



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114729052 A

(43) 申请公布日 2022. 07. 08

(21) 申请号 202080081278.X

(22) 申请日 2020.10.02

(30) 优先权数据

62/910,594 2019.10.04 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.05.20

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2020/054063 2020.10.02

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2021/067800 EN 2021.04.08

(71) 申请人 丹娜法伯癌症研究院

地址 美国马萨诸塞州

(72) 发明人 G·J·弗里曼 A·R·阿鲁兰南丹

(74) 专利代理机构 北京市君合律师事务所

11517

专利代理师 吴瑜 张璐

(51) Int.Cl.

C07K 16/28 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

G01N 33/68 (2006.01)

G01N 33/577 (2006.01)

C12N 5/20 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61K 47/68 (2017.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 35/02 (2006.01)

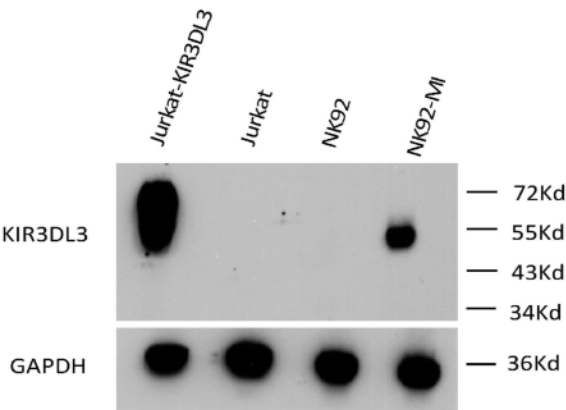
权利要求书5页 说明书130页 附图31页

(54) 发明名称

抗KIR3DL3抗体和其用途

(57) 摘要

本公开部分地基于以下的发现：与KIR3DL3特异性结合的单克隆抗体和其抗原结合片段；与KIR3DL3和PD-1结合的双特异性抗体和其抗原结合片段；以及其免疫球蛋白、多肽、核酸和将此类抗体用于预后目的、免疫调节目的和治疗目的的方法。



1. 一种单克隆抗体或其抗原结合片段,其包括:
 - a) 重链序列,所述重链序列与选自由表2、7和8中列出的序列组成的组的重链序列具有至少约95%同一性;和/或
 - b) 轻链序列,所述轻链序列与选自由表2、7和8中列出的序列组成的组的轻链序列具有至少约95%同一性。
2. 一种单克隆抗体或其抗原结合片段,其包括:
 - a) 一个、两个或三个重链CDR序列,所述重链CDR序列各自与选自由表2、7和8中列出的序列组成的组的重链CDR序列具有至少约95%同一性;和/或
 - b) 一个、两个或三个轻链CDR序列,所述轻链CDR序列各自与选自由表2、7和8中列出的序列组成的组的轻链CDR序列具有至少约95%同一性。
3. 一种单克隆抗体或其抗原结合片段,其包括:
 - a) 重链序列,所述重链序列选自由表2、7和8中列出的序列组成的组;和/或
 - b) 轻链序列,所述轻链序列选自由表2、7和8中列出的序列组成的组。
4. 一种单克隆抗体或其抗原结合片段,其包括:
 - a) 一个、两个或三个重链CDR序列,所述重链CDR序列各自选自由表2、7和8中列出的序列组成的组;和/或
 - b) 一个、两个或三个轻链CDR序列,所述轻链CDR序列各自选自由表2、7和8中列出的序列组成的组。
5. 根据权利要求1到4中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段是嵌合的、人源化的、复合的、鼠的或人的。
6. 根据权利要求1到5中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段:(a) 经可检测标记;(b) 与细胞毒性药剂,任选地化学治疗剂、生物药剂、毒素和/或放射性同位素缀合;(c) 包括效应结构域;(d) 包括Fc结构域;和/或(e) 选自由以下组成的组:Fv、Fav、F(ab')₂、Fab'、dsFv、scFv、sc(Fv)₂和双抗体片段。
7. 根据权利要求1到6中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段能从以保藏登记号_____保藏的杂交瘤_____获得。
8. 根据权利要求1到7中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段抑制HHLA2与KIR3DL3的结合。
9. 根据权利要求1到8中任一项所述的单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段与KIR3DL3特异性结合。
10. 一种双特异性抗体或其抗原结合片段,其包括:
 - a) 重链序列,所述重链序列与选自由表2和7到9中列出的序列组成的组的重链序列具有至少约95%同一性;和/或
 - b) 轻链序列,所述轻链序列与选自由表2和7到9中列出的序列组成的组的轻链序列具有至少约95%同一性。
11. 一种双特异性抗体或其抗原结合片段,其包括:
 - a) 一个、两个或三个重链CDR序列,所述重链CDR序列各自与选自由表2和7到9中列出的序列组成的组的重链CDR序列具有至少约95%同一性;和/或
 - b) 一个、两个或三个轻链CDR序列,所述轻链CDR序列各自与选自由表2和7到9中列出的

序列组成的组的轻链CDR序列具有至少约95%同一性。

12. 一种双特异性抗体或其抗原结合片段,其包括:

- a) 重链序列,所述重链序列选自由表2和7到9中列出的序列组成的组;和/或
- b) 轻链序列,所述轻链序列选自由表2和7到9中列出的序列组成的组。

13. 一种双特异性抗体或其抗原结合片段,其包括:

- a) 一个、两个或三个重链CDR序列,所述重链CDR序列各自选自由表2和7到9中列出的序列组成的组;和/或
- b) 一个、两个或三个轻链CDR序列,所述轻链CDR序列各自选自由表2和7到9中列出的序列组成的组。

14. 根据权利要求10到13中任一项所述的双特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述双特异性抗体或其抗原结合片段是嵌合的、人源化的、复合的、鼠的或人的。

15. 根据权利要求10到14中任一项所述的双特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述双特异性抗体或其抗原结合片段:(a) 经可检测标记;(b) 与细胞毒性药剂,任选地化学治疗剂、生物药剂、毒素和/或放射性同位素缀合;(c) 包括效应结构域;(d) 包括Fc结构域;和/或(e) 选自由以下组成的组:Fv、Fav、F(ab')₂、Fab'、dsFv、scFv、sc(Fv)₂和双抗体片段。

16. 根据权利要求10到15中任一项所述的双特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述双特异性抗体或其抗原结合片段能从以保藏登记号_____保藏的杂交瘤_____获得。

17. 根据权利要求10到16中任一项所述的双特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述双特异性抗体或其抗原结合片段抑制(a) HHLA2与KIR3DL3的结合和(b) PD-1与PD-L1和/或PD-L2的结合。

18. 根据权利要求10到17中任一项所述的双特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述双特异性抗体或其抗原结合片段与KIR3DL3和PD-1特异性结合。

19. 根据权利要求10到18中任一项所述的双特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述双特异性抗体或其抗原结合片段包括:

- a) 表9中列出的重链序列;和/或
- b) 表9中列出的轻链序列。

20. 一种免疫球蛋白重链和/或免疫球蛋白轻链,其选自由表2和7到9中列出的免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链序列组成的组。

21. 一种分离的核酸分子,其(a) 编码根据权利要求1到20中任一项所述的免疫球蛋白重链、免疫球蛋白轻链和/或抗体或其抗原结合片段;和/或(b) 在严格条件下与以下杂交:编码选自由表2和7到9中列出的多肽序列组成的组的多肽的核酸的补体或与编码选自由表2和7到9中列出的多肽序列组成的组的多肽的核酸具有至少约95%同源性的序列。

22. 一种载体,其包括根据权利要求21所述的分离的核酸。

23. 一种宿主细胞,其包括根据权利要求21所述的分离的核酸,包括根据权利要求22所述的载体,表达根据权利要求1到19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段或者能以保藏登记号_____获得。

24. 一种装置或试剂盒,其包括至少一种根据权利要求1到19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,所述装置或试剂盒任选地包括用于检测所述至少一种抗体或其抗原结合片段或包括所述抗体或其抗原结合片段的复合物的标记。

25. 一种产生至少一种根据权利要求1到19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括以下步骤:(i) 在适于允许所述抗体或其抗原结合片段的表达的条件下培养已被核酸转化的经转化宿主细胞,所述核酸包括编码至少一种根据权利要求1到19中任一项所述的抗体的序列;和(ii) 回收所表达的抗体或其抗原结合片段。

26. 一种检测KIR3DL3多肽的存在或水平的方法,所述方法包括通过使用至少一种根据权利要求1到19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段来在样品中检测所述多肽。

27. 根据权利要求26所述的方法,其中所述至少一种抗体或其抗原结合片段与KIR3DL3多肽形成复合物,并且所述复合物是以以下形式检测的:酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、免疫化学方式、蛋白质印迹或使用细胞内流动测定。

28. 一种预测对靶向KIR3DL3的疗法的应答性的方法,所述方法包括:

a) 使用至少一种根据权利要求1到19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段测定受试者样品中的KIR3DL3和/或HLA2的水平;

b) 使用所述至少一种抗体或其抗原结合片段测定来自至少一个对照受试者的样品中的KIR3DL3和/或HLA2的水平,所述至少一个对照受试者对靶向KIR3DL3的疗法具有良好应答性;以及

c) 将所述受试者样品中的KIR3DL3和/或HLA2的水平与来自所述对照受试者的所述样品中的KIR3DL3和/或HLA2的水平进行比较;

其中所述受试者样品中的KIR3DL3和/或HLA2的水平与来自所述至少一个对照受试者的所述样品中的KIR3DL3和/或HLA2的水平相同或高于后者表明所述受试者将对所述疗法有应答。

29. 根据权利要求28所述的方法,其中所述疗法使用至少一种根据权利要求1到19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段靶向KIR3DL3。

30. 一种使用至少一种根据权利要求1到19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段预测对靶向KIR3DL3的疗法的应答性的方法,所述方法包括:

a) 测定受试者样品中的KIR3DL3和/或HLA2的水平;

b) 测定来自至少一个对照受试者的样品中的KIR3DL3和/或HLA2的水平,所述至少一个对照受试者对靶向KIR3DL3的疗法具有良好应答性;以及

c) 将所述受试者样品中的KIR3DL3和/或HLA2的水平与来自所述对照受试者的所述样品中的KIR3DL3和/或HLA2的水平进行比较;

其中所述受试者样品中的KIR3DL3和/或HLA2的水平与来自所述至少一个对照受试者的所述样品中的KIR3DL3和/或HLA2的水平相同或高于后者表明所述受试者将对所述疗法有应答。

31. 根据权利要求28到30中任一项所述的方法,其中所述样品是从至少一个受试者获得的单个样品的一部分或从至少一个受试者获得的合并样品的部分。

32. 根据权利要求28到31中任一项所述的方法,其中所述疗法阻断(a) HHLA2与KIR3DL3;和/或(b) PD-1与PD-L1和/或PD-L2之间的相互作用和/或信号传导。

33. 根据权利要求26到32中任一项所述的方法,其中所述样品包括从所述受试者获得的细胞、血清、瘤周组织和/或瘤内组织。

34. 根据权利要求33所述的方法,其中所述细胞是T细胞或自然杀伤(NK)细胞。

35. 一种治疗患有癌症的受试者的方法, 所述方法包括向所述受试者施用至少一种根据权利要求1到19中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

36. 根据权利要求35所述的方法, 其中所述至少一种抗体或其抗原结合片段 (a) 减少所述癌症中的增殖癌细胞的数量; (b) 减小所述癌症的肿瘤的体积或大小; 和/或 (c) 激活T细胞和/或NK细胞。

37. 根据权利要求35或36所述的方法, 其中所述至少一种抗体或其抗原结合片段在药学上可接受的调配物中施用。

38. 根据权利要求35到37中任一项所述的方法, 其进一步包括向所述受试者施用用于治疗癌症的治疗剂或方案。

39. 根据权利要求35到38中任一项所述的方法, 其进一步包括向所述受试者施用选自以下组成的组的另外的疗法: 免疫疗法、检查点阻断、癌症疫苗、嵌合抗原受体、化学疗法、放射、靶向疗法和外科手术。

40. 根据权利要求39所述的方法, 其中所述嵌合抗原受体靶向CD19。

41. 根据权利要求35到40中任一项所述的方法, 其中所述受试者的癌细胞和/或肿瘤免疫浸润细胞表达HHLA2。

42. 根据权利要求35到41中任一项所述的方法, 其中所述癌症选自以下组成的组: 腺癌、慢性髓细胞性白血病 (CML)、肺癌、肾癌、胰腺癌、结直肠癌、急性髓性白血病、头颈癌、肝癌、卵巢癌、前列腺癌、子宫癌、神经胶质瘤、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、乳腺癌、胰腺导管癌、胸腺瘤、B-CLL、白血病、B细胞淋巴瘤和被表达HHLA2受体的免疫细胞浸润的癌症。

43. 根据权利要求42所述的方法, 其中所述癌症选自以下组成的组: 肺癌、肾癌、胰腺癌、结直肠癌、急性髓性白血病 (AML)、头颈癌、肝癌、卵巢癌、前列腺癌和子宫癌。

44. 根据权利要求35到43中任一项所述的方法, 其中所述受试者是癌症的动物模型。

45. 根据权利要求44所述的方法, 其中所述动物模型是小鼠模型, 任选地其中所述小鼠模型是人源化小鼠模型。

46. 根据权利要求35到45中任一项所述的方法, 其中所述受试者是哺乳动物。

47. 根据权利要求46所述的方法, 其中所述哺乳动物是人源化小鼠或人。

48. 根据权利要求47所述的方法, 其中所述哺乳动物是人。

49. 一种使用至少一种抗KIR3DL3抗体或其抗原结合片段调节免疫应答的方法。

50. 根据权利要求49所述的方法, 其中所述至少一种抗KIR3DL3抗体或其抗原结合片段抑制或破坏HHLA2与其结合抑制剂受体KIR3DL3之间的相互作用。

51. 根据权利要求49或50所述的方法, 其中至少一种抗KIR3DL3抗体或其抗原结合片段与细胞毒性药剂缀合。

52. 根据权利要求51所述的方法, 其中所述细胞毒性药剂选自以下组成的组: 化学治疗剂、生物药剂、毒素和放射性同位素。

53. 根据权利要求49到52中任一项所述的方法, 其中所述免疫应答被下调或上调。

54. 根据权利要求49到53中任一项所述的方法, 其中所述至少一种抗KIR3DL3抗体或其抗原结合片段根据权利要求1到19中任一项所述。

55. 根据权利要求49到54中任一项所述的方法, 其中 (a) HHLA2与KIR3DL3; 和/或 (b) PD-1与PD-L1和/或PD-L2之间的相互作用被阻断。

56. 根据权利要求49到55中任一项所述的方法, 其中所述抗KIR3DL3抗体或其抗原结合片段是用于癌症免疫疗法的T细胞激活检查点抑制剂。

57. 根据权利要求49到56中任一项所述的方法, 其中所述调节免疫应答包括调节T细胞功能或NK细胞功能。

58. 根据权利要求57所述的方法, 其中所述T细胞功能或NK细胞功能包括细胞毒活性。

59. 根据权利要求58所述的方法, 其中所述细胞毒活性是针对癌细胞的。

60. 根据权利要求59所述的方法, 其中所述癌细胞表达HHLA2。

61. 根据权利要求56到60中任一项所述的方法, 其中所述癌症选自由以下组成的组: 腺癌、慢性髓细胞性白血病 (CML)、肺癌、肾癌、胰腺癌、结直肠癌、急性髓性白血病、头颈癌、肝癌、卵巢癌、前列腺癌、子宫癌、神经胶质瘤、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、乳腺癌、胰腺导管癌、胸腺瘤、B-CLL、白血病、B细胞淋巴瘤和被表达HHLA2受体的免疫细胞浸润的癌症。

62. 根据权利要求61所述的方法, 其中所述癌症选自由以下组成的组: 肺癌、肾癌、胰腺癌、结直肠癌、急性髓性白血病 (AML)、头颈癌、肝癌、卵巢癌、前列腺癌和子宫癌。

63. 根据权利要求49到62中任一项所述的方法, 其进一步包括选自由以下组成的组的另外的疗法: 免疫疗法、检查点阻断、癌症疫苗、嵌合抗原受体、化学疗法、放射、靶向疗法和外科手术。

64. 根据权利要求63所述的方法, 其中所述嵌合抗原受体靶向CD19。

65. 根据权利要求49到64中任一项所述的方法, 其中所述免疫应答在癌症的动物模型中调节。

66. 根据权利要求65所述的方法, 其中所述动物模型是小鼠模型, 任选地其中所述小鼠模型是人源化小鼠模型。

67. 根据权利要求49到66中任一项所述的方法, 其中所述免疫应答在哺乳动物中调节。

68. 根据权利要求67所述的方法, 其中所述哺乳动物是人源化小鼠或人。

69. 根据权利要求68所述的方法, 其中所述哺乳动物是人。

抗KIR3DL3抗体和其用途

[0001] 相关申请案的交叉引用

[0002] 本申请要求于2019年10月4日提交的美国临时申请序列号62/910,594的权益;所述申请的全部内容通过引用整体并入本文。

[0003] 权利声明

[0004] 本发明是在由美国国立卫生研究院 (National Institutes of Health) 授予的授权号P50CA101942下由政府支持进行的。政府享有本发明的某些权利。

背景技术

[0005] 免疫检查点,如CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIR家族受体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、GITR、4-1BB、OX-40、BTLA、SIRP α (CD47)、CD48、2B4 (CD244)、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、嗜乳脂蛋白和A2aR以及更多,基于众多输入之间的复杂和组合相互作用负调节免疫应答进程。免疫检查点抑制剂可以调节一些受试者的免疫应答,但免疫检查点表达和与天然结合配偶体的相互作用在受试者之间和受试者的组织内有所不同。显著百分比的患者对此治疗没有应答,并且许多有应答的患者最终会产生抗性。因此,迫切需要找到不因PD-1途径而冗余的另外的免疫途径。

[0006] HERV-H LTR相关2 (HHLA2,也称为B7-H5、B7-H7) 是调节T细胞功能的B7家族成员。HHLA2在多种肿瘤(例如实体癌和血液癌,包含原发性人肾细胞癌(RCC))和抗原呈递细胞中广泛表达,并且已被认为是T细胞激活和抑制配体。HHLA2被鉴定为TMIGD2 (CD28H、IGPR-1) 的特异性配体,并且HHLA2/TMIGD2相互作用通过AKT依赖性信号传导级联选择性地共刺激人T细胞生长和细胞因子产生 (Zhu等人 (2013)《自然通讯 (Nat. Comm.)》4:2043;Janakiram等人 (2015)《临床癌症研究 (Clin. Cancer Res.)》21:2359-2366)。在原初T细胞中表达的TMIGD2是HHLA2的激活受体,并且在T细胞抗原受体 (TCR) 参与后转导共刺激信号。TMIGD2在重复TCR刺激后被下调。HHLA2的推定抑制性受体可能在激活的T细胞上被上调以调节T细胞激活。

发明内容

[0007] 在本公开之前,若干项研究表明在激活的T细胞上存在未表征的HHLA2受体,所述受体发挥共同抑制功能 (Zhao等人 (2013)《美国国家科学院院刊 (Proc. Natl. Acad. Sci. USA)》110:9879-9884;Xiao和Freeman等人 (2015)《临床癌症研究》21:2201-2203;Wang等人 (2014)《免疫学杂志 (J. Immunol.)》192:126.11)。发现HHLA2与KIR3DL3结合,即T细胞和NK细胞上的受体,并且HHLA2-KIR3DL3相互作用的结果是抑制T细胞和NK细胞激活 (PCT/US2019/026034)。因此,本公开涵盖对KIR3DL3受体是癌症免疫疗法候选者的认识,并且本文提供了用于靶向KIR3DL3以调节免疫应答的组合物和方法。

[0008] 本公开至少部分地基于以下发现:靶向KIR3DL3的药剂(例如抗体)可以特异性阻断HHLA2-KIR3DL3相互作用并且可以用于调节免疫应答的方法中。重要的是,本文提出靶向

KIR3DL3不会破坏HHLA2的整体功能,这还包含通过其与TMIGD2的相互作用激活免疫应答。因此,本公开提供了重要且令人惊讶的发现,即靶向KIR3DL3提供仅阻断HHLA2的免疫抑制功能的特异性,从而在不下调HHLA2的免疫激活功能的情况下引发有效的免疫应答(例如,针对癌细胞)。开发特异性阻断HHLA2途径的免疫抑制活性并且保持其刺激功能的药物表示在患有癌症(例如,血液癌症和实体瘤,包含透明细胞肾细胞癌(ccRCC))的患者中进行免疫检查点阻断的新方法。

[0009] 本公开还至少部分地基于以下发现:靶向KIR3DL3和PD-1的药剂可以用于调节免疫应答和/或治疗癌症。在一些实施例中,本文所描述的KIR3DL3 x PD-1双特异性抗体可用作检查点免疫疗法,如激活肿瘤中的T细胞和NK细胞。在一些实施例中,KIR3DL3 x PD-1双特异性抗体与PD-1或PD-L1或其它检查点免疫疗法相加或协同。此外,所述肿瘤中的HHLA2和/或KIR3DL3表达是用于确定对KIR3DL3 mAb和/或KIR3DL3 x PD-1双特异性抗体检查点阻断的应答性的有用生物标志物。

[0010] 一组示例性代表性抗KIR3DL3人单克隆抗体(mAb)在本文中被描述为免疫检查点抑制剂。鉴定了阻断性和非阻断性抗KIR3DL3 mAb,并且阻断HHLA2与KIR3DL3结合的抗KIR3DL3 mAb在T细胞和NK细胞测定中示出为检查点抑制剂抗体。

[0011] 一方面,提供了单克隆抗体或其抗原结合片段,其包括:a)重链序列,所述重链序列与选自由表2、7和8中列出的序列组成的组的重链序列具有至少约95%同一性;和/或b)轻链序列,所述轻链序列与选自由表2、7和8中列出的序列组成的组的轻链序列具有至少约95%同一性。

[0012] 另一方面,提供了单克隆抗体或其抗原结合片段,其包括:a)一个、两个或三个重链CDR序列,所述重链CDR序列各自与选自由表2、7和8中列出的序列组成的组的重链CDR序列具有至少约95%同一性;和/或b)一个、两个或三个轻链CDR序列,所述轻链CDR序列各自与选自由表2、7和8中列出的序列组成的组的轻链CDR序列具有至少约95%同一性。

[0013] 仍另一方面,提供了单克隆抗体或其抗原结合片段,其包括:a)重链序列,所述重链序列选自由表2、7和8中列出的序列组成的组;和/或b)轻链序列,所述轻链序列选自由表2、7和8中列出的序列组成的组。

[0014] 又另一方面,提供了单克隆抗体或其抗原结合片段,其包括:a)一个、两个或三个重链CDR序列,所述重链CDR序列各自选自由表2、7和8中列出的序列组成的组;和/或b)一个、两个或三个轻链CDR序列,所述轻链CDR序列各自选自由表2、7和8中列出的序列组成的组。

[0015] 进一步提供了许多实施例,所述实施例可以应用于如本文所描述的本公开所涵盖的任何方面。例如,在一个实施例中,单克隆抗体或其抗原结合片段是嵌合的、人源化的、复合的、鼠的或人的。在另一个实施例中,单克隆抗体或其抗原结合片段:(a)经可检测标记;(b)与细胞毒性药剂,任选地化学治疗剂、生物药剂、毒素和/或放射性同位素缀合;(c)包括效应结构域;(d)包括Fc结构域;和/或(e)选自由以下组成的组:Fv、Fav、F(ab')₂、Fab'、dsFv、scFv、sc(Fv)₂和双抗体片段。在仍另一个实施例中,单克隆抗体或其抗原结合片段能从以保藏登记号_____保藏的杂交瘤_____获得。在又另一个实施例中,单克隆抗体或其抗原结合片段抑制HHLA2与KIR3DL3的结合。在T细胞激活测定中阻断HHLA2与KIR3DL3结合的KIR3DL3 mAb被示出是检查点阻断剂。在另一个实施例中,单克隆抗体或其抗原结合片段

与KIR3DL3特异性结合。

[0016] 与KIR3DL3和PD-1结合的一组示例性代表性双特异性抗体在本文中被描述为免疫检查点抑制剂。

[0017] 一方面,本文提供了一种双特异性抗体或其抗原结合片段,其包括:a)重链序列,所述重链序列与选自表2和7到9中列出的序列组成的组的重链序列具有至少约95%同一性;和/或b)轻链序列,所述轻链序列与选自表2和7到9中列出的序列组成的组的轻链序列具有至少约95%同一性。

[0018] 另一方面,提供了一种双特异性抗体或其抗原结合片段,其包括:a)一个、两个或三个重链CDR序列,所述重链CDR序列各自与选自表2和7到9中列出的序列组成的组的重链CDR序列具有至少约95%同一性;和/或b)一个、两个或三个轻链CDR序列,所述轻链CDR序列各自与选自表2和7到9中列出的序列组成的组的轻链CDR序列具有至少约95%同一性。

[0019] 在仍另一方面,提供了一种双特异性抗体或其抗原结合片段,其包括:a)重链序列,所述重链序列选自表2和7到9中列出的序列组成的组;和/或b)轻链序列,所述轻链序列选自表2和7到9中列出的序列组成的组。

[0020] 在又另一方面,提供了一种双特异性抗体或其抗原结合片段,其包括:a)一个、两个或三个重链CDR序列,所述重链CDR序列各自选自表2和7到9中列出的序列组成的组;和/或b)一个、两个或三个轻链CDR序列,所述轻链CDR序列各自选自表2和7到9中列出的序列组成的组。

[0021] 提供了许多实施例,所述实施例可以应用于如本文所描述的本公开所涵盖的任何方面。例如,在一个实施例中,双特异性抗体或其抗原结合片段是嵌合的、人源化的、复合的、鼠的或人的。在另一个实施例中,双特异性抗体或其抗原结合片段:(a)经可检测标记;(b)与细胞毒性药剂,任选地化学治疗剂、生物药剂、毒素和/或放射性同位素缀合;(c)包括效应结构域;(d)包括Fc结构域;和/或(e)选自以下组成的组:Fv、Fav、F(ab')₂、Fab'、dsFv、scFv、sc(Fv)₂和双抗体片段。在仍另一个实施例中,双特异性抗体或其抗原结合片段能从以保藏登记号_____保藏的杂交瘤_____获得。在仍另一个实施例中,双特异性抗体或其抗原结合片段抑制(a) HHLA2与KIR3DL3的结合和(b) PD-1与PD-L1和/或PD-L2的结合。与KIR3DL3和PD-1两者结合的双特异性抗体被示出是检查点阻断剂。在另一个实施例中,双特异性抗体或其抗原结合片段与KIR3DL3和PD-1特异性结合。在仍另一个实施例中,双特异性抗体或其抗原结合片段包括a)表9中列出的重链序列;和/或b)表9中列出的轻链序列。

[0022] 另一方面,提供了免疫球蛋白重链和/或免疫球蛋白轻链,其选自表2和7到9中列出的免疫球蛋白重链和免疫球蛋白轻链序列组成的组。

[0023] 在仍另一方面,提供了一种分离的核酸分子,其(a)编码本文所描述的本公开所涵盖的免疫球蛋白重链、免疫球蛋白轻链和/或单克隆抗体或其抗原结合片段;和/或(b)在严格条件下与以下杂交:编码选自表2和7到9中列出的多肽序列组成的组的多肽的核酸的补体或与编码选自表2和7到9中列出的多肽序列组成的组的多肽的核酸具有至少约95%同源性的序列。

[0024] 在又另一方面,提供了一种包括本文所描述的分离的核酸的载体。

[0025] 另一方面,提供了宿主细胞,其包括本文所描述的分离的核酸,包括本文所描述的载体,表达本文所描述的抗体或其抗原结合片段或者能以保藏登记号_____获得。

[0026] 在仍另一方面,提供了一种装置或试剂盒,其包括至少一种本文所描述的抗体或其抗原结合片段(例如,单克隆抗体、双特异性抗体或其抗原结合片段);一种装置或试剂盒,其任选地包括用于检测至少一种抗体或其抗原结合片段或包括抗体或其抗原结合片段的复合物的标记。

[0027] 在又另一方面,提供了一种产生至少一种本文所描述的抗体或其抗原结合片段(例如,单克隆抗体、双特异性抗体或其抗原结合片段)的方法,所述方法包括以下步骤:(i)在适于允许所述抗体或其抗原结合片段的表达的条件下培养已被核酸转化的经转化宿主细胞,所述核酸包括编码至少一种根据本公开的序列;以及(ii)回收所表达的抗体或其抗原结合片段。

[0028] 另一方面,一种检测KIR3DL3多肽的存在或水平的方法,所述方法包括通过使用至少一种本文所描述的抗体或其抗原结合片段(例如,单克隆抗体、双特异性抗体或其抗原结合片段)来在样品中检测所述多肽。在一个实施例中,至少一种抗体或其抗原结合片段与KIR3DL3多肽形成复合物,并且复合物是以以下形式检测的:酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、免疫化学方式、蛋白质印迹或使用细胞内流动测定。

[0029] 在仍另一方面,提供了一种预测对靶向KIR3DL3的疗法的应答性的方法,所述方法包括:a)使用至少一种本文所描述的抗体或其抗原结合片段(例如,单克隆抗体、双特异性抗体或其抗原结合片段)测定受试者样品中的KIR3DL3和/或HLA2的水平;b)使用至少一种本文所描述的抗体或其抗原结合片段测定来自至少一个对照受试者的样品中的KIR3DL3和/或HLA2的水平,所述至少一个对照受试者对靶向KIR3DL3的疗法具有良好应答性;以及c)将所述受试者样品中的KIR3DL3和/或HLA2的水平与来自所述对照受试者的所述样品中的KIR3DL3和/或HLA2的水平进行比较;其中所述受试者样品中的KIR3DL3和/或HLA2的水平与来自所述至少一个对照受试者的所述样品中的KIR3DL3和/或HLA2的水平相同或高于后者表明所述受试者将对疗法有应答。在一个实施例中,疗法使用至少一种本文所描述的抗体或其抗原结合片段(例如,单克隆抗体、双特异性抗体或其抗原结合片段)靶向KIR3DL3。

[0030] 在又另一方面,提供了一种使用至少一种本文所描述的抗体或其抗原结合片段(例如,单克隆抗体、双特异性抗体或其抗原结合片段)预测对靶向KIR3DL3的疗法的应答性的方法,所述方法包括:a)测定受试者样品中的KIR3DL3和/或HLA2的水平;b)测定来自至少一个对照受试者的样品中的KIR3DL3和/或HLA2的水平,所述至少一个对照受试者对靶向KIR3DL3的疗法具有良好应答性;以及c)将所述受试者样品中的KIR3DL3和/或HLA2的水平与来自所述对照受试者的所述样品中的KIR3DL3和/或HLA2的水平进行比较;其中所述受试者样品中的KIR3DL3和/或HLA2的水平与来自所述至少一个对照受试者的所述样品中的KIR3DL3和/或HLA2的水平相同或高于后者表明所述受试者将对所述疗法有应答。

[0031] 如上文所描述的,某些实施例适用于本文所描述的任何方法。例如,在一个实施例中,样品是从至少一个受试者获得的单个样品的一部分或从至少一个受试者获得的合并样品的部分。在另一个实施例中,疗法阻断(a) HHLA2与KIR3DL3;和/或(b) PD-1与PD-L1和/或PD-L2之间的相互作用和/或信号传导。在仍另一个实施例中,样品包括细胞(例如,从受试者获得的T细胞或自然杀伤(NK)细胞、血清、瘤周组织和/或瘤内组织)。

[0032] 在又另一方面,提供了一种治疗患有癌症的受试者的方法,所述方法包括向受试

者施用至少一种本文所描述的抗体或其抗原结合片段(例如,单克隆抗体、双特异性抗体或其抗原结合片段)。

[0033] 如上文所描述的,某些实施例适用于本文所描述的任何方法。例如,在一个实施例中,至少一种本文所描述的抗体或其抗原结合片段(例如,单克隆抗体、双特异性抗体或其抗原结合片段)(a)减少所述癌症中的增殖癌细胞的数量;(b)减小所述癌症的肿瘤的体积或大小;和/或(c)激活T细胞和/或NK细胞。在另一个实施例中,至少一种本文所描述的抗体或其抗原结合片段(例如,单克隆抗体、双特异性抗体或其抗原结合片段)在药学上可接受的调配物中施用。在仍另一个实施例中,本文所描述的方法进一步包括向受试者施用用于治疗癌症的治疗剂或方案。在又另一个实施例中,本文所描述的方法进一步包括向受试者施用选自以下组成的组的另外的疗法:免疫疗法、检查点阻断、癌症疫苗、嵌合抗原受体(例如,靶向CD19的CAR)、化学疗法、放射、靶向疗法和外科手术。在另一个实施例中,受试者的癌细胞和/或肿瘤免疫浸润细胞表达HHLA2。在仍另一个实施例中,癌症选自以下组成的组:腺癌、慢性髓细胞性白血病(CML)、肺癌、肾癌、胰腺癌、结直肠癌、急性髓性白血病、头颈癌、肝癌、卵巢癌、前列腺癌、子宫癌、神经胶质瘤、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、乳腺癌、胰腺导管癌、胸腺瘤、B-CLL、白血病、B细胞淋巴瘤和被表达HHLA2受体的免疫细胞浸润的癌症。在又另一个实施例中,癌症选自以下组成的组:肺癌、肾癌、胰腺癌、结直肠癌、急性髓性白血病(AML)、头颈癌、肝癌、卵巢癌、前列腺癌和子宫癌。在另一个实施例中,受试者是癌症的动物模型。在仍另一个实施例中,动物模型是小鼠模型,任选地其中所述小鼠模型是人源化小鼠模型。在又另一个实施例中,受试者是哺乳动物,如人源化小鼠或人。

[0034] 另一方面,提供了一种使用至少一种本文所描述的抗KIR3DL3抗体或其抗原结合片段调节免疫应答的方法。例如,在一个实施例中,至少一种本文所描述的抗KIR3DL3抗体或其抗原结合片段抑制或破坏HHLA2与其结合抑制剂受体KIR3DL3之间的相互作用。在另一个实施例中,至少一种本文所描述的抗KIR3DL3抗体或其抗原结合片段与细胞毒性药剂(例如,化学治疗剂、生物药剂、毒素和/或放射性同位素)缀合。在仍另一个实施例中,下调免疫应答。在另一个实施例中,上调免疫应答。在又另一个实施例中,(a)HHLA2与KIR3DL3;和/或(b)PD-1与PD-L1和/或PD-L2之间的相互作用被阻断。在另一个实施例中,抗KIR3DL3抗体或其抗原结合片段是用于癌症免疫疗法的T细胞激活检查点抑制剂。在又另一个实施例中,调节免疫应答包括调节T细胞功能或NK细胞功能(例如,细胞毒性,如针对癌细胞,如表达HHLA2的癌细胞)。在又另一个实施例中,癌症癌症选自以下组成的组:腺癌、慢性髓细胞性白血病(CML)、肺癌、肾癌、胰腺癌、结直肠癌、急性髓性白血病、头颈癌、肝癌、卵巢癌、前列腺癌、子宫癌、神经胶质瘤、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、乳腺癌、胰腺导管癌、胸腺瘤、B-CLL、白血病、B细胞淋巴瘤和被表达HHLA2受体的免疫细胞浸润的癌症。在另一个实施例中,癌症选自以下组成的组:肺癌、肾癌、胰腺癌、结直肠癌、急性髓性白血病(AML)、头颈癌、肝癌、卵巢癌、前列腺癌和子宫癌。在仍另一个实施例中,一种方法进一步包括向受试者施用选自以下组成的组的另外的疗法:免疫疗法、检查点阻断、癌症疫苗、嵌合抗原受体(例如,靶向CD19的CAR)、化学疗法、放射、靶向疗法和外科手术。在又另一个实施例中,在癌症动物模型(例如,小鼠模型和/或人源化动物模型)中调节免疫应答。在另一个实施例中,在哺乳动物,如人源化小鼠或人中调节免疫应答。

[0035] 对于示出条形柱状图、曲线或与图例相关的其它数据的任何图,从左到右针对每

个指示呈现的柱形、曲线或其它数据直接对应于图例的从上到下或从左到右的框。

附图说明

[0036] 图1A-图1B示出了将KIR3DL3鉴定为HHLA2受体的表达筛选的结果。图1A示出了使用可溶性HHLA2-mIgG2a (HHLA2-Ig) 与在HEK293细胞中单独表达的所指示细胞表面受体结合的细胞微阵列分析结果。HHLA2-Ig示出与TMIGD2、KIR3DL3和对照 (FCGR2A) 结合, 但不与KIR家族的其它成员、PD-1、PD-L1或HHLA2结合。图1B示出了使用指定浓度的HHLA2-Ig或同型对照 (0.1 μ g/mL到160 μ g/mL), 将HHLA2-Ig或对照Ig与稳定表达KIR3DL3、TMIGD2或HHLA2的对照300.19细胞或300.19细胞结合的流式细胞术分析。

[0037] 图2A-图2D示出了KIR3DL3作为HHLA2的第二受体的鉴定和表征。图2A示出了表达384个人受体和共表达GFP的细胞的重复微阵列载玻片, 其将KIR3DL3鉴定为HHLA2-Ig的受体 (上图) 并且示出GFP表达作为转染和斑点定位的对照 (下图)。图2B示出了使用可溶性HHLA2-mIgG2a (HHLA2-Ig) 与在HEK293细胞中单独表达的所指示细胞表面受体结合的图1A中所示出的细胞微阵列分析结果。HHLA2-Ig示出与TMIGD2、KIR3DL3和对照 (FCGR2A) 结合, 但不与KIR家族的其它成员、PD-1、PD-L1或HHLA2结合。图2C示出了图2B (和图1A) 中所示出受体阵列的转染对照 (GFP表达) 结果。图2D示出了受体阵列的阳性对照处理结果。使用可溶性PD-1-Ig和PD-L1-Ig以及与图2B和图1A中相同的过表达受体组一起温育的细胞微阵列分析示出与FCGR2A、PD-1和PD-L1结合但不与KIR结合。不与PD-1-Ig结合的PD-L1点是交替剪接的异构体。

[0038] 图3A-图3E示出一组KIR3DL3和HHLA2 mAb的表征。(图3A) KIR3DL3 mAb与表达KIR3DL3的300.19细胞结合的流式细胞术分析。图3B示出了KIR3DL3 mAb阻断HHLA2-Ig与表达KIR3DL3的300.19细胞的结合的能力。图3C示出了HHLA2 mAb与表达HHLA2的300.19细胞的结合, 其中2C4、2G2和6F10表现出最强结合, 而6D10表现出较少结合。图3D示出了HHLA2 mAb阻断HHLA2-Ig与表达KIR3DL3的300.19细胞的结合的能力, 其中2C4、2G2和6F10表现出最强结合。图3E示出了HHLA2 mAb2G2和6F10阻断HHLA2-Ig与表达TMIGD2的300.19细胞的结合的能力。

[0039] 图4A-图4C示出了HHLA2-mIgG2a与KIR3DL3和TMIGD2的结合。图4A示出了图1B的归一化的结合数据: HHLA2-mIgG2a与KIR3DL3转染的300.19细胞的结合 (蓝色) 或HHLA2-mIgG2a与TMIGD2转染的300.19细胞的结合 (青色) 或HHLA2-mIgG2a与对照HHLA2转染的300.19细胞的结合 (红色) 或HHLA2-mIgG2a与亲本300.19细胞 (绿色) 的结合。图4B和图4C示出了通过流式细胞术与KIR3DL3转染的293T细胞 (图4B) 或TMIGD2转染的293T细胞 (图4C) 结合的HHLA2-mIgG2a或同型对照 (10 μ g/ml)。

[0040] 图5示出了通过流式细胞术抗KIR3DL3 mAb在KIR3DL3转染的300.19小鼠前B细胞白血病细胞系上的结合数据。

[0041] 图6示出了通过蛋白质印迹抗KIR3DL3 mAb在KIR3DL3上的结合数据。具体地, 示出了使用KIR3DL3转染的Jurkat细胞进行的KIR3DL3 mAb的蛋白质印迹分析结果。

[0042] 图7示出了Jurkat亲本细胞、用KIR3DL3转染的Jurkat、NK-92细胞和NK-92-MI细胞中的KIR3DL3表达。用5 μ g/ml的抗KIR3DL3 mAb 574.1F12印迹裂解物。

[0043] 图8示出了在公开可用的数据库中评估的KIR3DL3表达的单细胞RNA测序分析 (参

见可在`ebi.ac.uk/gxa/sc/home`万维网上获得的EMBL-EBI数据库和题为“使用单细胞转录组学重建人孕早期胎儿-母体界面(Reconstructing the human first trimester fetal-maternal interface using single cell transcriptomics)”的对应出版物,可在`biorxiv.org/content/10.1101/429589v1`万维网上获得)。KIR3DL3表达在右图上指示为蓝点。黑框突出显示大多数KIR3DL3表达的蜕膜NK细胞。

[0044] 图9示出了HHLA2与KIR3DL3结合的抗KIR3DL3 mAb阻断。

[0045] 图10A-图10D示出了激活的人T细胞和NK92-MI细胞上的KIR3DL3表达。图10A示出了从4个正常供体的全血中纯化,用CD3/CD28抗体四聚体激活,并且在指定的日子经受两次FACS分析以评估门控CD3+CD4+和CD3+CD8+T细胞中的KIR3DL3表达的结果。示出在第0天(未激活)(图10B)和激活后第21天(图10C)的KIR3DL3表达的代表性FACS图。图10D示出了NK92-MI上的KIR3DL3表达(左图),但在NK-92细胞上的表达最低(右图)。

[0046] 图11A-图11C示出了KIR3DL3是T细胞中的抑制性受体,并且HHLA2/KIR3DL3阻断增强了T细胞激活。图11A示出了在存在或不存在如指示的CD28 mAb的情况下,与表达抗CD3 scFV的CHO细胞、共表达抗CD3 scFV和HHLA2的CHO细胞或未转染的CHO细胞共培养的表达KIR3DL3的Jurkat IL-2报告基因T细胞的结果。荧光素酶活性表示为相对光单位(RLU)。图11B和图11C示出了在存在CD28 mAb和HHLA2 mAb(图11B)或KIR3DL3 mAb(图11C)的情况下,与共表达抗CD3 scFV和HHLA2的CHO细胞共培养的表达KIR3DL3的Jurkat IL-2报告基因T细胞的结果。IL-2报告基因荧光素酶活性的激活倍数表示为平均值 $\pm$ S.D. ($n \geq 3$; **** $P \leq 0.0001$)。

[0047] 图12示出了HHLA2/TMIGD2相互作用增强T细胞激活。将表达TMIGD2并且带有与荧光素酶连接的NFAT启动子的Jurkat T细胞与抗CD3 scFV CHO细胞或HHLA2-抗CD3 scFV CHO细胞共培养,并且测定荧光素酶活性(RLU)。定量呈现为平均值 $\pm$ S.D. ($n \geq 3$; *** $P \leq 0.001$)。

[0048] 图13示出了响应于抗CD3-scFV和HHLA2介导的信号Jurkat-KIR3DL3 T细胞中IL-2启动子驱动的荧光素酶表达的抗KIR3DL3 mAb增强。

[0049] 图14示出了响应于抗CD3-scFV和HHLA2介导的信号Jurkat-HHLA2 T细胞中IL-2启动子驱动的荧光素酶表达的抗KIR3DL3 mAb增强。

[0050] 图15A-图15D示出了KIR3DL3-CD19-CAR-T细胞对表达CD19和HHLA2的HeLa肿瘤的细胞毒性。图15A示出了KIR3DL3/CAR-19表达质粒和慢病毒产生。具体地,图15A示出了PMC456-Ef1a表达质粒的示意图。图15B示出了KIR3DL3/CD19-CAR-T细胞的生成和扩增。具体地,图15B示出了KIR3DL3/CAR-19T细胞(PMC456细胞)的FACS图。图15C示出了稳定的HeLa-CD19和HeLa-CD19+KIR3DL3表达性细胞的生成。具体地,图15C示出了HeLa-CD19和HeLa-CD19-KIR3DL3肿瘤细胞的FACS图。图15D示出了HHLA2 mAb增强KIR3DL3 CD19-CAR-T细胞对HHLA2+CD19转染的HeLa肿瘤细胞的细胞毒性。

[0051] 图16A-图16C示出了表达KIR3DL3的NK92细胞对表达或不表达HHLA2的HeLa肿瘤靶细胞的细胞毒性测定。图16A示出了KIR3DL3表达质粒和慢病毒产生。具体地,图16A示出了PMC579 KIR3DL3表达质粒的示意图。图16B示出了KIR3DL3转导的NK92细胞的衍生。具体地,图16B示出了KIR3DL3/NK92 FACS图。图16C分别示出了HHLA2转染或转导的K562和HeLa细胞的衍生。具体地,图16C示出了HHLA2转染的K562细胞和HHLA2转导的HeLa肿瘤细胞的FACS

图。

[0052] 图17A-图17C示出了NK92对单独的HeLa和HeLa转导的表达HHLA2的肿瘤靶细胞的细胞毒性。图17A示出了KIR3DL3-HHLA2相互作用/途径对NK92细胞毒性的抑制。图17B示出了HHLA2 mAb和KIR3DL3 mAb对NK92-KIR3DL3细胞毒性的增强。图17C示出了某些细胞毒性测定的示意图。

[0053] 图18示出了通过流式细胞术在Raji-B2M KO和HHLA2转染的Raji-B2M KO中的 β 2-微球蛋白和HHLA2表达。

[0054] 图19A-图19E示出了KIR3DL3是NK细胞中的抑制性受体,并且HHLA2/KIR3DL3阻断增强了NK细胞毒性。图19A示出了NK92-MI对具有B2M缺失的Raji细胞(Raji-B2M KO细胞)和表达HHLA2的Raji-B2M KO细胞的细胞毒性。图19B和图19C示出了在存在10ug/ml KIR3DL3抗体(图19B)或HHLA2抗体(图19C)和同型对照存在下,NK92-MI对以指示E/T比率表达HHLA2的Raji-B2M KO细胞的细胞毒性。图19D示出了以指定E:T比率与Raji B2M KO细胞或与过表达HHLA2的Raji B2M KO细胞一起温育的NK92-MI的结果。将脱粒测量为CD56+群体的CD107a阳性细胞百分比。对照是单独的效应细胞或具有PMA/ION的效应细胞,这会导致完全脱粒。图19E示出了与同型对照相比,在存在KIR3DL3 mAb(1G7)的情况下靶向过表达HHLA2的Raji B2M KO细胞的NK92-MI细胞的脱粒增强。定量呈现为平均值 $\pm$ S.D. ($N \geq 3$; $P \geq 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.0001$)。

[0055] 图20示出了HHLA2表达不同于PD-L1表达。图20示出了与来自癌症基因组图谱(TCGA)样品的正常肾脏相比,RCC中B7基因家族成员的表达水平。

[0056] 图21A-图21B示出了HHLA2途径模型。HHLA2通过原初T细胞或NK细胞中的TMIGD2递送免疫刺激信号。图21A示出了导致TMIGD2表达丧失和KIR3DL3增益的T细胞激活。HHLA2通过激活的T细胞中的KIR3DL3递送免疫抑制性信号。图21B示出了由抑制性和激活受体调节的NK细胞溶解活性。抑制性受体包含大多数KIR、CD94/NKG2A和LILRB1,它们分别识别MHC I、E和G类。激活受体包含NKG2D、NKp30、NKp44、NKp46、CD94/NKG2C和TMIGD2,它们识别ULBP-1、MICA、MICB、B7-H6、HLA-E、HHLA2和其它。如果肿瘤失去MHC表达(自我缺失),抑制性信号会减少,并且激活信号会占主导地位,导致NK细胞溶解肿瘤。肿瘤上的HHLA2是不依赖于MHC的抑制性信号,所述抑制性信号抑制KIR3DL3阳性NK细胞的裂解。

[0057] 图22示出了构建KIR3DL3 x PD-1双特异性抗体的示意图。

[0058] 图23示出了在Octet测定中KIR3DL3和PD-1人IgG4和scFV抗体的结合传感图。

具体实施方式

[0059] HHLA2,即B7基因家族成员,在多种肿瘤和抗原呈递细胞中广泛表达,并且被认为是T细胞的激活和抑制配体。在原初T细胞中表达的TMIGD2是HHLA2的激活受体,并且在T细胞抗原受体(TCR)参与后转导共刺激信号。TMIGD2在重复TCR刺激后被下调。HHLA2与另一个受体KIR3DL3结合,所述受体在T细胞和NK细胞中表达。如本文所描述的,本公开涵盖以下认识:与HHLA2-TMIGD2相互作用的免疫激活功能不同,HHLA2-KIR3DL3相互作用可以抑制免疫应答,并且为调节多种疾病、病症或病状症(包含例如癌症)提供了有吸引力的靶标。

[0060] 本公开至少部分地基于以下发现:靶向KIR3DL3可以特异性阻断抑制免疫应答的HHLA2-KIR3DL3相互作用。重要的是,靶向KIR3DL3不会破坏HHLA2的整体功能,这还包含通

过其与TMIGD2的相互作用激活免疫应答。因此,精确靶向KIR3DL3提供仅阻断HHLA2的免疫抑制功能的特异性,从而在不下调HHLA2的免疫激活功能的情况下引发有效的免疫应答例如针对癌细胞。

[0061] 本公开还至少部分地基于以下发现:靶向KIR3DL3和PD-1的药剂可以用于调节免疫应答和/或治疗癌症。在一些实施例中,本文所描述的KIR3DL3 x PD-1双特异性抗体是用于激活肿瘤中的T细胞和NK细胞的检查点免疫疗法。在一些实施例中,KIR3DL3 x PD-1双特异性抗体与PD-1或PD-L1或其它检查点免疫疗法相加或协同。此外,肿瘤中的HHLA2和/或KIR3DL3表达是用于确定对KIR3DL3 mAb和/或KIR3DL3 x PD-1双特异性抗体检查点阻断的应答性的有用生物标志物。

[0062] 一组示例性代表性抗KIR3DL3人单克隆抗体(mAb)在本文中被描述为免疫检查点抑制剂。鉴定了阻断性和非阻断性抗KIR3DL3 mAb,并且阻断HHLA2与KIR3DL3结合的抗KIR3DL3 mAb在T细胞和NK细胞测定中示出为检查点抑制剂抗体。本文描述了这些候选治疗性抗KIR3DL3抗体的结合特征以及可变区重链和轻链基因序列。

[0063] 与KIR3DL3和PD-1两者结合的一组示例性代表性双特异性抗体或其抗原结合片段在本文中也描述为免疫检查点抑制剂。靶向具有非重叠表达的两个免疫检查点提供了具有相加或协同抗肿瘤活性的组合疗法。

[0064] 因此,本公开提供了与KIR3DL3特异性结合的单克隆抗体和其抗原结合片段、与KIR3DL3和PD-1结合的双特异性抗体和其抗原结合片段以及其免疫球蛋白、多肽、核酸和使用此类抗体的方法,如用于免疫调节和治疗目的。

[0065] I. 定义

[0066] 本文使用的冠词“一个”和“一种”(“a”和“an”)是指冠词的语法对象中的一个或多个(即,至少一个)。举例来说,“一个要素”是指一个要素或多个要素。

[0067] 术语标志物的“改变后的量”是指与对照样品中的标志物的量相比,样品中标志物的拷贝数增加或减少和/或一个或多个特定标志基因的核酸水平增加或减少。与正常对照样品中标志物的蛋白质水平相比,术语标志物的“改变后的量”还包含样品中标志物的蛋白质水平增加或降低。

[0068] 术语标志物的“改变后的活性”是指与正常对照样品中标志物的活性相比,例如在生物样品中,在疾病状态下标志物的活性增加或减少。标志物的改变后的活性可以是例如标志物的改变后的表达、标志物的改变后的蛋白质水平、标志物的改变后的结构或例如与参与和标志物相同或不同途径的其它蛋白质的改变后的相互作用或与转录激活剂或抑制剂的改变后的相互作用。

[0069] 术语标志物的“改变后的结构”是指与正常或野生型基因或蛋白质相比,标志基因或标志蛋白内存在突变或等位基因变体,例如影响标志物的表达或活性的突变。例如,突变包含但不限于取代、缺失或添加突变。突变可能存在于标志物的编码区或非编码区。

[0070] 术语“激活受体”包含结合抗原、复合抗原(例如,在MHC多肽的情况下)或与抗体结合的免疫细胞受体。此类激活受体包含T细胞受体(TCR)、B细胞受体(BCR)、细胞因子受体、LPS受体、补体受体和Fc受体。

[0071] T细胞受体存在于T细胞上并且与CD3多肽相关。T细胞受体在MHC多肽的情况下受到抗原(以及多克隆T细胞激活试剂)的刺激。通过TCR的T细胞激活会导致许多变化,例如蛋

白质磷酸化、膜脂变化、离子通量、环核苷酸改变、RNA转录变化、蛋白质合成变化和细胞体积变化。

[0072] 术语“嵌合抗原受体”、“CAR”或“CAR-T”是指具有期望抗原特异性的工程化T细胞受体 (TCR)。T淋巴细胞通过T细胞受体 (TCR) 与主要组织相容性复合物 (MHC) I类或II类分子呈递的短肽相互作用来识别特定抗原。对于初始激活和克隆扩增,原初T细胞依赖于提供另外共刺激信号的专业抗原呈递细胞 (APC)。在不存在共刺激的情况下TCR激活可能导致无应答性和克隆无反应性。为了绕过免疫,已经开发了用于衍生具有移植识别特异性的细胞毒性效应细胞的不同方法。已经构建了由源自对TCR相关CD3复合物的细胞表面组分具有特异性的天然配体或抗体的结合结构域组成的CAR。在抗原结合后,此类嵌合抗原受体与效应细胞中的内源信号传导途径连接,并产生与由TCR复合物启动的激活信号类似的激活信号。例如,靶向CD19 (在血液癌细胞上高度表达的蛋白质) 的CAR已表现出良好的临床功效。自从首次报告关于嵌合抗原受体以来,这一概念已经稳步改进,并且嵌合受体的分子设计已经优化,并且常规使用任意数量的众所周知的结合结构域,如scFV、Fav和本文所描述的另一个蛋白质结合片段。

