR2

QVQLKQSGPQLVRPGASVKIPCKAS GYSFTNYW MHWVKQRPGQGLEWIGM IAPSDSDS

FR3　CDR3　FR4

RLNQNFKDKATLTVDKSSSTAYMQLSSPTSEDSAVYYC AREGVTMITTGLDY WGQGTTLTVSS

图5A

```
V-等位基因:
                                                 CDR1                     CDR2
                                              ------->                 ------->
IGHV1S126-1:   QVQLQQPGAELVKPGASVKISCKASGYTFTSYWMNWVKQRPGQGLEWIGEIDPSDSYTNNNQKFKDKATLTVDKSSST
R4C-C3:        ....K.S..Q..R.......P......S..N...H..............M.A....DSRL..N...............
                                    CDR3
                                    -->
IGHV1S126-1:   AYMQLSSLT-SEDSAVYYCAR
R4C-C3:        .......P.Q...........

D-等位基因:
                 CDR3
               ------->
IGHD2-12*01:   PTIVT-IVT
R4C-C3:        -EG..M.T.

J-等位基因:
               CDR3
               --->
IGHJ2*01:      YFDYWGQGTTLTVSS
R4C-C3:        GL.............
```

图5B

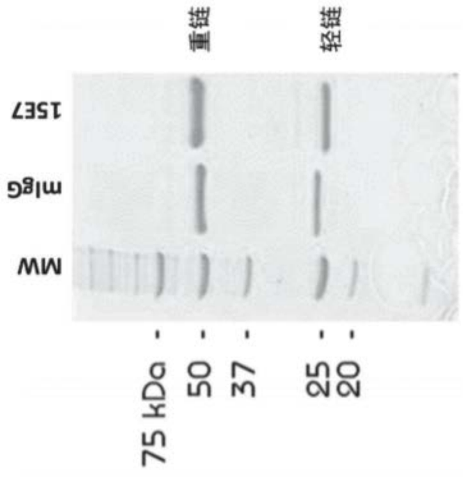

图6A

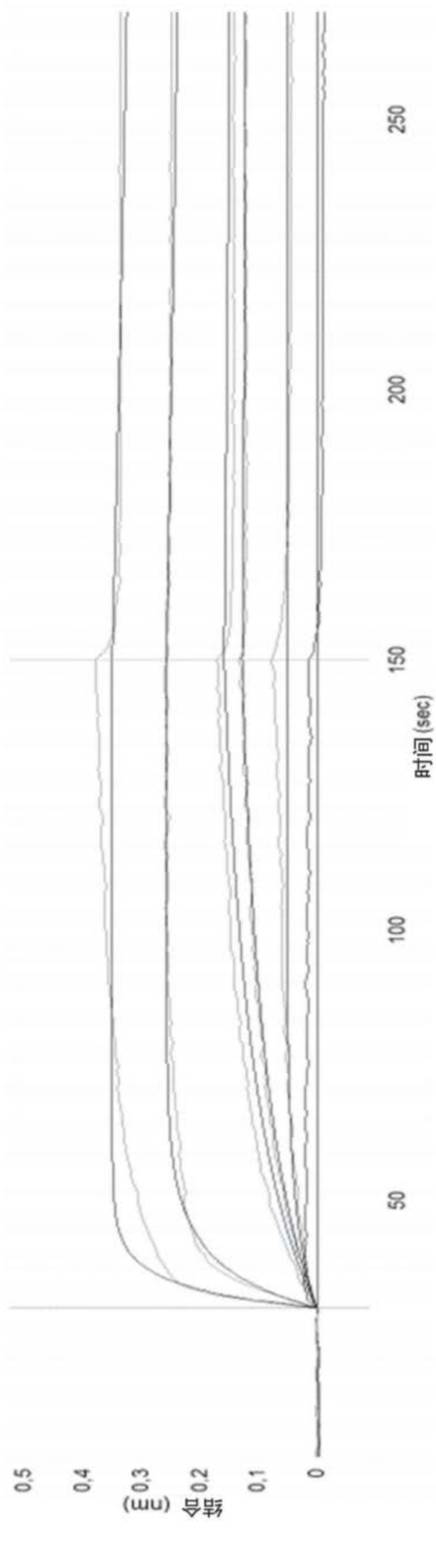

图6B

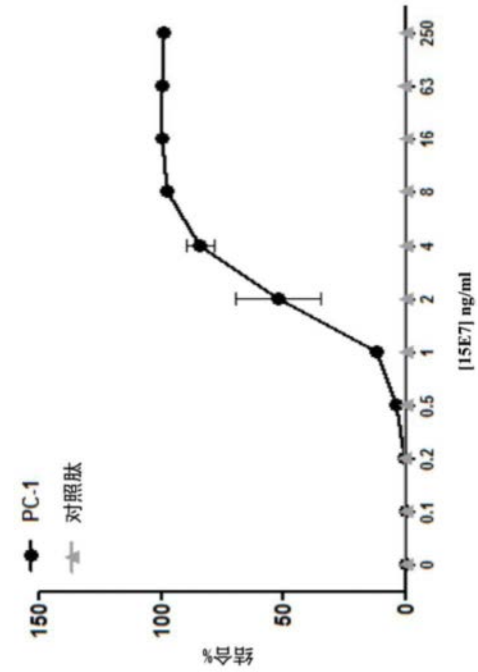
PC-1
对照肽
150
100
50
0
结合%
0
0.1
0.2
0.5
1
2
4
8
16
63
250
[15E7] ng/ml

图7A

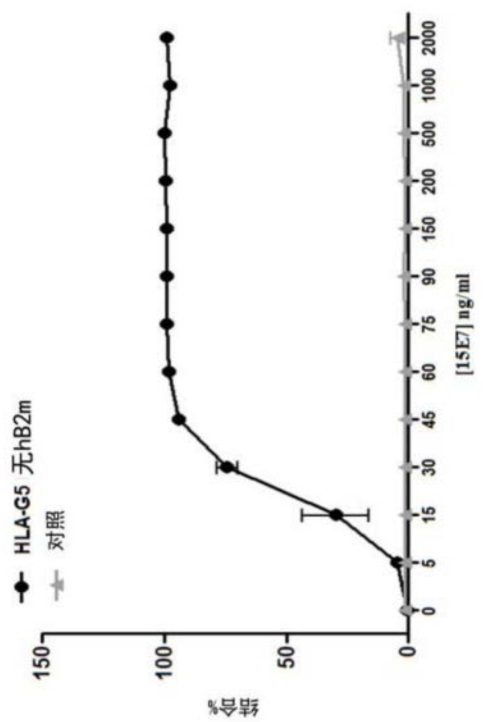
HLA-G5 无hB2m
对照
150
100
50
0
结合%
0
5
15
30
45
60
75
90
150
200
500
1000
2000
[15E7] ng/ml

图7B

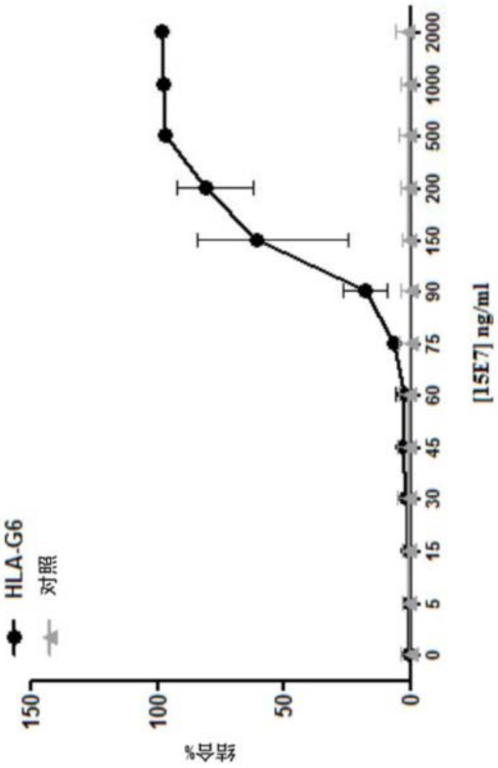
HLA-G6
对照
结合%
150
100
50
0
0
5
15
30
45
60
75
90
150
200
500
1000
2000
[15E7] ng/ml