[0073] 通常,CAR是根据本公开考虑使用的一种类型的“细胞疗法”(例如,T细胞疗法)。尽管用于通过调节KIR3DL3途径来调节免疫细胞活性的药剂和方法的许多代表性实施例,如调节KIR3DL3与KIR3DL3天然结合配偶体如HLA2之间的相互作用,但还包含基于免疫细胞的疗法和方法。例如,考虑了经工程化以具有KIR3DL3的敲除、敲低或表达增加的T细胞。类似地,还考虑了免疫细胞或经工程化以具有KIR3DL3、HLA2配体的敲除、敲低或表达增加的其它细胞。

[0074] B细胞受体 (BCR) 存在于B细胞上。B细胞抗原受体是膜Ig (mIg) 与其它跨膜多肽 (例如Ig α 和Ig β) 之间的复合物。mIg的信号转导功能是由寡聚体或多聚体抗原交联受体多肽触发的。B细胞还可以被抗免疫球蛋白抗体激活。BCR激活后,B细胞会发生许多变化,包含酪氨酸磷酸化。

[0075] Fc受体见于许多参与免疫应答的细胞上。Fc受体 (FcR) 是免疫球蛋白多肽 (Ig) 的Fc部分的细胞表面受体。迄今为止已鉴定的人FcR是识别IgG (称为Fc γ R)、IgE (Fc ϵ R1)、IgA (Fc α) 和聚合IgM/A (Fc μ R) 的那些。FcR见于以下细胞类型中:Fc ϵ R I (肥大细胞)、Fc ϵ R.II (许多白细胞)、Fc α R (中性粒细胞) 和Fc μ R (腺上皮、肝细胞) (Hogg,N. (1988)《今日免疫学 (Immunol.Today)》9:185-86)。广泛研究的Fc γ R处于细胞免疫防御中心,并且负责刺激炎症介质和参与自身免疫性疾病发病机制的水解酶的释放 (Unkeless,J.C.等人 (1988)《免疫学年度综述 (Annu.Rev.Immunol.)》6:251-81))。Fc γ R提供了效应细胞与分泌Ig的淋巴细胞之间的关键连接,因为巨噬细胞/单核细胞、多形核白细胞和自然杀伤 (NK) 细胞Fc γ R赋予由IgG介导的特异性识别元素。人白细胞具有至少三种不同的IgG受体:h Fc γ RI (见于单核细胞/巨噬细胞上)、hFc γ RII (在单核细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、血小板,可能地B细胞和K562细胞系上) 和Fc γ III (在NK细胞、中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和巨噬细胞上)。

[0076] 对于T细胞,共刺激信号向T细胞的传输涉及不受环孢菌素A抑制的信号传导途径。另外,共刺激信号可以在T细胞中诱导细胞因子分泌 (例如,IL-2和/或IL-10) 和/或可以防止诱导对抗原的无应答性、诱导无反应性或诱导T细胞中的细胞死亡 (缺失)。

[0077] 术语“活性”在针对多肽例如KIR3DL3和/或KIR3DL3天然结合配偶体如HLA2使用

时,包含蛋白质结构中固有的活性。例如,关于HHLA2配体,术语“活性”包含通过调节免疫细胞中的抑制性信号(例如,通过接合免疫细胞上的天然受体)来调节免疫细胞抑制的能力。本领域技术人员将认识到,当激活形式的HHLA2配体多肽与抑制性受体如KIR3DL3结合时,在免疫细胞中生成抑制性信号。

[0078] 术语“抑制性信号”是指通过免疫细胞上多肽的抑制性受体(例如KLRB1、CTLA4、PD-1等)传输的信号。此类信号通过激活受体(例如,通过TCR、CD3、BCR、TMIGD2或Fc多肽)拮抗信号,并且可能导致例如抑制第二信使生成;抑制增殖;抑制免疫细胞中的效应子功能,例如吞噬作用降低、抗体产生减少、细胞毒性降低、免疫细胞无法产生介质(如细胞因子(例如IL-2)和/或过敏应答的介质);或无反应性的发展。

[0079] 如果生物标志物的量大于或小于正常或对照水平的量大于用于评估量的测定的标准误差,并且优选地所述量的至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、350%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%,则受试者中生物标志物的量“显著”高于或低于生物标志物的正常量。可替代地,如果所述量分别高于或低于生物标志物的正常和/或对照量至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、105%、110%、115%、120%、125%、130%、135%、140%、145%、150%、155%、160%、165%、170%、175%、180%、185%、190%、195%、两倍、三倍、四倍、五倍或更多或介于两者之间的任何范围如5%-100%,则可以认为受试者中生物标志物的量“显著”高于或低于正常和/或对照量。此类显著的调节值可以应用于本文所描述的任何度量,如改变后的表达水平、改变后的活性、癌细胞过度增殖性生长变化、癌细胞死亡变化、生物标志物抑制变化、测试剂结合变化等。

[0080] 术语标志物的“改变后的表达水平”是指以下的测试样品例如来自患有癌症的受试者的样品中标志物的表达水平或拷贝数:大于或小于用于评估表达或拷贝数的测定的标准误差,并且优选地是对照样品(例如,来自未患有相关疾病的健康受试者的样品)中标志物或染色体区的表达水平或拷贝数和优选地若干个对照样品中标志物或染色体区的平均表达水平或拷贝数的至少两倍,更优选地三倍、四倍、五倍或十倍或更多倍。改变后的表达水平大于或小于用于评估表达或拷贝数的测定的标准误差,并且优选地是对照样品(例如,来自未患有相关疾病的健康受试者的样品)中标志物的表达水平或拷贝数和优选地若干个对照样品中标志物的平均表达水平或拷贝数的至少两倍,更优选地三倍、四倍、五倍或十倍或更多倍。

[0081] 除非本文另有说明,否则术语“抗体(antibody)”和“抗体(antibodies)”广泛涵盖天然存在形式的抗体(例如IgG、IgA、IgM、IgE)和重组抗体如单链抗体、嵌合抗体和人源化抗体和多特异性抗体以及所有上述的片段和衍生物,所述片段和衍生物至少具有抗原结合位点。抗体衍生物可以包括与抗体缀合的蛋白质或化学部分。“抗体”是指包括通过二硫键相互连接的至少两个重(H)链和两个轻(L)链的糖蛋白或其抗原结合部分。每个重链包含一个重链可变区(本文缩写为 V_H)和一个重链恒定区。重链恒定区包含三个结构域,CH1、CH2以及CH3。每个轻链包含一个轻链可变区(本文缩写为 V_L)和一个轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域,CL。 V_H 区和 V_L 区可以进一步细分为被称作互补决定区(CDR)的超变区,所述超变区散布有更保守的被称作构架区(FR)的区。每个 V_H 和 V_L 由按以下顺序从氨基端到羧基端布

置的三个CDR和四个FR构成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。术语“灭活抗体”是指不诱导补体系统的抗体。

[0082] 如本文所使用的术语“抗体”还包含抗体的“抗原结合部分”(或简称为“抗体部分”)。如本文所使用的术语“抗原结合部分”是指保留与抗原特异性结合的能力的抗体的一个或多个片段(例如,KIR3DL3多肽或其片段)。已经证明,抗体的抗原结合功能可以由全长抗体的片段执行。术语抗体的“抗原结合部分”中涵盖的结合片段的实例包含:(i) Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii) F(ab')₂片段,包括在铰链区处由二硫桥连接的两个Fab片段的双价片段;(iii) 由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv) 由抗体的单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;(v) 由VH结构域组成的dAb片段(Ward等人,(1989)《自然(Nature)》341:544-546);以及(vi) 分离的互补决定区(CDR)。此外,虽然Fv片段的两个结构域VL和VH由单独的基因编码,但是这两个结构域可以使用重组方法通过使这两个结构域能够成为单个蛋白链的合成接头来连接,在所述单个蛋白链中,VL区和VH区配对以形成单价多肽(被称为单链Fv(scFv));参见例如Bird等人(1988)《科学(Science)》242:423-426;和Huston等人(1988)《美国国家科学院院刊》85:5879-5883;和Osborn等人1998,《自然生物技术(Nature Biotechnology)》16:778)。此类单链抗体还旨在涵盖在术语抗体的“抗原结合部分”内。可以将特定scFv的任何VH和VL序列与人免疫球蛋白恒定区cDNA或基因组序列连接,以生成编码完整IgG多肽或其它同型的表达载体。VH和VL也可以用于使用蛋白质化学或重组DNA技术生成Fab、Fv或其它免疫球蛋白片段。还涵盖了其它形式的单链抗体,如双抗体。双抗体是双价双特异性抗体,其中VH和VL结构域在单个多肽链上表达,但使用的接头短得无法使同一条链上的两个结构域之间配对,从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并产生两个抗原结合位点(参见例如Holliger,P.等人(1993)《美国国家科学院院刊》90:6444-6448;Poljak,R.J.等人(1994)《结构(Structure)》2:1121-1123)。

[0083] 仍进一步地,抗体或其抗原结合部分可以是较大免疫粘附多肽的一部分,其通过抗体或抗体部分与一种或多种其它蛋白质或肽的共价或非共价结合形成。此类免疫粘附多肽的实例包含使用链霉亲和素核心区来制备四聚体scFv多肽(Kipriyanov,S.M.等人(1995)《人抗体和杂交瘤(Human Antibodies and Hybridomas)》6:93-101)和使用半胱氨酸残基、标志肽和C端多组氨酸标签来制备二价和生物素化的scFv多肽(Kipriyanov,S.M.等人(1994)《分子免疫学(Mol.Immunol.)》31:1047-1058)。抗体部分如Fab和F(ab')₂片段可以使用常规技术从完整抗体制备,如木瓜蛋白酶或胃蛋白酶分别消化完整抗体。此外,如本文所描述的,可以使用标准重组DNA技术获得抗体、抗体部分和免疫粘附多肽。

[0084] 抗体可以是多克隆或单克隆的;异种、同种异体或同源的;或其修饰形式(例如,人源化、嵌合等)。抗体也可以是完全人的。在一个实施例中,本公开所涵盖的抗体特异性地或基本上特异性地与KIR3DL3多肽或其片段结合。如本文所使用的术语“单克隆抗体”和“单克隆抗体组合物”是指仅含有一个物种的能够与抗原的特定表位进行免疫反应的抗原结合位点的抗体多肽群体,而术语“多克隆抗体”和“多克隆抗体组合物”是指含有多个物种的能够与特定抗原相互作用的抗原结合位点的抗体多肽群体。单克隆抗体组合物通常对与其进行免疫反应的特定抗原表现出单一的结合亲和力。

[0085] 术语“体液”是指从身体排泄或分泌的流体以及通常不排泄或分泌的流体(例如羊水、房水、胆汁、血液和血浆、脑脊液、眵和耳垢、考珀氏液(cowper's fluid)或射精前液、

乳糜、食糜、粪便、女性射精、间质液、细胞内液、淋巴液、月经、母乳、黏液、胸膜液、脓汁、唾液、皮脂、精液、血清、汗液、滑液、眼泪、尿液、阴道润滑液、玻璃体液、呕吐物)。

[0086] 术语“癌症”或“肿瘤”或“过度增生性疾病”是指存在具有致癌细胞的典型特性的细胞,所述特性如增殖失控、永生性、转移潜能、快速生长和增殖速率以及某些特有的形态特征。癌细胞通常呈肿瘤的形式,但这种细胞可以单独存在于动物体内,也可以是非致瘤性癌细胞,如白血病细胞。癌症包含但不限于B细胞癌例如多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症(Waldenström's macroglobulinemia)、重链疾病例如 α 链病、 γ 链病和 μ 链病、良性单克隆丙球蛋白病和免疫细胞淀粉样变性、黑色素瘤、乳腺癌、肺癌、支气管癌、结直肠癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、膀胱癌、脑或中枢神经系统癌、外周神经系统癌、食道癌、宫颈癌、子宫或子宫内膜癌、口腔或咽癌、肝癌、肾癌、睾丸癌、胆管癌、小肠或阑尾癌、唾液腺癌、甲状腺癌、肾上腺癌、骨肉瘤、软骨肉瘤、血液组织癌等。适用于本公开所涵盖的方法的癌症类型的其它非限制性实例包含人肉瘤和癌例如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨源性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏瘤(Ewing's tumor)、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、结直肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺瘤、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞癌、胆管癌、肝癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎性癌、维尔姆斯瘤(Wilms' tumor)、宫颈癌、骨癌、脑瘤、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、神经胶质瘤、星形细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、少突胶质细胞瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、成神经细胞瘤、视网膜母细胞瘤;白血病,例如急性淋巴细胞白血病和急性髓细胞白血病(成髓细胞、早幼粒细胞、粒单核细胞、单核细胞和红白血病);慢性白血病(慢性髓细胞(粒细胞)白血病和慢性淋巴细胞白血病);以及真性红细胞增多症、淋巴瘤(霍奇金氏病(Hodgkin's disease)和非霍奇金氏病(non-Hodgkin's disease))、多发性骨髓瘤、瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症和重链病。在一些实施例中,癌症本质上是上皮性的,并且包含但不限于膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、妇科癌症、肾癌、喉癌、肺癌、口腔癌、头颈癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌或皮肤癌。在其它实施例中,癌症是乳腺癌、前列腺癌、肺癌或结肠癌。在仍其它实施例中,上皮癌是非小细胞肺癌、非乳头状肾细胞癌、宫颈癌、卵巢癌(例如浆液性卵巢癌)或乳腺癌。可以以各种其它方式表征上皮癌,包含但不限于浆液性、子宫内膜样、粘液性、透明细胞、布伦纳(Brenner)或未分化。

[0087] 例如,术语“CDR”和其复数“CDRs”是指互补决定区(CDR),其中三个构成轻链可变区(CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3)的结合特征,并且三个构成抗体上重链可变区(CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3)的结合特征。CDR有助于抗体分子的功能活性,并且由包括支架或框架区的氨基酸序列隔开。确切定义的CDR边界和长度取决于不同的分类和编号系统。因此,Kabat、Chothia、联系人或任何其它边界定义可能会引用CDR。尽管边界不同,但这些系统中的每个系统在可变序列内构成所谓的“高变区”的内容上有一定程度的重叠。因此,根据这些系统的CDR定义可以在长度和边界区域方面相对于相邻框架区不同。参见例如Kabat、Chothia和/或MacCallum等人(Kabat等人,“具有免疫学意义的蛋白质的序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)”第5版,美国卫生与公共事业部(U.S. Department of Health and Human Services),1992;Chothia等人(1987)《分子生物学杂志

(J.Mol.Biol.)》196、901;以及MacCallum等人,《分子生物学杂志》(1996) 262,732中,所述文献中的每一个通过引用整体并入本文)。

[0088] 如本文所使用的,术语“分类”包含将样品与疾病状态“相关”或“分类”。在某些情况下,“分类”是基于统计证据、经验证据或两者兼而有之。在某些实施例中,分类方法和系统使用具有已知疾病状态的所谓的训练样品集。一旦建立,训练数据集就用作比较未知样品的特征的基础、模型或模板,以便对样品的未知疾病状态进行分类。在某些情况下,对样品进行分类类似于诊断样品的疾病状态。在某些其它情况下,对样品进行分类类似于将样品的疾病状态与另一种疾病状态区分开来。

[0089] 如本文所使用的,术语“编码区”是指核苷酸序列的包括翻译成氨基酸残基的密码子的区,而术语“非编码区”是指核苷酸序列的不翻译成氨基酸的区(例如,5'和3'非翻译区)。

[0090] “与...互补(Complement[to])”或“互补”是指两条核酸链的区之间或同一核酸链的两个区之间的序列互补性的广义概念。已知如果残基是胸腺嘧啶或尿嘧啶,则第一核酸区的腺嘌呤残基能够与和第一区反平行的第二核酸区的残基形成特定的氢键(“碱基配对”)。类似地,已知如果残基是鸟嘌呤,则第一核酸链的胞嘧啶残基能够与和第一链反平行的第二核酸链的残基进行碱基配对。如果当两个区以反平行方式布置时,第一区的至少一个核苷酸残基能够与第二区的残基进行碱基配对,则核酸的第一区与相同或不同核酸的第二区互补。在一个实施例中,第一区包括第一部分并且第二区包括第二部分,由此,当第一部分和第二部分以反平行方式布置时,第一部分的至少约50%,并且优选地至少约75%、至少约90%或至少约95%的核苷酸残基能够与第二部分中的核苷酸残基进行碱基配对。在另一个实施例中,第一部分的所有核苷酸残基都能够与第二部分中的核苷酸残基进行碱基配对。

[0091] 如本文所使用的,术语“复合抗体”是指具有可变区的抗体,所述可变区包括来自两个或更多个不相关可变区的种系或非种系免疫球蛋白序列。另外,术语“复合人抗体”是指具有源自人种系或非种系免疫球蛋白序列的恒定区和包括来自两个或更多个不相关人可变区的人种系或非种系序列的可变区的抗体。复合人抗体可用作根据本公开的治疗剂中的有效组分,因为复合人抗体在人体内的抗原性降低。

[0092] 术语“对照”是指适合提供与测试样品中表达产物比较的任何参考标准。在一个实施例中,对照包括获得“对照样品”,从所述对照样品检测到表达产物水平并且与来自测试样品的表达产物水平进行比较。此类对照样品可以包括任何合适的样品,包括但不限于来自具有已知结果的对照癌症患者的样品(可以是储存的样品或先前的样品测量);从受试者如正常患者或癌症患者分离的正常组织或细胞;从受试者如正常受试者或癌症患者分离的培养的原代细胞/组织;从癌症患者的同一器官或身体部位获得的相邻正常细胞/组织;从正常受试者中分离的组织或细胞样品或从保藏中心获得的原代细胞/组织。在另一个优选的实施例中,对照可以包括来自任何合适来源的参考标准表达产物水平,包括但不限于管家基因、来自正常组织(或其它先前分析的对照样品)的表达产物水平范围、来自一组患者或一组具有特定结果(例如,存活一年、两年、三年、四年等)或接受某种治疗的患者的测试样品中先前确定的表达产物水平范围(例如,护理癌症疗法的标准)。本领域技术人员将理解,此类对照样品和参考标准表达产物水平可以组合用作本公开所涵盖的方法中的对照。

在一个实施例中,对照可以包括正常或非癌细胞/组织样品。在另一个优选的实施例中,对照可以包括一组患者的表达水平,如一组癌症患者或一组接受某种治疗的癌症患者或一组具有一种结果与另一种结果的患者。在前一种情况下,每个患者的特定表达产物水平可以指定为百分位表达水平或表达为高于或低于参考标准表达水平的平均值或均值。在另一个优选的实施例中,对照可以包括正常细胞、来自用组合化学疗法治疗的患者的细胞和来自患有良性癌症的患者的细胞。在另一个实施例中,对照还可以包括测量值,例如,与同一群体中管家基因的表达水平相比,群体中特定基因的平均表达水平。此类群体可以包括正常受试者、未经历任何治疗(即,未接受过治疗)的癌症患者、接受标准护理疗法的癌症患者或患有良性癌症的患者。在另一个优选的实施例中,对照包括表达产物水平的比率转换,包含但不限于确定测试样品中两个基因的表达产物水平的比率并且将其与参考标准中相同两个基因的任何合适比率进行比较;确定测试样品中两种或更多种基因的表达产物水平并且确定任何合适对照中表达产物水平的差异;以及确定测试样品中两种或更多种基因的表达产物水平,将它们的表达相对于测试样品中管家基因的表达归一化,并且与任何合适的对照进行比较。在特别优选的实施例中,对照包括与测试样品具有相同谱系和/或类型的对照样品。在另一个实施例中,对照可以包括在一组患者样品内或基于一组患者样品,如所有患有癌症的患者,分组为百分位数的表达产物水平。在一个实施例中,建立了对照表达产物水平,其中使用相对于例如特定百分位数更高或更低水平的表达产物作为预测结果的基础。在另一个优选的实施例中,使用来自具有已知结果的癌症对照患者的表达产物水平建立对照表达产物水平,并且将来自测试样品的表达产物水平与对照表达产物水平进行比较,作为预测结果的基础。如下文数据所示,本公开所涵盖的方法不限于在将测试样品中的表达产物水平与对照进行比较时使用特定的分界点。

[0093] 术语“共刺激”,当关于激活的免疫细胞使用时,包含共刺激多肽提供诱导增殖或效应子功能的第二非激活受体介导的信号(“共刺激信号”)的能力。例如,共刺激信号可能导致细胞因子分泌,例如,在已接收到T细胞受体介导的信号的T细胞中。例如通过激活受体已接收到细胞受体介导的信号的免疫细胞在本文中称为“激活的免疫细胞”。

[0094] 术语“共刺激受体”包含将共刺激信号传输到免疫细胞的受体,例如CD28。如本文所使用的,术语“抑制性受体”包含将负信号传输到免疫细胞的受体(例如,CTLA4、KIR3DL3或PD-1)。即使免疫细胞上不存在共刺激受体(如CD28),抑制性受体转导的抑制性信号也可能出现,因此,不仅仅是抑制性受体与共刺激性受体之间竞争结合共刺激性多肽的功能(Fallarino等人(1998)《实验医学杂志(J. Exp. Med.》) 188:205)。抑制性信号向免疫细胞的传输可能导致免疫细胞中的无应答性或无反应性或程序性细胞死亡。优选地,抑制性信号的传输通过不涉及细胞凋亡的机制操作。如本文所使用的,术语“细胞凋亡”包含程序性细胞死亡,所述程序性细胞死亡可以使用本领域已知的技术来表征。凋亡性细胞死亡可以通过例如细胞收缩、膜起泡和最终导致细胞碎裂的染色质浓缩来表征。经历细胞凋亡的细胞也展现出核小体间DNA切割的特征模式。根据与受体结合的多肽的形式,可以传输信号(例如,通过多价形式的HHLA2和/或KIR3DL3多肽)或信号可以被抑制(例如,通过可溶性单价形式的HHLA2和/或KIR3DL3),例如通过与激活形式的HHLA2和/或KIR3DL3竞争与一个或多个天然结合配偶体结合。然而,存在可溶性多肽可以是刺激性的情况。使用如本文所描述的常规筛选测定可以容易地证明调节剂的作用。

[0095] 术语“为受试者确定合适的治疗方案”意指基于或基本上基于或至少部分地基于根据本公开的分析结果为受试者确定开始、修改和/或结束的治疗方案(即用于预防和/或治疗受试者癌症的单一疗法或不同疗法的组合)。一个实例是确定是否提供针对癌症的靶向疗法以提供免疫调节疗法(例如, KIR3DL3途径调节剂疗法(例如, KIR3DL3与一种或多种天然结合配偶体之间相互作用的调节剂, 如KIR3DL3))。另一个实例是在外科手术后开始辅助疗法, 其目的是降低复发的风险, 另一个是修改特定化学疗法的剂量。除了根据本公开的分析结果之外, 确定还可以基于待治疗的受试者的个人特征。在大多数情况下, 对受试者合适的治疗方案的实际确定将由主治医师或医生进行。

[0096] 如本文所使用的, 术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的C端区, 包含天然序列Fc区和变体Fc区。尽管免疫球蛋白重链的Fc区的边界可以变化, 但通常将人IgG重链Fc区定义为从位置Cys226处的氨基酸残基或从Pro230延伸到其羧基端。用于本公开所涵盖的抗体的合适天然序列Fc区包含人IgG1、IgG2 (IgG2A、IgG2B)、IgG3和IgG4。

[0097] 如本文所使用的, “Fc受体”或“FcR”描述了与抗体的Fc区结合的受体。优选的FcR是天然序列人FcR。此外, 优选的FcR是以下一种受体: 与IgG抗体(γ 受体)结合并且包含Fc γ RI、Fc γ RII和Fc γ RIII亚类的受体, 包含这些受体的等位基因变体和选择性剪接形式, Fc γ RII受体包含Fc γ RIIA(“激活受体”)和Fc γ RIIB(“抑制受体”), 它们具有类似的氨基酸序列, 所述类似的氨基酸序列主要在其细胞质结构域中不同。激活受体Fc γ RIIA在其细胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)。抑制受体Fc γ RIIB在其细胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)(参见M. Daëron,《免疫学年度综述》15:203-234(1997)。FcR综述于Ravetch和Kinet,《免疫学年度综述》9:457-92(1991); Capel等人,《免疫方法(Immunomethods)》4:25-34(1994); 以及de Haas等人,《实验室和临床医学杂志(J. Lab. Clin. Med.)》126:330-41(1995)。本文中的术语“FcR”涵盖了其它FcR, 包含将来鉴定的那些。

[0098] 如果分子与底物共价或非共价缔合, 则分子被“固定”或“附着”到底物上, 这样在没有大部分分子从底物解离的情况下, 底物可以用流体(例如标准柠檬酸盐, pH 7.4)冲洗。

[0099] 如本文所使用的, 如本文所定义的, “框架区”或“FR”残基是除了CDR残基以外的那些可变结构域残基。

[0100] “功能保守变体”是其中蛋白质或酶中的给定氨基酸残基已经被改变而不更改多肽的整体构象和功能的变体, 包含但不限于用具有类似特性(例如, 极性、氢键电势、酸性、碱性、疏水性、芳香族等)的氨基酸替换氨基酸。除了那些被指示为保守的氨基酸之外的氨基酸在蛋白质中可以不同, 使得类似功能的任何两种蛋白质之间的蛋白质或氨基酸序列相似度百分比可以变化并且可以是如根据比对方案, 如通过聚类方法测定的例如70%到99%, 其中相似度是基于MEGALIGN算法。“功能保守变体”还包含如通过BLAST或FASTA算法测定的具有至少60%氨基酸同一性, 优选地至少75%, 更优选地至少85%, 仍优选地至少90%并且甚至更优选地至少95%, 并且具有与其所比较的天然或亲本蛋白相同或基本上类似的特性或功能的多肽。

[0101] 如本文所使用的, 术语“异源抗体”定义为与产生此类抗体的转基因非人生物有关。此术语是指具有对应于在不由转基因非人动物组成的生物体中发现的氨基酸序列或编码核酸序列的抗体, 并且通常来自除转基因非人动物的物种之外的物种。

[0102] 与细胞生物标志物表达有关的术语“高”、“低”、“中等”和“阴性”是指相对于一个或多个参考细胞的生物标志物的细胞表达而表达的生物标志物的量。可以根据本文所描述的任何方法确定生物标志物表达,包括但不限于分析一种或多种生物标志物基因组核酸、核糖核酸和/或多肽的细胞水平、活性、结构等。在一个实施例中,所述术语是指分别以最高、中等或最低水平表达生物标志物的细胞群体的确定百分比。此类百分比可以定义为高表达或弱表达生物标志物的细胞群体的前0.1%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%、5.0%、5.5%、6.0%、6.5%、7.0%、7.5%、8.0%、8.5%、9.0%、9.5%、10%、11%、12%、13%、14%、15%或更多或介于两者之间的任何范围,包含端值。术语“低”不包含不能可检测地表达生物标志物的细胞,因为此类细胞对于生物标志物表达是“阴性”。术语“中等”包含表达生物标志物的细胞,但水平低于以“高”水平表达生物标志物的群体。在另一个实施例中,所述术语还可以指或在替代方案中指由定性或统计图区鉴定的生物标志物表达的细胞群体。例如,根据本领域众所周知的方法,通过基于可检测部分分析如基于平均荧光强度等鉴定不同的图,可以基于生物标志物表达水平区分使用流式细胞术分选的细胞群体。此类图区可以基于所关注生物标志物的本领域众所周知的方法根据数量、形状、重叠等来细化。在仍另一个实施例中,还可以根据存在或不存在另外的生物标志物的表达来确定术语。

[0103] 如本文所使用的“同源”是指相同核酸链的两个区之间或两个不同核酸链的区之间的核苷酸序列相似性。当两个区中的核苷酸残基位置被相同的核苷酸残基占据时,则所述区在所述位置是同源的。如果每个区的至少一个核苷酸残基位置被相同的残基占据,则第一区与第二区是同源的。两个区之间的同源性以被相同的核苷酸残基占据的两个区的核苷酸残基位置的比例表示。例如,具有核苷酸序列5'-ATTGCC-3'的区和具有核苷酸序列5'-TATGGC-3'的区具有50%的同源性。优选地,第一区包括第一部分并且第二区包括第二部分,由此,所述部分中的每个部分的至少约50%,并且优选地至少约75%、至少约90%或至少约95%的核苷酸残基位置被相同的核苷酸残基占据。更优选地,所述部分中的每个部分的所有核苷酸残基位置都被相同的核苷酸残基占据。

[0104] 如本文所使用的,术语“宿主细胞”旨在指其中已引入本公开所涵盖的核酸,如本公开所涵盖的重组表达载体的细胞。术语“宿主细胞”和“重组宿主细胞”在本文可互换地使用。应当理解此类术语不仅涉及具体受试者细胞,而且涉及这种细胞的子代或潜在子代。因为某些修饰可能由于突变或环境影响而在后续世代中发生,所以此类后代实际上可能不与亲本细胞相同,但仍包含在如本文中所使用的术语的范围内。

[0105] 如本文所使用的术语“人源化抗体”旨在包含由具有可变区和恒定区的非人细胞产生的抗体,所述可变区和恒定区已被改变为更类似于人细胞产生的抗体。例如,通过改变非人抗体氨基酸序列以掺入在人种系免疫球蛋白序列中发现的氨基酸。人源化抗体可以包含例如CDR中的未由人种系免疫球蛋白序列(例如,通过体外随机诱变或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)编码的氨基酸残基。如本文所使用的术语“人源化抗体”还包含其中来源于如小鼠等另一种哺乳动物物种的种系的CDR序列已经移植到人构架序列上的抗体。

[0106] 如本文所使用的人源化小鼠是携带有功能的人基因(例如,HLA2和/或KIR3DL3)、细胞、组织和/或器官的小鼠。人源化小鼠通常用作人体治疗学的生物和医学研究中的小动

物模型。裸鼠和严重联合免疫缺陷 (SCID) 小鼠可以用于此目的。NCG小鼠、NOG小鼠和NSG小鼠可以用于比其它模型更有效地移植人细胞和组织。此类人源化小鼠模型可以用于在健康和病理情况下对人体免疫系统进行建模,并且可以使得在与人体生理学相关的体内环境中对治疗候选者进行评估。

[0107] 如本文所使用的,术语“高变区”、“HVR”或“HV”是指抗体可变结构域的序列高变和/或形成结构限定的环的区,并且包含CDR。

[0108] 如本文所使用的,术语免疫细胞是指在免疫应答中发挥作用的细胞。免疫细胞属于造血来源,并且包含淋巴细胞,如B细胞和T细胞;自然杀伤细胞;髓样细胞,如单核细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞和粒细胞。

[0109] 如本文所使用的,术语“免疫病症”包含免疫疾病、病状和对以下的易感性,包含但不限于癌症、慢性炎症性疾病和病症(包含例如克罗恩病(Crohn's disease)、炎症肠病、反应性关节炎和莱姆病(Lyme disease))、胰岛素依赖性糖尿病、器官特异性自身免疫(包含例如多发性硬化症、桥本氏甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、自身免疫性葡萄膜炎和格雷夫氏病(Grave's disease))、接触性皮炎、银屑病、移植物排斥、移植物抗宿主疾病、结节病、特应性病状(包含例如哮喘和过敏,包含但不限于过敏性鼻炎和胃肠道过敏如食物过敏)、嗜酸性粒细胞增多症、结膜炎、肾小球肾炎、全身性红斑狼疮、硬皮病、如蠕虫病等某些病原体易感性(包含例如利什曼病(leishmaniasis))和某些病毒感染(包含例如HIV和细菌感染如结核病和瘤型麻风)和疟疾。

[0110] 如本文所使用的,术语“免疫应答”包含T细胞介导的和/或B细胞介导的免疫应答。示例性免疫应答包含T细胞应答,例如细胞因子产生和细胞毒性。另外,术语免疫应答包含受T细胞激活间接影响的免疫应答,例如抗体产生(体液应答)和细胞因子应答性细胞例如巨噬细胞的激活。

[0111] 术语“免疫治疗剂”可以包含任何分子、肽、抗体或其它可以刺激宿主免疫系统以在受试者中生成针对肿瘤或癌症的免疫应答的药剂。多种免疫治疗剂可用于本文所描述的组合物和方法。

[0112] 术语“免疫检查点”是指CD4+和/或CD8+T细胞的细胞表面上的一组分子,它们通过下调或抑制抗肿瘤免疫应答来微调免疫应答。免疫检查点蛋白在本领域中是众所周知的并且包含但不限于CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIR家族受体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、GITR、4-1BB、OX-40、BTLA、SIRPα (CD47)、CD48、2B4 (CD244)、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、HHLA2、嗜乳脂蛋白和A2aR(参见例如W02012/177624)。术语进一步涵盖生物活性蛋白片段,以及编码全长免疫检查点蛋白和其生物活性蛋白片段的核酸。在某个实施例中,术语进一步涵盖根据本文提供的同源性描述的任何片段。

[0113] 免疫检查点和它们的序列在本领域中是众所周知的并且下文描述了代表性实施例。例如,术语“PD-1”是指免疫球蛋白基因超家族的成员,所述成员作为具有PD-L1和PD-L2作为已知配体的共抑制受体起作用。先前使用基于减法克隆的方法来选择在TCR诱导的激活T细胞死亡期间上调的基因来鉴定PD-1。基于其与PD-L1结合的能力,PD-1是CD28/CTLA-4分子家族的成员。与CTLA-4一样,响应于抗CD3,PD-1在T细胞表面上被快速诱导(Agata等人25 (1996)《国际免疫学(Int. Immunol.)》8:765)。然而,与CTLA-4相比,PD-1也在B细胞表面

上被诱导(响应于抗IgM)。PD-1也在胸腺细胞和骨髓细胞的亚群上表达(Agata等人(1996)(同上);Nishimura等人(1996)《国际免疫学》8:773)。

[0114] 如本文所使用的,术语“抑制”和其语法等同物是指减少、限制和/或阻止特定动作、功能或相互作用。在一个实施例中,术语是指将给定输出或参数的水平降低到某个数量(例如,背景染色、KIR3DL3信号传导、KIR3DL3免疫抑制功能等),所述数量比对应对照中的数量少至少10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、99%或更少。给定输出或参数水平的降低不一定(尽管可能)意指输出或参数的绝对缺失。本发明不需要并且不限于完全消除输出或参数的方法。可以使用本领域众所周知的方法来确定给定输出或参数,包括但不限于如本文和实例中所讨论的免疫组织化学、分子生物学、细胞生物学、临床和生化测定。相反的术语“促进”、“增加”和其语法等同物是指给定输出或参数水平的增加,与针对抑制或减少所描述的相反。

[0115] 如本文所使用的,当指两个分子之间的相互作用时,术语“相互作用”是指分子彼此的物理接触(例如,结合)(例如,HLA2与TMIGD2的结合或HLA2与KIR3DL3的结合)。通常,此类相互作用导致所述分子中的一个或两个的活性(产生生物学效应)。所述活性可以是分子中的一个或两个的直接活性(例如,信号转导)。可替代地,可以防止相互作用中的一个或两个分子与它们的配体结合,因此就配体结合活性而言保持无活性(例如,与其配体结合并触发或抑制免疫应答)。抑制此类相互作用会破坏一个或多个参与相互作用的分子的活性。增强此类相互作用是为了延长或增加所述物理接触的可能性和延长或增加所述活性的可能性。

[0116] 术语“新辅助疗法”是指在主要治疗之前给予的治疗。新辅助疗法的实例可以包含化学疗法、放射疗法和激素疗法。

[0117] 如本文所使用的,术语“分离的抗体”旨在指基本上不含具有不同抗原特异性的其它抗体的抗体(例如,与KIR3DL3特异性结合并且基本上不含不与KIR3DL3结合的分离的抗体)。然而,与KIR3DL3特异性结合的分离的抗体可以分别与来自不同物种的其它KIR家族蛋白具有交叉反应性。例如,在一些实施例中,抗体保持对至少两个物种的特异性结合亲和力,如人和其它动物,如非啮齿动物或其它哺乳动物或非哺乳动物物种。然而,在一些实施例中,抗体对人KIR3DL3保持更高或确实特异性的亲和力和选择性。另外,分离的抗体通常基本上不含其它细胞物质和/或化学品。在本公开所涵盖的一个实施例中,将对人KIR3DL3具有不同特异性的“分离的”单克隆抗体组合在明确限定的组合物中。

[0118] 如本文所使用的,“分离的蛋白质”是指当从细胞分离或通过重组DNA技术产生时基本上不含其它蛋白质、细胞物质、分离介质和培养基或当以化学方式合成时基本上不含化学前体或其它化学品的蛋白质。“分离的”或“纯化的”蛋白质或其生物活性部分基本上不含来自细胞或组织来源的细胞物质或其它污染蛋白质或当以化学方式合成时基本上不含化学前体或其它化学品,从所述细胞或组织来源衍生抗体、多肽、肽或融合蛋白。术语“基本上不含细胞物质”包含靶多肽(例如免疫球蛋白)或其片段的制剂,其中蛋白质与分离或重组产生蛋白质的细胞的细胞组分分离。在一个实施例中,术语“基本上不含细胞物质”包含靶蛋白或其片段的制剂,所述制剂具有小于约30%(按干重计)的非靶蛋白(在本文中也称为“污染蛋白”),更优选地小于约20%的非靶蛋白,仍更优选地小于约10%的非靶蛋白和最优选地小于约5%的非靶蛋白。当重组产生抗体、多肽、肽或融合蛋白或其片段,例如其生物

活性片段时,其还优选地基本上不含培养基,即培养基占蛋白质制剂体积的小于约20%,更优选地小于约10%和最优选地小于约5%。

[0119] 如本文所使用的,术语“同型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类别(例如,IgM或IgG1)。

[0120] 如本文所使用的,术语“ K_D ”旨在指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。所公开的本发明的抗体的结合亲和力可以通过标准抗体-抗原测定测量或确定,例如竞争测定、饱和测定或如ELISA或RIA等标准免疫测定。

[0121] 如本文所使用的,“试剂盒”是包括至少一种试剂例如探针的任何制品(例如包装或容器),用于特异性检测或调节本公开所涵盖的标志物的表达。试剂盒可以作为用于执行本公开所涵盖的方法的单元进行推广、分发或销售。

[0122] “标志物”或“生物标志物”是基因或蛋白质,所述基因或蛋白质在组织或细胞中的表达水平从其在正常或健康组织或细胞中的改变后的表达水平与疾病状态如癌症相关。“标志核酸”是由本公开所涵盖的标志物编码或与其对应的核酸(例如,mRNA、cDNA)。此类标志核酸包含DNA(例如,cDNA),所述DNA包括序列表中所示的核酸序列中的任何核酸序列的全部或部分序列或此类序列的补体。标志核酸还包含RNA,所述RNA包括序列表中所示的核酸序列的任何核酸序列的全部或部分序列或此类序列的补体,其中所有胸苷残基被尿苷残基取代。“标志蛋白”是由本公开所涵盖的标志物编码或与其对应的蛋白质。标志蛋白包括序列表中所示的序列的任何序列的全部或部分序列。在一些实施例中,整体KIR3DL3或HLA2用作标志物。在其它实施例中,KIR3DL3或HLA2的片段用作标志物。术语“蛋白质”和“多肽”可互换使用。

[0123] 如本文所使用的,术语“调节”包含上调和下调,例如增强或抑制应答。

[0124] 术语“预定”生物标志物量和/或活性测量结果可以是用于仅举例来说以下的生物标志物量和/或活性测量结果:对可以被选择用于特定治疗的受试者进行评估;对治疗(如KIR3DL3途径的一种或多种调节剂,如KIR3DL3和一种或多种如HLA2等天然结合配偶体的调节剂),单独地或与一种或多种免疫疗法组合,的应答进行评估;和/或对疾病状态进行评估。可以在患有或不患有癌症的患者群体中测定预定的生物标志物量和/或活性测量结果。预定的生物标志物量和/或活性测量结果可以是同样适于每个患者的单个数字,或者预定的生物标志物量和/或活性测量结果可以根据患者的特定亚群而变化。受试者的年龄、体重、身高和其它因素可能会影响个体的预定的生物标志物量和/或活性测量结果。此外,可以为每个受试者单独确定预定的生物标志物量和/或活性。在一个实施例中,在本文所描述的方法中确定和/或比较的量基于绝对测量结果。在另一个实施例中,在本文所描述的方法中确定和/或比较的量基于相对测量结果,如比率(例如,相对于管家或以其它方式通常恒定的生物标志物的表达归一化的细胞比率或血清生物标志物)。预定的生物标志物量和/或活性测量结果可以是任何合适的标准。例如,预定的生物标志物量和/或活性测量结果可以从为其评估患者选择的相同或不同的人获得。在一个实施例中,预定的生物标志物量和/或活性测量结果可以从同一患者的先前评估中获得。以此方式,可以随时间推移监测患者选择的进展。另外,如果受试者是人,则对照可以从对另外的一个人或多个人的评估获得,例如选定的一组人。以此方式,正在被评估选择的人的选择程度可以与合适的其它人进行比较,例如与所关注的人处于类似情况的其它人,如患有类似或相同病状和/或具有相同种族

的那些人。

[0125] 术语“预测性”包含使用生物标志核酸和/或蛋白质状态,例如在疗法之前、期间或之后肿瘤的过度活性或低活性、出现、表达、生长、缓解、复发或抗性,以确定癌症对如KIR3DL3途径调节剂疗法等免疫调节疗法(例如,KIR3DL3与如HLA2等一种或多种天然结合配偶体之间相互作用的调节剂,单独地或与一种或多种另外疗法如免疫疗法,例如免疫检查点抑制疗法组合)的应答的可能性。生物标志物的此类预测性使用可以通过以下确认:例如(1)增加或减少的拷贝数(例如,通过FISH、FISH加SKY、单分子测序,例如,如本领域中至少在《生物技术杂志(J.Biotechnol.)》,86:289-301或qPCR中描述的)、生物标志核酸的过表达或表达不足(例如,通过ISH、Northern印迹或qPCR)、增加或减少的生物标志蛋白(例如,通过IHC)和/或生物标志物靶标或者增加或减少的活性,例如在超过约5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%或更多的测定人癌症类型或癌症样品中;(2)生物标志物在生物样品中的绝对或相对调节的存在或不存在,例如含有来自患有癌症的受试者例如人的组织、全血、血清、血浆、口腔刮片、唾液、脑脊液、尿液、粪便或骨髓的样品;(3)生物标志物在患有癌症的患者的临床亚群(例如,对特定免疫调节疗法(例如,KIR3DL3途径调节剂疗法(例如,KIR3DL3与如HLA2等一种或多种天然结合配偶体之间相互作用的调节剂,单独地或与免疫疗法组合)有应答的那些或那些对其产生抗性的那些)中的绝对或相对调节的存在或不存在。

[0126] 术语“防止(prevent)”、“防止(preventing)”、“防止(prevention)”、“预防性治疗(prophylactic treatment)”等是指降低未患有疾病、病症或病状但有患病症或病状的风险或易于患疾病、病症或病状的受试者患病症或病状的可能性。

[0127] 术语“预后”包含对癌症可能的病程和结果或从疾病恢复的可能性的预测。在一些实施例中,统计算法的使用提供个体癌症的预后。例如,预后可以是外科手术、癌症(例如实体瘤如肺癌、黑色素瘤和肾细胞癌)临床亚型的发展、一种或多种临床因素的发展、肠癌的发展或从疾病的恢复。

[0128] 当关于参考多肽使用时,术语“多肽片段”或“片段”是指与参考氨基酸自身相比,其中缺失氨基酸残基、但其中剩余氨基酸序列通常与参考多肽中对应位置相同的多肽。此类缺失可以发生在参考多肽的氨基端处、内部或羧基端处或可代替地两者兼而有之。片段通常为至少5、6、8或10个氨基酸长、至少14个氨基酸长、至少20、30、40或50个氨基酸长、至少75个氨基酸长或至少100、150、200、300、500或更多个氨基酸长。所述片段可以是例如至少和/或包含10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300、320、340、360、380、400、420、440、460、480、500、520、540、560、580、600、620、640、660、680、700、720、740、760、780、800、820、840、860、880、900、920、940、960、980、1000、1020、1040、1060、1080、1100、1120、1140、1160、1180、1200、1220、1240、1260、1280、1300、1320、1340或更长,只要片段小于全长多肽的长度。可替代地,片段可以不超过和/或不包含此类范围,只要片段小于全长多肽的长度。

[0129] 术语“探针”是指能够选择性与特定预期靶分子结合的任何分子,例如,由标志物编码或与其对应的核苷酸转录物或蛋白质。探针可以由本领域技术人员合成或衍生自适当的生物制剂。出于检测靶分子的目的,探针可以专门设计成被标记,如本文所描述。可以用

作探针的分子的实例包含但不限于RNA、DNA、蛋白质、抗体和有机分子。

[0130] 如本文所使用的,术语“重排”是指重链或轻链免疫球蛋白基因座构型,其中V区段在分别编码基本上完整的 V_H 和 V_L 结构域的构象中紧邻D-J或J区段定位。重排的免疫球蛋白基因座可以通过与种系DNA进行比较来鉴定;重排的基因座将具有至少一个重组的七聚体/九聚体同源元件。

[0131] 如本文所使用的,术语“重组宿主细胞”(或简称为“宿主细胞”)旨在指已引入到重组表达载体中的细胞。应当理解,此类术语旨在不仅指特定的受试者细胞,而且还指此类细胞的后代。因为某些修饰可能由于突变或环境影响而在后续世代中发生,所以此类后代实际上可能不与亲本细胞相同,但仍包含在如本文中所使用的术语“宿主细胞”的范围内。

[0132] 术语“抗性”是指癌症样品或哺乳动物对免疫调节疗法的获得性或天然抗性(即,对治疗性处理无应答或应答降低或有限),如对治疗性处理的应答降低5%或更多,例如10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或更多、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍或更多。可以通过在获得抗性之前与相同的癌症样品或哺乳动物进行比较或通过不同的癌症样品或已知对治疗性处理没有抗性的哺乳动物进行比较来测量应答的降低。对化学疗法的典型获得性抗性称为“多抗药性”。多抗药性可以由P-糖蛋白介导或可以由其它机制介导或可以在哺乳动物感染多抗药微生物或微生物组合时发生。对治疗性处理的抗性的确定在本领域中是常规的并且在普通临床医生的技能范围内,例如,可以通过如本文中描述为“致敏”的细胞增殖测定和细胞死亡测定来测量。在一些实施例中,术语“逆转抗性”意指将第二药剂与原发性癌症疗法(例如化学治疗或放射疗法)组合使用能够在所述情况下当与未处理的肿瘤的肿瘤体积相比时,使肿瘤体积在统计学意义的水平上显著减小(例如 $p < 0.05$),其中与未处理的肿瘤的肿瘤体积相比,单独的原发性癌症疗法(例如,化学治疗或放射疗法)不能使肿瘤体积在统计学上显著减小。这通常适用于在未处理的肿瘤有节奏地对数生长时进行的肿瘤体积测量。

[0133] 如上文所描述的,术语“应答”通常与例如确定对临床干预的进展、功效或结果的作用有关。例如,对疗法(例如,KIR3DL3途径调节剂疗法(例如,KIR3DL3与如HLA2等一种或多种天然结合配偶体之间相互作用的调节剂,单独地或与如免疫检查点抑制疗法等免疫疗法组合使用))的应答涉及对疗法(例如,KIR3DL3途径调节剂疗法(例如,KIR3DL3与如KIR3DL3等一种或多种天然结合配偶体之间相互作用的调节剂,单独地或与如免疫检查点抑制疗法等免疫疗法组合使用))的任何应答,并且对于癌症,优选地涉及新辅助或辅助化学疗法开始后癌细胞数量、肿瘤质量和/或体积的变化。可以针对例如疗效或在新辅助或辅助情况下评估过度增殖性病症应答,其中全身性干预后肿瘤的大小可以与通过CT、PET、乳房X线照片、超声或触诊测量的初始大小和尺寸进行比较。应答还可以通过卡尺测量或活检或外科手术切除后的肿瘤病理学检查来评估。应答可以以下方式记录:定量方式如肿瘤体积百分比变化或定性方式如“病理完全应答”(pCR)、“临床完全缓解”(cCR)、“临床部分缓解”(cPR)、“临床稳定疾病”(cSD)、“临床进行性疾病”(cPD)或其它定性标准。过度增殖性病症应答的评估可以在新辅助或辅助疗法开始后早期进行,例如几小时、几天、几周后或优选地几个月后。应答评估的典型终点是新辅助化学疗法终止时或外科手术切除残留肿瘤细胞和/或肿瘤床时。这通常是在新辅助疗法开始后三个月。在一些实施例中,本文所描述的治

疗性处理的临床功效可以通过测量临床受益率 (CBR) 来确定。通过确定处于完全缓解 (CR) 的患者百分比、处于部分缓解 (PR) 的患者数量和在治疗结束后至少6个月的时间点患有稳定疾病 (SD) 的患者数量之和来测量临床受益率。此公式的简写是 $CBR = CR + PR + \text{超过6个月的SD}$ 。在一些实施例中,特定癌症治疗方案的 CBR 为至少 25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85% 或更多。用于评估对癌症疗法的应答的另外标准与“生存”有关,生存包含以下内容:生存至死亡,也称为总生存(其中所述死亡可能与病因无关或与肿瘤有关);“无复发生存”(其中术语复发应包含局部复发和远处复发);无转移生存;无病生存(其中术语疾病应包含癌症和与之相关的疾病)。所述存活长度可以通过参考定义的起点(例如,诊断时间或治疗开始)和终点(例如,死亡、复发或转移)来计算。另外,治疗功效的标准可以扩展为包含对化学疗法的应答、生存概率、给定时间段内的转移概率和肿瘤复发的概率。例如,为了确定适当的阈值,可以将特定的癌症治疗方案施用于受试者群体,并且可以将结果与在施用任何免疫调节疗法之前确定的生物标志物测量结果相关。结果测量可以是对在新辅助环境中给予的疗法的病理应答。可替代地,可以在一段时间内监测生物标志物测量值已知的免疫调节疗法后受试者的结果测量值,如总生存和无病生存。在某些实施例中,施用的剂量是本领域已知的癌症治疗剂的标准剂量。监测的受试者的时间段可以变化。例如,可以监测受试者至少 2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45、50、55 或 60 个月。

[0134] 如本文所使用的,术语“特异性结合”是指抗体与预定抗原结合。通常,当使用人 KIR3DL3 作为分析物和抗体作为配体,在 BIACORE® 测定仪器中通过表面等离子体共振 (SPR) 技术测定时,抗体以大约小于 $10^{-7}M$ 如大约小于 $10^{-8}M$ 、 $10^{-9}M$ 或 $10^{-10}M$ 或甚至更低的亲和力 (K_D) 结合,并且以以下亲和力与预定的抗原结合,所述亲和力是其用于与预定的抗原或密切相关抗原之外的非特异性抗原(例如,BSA、酪蛋白)结合的亲和力的至少 1.1 倍、1.2 倍、1.3 倍、1.4 倍、1.5 倍、1.6 倍、1.7 倍、1.8 倍、1.9 倍、2.0 倍、2.5 倍、3.0 倍、3.5 倍、4.0 倍、4.5 倍、5.0 倍、6.0 倍、7.0 倍、8.0 倍、9.0 倍或 10.0 倍或更多。短语“识别抗原的抗体”和“对抗原特异的抗体”在本文中术语“与抗原特异性结合的抗体”可互换地使用。

[0135] 术语“受试者”是指任何健康的动物、哺乳动物或人或任何患有所关注病状(例如,癌症)的动物、哺乳动物或人。术语“受试者”可与“患者”互换。在一些实施例中,术语旨在包含其中可以引发免疫应答的活生物体。受试者的代表性非限制性实例包含人、狗、猫、小鼠、大鼠和其转基因物种。

[0136] 如本文所使用的,术语“生存”包含以下内容:生存至死亡,也称为总生存(其中所述死亡可能与病因无关或与肿瘤有关);“无复发生存”(其中术语复发应包含局部复发和远处复发);无转移生存;无病生存(其中术语疾病应包含癌症和与之相关的疾病)。所述存活长度可以通过参考定义的起点(例如,诊断时间或治疗开始)和终点(例如,死亡、复发或转移)来计算。另外,治疗功效的标准可以扩展为包含对化学疗法的应答、生存概率、给定时间段内的转移概率和肿瘤复发的概率。

[0137] 术语“耐受性”或“无应答性”包含细胞例如免疫细胞对刺激例如通过激活受体或细胞因子的刺激的折射。例如,由于暴露于免疫抑制剂或暴露于高剂量的抗原,可能会发生无应答性。若干种独立的方法可以诱导耐受性。一种机制被称为“无反应性”,它被定义为细胞在体内作为无应答细胞持续存在而不是分化成具有效应子功能的细胞的状态。此类折射