图7C

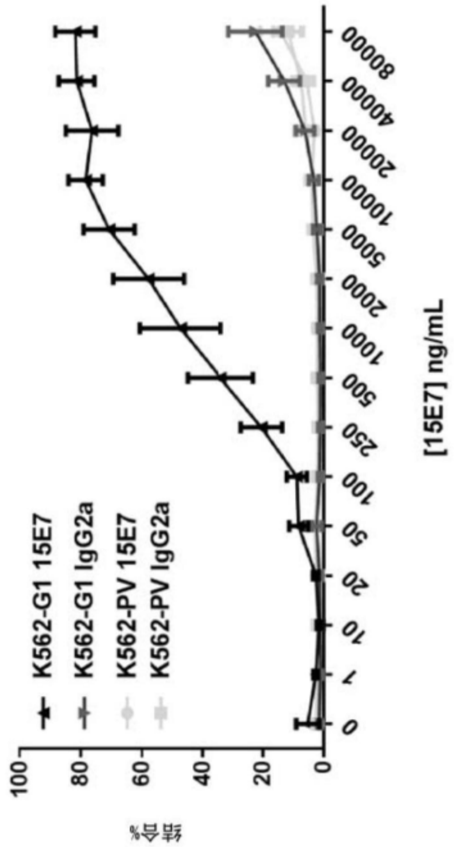
K562-G1 15E7
K562-G1 IgG2a
K562-PV 15E7
K562-PV IgG2a
结合%
[15E7] ng/mL
0
20
40
60
80
100
0
1
10
20
50
100
250
500
1000
2000
5000
10000
20000
40000
80000

图8

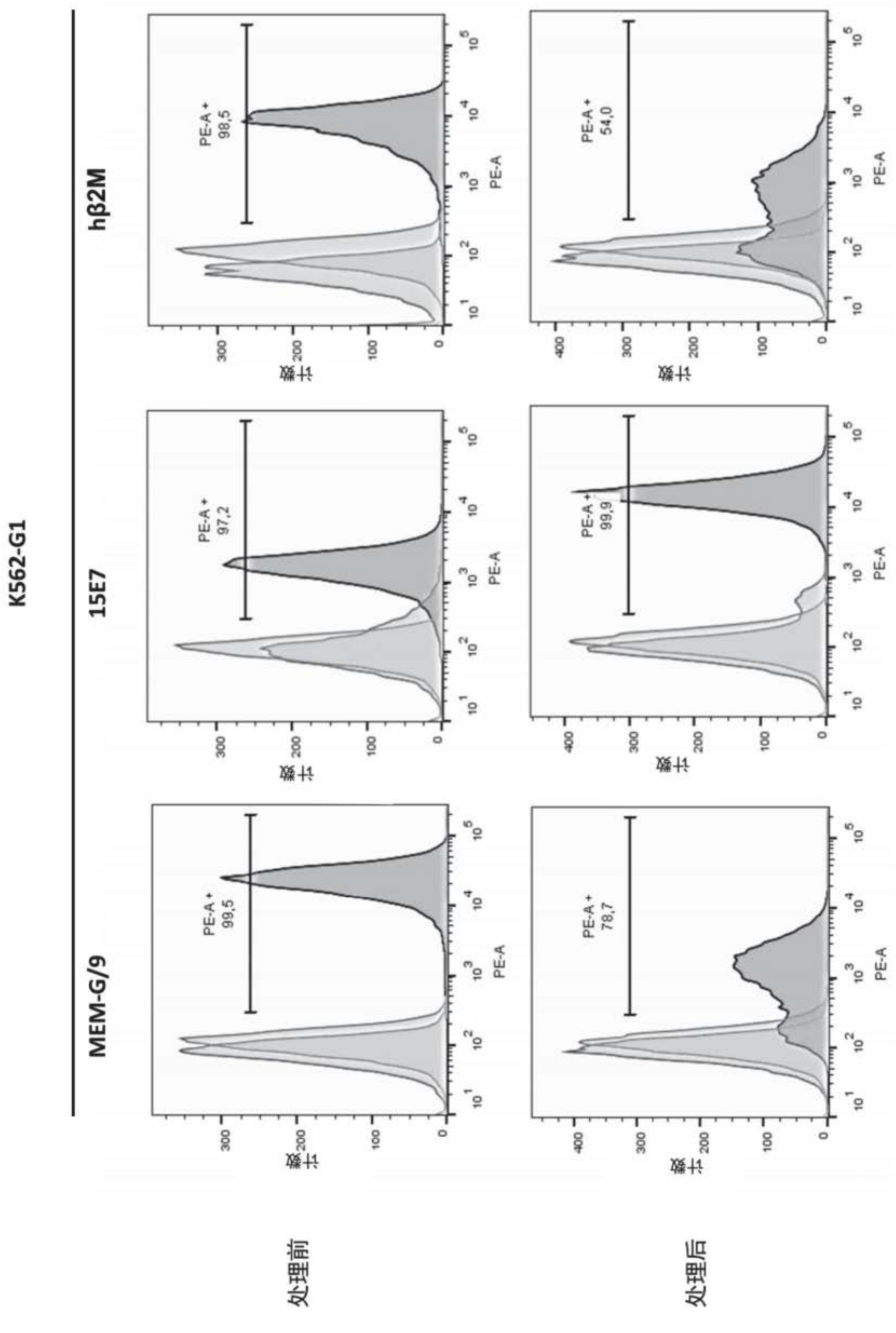
K562-G1
MEM-G/9
15E7
hβ2M
处理前
处理后
PE-A +
99,5
97,2
98,5
78,7
99,9
54,0
计数
PE-A