通常是抗原特异性的,并且在停止暴露于耐受性抗原后持续存在。例如,T细胞无反应性的特征在于缺乏细胞因子产生,例如IL-2。当T细胞暴露于抗原并在不存在第二信号(共刺激信号)的情况下接收第一个信号(T细胞受体或CD-3介导的信号)时,发生T细胞无反应性。在这些条件下,细胞再暴露于相同的抗原(即使再暴露在共刺激多肽的存在下发生)导致不能产生细胞因子,因此不能增殖。然而,如果与细胞因子(例如,IL-2)一起培养,则无反应性T细胞可以增殖。例如,通过ELISA或通过使用指示细胞系的增殖测定测量的T淋巴细胞不产生IL-2也可以观察到T细胞无反应性。可替代地,可以使用报告基因构建体。例如,无反应性T细胞不能启动由5' IL-2基因增强子控制下的异源启动子或增强子内可见的AP1序列多聚体诱导的IL-2基因转录(Kang等人(1992)《科学》257:1134)。另一种机制被称为“耗竭”。T细胞耗竭是在许多慢性感染和癌症期间出现的一种T细胞功能障碍状态。T细胞耗竭由效应子器功能差、抑制性受体的持续表达和不同于功能性效应子或记忆T细胞的转录状态定义。

[0138] “转录的多核苷酸”或“核苷酸转录物”是与全部或部分成熟mRNA互补或同源的多核苷酸(例如,mRNA、hnRNA、cDNA或此类RNA或cDNA的类似物),所述成熟mRNA通过本公开所涵盖的标志物的转录和RNA转录物的正常转录后加工(例如,剪接)(如果有的话)和RNA转录物的逆转录来制备。

[0139] 如本文所使用的,术语“T细胞”包含CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞。术语T细胞还包含T辅助1型T细胞和T辅助2型T细胞。术语“抗原呈递细胞”包含专业抗原呈递细胞(例如,B淋巴细胞、单核细胞、树突细胞、朗格汉斯细胞(Langerhans cell))以及其它抗原呈递细胞(例如,角质形成细胞、内皮细胞、星形胶质细胞、成纤维细胞、少突胶质细胞)。常规T细胞,也称为Tcon或Teff,具有用于通过表达一种或多种T细胞受体来增加免疫应答的效应子功能(例如,细胞因子分泌、细胞毒活性、抗自我识别等)。Tcon或Teff通常定义为不是Treg的任何T细胞群体,并且包含例如原初T细胞、激活T细胞、记忆T细胞、静息Tcon或已向例如Th1或Th2谱系分化的Tcon。在一些实施例中,Teff是非Treg T细胞的亚群。在一些实施例中,Teff是CD4⁺Teff或CD8⁺Teff,如CD4⁺辅助T淋巴细胞(例如,Th0、Th1、Tfh或Th17)和CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞。如本文进一步描述的,细胞毒性T细胞是CD8⁺T淋巴细胞。“原初Tcon”是在骨髓中分化的CD4⁺T细胞,并且在胸腺中成功地经历了中央选择的阳性和阴性过程,但尚未通过暴露于抗原而被激活。原初Tcon通常特征在于L-选择素(CD62L)的表面表达,不存在如CD25、CD44或CD69等激活标志物,以及不存在如CD45RO等记忆标志物。因此,认为原初Tcon是静止的和不分裂的,需要白细胞介素7(IL-7)和白细胞介素15(IL-15)来用于稳态生存(参见至少W0 2010/101870)。在抑制免疫应答的情况下,此类细胞的存在和活性是不期望的。与Treg不同,Tcon不是无反应性的,并且可以响应于基于抗原的T细胞受体激活而增殖(Lechler等人(2001)《伦敦皇家学会自然科学会报B:生物科学(Philos.Trans.R.Soc.Lond.Biol.Sci.)》356:625-637)。在肿瘤中,耗竭的细胞可以呈现无反应性的特征。

[0140] 如本文所使用的,关于V区段的术语“未重排”或“种系构型”是指其中V区段未重组以便紧邻D或J区段的构型。

[0141] II. 单克隆抗体、免疫球蛋白和多肽

[0142] 本公开部分地涉及针对KIR3DL3的分离的单克隆抗体或其片段(如本文列出的单克隆抗体和多克隆抗体)。此类分子的部分特征在于所述分子在诊断测定如免疫组织化学(IHC)、蛋白质印迹、细胞间流动、ELISA等中展现出识别KIR3DL3蛋白的能力。此类分子的部

分特征在于所述分子展现出抑制KIR3DL3与如HHLA2等结合配偶体结合的能力。

[0143] 也称人内源性逆转录病毒-H长末端重复相关蛋白2、HERV-H LTR相关2、B7y、B7H7、B7-H5、B7-H7的术语“HHLA2”是指B7家族的成员。HHLA2蛋白在正常人体组织中的表达有限，但在人癌症中广泛表达。HHLA2蛋白是具有三个Ig样结构域(IgV-IgC-IgV)的膜蛋白，而B7家族的其它成员通常只有两个Ig结构域(IgV-IgC)。正常人体组织中的HHLA2蛋白在肾、肠、胆囊和乳房的上皮以及胎盘滋养层细胞中表达。在免疫系统中，HHLA2蛋白在人单核细胞/巨噬细胞上组成性地表达。HHLA2调节人T细胞功能，包含例如HHLA2抑制T细胞增殖和细胞因子产生，并且增加T细胞产生和细胞因子产生。HHLA2在来自结肠肠癌、肾癌、肺癌、胰腺癌、卵巢癌和前列腺癌的多种人癌症中以较高水平表达。HHLA2还在人甲状腺癌、黑色素瘤、肝癌、膀胱癌、结肠癌、肾癌、乳腺癌和食道癌中表达。

[0144] 如上文所描述的，某些HHLA2结构和功能在本领域中是众所周知的(参见例如Xiao等人(2015)《临床癌症研究》21:2201-2203, Janakiram等人(2015)《临床癌症研究》21:2359-2366, Mager等人(1999)《基因组学(Genomics)》21:2359-2366, Flajnik等人(2012)《免疫遗传学(Immunogenet.)》64:571-590, Zhao等人(2013)《美国国家科学院院刊》110:9879-9884以及Zhu等人(2013)《自然通讯》4:2043)。

[0145] 术语“HHLA2”旨在包含其片段、变体(例如等位基因变体)和衍生物。代表性的人HHLA2 cDNA和人HHLA2蛋白质序列是本领域众所周知的，并且可从国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, NCBI)公开获得。人HHLA2变体包含变体1(NM_007072.3和NP_009003.1, 其表示最长的转录物并编码最长的同种型a)、变体2(NM_001282556.1和NP_001269485.1, 其表示使用替代启动子并且与变体1相比, 在5'UTR中不同)、变体3(NM_001282557.1和NP_001269486.1, 其表示使用替代启动子并且与变体1相比, 在5'UTR中不同)、变体4(NM_001282558.1和NP_001269487.1, 其编码同种型b, 表示使用替代启动子, 与变体1相比在5'UTR中不同并且在3'编码区缺少替代框内外显子, 产生比同种型a更短的同种型)以及变体5(NM_001282559.1和NP_001269488.1, 其编码同种型c, 表示使用替代启动子并且与变体2相比有多个差异, 与变体1相比产生独特的5'UTR并导致在替代起始密码子处开始翻译, 产生独特的N端和比同种型a更短的同种型)。人以外的生物体中HHLA2直系同源物的核酸和多肽序列是众所周知的，并且包含例如青蛙HHLA2(NM_001128644.1和NP_001122116.1)。HHLA2直系同源物的代表性序列如下表1所呈现。

[0146] 适用于检测HHLA2蛋白的抗HHLA2抗体是本领域众所周知的，并且包含例如抗体目录号: ab107119和ab214327(艾博抗公司(abcam))、抗体PA5-24146和PA5-6313(赛默飞世尔科技公司(ThermoFisher Scientific))、抗体MAB80841、AF8084、FAB80841R、FAB80841T和MAB8084(R&D系统公司(R&D systems))、抗体AP52042PU-N(傲锐基因公司(Origene))、抗体NBP2-49187、MAB80842、H00011148-B01P和NBP2-32420(诺伟思生物制品公司(Novus Biologicals))、抗体GTX51981(GeneTex公司(GeneTex))、抗体HPA055478(阿特拉斯抗体公司(Atlas Antibodies))、抗体LS-C321945、LS-C308228、LS-C246742、LS-C246743、LS-C246744、LS-C236210和LS-C249186(LifeSpan生物科学公司(LifeSpan Biosciences))等。此外, 用于降低HHLA2表达的多个siRNA、shRNA、CRISPR构建体可见于上述公司的商业产品列表中, 如shRNA产品号TL312462、TF312462、TR312462、TG312462和TL312462V; 来自傲锐基因技术公司的siRNA产品号SR323358; siRNA产品号i009616、i009616a、i009616b、

i009616c、i009616d、iV009616、iV009616a、iV009616b、iV009616c、iV009616d、iAAV00961600、iAAV00961601、iAAV00961602、iAAV00961603、iAAV00961604、iAAV00961605、iAAV00961606、iAAV00961607、iAAV00961608以及iAAV00961609；CRISPR产品号K0950321、K0950301、K0950302、K0950303、K0950304、K0950305、K0950306、K0950307、K0950308和K0950311 (abm)；siRNA产品号sc-78498；shRNA产品号sc-78498-V和sc-78498-SH；CRISPR产品号sc-411576、sc-411576-HDR、sc-411576-NIC、sand c-411576-NIC-2 (圣克鲁兹生物技术公司 (Santa Cruz Biotechnology)) 等。应注意，术语可以进一步用于指本文关于HHLA2分子描述的特征的任何组合。例如，序列组成、百分比同一性、序列长度、结构域结构、功能活性等的任何组合可以用于描述本公开所涵盖的HHLA2分子。

[0147] 术语“HHLA2途径”包含HHLA2和HHLA2与如TMIGD2和KIR3DL3等其天然结合配偶体中的一个或多个的相互作用。

[0148] 术语“KIR3DL3途径”包含KIR3DL3和KIR3DL3与如HHLA2等其天然结合配偶体中的一个或多个的相互作用。

[0149] 术语“TMIGD2”是指含有2、CD28H、IGPR1和IGPR-1的跨膜和免疫球蛋白结构域，它是与CD28、CTLA-4、ICOS和PD-1具有约10%氨基酸同一性的膜蛋白。TMIGD2具有一个细胞外IgV样结构域、跨膜区和具有两个酪氨酸信号传导基序的富脯氨酸的细胞质结构域。TMIGD2蛋白在所有原初T细胞和大多数自然杀伤(NK)细胞上组成性地表达，但不在T调节细胞或B细胞上表达。TMIGD2表达随着T细胞的重复刺激而缓慢丧失。与此一致，TMIGD2仅在约一半的记忆T细胞上表达，而TMIGD2阴性T细胞具有终末分化的衰老表型。TMIGD2也已被示出在内皮和上皮细胞中表达，并且用于减少细胞迁移和促进血管生成期间毛细血管的形成。

[0150] 如上文所描述的，某些TMIGD2结构和功能在本领域中是众所周知的(参见例如Xiao等人(2015)《临床癌症研究》21:2201-2203, Janakiram等人(2015)《临床癌症研究》21:2359-2366, Zhu等人(2013)《自然通讯》4:2043和Rahimi(2012)《细胞(Cell)》23:1646-1656)。

[0151] 术语“TMIGD2”旨在包含其片段、变体(例如等位基因变体)和衍生物。代表性的人TMIGD2 cDNA和人TMIGD2蛋白质序列是本领域众所周知的，并且可从国家生物技术信息中心(NCBI)公开获得。人TMIGD2同种型包含同种型1(NM_144615.2和NP_653216.2)、同种型2(NM_001169126.1和NP_001162597.1, 其与变体1相比使用3'编码区中的替代框内剪接位点, 与同种型1相比产生更短的同种型)和同种型3(NM_001308232.1和NP_001295161.1, 其与变体1相比在5'编码区缺少替代框内外显子, 与同种型1相比产生更短的同种型)。人以外的生物体中TMIGD2直系同源物的核酸和多肽序列是众所周知的，并且包含例如黑猩猩TMIGD2(XM_009434393.2和XP_009432668.2以及XM_001138228.4和XP_001138228.3)和牛TMIGD2(XM_005208980.3和XP_005209037.1、XM_005208979.3和XP_005209036.1以及XM_002688933.5和XP_002688979.1)。TMIGD2直系同源物的代表性序列如下表1所呈现。

[0152] 适用于检测TMIGD2蛋白的抗TMIGD2抗体是本领域众所周知的，并且包含例如抗体目录号MAB8316、MAB83162、FAB8316R、FAB83162R、FAB83162G、FAB83162N、FAB83162S、FAB83162T、FAB83162U和FAB83162V(R&D系统公司)、抗体TA326695(傲锐基因公司)、抗体PA5-52787和PA5-38055(赛默飞世尔科技公司)、抗体MAB83161和NBP1-81164(诺伟思生物制品公司)等。此外，用于降低TMIGD2表达的多个siRNA、shRNA、CRISPR构建体可见于上述公

司的商业产品列表中,如shRNA产品号TF317829、TG317829、TL317829、TR317829和TL317829V;siRNA产品号SR314913和来自傲锐基因技术公司的CRISPR产品号KN204938、KN204938LP、KN204938RB和KN204938BN;siRNA产品号i024914、i024914a、i024914b、i024914c、i024914d、iV024914、iV024914a、iV024914b、iV024914c、iV024914d、iAAV02491400、iAAV02491401、iAAV02491402、iAAV02491403、iAAV02491404、iAAV02491405、iAAV02491406、iAfAV02491407、iAAV02491408和iAAV02491409以及CRISPR产品号K2409321、K2409301、K2409302、K2409303、K2409304、K2409305、K2409306、K2409307、K2409308和K2409311 (Abm);siRNA产品号sc-97757;shRNA产品号sc-97757-SH和sc-97757-V以及CRISPR产品号sc-414261、sc-414261-HDR、sc-414261-NIC和sc-414261-NIC-2 (圣克鲁兹生物技术公司);shRNA产品号SH888208和SH874720 (Vigene生物科学公司 (Vigene Biosciences))等。此外,用于增加TMIGD2表达的多个CRISPR构建体可见于上述公司的商业产品列表中,如CRISPR产品号K2409378、K2409377、K2409376、K2409375、K2409374、K2409373、K2409372和K2409371 (Abm);CRISPR产品号sc-414261-ACT、sc-414261-ACT-2、sc-414261-LAC和sc-414261-LAC-2 (圣克鲁兹生物技术公司)等。应注意,术语可以进一步用于指本文关于TMIGD2分子描述的特征的任何组合。例如,序列组成、百分比同一性、序列长度、结构域结构、功能活性等的任何组合可以用于描述本公开所涵盖的TMIGD2分子。

[0153] TMIGD2与HLA2之间的相互作用和其功能在本领域中是众所周知的(参见例如Xiao等人(2015)《临床癌症研究》21:2201-2203和Janakiram等人(2015)《临床癌症研究》21:2359-2366)。

[0154] 术语“KIR3DL3”,也称为杀伤细胞免疫球蛋白样受体3DL3、CD158Z、KIR3DL7、KIR44、KIRC1、KIR2DS2,杀伤细胞免疫球蛋白样受体,三个Ig结构域和长胞质尾3,是指由自然杀伤细胞和T细胞亚群表达的跨膜糖蛋白家族的成员。杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)基因是多态性和高度同源性的,并且它们存在于1Mb白细胞受体复合物(LRC)内染色体19q13.4上的簇中。尽管在所有单倍型中都发现了若干个“框架”基因(KIR3DL3、KIR3DP1、KIR3DL4、KIR3DL2),但KIR基因簇的基因含量因单倍型而异。KIR蛋白根据细胞外免疫球蛋白结构域(2D或3D)的数量和它们是否具有长(L)或短(S)胞质结构域进行分类。具有长胞质结构域的KIR蛋白通过基于免疫酪氨酸的抑制性基序(ITIM)在配体结合时转导抑制性信号,而具有短胞质结构域的KIR蛋白缺乏ITIM基序,并且反而与TYRO蛋白酪氨酸激酶结合蛋白结合以转导激活信号。若干种KIR蛋白的配体是HLA I类分子的亚群;因此,KIR蛋白被认为在调节免疫应答方面起重要作用。此基因是存在于所有单倍型上的“框架”基因座之一。KIR3DL3蛋白具有N端信号序列、3个Ig结构域、缺乏带正电荷残基的跨膜区和含有基于免疫受体酪氨酸的抑制性基序(ITIM)的长胞质尾。KIR3DL3缺少在其它KIR中发现的茎区。

[0155] 如上文所描述的,某些KIR3DL3结构功能在本领域中是众所周知的(参见例如Hsu等人(2002)《免疫学评论(Immunol Rev.)》190:40-52,Trompeter等人(2005)《免疫学杂志》174:4135-4143,Trundley等人(2006)《免疫遗传学》57:904-916和Jones等人(2006)《免疫遗传学》58:614-627)。

[0156] 术语“KIR3DL3”旨在包含其片段、变体(例如等位基因变体)和衍生物。代表性的人KIR3DL3 cDNA和人KIR3DL3蛋白质序列是本领域众所周知的,并且可从国家生物技术信息

中心 (NCBI) 公开获得。例如,至少一种人KIR3DL3同种型是已知的:人KIR3DL3 (NM_153443.4) 可由转录物 (NP_703144.3) 编码。人以外的生物体中KIR3DL3直系同源物的核酸和多肽序列是众所周知的,并且包含例如黑猩猩KIR3DL3 (XM_003316679.3和XP_003316727.3)、恒河猴KIR3DL3 (NM_001104552.2和NP_001098022.1)、小鼠KIR3DL3 (NM_001310690.1和NP_001297619.1、NM_177749.4和NP_808417.2、NM_177748.2和NP_808416.1) 以及大鼠KIR3DL3 (NM_181479.2和NP_852144.1)。KIR3DL3直系同源物的代表性序列如下表1所呈现。

[0157] 适用于检测KIR3DL3蛋白的抗KIR3DL3抗体是本领域众所周知的,并且包含例如抗体目录号:FAB8919R、MAB8919、FAB8919G、FAB8919N、FAB8919S、FAB8919T、FAB8919U和FAB8919V (R&D系统公司)、抗体AP52374PU-N (傲锐基因公司)、抗体PA5-26178 (赛默飞世尔科技公司)、抗体OAB05761、OAAF08125、OAA04122、OACA09134、OACA09135、OACD04988和OASG01190 (奥维亚系统生物公司 (Aviva Systems Biology)) 等。此外,用于降低KIR3DL3表达的多个siRNA、shRNA、CRISPR构建体可见于上述公司的商业产品列表中,如shRNA产品号TF303684、TR303684、TG303684、TL303684、TL303684V; siRNA产品号SR314516和来自傲锐基因技术公司的CRISPR产品号KN224383、KN224383BN、KN224383RB和KN224383LP; siRNA产品号i011627、i011627a、i011627b、i011627c、i011627d、iV011627、iV011627a、iV011627b、iV011627c、iV011627d、iAAV01162700、iAAV01162701、iAAV01162702、iAAV01162703、iAAV01162704、iAAV01162705、iAAV01162706、iAAV01162707、iAAV01162708和iAAV01162709以及CRISPR产品号K1151421、K1151401、K1151402、K1151403、K1151404、K1151405、K1151406、K1151407、K1151408和K1151411 (Abm); siRNA产品号sc-60892; shRNA产品号sc-60892-SH和sc-60892-V以及CRISPR产品号sc-406227、sc-406227-KO-2、sc-406227-HDR-2、sc-406227-NIC和sc-406227-NIC-2 (圣克鲁兹生物技术公司) 等。应注意,术语可以进一步用于指本文关于KIR3DL3分子描述的特征的任何组合。例如,序列组成、百分比同一性、序列长度、结构域结构、功能活性等的任何组合可以用于描述本公开所涵盖的KIR3DL3分子。

[0158] 术语“外周血细胞亚型”是指正常存在于外周血中的细胞类型,包括但不限于嗜酸性粒细胞、中性粒细胞、T细胞、单核细胞、NK细胞、粒细胞和B细胞。

[0159] 术语“重组人抗体”包含所有通过重组手段制备、表达、产生或分离的人抗体,如(a) 从对人免疫球蛋白基因而言是转基因的或转染色体的动物(例如,小鼠) 或由其制备的杂交瘤(下文进一步描述) 中分离的抗体; (b) 从被转化以表达抗体的宿主细胞中,例如从转染瘤中分离的抗体; (c) 从重组的组合人抗体库中分离的抗体; 以及(d) 通过涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接成其它DNA序列的任何其它手段制备、表达、产生或分离的抗体。此类重组人抗体具有衍生自人种系和/或非种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而,在某些实施例中,此类重组人抗体可以经历体外诱变(或,当使用转基因人Ig序列的动物时,经历体内体细胞诱变),并且因此重组抗体的V_H区和V_L区的氨基酸序列是如下序列:虽然衍生自人种系V_H序列和V_L序列并与之相关,但可能并非天然在体内存在于人抗体种系库中。

[0160] 用于检测或确定至少一个生物标志物的存在或水平的术语“样品”通常是全血、血浆、血清、唾液、尿液、粪便(例如,排泄物)、眼泪和任何其它体液(例如,如上文在“体液”的定义中所描述) 或组织样品(例如,活检) 如小肠、结肠样品或外科手术切除组织。在某些情

况下,本公开所涵盖的方法进一步包括在检测或确定样品中至少一个标志物的存在或水平之前从个体获得样品。

[0161] 如本文所使用的,“RNA干扰剂”定义为通过RNA干扰(RNAi)干扰或抑制靶生物标志基因表达的任何试剂。此类RNA干扰剂包含但不限于包含与本公开所涵盖的靶生物标志基因同源的RNA分子或其片段的核酸分子、短干扰RNA(siRNA)和通过RNA干扰(RNAi)干扰或抑制靶生物标志核酸表达的小分子。

[0162] “RNA干扰(RNAi)”是进化上保守的过程,其中与靶生物标志核酸相同或高度类似的序列的RNA的表达或引入导致从靶向基因转录的信使RNA(mRNA)的序列特异性降解或特异性转录后基因沉默(PTGS)(参见Coburn,G.和Cullen,B.(2002)《病毒学杂志(J.of Virology)》76(18):9225),从而抑制靶生物标志核酸的表达。在一个实施例中,RNA是双链RNA(dsRNA)。此过程已在植物、无脊椎动物和哺乳动物细胞中进行了描述。实质上,RNAi由dsRNA特异性核酸内切酶Dicer启动,所述内切酶促进长dsRNA进行性切割成称为siRNA的双链片段。siRNA被掺入识别和切割靶mRNA的蛋白质复合物中。RNAi也可以通过引入核酸分子例如合成siRNA、shRNA或其它RNA干扰剂来启动,以抑制靶生物标志核酸的表达或使其沉默。如本文所使用的,“靶生物标志核酸表达的抑制”或“标志基因表达的抑制”包含靶生物标志核酸或由靶生物标志核酸编码的蛋白质的表达或蛋白质活性或水平的任何降低。与靶生物标志核酸的表达或由未被RNA干扰剂靶向的靶生物标志核酸编码的蛋白质的活性或水平相比,降低可以是至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%或更多。

[0163] 除RNAi外,基因组编辑还可以用于调节所关注生物标志物的拷贝数或基因序列,如所关注生物标志物的组成性或诱导性敲除或突变,如KIR3DL3途径成分,如HHLA2、TMIGD2和/或KIR3DL3。例如,CRISPR-Cas系统可以用于精确编辑基因组核酸(例如,用于创建无功能或无效突变)。在此类实施例中,可以表达CRISPR指导RNA和/或Cas酶。例如,可以将仅含有指导RNA的载体施用于Cas9酶转基因的动物或细胞。可以使用类似的策略(例如,设计者锌指、转录激活因子样效应子(TALE)或归巢大范围核酸酶)。此类系统在本领域中是众所周知的(参见例如美国专利第8,697,359号;Sander和Joung(2014)《自然生物技术》32:347-355;Hale等人(2009)《细胞》139:945-956;Karginov和Hannon(2010)《分子细胞(Mol.Cell)》37:7;美国专利公开2014/0087426和2012/0178169;Boch等人(2011)《自然生物技术》29:135-136;Boch等人(2009)《科学》326:1509-1512;Moscou和Bogdanove(2009)《科学》326:1501;Weber等人(2011)《公共科学图书馆期刊(PLoS One)》6:e19722;Li等人(2011)《核酸研究(Nucl.Acids Res.)》39:6315-6325;Zhang等人,(2011)《自然生物技术》29:149-153;Miller等人(2011)《自然生物技术》29:143-148;Lin等人(2014)《核酸研究》42:e47)。根据本领域的方法,此类遗传策略可以使用组成性表达系统或诱导型表达系统。

[0164] “Piwi相互作用RNA(piRNA)”是最大的一类非编码小RNA分子。piRNA通过与piwi蛋白相互作用形成RNA蛋白复合物。这些piRNA复合物与种系细胞,特别是精子发生中的那些中的逆转录转座子和其它遗传元件的表观遗传和转录后基因沉默有关。它们在大小(26-31nt而不是21-24nt)、缺乏序列保守性和增加的复杂性上与microRNA(miRNA)不同。然而,与其它小RNA一样,piRNA被认为参与基因沉默,特别是转座子的沉默。大多数piRNA与转座子序列是反义的,这表明转座子是piRNA靶标。在哺乳动物中,似乎piRNA在转座子沉默中的活性在胚胎发育期间最为重要,并且在秀丽隐杆线虫(C.elegans)和人类中,piRNA对精子发

生都是必需的。通过形成RNA诱导的沉默复合物(RISC),piRNA在RNA沉默中发挥作用。

[0165] “适体”是与特定靶分子结合的寡核苷酸或肽分子。“核酸适体”是已经通过重复轮次的体外选择或等效地,SELEX(配体指数增强系统进化技术)工程化以与如小分子、蛋白质、核酸,甚至细胞、组织和生物体等各种分子靶标结合的核酸物种。“肽适体”是选择或工程化以与特定靶分子结合的人工蛋白质。这些蛋白质由一个或多个由蛋白质支架展示的可变序列的肽环组成。所述蛋白质通常从组合文库中分离出来,并且通常随后通过定向突变或多轮可变区诱变和选择进行改进。“Affimer蛋白”,即肽适体的进化,是小的、高度稳定的蛋白质,所述蛋白质工程化为展示肽环,所述肽环为特定靶蛋白提供高亲和力结合表面。Affimer蛋白是低分子量的蛋白质,12-14kDa,来源于胰抑素的半胱氨酸蛋白酶抑制剂家族。适体可用于生物技术和治疗应用,因为所述适体提供与常用的生物分子抗体的分子识别特性相媲美的分子识别特性。除了适体的区分识别之外,适体还提供优于抗体的优势,因为适体可以在试管中完全工程化,易于通过化学合成产生,具有期望的储存特性,并且在治疗应用中引发很少的免疫原性或不引发免疫原性。

[0166] “短干扰RNA”(siRNA),在本文中也称为“小干扰RNA”,被定义为用于例如通过RNAi抑制靶生物标志核酸表达的药剂。siRNA可以是化学合成的,可以通过体外转录产生或可以在宿主细胞内产生。在一个实施例中,siRNA是长度约15到约40个核苷酸,优选地约15到约28个核苷酸,更优选地长度为约19到约25个核苷酸和更优选地长度为约19、20、21或22个核苷酸的双链RNA(dsRNA)分子,并且可以在长度为约0、1、2、3、4或5个核苷酸的每条链上含有3'和/或5'突出端。突出端的长度在两条链之间是独立的,即,一条链上的突出端长度不依赖于第二链上的突出端长度。优选地,siRNA能够通过靶信使RNA(mRNA)的降解或特异性转录后基因沉默(PTGS)来促进RNA干扰。

[0167] 在另一个实施例中,siRNA是小发夹(也称为茎环)RNA(shRNA)。在一个实施例中,这些shRNA由短的(例如,19到25个核苷酸)反义链、然后5到9个核苷酸环和类似的有义链构成。可替代地,有义链可以在核苷酸环结构之前并且反义链可以在之后。这些shRNA可以包含在质粒、逆转录病毒和慢病毒中,并且从例如pol III U6启动子或其它启动子表达(参见例如Stewart等人(2003)《RNA》4月;9(4):493-501,所述文献通过引用并入本文)。

[0168] RNA干扰剂,例如siRNA分子可以施用于患有癌症或有患癌症风险的患者,以抑制在癌症中过表达的生物标志基因的表达,从而治疗、预防或抑制受试者的癌症。

[0169] 术语“小分子”是本领域的术语并且包含小于约1000分子量或小于约500分子量的分子。在一个实施例中,小分子不排他地包括肽键。在另一个实施例中,小分子不是寡聚的。可以筛选活性的示例性小分子化合物包含但不限于肽、肽模拟物、核酸、碳水化合物、有机小分子(例如,聚酮化合物)(Cane等人1998.《科学》282:63)和天然产物提取物文库。在另一个实施例中,化合物是小的有机非肽化合物。在另外的实施例中,小分子不是生物合成的。

[0170] 应用于生物活性剂的术语“选择性调节剂”或“选择性调节”是指与脱靶细胞群体、信号传导活性等相比,药剂通过与如细胞群体等靶标的直接或间接相互作用调节靶标、信号传导活性等的的能力。例如,选择性抑制KIR3DL3与一种或多种如HHLA2等天然结合配偶体之间的相互作用(而不是KIR3DL3与另一种结合配偶体之间的另一种相互作用)和/或所关注的细胞群体上的此类相互作用的药剂可以对KIR3DL3途径调节剂疗法(例如,KIR3DL3与一种或多种如HHLA2等天然结合配偶体之间的相互作用的调节剂)有活性,相互作用所述活

性是所述药剂对至少一种其它结合配偶体的活性的至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、2x(倍)或更多(例如,至少约3x、4x、5x、6x、7x、8x、9x、10x、15x、20x、25x、30x、35x、40x、45x、50x、55x、60x、65x、70x、75x、80x、85x、90x、95x、100x、105x、110x、120x、125x、150x、200x、250x、300x、350x、400x、450x、500x、600x、700x、800x、900x、1000x、1500x、2000x、2500x、3000x、3500x、4000x、4500x、5000x、5500x、6000x、6500x、7000x、7500x、8000x、8500x、9000x、9500x、10000x或更多或介于两者之间的任何范围,包含端值)。此类度量通常以将相互作用/活性减少一半所需的相对量表示。

[0171] 更一般地,术语“选择性”是指优先作用或功能。术语“选择性”可以根据所关注的特定靶标相对于其它靶标的优先效应来量化。例如,测量变量(例如,Treg/Breg与其它细胞的调节,如其它免疫细胞,如Tcon)可以是10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、1倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、5.5倍、6倍、6.5倍、7倍、7.5倍、8倍、8.5倍、9倍、9.5倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或更多或介于两者之间的任何范围(例如,50%到16倍),在所关注的靶标与非预期或不期望的靶标方面不同。相同的倍数分析可以用于确认给定组织、细胞群体、测量变量、测量作用等中的作用大小,如Treg:Tcon比率、Breg:Tcon比率、过度增殖细胞生长速率或体积、Treg/Breg增殖率或数量等。

[0172] 相比之下,术语“特异性”是指排除性行为或功能。例如,HHLA2-KIR3DL3相互作用的特异性调节是指HHLA2-KIR3DL3相互作用的排他性调节,而不是KIR3DL3与另一个配体之间相互作用的调节。在另一个实例中,抗体与预定的抗原的特异性结合是指抗体与所关注的抗原结合而不与其它抗原结合的能力。通常,当使用所关注的抗原作为分析物和抗体作为配体,在BIACORE®测定仪器中通过表面等离子体共振(SPR)技术测定时,抗体以大约小于 1×10^{-7} M如大约小于 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M或甚至更低的亲和力(K_D)结合,并且以以下亲和力与预定的抗原结合,所述亲和力是其用于与预定的抗原或密切相关抗原之外的非特异性抗原(例如,BSA、酪蛋白)结合的亲和力的至少1.1倍、1.2倍、1.3倍、1.4倍、1.5倍、1.6倍、1.7倍、1.8倍、1.9倍、2.0倍、2.5倍、3.0倍、3.5倍、4.0倍、4.5倍、5.0倍、6.0倍、7.0倍、8.0倍、9.0倍或10.0倍或更多。另外, K_D 是 K_A 的倒数。短语“识别抗原的抗体”和“对抗原特异的抗体”在本文中术语“与抗原特异性结合的抗体”可互换地使用。

[0173] 术语“致敏”意指以允许用疗法(例如,KIR3DL3途径调节剂疗法(例如,KIR3DL3与如HHLA2等一个或多个天然结合配偶体之间的相互作用的调节剂),单独地或与如免疫检查点抑制疗法等免疫疗法组合使用)进行更有效的治疗的方式改变如癌细胞或肿瘤细胞等细胞。在一些实施例中,正常细胞未受到影响导致正常细胞受到疗法(例如,KIR3DL3途径调节剂疗法(例如,KIR3DL3与如HHLA2等一个或多个天然结合配偶体之间的相互作用的调节剂),单独地或与如免疫检查点抑制疗法等免疫疗法组合使用)过度伤害的程度。根据本领域已知的方法测量对治疗性处理的增加的敏感性或降低的敏感性,用于本文下文所描述的特定治疗和方法,包含但不限于细胞增殖测定(Tanigawa N,Kern D H,Kikasa Y,Morton D L,《癌症研究(Cancer Res)》1982;42:2159-2164)、细胞死亡测定(Weisenthal L M、

Shoemaker R H、Marsden J A、Dill P L、Baker J A、Moran E M,《癌症研究》1984;94:161-173;Weisenthal L M、Lippman M E,《癌症治疗报告 (Cancer Treat Rep)》1985;69:615-632;Weisenthal L M,于:Kaspers G J L、Pieters R、Twentyman P R、Weisenthal L M、Veerman A J P,编辑《白血病和淋巴瘤的抗药性 (Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma)》宾夕法尼亚州兰霍恩:哈伍德学术出版社 (Harwood Academic Publishers, 1993:415-432;Weisenthal L M,《产科学与妇科学普通发布版 (Contrib Gynecol Obstet)》1994;19:82-90)。也可以通过测量一段时间内例如对于人为6个月并且对于小鼠为4周到6周的肿瘤大小减小来测量动物的敏感性或抗性。如果与在不存在此类组合物或方法的情况下的治疗敏感性或抗性相比,治疗敏感性的增加或抗性的降低为5%或更多,例如10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或更多、2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍或更多,则组合物或方法使对治疗性处理的应答敏感。对治疗性处理的敏感性或抗性的确定在本领域中是常规的并且在普通临床医生的技能范围内。应当理解,本文所描述的用于增强免疫调节功效的任何方法可以同样应用于使过度增殖或其它癌细胞(例如,抗性细胞)对疗法敏感的方法。

[0174] 术语“协同作用”是指两种或更多种治疗剂如两种或更多种KIR3DL3途径调节剂、KIR3DL3途径调节剂和免疫疗法的组合作用可以大于单独的抗癌剂单独作用的总和, KIR3DL3途径调节剂单独地或与如免疫检查点抑制疗法等免疫疗法组合。

[0175] 术语“生存”包含以下内容:生存至死亡,也称为总生存(其中所述死亡可能与病因无关或与肿瘤有关);“无复发生存”(其中术语复发应包含局部复发和远处复发);无转移生存;无病生存(其中术语疾病应包含癌症和与之相关的疾病)。所述存活长度可以通过参考定义的起点(例如,诊断时间或治疗开始)和终点(例如,死亡、复发或转移)来计算。另外,治疗功效的标准可以扩展为包含对化学疗法的应答、生存概率、给定时间段内的转移概率和肿瘤复发的概率。

[0176] 术语“治疗作用”是指由药理活性物质在动物,特别地哺乳动物,并且更特别地人中引起的局部或全身性作用。因此,所述术语意指旨在用于诊断、治愈、缓解、治疗或预防疾病或增强动物或人的期望身体或精神发育和状况的任何物质。

[0177] 如本文所使用的术语“治疗有效量”和“有效量”意指以适用于任何医学治疗的合理益处/风险比率在动物中的至少细胞亚群中有效产生一些期望治疗效应的化合物、材料或包括本公开所涵盖的化合物的组合物的量。主题化合物的毒性和治疗功效可以通过细胞培养物或实验动物中的标准药理学程序来确定,例如用于确定LD₅₀和ED₅₀。优选展现出大的治疗指数的化合物。在一些实施例中,可以测量LD₅₀(致死剂量)并且相对于不施用药剂,对于药剂可以降低例如至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%或更多。类似地,可以测量ED₅₀(即,实现症状的半数最大抑制的浓度)并且相对于不施用药剂,对于药剂可以增加例如至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%或更多。同样类似地,可以测量IC₅₀(即,对于癌细胞实现半数最大细胞毒性或细胞抑制作用的浓度)并且相对于不施用药剂,对于药剂可以增加例如至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%或更多。在一些实施例中,测定中的癌细胞生长

可以被抑制至少约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或甚至100%。可以促进癌细胞死亡至少约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或甚至100%。在另一个实施例中,可以实现至少约10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或甚至100%的癌细胞数量和/或实体恶性减少。

[0178] 术语“基本上不含化学前体或其它化学品”包含抗体、多肽、肽或融合蛋白的制剂,其中蛋白质与参与蛋白质合成的化学前体或其它化学品分离。在一个实施例中,术语“基本上不含化学前体或其它化学品”包含抗体、多肽、肽或融合蛋白的制剂,所述制剂具有小于约30% (按干重计) 的化学前体或非抗体、多肽、肽或非抗体、多肽、肽或融合蛋白化学品,更优选地小于约20%的化学前体或非抗体、多肽、肽或融合蛋白化学品,仍更优选地小于约10%的化学前体或非抗体、多肽、肽或融合蛋白化学品,并且最优选地小于约5%的化学前体或非抗体、多肽、肽或融合蛋白化学品。

[0179] “转录的多核苷酸”或“核苷酸转录物”是与全部或部分成熟mRNA互补或同源的多核苷酸(例如,mRNA、hnRNA、cDNA、成熟miRNA、pre-miRNA、pri-miRNA、miRNA*、抗miRNA或miRNA结合位点或其变体或此类RNA或cDNA的类似物),所述成熟mRNA通过本公开所涵盖的标志物的转录和RNA转录物的正常转录后加工(例如,剪接)(如果有的话)和RNA转录物的逆转录来制备。

[0180] 术语“载体”是指能够转运其已经连接的另一个核酸的核酸。一种类型的载体是“质粒”,是指另外的DNA区段可以连接到其中的环状双链DNA环。另一种类型的载体是病毒载体,其中可以将另外的DNA区段连接到病毒基因组中。某些载体能够在其被引入到其中的宿主细胞中进行自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体以及附加型哺乳动物载体)。其它载体(例如,非附加型哺乳动物载体)在引入到宿主细胞中时被整合到所述宿主细胞的基因组中,并且由此与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够指导与其操作性地连接的基因的表达。此类载体在本文中被称为“重组表达载体”或简单地,“表达载体”。一般而言,可用于重组DNA技术中的表达载体经常呈质粒形式。在本说明书中,“质粒”和“载体”可以互换使用,因为质粒是最常用的载体形式。然而,本发明旨在包含提供同等功能的此类其它形式的表达载体,如病毒载体(例如,复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0181] 特定蛋白质的氨基酸序列与可以编码蛋白质的核苷酸序列之间存在已知且明确的对应关系,如基因密码所定义的(下文示出)。同样,特定核酸的核苷酸序列与由所述核酸编码的氨基酸序列之间存在已知且明确的对应关系,如基因密码所定义的。

[0182] 基因密码

	丙氨酸 (Ala, A)	GCA、GCC、GCG、GCT
	精氨酸 (Arg, R)	AGA、ACG、CGA、CGC、CGG、CGT
	天冬酰胺 (Asn, N)	AAC、AAT
	天冬氨酸 (Asp, D)	GAC、GAT
	半胱氨酸 (Cys, C)	TGC、TGT
	谷氨酸 (Glu, E)	GAA、GAG
	谷氨酰胺 (Gln, Q)	CAA、CAG
[0183]	甘氨酸 (Gly, G)	GGA、GGC、GGG、GGT
	组氨酸 (His, H)	CAC、CAT
	异亮氨酸 (Ile, I)	ATA、ATC、ATT
	亮氨酸 (Leu, L)	CTA、CTC、CTG、CTT、TTA、TTG
	赖氨酸 (Lys, K)	AAA、AAG
	甲硫氨酸 (Met, M)	ATG
	苯丙氨酸 (Phe, F)	TTC、TTT
	脯氨酸 (Pro, P)	CCA、CCC、CCG、CCT
	丝氨酸 (Ser, S)	AGC、AGT、TCA、TCC、TCG、TCT
	苏氨酸 (Thr, T)	ACA、ACC、ACG、ACT
[0184]	色氨酸 (Trp, W)	TGG
	酪氨酸 (Tyr, Y)	TAC、TAT
	缬氨酸 (Val, V)	GTA、GTC、GTG、GTT
	终止信号 (结束)	TAA、TAG、TGA

[0185] 基因密码的重要且众所周知的特征是其冗余性,因此,对于用于制造蛋白质的大多数氨基酸,可以采用超过一个编码核苷酸三联体(如上文所示)。因此,许多不同的核苷酸序列可以编码给定的氨基酸序列。此类核苷酸序列被认为在功能上是等效的,因为所述核苷酸序列导致在所有生物体中产生相同的氨基酸序列(尽管某些生物体可能比其它生物体更有效地翻译一些序列)。此外,有时在给定核苷酸序列中可能会发现嘌呤或嘧啶的甲基化变体。此类甲基化不影响三核苷酸密码子与对应氨基酸之间的编码关系。

[0186] 鉴于前述,编码生物标志核酸(或其任何部分)的DNA或RNA的核苷酸序列可以用于衍生多肽氨基酸序列,使用基因密码将DNA或RNA翻译成氨基酸。同样,对于多肽氨基酸序列,可以从基因密码(由于基因密码的冗余性,基因密码将针对任何给定氨基酸序列产生多个核酸序列)中推断出可以编码多肽的对应核苷酸序列。因此,本文对编码多肽的核苷酸序列的描述和/或公开内容应当被认为还包含对由核苷酸序列编码的氨基酸序列的描述和/

或公开内容。类似地,本文对多肽氨基酸序列的描述和/或公开内容应当被认为还包含对可以编码氨基酸序列的所有可能的核苷酸序列的描述和/或公开内容。

[0187] 最后,在本公开中有用的核酸和多肽分子的核酸和氨基酸序列信息在本领域中是众所周知的并且容易在如国家生物技术信息中心 (NCBI) 等可公开获得的数据库中获得。例如,下表1提供了来自可公开获得的序列数据库的示例性核酸和氨基酸序列。

[0188] 表1

[0189] SEQ ID NO:1人HLA2变体1 cDNA序列(NM_007072.3,位置415-1659的CDS区)

[0190]

```

1 agttctcttc aagtcattga atcgactttt ttgaattagt ttccagtttc attttgtttt
61 ccctaattca agttgggaac acttcatttt ccccaattca agttgggaac acttcettgg
121 tatttcccttg ctacatggac tttagcaaat gctactttac tctccttcca gctactcagg
181 aggcctgaggc aggagaatcg cttgaacccg ggaggcggag gttacagtga gccttttctt
241 agttttactg ttggaagcct aactcacagg agagattatg caatacagtc ctgaagtcaa
301 gggaggagag catgtaggag aatactaacc ctgcacagat tgtgatgggt atgtggaata
361 tactaaagcc tagaacgcac ctctcttgca tgactaatat gttctgcaca agacatgaag
421 gcacagacag cactgtcttt ctctctcatt ctcataacat ctctgagtgg atctcaaggc

481 atattccctt tggctttctt catttatgtt cctatgaatg aacaaatcgt cattggaaga
541 cttgatgaag atataattct cccttcttca tttgagaggg gatccgaagt cgtaatacac
601 tggaagtatc aagatagcta taaggttcac agttactaca aaggcagtga ccatttgga
661 agccaagatc ccagatatgc aaacaggaca tcccttttct ataatgagat tcaaaatggg
721 aatgcgtcgc tatttttctc aagagtaagc cttctggacg aaggaattta cactgctat
781 gtaggaacag caattcaagt gattacaaac aaagtgggtg taaaggtggg agtttttctc
841 acaccctgta tgaagtatga aaagaggaa acaaacagct tcttaatatg cagcgtgta
901 agtgtttatc ctctctcaat tatcacgtgg aaaatggaca acacacatct ctctgaaaac
961 aacatggaag aaacagggtc tttggattct ttttctatta acagccactt gaattattca
1021 ggatcaaatt catcttatga atgtacaatt gaaaattcac tgctgaagca aacatggaca
1081 gggcgtctga cgatgaaaga tggccttcat aaaatgcaaa gtgaacacgt ttcactctca
1141 tgtcaacctg taaatgatta tttttcacca aaccaagact tcaaagttac ttggtccaga
1201 atgaaaagtg ggactttctc tgtcctggct tactatctga gctcctcaca aaatacaatt
1261 atcaatgaat cccgattctc atggaacaaa gagctgataa accagagtga cttctctatg
1321 aatttgatgg atcttaattc ttccagacag ggggaatatt tatgcaatat ttcttcggat
1381 gaataacttt tacttaccat ccacacagtg catgtagaac cgagccaaga aacagcttcc
1441 cataacaaag gcttatggat tttggtgccc tctgcgattt tggcagcttt tctgctgatt
1501 tggagcgtaa aatggttcag agcccagcta gaagccagga ggagcagaca ccctgctgat
1561 ggagcccaac aagaaagatg ttgtgtccct cctggtgagc gctgtcccag tgcacccgat
1621 aatggcgaag aaaatgtgcc tctttcagga aaagtatagg aaatgagaga agactgtgac
1681 aactcatgac ctgcattcctt aatatccagt gacttcattc cccctttctt caccacaatt
1741 ccaggcaatg gctgtcggg gcagacaatt ctaccactgc aaagagtgtg aactattttc
1801 tgggtatcaca tttatttttc aagacatact tttcaagaca tcattcactg acccactacc
1861 tgcattgagt ataaatgcct ggatgttaag gattccaatt taactttgaa aagaactgtc
1921 tcattcattt acattttctg tacagtcagc ccaggaggtt acagtgagct ctccactaag
1981 aatctggaag aaatgcatca ctagggtttg attcccaatc tgatcaactg ataatgggtg
2041 agagagcagg taagagccaa agtcacctta gtggaaaggt taaaaaccag agcctggaaa
2101 ccaagatgat tgatttgaca aggtatttta gtctagtttt atatgaacgg ttgtatcagg
2161 gtaaccaact cgatttgga tgaatcttag ggcaccaaag actaagacag tatctttaag
2221 attgctaggg aaaagggccc tatgtgtcag gcctctgagc ccaagccaag catcgcatcc
2281 cctgtgattt gcacgtatac atccagatgg cctaaagtaa ctgaagatcc acaaaagaag
2341 taaaaatagc cttaactgat gacattccac cattgtgatt tgttctctgc ccaccctaac
2401 tgatcaatgt actttgtaat ctccccacc cttaagaagg tactttgtaa tcttccccac
2461 ccttaagaag gttctttgta attctcccc cccttgagaa tgtactttgt gagatccacc
2521 ctgcccacaa aacattgctc ttaacttcac cgcctaacc aaaacctata agaactaatg
2581 ataaccatc acccttcgct gactctcttt tcggactcag ccacactgca ccaggtgaa
2641 ataaacagct ttattgctca cacaaaaaaa aaaaaaaa

```

[0192] SEQ ID NO:2人HLA2变体1氨基酸序列(NP_009003.1)

[0193] 1 MKAQTALSFF LILITSLSGS QGIFPLAFFI YVPMNEQIVI GRLEDEDIILP SSFERGSEVV
61 IHWKYQDSYK VHSYYKGS DH LESQDPRYAN RTSLFYNEIQ NGNASLFFRR VSLLDEGIYT
121 CYVGTAIQVI TNKVVLKGV FLTPVMKYEK RNTNSFLICS VLSVYPRPII TWKMDNTPIS
181 ENNMEETGSL DSFSINSPLN ITGSNSSYEC TIENSLKQT WTGRWTMKDG LHKMQSEHVS
241 LSCQPVNDYF SPNQDFKVTW SRMKS GTFSV LAYYLSSSQN TIINESRFSW NKELINQSD F
301 SMNLMDLNL S DSGEYLCNIS SDEYTL LTIH TVHVEPSQET ASHNKGLWIL VPSAILA A FL
361 LIWSVKCCRA QLEARRSRHP ADGAQQERCC VPPGERCPSA PDNGEENVPL SGKV

[0194] SEQ ID NO:3人HLA2变体2 cDNA序列(NM_001282556.1,位置224-1468的CDS区)

[0195] 1 aaatcaaacg taccttggac tttactctct gagaaactca tagctgaatt caatgtttat
61 tcttatggac tacttagcat ttgactagac ggtatgaatt tctaagtaag cacatataga
121 actggatgcc cttgtggtac atctcaaggc tgatttgaaa gcttgagaga ccatcaagaa
181 ttggatttgg ggaagagcat gactaatatg ttctgcacaa gacatgaagg cacagacagc
241 actgtctttc ttctcatc tcataacatc tctgagtggg tctcaaggca tattcccttt
301 ggctttcttc atttatgttc ctatgaatga acaaatcgtc attggaagac ttgatgaaga
361 tataattctc ccttcttc ttagagaggg atccgaagtc gtaatacact ggaagtatca
421 agatagctat aaggttcaca gttactacaa aggcagtgac catttgga gccaagatcc
481 cagatatgca aacaggacat cccttttcta taatgagatt caaaatggga atgcgtcgc
541 atttttcaga agagtaagcc ttctggacga aggaatttac acctgctatg taggaacagc
601 aattcaagtg attacaaaca aagtgggtgct aaaggtggga gtttttctca caccctgat
661 gaagtatgaa aagaggaaca caaacagctt cttaatatgc agcgtgttaa gtgtttatcc
721 tctgccatt atcacgtgga aaatggacaa cacacctatc tctgaaaaca acatggaaga
781 aacagggtct ttggattctt tttctattaa cagccactg aatattacag gatcaaattc
841 atcttatgaa tgtacaattg aaaattcact gctgaagcaa acatggacag ggcgtggac
901 gatgaaagat ggccttcata aaatgcaaag tgaacacgtt tctctcat gtcaacctgt
961 aaatgattat ttttcaccaa accaagactt caaagtact tggctcagaa tgaaagtgg
1021 gactttctct gtcctggctt actatctgag ctctcacaa aatacaatta tcaatgaatc
1081 ccgattctca tggaaacaa agctgataaa ccagagtgc ttctctatga atttgatgga
1141 tcttaattct tcagacagtg gggaatatt atgcaatatt tcttcggatg aatatactt
1201 acttaccatc cacacagtgc atgtagaacc gagccaagaa acagcttccc ataacaaagg
1261 cttatggatt ttggtgccct ctgcgatttt ggcagcttt ctgctgattt ggagcgtaaa
1321 atgttgcaga gccagctag aagccaggag gagcagacac cctgctgatg gagccaaca
1381 agaaagatgt tgtgtccctc ctggtgagcg ctgtccagc gcaccgcata atggcgaaga
1441 aaatgtgctt ctttcaggaa aagtatagga aatgagagaa gactgtgaca actcatgacc
[0196] 1501 tgcatectta atatccagt acttcatctc ccctttcttc accacaattc caggcaatgg
1561 cctgtcggag cagacaattc taccactgca aagagttgta accattttct ggtatcacat
1621 ttatttttca agacatactt ttcaagacat cattcactga cccactacct gcattgagta
1681 taaatgctg gatgttaagg attccaattt aactttgaaa agaactgtct cattcattta
1741 ctttctgtt acagtcagcc caggaggtta cagtgaagtc tccactaaga atctggaaga
1801 aatgcatac taggggttga ttcccaactc gatcaactga taatgggtga gagagcaggt
1861 aagagccaaa gtcaccttag tggaaagggt aaaaaccaga gcctggaac caagatgatt
1921 gatttgacaa ggtatttttag tctagtttta tatgaacggt tgtatcagg taaccaactc
1981 gatttgggat gaatcttag gcaccaaaga ctaagacagt atctttaaga ttgctagga
2041 aaagggcct atgtgtcagg cctctgagcc caagccaagc atcgcatccc ctgtgatttg
2101 cacgtatata tccagatggc cttaaagtaac tgaagatcca caaaagaagt aaaaatagcc
2161 ttaactgatg acattccacc attgtgattt gttcctgccc caccctaact gatcaatgta
2221 ctttgtaate tccccaccc ttaagaagg actttgtaat cttccccacc ctaagaagg
2281 ttctttgtaa ttctccccac ccttgagaat gtactttgtg agatccaccc tgcccacaaa
2341 acattgctct taacttcacc gcctaacca aaacctataa gaactaatga taatccatca
2401 cccttgcgtg actctctttt cggactcagc ccacctgcac ccaggtgaaa taaacagctt
2461 tattgctcac aaaaaaaaa aaaaaaa

[0197] SEQ ID NO:4人HLA2变体2氨基酸序列(NP_001269485.1)

[0198] 1 MKAQTALSFF LILITSLSGS QGIFPLAFFI YVPMNEQIVI GRLEDEDIILP SSFERGSEVV
61 IHWKYQDSYK VHSYYKGS DH LESQDPRYAN RTSLFYNEIQ NGNASLFFRR VSLLDEGIYT
121 CYVGTAIQVI TNKVVLKGV FLTPVMKYEK RNTNSFLICS VLSVYPRPII TWKMDNTPIS
181 ENNMEETGSL DSFSINSPLN ITGSNSSYEC TIENSLKQT WTGRWTMKDG LHKMQSEHVS
241 LSCQPVNDYF SPNQDFKVTW SRMKS GTFSV LAYYLSSSQN TIINESRFSW NKELINQSD F
301 SMNLMDLNL S DSGEYLCNIS SDEYTL LTIH TVHVEPSQET ASHNKGLWIL VPSAILA A FL
361 LIWSVKCCRA QLEARRSRHP ADGAQQERCC VPPGERCPSA PDNGEENVPL SGKV

[0199] SEQ ID NO:5人HLA2变体3 cDNA序列(NM_001282557.1,位置155-1399的CDS区)

1 agtttactct acatcatagc agagaaaatg gacaaaacac agctgttttg catgtaggag
61 aataactaacc ctgcacagat tgtgatgggtg atgtggaata tactaaagcc tagaacgcac
121 ctccctctgca tgactaatat gttctgcaca agacatgaag gcacagacag cactgtcttt
181 ctccctcatt ctcataacat ctctgagtggt atctcaaggc atattccctt tggctttctt
241 catttatggt cctatgaatg aacaaatcgt cattggaaga cttgatgaag atataattct
301 cccttcttca tttgagaggg gatccgaagt cgtaatacac tggaggtatc aagatagcta
[0200] 361 taaggttcac agttactaca aaggcagtga ccatttggaa agccaagatc ccagatatgc
421 aaacaggaca tcccttttct ataagagat tcaaaatggg aatgcgtcgc tatttttcag
481 aagagtaagc cttctggacg aaggaattta cacctgctat gtaggaacag caattcaagt
541 gattacaaac aaagtgggtgc taaaggtggg agtttttctc acaccctga tgaagtatga
601 aaagaggaac acaaacagct tcttaatatg cagcgtgtta agtggttatc ctctccaat
661 tatcacgtgg aaaatggaca acacacctat ctctgaaaac aacatggaag aaacagggtc
721 tttggattct ttttctatta acagcccact gaatattaca ggatcaaatt catcttatga
781 atgtacaatt gaaaattcac tgctgaagca aacatggaca gggcgtgga cgatgaaaga
841 tggccttcat aaaatgcaaa gtgaacacgt ttcactctca tgtcaacctg taaatgatta
901 tttttcacca aaccaagact tcaaagttac ttggtccaga atgaaaagtg ggactttctc
961 tgtcctggct tactatctga gctctcaca aaatacaatt atcaatgaat cccgattctc
1021 attggaacaaa gagctgataa accagagtga ctctctatg aattttagtg atcttaatct
1081 ttcagacagt ggggaatatt tatgcaatat ttcttcggat gaatatactt tacttaccat
1141 ccacacagtg catgtagaac cgagccaaga aacagcttcc cataacaaag gcttatggat
1201 tttggtgccc tctgcatgtt tggcagcttt tctgctgatt tggagcgtaa aatggtgcag
1261 agcccagcta gaagccagga ggagcagaca ccctgctgat ggagcccaac aagaaagatg
1321 ttgtgtccct cctggtgagc gctgtcccag tgcacccgat aatggcgaag aaaatgtgcc
1381 tctttcagga aaagtatagg aaatgagaga agactgtgac aactcatgac ctgcatcctt
1441 aatatccagt gacttcatct cccctttctt caccacaatt ccaggcaatg gcctgtcgga
1501 gcagacaatt ctaccactgc aaagagttgt aaccattttc tggatcaca tttatttttc
[0201] 1561 aagacatact tttcaagaca tcatttactg acccactacc tgcattgagt ataaatgcct
1621 ggatgttaag gattccaatt taactttgaa aagaactgtc tcattcattt acatttctgt
1681 tacagtcagc ccaggaggtt acagtgaagt ctccactaag aatctggaag aaatgcatca
1741 ctagggggtt attcccaatc tgatcaactg ataatgggtg agagagcagg taagagccaa
1801 agtcacetta gtggaaaggt taaaaaccag agcctggaaa ccaagatgat tgatttgaca
1861 aggtatttta gtctagtttt atatgaacgg ttgtatcagg gtaaccaact cgatttggga
1921 tgaatcttag ggcaccaaag actaagacag tatctttaag attgctaggg aaaagggcc
1981 tatgtgtcag gcctctgagc ccaagccaag catcgcatcc cctgtgattt gcacgtatac
2041 atccagatgg cctaaagtaa ctgaagatcc acaaaagaag taaaaatagc cttaactgat
2101 gacattccac cattgtgatt tgttctctgcc ccaccctaac tgatcaatgt actttgtaat
2161 ctccccacc cttaagaagg tactttgtaa tcttccccac ccttaagaag gttctttgta
2221 attctcccca cccttgagaa tgtactttgt gagatccacc ctgcccacaa aacattgctc
2281 ttaacttcac cgcctaacc aaaacctata agaactaatg ataatccatc acccttcgct
2341 gactctcttt tcggactcag cccacctgca cccaggtgaa ataaacagct ttattgctca
2401 cacaaaaaaa aaaaaaaaa

[0202] SEQ ID NO:6人HLA2变体3氨基酸序列(NP_001269486.1)

1 MKAQTALSFF LILITSLSGS QGIFPLAFFI YVPMNEQIVI GRLDEDIILP SSFERGSEVV
61 IHWKYQDSYK VHSYYKGS DH LESQDP RYAN RTSLFYNEIQ NGNASLFFRR VSLLDDEGIYT
121 CYVGTAIQVI TNKVVLKGV FLTPVMKY EK RNTNSFLICS VLSVYPRPII TWKMDNTPIS
[0203] 181 ENNMEETGSL DSFSINSPLN ITGSNSSYEC TIENSLKQT WTGRWTMKDG LHKMQSEHVS
241 LSCQPVNDYF SPNQDFKVTW SRMKSGTFSV LAYYLSSSQN TIINESRFSW NKELINQSD F
301 SMNLMDLNL SSGEYLCNIS SDEYTLTTH TVHVEPSQET ASHNKGLWIL VPSAILAAFL
361 LIWSVKCCRA QLEARRSRHP ADGAQQRCC VPPGERCP SA PDNGEENVPL SGKV

[0204] SEQ ID NO:7人HLA2变体4cDNA序列(NM_001282558.1,位置302-1495的CDS区)

[0205] 1 aaatcaaacg taccttggac tttactctct gagaaactca tagctgaatt caatgtttat
 61 tcttatggac tacttagcat ttgactagac ggtatgaatt tctaagtaag cacatataga
 121 actggatgcc cttgtggtac atctcaaggc tgatttgaaa gcttgagaga ccatcaagaa
 181 ttggatttgg ggaagagcat gtaggagaat actaaccctg cacagattgt gatggtgatg
 241 tggaatatac taaagcctag aacgcacctc ctctgcatga ctaatatgtt ctgcacaaga
 301 catgaaggca cagacagcac tgtctttctt cctcattctc ataacatctc tgagtggatc
 361 tcaaggcata ttccctttgg ctttcttcat ttatgttcct atgaatgaac aaatcgctcat
 421 tggaagactt gatgaagata taattctccc ttcttcattt gagaggggat ccgaagtcgt
 481 aatacactgg aagtatcaag atagctataa ggttcacagt tactacaaag gcagtgacca
 541 tttggaaagc caagatccca gatatgcaa caggacatcc cttttctata atgagattca
 601 aaatgggaat gcgtcgctat ttttcagaag agtaagcctt ctggacgaag gaatttacac
 661 ctgctatgta ggaacagcaa ttcaagtgat tacaacaaa gtggtgctaa aggtgggagt
 721 ttttctcaca cccgtgatga agtatgaaa gaggaacaa aacagcttct taatatgcag
 781 cgtgtaagt gtttctctc gtccaattat cacttggaat atggacaaca cacctatctc
 841 tgaaaacaac atggaagaaa cagggtcttt ggattctttt tctattaaca gccactgaa
 901 tattacagga tcaaattcat cttatgaatg tacaattgaa aattcactgc tgaagcaaac
 961 atggacaggg cgctggacga tgaaagatgg cttcataaa atgcaaagtg aacacgttct
 1021 actctcatgt caacctgtaa atgattattt ttcaccaaac caagacttca aagttacttg

[0206] 1081 gtccagaatg aaaagtggga ctttctctgt cctggcttac tatctgagct cctcacaaaa
 1141 tacaattatc aatgaatccc gattctcatg gaacaaagag ctgataaacc agagtgactt
 1201 ctctatgaat ttgatggatc ttaattcttc agacagtggg gaatatttat gcaatatttc
 1261 ttccgtagaa tatactttac ttaccatcca cacagtgcag gtagaaccga gccaaagaa
 1321 agcttcccat aacaaaggct tatggatttt ggtgccctct gcgatttttg cagcttttct
 1381 gctgatttgg agcgtaaaat gttgcagaga aagatgttgt gtccctcctg gtgagcgctg
 1441 tccagtgca cccgataatg gcgaagaaaa tgtgcctctt tcaggaaaag tataggaaat
 1501 gagagaagac tgtgacaact catgacctgc atccttaata tccagtgact tcatctcccc
 1561 tttcttcacc acaattccag gcaatggcct gtccggagcag acaattctac cactgcaaag
 1621 agttgtaacc attttctggt atcacattta ttttcaaga catacttttc aagacatcat
 1681 tcaactgacc actacctgca ttgagtataa atgcctggat gttaaggatt ccaatttaac
 1741 ttgaaaaga actgtctcat tcattttacat ttctgttaca gtcagcccag gaggttacag
 1801 tgagctctcc actaagaatc tggaagaaat gcatcactag gggttgattc ccaatctgat
 1861 caactgataa tgggtgagag agcaggtaag agccaaagtc accttagtgg aaagggttaa
 1921 aaccagagcc tggaaaccaa gatgattgat ttgacaaggt attttagtct agttttatat
 1981 gaacggttgt atcagggtta ccaactcgat ttgggatgaa tcttagggca ccaaagacta
 2041 agacagtatc tttaagattg ctagggaataa gggccctatg tgtcaggcct ctgagcccaa
 2101 gccagcatc gcacccctg tgatttgcac gtatacatcc agatggccta aagtaactga
 2161 agatccacaa aagaagtaaa aatagcctta actgatgaca ttccaccatt gtgatttgtt
 2221 cctgccccac cctaactgat caatgtactt tgtaatctcc cccaccctta agaaggact
 2281 ttgtaatctt cccaccctt aagaaggttc tttgtaattc tccccaccct tgagaatgta
 2341 ctttgtgaga tccaccctgc ccacaaaaca ttgctcttaa cttcaccgcc taacccaaaa
 2401 cctataagaa ctaatgataa tccatcacc ttcgctgact ctcttttcgg actcagccca
 2461 cctgcaccca ggtgaaataa acagctttat tgctcacaca aaaaaaaaaa aaaaa

[0207] SEQ ID NO:8人HLA2变体4氨基酸序列(NP_001269487.1)

[0208] 1 MKAQTALSFF LILITSLSGS QGIFPLAFFI YVPMNEQIVI GRLEDEDIILP SSFERGSEVV
 61 IHWKYQDSYK VHSYYKGS DH LESQDP RYAN RTS LFYNEIQ NGNASLFFRR VSLLDEGIYT
 121 CYVGTAIQVI TNKVVLKGV FLTPVMKY EK RNTNSFLICS VLSVYPRPII TWKMDNTPIS
 181 ENNMEETGSL DSFSINSPLN ITGSNSSYEC TIENSLLKQT WTGRWTMKDG LHKMQSEHVS
 241 LSCQPVNDYF SPNQDFKVTW SRMKS GTF SV LAYYLSSSQN TIINESRFSW NKELINQSD F
 301 SMNLMDLNL S DSGEYLCNIS SDEYTL LTIH TVHVEPSQET ASHNKGLWIL VPSAILAAFL
 361 LIWSVKCCRE RCCVPPGERC PSAPDN GEEN VPLSGKV

[0209] SEQ ID NO:9人HLA2变体5 cDNA序列(NM_001282559.1,位置232-1284的CDS区)

- [0210]
- ```

1 aaatcaaacg taccttggac tttactctct gagaaactca tagctgaatt caatgtttat
61 tcttatggac tacttagcat ttgactagac ggtatgaatt tctaagtaag cacatataga
121 actggatgcc cttgtggtac atctcaaggc tgatttgaaa gcttgagaga ccatcaagaa
181 ttggatttgg ggaagagcat gtaggagaat actaaccctg cacagattgt gatggtgatg
241 tggaatatac taaagcctag aacgcacctc ctctgcatga ctaatatgtt ctgcacaaga
301 catgaaggca cagacagcac tgtctttctt cctcattctc ataacatctc tgagtggatc
361 tcaagaagag taagccttct ggacgaagga atttacacct gctatgtagg aacagcaatt
421 caagtgatta caaacaaggt ggtgctaaag gtgggagttt ttctcacacc cgtgatgaag
481 tatgaaaaga ggaacacaaa cagcttctta atatgcagcg tgtaagtgtt ttatcctcgt
541 ccaattatca cgtggaaaat ggacaacaca cctatctctg aaaacaacat ggaagaaaca
601 gggctcttgg attctttttc tattaacagc ccactgaata ttacaggatc aaattcatct
661 tatgaatgta caattgaaaa ttcactgctg aagcaaacat ggacagggcg ctggacgatg
721 aaagatggcc ttcataaaat gcaaagtga caggtttcac tctcatgtca acctgtaaat
781 gattattttt caccaaacca agacttcaaa gttacttggg ccagaaatgaa aagtgggact
841 ttctctgtcc tggcttacta tctgagctcc tcacaaaata caattatcaa tgaatccgga
901 ttctcatgga acaaagagct gataaaccag agtgacttct ctatgaattt gatggatctt
961 aatctttcag acagtgggga atatttatgc aatatttctt cggatgaata tactttactt
1021 accatccaca cagtgcattg agaaccgagc caagaaacag cttcccataa caaaggctta
1081 tggatttttg tgccctctgc gattttggca gcttttctgc tgatttggag cgtaaaatgt
1141 tgcagagccc agctagaagc caggaggagc agacaccctg ctgatggagc ccaacaagaa
1201 agatgtttgt tccctcctgg tgagcgctgt cccagtgcac ccgataatgg cgaagaaaat
1261 gtgcctcttt caggaaaagt ataggaaatg agagaagact gtgacaactc atgacctgca

1321 tccttaatat ccagtgactt catctcccct ttcttcacca caattccagg caatggcctg
1381 tcggagcaga caattctacc actgcaaaga gttgtaacca ttttctggta tcacatttat
1441 ttttcaagac atacttttca agacatcatt cactgacca ctacctgat tgagtataaa
1501 tgccctggatg ttaaggatcc caatttaact ttgaaaagaa ctgtctcatt catttacatt
1561 tctgttacag tcagcccagg aggttacagt gagctctcca ctaagaatct ggaagaaatg
1621 catcactagg ggttgattcc caatctgatc aactgataat ggggtgagaga gcaggtaaga
1681 gccaaagtca ccttagtgga aagggttaaaa accagagcct ggaaaccaag atgattgatt
1741 tgacaaggta ttttagtcta gttttatatg aacgggtgta tcagggtaac caactcgatt
1801 tgggatgaat cttagggcac caaagactaa gacagtatct ttaagattgc tagggaaaag
1861 ggccctatgt gtcaggcctc tgagcccaag ccaagcatcg catcccctgt gatttgcacg
1921 tatacatcca gatggcctaa agtaactgaa gatccacaaa agaagtaaaa atagccttaa
1981 ctgatgacat tccaccattg tgatttgttc ctgccccacc ctaactgatc aatgtacttt
2041 gtaatctccc ccacccttaa gaaggctact tgtaatcttc ccaccctta agaaggttct
2101 ttgtaattct cccaccctt gagaatgtat tttgtgagat ccaccctgcc caaaaacat
2161 tgctcttaac ttcaccgctt aacccaaaac ctataagaac taatgataat ccatcaccct
2221 tcgctgactc tcttttcgga ctcagccac ctgcaccag gtgaaataaa cagctttatt
2281 gctcacacaa aaaaaaaaaa aaaa

```
- [0211]
- [0212] SEQ ID NO:10人HHLA2变体5氨基酸序列(NP\_001269488.1)
- ```

1 MVMWNILKPR THLLCMTNMF CTRHEGTDST VFLPHSHNIS EWISRRVSL DEGIYTCYVG
61 TAIQVITNKV VLKVGVLTP VMKYEKRTN SFLICSVLSV YPRPIITWKM DNTPISENNM
121 EETGSLDSFS INSPLNITGS NSSYECTIEN SLLKQWTWGR WTMKDGLHKM QSEHVSLSQ
181 PVNDYFSPNQ DFKVTWSRMK SGTFSVLAYY LSSSQNTIIN ESRFSWNKEL INQSDFSMNL
241 MDLNLSDSGE YLCNISSDEY TLLTIHTVHV EPSQETASHN KGLWILVPSA ILAAFLLIWS
301 VKCCRAQLEA RRSRHPADGA QQERCCVPPG ERCPSAPDNG EENVPLSGKV

```
- [0213]
- [0214] SEQ ID NO:11人KIR3DL3 cDNA序列(NM_153443.4,位置51-1283的CDS区)

1 tgctgctgaa ctgagctggg ggcagccgc ctgtctgcac cggcagcacc atgtcgtca
61 tggctgctcag catggcgtgt gttgggttct tcttgctgga ggggccctgg ccacatgtgg
121 gtggtcagga caagcccttc ctctctgcct ggcccggcac tgtggtgtct gaaggacaac
181 atgtgactct tcagtgtcgc tctcgtcttg ggtttaatga attcagtctg tccaaagaag
241 acgggatgcc tgtccctgag ctctacaaca gaatattccg gaacagcttt ctcatgggcc
301 ctgtgacccc agcacatgca gggacctaca gatgttgag ttcacaccca cactccccc
361 ctgggtgggc ggcacccagc aaccctgtgg tgatcatggt cacaggagtc cacagaaaac
421 cttccctcct ggcccaccca ggtcccctgg tgaaatcagg agagacggtc atcctgcaat
481 gttggtcaga tgtcagggtt gagcgcttcc ttctgcacag agaggggac actgaggacc
541 ccttgccgct cgttggacag ctccacgatg cgggttccca ggtcaactat tccatgggtc
601 ccatgacacc tgcccttgca gggacctaca gatgctttgg ttctgtcact cacttaccct
661 atgagttgtc ggctcccagt gacctctgg acatcgtggt cgtaggtcta tatgggaaac
721 cttctctctc agcccagccg ggcacccagc ttcaggcagg agagaatgtg accttgcct
781 gcagctcccg gagcttggtt gacatttacc atctatccag ggaggcggag gccggtgaac
[0215] 841 ttaggctcac tgcagtgtg agggctcaatg gaacattcca ggccaacttc cctctgggcc
901 ctgtgaccca cggagggaac tacagatgct tcggctcttt ccgtgccctg ccccatgcgt
961 ggtcagaccc gaggtagcca ctgcccgttt ctgtcacagg taactccaga aacctgcacg
1021 ttctgattgg gacctcagt gtcacatcc ctttgcctat cctcctcttc tttctccttc
1081 atcgtctgtg tgccaacaaa aagaatgctg ttgtaatgga ccaagagcct gcagggaaca
1141 gaacagtga cagggaggac tctgatgaac aagacctca ggaggtgaca tacgcacagt
1201 tgaatcactg cgttttcaca cagagaaaaa tcaactcgcc ttctcagagg cccaagacac
1261 ccccaacaga taccagcgtg taacacggaa cttccaaatg ctgagcgcag atccaaagtt
1321 gtcttctgtc cactagcacc acagtcaggc cttgatggga tcttctaggg agacaatagc
1381 cctgtctcaa aaccgggttg ccagctccca tgtaccagca gctggactct gaaggcgtga
1441 gtctgcatct tagggcatcg ctcttctca caccacgaat ctgaacatgc ctctctcttg
1501 cttacaaatg tctaaggtcc ccactgctg ctggagagaa aacacacttg cttagcccac
1561 aattctccat ttcacttgac cctgcccac ctctccaacc taactggctt acttctagt
1621 ctacttgagg ctgcgatcac actgaggaac tcacaattcc aaacatataa gaggctccct
1681 ctaaacacgg cacttagata cgtgctattc caccttctc cag

[0216] SEQ ID NO:12人KIR3DL3氨基酸序列(NP_703144.3)

1 MSLMVVSMAC VGFFLLEGPW PHVGGQDKPF LSAWPGTVVS EGQHVTLQCR SRLGFNEFSL
61 SKEDGMPVPE LYNRIFRNSF LMGPVTPAHA GTYRCCSSHP HSPTGWSAPS NPVVIMVTGV
121 HRKPSLLAHP GPLVKSGETV ILQWSDVRF ERFLHREGI TEDPLRLVGQ LHDAGSQVNY
[0217] 181 SMGPMTPALA GTYRCFGSVT HLPYELSAPS DPLDIVVGL YGKPSLSAQF GPTVQAGENV
241 TLSCSSRSFL DIYHLSREAE AGELRLTAVL RVNGTFQANF PLGPVTHGGN YRCFGSFRAL
301 PHAWSDPSPD LPVSVTGNR NLHVLIGTSV VIIPFALLF FLLHRWCANK KNAVVMQDEP
361 AGNRTVNRED SDEQDPQEVY YQNLNHCVFT QRKITRPSQR PKTPPTDTSV

[0218] *表1中包含RNA核酸分子(例如,用尿苷代替的胸腺嘧啶)、编码经编码的蛋白质的直系同源物的核酸分子,以及包括核酸序列的DNA、cDNA或RNA核酸序列,所述核酸序列与表1中列出的任何SEQ ID NO的核酸序列或其一部分在其全长上具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或更多同一性。此类核酸分子可以具有如本文进一步描述的全长核酸的功能。

[0219] *表1中包含蛋白质的直系同源物,以及包括氨基酸序列的多肽分子,所述氨基酸序列列表1中列出的任何SEQ ID NO的氨基酸序列或其一部分在其全长上具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或更多同一性。此类多肽可以具有如本文进一步描述的全长多肽的功能。

[0220] *表1中包含其它已知的HLA2和KIR3DL3核酸和氨基酸序列。

[0221] 术语“KIR3DL3活性”包含KIR3DL3多肽在激活的免疫细胞中调节抑制性信号的能力,例如通过与癌细胞上的天然HLA2配体结合。免疫细胞中抑制性信号的调节导致免疫细胞增殖和/或细胞因子分泌的调节。因此,术语“KIR3DL3活性”包含KIR3DL3多肽与其天然配

体结合的能力、调节免疫细胞抑制性信号的能力和调节免疫应答的能力。

[0222] 在一些实施例中,如癌症的病状仅对KIR3DL3阻断有应答。在其它实施例中,如癌症等病状对单独的KIR3DL3阻断有应答,但是当用KIR3DL3阻断和至少一种其它疗法组合治疗时显著或协同地更有应答。许多对KIR3DL3阻断,单独地或以组合形式,有应答的病状包含但不限于黑色素瘤(例如,晚期或转移性黑色素瘤)、肺癌(例如,非小细胞肺癌和小细胞肺癌)、乳腺癌(例如,HER-2阴性乳腺癌、雌激素受体+/HER-2-乳腺癌和三阴性乳腺癌)、胰腺癌(例如,胰腺腺癌)和霍奇金淋巴瘤(Hodgkin lymphoma)以及膀胱癌、胃癌、头颈癌、肾癌、前列腺癌、妇科癌、结直肠癌、卵巢癌、腺癌、腺癌、慢性粒细胞性白血病(CML)和血液癌症。

[0223] 优选的B7多肽能够向免疫细胞提供共刺激或抑制性信号,从而促进或抑制免疫细胞应答。例如,与共刺激受体结合的B7家族成员增加了T细胞激活和增殖,而与抑制性受体结合的B7家族成员则减少了共刺激。此外,相同的B7家族成员可以增加或减少T细胞共刺激。例如,当与共刺激受体结合时,HHLA2可以诱导免疫细胞的共刺激或者当与抑制性受体结合时,HHLA2可以抑制免疫细胞。当与抑制性受体结合时,HHLA2可以将抑制性信号传输给免疫细胞。优选的B7家族成员包含HHLA2、B7-1、B7-2、B7h、PD-L1或PD-L2及其可溶性片段或衍生物。在一个实施例中,B7家族成员与免疫细胞上的一个或多个受体结合,例如TMIGD2、KIR3DL3、CTLA4、CD28、ICOS、PD-1和/或其它受体,并且根据受体,具有将抑制性信号或共刺激信号传输给免疫细胞,优选地T细胞的能力。

[0224] 共刺激信号的调节导致免疫细胞的效应子功能的调节。因此,术语“KIR3DL3活性”包含KIR3DL3配体多肽与其天然受体(例如,HHLA2)结合的能力、调节免疫细胞共刺激或抑制性信号的能力和调节免疫应答的能力。

[0225] KIR3DL3途径是免疫功能的负调节剂,使得调节KIR3DL3与如HHLA2等一个或多个天然结合配偶体之间的相互作用可以调节免疫功能。因此,本文所描述的本公开所涵盖的直接或间接调节KIR3DL3与一个或多个天然结合配偶体之间的相互作用的药剂可以上调或下调免疫系统,从而上调或下调免疫应答。调节此类相互作用的药剂可以直接或间接地这样做。

[0226] 用于上调免疫应答的示例性药剂包含阻断HHLA2与KIR3DL3之间相互作用的针对HHLA2或KIR3DL3的抗体;非激活形式的HHLA2或KIR3DL3(例如,显性失活多肽)、阻断HHLA2与KIR3DL3之间相互作用的小分子或肽;分别与HHLA2或KIR3DL3结合并抑制HHLA2与KIR3DL3之间相互作用的融合蛋白(例如,与抗体或免疫球蛋白的Fc部分融合的HHLA2或KIR3DL3的胞外部分);阻断HHLA2和/或KIR3DL3转录或翻译的核酸分子和/或遗传修饰;非激活形式的天然HHLA2配体和可溶形式的天然KIR3DL3配体。

[0227] 在其它示例性实施例中,促进HHLA2多肽与如KIR3DL3多肽等一个或多个天然结合配偶体结合的药剂促进对免疫细胞的抑制性信号。调节此类相互作用的药剂可以直接或间接地这样做。因此,在一个实施例中,直接增强HHLA2与KIR3DL3之间相互作用的药剂(HHLA2激动剂和/或KIR3DL3激动剂)可以促进抑制性信号传导并且下调免疫应答。可替代地,阻断KIR3DL3与其它靶标结合的药剂会增加可用于与HHLA2结合的KIR3DL3的有效浓度。用于下调免疫应答的示例性药剂包含激活或促进HHLA2与KIR3DL3之间相互作用的针对HHLA2或KIR3DL3的抗体;激活或促进HHLA2与KIR3DL3之间相互作用的小分子或肽;以及分别与

HHLA2和KIR3DL3的天然结合配偶体而不是HHLA2和KIR3DL3结合的阻断抗体。

[0228] 可用于本公开所涵盖的方法的另外的药剂包含抗体、小分子、肽、肽模拟物、天然配体和天然配体的衍生物,其可以结合和/或激活或抑制本公开所涵盖的蛋白质生物标志物,所述蛋白质生物标志物包含表1中列出的生物标志物或其片段;可以下调本公开所涵盖的生物标志物的表达和/或活性的RNA干扰、反义、核酸适体等,包含表1中列出的生物标志物或其片段。

[0229] 提供了针对KIR3DL3的分离的单克隆抗体或其片段。在一些实施例中,由杂交瘤产生的mAb已根据布达佩斯条约 (Budapest Treaty) 的条款保藏在美国典型培养物保藏中心 (American Type Culture Collection, ATCC) _____, 保藏号为_____。

[0230] 由于本领域众所周知抗体重链和轻链CDR3结构域在抗体对抗原的结合特异性/亲和力中起特别重要的作用,因此如上所述制备的本公开所涵盖的重组单克隆抗体优选地包括本公开所涵盖的可变区的重链和轻链CDR3 (例如,包含表2的序列或其部分)。抗体进一步可以包括本公开所涵盖的可变区的CDR2 (例如,包含表2的序列或其部分)。抗体进一步可以包括本公开所涵盖的可变区的CDR1 (例如,包含表2的序列或其部分)。在其它实施例中,抗体可以包括CDR的任何组合。

[0231] 上文所描述的工程化抗体的CDR1、2和/或3区可以包括与本文所描述的本公开所涵盖的可变区的那些完全相同的氨基酸序列 (例如,包含表2的序列或其部分)。然而,普通技术人员将理解,在仍保留抗体与KIR3DL3有效结合的能力 (例如,保守序列修饰) 的同时,与确切的CDR序列有一些偏差是可能的。因此,在另一个实施例中,工程化抗体可以由一个或多个CDR构成,例如与本公开涵盖的一个或多个CDR具有例如50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%同一性的一个或多个CDR (例如,包含表2的序列或其部分)。

[0232] 已知的非人或人抗体 (例如,小鼠或非啮齿动物抗人KIR3DL3抗体) 的结构特征可以用于产生结构相关的人抗人KIR3DL3抗体,所述抗体保留本公开所涵盖的抗体的至少一种功能特性,如与KIR3DL3结合。另一个功能特性包含在竞争ELISA测定中抑制原始已知的非人或人抗体的结合。

[0233] 在一些实施例中,提供了能够与人KIR3DL3结合的单克隆抗体,所述单克隆抗体包括重链,其中可变结构域包括至少一个CDR,所述CDR的序列与表2中呈现的一组重链可变结构域CDR有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性。

[0234] 类似地,还提供了能够与人KIR3DL3结合的单克隆抗体,所述单克隆抗体包括轻链,其中可变结构域包括至少一个CDR,所述CDR的序列与表2中呈现的一组轻链可变结构域CDR有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性。

[0235] 还提供了能够与人KIR3DL3结合的单克隆抗体,所述单克隆抗体包括重链,其中可变结构域包括至少一个CDR,所述CDR的序列与表2中呈现的一组重链可变结构域CDR有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性;并且所述单克隆抗体包括轻链,其中可变结构域包括至少一个CDR,所述CDR的序列与表2中呈现的一组轻链可变结构域CDR有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、

96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性。

[0236] 熟练的技术人员将注意到,此类百分比同源性等同于并且可以通过在给定CDR内引入1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个保守氨基酸取代来实现。

[0237] 本公开所涵盖的单克隆抗体可以包括重链,其中可变结构域包括至少一个CDR,所述CDR具有选自由表2中呈现的重链可变结构域CDR和轻链组成的组的序列,其中可变结构域包括至少一个CDR,所述CDR具有选自由表2中呈现的轻链可变结构域CDR组成的组的序列。

[0238] 此类单克隆抗体可以包括轻链,其中可变结构域包括至少一个CDR,所述CDR具有选自由CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3组成的组的序列,如本文所描述;和/或包括重链,其中可变结构域包括至少一个CDR,所述CDR具有选自由CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3组成的组的序列,如本文所描述。在一些实施例中,能够与人KIR3DL3结合的单克隆抗体包括CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3或由其组成,如本文所描述。

[0239] 本公开所涵盖的单克隆抗体的重链可变域可以包括表2所示的vH氨基酸序列或由其组成和/或本公开所涵盖的单克隆抗体的轻链可变结构域可以包括表2所示的vL氨基酸序列或由其组成。

[0240] 本公开所涵盖的单克隆抗体可以通过本领域熟知的任何技术产生和修饰。例如,此类单克隆抗体可以是鼠或非啮齿动物抗体,如可从保藏在_____的杂交瘤中获得的那些抗体,ATCC作为存放点_____。类似地,此类单克隆抗体可以是嵌合的,优选地嵌合的小鼠/人抗体。在一些实施例中,单克隆抗体是人源化抗体,使得可变结构域包括人受体框架区和任选地存在的人恒定结构域,以及非人供体CDR如上文定义的小鼠或非啮齿动物CDR。

[0241] 本公开进一步提供了所述单克隆抗体的片段,所述单克隆抗体包含但不限于Fv、Fab、F(ab')₂、Fab'、dsFv、scFv、sc(Fv)₂和双抗体;以及从抗体片段形成的多特异性抗体。例如,可以以双特异性或多特异性方式检测许多免疫抑制分子如HHLA2、PD-L2、PD-L1、CTLA-4、KIR3DL3等,以有效表征此类分子的表达。

[0242] 还考虑了本公开所涵盖的单克隆抗体的其它片段。例如,提供了单独的免疫球蛋白重链和/或轻链,其中其可变结构域包括至少一个表2呈现的CDR。在一个实施例中,免疫球蛋白重链包括至少一个CDR,所述CDR的序列与表2中呈现的一组重链或轻链可变结构域CDR有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性。在另一个实施例中,免疫球蛋白轻链包括至少一个CDR,所述CDR的序列与(例如,表2中呈现的)本文所描述的一组轻链或重链可变结构域CDR有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性。

[0243] 在一些实施例中,免疫球蛋白重链和/或轻链包括可变结构域,所述可变结构域包括本文所描述的CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2或CDR-H3中的至少一种。此类免疫球蛋白重链可以包括CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3中的至少一种或由其组成。此类免疫球蛋白轻链可以包括CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3中的至少一种或由其组成。

[0244] 在其它实施例中,根据本公开的免疫球蛋白重链和/或轻链分别包括表2中提供的vH或vL可变结构域序列或由其组成。

[0245] 本公开进一步提供了具有序列的多肽,所述序列选自由以下组成的组:本文所描述的vH可变结构域、vL可变结构域、CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列。

[0246] 本公开所涵盖的抗体、免疫球蛋白和多肽可以以分离的(例如,纯化的)形式使用或包含在载体中,如膜或脂质囊泡(例如,脂质体)。

[0247] 表2:包含mAbs 1C7、1D12、1G7、2A3、2D8、2F11、2H1、8C2和8F7的抗KIR3DL3单克隆抗体的代表性可变区的特征和序列

[0248]	小鼠抗人 KIR3DL3 mAb	用于增强 IL-2 荧光素酶的 Jurkat 测定	HHLA2 结合的阻断	同型
	574.2.1C7	增强子	阻断剂	IgG1
	574.2.1D12	ND 补充剂	阻断剂	IgG2a
	574.2.1G7	强增强子	阻断剂	IgG2b
	574.2.2A3	ND 补充剂	非阻断剂	IgG1
	574.2.2D8	强增强子	阻断剂	IgG2b
	574.2.2F11	强增强子	阻断剂	IgG2b
	574.2.2H1	强增强子	阻断剂	IgG2b
	574.2.8C2	ND 补充剂	阻断剂	IgG2a
	574.2.8F7	非增强子	非阻断剂	IgG1

[0249] 1C7重链可变(vH)和轻链可变(vL)DNA和氨基酸序列*

[0250] AVS-3698HC[574.2.1C7.D2.6.5重链]

[0251]	区	序列片段	残基	长度
	HFR1	QVQLQQSGAELMKPGASVKISKAT	1 - 25	25
	CDR-H1	GYTFSNY	26 - 32	7
	HFR2	WIEWIKQRPBGHGLEWIGEI	33 - 51	19
	CDR-H2	LPGSGS	52 - 57	6
	HFR3	TNYNEKFKGKATFTAATSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCAR	58 - 98	41
	CDR-H3	RVPDYYSRYYFDY	99 - 112	14
	HFR4	WGQGTTTLTVSS	113 - 123	11

[0252] AVS-3698LC[574.2.1C7.D2.6.5轻链]

[0253]	区	序列片段	残基	长度
	LFR1	NIVMTQSPKSMMSGVGERVTLSC	1-23	23
	CDR-L1	KASENVIYVS	24-34	11
	LFR2	WYQQKPEQSPKLLIY	35-49	15
	CDR-L2	GASNRYT	50-56	7
	LFR3	GVPDRFTGSGSATDFTLTISSVQAEDLADYHC	57-88	32
	CDR-L3	GQSYNYPFT	89-97	9
	LFR4	FGSGTKLEIK	98-107	10

[0254]

SR 连接	AVS 连接	客户样品名称	LP 样品名称	链类型	CDR-1	CDR-2	CDR-3
SR-14910	AVS-3698	574.2.1C7.D2.6.5	AVS-3698HC.3	HC	GYTFSNY	LPGSGS	RVPDYYGSRY YFDY
蛋白质序列			核苷酸序列				
QVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSNYWIEWIKQRPGLGLEWIGEILPGSGSTNYNEKFKGKATFTAATSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARRVPDYYGSRY YFDYWGQGTTTLTVSS			CAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGATGAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTACTGGCTACACATTCAGTAAGTACTGGATAGAGTGGATAAAGCAGAGGCCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTACCTGGAAGTGGTAGTACTAACTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACATTCACTGCACTACATCCTCCAACACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTGCAAGAAGGGTCCCTGATTACTACGGTAGTAGGTACTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA				

[0255]

SR 连接	AVS 连接	客户样品名称	LP 样品名称	链类型	CDR-1	CDR-2	CDR-3
SR-14910	AVS-3698	574.2.1C7.D2.6.5	AVS-3698LCP.4	LC	KASENVGIYVS	GASNRYT	GQSYNYPFT

[0256]

蛋白质序列			核苷酸序列				
NIVMTQSPKSMMSVGERVTLCKASENVGIYVSWYQQKPEQSPKLLIYGASNRYTGVPDRFTGSGSATDFTLTISVQAEDLADYHCGQSYNYPFTFGSGTKLEIK			AACATTGTAATGACCCAATCTCCCAAATCCATGTCCATGTCAGTAGGAGAGAGGGTCACCTTGAGCTGCAAGGCCAGTGAGAATGTGGGTATTTACGTATCCTGGTATCAACAGAAACCAGAGCAGTCTCCTAACTACTAATATACGGGGCATCCAACCGATACACTGGGGTCCCCGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGCAACAGATTTCACTCTGACCATCAGCAGTGTGCAGGCTGAAGACCTTGCA GATTATCACTGTGGACAGAGTTACAACCTATCCATTCA CGTTCGGCTCGGGGACAAAGTTGGAAATCAAA				

[0257] 2A3重链可变 (vH) 和轻链可变 (vL) DNA和氨基酸序列*

[0258] AVS-3699HC[574.2.2A3.5.9重链]

[0259]

区	序列片段	残基	长度
HFR1	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKAS	1 - 25	25
CDR-H1	GYTFTSY	26 - 32	7
HFR2	VMHWLQKPGQGLEWIAIYI	33 - 51	19
CDR-H2	NPYNDG	52 - 57	6
HFR3	TKYNENFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCAR	58 - 98	41
CDR-H3	PSMVTAAWFAY	99 - 109	11
HFR4	WGQGTTLTVSA	110 - 120	11

[0260] AVS-3699LC[574.2.2A3.5.9轻链]

[0261]

区	序列片段	残基	长度
LFR1	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISC	1-23	23
CDR-L1	RSSQNLAHSNGDTYLH	24-39	16
LFR2	WYLQKPGQSPKLLIY	40-54	15
CDR-L2	KVSNRFS	55-61	7

LFR3	GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYFC	62-93	32
CDR-L3	SQTTHVLWT	94-102	9
LFR4	FGGGTKLEIK	103-112	10

[0262]	SR 连接	AVS 连接	客户样品名称	LP 样品名称	链类型	CDR-1	CDR-2	CDR-3
	SR-14910	AVS-3699	574.2.2A3.5.9	AVS-3699HC.1	HC	GYTFTSY	NPYNDG	PSMVTAAWFAY
	蛋白质序列			核苷酸序列				

[0263]	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVMHWLQKPGQGLEWIAVINPYNDGTKYNENFKGKATLTSDKSSSTAYMELSSLTSEDSAVYYCARPSMVTAAWFAYWGQGTILVTVSA	GAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTAAAGCCTGGGGCTTCAGTGAAGATGCTCTGCAAGGCTTC TGGATACACATTCAGTATGTCATGCACTGGTTGAAGCAGAAGCCTGGGCAGGGCCTTGAGTGGATTGCATATTAATCCTTACAATGATGGTACTAAGTACAATGAGAACTTCAAAGGCAAGGCCACACTGACTTCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATGGAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTACTGTGCAAGACCTAGTATGGTAACTGCCGCCTGGTTTGCTTACTGGGGCCAAGG GACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
--------	--	--

[0264]

SR 连接	AVS 连接	客户样品名称	LP 样品名称	链类型	CDR-1	CDR-2	CDR-3
SR-14910	AVS-3699	574.2.2A3.5.9	AVS-3699LCP.1	LC	RSSQNLAHSNGDTYLH	KVSNRFS	SQTTHVLWT
蛋白质序列			核苷酸序列				
DVVMTQTPLSLPVSLGDQAS ISCRSSQNLAHSNGDTYLHW YLQKPGQSPKLLIYKVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDLG VYFCSQTTHVLWT FGGGTKLEIK			GATGTTGTGATGACCCAACTCCACTCTCCCTGCCTGT CAGTCTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCCTGCAGATCTA GTCAGAACCTTGACACAGTAATGGAGACACCTATTTA CATTGGTACCTGCAGAAGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCT CCTGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCC CAGACAGGTTTCAGTGGCAGTGGATCAGGGACAGATTT CACACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAGGATCTG GGAGTTTATTTCTGCTCTCAAACCTACACATGTTTTGTGG ACGTTTCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA				

[0265] 8F7重链可变 (vH) 和轻链可变 (vL) DNA和氨基酸序列*

[0266] AVS-3700HC[574.2.8F7.1.7.4重链]

[0267]	区	序列片段	残基	长度
	HFR1	DVKLVESGGGLVKPGGSLKLSCAAS	1 - 25	25
	CDR-H1	GFTFSSY	26 - 32	7
	HFR2	CMSWVRQTPEKRLEWVATI	33 - 51	19
	CDR-H2	SSGGNY	52 - 57	6
	HFR3	IYYPDSVKGRFTISRDIKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCTR	58 - 98	41
	CDR-H3	GGYDERYFDY	99 - 108	10
	HFR4	WGQGTILTVSS	109 - 119	11

[0268] AVS-3700LC[574.2.8F7.1.7.4轻链]

区	序列片段	残基	长度
LFR1	DIQMTQSPASLSASVGETVTITC	1 - 23	23
[0269] CDR-L1	RASENIYSYLA	24 - 34	11
LFR2	WYQQKQKGKSPQLLVY	35 - 49	15
CDR-L2	NAKLTLE	50 - 56	7
LFR3	GMPSRFSGSGSGTQFSLRINSLQPEDFGSYYC	57 - 88	32
[0270] CDR-L3	QHHHGTPT	89 - 97	9
LFR4	FGGGTKLEIK	98 - 107	10

SR 连接	AVS 连接	客户样品名称	LP 样品名称	链类型	CDR-1	CDR-2	CDR-3
SR-14910	AVS-3700	574.2.8F7.1.7.4	AVS-3700HC.2	HC	GFTFSSY	SSGGNY	GGYDERYFDY
蛋白质序列			核苷酸序列				
DVKLVESGGGLVKPGGSLKL SCAASGFTFSSYCMSWVRQT PEKRLEWVATISSGGNYIYYP DSVKGRFTISRDIKNTLYLQ MSSLKSEDTAMYYCTRGGY DERYFDYWGQGTILTVSS			GACGTGAAGTTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGA AACCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCCTGTGCAGCCTC TGGATTCACTTTCAGTTCCTATTGCATGTCTTGGGTTCG CCAGACTCCGAGAGAAGAGGCTGGAGTGGGTGCGCAAC CATTAGTAGTGGTGGTAATTACATCTACTATCCGGACAG TGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACATTGCCA AGAACACCTGTACCTGCAAATGAGCAGTCTGAAGTC TGAGGACACAGCCATGTATTACTGTACAAGAGGGGGTT ACGACGAGAGGTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGCAC CATTCTCACAGTCTCCTCA				

SR 连接	AVS 连接	客户样品名称	LP 样品名称	链类型	CDR-1	CDR-2	CDR-3
SR-14910	AVS-3700	574.2.8F7.1.7.4	AVS-3700LCP.3	LC	RASENIYSYLA	NAKLTLE	QHHHGTPT
蛋白质序列			核苷酸序列				
DIQMTQSPASLSASVGETVTIT CRASENIYSYLAWYQQKQK SPQLLVYNAKLTLEGMPSRFS GSGSGTQFSLRINSLQPEDFGS YYCQHHHGTPTFGGGTKLEIK			GACATCCAGATGACTCAGTCTCCAGCCTCCCTTTCTG CTTCTGTGGGAGAACTGTCACCATCACATGTCGAGC AAGTGAAAATATTTACAGTTATTTAGCATGGTATCAGC AGAAACAGGGAAAATCTCCTCAGCTCCTGGTCTATAA TGCAAAAACCTTAACAGAAGGTATGCCATCAAGGTTT AGTGGCAGTGGATCAGGTACACAGTTTCTCTGAGGA TCAATAGCCTGCAGCCTGAAGATTTGGGAGTTATTAC TGTC AACATCATCATGGTACTCCTCGGACGTTTCGGTG GAGGCACCAAGTTGGAAATCAA				

[0273] 1G7重链可变 (vH) 和轻链可变 (vL) DNA和氨基酸序列*

[0274] AVS-3701HC[574.2.1G7.9.9重链]

区	序列片段	残基	长度
HFR1	ELKLEESGGGLVQPGGSMKLSCVAS	1 - 25	25
CDR-H1	GFTFSNY	26 - 32	7
HFR2	WMNWVRQSPEKGLEWIAEI	33 - 51	19
CDR-H2	RLKSNNYA	52 - 59	8
HFR3	THYAESVKGRFTISRDDSKSSVYLQMNNLRAEDTGIFYCTP	60 - 100	41
CDR-H3	FYGSSFPY	101 - 108	8
HFR4	WGQGTILTVSA	109 - 119	11

[0276] AVS-3701LC[574.2.1G7.9.9轻链]

区	序列片段	残基	长度
LFR1	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISC	1-23	23
CDR-L1	RASQDISNYLN	24-34	11
LFR2	WYQQKPDGTVKLLIY	35-49	15
CDR-L2	YTSILQL	50-56	7
LFR3	GVPPRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFC	57-88	32
CDR-L3	QQGNTLPFT	89-97	9
LFR4	FGAGTKVELK	98-107	10

SR 连接	AVS 连接	客户样品名称	LP 样品名称	链类型	CDR-1	CDR-2	CDR-3
SR-14910	AVS-3701	574.2.1G7.9.9	AVS-3701HCT.2	HC	GFTFSNY	RLKSNNYA	FYGSSFPY
蛋白质序列			核苷酸序列				
ELKLEESGGGLVQPGGSMK LSCVASGFTFSNYWMNWVR QSPEKGLEWIAEIRLKSNNY ATHYAESVKGRFTISRDDSK SSVYLQMNLR AEDTGIFYC TPFYGSSFPYWGQGLTVTS A			GAACTGAAGCTTGAGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTGCA AACCTGGAGGATCCATGAACTCTCCTGTGTGCTGCCTCT GGATTCACCTTTCAGTAACTACTGGATGAACTGGGTCCGC CAGTCTCCAGAGAAGGGGCTTGAATGGATTGCTGAAAT TAGATTGAAATCTAATAATTATGCAACACATTATGCGGA GTCTGTGAAAGGGAGGTTCAACATCTCAAGAGATGATT CCAAAAGTAGTGTCTACCTACAGATGAACAACTTAAGA GCTGAAGACACTGGCATTCTTTTACTGTACCCCTTCTAC GGTAGTTCTTTTCTTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTC ACTGTCTCTGCA				

SR 连接	AVS 连接	客户样品名称	LP 样品名称	链类型	CDR-1	CDR-2	CDR-3
SR-14910	AVS-3701	574.2.1G7.9.9	AVS-3701LCP.2	LC	RASQDISNYLN	YTSILQL	QQGNTLPFT
蛋白质序列			核苷酸序列				
DIQMTQTTSSLSASLGDRVTI SCRASQDISNYLNWYQQKP DGTVKLLIYYTSILQLGVPP RFSGSGSGTDYSLTISNLEQE DIATYFCQQGNTLPFTFGAG TKVELK			GATATCCAGATGACACAGACTACATCGTCCCTGTCTGCC TCTCTGGGAGACAGAGTCACCATCAGTTGCAGGGCAAG TCAGGACATTAGCAATTACTTAACTGGTATCAGCAGAA ACCAGATGGAAGTGTAACTCCTTATCTATTACACATC AATATTACAATTAGGAGTCCCGCCAAGGTTCAAGTGCA GTGGGTCTGGAACAGATTATTCTCTCACCATTAGCAACC TGGAGCAAGAAGATATTGCCACTTACTTTTGCCAACAG GGTAATACGTTCCGTTACGTTTCGGTGCTGGGACCAA GGTGGAGCTGAAA				

[0280] 2D8重链可变 (vH) 和轻链可变 (vL) DNA和氨基酸序列*

[0281] AVS-3702HC[574.2.2D8.6.9重链]

区	序列片段	残基	长度
HFR1	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSAAS	1-25	25

[0283]	CDR-H1	GFTFSYF	26 - 32	7
	HFR2	GMHWVRRRAPEKGLEWVAFI	33 - 51	19
	CDR-H2	SSDSTT	52 - 57	6
	HFR3	IYYTDTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDTAIYYCAR	58 - 98	41
	CDR-H3	FYDGAMDY	99 - 106	8
	HFR4	WGQGTSVTVST	107 - 117	11

[0284] AVS-3702LC[574.2.2D8.6.9轻链]

[0285]	区	序列片段	残基	长度
	LFR1	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITC	1-23	23
	CDR-L1	KASQSVRTAVA	24-34	11
	LFR2	WYQQKPGQSPKVLIIY	35-49	15
	CDR-L2	LASNRHT	50-56	7
	LFR3	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFC	57-88	32
	CDR-L3	LQHWNYPLT	89-97	9
	LFR4	FGAGTKLELK	98-107	10

[0286]	SR 连接	AVS 连接	客户样品名称	LP 样品名称	链类型	CDR-1	CDR-2	CDR-3
	SR-14910	AVS-3702	574.2.2D8.6.9	AVS-3702HC.2	HC	GFTFSYF	SSDSTT	FYDGAMDY
	蛋白质序列			核苷酸序列				
	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSYFGMHVRRRAPEKGLEWVAFISSDSTTIYYTDTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDTAIYYCARFYDGAMDYWGQGTSVTVST			GATGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGCAGCCTGGAGGGTCCCGAAACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTCACTTTCAGTTACTTTGGAATGCACTGGGTTCGTCGGGCTCCAGAGAAGGGGCTGGAGTGGTTCGATTCACTAGTAGTGACAGTACTACCATCTACTATACAGACACAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATCCCAAGAACACCCGTGTTCTGCAATGACCAGTCTAAGGTCTGAGGACACGGCCATATATTA CTGTGCAAGATTTTACGACGGTGCTATGGACTACTGGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCACA				

[0287]	SR 连接	AVS 连接	客户样品名称	LP 样品名称	链类型	CDR-1	CDR-2	CDR-3
	SR-14910	AVS-3702	574.2.2D8.6.9	AVS-3702LCP.5	LC	KASQS VRTAVA	LASNRHT	LQHWNYPLT
	蛋白质序列			核苷酸序列				

[0288]	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITC KASQSVRTAVAWYQQKPGQSPK VLIYLASNRHTGVPDRFTGSGSG TDFTLTISNVQSEDLADYFCLQH WNYPLTFGAGTKLELK				GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCC ACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCACCTGCAA GGCCAGTCAGAGTGTTCTGACTGCTGTAGCCTGGTA TCAACAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAAGTATTGA TTTACTTGGCATCCAACCGGCACACTGGAGTCCCTG ATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGACAGACTTC ACTCTCACCATTAGCAATGTGCAATCTGAAGACCTG GCAGATTATTTCTGTCTTCAACATTGGAATTATCCTC TCACGTTCTGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA			

[0289] 2F11重链可变 (vH) 和轻链可变 (vL) DNA和氨基酸序列*

[0290] AVS-3703HC[574.2.2F11.2.7.4重链]

区	序列片段	残基	长度
HFR1	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAAS	1 - 25	25
CDR-H1	GFTFSYF	26 - 32	7
HFR2	GMHWVRRRAPEKGLEWVAFI	33 - 51	19
CDR-H2	SSDSTT	52 - 57	6
HFR3	IYYTDTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDTAIYYCAR	58 - 98	41
CDR-H3	FYDGAMDY	99 - 106	8
HFR4	WGQGTSVTVST	107 - 117	11

[0292] AVS-3703LC[574.2.2F11.2.7.4轻链]

[0293]

区	序列片段	残基	长度
LFR1	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITC	1-23	23
CDR-L1	KASQSVRTAVA	24-34	11
LFR2	WYQQKPGQSPKVLIIY	35-49	15
CDR-L2	LASNRHT	50-56	7
LFR3	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLADYFC	57-88	32
CDR-L3	LQHWNYPLT	89-97	9
LFR4	FGAGTKLELK	98-107	10

[0294]

SR 连接	AVS 连接	客户样品名称	LP 样品名称	链类型	CDR-1	CDR-2	CDR-3
SR-14910	AVS-3703	574.2.2F11.2.7.4	AVS-3703HCT.2	HC	GFTFSYF	SSDSTT	FYDGAMDY
蛋白质序列			核苷酸序列				

[0295]

DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAA SGFTFSYFGMHVRRRAPEKGLEW VAFISSDSTTIYYTDTVKGRFTISR NPKNTLFLQMTSLRSEDTAIYYCA RFYDGAMDYWGQGTSVTVST	GATGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAG TGCAGCCTGGAGGGTCCCGGAAACTCTCCTGTGC AGCCTCTGGATTCACTTTCAGTTACTTTGGAATGC ACTGGGTTCGTCGGGCTCCAGAGAAGGGGCTGG AGTGGGTCGCATTCATTAGTAGTGACAGTACTACC ATCTACTATACAGACACAGTGAAGGGCCGATTCA CCATCTCCAGAGACAATCCCAAGAACACCCTGTT CCTGCAAATGACCAGTCTAAGGTCTGAGGACACG GCCATATATTACTGTGCAAGATTTTACGACGGTGC TATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAGTCACC GTCTCCACA
--	---