图9A

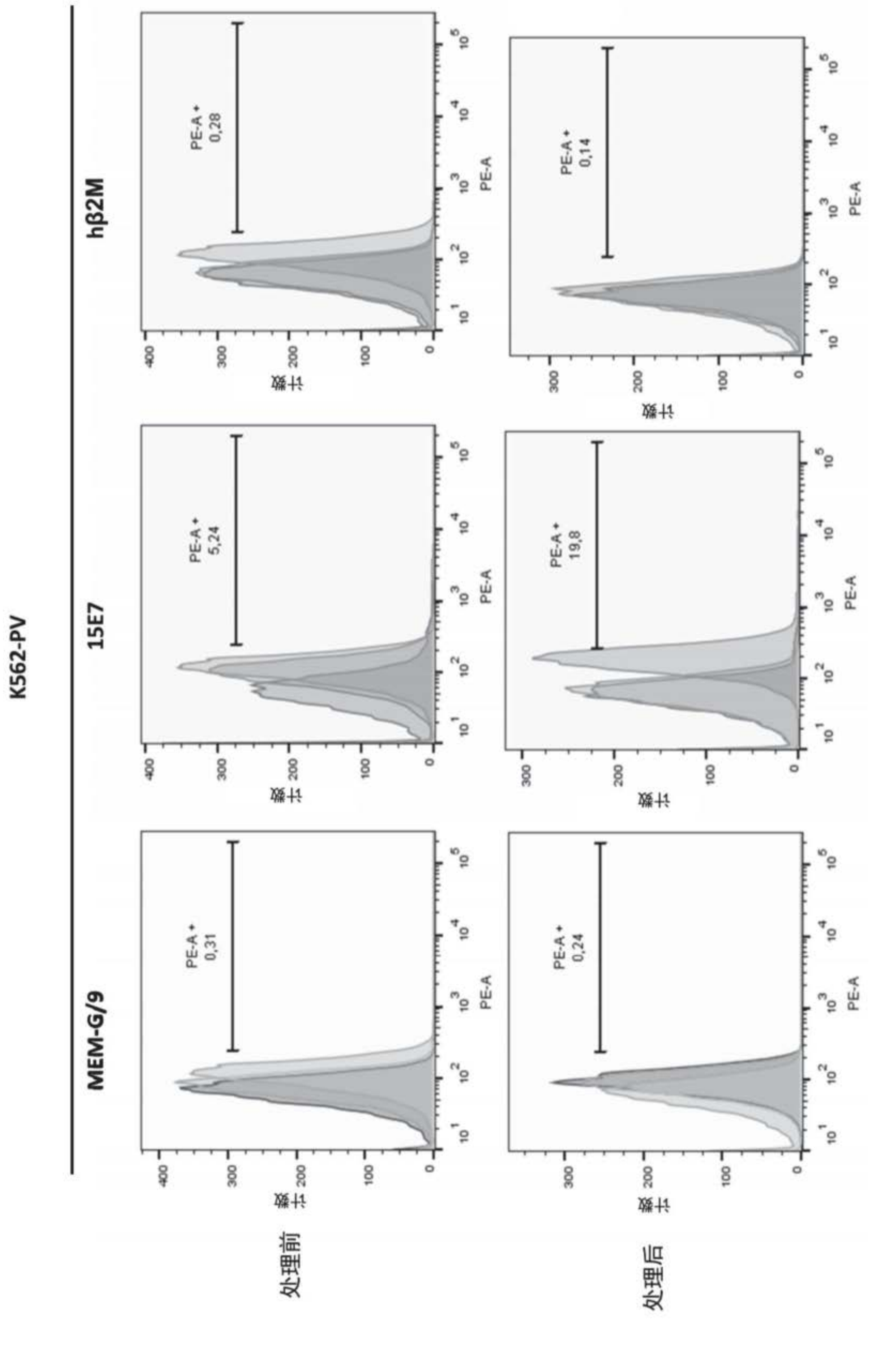
K562-PV
MEM-G/9
15E7
hβ2M
处理前
处理后
计数
PE-A
PE-A +
0,31
PE-A +
5,24
PE-A +
0,28
PE-A +
0,24
PE-A +
19,8
PE-A +
0,14