SR 连接	AVS 连接	客户样品名称	LP 样品名称	链类型	CDR-1	CDR-2	CDR-3
SR-14910	AVS-3703	574.2.2F11.2.7.4	AVS-3703LCT.2	LC	KASQS VRTAVA	LASNRHT	LQHWNYPLT
蛋白质序列			核苷酸序列				
[0296]	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITCK		GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTC				
	ASQSVRTAVAWYQQKPGQSPKVL		CACATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCACCTGC				
	YLASNRHTGVPDRFTGSGSGTDF		AAGGCCAGTCAGAGTGTTTCGTACTGCTGTAGCCT				
	LTISNVQSEDLADYFCLQHWNYPL		GGTATCAACAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAAGT				
	TFGAGTKLELK		ATTGATTTACTTGGCATCCAACCGGCACACTGGAG				
			TCCCTGATCGCTTCACAGGCAGTGGATCTGGGAC				
			AGACTTCACTCTCACCATTAGCAATGTGCAATCTG				
			AAGACCTGGCAGATTATTTCTGTCTTCAACATTGG				
			AATTATCCTCTCACGTTCCGGTGCTGGGACCAAGCT				
			GGAGCTGAAA				

[0297] 2H1重链可变 (vH) 和轻链可变 (vL) DNA和氨基酸序列*

[0298] AVS-3704HC[574.2.2H1.11.6重链]

区	序列片段	残基	长度
HFR1	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAAS	1 - 25	25
CDR-H1	GFTFSYF	26 - 32	7
HFR2	GMHWVRRRAPEKGLEWVAFI	33 - 51	19
CDR-H2	SSDSTT	52 - 57	6
HFR3	IYYTDTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDTAIYYCAR	58 - 98	41
CDR-H3	FYDGAMDY	99 - 106	8
HFR4	WGQGTSVTVST	107 - 117	11

[0300] AVS-3704LC[574.2.2H1.11.6轻链]

区	序列片段	残基	长度
LFR1	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITC	1 - 23	23
CDR-L1	KASQSVRTAVA	24 - 34	11
LFR2	WYQQKPGQSPKVLII	35 - 49	15
CDR-L2	LASNRHT	50 - 56	7
LFR3	GVPDRFTGSGSGTDFLTISNVQSEDLADYFC	57 - 88	32
CDR-L3	LQHWNYPLT	89 - 97	9
LFR4	FGAGTKLELK	98 - 107	10

[0303]

SR 连接	AVS 连接	客户样品名称	LP 样品名称	链类型	CDR-1	CDR-2	CDR-3
SR-14910	AVS-3704	574.2.2H1.11.6	AVS-3704HCT.1	HC	GFTFSYF	SSDSTT	FYDGAMDY
蛋白质序列			核苷酸序列				
DVQLVESGGGLVQPGGSRKLS CAASGFTFSYFGMHWVRRAP EKGLEWVAFISSDSTTIYYTDT VKGRFTISRDNPKNTLFLQMT SLRSEDTAIYYCARFYDGAMD YWQGQTSVTVST			GATGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTG CAGCCTGGAGGGTCCCGGAAACTCTCCTGTGCAGCCT CTGGATTCACTTTTCAGTTACTTTGGAATGCACTGGGTT CGTCGGGCTCCAGAGAAGGGGCTGGAGTGGGTCGCA TTCATTAGTAGTGACAGTACTACCATCTACTATACAGA CACAGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAAT CCCAAGAACACCCTGTTCTGCAAATGACCAGTCTAA GGTCTGAGGACACGGCCATATATTACTGTGCAAGATTT TACGACGGTGCTATGGACTACTGGGGTCAAGGAACCT CAGTCACCGTCTCCACA				

[0304]

SR 连接	AVS 连接	客户样品名称	LP 样品名称	链类型	CDR-1	CDR-2	CDR-3
SR-14910	AVS-3704	574.2.2H1.11.6	AVS-3704LCP.5	LC	KASQSVR TAVA	LASNRHT	LQHWNYPLT
蛋白质序列			核苷酸序列				
DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSI TCKASQSVRTAVAWYQKPG QSPKVLIIYLASNRHTGVPDRF TGSGSGTDFTLTISNVQSEDLA DYFCLQHWNYPLTFGAGTKL ELK			GACATTGTGATGACCCAGTCTCAAAAATTCATGTCCAC ATCAGTAGGAGACAGGGTCAGCATCACCTGCAAGGCC AGTCAGAGTGTTCTGACTGCTGTAGCCTGGTATCAAC AGAAACCAGGACAGTCTCCTAAAGTATTGATTACTTG GCATCCAACCGGCACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCA CAGGCAGTGGATCTGGGACAGACTTCACTCTACCAT TAGCAATGTGCAATCTGAAGACCTGGCAGATTATTCT GTCTTCAACATTGGAATTATCCTCTCACGTTTCGGTGCT GGGACCAAGCTGGAGCTGAAA				

[0305] 1D12重链可变 (vH) 和轻链可变 (vL) DNA和氨基酸序列*

[0306] AVS-3705HC[574.2.1D12.1.6重链]

[0307]

区	序列片段	残基	长度
HFR1	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSKAS	1 - 25	25
CDR-H1	GYAFNNY	26 - 32	7
HFR2	LIEWVKQRPQGQGLEWIGVI	33 - 51	19
CDR-H2	NPGSGG	52 - 57	6
HFR3	TNDNEKFRGKATLTADTSSSTAYMQLTSLTSDDSAVYFCAR	58 - 98	41

[0308]

CDR-H3	GNYYGTRDWYFDV	99 - 111	13
HFR4	WGAGTTVTVSS	112 - 122	11

[0309] AVS-3705LC[574.2.1D12.1.6轻链]

[0310]

区	序列片段	残基	长度
LFR1	QIVLTQSPAISASLGARVTMTCT	1 - 23	23
CDR-L1	TASSSVSSSLH	24 - 35	12
LFR2	WYQQKPGSSPKLWIY	36 - 50	15
CDR-L2	SISSLAS	51 - 57	7

LFR3	GVPARFSGSGSGTSYSLTISSELEAEDAATYYC	58-89	32
CDR-L3	HQYHRSPPT	90-98	9
LFR4	FGGGTKLEIK	99-108	10

[0311]

SR 连接	AVS 连接	客户样品名称	LP 样品名称	链类型	CDR-1	CDR-2	CDR-3
SR-14910	AVS-3705	574.2.1D12.1.6	AVS-3705HCT.2	HC	GYAFNNY	NPGSGG	GNYYGTRDWYFDV
蛋白质序列			核苷酸序列				
QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCASGYAFNNYLIEWVKQRPGQGLEWISVINPQSGGTNDNEKFRGKATLTADTSSSTAYMQLTSLTSDDSAVYFCARGNYYGTRDWYFDVWGAGTTVTVS			CAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTGTAAAGGCCTGGGACTTCAGTGAAGGTGTCCTGCAGGCTTCTGGATACGCCTCAATAATTACTTGATAGAGTGGGTAAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCCTTGAGTGGATTGGAGTGATCAATCCTGGAAGTGTGGTACTAACGACAATGAGAAGTTCAGGGGCAAGGCTACCCTGACTGCAGACACATCCTCCAGCACTGCCTACATGCAGCTCACCAGCCTGACATCTGATGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGGGAATTACTACGGTACTCGCGACTGGTACTTCGATGTCTGGGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCCTCA				

[0312]

SR 连接	AVS 连接	客户样品名称	LP 样品名称	链类型	CDR-1	CDR-2	CDR-3
SR-14910	AVS-3705	574.2.1D12.1.6	AVS-3705LCP.2	LC	TASSSVSSSLH	SISSLAS	HQYHRSPPT
蛋白质序列			核苷酸序列				
QIVLTQSPAISASLGARVTMTCTASSSVSSSLHWYQKPGSSPKLWIYSISSLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSELEAEDAATYYCHQYHRSPPTFGG			CAAATTGTTCTCACCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCTAGGGGCACGGGTCAACATGACCTGCACTGCCAGCTCAAGTGTAAGTTCAGTTCCTTGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCTCCCCAACTCTGGATTTATAGTATATCCAGCCTGGCTCTGGAGTCCCAGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAGCTTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCACCAGTATCATCGCTCCCCACCGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAA				

[0313] 8C2重链可变 (vH) 和轻链可变 (vL) DNA和氨基酸序列*

[0314] AVS-3706HC[574.2.8C2.12.3.10重链]

[0315]

区	序列片段	残基	长度
HFR1	KVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCAS	1 - 25	25
CDR-H1	GYAFTNY	26 - 32	7
HFR2	LIEWVKQRPGQGLEWIGVI	33 - 51	19
CDR-H2	NPGSGG	52 - 57	6
HFR3	TNDNEKFRDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCAR	58 - 98	41
CDR-H3	GNYYGTTDWYFDV	99 - 111	13
HFR4	WGAGTTVTVSS	112 - 122	11

[0316] AVS-3706LC[574.2.8C2.12.3.10轻链]

[0317]

区	序列片段	残基	长度
LFR1	QIVLTQSPAISASLGERVTMTCT	1-23	23

CDR-L1	TASASVSSSSLH	24-35	12
LFR2	WYQQKPGSPPKFWIY	36-50	15
CDR-L2	STTNLAS	51-57	7
LFR3	GVPTRFSGSGSGTSYSLTISNMEAEDAATYYC	58-89	32
CDR-L3	HQYHRSPPT	90-98	9
LFR4	FGGGTKLEIK	99-108	10

[0318]

SR 连接	AVS 连接	客户样品名称	LP 样品名称	链类型	CDR-1	CDR-2	CDR-3
SR-14910	AVS-3706	574.2.8C2.12.3.10	AVS-3706HCT.1	HC	GYAFTNY	NPGSGG	GNYYGTTDWYFDV
蛋白质序列			核苷酸序列				
KVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCKA SGYAFTNYLIEWVKQRPQGLEWI GVINPGSGGTNDNEKFRDKATLTAD KSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYFCAR GNYYGTTDWYFDVWGAGTTVTVS S			AAGGTCCAGCTGCAGCAGTCTGGAGCTGAGCTG GTAAGGCCTGGGACTTCAGTGAAGGTGTCCTGC AAGGCTTCTGGATACGCCTTCACTAATTATTGAT AGAGTGGGTAAAGCAGAGGCCTGGACAGGGCC TTGAGTGGATTGGAGTGATTAATCCTGGAAGTGG TGGTACTAATGACAATGAGAAGTTCAGGGACAA GGCAACATTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCAC TGCCTACATGCAGCTCAGCAGCCTGACATCTGAT GACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGAGGGAATT ACTACGGTACTACCGACTGGTACTTCGATGTCTG GGGCGCAGGGACCACGGTCACCGTCTCTCTCA				

[0319]

SR 连接	AVS 连接	客户样品名称	LP 样品名称	链类型	CDR-1	CDR-2	CDR-3
SR-14910	AVS-3706	574.2.8C2.12.3.10	AVS-3706LCP.1	LC	TASASV SSSSLH	STTNLAS	HQYHRSPPT
蛋白质序列			核苷酸序列				

[0320]

QIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTAS ASVSSSSLHWYQQKPGSPPKFWIYS TTNLASGVPTRFSGSGSGTSYSLTIS NMEAEDAATYYCHQYHRSPPTFGG GTKLEIK			CAAATTGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGT CTGCATCTCTAGGGGAACGGGTACCATGACCT GCACTGCCAGCGCAAGTGTAAGTTCAGCTCCT TGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGATCCCCC CCAAATTCTGGATTTATAGCACAACCAACCTGGC TTCTGGAGTCCCAACTCGCTTCAGTGGCAGTGG GTCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCAGCAAC ATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCC ACCAGTATCATCGTTCCCCACCGACGTTTCGGTGG AGGCACCAAGCTGGAAATCAAA				
--	--	--	--	--	--	--	--

[0321] *根据Kabat的CDR定义和蛋白质序列编号。

[0322] *表2中包含RNA核酸分子(例如,用尿苷代替的胸腺嘧啶)、编码经编码的蛋白质的直系同源物的核酸分子,以及包括核酸序列的DNA、cDNA或RNA核酸序列,所述核酸序列与表2中列出的任何SEQ ID NO的核酸序列或其一部分在其全长上具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或更多同一性。此类核酸分子可以具有如本文进一步描述的全长核酸的功能。

[0323] III. 核酸、载体和重组宿主细胞

[0324] 本公开所涵盖的另外的方面涉及编码本公开所涵盖的单克隆抗体和其片段、免疫球蛋白和多肽的核酸序列。

[0325] 通常,核酸是DNA或RNA分子,其可以包含在任何合适的载体如质粒、粘粒、附加体、人工染色体、噬菌体或病毒载体中。

[0326] 载体可以包括调节元件如启动子、增强子、终止子等,以在施用于受试者后引起或引导所述多肽的表达。用于动物细胞表达载体的启动子和增强子的实例包含SV40的早期启动子和增强子(Mizukami T.等人1987)、莫洛尼小鼠白血病病毒(Moloney mouse leukemia virus)的LTR启动子和增强子(Kuwana Y等人1987)、免疫球蛋白H链的启动子(Mason J O等人1985)和增强子(Gillies S D等人1983)等。

[0327] 可以使用任何动物细胞的表达载体。合适载体的实例包含pAGE107(Miyaji H等人1990)、pAGE103(Mizukami T等人1987)、pHSG274(Brady G等人1984)、pKCR(O'Hare K等人1981)、pSG1βd2-4-(Miyaji H等人1990)等。质粒的其它代表性实例包含包括复制起点的复制质粒或整合质粒例如pUC、pcDNA、pBR等。病毒载体的代表性实例包含腺病毒、逆转录病毒、疱疹病毒和AAV载体。此类重组病毒可以通过本领域已知的技术产生,如通过转染包装细胞或通过用辅助质粒或病毒瞬时转染。病毒包装细胞的典型实例包含PA317细胞、PsiCRIP细胞、GPenv阳性细胞、293细胞等。用于产生此类复制缺陷型重组病毒的详细方案可见于例如WO 95/14785、WO 96/22378、美国专利第5,882,877号、美国专利第6,013,516号、美国专利第4,861,719号、美国专利第5,278,056号和WO 94/19478。

[0328] 本公开所涵盖的另外的方面涉及已经被根据本公开的核酸和/或载体转染、感染或转化的细胞。术语“转化”意指将“外源”(即,外在的或细胞外的)基因、DNA或RNA序列引入宿主细胞,使得宿主细胞将表达引入的基因或序列以产生期望的物质,通常是由引入的基因或序列编码的蛋白质或酶。接受并表达引入的DNA或RNA的宿主细胞已被“转化”。

[0329] 本公开所涵盖的核酸可以用于在合适的表达系统中产生本公开所涵盖的重组多肽。术语“表达系统”意指在合适条件下的宿主细胞和相容载体,例如用于表达由载体携带并引入宿主细胞的外源DNA编码的蛋白质。

[0330] 常见的表达系统包含大肠杆菌(E.coli)宿主细胞和质粒载体、昆虫宿主细胞和杆状病毒载体,以及哺乳动物宿主细胞和载体。宿主细胞的其它实例包含但不限于原核细胞(如细菌)和真核细胞(如酵母细胞、哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞等)。具体实例包含大肠杆菌、克鲁维酵母菌属(Kluyveromyces yeast)或酵母菌属(Saccharomyces yeast)、哺乳动物细胞系(例如,Vero细胞、CHO细胞、3T3细胞、COS细胞等)以及原代或已建立的哺乳动物细胞培养物(例如,由淋巴母细胞、成纤维细胞、胚胎细胞、上皮细胞、神经细胞、脂肪细胞等产生)。实例还包含小鼠SP2/0-Ag14细胞(ATCC CRL1581)、小鼠P3X63-Ag8.653细胞(ATCC CRL1580)、二氢叶酸还原酶基因(下文称为“DHFR基因”)有缺陷的CHO细胞(Urlaub G等人;1980)、大鼠YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20细胞(ATCC CRL 1662,下文称为“YB2/0细胞”)等。YB2/0细胞是优选的,因为嵌合或人源化抗体的ADCC活性在此细胞中表达时增强。

[0331] 本公开还涉及根据本公开产生表达本公开所涵盖的抗体或多肽的重组宿主细胞的方法,所述方法包括由以下组成的步骤:(i)将如上文所描述的重组核酸或载体体外或离体引入感受态宿主细胞;(ii)体外或离体培养获得的重组宿主细胞;以及(iii)任选地,选择表达和/或分泌所述抗体或多肽的细胞。此类重组宿主细胞可以用于产生如本文所描述的抗体和多肽。

[0332] 另一方面,本公开提供了在选择性杂交条件下与本文公开的多核苷酸杂交的分离

的核酸。因此,此实施例的多核苷酸可以用于分离、检测和/或定量包括此类多核苷酸的核酸。例如,本公开所涵盖的多核苷酸可以用于鉴定、分离或扩增保藏文库中的部分或全长克隆。在一些实施例中,多核苷酸是与来自人或哺乳动物核酸文库的cDNA分离或互补的基因组或cDNA序列。优选地,cDNA文库包括至少80%的全长序列,优选地至少85%或90%的全长序列,并且更优选地至少95%的全长序列。可以对cDNA文库归一化以增加稀有序列的代表性。低或中等严格杂交条件通常但不排他地与相对于互补序列具有降低的序列同一性的序列一起使用。对于更高同一性的序列,可以任选地使用中等和高严格条件。低严格条件允许选择性杂交具有约70%序列同一性的序列,并且可以用于鉴定直系同源或旁系同源序列。任选地,本发明的多核苷酸将编码由本文所描述的多核苷酸编码的抗体的至少一部分。本发明的多核苷酸涵盖可以用于与编码本公开所涵盖的抗体的多核苷酸选择性杂交的核酸序列。参见例如Ausubel(同上);Colligan(同上),每个通过引用整体并入本文。

[0333] IV. 产生抗体的方法

[0334] 本公开所涵盖的抗体和其片段、免疫球蛋白和多肽可以通过本领域已知的任何技术产生,如但不限于任何化学、生物、遗传或酶技术,单独或组合。

[0335] 已知期望序列的氨基酸序列,本领域技术人员可以通过用于产生多肽的标准技术容易地生产所述抗体或多肽。例如,所述抗体或多肽可以使用众所周知的固相方法合成,优选地使用可商购获得的肽合成设备(如由加利福尼亚州福斯特城的应用生物系统公司(Applied Biosystems,Foster City,Calif.)制造的设备)并且遵循制造商的说明。可替代地,本公开所涵盖的抗体和其它多肽可以通过本领域众所周知的重组DNA技术合成。例如,在将编码期望(多)肽的DNA序列并入表达载体并将此类载体引入将表达期望多肽的合适真核或原核宿主后,这些片段可以作为DNA表达产物获得,之后可以使用众所周知的技术将它们从中分离出来。

[0336] 具体地,本公开进一步涉及产生本公开所涵盖的抗体或多肽的方法,所述方法包括由以下组成的步骤:(i)在适合于允许所述抗体或多肽表达的条件下培养根据本公开的转化的宿主细胞;以及(ii)回收表达的抗体或多肽。

[0337] 本公开所涵盖的抗体和其它多肽可以通过常规免疫球蛋白纯化程序从培养基中适当分离,例如蛋白A-琼脂糖、羟基磷灰石色谱法、凝胶电泳、透析、亲和色谱法、硫酸铵或乙醇沉淀、酸萃取、阴离子或阳离子交换色谱法、磷酸纤维素色谱法、疏水相互作用色谱法、羟基磷灰石色谱法和凝集素色谱法。高效液相色谱法(“HPLC”)也可以用于纯化。参见例如Colligan,《当代免疫学实验指南(Current Protocols in Immunology)》或《当代蛋白质科学实验指南(Current Protocols in Protein Science)》,纽约州纽约市约翰·威利父子出版公司(John Wiley&Sons,NY,N.Y.), (1997-2001),例如章节1,4,6,8,9,10,每个通过引用整体并入本文。

[0338] 本公开所涵盖的嵌合抗体(例如,小鼠-人嵌合体或非啮齿动物-人嵌合体)可以通过以下产生:获得如先前所描述的编码VL和VH结构域的核酸序列;通过将它们插入具有编码人抗体CH和人抗体CL的基因的动物细胞表达载体中来构建人嵌合抗体表达载体;以及通过将表达载体引入动物细胞来表达编码序列。人嵌合抗体的CH结构域可以是属于人免疫球蛋白的任何区,如IgG类或其亚类,如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。类似地,人嵌合抗体的CL可以是属于Ig的任何区,如κ类或λ类。可以使用标准重组DNA技术制备的嵌合和人源化单克隆抗

体(包括人和非人部分)在本公开所涵盖的范围内。此类嵌合和人源化单克隆抗体可以通过本领域已知的重组DNA技术产生,例如使用描述于以下的方法:Robinson等人的国际专利公开PCT/US86/02269;Akira等人的欧洲专利申请184,187;Taniguchi,M.的欧洲专利申请171,496;Morrison等人的欧洲专利申请173,494;Neuberger等人PCT申请W0 86/01533;Cabilly等人的美国专利第4,816,567号;Cabilly等人的欧洲专利申请125,023;Better等人(1988)《科学》240:1041-1043;Liu等人(1987)《美国国家科学院院刊》84:3439-3443;Liu等人(1987)《免疫学杂志》139:3521-3526;Sun等人(1987)《美国国家科学院院刊》84:214-218;Nishimura等人(1987)《癌症研究》47:999-1005;Wood等人(1985)《自然》314:446-449;Shaw等人(1988)《美国国立癌症研究所杂志(J.Natl.Cancer Inst.)》80:1553-1559;Morrison,S.L.(1985)《科学》229:1202-1207;Oi等人(1986)《生物技术(Biotechniques)》4:214;Winter美国专利5,225,539;Jones等人(1986)《自然》321:552-525;Verhoeyan等人(1988)《科学》239:1534;以及Beidler等人(1988)《免疫学杂志》141:4053-4060。

[0339] 另外,人源化抗体可以根据标准方案制备,如美国专利5,565,332中公开的那些。在一些实施例中,抗体链或特异性结合对成员可以通过以下来产生:包括编码特异性结合对成员的多肽链和可复制的通用展示包的组分的融合的核酸分子的载体与含有编码单个结合对成员的第二多肽链的核酸分子的载体之间的重组,使用本领域已知的技术例如,如美国专利5,565,332、5,871,907或5,733,743所描述的。本公开所涵盖的人源化抗体可以通过以下来产生:获得如先前所描述的编码CDR结构域的核酸序列;通过将它们插入到动物细胞的表达载体中来构建人源化抗体表达载体,所述基因编码(i)与人抗体的重链恒定区相同的重链恒定区和(ii)与人抗体的轻链恒定区相同的轻链恒定区;以及通过将表达载体引入动物细胞来表达基因。人源化抗体表达载体可以是编码抗体重链的基因和编码抗体轻链的基因存在于单独载体上的类型或两种基因存在于同一载体上的类型(串联型)。

[0340] 用于基于常规重组DNA和基因转染技术产生人源化抗体的方法是本领域众所周知的(参见例如Riechmann L.等人1988;Neuberger M S.等人1985)。可以使用本领域已知的多种技术将抗体人源化,包含例如CDR-移植(EP 239,400;PCT公开W091/09967;美国专利第5,225,539号;第5,530,101号;和第5,585,089号)、镶面或表面重修(EP 592,106;EP 519,596;Padlan EA(1991);Studnicka G M等人(1994);Roguska M A.等人(1994))和链改组(美国专利第5,565,332号)。用于制备此类抗体的一般重组DNA技术也是已知的(参见欧洲专利申请EP 125023和国际专利申请W0 96/02576)。

[0341] 类似地,本文所描述的双特异性或多特异性抗体可以根据标准程序制备。例如,三源杂交瘤和杂交杂交瘤是可以分泌双特异性或多特异性抗体的细胞系的两个实例。美国专利4,474,893中公开了由杂交杂交瘤或三源杂交瘤产生的双特异性和多特异性抗体的实例。此类抗体也可以通过以下构建:化学方法(Staerz等人(1985)《自然》314:628和Perez等人(1985)《自然》316:354)和杂交瘤技术(Staerz和Bevan(1986)《美国国家科学院院刊》83:1453以及Staerz和Bevan(1986)《今日免疫学》7:241)。可替代地,此类抗体也可以通过以下来产生:通过融合杂交瘤或产生不同抗体的其它细胞产生异种杂交瘤,然后鉴定产生和共组装期望抗体的克隆。所述抗体也可以通过完整的免疫球蛋白链或其部分如Fab和Fv序列的化学或遗传缀合来产生。抗体组分可以与本公开所涵盖的一种或多种生物标志物的多肽或其片段结合,包含本文所描述的一种或多种免疫抑制性生物标志物。

[0342] 另外,用于产生抗体片段的方法是众所周知的。例如,本公开所涵盖的Fab片段可以通过用蛋白酶如木瓜蛋白酶处理与人KIR3DL3特异性反应的抗体来获得。此外,可以通过将编码抗体的Fab的DNA插入原核表达系统或真核表达系统的载体中,并且将载体引入原核生物或真核生物(视情况而定)以表达Fab来产生Fab。

[0343] 类似地,本公开所涵盖的F(ab')₂片段可以通过用蛋白酶,即木瓜蛋白酶处理与KIR3DL3特异性反应的抗体来获得。此外,F(ab')₂片段可以通过经由硫醚键或二硫键结合下文所描述的Fab'来产生。

[0344] 本公开所涵盖的Fab'片段可以通过用还原剂,即二硫苏糖醇处理与人KIR3DL3特异性反应的F(ab')₂来获得。此外,Fab'片段可以通过将编码抗体的Fab'片段的DNA插入原核生物的表达载体或真核生物的表达载体中,并且将载体引入原核生物或真核生物(视情况而定)以进行其表达来产生。

[0345] 另外,本公开所涵盖的scFv可以通过获得如先前所描述的编码VH和VL结构域的cDNA,构建编码scFv的DNA,将DNA插入原核生物的表达载体或真核生物的表达载体,然后将表达载体引入原核生物或真核生物(视情况而定)以表达scFv来产生。为了产生人源化scFv片段,可以使用称为CDR移植的众所周知的技术所述技术涉及从供体scFv片段中选择互补决定区(CDR),并且将互补决定区移植到已知三维结构的人scFv片段框架上(参见例如W098/45322;W0 87/02671;美国专利第5,859,205号;美国专利第5,585,089号;美国专利第4,816,567号;EP0173494)。

[0346] V. 抗体、免疫球蛋白和多肽的修饰

[0347] 考虑了本文所描述的抗体的氨基酸序列修饰。例如,可能期望改善抗体的结合亲和力和/或其它生物性质。已知当人源化抗体通过在人抗体的VH和VL的FR中简单地仅移植衍生自非人动物的抗体的VH和VL的CDR而产生时,与衍生自非人动物的原始抗体的抗原结合活性相比,抗原结合活性降低。据认为,不仅在CDR中,而且在FR中,非人抗体的VH和VL的若干个氨基酸残基与抗原结合活性直接或间接相关。因此,用源自人抗体的VH和VL的FR的不同氨基酸残基取代这些氨基酸残基会降低结合活性,并且可以通过用源自非人动物的原始抗体的氨基酸残基替换氨基酸来校正。

[0348] 可以对本公开所涵盖的抗体的结构和编码所述抗体的DNA序列作出修饰和改变,并且修饰和改变仍可以获得编码具有令人期望的特性的抗体和多肽的功能分子。例如,某些氨基酸可以被蛋白结构中的其它氨基酸取代,而不会明显丧失活性。由于蛋白的相互作用能力和性质限定了蛋白的生物功能活性,因此可以在蛋白序列中以及当然在其DNA编码序列中进行某些氨基酸序列取代,然而同时获得具有类似性质的蛋白质。因此考虑可以在不明显丧失其生物活性的情况下对本公开所涵盖的抗体序列或编码所述多肽的对应DNA序列进行各种改变。

[0349] 在一些实施例中,可以通过改变DNA序列中的密码子以编码基于基因密码的保守性的保守取代来实现氨基酸改变。具体地,特定蛋白质的氨基酸序列与可以编码蛋白质的核苷酸序列之间存在已知且明确的对应关系,如基因密码所定义(如下所示)。同样,特定核酸的核苷酸序列与由所述核酸编码的氨基酸序列之间存在已知且明确的对应关系,如基因密码所定义(参见上文的基因密码图表)。

[0350] 在对多肽的氨基酸序列作出改变时,可以考虑氨基酸的亲水指数。亲水氨基酸指

数在向蛋白赋予相互作用生物功能方面的重要性在本领域中通常是被理解的。接受的是,氨基酸的相对亲水特性有助于所得蛋白的二级结构,所述二级结构进而定义蛋白与其它分子,例如酶、底物、受体、DNA、抗体、抗原等的相互作用。根据氨基酸的疏水性和电荷特性,每种氨基酸都被指定了亲水指数,它们是:异亮氨酸(+4.5);缬氨酸(+4.2);亮氨酸(+3.8);苯丙氨酸(+2.8);半胱氨酸/胱氨酸(+2.5);蛋氨酸(+1.9);丙氨酸(+1.8);甘氨酸(-0.4);苏氨酸(-0.7);丝氨酸(-0.8);色氨酸(-0.9);酪氨酸(-1.3);脯氨酸(-1.6);组氨酸(-3.2);谷氨酸盐(-3.5);谷氨酰胺(-3.5);天冬氨酸(<RTI3.5);天冬酰胺(-3.5);赖氨酸(-3.9);以及精氨酸(-4.5)。

[0351] 本领域中已知某些氨基酸可以被具有类似亲水指数或得分的其它氨基酸取代并且仍导致具有类似生物活性的蛋白质,即仍获得生物功能等效蛋白质。

[0352] 如上文所概述的,氨基酸取代因此通常基于氨基酸侧链取代基的相对相似性,例如,其疏水性、亲水性、电荷、大小等。考虑到各种前述特性的示例性取代是本领域技术人员众所周知的并且包含:精氨酸和赖氨酸;谷氨酸盐和天冬氨酸盐;丝氨酸和苏氨酸;谷氨酰胺和天冬酰胺;以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。

[0353] 本公开所涵盖的抗体的另一种类型的氨基酸修饰可以用于改变抗体的原始糖基化模式以例如增加稳定性。“改变”意指删除抗体中发现的一个或多个碳水化合物部分和/或添加抗体中不存在的一个或多个糖基化位点。抗体的糖基化通常是N-连接的。N-连接是指碳水化合物部分附接至天冬酰胺残基的侧链。其中X为除脯氨酸以外的任何氨基酸的三肽序列,天冬酰胺-X-丝氨酸以及天冬酰胺-X-苏氨酸,是将碳水化合物部分酶促附接至天冬酰胺侧链的识别序列。因此,在多肽中的这些三肽序列中的任何一个的存在产生潜在糖基化位点。向抗体添加糖基化位点便利地通过改变氨基酸序列以使得它含有一个或多个上述三肽序列来完成(对于N-连接糖基化位点)。另一种类型的共价修饰涉及将糖苷以化学方式或酶促方式偶联到抗体。这些程序是有利的,因为所述程序不需要在具有N-或O-连接糖基化的糖基化能力的宿主细胞中产生抗体。根据所使用的偶联模式,糖可以与以下连接:(a)精氨酸和组氨酸,(b)游离羧基,(c)游离巯基,如半胱氨酸的那些,(d)游离羟基,如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸的那些,(e)芳香族残基,如苯基丙氨酸、酪氨酸或色氨酸的那些,或(f)谷氨酰胺的酰胺基。例如,W087/05330中描述了此类方法。

[0354] 类似地,化学去糖基化需要将抗体暴露于化合物三氟甲磺酸或等效化合物。化学去糖基化需要将抗体暴露于化合物三氟甲磺酸或等效化合物。这种治疗导致除连接糖(N-乙酰葡萄糖胺或N-乙酰半乳糖胺)以外的大多数或所有糖剪切,同时保持抗体完整。化学去糖基化由以下描述:Sojahn H.等人(1987)和Edge, A S.等人(1981)。抗体上的碳水化合物部分的酶促剪切可以使用各种内切和外切糖苷酶来实现,如Thotakura, N R.等人(1987)描述。

[0355] 其它修饰可能涉及免疫偶联物的形成。例如,在一种共价修饰类型中,抗体或蛋白质以以下所示的方式与多种非蛋白质聚合物中的一种共价连接,例如聚乙二醇、聚丙二醇或聚氧化烯:美国专利第4,640,835号;第4,496,689号;第4,301,144号;第4,670,417号;第4,791,192号或第4,179,337号。

[0356] 本公开所涵盖的抗体或其它蛋白质与异源剂的缀合可以使用多种双功能蛋白质偶联剂进行,包含但不限于N-(2-吡啶基二硫代)丙酸琥珀酰亚胺酯(SPDP)、(N-马来酰亚胺

基甲基)环己烷-1-甲酸琥珀酰亚胺酯、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酸酯的双功能衍生物(如己二亚氨盐酸二甲酯)、活性酯类(如辛二酸二琥珀酰亚胺基酯)、醛类(如戊二醛)、双叠氮化合物(如双(对叠氮苯甲酰基)己二胺)、双重氮衍生物(如双-(对重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(如甲苯2,6-二异氰酸酯)和双活性氟化合物(如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,碳标记的1-异硫氰基苄基甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于将放射性核苷酸与抗体缀合的示例性螯合剂(WO 94/11026)。

[0357] 另一方面,本公开的特征在于与KIR3DL3特异性结合的抗体,所述KIR3DL3与治疗部分如细胞毒素、药物和/或放射性同位素缀合。当与细胞毒素缀合时,这些抗体缀合物被称为“免疫毒素”。一种细胞毒素或细胞毒剂包含任何对细胞有害(例如,杀死)的试剂。实例包含紫杉酚、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、吐根碱、丝裂霉素、依托泊苷、替诺泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙素、多柔比星、柔红霉素、二羟基炭疽菌素二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌、光神霉素、放线菌素D、1-去氢睾酮、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素以及其类似物或同源物。治疗剂包含但不限于抗代谢药(例如,甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶脱卡巴嗪)、烷化剂(例如,氮芥、塞替派苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫斯汀(BSNU)和洛莫斯汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲佐菌素、丝裂霉素C和顺二氯二胺铂(II)(DDP)顺铂)、蒽环类药物(例如,柔红霉素(以前称为道诺霉素)和多柔比星)、抗生素(例如,放线菌素(以前称为放线菌素)博来霉素、光神霉素和蒽霉素(AMC)以及抗有丝分裂剂(例如,长春新碱和长春碱)。本公开的抗体可以与放射性同位素例如放射性碘缀合以生成用于治疗如癌症等相关病症的细胞毒性放射性药物。

[0358] 缀合的抗KIR3DL3抗体可以用于,除其它外,诊断地或预后地监测组织中的多肽水平,作为临床测试程序的一部分,例如以确定给定治疗方案的功效或选择最可能对某种免疫疗法有应答的患者。例如,可以在流式细胞术测定中透化细胞以允许与KIR3DL3结合的抗体靶向其识别的细胞内表位,并且允许通过分析从缀合分子发出的信号来检测结合。可以通过将抗体与可检测物质偶联(即物理连接)来促进检测。可检测物质的实例包含各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料和放射性材料。合适的酶的实例包含辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基复合物的实例包含链霉亲和素/生物素和亲和素/生物素;合适的荧光材料的实例包含伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、若丹明(rhodamine)、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白(PE);发光材料的实例包含鲁米诺(luminol);生物发光材料的实例包含荧光素酶、荧光素和水母发光蛋白,并且合适的放射性材料的实例包含 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^3H 。如本文所使用的,关于抗体的术语“标记的”旨在涵盖通过将可检测物质如放射性药剂或荧光团(例如,异硫氰酸荧光素(FITC)或藻红蛋白(PE)或吖啶菁(Cy5))与抗体偶联(即物理连接)直接标记抗体,以及通过与可检测物质的反应性间接标记抗体。

[0359] 本公开所涵盖的抗体缀合物可以用于修饰给定的生物应答。化学部分不应被解释为仅限于经典的化学药剂。例如,药物部分可以是具有期望的生物活性的蛋白质或多肽。此类蛋白质可以包含例如肿瘤坏死因子或干扰素- γ ;或生物反应调节剂,例如淋巴因子、白细胞介素-1(“IL-1”)、白细胞介素-2(“IL-2”)、白细胞介素-6(“IL-6”)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(“GM-CSF”)、粒细胞集落刺激因子(“G-CSF”)或其它细胞因子或生长因子。

[0360] 将此类治疗部分与抗体结合的技术是众所周知的,参见例如,Arnon等人,“用于在癌症疗法中免疫靶向药物的单克隆抗体 (Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy)”,在《单克隆抗体和癌症疗法 (Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy)》,Reisfeld等人(编著),第243 56页 (Alan R.Liss公司 (Alan R.Liss, Inc.) 1985) 中;Hellstrom等人,“用于药物递送的抗体 (Antibodies For Drug Delivery)”,在《受控药物递送 (Controlled Drug Delivery)》(第2版),Robinson等人(编著),第623 53页 (马塞尔德克尔公司 (Marcel Dekker, Inc.) 1987) 中;Thorpe,“癌症疗法中细胞毒剂的抗体载体:综述 (Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review)”,在《单克隆抗体’84:生物学和临床应用 (Monoclonal Antibodies’ 84: Biological And Clinical Applications)》,Pinchera等人(编著),第475506页 (1985) 中;“放射标记抗体在癌症疗法中的治疗性用途的分析、结果和未来展望 (Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy)”,在《用于癌症检测和疗法的单克隆抗体 (Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy)》,Baldwin等人(编著),第303 16页 (学术出版社 (Academic Press) 1985) 以及Thorpe等人中,“抗体-毒素缀合物的制备和细胞毒性性质 (The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates)”,《免疫学综述 (Immunol. Rev.)》,62:119 58 (1982)。

[0361] 在一些实施例中,可以使用促进细胞毒剂或生长抑制剂在细胞中释放的“可切割接头”进行缀合。例如,可以使用酸不稳定接头、肽酶敏感接头、光不稳定接头、二甲基接头或含二硫键接头 (参见例如美国专利第5,208,020号)。可替代地,可以通过重组技术或肽合成制备包括抗体和生长抑制剂的融合蛋白。DNA的长度可以包括编码缀合物的两个部分的相应区,所述两个部分彼此相邻或被编码不破坏缀合物的期望特性的接头肽的区隔开。

[0362] VI. 用途和方法

[0363] 本文所描述的本公开所涵盖的抗KIR3DL3抗体、免疫球蛋白、多肽和核酸可单独地或与其它疗法等组合用于多种用途如KIR3DL3检测方法、治疗目的 (例如,治疗性、预防性和免疫调节性)。另外,本文所描述的本公开所涵盖的抗KIR3DL3抗体、免疫球蛋白、多肽和核酸可以用于许多基于检测KIR3DL3水平的预测性药物测定。例如,本公开提供用于确定个体是否将对某种疗法 (例如,靶向KIR3DL3的疗法) 有应答的预后 (或预测) 测定。如本文所描述的,本公开所涵盖的KIR3DL3多肽或其片段具有以下活性中的一种或多种: 1) 与如HHLA2等其天然结合配偶体结合和/或调节其活性; 2) 调节如共免疫抑制信号传导等细胞内或细胞间信号传导; 3) 调节T细胞或NK细胞的激活; 4) 调节生物体的免疫应答,例如哺乳动物生物体如小鼠、非啮齿动物或人; 并且5) 调节免疫细胞无反应性。

[0364] 本公开还提供了检测KIR3DL3作为识别转导KIR3DL3信号的药剂的手段。转导KIR3DL3信号的药剂会减弱免疫应答,并且可能对自身免疫性疾病、哮喘和建立耐受性有用。

[0365] 在本文所描述的任何方法中,可以单独地或与其它分子如其它免疫检查点和/或共刺激分子的表达组合来检测KIR3DL3。若干个分子的组合检测 (例如,顺序或同时) 可以提供有关治疗干预和/或病症亚型的个性化、更高分辨率诊断的协同作用的有用信息。在一些实施例中,KIR3DL3与一种或多种标志物组合检测。

[0366] 1. 治疗方法和用途

[0367] 在一些实施例中,本公开所涵盖的抗体、片段或免疫缀合物(例如,抗KIR3DL3抗体)可用于治疗与KIR3DL3的异常或不期望激活相关的任何病症(例如,癌症)。在某些实施例中,治疗是针对如人等哺乳动物。本公开所涵盖的此类抗体可以单独使用或与任何合适的药剂或适当的疗法组合使用以治疗所关注的病症。例如,当用包括抗KIR3DL3 mAb和另一种免疫检查点抑制剂或如CAR等细胞疗法的疗法治疗细胞时,治疗协同作用被认为会显现出来。

[0368] 本文所描述的本公开所涵盖的抗体或其片段可用于通过防止或破坏KIR3DL3与其天然配体HHLA2之间的相互作用来调节免疫应答。类似地,本文所描述的抗体或其片段可用于通过增加免疫应答和T细胞和/或NK细胞对癌细胞的活性来治疗疾病,例如癌症。因此,本公开所涵盖的目的涉及用于调节免疫应答和/或治疗与异常KIR3DL3激活相关的病症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的本公开所涵盖的抗体和其片段。

[0369] 免疫应答的上调可以是增强现有免疫应答或引发初始免疫应答的形式。例如,使用主题组合物和方法增强免疫应答在改善对癌症和微生物(例如,细菌、病毒或寄生虫)感染的免疫防御的情况下是有用的。例如,如本文所描述的免疫应答功能的上调或增强可用于诱导肿瘤免疫。

[0370] 在另一个实施例中,可以通过本文所描述的方法刺激免疫应答,从而克服预先存在的耐受性、克隆缺失和/或耗竭(例如,T细胞耗竭)。例如,针对受试者不能对其产生显著免疫应答的抗原,例如针对自体抗原如肿瘤特异性抗原的免疫应答可以通过施用本文所描述的上调免疫应答的适当药剂来诱导。在一个实施例中,可以共同施用如肿瘤特异性抗原等自体抗原。在另一个实施例中,可以针对抗原(例如,自体抗原)刺激免疫应答以治疗神经障碍。在另一个实施例中,主题药剂可以用作佐剂以在主动免疫过程中增强对外来抗原的应答。

[0371] 在某些情况下,可能期望进一步施用上调免疫应答的其它药剂,例如通过共刺激受体转导信号的其它B7家族成员的形式,以进一步增强免疫应答。此外,上调免疫应答的药剂可以预防性地用于针对各种多肽(例如,源自病原体的多肽)的疫苗。可以通过在适当的佐剂中接种病毒蛋白以及上调免疫应答的药剂来诱导针对病原体(例如,病毒)的免疫。

[0372] 另外或可替代地,在一些实施例中,本公开所涵盖的抗体和抗原结合片段除了诊断、预后和预防应用(如治疗和延缓疾病的发作或进展)外,还可用于治疗应用,以抑制上调免疫反应的疾病,例如哮喘、自身免疫性疾病(肾小球肾炎、关节炎、扩张型心肌病样疾病、溃疡型结肠炎、斯耶格伦综合征(Sjogren syndrome)、克罗恩病、全身性红斑、慢性类风湿性关节炎、多发性硬化症、银屑病、过敏性接触性皮炎、多肌炎、皮肥厚、结节性动脉周围炎、风湿热、寻常性白斑、胰岛素依赖型糖尿病、白塞病(Behcet disease)、桥本氏病(Hashimoto disease)、艾迪生病(Addison disease)、皮炎、重症肌无力、莱特尔氏综合征(Reiter syndrome)、格雷夫斯氏病(Graves' disease)、恶性贫血、古德帕斯丘综合征(Goodpasture syndrome)、不育症、慢性活动性肝炎、天疱疮、自身免疫性血小板减少性紫癜和自身免疫性溶血性贫血、活动性慢性肝炎、艾迪生氏病(Addison's disease)、抗磷脂综合征、特异反应性过敏、自身免疫性萎缩性胃炎、胃酸缺乏自身免疫、乳糜泻、库欣氏综合征(Cushing's syndrome)、皮炎、盘状狼疮、红斑、古德帕斯丘氏综合征(Goodpasture's

syndrome)、桥本氏甲状腺炎、原发性肾上腺萎缩、特发性血小板减少、胰岛素依赖性糖尿病、兰伯特-伊顿综合征(Lambert-Eaton syndrome)、狼疮性肝炎、一些淋巴细胞减少症、混合性结缔组织病、类天疱疮、寻常型天疱疮、恶性贫血、晶状体源性葡萄膜炎、结节性多动脉炎、多腺自体综合征、原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎、雷诺氏综合征(Raynaud's syndrome)、复发性软骨炎、施密特氏症(Schmidt's syndrome)、局限性硬皮病(或crest综合征)、交感性眼炎、全身性红斑狼疮、高安氏动脉炎(Takayasu's arteritis)、颞动脉炎、甲状腺毒症、b型胰岛素抗性、溃疡性大肠炎和韦格纳氏肉芽肿病(Wegener's granulomatosis)。

[0373] 类似地,除了持续性传染病(例如,包含HPV、HBV、丙型肝炎病毒(HCV)的病毒性传染病、逆转录病毒如人免疫缺陷病毒(HIV-1和HIV-2)、疱疹病毒如爱泼斯坦巴尔病毒(Epstein Barr Virus,EBV)、巨细胞病毒(CMV)、HSV-1和HSV-2以及流感病毒)的诊断、预后和预防应用(如治疗和延迟疾病的发作或进展)之外,本公开所涵盖的抗体和抗原结合片段可用于治疗应用。可以如本文所描述使用的与病原体相关的其它抗原是各种寄生虫的抗原,包含疟疾,优选地基于NANP重复的疟疾肽。另外,包含细菌、真菌和其它致病性疾病,如曲霉属(*Aspergillus*)、布鲁格丝虫属(*Brugia*)、假丝酵母属(*Candida*)、衣原体属(*Chlamydia*)、球虫亚纲(*Coccidia*)、隐球菌属(*Cryptococcus*)、恶丝虫属(*Dirofilaria*)、淋球菌(*Gonococcus*)、组织胞浆菌属(*Histoplasma*)、利什曼原虫属(*Leishmania*)、分枝杆菌属(*Mycobacterium*)、支原体属(*Mycoplasma*)、草履虫属(*Paramecium*)、百日咳(*Pertussis*)、疟原虫属(*Plasmodium*)、肺炎球菌属(*Pneumococcus*)、肺囊虫属(*Pneumocystis*)、立克次体属(*Rickettsia*)、沙门氏菌属(*Salmonella*)、志贺氏菌属(*Shigella*)、葡萄球菌属(*Staphylococcus*)、链球菌属(*Streptococcus*)、弓形体属(*Toxoplasma*)和霍乱弧菌属(*Vibrio cholerae*)。示例性物种包含淋病奈瑟菌(*Neisseria gonorrhea*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、热带假丝酵母(*Candida tropicalis*)、阴道毛滴虫(*Trichomonas vaginalis*)、阴道嗜血杆菌(*Haemophilus vaginalis*)、B组链球菌属(Group B *Streptococcus* sp.)、人型微等离子体(*Microplasma hominis*)、杜克雷嗜血杆菌(*Hemophilus ducreyi*)、腹股沟肉芽肿(*Granuloma inguinale*)、腹股沟淋巴肉芽肿(*Lymphopathia venereum*)、梅毒螺旋体(*Treponema pallidum*)、牛布鲁氏杆菌(*Brucella abortus*)、羊布鲁氏杆菌(*Brucella melitensis*)、猪布鲁氏杆菌(*Brucella suis*)、犬布鲁氏杆菌(*Brucella canis*)、胎儿弯曲菌属(*Campylobacter fetus*)、胎儿肠弯曲杆菌(*Campylobacter fetus intestinalis*)、那钩端螺旋体(*Leptospira pomona*)、单核细胞增多性李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)、绵羊布鲁氏杆菌(*Brucella ovis*)、鹦鹉热衣原体(*Chlamydia psittaci*)、牛毛滴虫(*Trichomonas foetus*)、刚地弓形虫(*Toxoplasma gondii*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*)、马驹放线杆菌(*Actinobacillus equuli*)、羊流产沙门菌(*Salmonella abortus ovis*)、马流产沙门菌(*Salmonella abortus equi*)、铜绿假单胞菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、马棒状杆菌(*Corynebacterium equi*)、化脓棒状杆菌(*Corynebacterium pyogenes*)、羊放线杆菌(*Actinobacillus seminis*)、牛生殖道支原体(*Mycoplasma bovis genitalium*)、烟曲霉菌(*Aspergillus fumigatus*)、分棘状棘子须霉菌(*Absidia ramosa*)、马媾疫锥虫(*Trypanosoma equiperdum*)、弩巴贝斯虫(*Babesia*

caballi)、破伤风梭菌(*Clostridium tetani*)、肉毒杆菌(*Clostridium botulinum*)；或真菌如巴西副球孢子菌(*Paracoccidioides brasiliensis*)；或其它病原体，例如恶性疟原虫(*Plasmodium falciparum*)。还包含国家过敏和传染病研究所(National Institute of Allergy and Infectious Diseases, NIAID) 优先病原体。这些包含A类药剂，如大天花(天花)、炭疽杆菌(*Bacillus anthracis*) (炭疽)、耶尔森氏菌(*Yersinia pestis*) (鼠疫)、肉毒杆菌毒素(*Clostridium botulinum toxin*) (肉毒中毒)、土拉弗朗西斯菌(*Francisella tularensis*) (土拉菌病)、线状病毒(filoviruses) (埃博拉出血热(Ebola hemorrhagic fever)、马尔堡出血热(Marburg hemorrhagic fever))、沙粒病毒(拉沙(Lassa) (拉沙热)、朱宁出血热(Junin) (阿根廷出血热(Argentine hemorrhagic fever)) 和相关病毒)；B类药剂，如立克次体(*Coxiella burnetii*) (Q热病)、布氏杆菌(*Brucella species*) (布鲁氏菌病)、鼻疽伯克霍尔德氏菌(*Burkholderia mallei*) (马鼻疽)、甲病毒属(委内瑞拉脑脊髓炎(Venezuelan encephalomyelitis)、东西方马脑脊髓炎)、来自蓖麻的蓖麻毒素(蓖麻子)、来自产气荚膜梭菌(*Clostridium perfringens*) 的 ϵ 毒素；葡萄球菌肠毒素B(*Staphylococcus enterotoxin B*)、沙门氏菌属(*Salmonella species*)、痢疾志贺菌(*Shigella dysenteriae*)、大肠杆菌菌株0157:H7、霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、隐孢子虫(*Cryptosporidium parvum*)；C类药剂，如尼帕病毒(nipah virus)、汉坦病毒(hantaviruses)、蜱传出血热病毒、蜱传脑炎病毒、黄热病和耐多药结核病；蠕虫如血吸虫和绦虫；以及原生动物如利什曼原虫属(例如，墨西哥利什曼原虫(*L. mexicana*)) 和疟原虫属。

[0374] 在一些实施例中，除了预后和预防应用外，本公开所涵盖的抗体或抗原结合片段可用于治疗应用，关于诱导免疫耐受性、器官移植排斥、移植物抗宿主病(GVHD)、过敏性疾病和由KIR3DL3介导的免疫反应减弱引起的疾病。

[0375] 在本发明的上下文中，如本文所用，术语“治疗”(“treating”或“treatment”)意指逆转、减轻或抑制此类术语适用的病症或病状的进展或此类病症或病状的一种或多种症状。如本文所使用的术语“治疗癌症”意指抑制癌细胞的生长和/或增殖。优选地，此类治疗还导致肿瘤生长的消退(即，可测量肿瘤的大小减小)。最优选地，此类治疗导致肿瘤完全消退。

[0376] 通过将具有期望程度的纯度的抗体与任选的生理学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂以冻干调配物或水溶液的形式混合来制备包括一种或多种本公开所涵盖的抗体的治疗调配物以供储存(《雷明顿氏药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences) 第16版, Osol, A. 编辑(1980)》)。可以以符合良好医疗实践的任何方式调配、给药和施用抗体组合物。在这一背景下考虑的因素包含所治疗的特定病症、所治疗的特定哺乳动物、个体患者的临床病状、病症的起因、药剂的递送部位、施用方法、施用时间表和开业医生已知的其它因素。

[0377] 治疗剂量可以是至少约0.001 μ g/kg体重、0.005 μ g/kg体重、0.01 μ g/kg体重、至少约0.05 μ g/kg体重；至少约0.1 μ g/kg体重、至少约0.5 μ g/kg体重、至少约1 μ g/kg体重、至少约2.5 μ g/kg体重、至少约5 μ g/kg体重、至少约50 μ g/kg体重或至少约100 μ g/kg体重。本领域技术人员将理解，此类指南将针对活性剂的分子量进行调整，例如在抗体片段的使用中或在抗体缀合物的使用中。对于局部施用，例如鼻内、吸入等或对于全身性施用，例如肌肉内、腹

膜内、静脉内等,剂量也可以变化。

[0378] 组合物不需要但任选地与一种或多种增强活性或以其它方式增加治疗效果的药剂一起调配。

[0379] 可接受的载剂、赋形剂或稳定剂在所用剂量和浓度下对接受者无毒并且包含:缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐和其它有机酸;抗氧化剂,包含抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲双铵;苯扎氯铵、苄索氯铵;酚醇、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;以及间甲酚);低分子量(少于约10个残基)的多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其它碳水化合物,包含葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖,诸如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇;成盐反离子,诸如钠;金属络合物(例如,Zn-蛋白络合物);和/或非离子表面活性剂,如TWEENTM、PLURONICSTM或聚乙二醇(PEG)。用于体内施用的调配物必须是无菌的。这通过无菌过滤膜过滤而容易地完成。

[0380] 活性成分还可以例如通过凝聚法技术或通过界面聚合反应包入制备的微胶囊中,所述微胶囊例如:分别在胶体药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒以及纳米胶囊)或在粗乳液中的羟甲基纤维素或明胶-微胶囊以及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊。此类技术公开于《雷明顿氏药物科学》第16版,Osol, A. 编辑(1980)。

[0381] 本文所描述的组合物可以通过任何合适的方式施用,包含肠胃外、皮下、腹膜内、肺内和鼻内。胃肠外输注包含肌肉内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下施用。另外,组合物可以通过脉冲输注适当地施用,特别是在抗体剂量递减的情况下。

[0382] 对于疾病的预防或治疗,抗体的适当剂量将取决于如上文所定义的待治疗的疾病类型、疾病的严重程度和病程、是否出于预防目的施用抗体、既往疗法、患者的临床病史和对抗体的应答以及主治医生的考量。抗体适合在一次或在一系列治疗中向患者施用。

[0383] 直接阻断KIR3DL3与HHLA2之间相互作用的药剂,如抗HHLA2抗体、抗KIR3DL3抗体、抗KIR3DL3/抗免疫检查点双特异性抗体(例如,抗KIR3DL3/PD-1双特异性抗体)等可以阻止KIR3DL3信号传导和其下游免疫应答。可替代地,间接阻断KIR3DL3与HHLA2之间相互作用的药剂可以阻止KIR3DL3信号传导和其下游免疫应答。例如,在一些实施例中,可溶形式的KIR3DL3,如KIR3DL3的胞外结构域,通过与HHLA2结合可以间接降低细胞表面上可用于与KIR3DL3结合的HHLA2的有效浓度。示例性药剂包含针对KIR3DL3和/或HHLA2的单特异性或双特异性阻断抗体,其阻断受体与配体之间的相互作用;非激活形式的HHLA2和/或KIR3DL3(例如,显性失活或可溶多肽)、阻断KIR3DL3与HHLA2之间相互作用的小分子或肽;与KIR3DL3和/或HHLA2结合并抑制受体与配体之间相互作用的融合蛋白(例如,与抗体或免疫球蛋白的Fc部分融合的HHLA2和/或KIR3DL3的胞外部分);非激活形式的天然KIR3DL3和/或HHLA2和可溶形式的天然KIR3DL3和/或HHLA2。

[0384] 在一些实施例中,可以施用抗KIR3DL3抗体疗法或疗法组合(例如,一种或多种抗KIR3DL3抗体疗法与如另一种免疫检查点抑制剂等一种或多种另外的抗癌疗法组合)。组合疗法可以包括例如一种或多种化学治疗剂和放射、一种或多种化学治疗剂和免疫疗法或一种或多种化学治疗剂、放射和化学疗法,所述组合的每种组合可以与抗免疫检查点疗法一起使用。另外,普通技术人员可以将调节特定靶标的药剂的任何代表性实施例适用于本文

和下文所描述的任何其它靶标(例如,本文所描述的直接和间接KIR3DL3抑制剂可以应用于其它免疫检查点抑制剂和/或单特异性抗体、双特异性抗体、非激活形式、小分子、肽、干扰核酸等)。

[0385] 因此,本公开所涵盖的治疗剂可以单独使用或可以与例如化学治疗剂、激素、抗血管生成剂、CAR、放射性标记的化合物或外科手术、冷冻疗法和/或放射疗法组合疗法施用。前述治疗方法可以与其它形式的常规疗法(例如,本领域技术人员熟知的癌症护理标准治疗)联合施用,与常规疗法相继施用、在其之前或之后施用。例如,本公开所涵盖的药剂可以与治疗有效剂量的化学治疗剂一起施用。在另一个实施例中,本公开所涵盖的药剂与化学疗法联合施用以增强化学治疗剂的活性和功效。《医师案头参考(Physicians' Desk Reference, PDR)》公开了已用于治疗各种癌症的化学治疗剂的剂量。治疗有效的这些上述化学治疗药物的给药方案和剂量将取决于所治疗的特定癌症、疾病程度和本领域技术人员熟悉的其它因素,并且可以由医生确定。

[0386] 抗KIR3DL3药剂也可以与靶向疗法(例如免疫疗法)组合施用。旨在引发或放大免疫应答的免疫疗法被称为“激活免疫疗法”。旨在减少或抑制免疫应答的免疫疗法被称为“抑制免疫疗法”。可以测定任何被认为对基因修饰的移植癌细胞具有免疫系统作用的药剂以确定所述药剂是否是免疫疗法以及给定的基因修饰对免疫应答调节的作用。在一些实施例中,免疫疗法是癌细胞特异性的。在一些实施例中,免疫疗法可以是“非靶向的”,这是指施用不与免疫系统细胞选择性相互作用但调节免疫系统功能的药剂。非靶向疗法的代表性实例包含但不限于化学疗法、基因疗法和放射疗法。

[0387] 术语“靶向疗法”是指施用选择性地与所选择的生物分子相互作用例如,从而治疗癌症的药剂。例如,关于抑制免疫检查点抑制剂的靶向疗法与本公开所涵盖的方法组合是有用的。术语“免疫检查点抑制剂”意指CD4+和/或CD8+T细胞的细胞表面上的一组分子,它们通过下调或抑制抗肿瘤免疫应答来微调免疫应答。免疫检查点蛋白在本领域中是众所周知的并且包含但不限于CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、2B4、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIR家族受体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、BTLA、SIRPα(CD47)、CD48、2B4(CD244)、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、HHLA2、TMIDG2、KIR3DL3和A2aR(参见例如W02012/177624)。抑制一种或多种免疫检查点抑制剂可以阻断或以其它方式中和抑制性信号传导,从而上调免疫应答以便更有效地治疗癌症。

[0388] 免疫疗法是一种形式的靶向疗法,所述靶向疗法可以包括例如使用一种或多种癌症疫苗和/或致敏的抗原呈递细胞。例如,溶瘤病毒是能够感染和裂解癌细胞,同时使正常细胞不受伤害的病毒,这使得它们在癌症疗法中可能有用。溶瘤病毒的复制既促进了肿瘤细胞破坏,并且还在肿瘤位点处产生了剂量放大。溶瘤病毒还可以作为抗癌基因的载体,使溶瘤病毒能够被特异性地递送到肿瘤位点。免疫疗法可以涉及用于短期保护宿主的被动免疫,通过施用针对癌症抗原或疾病抗原的预先形成的抗体来实现(例如,将任选地与化学治疗剂或毒素连接的单克隆抗体施用于肿瘤抗原)。例如,已知抗VEGF和mTOR抑制剂可有效治疗肾细胞癌。免疫疗法还可以专注于使用癌细胞系的细胞毒性淋巴细胞识别表位。可替代地,反义多核苷酸、核酶、RNA干扰分子、三螺旋多核苷酸等可以用于选择性调节与肿瘤或癌症的起始、进展和/或病理学相关的生物分子。免疫疗法还可以专注于使用癌细胞系的细胞毒性淋巴细胞识别表位。可替代地,反义多核苷酸、核酶、RNA干扰分子、三螺旋多核苷酸等

可以用于选择性调节与肿瘤或癌症的起始、进展和/或病理学相关的生物分子。如上文所描述的,针对如HLA2、KIR3DL3等免疫检查点靶标的免疫疗法是有用的。

[0389] 在一些实施例中,免疫疗法可以包括一种或多种基于过继性细胞的免疫疗法。众所周知的基于过继性细胞的免疫治疗形式包含但不限于辐射的自体或同种异体肿瘤细胞、肿瘤裂解物或凋亡肿瘤细胞、基于抗原呈递细胞的免疫疗法、基于树突细胞的免疫疗法、过继性T细胞转移、过继性CAR T细胞疗法、自体免疫增强疗法(AIET)、癌症疫苗和/或抗原呈递细胞。此类基于细胞的免疫疗法可以进一步被修饰成表达一种或多种基因产物以进一步调节免疫应答,如表达细胞因子如GM-CSF和/或表达肿瘤相关抗原(TAA)抗原,如MAGE-1、gp-100、患者特异性新抗原疫苗等。

[0390] 在一些实施例中,免疫疗法可以包括一种或多种基于非细胞的免疫疗法。在一些实施例中,使用包括具有或不具有疫苗增强佐剂的抗原的组合物。此类组合物以许多众所周知的形式存在,如肽组合物、溶瘤病毒、包括融合蛋白的重组抗原等。在另一个实施例中,使用免疫调节白细胞介素,如IL-2、IL-6、IL-7、IL-12、IL-17、IL-23等以及其调节剂(例如,阻断抗体或更有效或更持久的形式)。在又一个实施例中,使用免疫调节细胞因子,如干扰素、G-CSF、咪喹莫特(imiquimod)、TNF α 等以及其调节剂(例如,阻断抗体或更有效或更持久的形式)。在另一个实施例中,使用免疫调节趋化因子,如CCL3、CCL26和CXCL7等以及其调节剂(例如,阻断抗体或更有效或更持久的形式)。在另一个实施例中,使用靶向免疫抑制的免疫调节分子,如STAT3信号调节剂、NF κ B信号调节剂和免疫检查点调节剂。上文描述了术语“免疫检查点”和“抗免疫检查点疗法”。

[0391] 在一些实施例中,使用免疫调节药物,如免疫细胞抑制药物、糖皮质激素、细胞抑制剂、亲免疫素和其调节剂(例如,雷帕霉素(rapamycin)、神经钙调蛋白抑制剂、他克莫司(tacrolimus)、环孢素(ciclosporin)(环孢菌素(cyclosporin))、吡美莫司(pimecrolimus)、阿贝莫司(abetimus)、胍立莫司(gusperimus)、地磷莫司(ridaforolimus)、依维莫司(everolimus)、西罗莫司(temsirolimus)、唑他莫司(zotarolimus)等)、氢化可的松(hydrocortisone)(皮质醇(cortisol))、醋酸可的松(cortisone acetate)、泼尼松(prednisone)、泼尼松龙(prednisolone)、甲基强的松龙(methylprednisolone)、地塞米松(dexamethasone)、倍他米松(betamethasone)、曲安西龙(triamcinolone)、倍氯米松(beclometasone)、醋酸氟氢可的松(fludrocortisone acetate)、醋酸脱氧皮质酮(deoxycorticosterone acetate, doca)、醛固酮(alдостерone)、非糖皮质激素、嘧啶合成抑制剂、来氟米特(leflunomide)、特立氟胺(teriflunomide)、类叶酸、甲氨蝶呤(methotrexate)、抗胸腺细胞球蛋白、抗淋巴细胞球蛋白、沙利度胺(thalidomide)、来那度胺(lenalidomide)、己酮可可碱(pentoxifylline)、安非他酮(bupropion)、姜黄素(curcumin)、儿茶素(catechin)、阿片(opioid)、IMPDH抑制剂、霉酚酸(mycophenolic acid)、多球壳菌素(myriocin)、芬戈莫德(fingolimod)、NF- κ B抑制剂、雷洛昔芬(raloxifene)、替加色罗 α (drotrecogin alfa)、狄诺塞麦(denosumab)、NF- κ B信号传导级联抑制剂、双硫仑(disulfiram)、奥美沙坦(olmesartan)、二硫代氨基甲酸酯(dithiocarbamate)、蛋白酶体抑制剂、硼替佐米(bortezomib)、MG132、Prol、NPI-0052、姜黄素、染料木素(genistein)、白藜芦醇(resveratrol)、小白菊内酯(parthenolide)、沙利度胺、来那度胺、夫拉平度(flavopiridol)、非甾体抗炎药(NSAID)、三氧化二砷、脱羟甲基

环氧喹霉素 (DHMEQ)、I3C (吡啶-3-甲醇)/DIM (二吡啶甲烷) (I3C/DIM)、Bay 11-7082、木犀草素、细胞渗透肽SN-50、IKBa.-超级阻遏物过度表达、NFKB诱杀寡脱氧核苷酸 (ODN) 或其任何衍生物或类似物。在又一个实施例中,使用免疫调节抗体或蛋白质。例如,与CD40、Toll样受体 (TLR)、OX40、GITR、CD27或与4-1BB结合的抗体、T-细胞双特异性抗体、抗IL-2受体抗体、抗CD3抗体、OKT3 (莫罗单抗 (muromonab))、奥昔珠单抗 (otelixizumab)、替利组单抗 (teplizumab)、维西珠单抗 (visilizumab)、抗CD4抗体、克立昔单抗 (clenoliximab)、凯利昔单抗 (keliximab)、扎诺米单 (zanolimumab)、抗CD11抗体、依法珠单抗 (efalizumab)、抗CD18抗体、厄立珠单抗 (erlizumab)、罗维珠单抗 (rovelizumab)、抗CD20抗体、阿夫珠单抗 (afutuzumab)、奥瑞组单抗 (ocrelizumab)、奥法木单抗 (ofatumumab)、帕昔单抗 (pascolizumab)、利妥昔单抗 (rituximab)、抗CD23抗体、鲁昔单抗 (lumiliximab)、抗CD40抗体、替奈昔单抗 (teneliximab)、托利珠单抗 (toralizumab)、抗CD40L抗体、卢利珠单抗 (ruplizumab)、抗CD62L抗体、阿塞珠单抗 (aselizumab)、抗CD80抗体、加利昔单抗 (galiximab)、抗CD147抗体、加维莫单抗 (gavilimomab)、B-淋巴细胞刺激因子 (BLyS) 抑制抗体、贝利单抗 (belimumab)、CTLA4-Ig融合蛋白、阿巴西普 (abatacept)、贝拉西普 (belatacept)、抗CTLA4抗体、易普利姆玛 (ipilimumab)、曲美木单抗 (tremelimumab)、抗嗜酸细胞活化趋化因子1抗体、柏替木单抗 (bertilimumab)、抗 α 4-整合素抗体、那他珠单抗 (natalizumab)、抗IL-6R抗体、托珠单抗 (tocilizumab)、抗LFA-1抗体、奥度莫单抗 (odulimomab)、抗CD25抗体、巴利昔单抗 (basiliximab)、达克珠单抗 (daclizumab)、伊诺莫单抗 (inolimomab)、抗CD5抗体、阿佐莫单抗 (zolimomab)、抗CD2抗体、西利珠单抗 (siplizumab)、奈瑞莫单抗 (nerelimomab)、法拉莫单抗 (faralimomab)、阿特利单抗 (atlizumab)、阿托木单抗 (atorolimomab)、西利珠单抗 (cedelizumab)、阿托度单抗 (dorlimomab aritox)、得利西珠单抗 (dorlixizumab)、芬特妥珠单抗 (fontolizumab)、更汀芦单抗 (gantenerumab)、戈利昔单抗 (gomiliximab)、莱布利珠单抗 (lebrilizumab)、马司莫单抗 (maslimomab)、莫罗木单抗 (morolimomab)、培克珠单抗 (pexelizumab)、瑞利珠单抗 (reslizumab)、罗维珠单抗 (rovelizumab)、他利珠单抗 (talizumab)、阿替莫单抗 (telimomab aritox)、伐利昔单抗 (vapaliximab)、维帕莫单抗 (vepalimomab)、阿柏西普 (aflibercept)、阿法赛特 (alefacept)、利纳西普 (rilonacept)、IL-1受体拮抗剂、阿那白滞素 (anakinra)、抗IL-5抗体、美泊利单抗 (mepolizumab)、IgE抑制剂、奥马珠单抗 (omalizumab)、他利珠单抗 (talizumab)、IL12抑制剂、IL23抑制剂、优特克单抗 (ustekinumab) 等。

[0392] 在一些实施例中,增强免疫应答的营养补充剂,如维生素A、维生素E、维生素C等是本领域众所周知的 (参见例如美国专利第4,981,844号和第5,230,902号以及PCT公开号W0 2004/004483) 可以用于本文所描述的方法中。

[0393] 类似地,除了免疫疗法之外的药剂和疗法可以与抗KIR3DL3抗体组合使用以刺激免疫应答,从而治疗将从中受益的病状。例如,化学疗法、放射、表观遗传修饰剂 (例如,组蛋白脱乙酰酶 (HDAC) 修饰剂、甲基化修饰剂、磷酸化修饰剂等)、靶向疗法等在本领域中是众所周知的。

[0394] 术语“非靶向疗法”是指施用不与所选择的生物分子选择性相互作用但治疗癌症的药剂。非靶向疗法的代表性实例包含但不限于化学疗法、基因疗法和放射疗法。

[0395] 在一个实施例中,使用化学疗法。化学疗法包含施用化学治疗剂。此类化学治疗剂可以是但不限于选自以下化合物组的那些:铂化合物、细胞毒性抗生素、抗代谢物、抗有丝分裂剂、烷化剂、砷化合物、DNA拓扑异构酶抑制剂、紫杉烷、核苷类似物、植物生物碱和毒素;以及其合成衍生物。示例性化合物包含但不限于烷化剂:顺铂(cisplatin)、曲奥舒凡(treosulfan)和曲洛磷胺(trofosfamide);植物生物碱:长春碱、紫杉醇(paclitaxel)、多西他赛(docetaxol);DNA拓扑异构酶抑制剂:teniposide(teniposide)、克立那托(crisnatol)和丝裂霉素;抗叶酸剂:甲氨蝶呤、霉酚酸和羟基脲;嘧啶类似物:5-氟尿嘧啶、去氧氟尿苷(doxifluridine)和阿糖胞苷;嘌呤类似物:巯嘌呤和硫鸟嘌呤;DNA抗代谢物:2'-脱氧-5-氟尿苷、甘氨酸阿非迪霉素和吡唑咪唑;以及抗有丝分裂剂:软海绵素、秋水仙素和根霉素。还可以使用包括一种或多种化学治疗剂(例如,FLAG、CHOP)的组合物。FLAG包括氟达拉滨(fludarabine)、阿糖胞苷(Ara-C)和G-CSF。CHOP包括环磷酰胺、长春新碱、多柔比星和泼尼松。在另一个实施例中,使用PARP(例如,PARP-1和/或PARP-2)抑制剂并且此类抑制剂是本领域众所周知的(例如,Olaparib、ABT-888、BSI-201、BGP-15(N-基因研究实验室公司(N-Gene Research Laboratories, Inc.));INO-1001(伊诺特克制药公司(Inotek Pharmaceuticals Inc.));PJ34(Soriano等人,2001;Pacher等人,2002b);3-氨基苯甲酰胺(Trevigen公司(Trevigen));4-氨基-1,8-萘二甲酰亚胺;(Trevigen公司);6(5H)-菲啶酮(Trevigen公司);苯甲酰胺(美国专利Re.36,397);以及NU1025(Bowman等人)。作用机制通常与PARP抑制剂与PARP结合并降低其活性的能力有关。PARP催化 β -烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)转化为烟酰胺和聚-ADP-核糖(PAR)。聚(ADP-核糖)和PARP都与转录调控、细胞增殖、基因组稳定性和致癌作用有关(Bouchard V.J.等人《实验血液学(Experimental Hematology)》,第31卷,第6期,2003年6月,第446-454(9)页;Herceg Z.;Wang Z.-Q.《突变研究/诱变的基本和分子机制(Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis)》,第477卷,第1期,2001年6月2日,第97-110(14)页)。聚(ADP-核糖)聚合酶1(PARP1)是修复DNA单链断裂(SSB)的关键分子(de Murcia J.等人1997.《美国国家科学院院刊》94:7303-7307;Schreiber V、Dantzer F、Ame J C、de Murcia G(2006)《分子细胞生物学自然综述(Nat Rev Mol Cell Biol)》7:517-528;Wang Z Q等人(1997)《基因与发育(Genes Dev)》11:2347-2358)。通过抑制PARP1功能来敲除SSB修复诱导DNA双链断裂(DSB),所述DNA双链断裂可以在具有缺陷的同源定向DSB修复的癌细胞中引发合成杀伤力(Bryant H E等人(2005)《自然》434:913-917;Farmer H等人(2005)《自然》434:917-921)。前述化学治疗剂的实例是说明性的,并且不旨在是限制性的。

[0396] 在另一个实施例中,使用放射疗法。放射疗法中使用的放射可以是电离放射。放射疗法还可以是 γ 射线、X射线或质子束。放射疗法的实例包含但不限于外束放射疗法、放射性同位素(I-125、钷、铈)的间质植入、如镭-89等放射性同位素、胸部放射疗法、腹膜内P-32放射疗法和/或全腹部和盆腔放射疗法。有关放射疗法的一般概述,参见Hellman,第16章:《癌症管理原则:放射疗法(Principles of Cancer Management:Radiation Therapy)》,第6版,2001,DeVita等人,编辑,宾夕法尼亚州的利平科特公司(J.B.Lippencott Company, Philadelphia)。放射疗法可以作为外部束放射或远距放射疗法来施用,其中放射是从远程源引导的。放射治疗还可以作为内部疗法或近距离放射治疗来施用,其中放射源被放置在身体内部靠近癌细胞或肿瘤块。还涵盖光动力疗法的使用,光动力疗法包括施用光敏剂,如

血卟啉和其衍生物、维替泊芬 (Vertoporphin) (BPD-MA)、酞菁、光敏剂Pc4、去甲氧基-次氯酚A;以及2BA-2-DMHA。

[0397] 在另一个实施例中,使用激素疗法。激素治疗性处理可以包括例如激素激动剂、激素拮抗剂(例如氟他胺(flutamide)、比卡鲁胺(bicalutamide)、他莫昔芬(tamoxifen)、雷洛昔芬(raloxifene)、醋酸亮丙瑞林(leuprolide acetate) (LUPRON)、LH-RH拮抗剂)、激素生物合成和加工抑制剂和类固醇(例如地塞米松、类维生素A、三角肌、倍他米松、皮质醇、可的松(cortisone)、泼尼松、脱氢睾酮、糖皮质激素、盐皮质激素、雌激素、睾酮、孕激素)、维生素A衍生物(例如,全反式维甲酸(ATRA));维生素D3类似物;抗雌激素(例如,米非司酮(mifepristone)、奥那司酮(onapristone))或抗雄激素(例如,醋酸环丙孕酮(cyproterone acetate))。

[0398] 用疗法的治疗的持续时间和/或剂量可以根据具体的治疗剂或其组合而变化。熟练的技术人员将理解特定癌症治疗剂的适当治疗时间。本公开考虑持续评估每种癌症治疗剂的最佳治疗方案,其中通过本公开所涵盖的方法确定的受试者癌症的表型是确定最佳治疗剂量和方案的一个因素。

[0399] 用于将多核苷酸引入哺乳动物、人或非人或其细胞中的任何方式都可以适于本发明的实践,以将本公开所涵盖的各种构建体递送到预期的接受者中。在本公开所涵盖的一个实施例中,DNA构建体通过转染递送到细胞,即通过递送“裸”DNA或在具有胶体分散系统的复合物中。胶体系统包含大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠粒,以及基于脂质的系统,包含水包油乳剂、胶束、混合胶束和脂质体。本发明优选的胶体系统是脂质复合的或脂质体调配的DNA。在前一种方法中,在例如用脂质调配DNA之前,可以首先以实验方式优化含有携带期望DNA构建体的转基因的质粒以用于表达(例如,在5'非翻译区包含内含子并消除不必要的序列(Felgner等人,《纽约科学院年报(Ann NY Acad Sci)》126-139,1995)。例如用各种脂质或脂质体材料调配DNA然后可以使用已知的方法和材料来实现并递送到受体哺乳动物。参见例如Canonica等人,《美国呼吸系统细胞和分子生物学杂志(Am J Respir Cell Mol Biol)》10:24-29,1994;Tsan等人,《美国生理学杂志(Am J Physiol)》268;Alton等人《自然遗传学(Nat Genet.)》5:135-142,1993和Carson等人的美国专利第5,679,647号。

[0400] 脂质体的靶向可以基于解剖学和机械学因素进行分类。解剖学分类基于选择性水平,例如器官特异性、细胞特异性和细胞器特异性。机械靶向可以基于所述机械靶向是被动的还是主动的来区分。被动靶向利用脂质体的自然趋势分布到器官中的网状内皮系统(RES)的细胞,所述器官含有正弦毛细血管。另一方面,主动靶向涉及通过将脂质体与特定配体如单克隆抗体、糖、糖脂或蛋白质偶联或通过改变脂质体的组成或大小来改变脂质体,以便实现对器官和细胞类型,而不是自然发生的定位位点的靶向。

[0401] 靶向递送系统的表面可以多种方式进行修饰。在脂质体靶向递送系统的情况下,可以将脂质基团掺入脂质体的脂质双层中以保持靶向配体与脂质体双层稳定结合。各种连接基团可以用于将脂质链与靶向配体连接。可以将裸DNA或与递送媒剂例如脂质体相关的DNA施用于受试者的若干个位点(参见下文)。

[0402] 核酸可以在任何期望的载体中递送。这些包含病毒或非病毒载体,包含腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体和质粒载体。示例性病毒类型包含HSV(单纯疱疹病毒)、AAV(腺相关病毒)、HIV(人免疫缺陷病毒)、BIV(牛免疫缺陷病毒)和MLV

(鼠白血病毒)。核酸可以以提供足够有效递送水平的任何期望形式施用,包含以病毒颗粒、脂质体、纳米颗粒和与聚合物复合的形式。

[0403] 编码所关注的蛋白质或核酸的核酸可以在质粒或病毒载体或本领域已知的其它载体中。此类载体是众所周知的并且可以针对特定应用进行选择。在本公开所涵盖的一个实施例中,基因递送媒介剂包括启动子和脱甲基酶编码序列。优选的启动子是组织特异性启动子和被细胞增殖激活的启动子,如胸苷激酶和胸苷酸合酶启动子。其它优选的启动子包含可通过病毒感染激活的启动子,如 α -和 β -干扰素启动子以及可通过如雌激素等激素激活的启动子。可以使用的其它启动子包含莫洛尼病毒LTR、CMV启动子和小鼠白蛋白启动子。启动子可以是组成性的或诱导型的。

[0404] 在另一个实施例中,裸多核苷酸分子可以用作基因递送媒介剂,如WO 90/11092和美国专利5,580,859中所描述的。此类基因递送媒介剂可以是生长因子DNA或RNA,并且在某些实施例中,与杀伤的腺病毒相关。Curiel等人,《人类基因疗法 (Hum. Gene. Ther.)》3:147-154, 1992。可以任选使用的其它媒介剂包含DNA-配体(Wu等人,《生物化学杂志 (J. Biol. Chem.)》264:16985-16987, 1989)、脂质-DNA组合(Felgner等人,《美国国家科学院院刊》84:7413-7417, 1989)、脂质体(Wang等人,《美国国家科学院院刊》84:7851-7855, 1987)和微粒(Williams等人,《美国国家科学院院刊》88:2726-2730, 1991)。

[0405] 基因递送媒介剂可以任选地包括如病毒复制起点或包装信号等一种或多种病毒序列。这些病毒序列可以选自病毒如星状病毒、冠状病毒、正粘病毒、乳多空病毒、副粘病毒、细小病毒、小核糖核酸病毒、痘病毒、逆转录病毒、披膜病毒或腺病毒。在优选的实施例中,生长因子基因递送媒介剂是重组逆转录病毒载体。许多参考文献中描述了重组逆转录病毒和其各种用途,包含例如Mann等人,《细胞》33:153, 1983, Cane和Mulligan,《美国国家科学院院刊》81:6349, 1984, Miller等人,《人类基因疗法》1:5-14, 1990, 美国专利第4,405,712号、第4,861,719号和第4,980,289号以及PCT申请号WO 89/02,468、WO 89/05,349和WO 90/02,806。在本公开中可以使用多种逆转录病毒基因递送媒介剂,包含例如在以下中描述的那些:EP 0,415,731;WO 90/07936;WO 94/03622;WO 93/25698;WO 93/25234;美国专利第5,219,740号;WO 9311230;WO 9310218;Vile和Hart,《癌症研究》53:3860-3864, 1993;Vile和Hart,《癌症研究》53:962-967, 1993;Ram等人,《癌症研究》53:83-88, 1993;Takamiya等人,《神经科学研究杂志 (J. Neurosci. Res.)》33:493-503, 1992;Baba等人,《神经外科杂志 (J. Neurosurg.)》79:729-735, 1993 (美国专利第4,777,127号、GB 2,200,651、EP 0,345,242和WO91/02805)。

[0406] 可以用于递送本公开所涵盖的多核苷酸的其它病毒载体系统已经衍生自疱疹病毒,例如单纯疱疹病毒(1997年5月20日发布的Woo等人的美国专利第5,631,236号和Neurovex的WO 00/08191)、牛痘病毒(Ridgeway (1988) Ridgeway, “哺乳动物表达载体 (Mammalian expression vectors)”于:Rodriguez R L, Denhardt D T, 编辑“载体:分子克隆载体和其用途的综述 (Vectors: A survey of molecular cloning vectors and their uses)”斯通哈姆:巴特沃斯出版社 (Stoneham: Butterworth; Baichwal和Sugden (1986) “来自动物DNA病毒的基因转移载体:转移基因的瞬时和稳定表达 (Vectors for gene transfer derived from animal DNA viruses: Transient and stable expression of transferred genes)”于:Kucherlapati R, 编辑《基因转移 (Gene transfer.)》纽约:普莱

南出版社 (New York:Plenum Press);Coupar等人 (1988)《基因Gene》,68:1-10)以及若干种RNA病毒。优选的病毒包含甲病毒、痘病毒、沙粒病毒、牛痘病毒、脊髓灰质炎病毒等。所述病毒为各种哺乳动物细胞提供了若干个吸引人的特征 (Friedmann (1989)《科学》,244:1275-1281;Ridgeway,1988 (同上);Baichwal和Sugden,1986 (同上);Coupar等人,1988;Horwich等人 (1990)《病毒学杂志》,64:642-650)。

[0407] 在其它实施例中,基因组中的靶DNA可以使用本领域众所周知的方法进行操作。例如,基因组中的靶DNA可以通过缺失、插入和/或突变进行操作是逆转录病毒插入、人工染色体技术、基因插入、使用组织特异性启动子进行的随机插入、基因靶向、转座子和/或任何其它用于引入外源DNA或产生经修饰DNA/经修饰核DNA的方法。其它修饰技术包含从基因组中缺失DNA序列和/或改变核DNA序列。例如,可以通过定点诱变改变核DNA序列。

[0408] 在其它实施例中,可以将重组生物标志多肽和其片段施用于受试者。在一些实施例中,可以构建和施用具有增强的生物学特性的融合蛋白。另外,可以根据本领域众所周知的药理学方法 (例如,聚乙二醇化、糖基化、寡聚化等) 对生物标志多肽和其片段进行修饰,以进一步增强期望的生物活性,如增加的生物利用度和减少的蛋白水解降解。

[0409] 2. 测定和筛选方法

[0410] 本公开所涵盖的另一方面涉及筛选测定,包含基于非细胞的测定和异种移植动物模型测定。在一个实施例中,测定提供了一种用于鉴定调节KIR3DL3信号传导的药剂的方法,如在人或动物模型测定中,以便鉴定降低KIR3DL3信号传导从而增加免疫应答的药剂和/或鉴定增加KIR3DL3信号传导从而降低免疫应答的药剂。

[0411] 在一个实施例中,本公开涉及用于筛选与本文 (例如,在表格、附图、实例中或在说明书中以其它方式) 所描述的至少一种生物标志物如HHLA2、TMIGD2和KIR3DL3结合或调节其生物活性的测试药剂的测定。在一个实施例中,一种用于鉴定此类药剂的方法需要确定药剂调节,例如抑制至少一种本文所描述的生物标志物的能力。

[0412] 在一个实施例中,测定是无细胞或基于细胞的测定,包括将至少一种本文所描述的生物标志物与测试药剂接触,并且确定测试药剂调节 (例如,抑制) 生物标志物的酶活性的能力,如通过测量底物的直接结合或测量如下文所描述的间接参数。

[0413] 例如,在直接结合测定中,生物标志蛋白 (或它们相应的靶多肽或分子) 可以与放射性同位素或酶标记物偶联,从而可以通过检测复合物中的标记蛋白质或分子来确定结合。例如,可以直接或间接地用¹²⁵I、³⁵S、¹⁴C或³H标记靶标,并且通过辐射发射的直接计数或闪烁计数来检测放射性同位素。可替代地,可以用例如辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶或荧光素酶对靶标进行酶标记,并且通过确定合适的底物向产物的转化来检测酶标记。还可以使用标准结合或酶分析测定来确定生物标志物与底物之间的相互作用。在上文所描述的测定方法的一个或多个实施例中,可能期望固定多肽或分子以促进复合形式与未复合形式的蛋白质或分子中的一个或两个的分离,并且适应测定的自动化。

[0414] 可以在任何适用于容纳反应物的容器中完成测试药剂与靶标的结合。此类容器的非限制性实例包含微量滴定板、试管和微量离心管。本文所描述的固定化形式的抗体还可以包含与固相结合的抗体,如多孔、微孔 (平均孔径小于约1微米) 或大孔 (平均孔径大于约10微米) 材料,如膜、纤维素、硝化纤维素或玻璃纤维;珠粒,如由琼脂糖或聚丙烯酰胺或乳胶制成的珠粒;或盘子、板或孔的表面,如由聚苯乙烯制成的表面。

[0415] 在替代性实施例中,确定药剂调节生物标志物与底物或生物标志物与其天然结合配偶体之间的相互作用的能力可以通过确定测试药剂调节多肽或其它在其信号途径(例如,反馈回路)内的位置下游或上游发挥作用的产物的活性的能力来完成。此类反馈回路在本领域中是众所周知的(参见例如Chen和Guillemin(2009)《国际色氨酸研究杂志(Int.J.Tryptophan Res.)》2:1-19))。

[0416] 可以使用本文所描述的抗KIR3DL3抗体测量KIR3DL3状态。KIR3DL3与HHLA2结合的减少表明所述药剂抑制KIR3DL3活性/信号传导,并且鉴定药剂可用于抑制KIR3DL3活性/信号传导和增加免疫应答。相比之下,KIR3DL3与HHLA2结合的增加表明所述药剂促进KIR3DL3活性/信号传导,并且鉴定药剂可用于促进KIR3DL3活性/信号传导和减少免疫应答。

[0417] 本公开进一步涉及通过上文所描述的筛选测定鉴定的新型药剂。因此,进一步使用如本文所描述的鉴定的药剂在本发明的范围内,如在适当的动物模型中。例如,如本文所描述的鉴定的药剂可以用于动物模型以确定用此类药剂治疗的功效、毒性或副作用。可替代地,如本文所描述的鉴定的抗体可以用于动物模型以确定此类药剂的作用机制。

[0418] 本公开所涵盖的一方面涉及筛选测定,所述筛选测定包含基于非细胞的测定和异种移植动物模型测定。在一个实施例中,测定提供了一种用于如在人中通过使用异种移植动物模型测定来鉴定癌症是否可能响应抗KIR3DL3抗体疗法和/或药剂是否可以抑制不太可能响应抗KIR3DL3抗体疗法的癌细胞的生长或对其杀伤的方法。

[0419] 3. 预防方法

[0420] 一方面,本公开提供了用于在受试者中预防与不希望的或不太期望的免疫应答相关的疾病或病症的方法。例如,可以通过本领域已知的任何诊断或预后测定或其组合来鉴定将受益于使用要求保护的药剂或方法进行治疗的有疾病风险的受试者。预防剂的施用可以在与不希望的或不太期望的免疫应答相关的症状出现之前发生。用于治疗的合适药剂(例如,抗体、肽、融合蛋白或小分子)可以基于临床适应症确定并且可以例如使用本文所描述的筛选测定来鉴定。

[0421] 4. 预后测定

[0422] 此外,本文所描述的检测方法可以用于鉴定将对某种疗法有应答的受试者,如靶向KIR3DL3的疗法,用于调节与如HHLA2等结合配偶体的活性和/或相互作用。类似地,本文所描述的预后测定可以用于确定是否可以向受试者施用用于治疗与KIR3DL3活性过多或过少相关的此类病症的药剂(例如,激动剂、拮抗剂、肽模拟物、多肽、肽、核酸、小分子或其它候选药物)。例如,此类方法可以用于确定受试者是否可以用一种药剂或药剂组合进行有效治疗。因此,本公开提供了用于确定受试者是否可以用一种或多种用于治疗与KIR3DL3活性过多或过少相关的病症的药剂有效治疗的方法,其中获得测试样品并且检测KIR3DL3。测试样品可以是所关注的受试者获得的生物样品。测试样品可以从所关注的受试者获得。例如,样品可以是生物流体(例如,脑脊液或血清)、细胞样品或组织,如肿瘤微环境、瘤周区域和/或瘤内区域的组织病理学载玻片。在一些实施例中,测试样品可以包括表达成熟的膜结合的KIR3DL3和/或KIR3DL3片段的细胞。

[0423] 本文所描述的方法可以例如通过使用包括至少一种本文所描述的抗体试剂的预包装的诊断试剂盒来进行,所述预包装的诊断试剂盒可以方便地用于例如在临床环境中预测表现出症状或家族史的疾病或涉及KIR3DL3的疾病的患者。

[0424] 此外,表达KIR3DL3的任何细胞类型或组织可以用于本文所描述的预后测定。

[0425] 本公开的另一方面包含本文所描述的组合物和方法用于关联和/或分层分析的用途,其中对来自患有与KIR3DL3活性过多或过少相关的病症的个体的生物样品中的KIR3DL3进行分析,并且将所述信息与对照(例如,未患有所述病症的个体;对照也可以称为“健康”或“正常”个体或在给定延时研究中的早期时间点)的信息进行比较,所述对照优选地具有类似的年龄和种族。可替代地,对照可以是患有KIR3DL3活性过多或过少的病症的个体,所述个体对靶向KIR3DL3的疗法,例如调节KIR3DL3活性或KIR3DL3与其结合配偶体中的一个或多个相互作用的疗法响应良好。由于在一些实施例中适当的患者和对照的选择对于关联和/或分层研究是有用的,因此可能期望具有包含一组具有良好表征的表型的个体是非常令人期望的。不同的研究设计可以用于分层研究(《现代流行病学(Modern Epidemiology)》,利平科特·威廉斯和威尔金斯出版公司(Lippincott Williams & Wilkins)(1998),609-622)。

[0426] VII. 药物组合物

[0427] 包含例如阻断抗体、肽、融合蛋白或小分子的调节(例如,抑制或促进)KIR3DL3与如HHLA2等一种或多种天然结合配偶体之间相互作用的药剂可以掺入适合施用于受试者的药物组合物。此类药物组合物可以进一步包含另外的组分和/或治疗剂,如本文所描述的那些。药物组合物通常包括一种或多种药剂和药学上可接受的载体。如本文所使用的,语言“药学上可接受的载体”旨在包含与药物施用相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂以及吸附延迟剂等。将这种培养基和药剂用于具有药学活性的物质在本领域中是熟知的。除非任何常规介质或试剂与活性化合物不相容,否则考虑其在组合物中的用途。补充的活性化合物也可以并入这些组合物中。

[0428] 本公开所涵盖的药物组合物被调配成与其预期的施用途径相容。施用途径的实例包含肠胃外,例如静脉内、皮内、皮下、口服(例如,吸入)、经皮(局部)、经粘膜和直肠施用。用于胃肠外应用、皮内应用或皮下应用的溶液或悬浮液可以包含以下组分:无菌稀释剂,如注射用水、盐水溶液、不挥发性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其它合成溶剂;抗菌剂,如苯醇或对羟苯甲酸甲酯;抗氧化剂,如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,如乙二胺四乙酸;缓冲剂,如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;以及用于调节张力的试剂,如氯化钠或葡萄糖。可用酸或碱调节pH,如盐酸或氢氧化钠。肠胃外制剂可以封闭在安瓿、一次性注射器或由玻璃或塑料制成的多个剂量小瓶中。

[0429] 适于可注射使用的药物组合物包含无菌水溶液(当水溶性时)或分散液和用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。对于静脉内施用,合适的载体包含生理盐水、抑菌水、Cremophor ELTM(新泽西州帕西波尼市的巴斯夫公司(BASF, Parsippany, NJ))或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,组合物应该是无菌的并且应当具有达到容易注射的程度的流动性。其必须在制造和存储的条件下稳定并且应被保存以免遭微生物如细菌和真菌的污染作用。载体可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。可以例如通过使用如卵磷脂的包衣、通过在分散情况下保持所需粒度以及通过使用表面活性剂来保持适当的流动性。防止微生物的作用可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂(例如,对羟苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等)来实现。在许多情况下,优选的是,在组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇(如甘露醇、

山梨醇)、氯化钠。可以通过在组合物中包含延迟吸收的药剂(例如,单硬脂酸铝和明胶)来实现可注射组合物的延长吸收。

[0430] 根据需要,可以通过将活性化合物以所需量并入具有以上列举的组分中的一种或组合的适当溶剂中、随后进行无菌过滤来制备无菌可注射溶液。通常,分散液通过将活性化合物掺入无菌媒介物中来制备,该无菌媒介物含有基础分散介质以及来自以上列举的那些成分的所需其它成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,所述方法从其先前的无菌过滤溶液中产生活性成分和任何其它所希望的成分的粉末。

[0431] 口服的组合物通常包含惰性稀释剂或可食用的载体。它们可以被封装在明胶胶囊中或被压缩成片剂。出于口服治疗性施用的目的,可以将活性化合物与赋形剂一起掺入并且以片剂、锭剂或胶囊剂的形式使用。口服组合物也可以使用用作漱口水的流体载体来制备,其中将在流体载体中的化合物口服施用并且漱口(swished)并且吐出或吞咽。可以包含药学上相容的粘结剂和/或佐剂材料作为组合物的一部分。片剂、丸剂、胶囊、锭剂等可以含有以下成分中的任一种或具有类似性质的化合物:粘合剂,如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂,如淀粉或乳糖;崩解剂,如海藻酸、Primogel或玉米淀粉;如硬脂酸镁或氢化植物油(Sterotes)等润滑剂;如胶态二氧化硅等助流剂;如蔗糖或糖精等甜味剂;或调味剂,如薄荷、水杨酸甲酯、或橙味调味剂。

[0432] 对于通过吸入施用,化合物从含有适合的推进剂,例如气体(如二氧化碳)的加压容器或分配器或者从雾化器以气溶胶喷雾形式递送。

[0433] 也可以通过经粘膜或透皮的方式进行全身施用。对于透粘膜或透皮施用,在配制品中使用适于待被渗透的屏障的渗透剂。此类渗透剂通常是本领域中已知的并且包含例如就经粘膜施用而言洗涤剂、胆盐和梭链孢酸衍生物。透粘膜施用可以通过使用鼻喷雾剂或栓剂来实现。对于经皮施用,将活性化合物配制成软膏剂、油膏剂、凝胶剂或乳膏剂,如本领域通常已知的。

[0434] 组合物也可以制备成栓剂形式(例如,用常规的栓剂基质,如可可脂和其它甘油酯)或用于直肠递送的保留灌肠剂。

[0435] 在一个实施例中,将调节剂与将保护这些化合物免于从体内快速消除的载剂一起制备,如控释调配物,包含植入物和微囊化的递送系统。可以使用可生物降解、生物相容的聚合物,如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯、和聚乳酸。用于制备此类调配物的方法对本领域的技术人员而言应是显而易见的。这些材料也可以从阿尔扎公司(Alza Corporation)和新星制药有限公司(Nova Pharmaceuticals, Inc.)商购获得。脂质体悬浮液(包含以抗病毒抗原的单克隆抗体靶向受感染细胞的脂质体)也可以用作药学上可接受的载体。这些可以根据本领域的技术人员已知的例如美国专利第4,522,811号中描述的方法来制备。

[0436] 尤其有利的是以剂量单位形式配制口服或肠胃外组合物以便于施用和剂量统一。如本文所用,剂量单位形式是指作为针对有待治疗的受试者的单一剂量适合的物理上离散单位;每单位含有经计算以与所需的药物载体的联合产生所期望的治疗效果的预定量的活性化合物。本公开所涵盖的剂量单位形式的规格由活性化合物的独特特性、待实现的特定治疗效果以及本领域中在混配这种活性化合物以用于治疗个体时固有的局限性决定并且

直接依赖于此。

[0437] 此类化合物的毒性和治疗功效可以通过细胞培养物或实验动物中的标准制药程序测定,例如以测定LD50(对50%群体致死的剂量)和ED50(对50%群体治疗有效的剂量)。毒性作用与治疗作用之间的剂量比为治疗指数并且治疗指数可被表示为比值LD50/ED50。优选那些表现出大的治疗指数的化合物。尽管可以使用展现出有毒副作用的化合物,但是应该注意设计将此类化合物靶向到受影响组织的部位的递送系统,从而使对未感染细胞的潜在损伤最小化并由此减少副作用。

[0438] 从细胞培养测定和动物研究获得的数据可以用于配制用于在人类中使用的一系列剂量。此类化合物的剂量优选地处于包含ED50在内的具有很小毒性或没有毒性的循环浓度范围内。剂量可以在该范围内变化,这取决于所使用的剂型和使用的施用途径。对于用于本公开所涵盖的方法的任何化合物,均可根据细胞培养试验初步估计治疗有效剂量。在动物模型中可以将剂量调配为实现包含如在细胞培养中测定的IC50(即,测试化合物的实现症状的半数最大抑制的浓度)在内的循环血浆浓度范围。此类信息可以用于更精确地确定可用于人的剂量。可以测量血浆中的水平,例如通过高效液相层析。

[0439] 上文所描述的调节剂可以以编码所述药剂的可表达核酸的形式施用。此类核酸和包含所述核酸的组合物也涵盖在本公开中。例如,本公开所涵盖的核酸分子可以插入载体并且用作基因疗法载体。基因疗法载体可以通过例如以下方式递送到受试者:静脉注射、局部施用(参见美国专利5,328,470)或通过立体定向注射(参见例如Chen等人(1994)《美国国家科学院院刊》91:3054-3057)。基因疗法载体的药物制剂可以包含在可接受的稀释剂中的基因疗法载体,或者可以包括嵌入基因递送媒剂的缓释基质。可替代地,在完全的基因递送载体可以从例如逆转录病毒载体的重组细胞完整地产生的情况下,药物制品可以包含产生基因递送系统的一个或多个细胞。

[0440] 药物组合物可以与施用说明书一起包含在容器、包装或分配器中。

[0441] VIII. 药剂施用

[0442] 本公开所涵盖的免疫调节剂以适合于体内药物施用的生物相容形式施用于受试者,以增强或抑制免疫细胞介导的免疫应答。“适合于体内施用的生物相容形式”意指待施用的蛋白质的形式,其中任何毒性作用都超过了蛋白质的治疗作用。如本文所描述的药剂的施用可以是任何药理学形式,包含单独地或与药学上可接受的载体组合的治疗有效量的药剂。

[0443] 本公开所涵盖的治疗组合物的治疗活性量的施用被定义为在必要的剂量下和时间段内有效达到期望结果的量。例如,药剂的治疗活性量可以根据如个体的疾病状态、年龄、性别和重量等因素以及肽在个体中引发期望的应答的能力而变化。剂量方案可以调整以提供最佳的治疗应答。例如,可以每天施用若干个分开的剂量,或者剂量可以成比例减少,如治疗情况的迫切情况所指示的。

[0444] 本文所描述的药剂或发明可以以方便的方式施用,如通过注射(皮下、静脉内等)、口服施用、吸入、透皮应用或直肠施用。根据施用途径,活性化合物可以包被在材料中,以保护所述化合物免受酶、酸和可能使所述化合物失活的其它自然条件的作用。例如,对于药剂的施用,除了肠胃外施用外,可能期望用一种材料包被药剂或与药剂共同施用以防止其失活。

[0445] 可以在适当的载体、稀释剂或佐剂中将药剂施用于个体,与酶抑制剂共施用或在如脂质体等适当的载体中施用。药学上可接受的稀释剂包含盐水和水性缓冲溶液。佐剂以其最广泛的意义使用,并且包含如干扰素等任何免疫刺激化合物。本文考虑的佐剂包含间苯二酚、非离子表面活性剂如聚氧乙烯油基醚和正十六烷基聚乙醚。酶抑制剂包含胰蛋白酶抑制剂、氟磷酸二异丙酯(DEEP)和抑肽酶。脂质体包含水包油包水乳液以及常规脂质体(Sterna等人(1984)《神经免疫学期刊(J.Neuroimmunol.)》7:27)。

[0446] 还可以在甘油、液体聚乙二醇和其混合物中以及在油中制备分散体。在平常的储存和使用条件下,这些制品可含有防止微生物生长的防腐剂。

[0447] 适合于可注射用途的药剂的药物组合物包含无菌水溶液(在水溶性的情况下)或分散体以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散液的无菌粉末。在所有情况下,组合物将优选地是无菌的并且必须具有达到容易注射的程度的流动性。组合物在制造和储存条件下将优选地是稳定的并且可以抗如细菌和真菌等微生物的污染作用而保存。载体可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。可以例如通过使用如卵磷脂的包衣、通过在分散情况下保持所需粒度以及通过使用表面活性剂来保持适当的流动性。防止微生物的作用可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂(例如,对羟苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等)来实现。在许多情况下,优选的是,在组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇(如甘露醇、山梨醇)、氯化钠。可以通过在组合物中包含延迟吸收的药剂(例如,单硬脂酸铝和明胶)来实现可注射组合物的延长吸收。

[0448] 根据需要,可以通过将本公开所涵盖的药剂(例如,抗体、肽、融合蛋白或小分子)以所需量并入具有以上列举的组分中的一种或组合的适当溶剂中、随后进行无菌过滤来制备无菌可注射溶液。通常,分散液通过将活性化合物掺入无菌媒介物中来制备,该无菌媒介物含有基础分散介质以及来自以上列举的那些成分的所需其它成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,所述方法从其先前的无菌过滤溶液产生具有药剂和任何另外的期望成分的粉末。

[0449] 当药剂被合适地保护时,如上文所描述的,蛋白质可以例如与惰性稀释剂或可同化的可食用载体一起口服施用。如本文所使用的“药学上可接受的载体”包含任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂以及吸收延迟剂等。将这种培养基和药剂用于具有药学活性的物质在本领域中是熟知的。除非任何常规介质或药剂与活性化合物不相容,否则考虑其在治疗性组合物中的用途。补充的活性化合物也可以并入这些组合物中。

[0450] 为了易于施用以及剂量的均一性,以剂量单位形式配制肠胃外组合物是特别有利的。如本文所使用的,“剂量单位形式”是指适于作为用于待治疗的哺乳动物受试者的单一剂量的物理上离散的单位;每单位含有经计算以与所需的药物载体的联合产生所期望的治疗效果的预定量的活性化合物。针对本公开所涵盖的剂量单位形式的规格受制于并直接取决于:(a)活性化合物的独特特性和要实现的特定治疗效果,和(b)个体敏感性对复合用于治疗的本类活性化合物造成的本领域固有限制。

[0451] 在一个实施例中,本公开所涵盖的药剂是抗体。如本文所定义的,抗体的治疗有效量(即有效剂量)范围为约0.001到100mg/kg体重,优选地约0.01到25mg/kg体重,更有优选地约0.1到20mg/kg体重并且甚至更优选地约1到10mg/kg、2到9mg/kg、3到8mg/kg、4到7mg/

kg或5到6mg/kg体重。本领域技术人员将理解,某些因素可能影响有效治疗受试者所需的剂量,这些因素包含但不限于疾病或病症的严重性、之前的治疗、所述受试者的总体健康和/或年龄以及存在的其它疾病。此外,用治疗有效量的抗体治疗受试者可以包含单一治疗,或优选地,可以包含一系列治疗。在优选的实例中,受试者用介于约0.1到20mg/kg体重范围内的抗体治疗,每周一次,持续约1到10周,优选地2到8周,更优选地约3周到7周,并且甚至更优选地约4、5或6周。还应理解,用于治疗抗体的有效剂量可以在特定治疗过程中增加或减少。剂量的变化可能来自诊断测定的结果。

[0452] 如上文所描述的,在一些实施例中,用于施用的药剂是基于细胞的。基于细胞的药剂与受试者宿主具有免疫相容性关系,并且任何此类关系都根据本公开被考虑供使用。例如,如过继性T细胞等细胞可以是同源的。术语“同基因”可以指源自、起源于或成为遗传相同的同一物种的成员的状态,特别是在抗原或免疫反应方面。这些包含具有匹配MHC类型的同卵双胞胎。因此,“同基因移植”是指将细胞从供体转移到与供体在遗传上相同或免疫学上足够相容的受体,以允许移植而没有不期望的不良免疫原性应答(例如,对本文所描述的免疫筛选结果的解释起作用的应答)。

[0453] 如果转移的细胞是从同一受试者获得并移植到同一受试者,则同基因移植可以是“自体的”。“自体移植”是指受试者自身细胞或器官的采集和再输注或移植。自体细胞的排他性或补充性使用可以消除或减少将细胞施用回宿主的许多不利影响,特别是移植对于宿主反应。