图9B

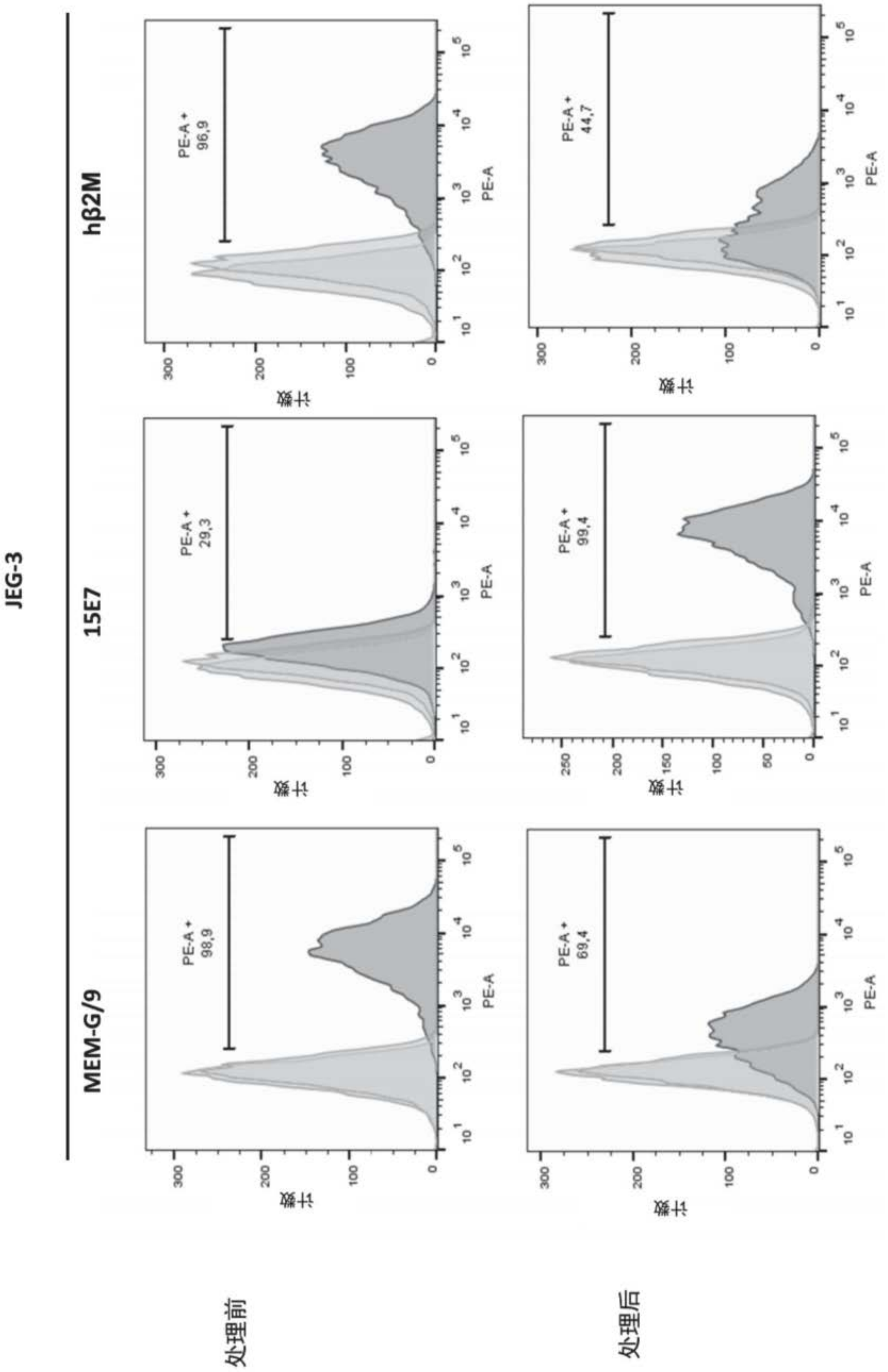

图9C

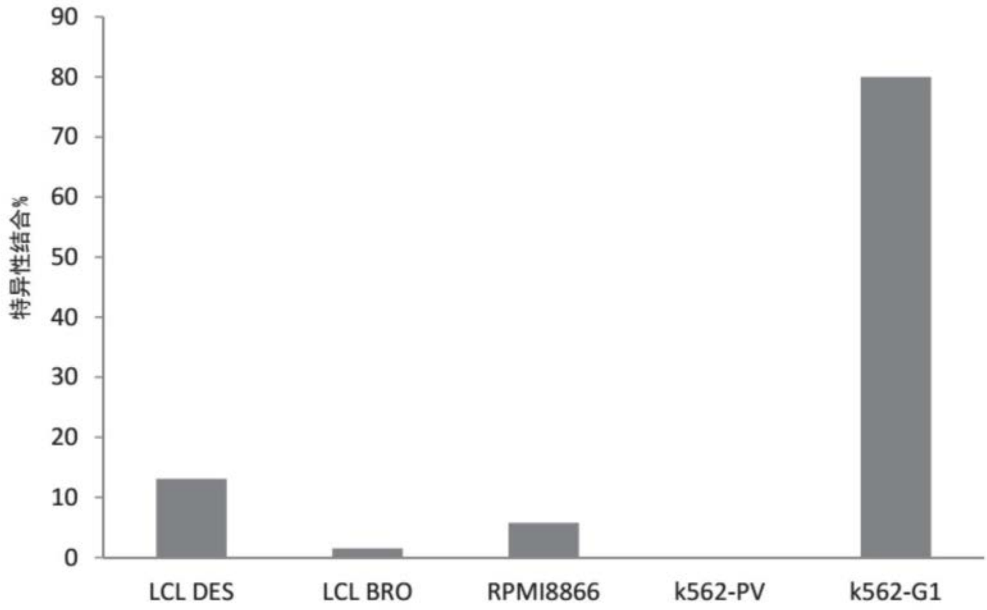
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
特异性结合%
LCL DES
LCL BRO
RPMI8866
k562-PV
k562-G1

图10