[0454] 如果转移的细胞是从同一物种的不同成员中获得并移植到同一物种的不同成员中,但其主要组织相容性复合物(MHC)抗原足够匹配以避免不利的免疫原性应答,则同基因移植可以是“匹配的同种异体”。可以根据本领域已知和使用的标准测试来完成确定MHC错配的程度。例如,人中至少有六种主要的MHC基因,被鉴定为在移植生物学中很重要。HLA-A、HLA-B、HLA-C编码HLA I类蛋白,而HLA-DR、HLA-DQ和HLA-DP编码HLA II类蛋白。这些组中的每个组内的基因都具有高度多态性,如反映在人群中发现的众多HLA等位基因或变体中,并且这些组中个体之间的差异与针对移植细胞的免疫应答强度相关。用于确定MHC匹配程度的标准方法检查HLA-B和HLA-DR或HLA-A、HLA-B和HLA-DR组内的等位基因。因此,可以分别对两个或三个HLA组内的至少4个,甚至5个或6个MHC抗原进行测试。在血清学MHC测试中,针对每种HLA抗原类型的抗体与来自一名受试者(例如,供体)的细胞发生反应,以确定存在或不存在与抗体反应的某些MHC抗原。这与其它受试者(例如,接受者)的反应概况进行比较。抗体与MHC抗原的反应通常通过将抗体与细胞一起温育,然后添加补体以诱导细胞裂解(即淋巴细胞毒性测试)来确定。根据反应中裂解的细胞量检查和分级反应(参见例如Mickelson和Petersdorf(1999)《造血细胞移植(Hematopoietic Cell Transplantation)》,Thomas,E.D.等人编辑,第28-37页,马萨诸塞州马尔登的布莱克威尔科学出版社(Blackwell Scientific,Malden,Mass.))。其它基于细胞的测定包含使用标记抗体的流式细胞术或酶联免疫测定(ELISA)。用于确定MHC类型的分子方法是众所周知的,并且通常采用合成探针和/或引物来检测编码HLA蛋白的特定基因序列。合成寡核苷酸可以用作杂交探针以检测与特定HLA类型相关的限制性片段长度多态性(Vaughn(2002)《分子生物学方法(Method.Mol.Biol.)》MHC方案210:45-60)。可替代地,引物可以用于扩增HLA序列(例如,通过聚合酶链反应或连接链反应),其产物可以通过直接DNA测序、限制性片段多态

性分析(RFLP)或与一系列序列特异性寡核苷酸引物(SSOP)杂交来进一步检查(Petersdorf等人(1998)《血液(Blood)》92:3515-3520;Morishima等人(2002)《血液》99:4200-4206;以及Middleton和Williams(2002)《分子生物学方法》MHC方案210:67-112)。

[0455] 如果转移的细胞和受试者的细胞在如单个基因座等定义的基因座方面不同,通常通过近交,则同基因移植可以是“同类”。术语“同类”是指衍生自、起源于或成为同一物种的成员,其中除了小的遗传区,成员在遗传上是相同的,通常是单个遗传基因座(即,单个基因)。“同类移植”是指将细胞或器官从供体转移到受体,其中受体在遗传上与供体相同,除了单个基因位点。例如,CD45以若干种等位基因形式存在,并且存在同类小鼠品系,其中小鼠品系在是否表达CD45.1或CD45.2等位基因版本方面不同。

[0456] 相比之下,“错配的同种异体”是指源自、起源于或成为具有不同的主要组织相容性复合体(MHC)抗原(即,蛋白质)的同一物种的成员,如通常通过本领域使用的标准测定确定的,如定义数量的MHC抗原的血清学或分子分析,足以引发不良免疫原性应答。“部分错配”是指在成员之间测试的MHC抗原的部分匹配,通常在供体与和受体之间。例如,“半错配”是指测试的50%的MHC抗原在两个成员之间表现出不同的MHC抗原类型。“完全(full或complete)”错配是指测试的所有MHC抗原在两个成员之间不同。

[0457] 类似地,相比之下,“异种”是指衍生自、起源于或成为不同物种的成员,例如人和啮齿动物、人和猪、人和黑猩猩等。“异种移植”是指将细胞或器官从供体转移到受体,其中受体是与供体不同的物种。

[0458] 另外,细胞可以从单一来源或多个来源(例如,单个受试者或多个受试者)获得。多个是指至少两个(例如,超过一个)。在仍另一个实施例中,非人哺乳动物是小鼠。从中获得所关注的细胞类型的动物可以是成年、新生儿(例如,年龄小于48小时)、未成熟或在子宫内。所关注的细胞类型可以是原代癌细胞、癌症干细胞、已建立的癌细胞系、永生化原代癌细胞等。在某些实施例中,宿主受试者的免疫系统可以被工程化或以其它方式选择为与移植的癌细胞免疫相容。例如,在一个实施例中,受试者可以被“人源化”以便与人癌细胞相容。术语“免疫系统人源化”是指包括人HSC谱系细胞和人获得性和先天性免疫细胞的如小鼠等动物在不被宿主动物排斥的情况下存活,从而允许人造血以及获得性和先天性免疫在宿主动物中重建。获得性免疫细胞包含T细胞和B细胞。先天免疫细胞包含巨噬细胞、粒细胞(嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、中性粒细胞)、DC、NK细胞和肥大细胞。代表性的非限制性实例包含SCID-hu、Hu-PBL-SCID、Hu-SRC-SCID、NSG(NOD-SCID IL2r- γ (无效)缺乏先天免疫系统、B细胞、T细胞和细胞因子信号传导)、NOG(NOD-SCID IL2r- γ (截短))、BRG(BALB/c-Rag2(无效) IL2r- γ (无效))和H2dRG(库存-H2d-Rag2(无效) IL2r- γ (无效))小鼠(参见例如Shultz等人(2007)《自然综述免疫学(Nat.Rev.Immunol.)》7:118;Pearson等人(2008)《当前免疫学方案(Curr.Protocol.Immunol.)》15:21;Brehm等人(2010)《临床免疫学(Clin.Immunol.)》135:84-98;McCune等人(1988)《科学》241:1632-1639,美国专利7,960,175和美国专利公开2006/0161996)以及免疫相关基因的相关无效突变体如Rag1(缺乏B和T细胞)、Rag2(缺乏B和T细胞)、TCR α (缺乏T细胞)、穿孔素(cD8+T细胞缺乏细胞毒性功能)、FoxP3(缺乏功能性CD4+T调节细胞)、IL2rg或Prf1以及HLA2、KIR3DL3、TMIGD2、PD-1、PD-L1、Tim3和/或2B4的突变体或敲除,允许将人免疫细胞有效植入和/或提供如小鼠等免疫受损动物的隔室特异性模型(参见例如PCT公开W02013/062134)。另外,NSG-CD34+(NOD-SCID

IL2r- γ (无效)CD34+) 人源化小鼠可用于研究如小鼠等动物模型中的人基因和肿瘤活性。

[0459] 如本文所使用的,从生物材料来源“获得”意指从供体采集或分配生物材料来源的任何常规方法。例如,生物材料可以从实体瘤、如外周血或脐带血样品等血液样品获得或从如骨髓或羊水等另一种体液采集。用于获得此类样品的方法是技术人员众所周知的。在本公开中,样品可以是新鲜的(即,在没有冷冻的情况下从供体获得)。此外,可以进一步处理样品以在扩展之前去除无关的或不需要的组分。样品也可以从保存的库存中获得。例如,在细胞系或如外周血或脐带血等流体的情况下,可以从低温或以其它方式保存的此类细胞系或流体库中提取样品。此类样品可以从任何合适的供体获得。

[0460] 获得的细胞群体可以直接使用或冷冻以备日后使用。用于低温保存的多种介质和方案是本领域已知的。通常,冷冻培养基将包括来自约5-10%的DMSO、10-90%的血清白蛋白和50-90%的培养基。可用于保存细胞的其它添加剂包含例如但不限于如海藻糖等二糖(Scheinkonig等人(2004)《骨髓移植(Bone Marrow Transplant.)》34:531-536)或如羟乙基淀粉(hetastarch)(即,羟乙基淀粉(hydroxyethyl starch))等血浆扩容剂。在一些实施例中,可以使用如磷酸盐缓冲盐水等等渗缓冲溶液。示例性冷冻保存组合物具有含有4% HSA、7.5%二甲基亚砷(DMSO)和2%羟乙基淀粉的细胞培养基。用于冷冻保存的其它组合物和方法在本领域中是众所周知的,并且被描述(参见例如Broxmeyer等人(2003)《美国国家科学院院刊》100:645-650)。细胞在低于约-135℃的最终温度下保存。

[0461] 可以以每千克受试者体重 0.1×10^6 、 0.2×10^6 、 0.3×10^6 、 0.4×10^6 、 0.5×10^6 、 0.6×10^6 、 0.7×10^6 、 0.8×10^6 、 0.9×10^6 、 1.0×10^6 、 5.0×10^6 、 1.0×10^7 、 5.0×10^7 、 1.0×10^8 、 5.0×10^8 或更多或介于两者之间的任何范围或介于两者之间的任何值的细胞施用细胞。移植的细胞数量可以基于在给定时间内期望的移植水平进行调整。通常,必要时可以移植 1×10^5 个到约 1×10^9 个细胞/kg体重、约 1×10^6 个到约 1×10^8 个细胞/kg体重或约 1×10^7 个细胞/kg体重或更多细胞。在某个实施例中,相对于平均大小的小鼠移植至少约 0.1×10^6 、 0.5×10^6 、 1.0×10^6 、 2.0×10^6 、 3.0×10^6 、 4.0×10^6 或 5.0×10^6 个总细胞是有效的。

[0462] 细胞也可以在其它抗癌剂之前、同时或之后施用。

[0463] 如上文所描述的,可以使用本领域通常已知的方法来完成如细胞等药剂的施用,所述方法包含但不限于通过血管内、脑内、肠胃外、腹膜内、静脉内、硬膜外、脊柱内、胸骨内、关节内、滑膜内、鞘内、动脉内、心内或肌肉内、静脉内、皮下、特定组织(例如,局灶性移植)、股骨骨髓腔、脾脏、胎肝模式的肾包膜等。

[0464] 移植细胞的植入可以通过各种方法中的任何方法来评估,如但不限于肿瘤体积、细胞因子水平、施用时间、在移植后的一个或多个时间点从受试者获得的所关注的细胞的流式细胞术分析等。例如,等待1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28天的基于时间的分析或可以发出肿瘤采集时间的信号。任何此类度量是可以根据众所周知的参数进行调整的变量,以确定变量对抗癌免疫疗法的应答的影响。另外,移植的细胞可以与其它药剂共同移植,如细胞因子、细胞外基质、细胞培养支持物等。

[0465] IX. 受试者

[0466] 在一些实施例中,本公开(例如,抗KIR3DL3抗体或其抗原结合片段)用于疗法或免疫调节的受试者是哺乳动物(例如,小鼠、人源化小鼠、大鼠、灵长类动物、非人哺乳动物、家

畜如狗、猫、牛、马等),并且优选地是人。在另一个实施例中,受试者是癌症的动物模型。例如,动物模型可以是人源癌症的原位异种移植动物模型。

[0467] 在本公开所涵盖的方法的另一个实施例中,受试者未接受治疗,如化学疗法、放射疗法、靶向疗法和/或免疫检查点疗法。在仍另一个实施例中,受试者未接受治疗,如化学疗法、放射疗法、靶向疗法和/或免疫检查点疗法。

[0468] 在某些实施例中,受试者已接受外科手术以切除癌或癌前组织。在其它实施例中,癌组织尚未被切除,例如,癌组织可能定位于身体的不可手术区,如在对生命至关重要的组织中或在外外科手术会对患者造成相当大的伤害风险的区。

[0469] 本公开所涵盖的方法可以用于确定对KIR3DL3疗法的应答性和/或治疗受试者的如本文所描述的那些等许多不同癌症。

[0470] X. 样品收集、制备和分离

[0471] 在一些实施例中,将来自受试者的样品中的生物标志物量和/或活性测量结果与预定的对照(标准)样品进行比较。来自受试者的样品通常来自如癌细胞或组织等患病组织。对照样品可以来自同一受试者或来自不同受试者。对照样品通常是正常的、未患病的样品。然而,在一些实施例中,如为了对疾病分期或为了对治疗功效进行评估,对照样品可以来自患病组织。对照样品可以是来自若干个不同受试者的样品的组合。在一些实施例中,将来自受试者的生物标志物量和/或活性测量结果与预定水平进行比较。此预定水平通常从正常样品中获得。如本文所描述的,“预定”生物标志物量和/或活性测量结果可以是用于仅举例来说以下的生物标志物量和/或活性测量结果:对可以被选择用于治疗的受试者(例如,基于基因组突变的数量和/或导致DNA修复基因的非功能性蛋白质的基因组突变的数量)进行评估;对抗KIR3DL3抗体疗法的应答进行评估和/或使用一种或多种另外的抗癌疗法对抗KIR3DL3抗体疗法的应答进行评估。可以在患有或不患有癌症的患者群体中测定预定的生物标志物量和/或活性测量结果。预定的生物标志物量和/或活性测量结果可以是同样适于每个患者的单个数字,或者预定的生物标志物量和/或活性测量结果可以根据患者的特定亚群而变化。受试者的年龄、体重、身高和其它因素可能会影响个体的预定的生物标志物量和/或活性测量结果。此外,可以为每个受试者单独确定预定的生物标志物量和/或活性。在一个实施例中,在本文所描述的方法中确定和/或比较的量基于绝对测量结果。

[0472] 在另一个实施例中,在本文所描述的方法中确定和/或比较的量基于相对测量结果,如比率(例如,治疗前与治疗后的生物标志物拷贝数、水平和/或活性、此类生物标志物测量结果相对于加标或人造对照、此类生物标志物测量结果相对于管家基因的表达等)。例如,相对分析可以基于治疗前生物标志物测量结果与治疗后生物标志物测量结果比较的比率。治疗前生物标志物测量结果可以在开始抗癌疗法之前的任何时间进行。治疗后生物标志物测量结果可以在开始抗癌疗法之后的任何时间进行。在一些实施例中,治疗后生物标志物测量结果在开始抗癌疗法之后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20周或更长时间或用于持续监测的无期限地甚至更长时间进行。治疗可以包括抗癌疗法,如包括单独一种或多种抗KIR3DL3抗体或与如与免疫检查点抑制剂等其它抗癌剂组合的治疗方案。

[0473] 预定的生物标志物量和/或活性测量结果可以是任何合适的标准。例如,预定的生物标志物量和/或活性测量结果可以从为其评估患者选择的相同或不同的人获得。在一个

实施例中,预定的生物标志物量和/或活性测量结果可以从同一患者的先前评估中获得。以此方式,可以随时间推移监测患者选择的进展。另外,如果受试者是人,则对照可以从对另外的一个人或多个人的评估获得,例如选定的一组人。以此方式,正在被评估选择的人的选择程度可以与合适的其它人进行比较,例如与所关注的人处于类似情况的其它人,如患有类似或相同病状和/或具有相同种族的那些人。

[0474] 在本公开所涵盖的一些实施例中,生物标志物量和/或活性测量结果与预定水平的变化为约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5或5.0倍或更大或介于两者之间的任何范围,包含端值。当测量结果基于相对变化,如基于治疗前生物标志物测量结果与治疗后生物标志物测量结果的比率时,此类截止值同样适用。

[0475] 可以从患者的多种来源收集生物样品,所述生物样品包含体液样品、细胞样品或包括核酸和/或蛋白质的组织样品。“体液”是指从身体排泄或分泌的流体以及通常不排泄或分泌的流体(例如羊水、房水、胆汁、血液和血浆、脑脊液、叮叮和耳垢、考珀氏液或射精前液、乳糜、食糜、粪便、女性射精、间质液、细胞内液、淋巴液、月经、母乳、黏液、胸膜液、脓汁、唾液、皮脂、精液、血清、汗液、滑液、眼泪、尿液、阴道润滑液、玻璃体液、呕吐物)。在优选的实施例中,受试者和/或对照样品选自由以下组成的组:细胞、细胞系、组织学载玻片、石蜡包埋组织、活组织检查、全血、乳头抽吸物、血清、血浆、口腔刮片、唾液、脑脊液、尿液、粪便和骨髓。在一个实施例中,样品是血清、血浆或尿液。在另一个实施例中,样品是血清。

[0476] 可以在纵向时间段内(例如,约数天、数周、数月、每年、每半年等一次或多次)重复地从个体收集样品。在一段时间内从个体获得大量样品可以用于验证早期检测的结果和/或识别由于例如疾病进展、药物治疗等而导致的生物模式改变。例如,根据本公开,可以每月、每两个月或一个、两个或三个月间隔的组合采集和监测受试者样品。另外,随着时间的推移获得的受试者的生物标志物量和/或活性测量结果可以相互,以及与监测期间的正常对照的那些方便地比较,从而提供受试者自己的值,作为用于长期监测的内部或个人对照。

[0477] 样品制备和分离可以涉及所述程序中的任何程序,这取决于收集的样品类型和/或生物标志物测结果的分析。仅通过实例的方式,此类程序包含浓缩、稀释、调节pH、去除高丰度多肽(例如,白蛋白、 γ 球蛋白和转铁蛋白等)、添加防腐剂和校准物、添加蛋白酶抑制剂、添加变性剂、样品脱盐、以及浓缩样品蛋白质、脂质的提取和纯化。

[0478] 样品制备还可以分离以非共价复合物与其它蛋白质(例如,载体蛋白质)结合的分子。此过程可以分离与特定载体蛋白(例如,白蛋白)结合的那些分子或者使用更通用的过程,如通过蛋白质变性从所有载体蛋白中释放结合的分子,例如使用酸,然后去除载体蛋白。

[0479] 可以使用高亲和力试剂、高分子量过滤器、超速离心和/或电渗析从样品中去除不期望的蛋白质(例如,高丰度、无信息或不可检测的蛋白质)。高亲和力试剂包含与高丰度蛋白质选择性结合的抗体或其它试剂(例如,适体)。样品制备还可以包含离子交换色谱法、金属离子亲和色谱法、凝胶过滤、疏水色谱法、色谱聚焦、吸附色谱法、等电聚焦和相关技术。分子量过滤器包含基于大小和分子量分离分子的膜。此类过滤器可以进一步采用反渗透、纳滤、超滤和微滤。

[0480] 超速离心是一种用于从样品中去除不期望的多肽的方法。超速离心是将样品以约

15,000-60,000rpm离心,同时用光学系统监测颗粒的沉降(或其缺乏沉降)。电渗析是在电位梯度的影响下,在离子通过半透膜从一种溶液传输到另一种溶液的过程中使用电膜或半透膜的过程。由于电渗析中使用的膜可能具有选择性传输带正电荷或负电荷的离子、排斥相反电荷的离子或允许物质迁移通过基于大小和电荷的半透膜的能力,因此它使电渗析可用于浓缩、去除或分离电解质。

[0481] 本公开中的分离和纯化可以包含本领域已知的任何程序,如毛细管电泳(例如,在毛细管中或芯片上)或色谱法(例如,在毛细管中、柱中或芯片上)。电泳是一种可以用于在电场的影响下分离离子分子的方法。电泳可以在凝胶、毛细管或芯片上的微通道中进行。用于电泳的凝胶的实例包含淀粉、丙烯酰胺、聚环氧乙烷、琼脂糖或其组合。凝胶可以通过其交联、添加去污剂或变性剂、固定酶或抗体(亲和电泳)或底物(酶谱)以及并入pH梯度来修饰。用于电泳的毛细管的实例包含与电喷雾接口的毛细管。

[0482] 对于分离复杂亲水分子和高电荷溶质,毛细管电泳(CE)是优选的。CE技术也可以在微流控芯片上实施。根据所使用的毛细管和缓冲液的类型,CE可以进一步细分为分离技术,如毛细管区带电泳(CZE)、毛细管等电聚焦(CIEF)、毛细管等速电泳(cITP)和毛细管电色谱(CEC)。将CE技术与电喷雾电离偶联的实施例涉及使用挥发性溶液,例如含有挥发性酸和/或碱以及如醇或乙腈等有机物的水性混合物。

[0483] 毛细管等速电泳(cITP)是分析物以恒定的速度移动通过毛细管,但仍然通过它们相应的迁移率分离的技术。毛细管区带电泳(CZE),也称为自由溶液CE(FSCE),基于物种电泳迁移率的差异,由分子上的电荷和分子在迁移期间遇到的摩擦阻力决定,所述摩擦阻力通常与分子的大小成正比。毛细管等电聚焦(CIEF)允许弱电离两性分子在pH梯度下通过电泳分离。CEC是传统高效液相色谱法(HPLC)与CE之间的混合技术。

[0484] 本公开中使用的分离和纯化技术包含本领域已知的任何色谱法程序。色谱法可以基于某些分析物的差异吸附和洗脱或分析物在流动相与固定相之间的分配。色谱法的不同实例包含但不限于液相色谱法(LC)、气相色谱法(GC)、高效液相色谱法(HPLC)等。

[0485] XI. 生物标志多肽

[0486] 本公开所涵盖的另一方面涉及生物标志蛋白和其生物活性部分的用途。在一个实施例中,对应于标志物的天然多肽可以通过使用标准蛋白质纯化技术的适当纯化方案从细胞或组织来源中分离。在另一个实施例中,对应于本公开所涵盖的标志物的多肽是通过重组DNA技术产生的。作为重组表达的替代方案,对应于本公开所涵盖的标志物的多肽可以使用标准肽合成技术化学合成。

[0487] 生物标志多肽的生物活性部分包含包括与本文所描述的生物标志蛋白氨基酸序列充分相同或源自其的氨基酸序列的多肽,但其包含的氨基酸少于全长蛋白质,并且展现出对应全长蛋白质的至少一种活性。通常,生物活性部分包括具有对应蛋白质的至少一种活性的结构域或基序。本公开所涵盖的蛋白质的生物活性部分可以是长度为例如10、25、50、100或更多个氨基酸的多肽。此外,可以通过重组技术制备其中缺失了蛋白质的其它区的其它生物活性部分,并且对本公开所涵盖的天然形式的多肽的一种或多种功能活性进行评估。

[0488] 优选的多肽具有由本文所描述的核酸分子编码的生物标志蛋白的氨基酸序列。其它有用的蛋白质与这些序列之一基本相同(例如,至少约40%,优选地50%、60%、70%、

75%、80%、83%、85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)并且保留对应天然存在的蛋白质的蛋白质的功能活性,但由于天然等位基因变异或诱变而在氨基酸序列上有所不同。

[0489] 为了确定两个氨基酸序列或两个核酸的百分比同一性,出于最佳比较目的对序列进行比对(例如,可以在第一氨基酸或核酸序列的序列中引入空位,以与第二氨基酸或核酸序列进行最佳比对)。然后比较在相应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置被与在第二序列中的相应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,则这些分子在那个位置是相同的。两个序列之间的同一性百分比是序列共有的相同位置的数量的函数(即,同一性% = 相同位置的数量/总位置(例如,重叠位置)的数量 $\times 100$)。在一个实施例中,两个序列的长度相同。

[0490] 两个序列之间的同一性百分比的确定可以使用数学算法完成。用于两个序列比较的数学算法的优选非限制性实例是以下的算法:Karlin和Altschul (1990)《美国国家科学院院刊》87:2264-2268,修改为以下中:Karlin和Altschul (1993)《美国国家科学院院刊》90:5873-5877。将这种算法并入到以下的NBLAST和XBLAST程序中:Altschul等人(1990)《分子生物学杂志》215:403-410。可以用NBLAST程序(评分=100,字长=12)进行BLAST核苷酸检索,以获得与本公开所涵盖的核酸分子同源的核苷酸序列。可以用XBLAST程序(评分=50,字长=3)进行BLAST蛋白质检索,以获得与本公开所涵盖的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的有空位的比对,可以利用有空位的BLAST,如以下中所描述的:Altschul等人(1997)《核酸研究》25:3389-3402。可替代地,PSI Blast可以用于执行检测分子之间的距离关系的迭代检索。当利用BLAST、有空位的BLAST和PSI-Blast程序时,可以使用各个程序(例如,XBLAST和NBLAST)的默认参数。参见<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。用于序列比较的数学算法的另一个优选的非限制性实例是Myers和Miller的算法,(1988)《计算机应用生物科学(Comput Appl Biosci)》,4:11-7。此算法被合并到ALIGN程序(版本2.0)中,所述程序是GCG序列比对软件包的一部分。当利用ALIGN程序比较氨基酸序列,可以使用PAM120权重残基表、12的缺口长度罚分以及4的缺口罚分。用于识别局部序列相似性和比对的又另一种有用算法是如以下中所描述的FASTA算法:Pearson和Lipman (1988)《美国国家科学院院刊》85:2444-2448。当使用用于比较核苷酸或氨基酸序列的FASTA算法时,例如PAM120权重残基表可以与为2的k元组值一起使用。

[0491] 在容许或不容许缺口的情况下,可以使用类似于以上所描述的那些技术的技术,测定两个序列之间的同一性百分比。在计算同一性百分比时,仅对确切的匹配进行计数。

[0492] 本公开还提供了对应于生物标志蛋白的嵌合或融合蛋白。如本文所使用的,“嵌合蛋白”或“融合蛋白”包括对应于本公开所涵盖的标志物的多肽的全部或部分(优选地生物活性部分),其与异源多肽(即,除对应于标志物之外的多肽)可操作地连接。在融合蛋白中,术语“可操作地连接”旨在指示本公开所涵盖的多肽和异源多肽彼此框内融合。异源多肽可以与本公开所涵盖的多肽的氨基末端或羧基末端融合。

[0493] 一种有用的融合蛋白是GST融合蛋白,其中对应于本公开所涵盖的标志物的多肽与GST序列的羧基末端融合。此类融合蛋白可以促进本公开所涵盖的重组多肽的纯化。

[0494] 在另一个实施例中,融合蛋白含有异源信号序列、免疫球蛋白融合蛋白、毒素或其它有用的蛋白序列。本公开所涵盖的嵌合蛋白和融合蛋白可以通过标准重组DNA技术产生。

在另一个实施例中,融合基因可以通过包含自动化DNA合成仪的常规技术合成。可替代地,可以使用锚定引物进行基因片段的PCR扩增,所述锚定引物在两个连续的基因片段之间产生互补突出端,随后使其退火并再扩增以生成嵌合基因序列(参见例如Ausubel等人(同上))。此外,许多已经编码融合部分(例如,GST多肽)的表达载体可商购获得。可以将编码本公开所涵盖的多肽的核酸克隆到此类表达载体中,使得融合部分与本公开所涵盖的多肽框内连接。

[0495] 信号序列可以用于促进分泌的蛋白质或其它所关注的蛋白质的分泌和分离。信号序列通常表征为疏水氨基酸的核心,所述疏水氨基酸通常在一个或多个切割事件中在分泌期间从成熟蛋白质上切割下来。此类信号肽含有加工位点,当成熟蛋白质穿过分泌途径时,所述加工位点允许从成熟蛋白质上切割信号序列。因此,本公开涉及所描述的具有信号序列的多肽,以及信号序列已经被蛋白水解切割的多肽(即,切割产物)。在一个实施例中,编码信号序列的核酸序列可以在表达载体中与所关注的蛋白质,如通常不分泌或以其它方式难以分离的蛋白质可操作地连接。信号序列引导蛋白质的分泌,如从表达载体转化到其中的真核宿主,并且信号序列随后或同时被切割。然后通过本领域公认的方法容易地从细胞外培养基中纯化蛋白质。可替代地,信号序列可以使用促进纯化的序列与所关注的蛋白质连接,如使用GST结构域。

[0496] 本公开还涉及本文所描述的生物标志多肽的变体。此类变体具有改变后的氨基酸序列,所述改变后的氨基酸序列可以作为激动剂(模拟物)或作为拮抗剂发挥作用。变体可以通过诱变生成,例如离散点突变或截短。激动剂可以保留与天然存在形式的蛋白质的生物活性基本上相同的生物活性或保留其亚群。蛋白质的拮抗剂可以通过例如与包含所关注的蛋白质的细胞信号级联的下游或上游成员竞争性结合来抑制天然存在形式的蛋白质的一种或多种活性。因此,可以通过使用功能有限的变体进行治疗来引发特定的生物学效应。相对于用天然存在形式的蛋白质的治疗,用具有天然存在形式的蛋白质的生物活性的亚群的变体治疗受试者可以在受试者中具有更少的副作用。

[0497] 可以通过筛选本公开所涵盖的蛋白质的突变体(例如,截短突变体)组合文库的激动剂或拮抗剂活性来鉴定起激动剂(模拟物)或拮抗剂作用的生物标志蛋白的变体。在一个实施例中,多样化变体文库通过核酸水平的组合诱变生成并且由多样化基因文库编码。可以通过例如将合成寡核苷酸的混合物酶促连接到基因序列中来产生多样化变体文库,使得一组简并的潜在蛋白质序列可表达为单独的多肽或可替代地作为一组更大的融合蛋白(例如,用于噬菌体展示)。有多种可以用于从简并寡核苷酸序列产生本公开所涵盖的多肽的潜在变体文库的方法。用于合成简并寡核苷酸的方法是本领域已知的(参见例如Narang, 1983,《四面体(Tetrahedron)》39:3;Itakura等人,1984,《生物化学年度评论(Annu.Rev.Biochem.)》53:323;Itakura等人,1984,《科学》198:1056;Ike等人,1983《核酸研究》11:477)。

[0498] 另外,对应于本公开所涵盖的标志物的多肽编码序列的片段文库可以用于生成多样化的多肽群体,用于筛选和随后选择变体。例如,可以通过以下来生成编码序列片段的文库:在一定条件下用核酸酶处理所关注的编码序列的双链PCR片段,其中每个分子仅发生约一次切口;使双链DNA变性;使DNA复性以形成可以包含来自不同切口产物的正义/反义对的双链DNA;通过用S1核酸酶处理从重整双链体中去除单链部分;以及将所得片段库连接到表

达载体中。通过此方法,可以得到表达文库,所述表达文库编码各种大小的所关注蛋白质的氨基末端和内部片段。

[0499] 本领域已知用于筛选由点突变或截短产生的组合文库的基因产物,以及用于筛选具有选定特性的基因产物的cDNA文库的若干种技术。适用于高通量分析的最广泛使用的用于筛选大型基因文库的技术通常包含将基因文库克隆到可复制的表达载体中,用所得载体文库转化合适的细胞,并且在检测期望活性有助于分离编码其产物被检测到的基因的载体的条件下表达组合基因。递归总体诱变(REM)——一种增强文库中功能性突变体频率的技术,可以与筛选测定组合使用以鉴定本公开所涵盖的蛋白质变体(Arkin和Yourvan,1992,《美国国家科学院院刊》89:7811-7815;Delgrave等人,1993,《蛋白质工程化(Protein Engineering)》6(3):327-331)。

[0500] 对应于本公开所涵盖的一种或多种生物标志物(包含表1中列出的生物标志物或其片段)的分离的多肽或其片段(或编码此类多肽的核酸)可以用作免疫原以生成抗体,根据本领域众所周知的方法,使用用于制备多克隆和单克隆抗体的标准技术所述抗体与所述免疫原结合。抗原肽包括至少8个氨基酸残基并涵盖存在于相应全长分子中的表位,使得针对肽产生的抗体与相应全长分子形成特异性免疫复合物。优选地,抗原肽包括至少10个氨基酸残基。在一个实施例中,此类表位可以对来自如小鼠或人等一个物种的给定多肽分子具有特异性(即,跨越物种间不保守的多肽分子区的抗原肽用作免疫原;此类非保守残基可以使用如本文提供的比对来确定)。

[0501] 在一个实施例中,抗体基本上与KIR3DL3特异性结合并且抑制或阻断其功能,如通过中断其与HHLA2的相互作用。

[0502] 例如,多肽免疫原通常用于通过用免疫原对合适的受试者(例如,兔、山羊、小鼠、人源化小鼠或其它哺乳动物)进行免疫来制备抗体。合适的免疫原性制剂可以含有例如重组表达或化学合成的分子或其片段,针对所述分子或其片段生成免疫应答。制剂可以进一步包含佐剂,如弗氏(Freund's)完全佐剂或不完全佐剂或类似免疫刺激剂。用免疫原性制剂对合适的受试者进行免疫诱导多克隆抗体对其中所含的抗原肽的应答。

[0503] 可以如上文所描述的通过用多肽免疫原对合适的受试者进行免疫来制备多克隆抗体。可以通过标准技术,如利用使用固定化多肽的酶联免疫吸附测定(ELISA)随时间推移监测经过免疫的受试者中的多肽抗体滴度。如果需要,可以从哺乳动物中(例如,从血液中)分离针对抗原的抗体,并且通过众所周知的技术如蛋白A色谱法对其进行进一步纯化以获得IgG馏分。在免疫后的适当时间,例如,当抗体滴度最高时,可以从受试者中获得抗体产生细胞,并且通过标准技术将其用于制备单克隆抗体,如杂交瘤技术(最初由Kohler和Milstein(1975)《自然》256:495-497描述)(还参见Brown等人(1981)《免疫学杂志》127:539-46;Brown等人(1980)《生物化学杂志》255:4980-83;Yeh等人(1976)《美国国家科学院院刊》76:2927-31;Yeh等人(1982)《国际癌症杂志(Int.J.Cancer)》29:269-75)、最新的人B细胞杂交瘤技术(Kozbor等人(1983)《今日免疫学》4:72)、EBV杂交瘤技术(Cole等人(1985)《单克隆抗体和癌症疗法(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy)》,Alan R.Liss公司,第77-96页)或三源杂交瘤技术。用于产生单克隆抗体杂交瘤的技术是众所周知的(通常参见Kenneth,R.H.于《单克隆抗体:生物学测定的新维度(Monoclonal Antibodies:A New Dimension In Biological Analyses)》,纽约州纽约的普莱南出版公司(Plenum

Publishing Corp., New York, New York) (1980); Lerner, E.A. (1981)《耶鲁生物学与医学杂志 (Yale J. Biol. Med.)》54:387-402; Gefter, M.L. 等人 (1977)《体细胞遗传学 (Somatic Cell Genet.)》3:231-36)。简而言之, 将永生细胞系 (通常是骨髓瘤) 与来自用如上文所描述的免疫原进行免疫的哺乳动物的淋巴细胞 (通常是脾细胞) 融合, 并且筛选所得杂交瘤细胞的培养上清液以鉴定产生与多肽抗原结合, 优选地特异性结合的单克隆抗体的杂交瘤。在一些实施例中, 免疫在具有所关注的靶抗原敲除 (例如, 在免疫前不产生抗原) 的细胞或动物宿主中进行。

[0504] 用于融合淋巴细胞和永生化细胞系的许多众所周知的方案中的任何方案都可以用于生成针对本公开所涵盖的一种或多种生物标志物的单克隆抗体的目的, 包含表1中列出的生物标志物或其片段 (参见例如 Galfre, G. 等人 (1977)《自然》266:55052; Gefter 等人 (1977) 同上; Lerner (1981) 同上; Kenneth (1980) 同上)。此外, 普通技术人员将理解也将有用的此类方法存在许多变化。通常, 永生细胞系 (例如, 骨髓瘤细胞系) 源自与淋巴细胞相同的哺乳动物物种。例如, 鼠杂交瘤可以通过将来自用本公开所涵盖的免疫原性制剂进行免疫的小鼠的淋巴细胞与永生化小鼠细胞系融合来制备。优选的永生细胞系是对含有次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷的培养基 (“HAT培养基”) 敏感的小鼠骨髓瘤细胞系。根据标准技术, 许多骨髓瘤细胞系中的任何骨髓瘤细胞系都可以用作融合配偶体, 例如 P3-NS1/1-Ag4-1、P3-x63-Ag8.653 或 Sp2/0-Ag14 骨髓瘤细胞系。这些骨髓瘤细胞系可从马里兰州罗克维尔的美国典型培养物保藏中心 (ATCC) 获得。通常, 使用聚乙二醇 (“PEG”) 将 HAT 敏感性小鼠骨髓瘤细胞与小鼠脾细胞融合。然后使用 HAT 培养基选择融合产生的杂交瘤细胞, 所述培养基杀伤未融合和非生产性融合的骨髓瘤细胞 (未融合的脾细胞在几天后死亡, 因为它们没有转化)。通过筛选杂交瘤培养物上清液中与给定多肽结合的抗体, 例如使用标准 ELISA 测定, 对产生本公开所涵盖的单克隆抗体的杂交瘤细胞进行检测。

[0505] 作为制备单克隆抗体分泌杂交瘤的替代方案, 可以通过用合适的多肽筛选重组组合免疫球蛋白文库 (例如, 抗体噬菌体展示文库) 来鉴定和分离对上文所描述的多肽之一具有特异性的单克隆抗体, 从而分离与多肽结合的免疫球蛋白文库成员。用于生成和筛选噬菌体展示文库的试剂盒可商购获得 (例如, 法玛西亚 (Pharmacia) 重组噬菌体抗体系统, 目录号 27-9400-01; 和 Stratagene SurfZAP™ 噬菌体展示试剂盒, 目录号 240612)。另外, 特别适用于生成和筛选抗体展示文库的方法和试剂的实例可见于例如以下: Ladner 等人的美国专利第 5,223,409 号; Kang 等人的国际公开号 W0 92/18619; Dower 等人的国际公开号 W0 91/17271; Winter 等人的国际公开号 W0 92/20791; Markland 等人的国际公开号 W0 92/15679; Breitling 等人的国际公开号 W0 93/01288; McCafferty 等人的国际公开号 W0 92/01047; Garrard 等人的国际公开号 W0 92/09690; Ladner 等人的国际公开号 W0 90/02809; Fuchs 等人 (1991)《生物技术》(纽约) 9:1369-1372; Hay 等人 (1992)《人抗体杂交瘤 (Hum. Antibod. Hybridomas)》3:81-85; Huse 等人 (1989)《科学》246:1275-1281; Griffiths 等人 (1993)《欧洲分子生物学学会杂志 (EMBO J.)》12:725-734; Hawkins 等人 (1992)《分子生物学杂志》226:889-896; Clarkson 等人 (1991)《自然》352:624-628; Gram 等人 (1992)《美国国家科学院院刊》89:3576-3580; Garrard 等人 (1991)《生物技术》(纽约) 9:1373-1377; Hoogenboom 等人 (1991)《核酸研究》19:4133-4137; Barbas 等人 (1991)《美国国家科学院院刊》88:7978-7982; 以及 McCafferty 等人 (1990)《自然》348:552-554。

[0506] 非人或人抗体(例如,大鼠抗小鼠/抗人抗体)的结构特征可以用于产生结构相关的人抗体,所述人抗体保留本公开所涵盖的抗体的至少一种功能特性,如与KIR3DL3结合。另一个功能特性包含在竞争ELISA测定中抑制原始已知的非人或人抗体的结合。

[0507] 在一些实施例中,提供了能够与KIR3DL3结合和抑制/阻断其的单克隆抗体,所述单克隆抗体包括重链,其中可变结构域包括至少一个CDR,所述CDR的序列与本文所呈现的或与其它方式可公开获得的一组重链可变结构域CDR有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性。

[0508] 类似地,还提供了能够与KIR3DL3结合和抑制/阻断其的单克隆抗体,所述单克隆抗体包括轻链,其中可变结构域包括至少一个CDR,所述CDR的序列与本文所呈现的或与其它方式可公开获得的一组轻链可变结构域CDR有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性。

[0509] 还提供了能够与KIR3DL3结合和抑制/阻断其的单克隆抗体,所述单克隆抗体包括重链,其中可变结构域包括至少一个CDR,所述CDR的序列与本文所呈现的或与其它方式可公开获得的一组重链可变结构域CDR有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性;并且所述单克隆抗体包括轻链,其中可变结构域包括至少一个CDR,所述CDR的序列与本文所呈现的或与其它方式可公开获得的一组轻链可变结构域CDR有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性。

[0510] 熟练的技术人员将注意到,此类百分比同源性等同于并且可以通过在给定CDR内引入1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个保守氨基酸取代来实现。

[0511] 另外,可以针对本公开所涵盖的生物标志物制备完全人抗体,所述生物标志物包含表1中列出的生物标志物或其片段。完全人抗体可以在人免疫球蛋白基因的转基因小鼠中制备,例如根据Hogan等人,“操纵小鼠胚胎:实验室手册(Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual)”冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory)。简而言之,用纯化的免疫原对转基因小鼠进行免疫。采集脾细胞并与骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤。基于其产生与免疫原结合的抗体的能力来选择杂交瘤。完全人抗体会降低此类抗体在人体内的免疫原性。

[0512] 在一个实施例中,用于本发明的抗体是双特异性或多特异性抗体。双特异性抗体在单个抗体多肽内具有两种不同抗原的结合位点。抗原结合可以是同时的或顺序的。三源杂交瘤和杂交杂交瘤是可以分泌双特异性抗体的细胞系的两个实例。美国专利4,474,893中公开了由杂交杂交瘤或三源杂交瘤产生的双特异性抗体的实例。双特异性抗体通过以下构建:化学方法(Staerz等人(1985)《自然》314:628和Perez等人(1985)《自然》316:354)和杂交瘤技术(Staerz和Bevan(1986)《美国国家科学院院刊》83:1453以及Staerz和Bevan(1986)《今日免疫学》7:241)。双特异性抗体还描述于美国专利5,959,084中。双特异性抗体的片段描述于美国专利5,798,229中。

[0513] 双特异性药剂也可以通过以下来产生:通过融合杂交瘤或产生不同抗体的其它细胞产生异种杂交瘤,然后鉴定产生和共组装两个抗体的克隆。所述抗体也可以通过完整的免疫球蛋白链或其部分如Fab和Fv序列的化学或遗传缀合来产生。抗体组分可以与本公开所涵盖的一种或多种生物标志物的多肽或其片段结合,包含表1中列出的一种或多种生物

标志物或其片段。在一个实施例中,双特异性抗体可以与多肽或其片段和其天然结合配偶体或其片段特异性结合。

[0514] 在本发明的另一方面,肽或肽模拟物可以用于拮抗本公开所涵盖的一种或多种生物标志物的活性,所述生物标志物包含表1中列出的一种或多种生物标志物或其片段。在一个实施例中,可以通过筛选突变体(例如,截短突变体)组合文库的拮抗剂活性来鉴定表1中列出的一种或多种生物标志物的变体,所述变体用作相应全长蛋白质的调节剂。在一个实施例中,多样化变体文库通过核酸水平的组合诱变生成并且由多样化基因文库编码。可以例如通过将合成寡核苷酸的混合物酶促连接到基因序列中来产生多样化变体文库,使得一组简并的潜在多肽序列可表达为其中含有所述一组多肽序列的单个多肽。有多种可以用于从简并寡核苷酸序列产生多肽变体文库的方法。简并基因序列的化学合成可以在自动DNA合成仪中进行,然后将合成基因连接到适当的表达载体中。使用一组简并基因允许在一个混合物中提供编码期望的一组潜在多肽序列的所有序列。用于合成简并寡核苷酸的方法是本领域已知的(参见例如Narang, S.A. (1983)《四面体》39:3; Itakura等人(1984)《生物化学年度评论(Rev. Biochem.)》53:323; Itakura等人(1984)《科学》198:1056; Ike等人(1983)《核酸研究》11:477。

[0515] 另外,多肽编码序列的片段文库可以用于生成多样化的多肽片段群体,用于筛选和随后选择给定多肽的变体。在一个实施例中,可以通过以下来生成编码序列片段的文库:在一定条件下用核酸酶处理多肽编码序列的双链PCR片段,其中每个多肽仅发生约一次切口;使双链DNA变性;使DNA复性以形成可以包含来自不同切口产物的正义/反义对的双链DNA;通过用S1核酸酶处理从重整双链体中去除单链部分;以及将所得片段库连接到表达载体中。通过此方法,可以得到表达文库,所述表达文库编码各种大小的多肽的N末端、C末端和内部片段。

[0516] 本领域已知用于筛选由点突变或截短产生的组合文库的基因产物,以及用于筛选具有选定特性的基因产物的cDNA文库的若干种技术。此类技术适用于快速筛选由多肽组合诱变生成的基因文库。适用于高通量分析的最广泛使用的用于筛选大型基因文库的技术通常包含将基因文库克隆到可复制的表达载体中,用所得载体文库转化合适的细胞,并且在检测期望活性有助于分离编码其产物被检测到的基因的载体的条件下表达组合基因。递归总体诱变(REM)——一种增强文库中功能性突变体频率的技术,可以与筛选测定组合使用以鉴定所关注的变体(Arkin和Youvan (1992)《美国国家科学院院刊》89:7811-7815; Delagrave等人(1993)《蛋白质工程化》6(3):327-331)。在一个实施例中,可以利用基于细胞的测定来分析多样化的多肽文库。例如,可以将表达载体文库转染到细胞系中,所述细胞系通常合成本公开所涵盖的一种或多种生物标志物,所述生物标志物包含表1中列出的一种或多种生物标志物或其片段。然后培养转染的细胞,使得产生全长多肽和特定突变体多肽,并且可以检测突变体表达对细胞上清液中全长多肽活性的影响,例如,通过许多功能测定中的任何功能测定。然后可以从细胞中回收质粒DNA,所述细胞对抑制或可替代地全长多肽活性的增强进行评分,并且进一步表征单个克隆。

[0517] 多肽氨基酸序列的一个或多个氨基酸被相同类型的D-氨基酸(例如,D-赖氨酸代替L-赖氨酸)的系统取代可以用于生成更稳定的肽。另外,包括所关注的多肽氨基酸序列或基本上相同的序列变异的受限肽可以通过本领域已知的方法生成(Rizo和Gierasch (1992)

《生物化学年度评论 (Rev.Biochem.) 》61:387, 所述文献通过引用并入本文); 例如, 通过添加能够形成使肽环化的分子内二硫键的内部半胱氨酸残基。

[0518] 本文所公开的氨基酸序列将使本领域技术人员能够产生对应于肽序列和其序列变体的多肽。此类多肽可以通过表达编码肽序列的多核苷酸在原核或真核宿主细胞中产生, 通常作为较大多肽的一部分。可替代地, 此类肽可以通过化学方法合成。用于在重组宿主中表达异源蛋白、多肽的化学合成和体外翻译的方法在本领域中是众所周知的并且在以下中进一步描述: Maniatis 等人《分子克隆: 实验室手册 (Molecular Cloning: A Laboratory Manual) 》(1989), 第2版, 冷泉港实验室出版社, 纽约; Berger 和 Kimmel, 《酶学方法 (Methods in Enzymology) 》, 第152卷, 《分子克隆技术指南 (Guide to Molecular Cloning Techniques) 》(1987), 加利福尼亚州圣地亚哥的学术出版社公司 (Academic Press, Inc., San Diego, Calif.); Merrifield, J. (1969) 《美国化学会会志 (J. Am. Chem. Soc.) 》91:501; Chaiken I. M. (1981) 《CRC: 生物医学工程评论 (CRC Crit. Rev. Biochem.) 》11:255; Kaiser 等人 (1989) 《科学》243:187; Merrifield, B. (1986) 《科学》232:342; Kent, S. B. H. (1988) 《生物化学年度评论 Rev. Biochem.) 》57:957; 以及 Offord, R. E. (1980) 《半合成蛋白质 (Semisynthetic Proteins) 》, 威利出版公司 (Wiley Publishing), 所述文献通过引用并入本文)。

[0519] 通常通过直接化学合成可以产生肽。肽可以作为修饰肽产生, 其中非肽部分通过共价键与N端和/或C端连接。在某些优选的实施例中, 羧基端或氨基端或两者都被化学修饰。末端氨基和羧基最常见的修饰分别是乙酰化和酰胺化。氨基末端修饰如酰化 (例如, 乙酰化) 或烷基化 (例如, 甲基化) 和羧基末端修饰如酰胺化以及包含环化的其它末端修饰可以并入本公开所涵盖的各种实施例中。核心序列的某些氨基末端和/或羧基末端修饰和/或肽延伸可以提供有利的物理、化学、生化和药理学特性, 如: 增强的稳定性、增加的效力和/或功效、对血清蛋白酶的抗性、期望的药代动力学特性等。本文所公开的肽可以用于治疗疾病, 例如通过改变患者的共刺激。

[0520] 肽模拟物 (Fauchere (1986) 《药物研究进展 (Adv. Drug Res.) 》15:29; Veber 和 Freidinger (1985) 《神经科学趋势 (TINS) 》第392页; 以及 Evans 等人 (1987) 《药物化学杂志 (J. Med. Chem.) 》30:1229, 所述文献通过引用并入本文) 通常是在计算机化分子建模的帮助下开发的。结构上类似于治疗上有用的肽的肽模拟物可以用于产生等效治疗或预防效果。通常, 肽模拟物在结构上类似于范例多肽 (即, 具有生物学或药理学活性的多肽), 但具有一个或多个肽键, 所述肽键通过本领域已知的方法任选地被选自以下组成的组的键替代: $-CH_2NH-$ 、 $-CH_2S-$ 、 $-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH=CH-$ (顺式和反式)、 $-COCH_2-$ 、 $-CH(OH)CH_2-$ 和 $-CH_2SO-$, 并且在以下参考文献中进一步描述: Spatola, A. F. 于“氨基酸、多肽和蛋白质的化学和生物化学 (Chemistry and Biochemistry of Amino Acids, Peptides, and Proteins)” Weinstein, B., 编辑, 纽约马塞尔·德克尔公司 (Marcel Dekker, New York), 第267页 (1983); Spatola, A. F., 《维加数据 (Vega Data) 》(1983年3月), 第1卷, 第3期, “肽主链修饰 (Peptide Backbone Modifications)” (综述); Morley, J. S. (1980) 《药物科学趋势 (Trends Pharm. Sci.) 》第463-468页 (综述); Hudson 等人 (1979) 《国际肽蛋白研究期刊 (Int. J. Pept. Prot. Res.) 》14:177-185 ($-CH_2NH-$, CH_2CH_2-); Spatola, A. F. 等人 (1986) 《生命科学 (Life Sci.) 》38:1243-1249 ($-CH_2-S$); Hann, M. M. (1982) 《化学学会杂志珀金会报

(J.Chem.Soc.Perkin Trans.)》I.307-314 (-CH-CH-, 顺式和反式); Almquist, R.G. 等人 (190)《药物化学杂志》23:1392-1398 (-COCH₂-); Jennings-White, C. 等人 (1982)《四面体通讯 (Tetrahedron Lett.)》23:2533 (-COCH₂-); Szelke, M. 等人《欧洲应用 (European Appln.)》EP 45665 (1982) CA:97:39405 (1982) (-CH(OH)CH₂-); Holladay, M.W. 等人 (1983)《四面体通讯》(1983) 24:4401-4404 (-C(OH)CH₂-); 以及 Hruby, V.J. (1982)《生命科学》(1982) 31:189-199 (-CH₂-S-); 所述文献中的每一个通过引用并入本文。特别优选的非肽键是 -CH₂NH-。此类肽模拟物可能具有优于多肽实施例的显著优势, 包含例如: 如更经济的产生、更大的化学稳定性、增强的药理特性 (半衰期、吸收、效力、功效等)、改变后的特异性 (例如, 广谱的生物活性)、降低的抗原性等。肽模拟物的标记通常涉及将一种或多种标记直接或通过间隔物 (例如酰胺基团) 与肽模拟物上由定量结构-活性数据和/或分子建模预测的非干扰位置共价连接。此类非干扰位置通常是不与大多肽形成直接接触的位置, 肽模拟物与所述大多肽结合以产生治疗效果。肽模拟物的衍生化 (例如, 标记) 不应实质上干扰肽模拟物的期望生物学或药理学活性。

[0521] 本公开还涵盖可以调节 (增强或抑制) 相互作用的小分子, 例如本文所描述的或表 1 中列出的生物标志物与其天然结合配偶体之间的相互作用。本公开所涵盖的小分子可以使用本领域已知的组合文库方法中的众多方法中的任何方法获得, 包含: 空间可寻址平行固相或溶液相文库; 需要反卷积的合成文库方法; “一珠粒一化合物”文库方法; 以及使用亲和色谱法选择的合成文库方法。(Lam, K.S. (1997)《抗癌药物设计 (Anticancer Drug Des.)》12:145)。

[0522] 合成分子文库的方法的实例可见于本领域中, 例如: DeWitt 等人 (1993)《美国国家科学院院刊》90:6909; Erb 等人 (1994)《美国国家科学院院刊》91:11422; Zuckermann 等人 (1994)《药物化学杂志》37:2678; Cho 等人 (1993)《科学》261:1303; Carrell 等人 (1994)《德国应用化学英文版 (Angew.Chem.Int.Ed.Engl.)》33:2059; Carrell 等人 (1994)《德国应用化学英文版》33:2061; 以及 Gallop 等人 (1994)《药物化学杂志》37:1233。

[0523] 化合物文库可以在以下中呈现: 溶液 (例如, Houghten (1992)《生物技术》13:412-421) 或珠粒 (Lam (1991)《自然》354:82-84)、芯片 (Fodor (1993)《自然》364:555-556)、细菌 (Ladner USP 5,223,409)、孢子 (Ladner USP '409)、质粒 (Cull 等人 (1992)《美国国家科学院院刊》89:1865-1869) 或噬菌体 (Scott 和 Smith (1990)《科学》249:386-390); (Devlin (1990)《科学》249:404-406); (Cwirla 等人 (1990)《美国国家科学院院刊》87:6378-6382); (Felici (1991)《分子生物学杂志》222:301-310); (Ladner 同上)。可以在基于细胞或非基于细胞的测定中筛选化合物。化合物可以在集合中筛选 (例如, 每个测试样品中的多个化合物) 或作为单个化合物进行筛选。

[0524] 本发明还涉及本公开所涵盖的生物标志物的嵌合或融合蛋白, 包含表 1 中列出的生物标志物或其片段。如本文所使用的, “嵌合蛋白”或“融合蛋白”包括本公开所涵盖的一种或多种生物标志物, 所述生物标志物包含表 1 中列出的一种或多种生物标志物或其片段, 其与另一个多肽可操作地连接, 所述另一个多肽的氨基酸序列对应于与相应生物标志物基本上不同源的蛋白质。在优选的实施例中, 融合蛋白包括本公开所涵盖的一种或多种生物标志物的至少一个生物活性部分, 包含表 1 中列出的一种或多种生物标志物或其片段。在融合蛋白内, 术语“可操作地连接”旨在指示生物标志物序列和非生物标志物序列以此类方式

彼此框内融合,以保留独立于融合表达时展现出的功能。“另一个”序列可以分别融合到生物标志物序列的N端或C端。

[0525] 此类融合蛋白可以通过重组表达编码第一肽的核苷酸序列和编码第二肽的核苷酸序列来产生。第二肽可以任选地对应于改变第一肽的溶解度、亲和力、稳定性或效价的部分,例如免疫球蛋白恒定区。在另一个优选的实施例中,第一肽由生物活性分子的一部分(例如,多肽的细胞外部分或配体结合部分)组成。第二肽可以包含免疫球蛋白恒定区,例如人C γ 1结构域或C γ 4结构域(例如,人IgC γ 1或人IgC γ 4的铰链区、CH2和CH3区,参见例如Capon等人的美国专利5,116,964;5,580,756;5,844,095等,所述文献通过引用并入本文)。此类恒定区可以保留介导效应子功能(例如,Fc受体结合)的区,或者可以被改变以降低效应子功能。与独立表达的第一肽相比,所得融合蛋白可以具有改变后的溶解度、结合亲和力、稳定性和/或效价(即,每个多肽可用的结合位点的数量),并且可以增加蛋白质纯化的效率。通过重组技术产生的融合蛋白和肽可以从含有蛋白质或肽的细胞和培养基的混合物中分泌和分离。可替代地,可以将蛋白质或肽以细胞质方式保留,并且采集、裂解细胞并分离蛋白质。细胞培养物通常包含宿主细胞、培养基和其它副产物。用于细胞培养的合适培养基是本领域众所周知的。可以使用本领域已知的用于纯化蛋白质和肽的技术从细胞培养基、宿主细胞或两者中分离蛋白质和肽。用于转染宿主细胞和纯化蛋白质和肽的技术是本领域已知的。

[0526] 优选地,本公开所涵盖的融合蛋白通过标准重组DNA技术产生。例如,根据常规技术将编码不同多肽序列的DNA片段在框内连接在一起,例如采用平端或交错末端进行连接,限制酶消化以提供合适的末端,将粘性端填充为适当的碱性磷酸酶处理以避免不期望的连接和酶促连接。在另一个实施例中,融合基因可以通过包含自动化DNA合成仪的常规技术合成。可替代地,可以使用锚定引物进行基因片段的PCR扩增,所述锚定引物在两个连续的基因片段之间产生互补突出端,随后使其退火并再扩增以生成嵌合基因序列(参见例如《当代分子生物学实验指南(Current Protocols in Molecular Biology)》,编辑Ausubel等人约翰·威利父子公司:1992)。

[0527] 特别优选的Ig融合蛋白包含与免疫球蛋白恒定区(例如,Fc区)偶联的表1中列出的一种或多种生物标志物的细胞外结构域部分或可变区样结构域。免疫球蛋白恒定区可以含有降低或消除免疫球蛋白结构中固有的效应子活性的遗传修饰。例如,编码所关注的多肽的细胞外部分的DNA可以与编码人IgG γ 1和/或IgG γ 4的铰链区、CH2和CH3区的DNA连接,所述DNA通过定点诱变修饰,例如WO 97/28267中教导的。

[0528] 在另一个实施例中,融合蛋白在其N端含有异源信号序列。在某些宿主细胞(例如,哺乳动物宿主细胞)中,可以通过使用异源信号序列来增加多肽的表达和/或分泌。

[0529] 本公开所涵盖的融合蛋白可以用作免疫原以在受试者中产生抗体。此类抗体可以用于纯化生成融合蛋白的相应天然多肽或用于筛选测定以鉴定抑制一种或多种生物标志多肽或其片段与其天然结合配偶体或其片段之间相互作用的多肽。

[0530] 本文所描述的调节剂(例如,抗体、小分子、肽、融合蛋白或小核酸)可以掺入药物组合物中并在体内施用于受试者。组合物可以含有单个此类分子或试剂或本文所描述的试剂的任何组合。根据本文所提供的方法和组合物,本文所描述的“单一活性剂”可以与本领域已知的其它药理学活性化合物(“第二活性剂”)组合。

[0531] 可以通过使用标准重组技术来促进本文所描述的生物标志核酸和/或生物标志多肽分子的产生和使用。在一些实施例中,此类技术使用载体,优选地表达载体,所述载体含有编码生物标志多肽或此类多肽的一部分的核酸。如本文所使用的,术语“载体”是指能够转运其已经连接的另一个核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”,其是指可以将另外的DNA区段连接到其中的环状双链DNA环。另一种类型的载体是病毒载体,其中可以将另外的DNA区段连接到病毒基因组中。某些载体能够在其被引入到其中的宿主细胞中进行自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体以及附加型哺乳动物载体)。其它载体(例如,非附加型哺乳动物载体)在引入到宿主细胞中时被整合到所述宿主细胞的基因组中,并且由此与宿主基因组一起复制。此外,某些载体即表达载体能够指导它们可操作地连接的基因的表达。一般而言,可用于重组DNA技术的表达载体通常呈质粒(载体)形式。然而,本公开旨在包含提供同等功能的此类其它形式的表达载体,如病毒载体(例如,复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。

[0532] 本公开所涵盖的重组表达载体包括本公开所涵盖的以适于在宿主细胞中表达核酸的形式的核酸。这意指重组表达载体包含一种或多种调节序列,所述一种或多种调节序列基于要用于表达的宿主细胞而选择,其与要表达的核酸序列可操作地连接。在重组表达载体中,“可操作地连接”旨在意指所关注的核苷酸序列(例如,在体外转录/翻译系统中或在将载体引入宿主细胞时在宿主细胞中)以允许表达核苷酸序列的方式与调节序列连接。术语“调节序列”旨在包含启动子、增强子和其它表达控制元件(例如,多腺苷酸化信号)。此类调节序列描述于例如Goeddel,《酶学方法:基因表达技术(Methods in Enzymology:Gene Expression Technology)》第185卷,加利福尼亚州圣地亚哥的学术出版社公司(1991)。调节序列包含指导核苷酸序列在许多类型的宿主细胞中的组成型表达的那些序列以及指导核苷酸序列只在某些宿主细胞中表达的那些序列(例如,组织特异性调节序列)。本领域技术人员应了解,表达载体的设计可以取决于如要转化的宿主细胞的选择、期望的蛋白质表达水平等因素。本公开所涵盖的表达载体可以引入宿主细胞中,从而产生如由如本文所描述的核酸编码的包含融合蛋白或肽的蛋白或肽。

[0533] 用于本公开的重组表达载体可以设计用于在原核(例如,大肠杆菌)或真核细胞(例如,昆虫细胞{使用杆状病毒表达载体}、酵母细胞或哺乳动物细胞)中表达对应于本公开所涵盖的标志物的多肽。合适的宿主细胞在Goeddel(同上)中进一步讨论。可替代地,重组表达载体可以在体外例如使用T7启动子调控序列和T7聚合酶来转录和翻译。

[0534] 蛋白质在原核生物中的表达最经常在大肠杆菌中用含有引导融合或非融合蛋白的表达的组成性或诱导型启动子的载体来进行。融合载体将许多氨基酸添加到其中所编码的蛋白质,通常添加到重组蛋白的氨基端。此类融合载体通常有三个目的:1)增加重组蛋白的表达;2)增加重组蛋白的溶解度;并且3)通过在亲和纯化中作为配体来帮助纯化重组蛋白。通常,在融合表达载体中,将蛋白剪切位点引入到融合部分与重组蛋白的接合处以使得能够在纯化融合蛋白之后将重组蛋白与融合部分分离。此类酶和其同源识别序列包含因子Xa、凝血酶和肠激酶。典型的融合表达载体包含pGEX(法玛西亚生物技术公司(Pharmacia Biotech Inc);Smith和约翰逊Johnson,1988,《基因(Gene)》67:31-40)、pMAL(马萨诸塞州贝弗利的新英格兰实验室(New England Biolabs,Beverly,MA))以及pRIT5(新泽西州皮斯卡塔韦的法玛西亚公司(Pharmacia,Piscataway,NJ)),它们分别将谷胱甘肽S-转移酶

(GST)、麦芽糖E结合蛋白或蛋白质A融合到靶向重组蛋白。

[0535] 合适的诱导型非融合大肠杆菌表达载体的实例包含pTrc (Amann等人,1988,《基因》69:301-315)和pET 11d (Studier等人,第60-89页,于《基因表达技术:酶学方法 (Gene Expression Technology:Methods in Enzymology)》第185卷,加利福尼亚州圣地亚哥的学术出版社公司,1991)。pTrc载体的靶生物标志核酸表达依赖于宿主RNA聚合酶从杂合trp-lac融合启动子的转录。pET 11d载体的靶生物标志核酸表达依赖于由共表达的病毒RNA聚合酶(T7 gn1)介导的T7 gn10-lac融合启动子的转录。在lacUV 5启动子的转录控制下,此病毒聚合酶由来自具有T7 gn1基因的常驻原噬菌体的宿主菌株BL21 (DE3) 或HMS174 (DE3) 提供。

[0536] 将大肠杆菌中的重组蛋白表达最大化的一种策略是在蛋白裂解重组蛋白的能力被削弱的细菌宿主中表达所述蛋白 (Gottesman,第119-128页,于《基因表达技术:酶学方法》第185卷,加利福尼亚州圣地亚哥的学术出版社1990)。另一种策略是改变待插入表达载体中的核酸的核酸序列以使得每个氨基酸的单独密码子是在大肠杆菌使用的那些优选密码子 (Wada等人,1992,《核酸研究》20:2111-2118)。本公开所涵盖的核酸序列的此类改变可以通过标准DNA合成技术来进行。

[0537] 在另一个实施例中,表达载体是酵母表达载体。用于在酵母酿酒酵母 (*S.cerevisiae*) 中表达的载体的实例包含pYepSec1 (Baldari等人,1987,《欧洲分子生物学学会杂志》6:229-234)、pMFa (Kurjan和Herskowitz,1982,《细胞》30:933-943)、pJRY88 (Schultz等人,1987,《基因》54:113-123)、pYES2 (加利福尼亚州圣地亚哥的英杰公司 (Invitrogen Corporation, San Diego, Ca)) 以及pPicZ (加利福尼亚州圣地亚哥的英杰公司)。

[0538] 可替代地,表达载体是杆状病毒表达载体。可用于在培养的昆虫细胞 (例如,Sf 9细胞) 中表达蛋白质的杆状病毒载体包含pAc系列 (Smith等人,1983,《分子与细胞生物学 (Mol.Cell Biol.)》3:2156-2165) 和pVL系列 (Lucklow和Summers,1989,《病毒学 (Virology)》170:31-39)。

[0539] 在又一个实施例中,本公开所涵盖的核酸使用哺乳动物表达载体在哺乳动物细胞中表达。哺乳动物表达载体的实例包含pCDM8 (Seed,1987,《自然》329:840) 和pMT2PC (Kaufman等人,1987,《欧洲分子生物学学会杂志》6:187-195)。当用于哺乳动物细胞中时,表达载体的对照功能经常由病毒调控元件来提供。例如,常用的启动子源自多瘤病毒、腺病毒2、巨细胞病毒和猴病毒40。对于原核和真核细胞的其它合适的表达系统,参见 Sambrook等人的第16章和第17章 (同上)。

[0540] 在另一个实施例中,重组哺乳动物表达载体能够引导核酸优先在特定细胞类型中表达 (例如,使用组织特异性调控元件来表达核酸)。组织特异性调控元件在本领域中是已知的。合适的组织特异性启动子的非限制性实例包含白蛋白启动子 (肝脏特异性;Pinkert等人,1987,《基因与发育》1:268-277)、淋巴特异性启动子 (Calame和Eaton,1988,《免疫学进展 (Adv.Immunol.)》43:235-275),特别是T细胞受体 (Winoto和Baltimore,1989,《欧洲分子生物学学会杂志》8:729-733) 和免疫球蛋白 (Banerji等人,1983,《细胞》33:729-740;Queen和Baltimore,1983,《细胞》33:741-748) 的启动子、神经元特异性启动子 (例如,神经丝启动子;Byrne和Ruddle,1989,《美国国家科学院院刊》86:5473-5477)、胰腺特异性启动

子(Edlund等人,1985,《科学》230:912-916)以及乳腺特异性启动子(例如,乳清启动子;美国专利第4,873,316号和欧洲申请公开号264,166)。还涵盖发育性调控启动子,例如,鼠科动物同源框蛋白(hox)启动子(Kessel和Gruss,1990,《科学》249:374-379)和 α 胎蛋白启动子(Camper和Tilghman,1989,《基因与发育》3:537-546)。

[0541] 本公开进一步提供了一种重组表达载体,所述重组表达载体包括以反义朝向克隆到该表达载体中的DNA分子。也就是说,DNA分子以允许(通过DNA分子的转录)表达RNA分子的方式与调节序列可操作地连接,所述RNA分子与编码本公开所涵盖的多肽的mRNA反义。以反义朝向与克隆的核酸可操作地连接的调节序列可以被选择成引导反义RNA分子在各种细胞类型中的连续表达,例如病毒启动子和/或增强子,或者调节序列可以被选择成引导反义RNA的组成性、组织特异性或细胞类型特异性表达。反义表达载体可以呈重组质粒、噬菌粒或减毒病毒形式,其中反义核酸在一个高效率调节区的控制下产生,所述高效率调节区的活性可以由将载体引入其中的细胞类型来确定。使用反义基因调节基因表达的讨论(参见Weintraub等人,1986,《遗传学趋势(Trends in Genetics)》,第1(1)卷)。

[0542] 本公开所涵盖的另一方面涉及其中已引入本公开所涵盖的重组表达载体的宿主细胞。术语“宿主细胞”和“重组宿主细胞”在本文可互换地使用。应理解此类术语不仅涉及具体受试者细胞,而且涉及这种细胞的子代或潜在子代。因为某些修饰可能由于突变或环境影响而在后续世代中发生,所以此类后代实际上可能不与亲本细胞相同,但仍包含在如本文中所使用的术语的范围内。

[0543] 宿主细胞可以是任何原核细胞(例如,大肠杆菌)或真核细胞(例如,昆虫细胞、酵母或哺乳动物细胞)。

[0544] 载体DNA可以通过常规转化或转染技术而引入原核或真核细胞中。如本文所使用的,术语“转化”和“转染”旨在指用于向宿主细胞中引入外源核酸的多种领域公认的技术,包含磷酸钙或氯化钙共沉淀法、DEAE-葡聚糖介导的转染法、脂质转染法或电穿孔法。用于转化或转染宿主细胞的合适方法可见于Sambrook等人(同上)和其它实验室手册。

[0545] 为了稳定转染哺乳动物细胞,已知取决于所使用的表达载体和转染技术,只有小部分的细胞可以将外源DNA并入其基因组中。为了鉴定并且选择这些整合体,通常将编码可选择标志物(例如,抗生素抗性)的基因与所关注的基因一起引入宿主细胞中。优选的可选择标志物包含那些赋予药物抗性的标志物,如G418、潮霉素和甲氨蝶呤。用所引入的核酸稳定转染的细胞可以通过药物选择来鉴定(例如,并入可选择标志基因的细胞将存活,而其它细胞将死亡)。

[0546] XII. 分析生物标志核酸和多肽

[0547] 可以根据本文所描述的方法和熟练的技术人员已知的技术分析生物标志核酸和/或生物标志多肽以鉴定对本公开有用的此类基因或表达改变,所述改变包括但不限于:1)生物标志转录物或多肽水平的改变;2)从生物标志基因中缺失或向生物标志基因添加一个或多个核苷酸;4)生物标志基因的一个或多个核苷酸的取代;5)如表达调节区等生物标志基因的异常修饰;等。

[0548] a. 拷贝数检测方法

[0549] 用于对生物标志核酸拷贝数进行评估的方法是本领域技术人员众所周知的。可以简单地通过确定本文鉴定的区或标志物的拷贝数来对存在或不存在染色体增益或缺失进

行评估。

[0550] 对生物标志基因座拷贝数进行评估的方法包含但不限于基于杂交的测定。基于杂交的测定包含但不限于传统的“直接探针”方法,如Southern印迹、原位杂交(例如,FISH和FISH加SKY)方法以及“比较探针”方法,如比较基因组杂交(CGH),例如基于cDNA或基于寡核苷酸的CGH。所述方法可以以多种形式使用,包含但不限于底物(例如膜或玻璃)结合方法或基于阵列的方法。

[0551] 在一个实施例中,对样品中的生物标志基因拷贝数进行评估涉及Southern印迹。在Southern印迹中,基因组DNA(通常在电泳凝胶上被片段化和分离)与对靶区具有特异性的探针杂交。将来自靶区的探针的杂交信号强度与来自正常基因组DNA分析的对照探针信号(例如,相同或相关细胞、组织、器官等的未扩增部分)的比较提供对靶核酸的相对拷贝数的估计。可替代地,Northern印迹可以用于对样品中编码核酸的拷贝数进行评估。在Northern印迹中,mRNA与对靶区具有特异性的探针杂交。将来自靶区的探针的杂交信号强度与来自正常RNA分析的对照探针信号(例如,相同或相关细胞、组织、器官等的未扩增部分)的比较提供对靶核酸的相对拷贝数的估计。可替代地,可以使用本领域众所周知的其它检测RNA的方法,使得相对于适当的对照(例如,相同或相关细胞组织、器官等的未扩增部分)更高或更低的表达提供对靶核酸的相对拷贝数的估计。

[0552] 用于确定基因组拷贝数的替代性方法是原位杂交(例如,Angerer(1987)《酶学方法》152:649)。通常,原位杂交包括以下步骤:(1)将要分析的组织或生物结构固定;(2)对生物结构进行预杂交处理以增加靶DNA的可及性并减少非特异性结合;(3)使核酸混合物与生物结构或组织中的核酸进行杂交;(4)杂交后清洗以去除杂交中未结合的核酸片段;以及(5)对杂交的核酸片段进行检测。这些步骤中的每个步骤中使用的试剂和使用条件根据具体应用而有所不同。在典型的原位杂交测定中,细胞被固定在固体支持物上,通常是载玻片。如果要探测核酸,细胞通常用热或碱变性。然后将细胞与在中等温度下的杂交溶液接触,以允许对编码蛋白质的核酸序列具有特异性的标记探针退火。然后通常以预定严格度或以增加的严格度洗涤靶标(例如,细胞),直到获得适当的信噪比。探针通常例如用放射性同位素或荧光报告物标记。在一个实施例中,探针足够长以便在严格条件下与靶核酸特异性杂交。探针的长度范围通常为约200个碱基到约1000个碱基。在一些应用中,有必要阻断重复序列的杂交能力。因此,在一些实施例中,tRNA、人基因组DNA或Cot-I DNA用于阻断非特异性杂交。

[0553] 用于确定基因组拷贝数的替代性方法是比较基因组杂交。一般来说,基因组DNA是从正常参考细胞以及测试细胞(例如,肿瘤细胞)中分离出来的,并且在必要时进行扩增。两种核酸被差异标记,并且然后与参考细胞的中期染色体原位杂交。参考和测试DNA中的重复序列被去除或其杂交能力通过某种方式降低,例如通过与适当的阻断核酸预杂交和/或在所述杂交期间包含用于所述重复序列的此类阻断核酸序列。如有必要,然后以可视形式呈现结合的标记DNA序列。测试细胞中拷贝数增加或减少的染色体区可以通过检测来自两个DNA的信号比率改变的区来鉴定。例如,与基因组的其它区相比,那些在测试细胞中拷贝数减少的区将示出来自测试DNA的信号相对于参考较低。测试细胞中拷贝数增加的区将示出来自测试DNA的相对较高的信号。在存在染色体缺失或增殖的情况下,将检测来自两个标记的信号比率的差异,并且所述比率将提供拷贝数的量度。在CGH、阵列CGH(aCGH)的另一个实

施例中,固定化染色体元件被阵列上的固体支持物结合的靶核酸的集合替换,从而允许基因组的大部分或完整百分比在固体支持物结合的靶标集合中呈现。靶核酸可以包括cDNA、基因组DNA、寡核苷酸(例如,用于检测单核苷酸多态性)等。基于阵列的CGH也可以用单色标记进行(与用两种不同的染料标记对照和可能的肿瘤样品并在杂交前混合它们相反,由于阵列上探针的竞争性杂交,这将产生比率)。在单色CGH中,对照被标记并且与一个阵列杂交并读取绝对信号,并且可能的肿瘤样品被标记并与第二阵列(具有相同内容)杂交并读取绝对信号。基于来自两个阵列的绝对信号计算拷贝数差异。制备固定化染色体或阵列以及进行比较基因组杂交的方法是本领域众所周知的(参见例如美国专利第6,335,167号;第6,197,501号;第5,830,645号;和第5,665,549号以及Albertson(1984)《欧洲分子生物学学会杂志》3:1227-1234;Pinkel(1988)《美国国家科学院院刊》85:9138-9142;EP0公开号430,402;《分子生物学方法》,第33卷:《原位杂交方案(In situ Hybridization Protocols)》,Choo,编辑,新泽西托托瓦的哈门那出版社(Humana Press,Totowa,N.J.)(1994)等)。在另一个实施例中,使用以下的杂交方案:Pinkel等人(1998)《自然遗传学》20:207-211或Kallioniemi(1992)《美国国家科学院院刊》89:5321-5325(1992)。

[0554] 在又一个实施例中,可以使用基于扩增的测定来测量拷贝数。在此类基于扩增的测定中,核酸序列在扩增反应(例如,聚合酶链反应(PCR))中充当模板。在定量扩增中,扩增产物的量将与原始样品中的模板量成正比。与适当的对照,例如健康组织进行比较提供拷贝数的量度。

[0555] “定量”扩增的方法为本领域技术人员所众所周知。例如,定量PCR涉及使用相同的引物同时共扩增已知数量的对照序列。这提供了可以用于校准PCR反应的内部标准。以下中提供了定量PCR的详细方案:Innis等人(1990)《PCR方案:方法和应用指南(PCR Protocols, A Guide to Methods and Applications)》,新泽西州的学术出版社公司)。以下中描述了使用定量PCR分析测量微卫星基因座处的DNA拷贝数:Ginzonger等人(2000)《癌症研究》60:5405-5409。基因的已知核酸序列足以使本领域技术人员能够常规选择引物以扩增基因的任何部分。荧光定量PCR还可以用于本公开所涵盖的方法中。在荧光定量PCR中,定量基于荧光信号,例如TaqMan和SYBR green的量。

[0556] 其它合适的扩增方法包含但不限于连接酶链反应(LCR)(参见Wu和Wallace(1989)《基因组学》4:560,Landegren等人(1988)《科学》241:1077以及Barringer等人(1990)《基因》89:117)、转录扩增(Kwoh等人(1989)《美国国家科学院院刊》86:1173)、自持序列复制(Guatelli等人(1990)《美国国家科学院院刊》87:1874)、dot PCR和接头衔接子PCR等。

[0557] 杂合性缺失(LOH)和主要拷贝比例(MCP)映射(Wang,Z.C.等人(2004)《癌症研究》64(1):64-71;Seymour,A.B.等人(1994)《癌症研究》54,2761-4;Hahn,S.A.等人(1995)《癌症研究》55,4670-5;Kimura,M.等人(1996)《基因、染色体和癌症(Genes Chromosomes Cancer)》17,88-93;Li等人,(2008)《MBC生物信息学(MBC Bioinform.)》9,204-219)也可以用于鉴定扩增或缺失区。

[0558] b. 用于检测生物标志核酸表达的方法

[0559] 可以通过用于检测转录分子或蛋白质表达的多种众所周知的方法中的任何方法来评估生物标志物表达。此类方法的非限制性实例包含用于检测分泌蛋白、细胞表面蛋白、细胞质蛋白或核蛋白的免疫学方法、蛋白质纯化方法、蛋白质功能或活性测定、核酸杂交方

法、核酸逆转录方法和核酸扩增方法。

[0560] 在优选的实施例中,特定基因的活性表征为基因转录物(例如,mRNA)的量度、翻译蛋白质的量的量度或基因产物活性的量度。可以通过多种方式监测标志物表达,所述方式包含通过检测mRNA水平、蛋白质水平或蛋白质活性,其中任何一种都可以使用标准技术进行测量。检测可以涉及基因表达水平的定量(例如,基因组DNA、cDNA、mRNA、蛋白质或酶活性),或者可替代地可以是基因表达水平的定性评估,特别是与对照水平相比。检测到的级别的类型从上下文将显而易见。

[0561] 在另一个实施例中,检测或确定包含其片段或基因改变(例如,在其调节或启动子区中)的生物标志物和其功能类似同源物的表达水平包括检测或确定所关注的标志物的RNA水平。在一个实施例中,获得来自要测试的受试者的一种或多种细胞并且从细胞中分离RNA。在优选的实施例中,从受试者获得乳房组织细胞的样品。

[0562] 在一个实施例中,从单个细胞中获得RNA。例如,可以通过激光捕获显微切割(LCM)从组织样品中分离细胞。可以使用此技术从组织切片,包含染色的组织切片,中分离细胞,从而确保分离出期望的细胞(参见例如Bonner等人(1997)《科学》278:1481;Emmert-Buck等人(1996)《科学》274:998;Fend等人(1999)《美国病理学杂志(Am.J.Path.)》154:61;和Murakami等人(2000)《国际肾脏杂志(Kidney Int.)》58:1346)。例如,Murakami等人(同上)描述了从先前免疫染色的组织切片中分离细胞。

[0563] 还可能从受试者获得细胞并在体外培养细胞,如获得可以从中提取RNA的更大的细胞群体。用于建立非转化细胞培养物,即原代细胞培养物的方法是本领域已知的。

[0564] 当从个体的组织样品或细胞中分离RNA时,防止从受试者取出组织或细胞后基因表达的任何进一步变化可能很重要。已知表达水平的变化在扰动后迅速变化,例如热激或用脂多糖(LPS)或其它试剂的激活。另外,组织和细胞中的RNA可能会迅速降解。因此,在优选的实施例中,从受试者获得的组织或细胞尽快被快速冷冻。

[0565] 可以通过多种方法从组织样品中提取RNA,例如,硫氰酸胍裂解后CsCl离心(Chirgwin等人,1979,《生物化学》18:5294-5299)。可以获得来自单细胞的RNA,如用于从单细胞制备cDNA文库的方法中所描述的,如以下中所描述的那些:Dulac,C.(1998)《发育生物学的当前主题(Curr.Top.Dev.Biol.)》36,245和Jena等人(1996)《免疫学方法杂志(J.Immunol.Methods)》190:199。必须例如通过包含RNasin注意避免RNA降解。

[0566] 然后可以在特定物种中富集RNA样品。在一个实施例中,从RNA样品中分离poly(A)+RNA。通常,此类纯化利用了mRNA上的poly-A尾。具体地并且如上所述,poly-T寡核苷酸可以固定在固体支持物上以用作mRNA的亲亲和配体。用于此目的的试剂盒可商购获得,例如MessageMaker试剂盒(纽约州格兰德岛的生命技术公司(Life Technologies,Grand Island,NY))。

[0567] 在优选的实施例中,RNA群体富含标志物序列。可以进行富集,例如通过引物特异性cDNA合成或基于cDNA合成和模板引导的体外转录的多轮线性扩增(参见例如Wang等人(1989)《美国国家科学院院刊》86,9717;Dulac等人(同上)以及Jena等人(同上))。

[0568] 可以进一步扩增在特定物种或序列中富集或未富集的RNA群体。如本文所定义,“扩增过程”旨在加强、增加或增强RNA内的分子。例如,在RNA是mRNA的情况下,可以利用如RT-PCR等扩增过程来扩增mRNA,从而可检测到信号或增强检测。此类扩增过程是有益的,特

别是当生物、组织或肿瘤样品具有小尺寸或体积时。

[0569] 可以使用各种扩增和检测方法。例如,以下在本公开所涵盖的范围内:将mRNA逆转录成cDNA然后进行聚合酶链反应(RT-PCR);或在如美国专利第5,322,770号中描述的两个步骤中使用单一酶或将mRNA逆转录成cDNA,然后进行对称间隙连接酶链反应(RT-AGLCR),如R.L.Marshall等人,《PCR方法和应用(PCR Methods and Applications)》4:80-84(1994)中所描述的。还可以使用实时PCR。

[0570] 可以在本文中使用的其它已知扩增方法包含但不限于在以下中描述的所谓“NASBA”或“3SR”技术:《美国国家科学院院刊》87:1874-1878(1990)和《自然》350(No.6313):91-92(1991);如公开的欧洲专利申请(EPA)号4544610中所描述的Q- β 扩增;链置换扩增(如以下中所描述的:G.T.Walker等人,《临床化学(Clin.Chem.)》42:9-13(1996)和欧洲专利申请号684315);靶标介导的扩增,如PCT公开W09322461所描述的;PCR;连接酶链反应(LCR)(参见例如Wu和Wallace,《基因组学》4,560(1989),Landegren等人,《科学》241,1077(1988));自持序列复制(SSR)(参见例如Guatelli等人,《美国国家科学院院刊》87,1874(1990));以及转录扩增(参见例如Kwoh等人,《美国国家科学院院刊》86,1173(1989))。

[0571] 许多技术在现有技术中已知用于确定基因表达的绝对和相对水平,适用于本公开的常用技术包含Northern分析、RNase保护测定(RPA)、微阵列和基于PCR的技术,如定量PCR和差异显示PCR。例如,Northern印迹涉及在变性琼脂糖凝胶上运行RNA的制备,并且将其转移到合适的支持物上,如激活纤维素、硝酸纤维素或玻璃或尼龙膜。然后将放射性标记的cDNA或RNA与制备物杂交,洗涤并且通过放射自显影进行分析。

[0572] 还可以使用原位杂交可视化,其中放射性标记的反义RNA探针与活检样品的薄切片杂交,洗涤,用RNase切割并暴露于敏感乳液以进行放射自显影。样品可以用苏木精染色以证明样品的组织学组成,并且使用合适的滤光器进行暗场成像显示显影的乳剂。还可以使用如地高辛等非放射性标记。

[0573] 可替代地,可以在DNA阵列、芯片或微阵列上检测mRNA表达。从受试者获得的测试样品的标记核酸可以与包括生物标志物DNA的固体表面杂交。用含有生物标志物转录物的样品获得阳性杂交信号。制备DNA阵列的方法和其用途是本领域众所周知的(参见例如美国专利第6,618,679号;第6,379,897号;第6,664,377号;第6,451,536号;第548,257号;美国20030157485和Schena等人(1995)《科学》20,467-470;Gerhold等人(1999)《生物化学科学趋势(Trends In Biochem.)》24,168-173;以及Lennon等人(2000)《今日药物发现(Drug Discovery Today)》5,59-65,所述文献通过引用整体并入本文)。还可以进行基因表达的系列分析(SAGE)(参见例如美国专利申请20030215858)。

[0574] 例如,为了监测mRNA水平,从要测试的生物样品中提取mRNA,进行逆转录,并且生成荧光标记的cDNA探针。然后用标记的cDNA探针探测能够与标志物cDNA杂交的微阵列,扫描载玻片并且测量荧光强度。此强度与杂交强度和表达水平相关。

[0575] 可以用于本文所描述的方法的探针类型包含cDNA、核糖探针、合成寡核苷酸和基因组探针。使用的探针类型通常由特定情况决定,如用于原位杂交的核糖探针和用于Northern印迹的cDNA。在一个实施例中,探针针对RNA特有的核苷酸区。探针可以短至差异识别标志物mRNA转录物所需的,并且可以短至例如15个碱基;然而,可以使用具有至少17、

18、19或20个或更多个碱基的探针。在一个实施例中，引物和探针在严格条件下与具有对应于标志物的核苷酸序列的DNA片段特异性杂交。如本文所使用的，术语“严格条件”意指仅当核苷酸序列中存在至少95%的同一性时才将会发生杂交。在另一个实施例中，当序列之间存在至少97%的同一性时，发生“严格条件”下的杂交。

[0576] 探针的标记形式可以是任何适当的形式，如使用放射性同位素，例如 ^{32}P 和 ^{35}S 。无论探针是化学合成的或生物合成的，都可以通过使用适当标记的碱基来实现用放射性同位素进行标记。

[0577] 在一个实施例中，生物样品含有来自测试受试者的多肽分子。可替代地，生物样品可以含有来自测试受试者的mRNA分子或来自测试受试者的基因组DNA分子。

[0578] 在另一个实施例中，所述方法进一步涉及从对照受试者获得对照生物样品；使对照样品与能够检测标志多肽、mRNA、基因组DNA或其片段的化合物或药剂接触，使得检测生物样品中标志多肽、mRNA、基因组DNA或其片段的的存在；以及将对照样品中标志多肽、mRNA、基因组DNA或其片段的的存在与测试样品中标志多肽、mRNA、基因组DNA或其片段的的存在进行比较。

[0579] c. 用于检测生物标志蛋白表达的方法

[0580] 可以通过检测或定量表达的多肽来检测和/或定量生物标志蛋白的活性或水平。可以通过本领域技术人员众所周知的多种方法中的任何方法来检测和定量多肽。由包含其片段或基因改变(例如，在其调节或启动子区中)的生物标志核酸和其功能类似的同源物编码的多肽的异常水平的多肽表达与癌症对抗KIR3DL3抗体疗法的应答的可能性相关。可以使用本领域已知的用于检测多肽的任何方法。此类方法包含但不限于免疫扩散、免疫电泳、放射免疫测定(RIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫荧光测定、蛋白质印迹、结合物-配体测定、免疫组织化学技术、凝集、补体测定、高效液体色谱法(HPLC)、薄层色谱法(TLC)、超扩散色谱法等(例如，《基础和临床免疫学(Basic and Clinical Immunology)》，Sites和Terr, 编辑, 康涅狄格州诺沃克的阿普尔顿和兰格公司(Appleton and Lange, Norwalk, Conn.) 第217-262页, 1991, 所述文献通过引用并入本文)。优选的是结合物-配体免疫测定方法，所述方法包含使抗体与一个或多个表位反应并竞争性置换标记的多肽或其衍生物。在某些实施例中，表2中列出的抗体用于检测和/或定量表1中列出的生物标志物。

[0581] 例如，可以进行ELISA和RIA程序，使得标记期望的生物标志蛋白标准品(用放射性同位素，如 ^{125}I or ^{35}S ，或可测定的酶，如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶)，并且与未标记的样品一起与对应的抗体接触，其中第二抗体用于与第一抗体结合，并且测定放射性或固定化酶(竞争性测定)。可替代地，使样品中的生物标志蛋白与对应的固定化抗体反应，使放射性同位素或酶标记的抗生物标志蛋白抗体与系统反应，并且测定放射性或酶(ELISA-夹心测定)。也可酌情采用其它常规方法。

[0582] 在一些实施例中，本公开所涵盖的抗体可以以众所周知的免疫测定形式中的任何免疫测定形式使用，包含但不限于放射免疫测定、蛋白质印迹测定、免疫荧光测定、酶免疫测定、免疫沉淀测定、化学发光测定、免疫组织化学测定、斑点印迹测定或狭线印迹测定。用于执行上述各种免疫测定的一般技术和所述技术的其它变体，如原位邻近连接测定(PLA)、荧光偏振免疫测定(FPIA)、荧光免疫测定(FIA)、酶免疫测定(EIA)、比浊抑制免疫测定(NIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)和放射免疫测定(RIA)、ELISA等单独地或与NMR、MALDI-

TOF、LC-MS/MS组合或与其交替对于本领域普通技术人员来说是已知的。

[0583] 此类试剂还可以用于监测细胞或组织中的蛋白质水平,例如白细胞或淋巴细胞,作为临床测试程序的一部分,例如以监测抑制剂的最佳剂量。可以通过将抗体与可检测物质偶联(例如,物理连接)来促进检测。可检测物质的实例包含各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料和放射性材料。合适的酶的实例包含辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基复合物的实例包含链霉亲和素/生物素和亲和素/生物素;合适的荧光材料的实例包含伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白;发光材料的实例包含鲁米诺;生物发光材料的实例包含荧光素酶、荧光素和水母发光蛋白,并且合适的放射性材料的实例包含 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^3H 。

[0584] 上述技术可以基本上作为“一步”或“两步”测定进行。“一步”测定涉及将抗原与固定化抗体接触,并且无需洗涤,使混合物与标记的抗体接触。“两步”测定涉及在接触前洗涤混合物与标记的抗体。也可酌情采用其它常规方法。

[0585] 在一个实施例中,用于测量生物标志蛋白水平的方法包括以下步骤:使生物样本和与生物标志蛋白选择性结合的抗体或其变体(例如,片段)接触,并且检测所述抗体或其变体是否与所述样品结合,从而测量生物标志蛋白水平。

[0586] 生物标志蛋白和/或抗体的酶促和放射性标记可以通过常规方式实现。此类方法将通常包含酶与所讨论的抗原或抗体的共价连接,如通过戊二醛,具体地从而不对酶的活性产生不利影响,这意指酶必须仍然能够与其底物相互作用,但并非所有酶都必须具有活性,只要保持足够的活性以允许进行测定即可。事实上,一些用于结合酶的技术是非特异性的(如使用甲醛),并且将只会产生一部分活性酶。

[0587] 通常期望将测定系统的一个组件固定在支持物上,从而允许系统的其它组件与所述组件接触并容易地移除,而无需费力和费时的劳动。可以将第二相固定成远离第一相,但通常一个相就足够。

[0588] 可以将酶本身固定在支持物上,但如果需要固相酶,那么这通常最好通过与抗体结合并将抗体固定到支持物、模型和系统上来实现,这在本领域是众所周知的。简单的聚乙烯可以提供合适的支持物。

[0589] 用于标记的酶没有特别限制,但可以选自例如氧化酶组的成员。这些催化通过与其底物反应产生过氧化氢,并且葡萄糖氧化酶通常因其良好的稳定性、易于获得和廉价以及其底物(葡萄糖)的容易获得而被使用。可以通过测量酶标记抗体与底物在本领域熟知的受控条件下反应后形成的过氧化氢的浓度来测定氧化酶的活性。

[0590] 基于本公开,根据从业者的偏好,可以使用其它技术来检测生物标志蛋白。一种此类技术是蛋白质印迹(Towbin等人,《美国国家科学院院刊》76:4350(1979)),其中适当处理的样品在转移到如硝酸纤维素滤纸等固体支持物之前在SDS-PAGE凝胶上运行。然后使抗生物标志蛋白抗体(未标记)与支持物接触,并且通过如标记的蛋白A或抗免疫球蛋白(包含 ^{125}I 、辣根过氧化物酶和碱性磷酸酶的合适的标记)等二级免疫试剂进行测定。还可以使用色谱检测。

[0591] 免疫组织化学可以用于检测例如活检样品中的生物标志蛋白的表达。使合适的抗体与例如细胞薄层接触,洗涤,并且然后与第二标记的抗体接触。标记可以通过荧光标志物、如过氧化物酶等酶、抗生物素蛋白或放射性标记。使用显微镜对测定进行视觉评分。

[0592] 如胞内抗体等抗生物标志蛋白抗体(例如,表2中列出的)也可以用于成像目的,例如检测受试者细胞和组织中生物标志蛋白的存在。合适的标记包含放射性同位素、碘(^{125}I 、 ^{121}I)、碳(^{14}C)、硫(^{35}S)、氚(^3H)、铟(^{112}In)和锝($^{99\text{m}}\text{Tc}$)、如荧光素和罗丹明等荧光标记以及生物素。

[0593] 对于体内成像目的,抗体不可这样从体外检测到,因此必须被标记或以其它方式修饰以允许检测。用于此目的的标志物可以是基本上不干扰抗体结合但允许外部检测的任何标志物。合适的标志物可以包含可以通过X射线照相、NMR或MRI检测到的那些标志物。对于X射线照相技术,合适的标志物包含发射可检测辐射但对受试者没有明显危害的任何放射性同位素,例如钡或铯。NMR和MRI的合适标志物通常包含具有可检测特性自旋的标志物,如氘,所述标志物可以通过对例如相关杂交瘤的营养物进行适当标记而掺入到抗体中。

[0594] 受试者的尺寸和所使用的成像系统将决定需要产生诊断图像的成像部分的数量。在放射性同位素部分的情况下,对于人类受试者,注射的放射性的量通常在锝-99的约5毫居里到20毫居里的范围内。然后,标记的抗体或抗体片段将优先积聚在含有生物标志蛋白的细胞位置处。然后可以使用已知技术检测标记的抗体或抗体片段。

[0595] 可以用于检测生物标志蛋白的抗体包含任何抗体(例如,表2中列出的),无论是天然的或合成的、全长的或其片段、单克隆或多克隆的,所述抗体与要检测的生物标志蛋白足够强且特异性地结合。抗体的 K_d 可以为至多约 10^{-6}M 、 10^{-7}M 、 10^{-8}M 、 10^{-9}M 、 10^{-10}M 、 10^{-11}M 、 10^{-12}M 。短语“特异性结合”是指例如抗体与表位或抗原或抗原决定簇以此类方式结合,使得结合可以与相同或类似的表位、抗原或抗原决定簇的第二制备置换或竞争。相对于如相关蛋白质等其它蛋白质,抗体可以优先地与生物标志蛋白结合。

[0596] 抗体可商购获得或可以根据本领域已知的方法制备。

[0597] 可以使用的抗体和其衍生物涵盖多克隆或单克隆抗体、嵌合的、人的、人源化的、灵长类化的(CDR嫁接)、贴面或单链抗体以及抗体的功能片段,即生物标志蛋白结合片段。例如,可以使用能够与生物标志蛋白或其部分结合的抗体片段,所述抗体片段包含但不限于Fv、Fab、Fab'和F(ab')₂片段。此类片段可以通过酶促切割或通过重组技术产生。例如,木瓜蛋白酶或胃蛋白酶切割可以分别生成Fab或F(ab')₂片段。其它具有所需底物特异性的蛋白酶也可以用于生成Fab或F(ab')₂片段。还可以使用其中一个或多个终止密码子已被引入天然终止位点上游的抗体基因以多种截短形式产生抗体。例如,可以将编码F(ab')₂重链部分的嵌合基因设计成包含编码重链的CH₁、结构域和铰链区的DNA序列。

[0598] 以下描述了合成的和工程化的抗体:Cabilly等人,美国专利第4,816,567号;Cabilly等人,欧洲专利第0,125,023B1号;Boss等人,美国专利第4,816,397号;Boss等人,欧洲专利第0,120,694B1号;Neuberger, M.S.等人,WO 86/01533;Neuberger, M.S.等人,欧洲专利第0,194,276B1号;Winter,美国专利第5,225,539号;Winter,欧洲专利第0,239,400B1号;Queen等人,欧洲专利第0451216B1号;以及Padlan, E.A.等人,EP0519596A1。关于灵长类抗体,还参见Newman, R.等人,《生物技术》,10:1455-1460(1992),并且关于单链抗体,参见Ladner等人,美国专利第4,946,778号和Bird, R.E.等人,《科学》,242:423-426(1988)。还可以使用从文库,例如噬菌体展示文库产生的抗体。

[0599] 在一些实施例中,使用与除抗体之外的生物标志蛋白特异性结合的药剂,如肽。可以通过本领域已知的任何方式鉴定与生物标志蛋白特异性结合的肽。例如,可以使用肽噬

菌体展示文库筛选生物标志蛋白的特定肽结合剂。

[0600] d.用于检测生物标志物结构改变的方法

[0601] 以下说明性方法可以用于鉴定生物标志核酸和/或生物标志多肽分子中结构改变的存在,以便例如鉴定过表达、过功能等的HLA2或KIR3DL3。

[0602] 在某些实施例中,改变的检测涉及在以下中使用探针/引物:聚合酶链反应(PCR)(参见例如美国专利第4,683,195号和第4,683,202号),如锚定PCR或RACE PCR或可替代地连接链反应(LCR)(参见例如Landegran等人(1988)《科学(Science)》241:1077-1080;以及Nakazawa等人(1994)《美国国家科学院院刊》91:360-364),后者可以特别用于检测如生物标志基因等生物标志核酸中的点突变(参见Abravaya等人(1995)《核酸研究》23:675-682)。所述方法可以包含以下步骤:从受试者收集细胞样品;从样品的细胞中分离核酸(例如,基因组、mRNA或两者);使核酸样品与一种或多种与生物标志基因特异性杂交的引物在生物标志基因(如果存在)发生杂交和扩增的条件下接触;以及检测扩增产物的存在或不存在或检测扩增产物的大小并将长度与对照样品进行比较。预计PCR和/或LCR可能期望用作初步扩增步骤,结合用于检测本文所描述的突变的任何技术。

[0603] 替代性扩增方法包含:自持序列复制(Guatelli,J.C.等人(1990)《美国国家科学院院刊》87:1874-1878)、转录扩增系统(Kwoh,D.Y.等人(1989)《美国国家科学院院刊》86:1173-1177)、Q- β 复制酶(Lizardi,P.M.等人(1988)《生物技术》6:1197)或任何其它核酸扩增方法,然后使用本领域技术人员众所周知的技术检测扩增的分子。如果此类核酸分子以非常低的数量存在,则这些检测方案对于检测核酸分子特别有用。

[0604] 在替代性实施例中,来自样品细胞的生物标志核酸中的突变可以通过限制酶切割模式的改变来鉴定。例如,样品和对照DNA被分离、扩增(任选地)、用一种或多种限制性内切酶消化,并且通过凝胶电泳确定片段长度大小并进行比较。样品与对照DNA之间片段长度大小的差异表明样品DNA中的突变。此外,使用序列特异性核酶(参见例如美国专利第5,498,531号)可以用于通过核酶切割位点的发展或缺失对特定突变的存在进行评分。

[0605] 在其它实施例中,生物标志核酸中的基因突变可以通过将样品和对照核酸例如DNA或RNA与含有数百或数千个寡核苷酸探针的高密度阵列杂交来鉴定(Cronin,M.T.等人(1996)《人突变(Hum.Mutat.)》7:244-255;Kozal,M.J.等人(1996)《自然医学(Nat.Med.》)2:753-759)。例如,可以在含有光生成DNA探针的二维阵列中鉴定生物标志物基因突变,如Cronin等人(1996)同上所描述的。简而言之,探针的第一杂交阵列可以用于扫描样品和对照中的长DNA段以通过制作连续重叠探针的线性阵列来识别序列之间的碱基变化。此步骤允许鉴定点突变。此步骤之后是第二杂交阵列,所述第二杂交阵列允许通过使用与检测到的所有变体或突变互补的更小、专门的探针阵列来表征特定突变。每个突变阵列由平行探针组组成,一组与野生型基因互补,并且另一组与突变基因互补。此类生物标志物基因突变可以在多种情况下鉴定,包含例如种系和体细胞突变。

[0606] 在又一个实施例中,本领域已知的多种测序反应中的任何测序反应可以用于直接对生物标志基因进行测序并且通过将样品生物标志物的序列与对应的野生型(对照)序列进行比较来检测突变。测序反应的实例包含那些基于以下开发的技术的那些测序反应:Maxam和Gilbert(1977)《美国国家科学院院刊》74:560或Sanger(1977)《美国国家科学院院刊》74:5463。还考虑在进行诊断测定时可以利用多种自动测序程序中的任何自动测序程序

(Naeve (1995)《生物技术》19:448-53),包含通过质谱的测序(参见例如PCT国际公开号WO 94/16101;Cohen等人(1996)《色谱法进展(Adv.Chromatogr.)》36:127-162;以及Griffin等人(1993)《应用生物化学与生物技术(Appl.Biochem.Biotechnol.)》38:147-159)。

[0607] 用于检测生物标志基因突变的其它方法包含使用保护免受切割剂来检测RNA/RNA或RNA/DNA异源双链体中的错配碱基的方法(Myers等人(1985)《科学》230:1242)。一般而言,“错配切割”的现有技术首先提供通过将含有野生型生物标志物序列的RNA或DNA与从组织样品中获得的潜在突变RNA或DNA杂交(标记)而形成的异源双链体。双链双链体用一种药剂处理,所述药剂切割双链体的单链区,如由于对照链与样品链之间的碱基对错配而将存在的单链区。例如,RNA/DNA双链体可以用RNase处理,并且DNA/DNA杂交体可以用SI核酸酶处理以酶促消化错配区。在其它实施例中,DNA/DNA或RNA/DNA双链体可以用羟胺或四氧化锇和哌啶处理以便消化错配区。消化错配区后,然后在变性聚丙烯酰胺凝胶上按大小分离所得材料以确定突变位点。参见例如Cotton等人(1988)《美国国家科学院院刊》85:4397和Saleeba等人(1992)《酶学方法》217:286-295。在优选的实施例中,对照DNA或RNA可以被标记用于检测。

[0608] 在又一个实施例中,错配切割反应在定义的系统采用一种或多种识别双链DNA中错配碱基对的蛋白质(所谓的“DNA错配修复”酶)用于检测和绘制从细胞样品获得的生物标志物cDNA中的点突变。例如,大肠杆菌的mutY酶在G/A错配处切割A,并且来自HeLa细胞的胸苷DNA糖基化酶在G/T错配处切割T(Hsu等人(1994)《癌症发生Carcinogenesis》15:1657-1662)。根据示例性实施例,基于生物标志物序列的探针,例如用DNA错配修复酶处理的野生型生物标志物和切割产物(如果有的话)可以从电泳方案等中检测(例如美国专利第5,459,039号)。

[0609] 在其它实施例中,电泳迁移率的改变可以用于鉴定生物标志基因的突变。例如,单链构象多态性(SSCP)可以用于检测突变与野生型核酸之间的电泳迁移率差异(Orita等人(1989)《美国国家科学院院刊》86:2766;还参见Cotton(1993)《突变研究(Mutat.Res.)》285:125-144和Hayashi(1992)《基因分析技术应用(Genet.Anal.Tech.Appl.)》9:73-79)。样品和对照生物标志核酸的单链DNA片段将变性并允许复性。单链核酸的二级结构因序列而异,所得电泳迁移率变化甚至可以检测到单个碱基变化。DNA片段可以用标记的探针标记或检测。通过使用RNA(而不是DNA)可以提高测定的灵敏度,其中二级结构对序列变化更敏感。在优选的实施例中,主题方法利用异源双链分析以基于电泳迁移率的变化分离双链异源双链分子(Keen等人(1991)《遗传学趋势(Trends Genet.)》7:5)。

[0610] 在又一个实施例中,突变或野生型片段在含有梯度变性剂的聚丙烯酰胺凝胶中的移动使用变性梯度凝胶电泳(DGGE)测定(Myers等人(1985)《自然》313:495)。当使用DGGE作为分析方法时,DNA将被修饰以确保它不会完全变性,例如通过PCR添加大约40bp的高熔点富含GC的DNA的GC钳。在另外的实施例中,使用温度梯度代替变性梯度来鉴定对照和样品DNA的迁移率差异(Rosenbaum和Reissner(1987),《生物物理化学(Biophys.Chem.)》265:12753)。

[0611] 用于检测点突变的其它技术的实例包含但不限于选择性寡核苷酸杂交、选择性扩增或选择性引物延伸。例如,可以制备寡核苷酸引物,其中将已知突变置于中心,并且然后在仅当找到完美匹配时才允许杂交的条件下与靶DNA杂交(Saiki等人(1986)《自然》324:

163;Saiki等人(1989)《美国国家科学院院刊》86:6230)。当寡核苷酸与杂交膜附接并与标记的靶DNA杂交时,此类等位基因特异性寡核苷酸与PCR扩增的靶DNA或许多不同的突变杂交。

[0612] 可替代地,依赖于选择性PCR扩增的等位基因特异性扩增技术可以与本发明结合使用。用作特异性扩增引物的寡核苷酸可能在以下中携带所关注的突变:分子中心(因此扩增取决于差异杂交)(Gibbs等人(1989)《核酸研究》17:2437-2448)或一个引物的极限3'端处,其中在适当的条件下错配可以防止或减少聚合酶延伸(Prossner(1993)《Tibtech杂志(Tibtech)》11:238)。另外,可能期望在突变区引入新的限制性位点以创建基于切割的检测(Gasparini等人(1992)《分子与细胞探测(Mol.Cell Probes)》6:1)。预计在某些实施例中,扩增也可以使用Taq连接酶进行扩增(Barany(1991)《美国国家科学院院刊》88:189)。在此类情况下,只有在5'序列的3'端处存在完全匹配时才会发生连接,从而可以通过查询存在或不存在扩增来检测特定位置处存在已知突变。

[0613] XIII. 临床功效

[0614] 可以通过本领域已知的任何方法测量临床功效。例如,对如抗KIR3DL3抗体疗法等疗法的应答涉及对疗法的任何应答,如癌症,例如肿瘤,优选地涉及新辅助或辅助化学疗法开始后肿瘤质量和/或体积的变化。可以在新辅助或辅助情况下评估肿瘤应答,其中全身干预后肿瘤的大小可以与如通过CT、PET、乳房X线照片、超声或触诊测量的初始大小和尺寸进行比较,并且可以在组织学上估计肿瘤的细胞结构,并且与开始治疗前进行的肿瘤活检的细胞结构进行比较。应答还可以通过卡尺测量或活检或外科手术切除后的肿瘤病理学检查来评估。可以以定量方式记录反应,如肿瘤体积或细胞结构的百分比变化或使用半定量评分系统,如残留癌症负担(Symmans等人,《临床肿瘤学杂志(J.Clin.Oncol.)》(2007) 25: 4414-4422)或Miller-Payne评分(Ogston等人(2003)《乳腺(Breast)》(爱丁堡,苏格兰) 12: 320-327)或定性方式如“病理完全应答”(pCR)、“临床完全缓解”(cCR)、“临床部分缓解”(cPR)、“临床稳定疾病”(cSD)、“临床进行性疾病”(cPD)或其它定性标准。肿瘤应答的评估可以在新辅助或辅助疗法开始后早期进行,例如几小时、几天、几周后或优选地几个月后。应答评估的典型终点是新辅助化学疗法终止时或外科手术切除残留肿瘤细胞和/或肿瘤床时。

[0615] 在一些实施例中,本文所描述的治疗性处理的临床功效可以通过测量临床受益率(CBR)来确定。通过确定处于完全缓解(CR)的患者百分比、处于部分缓解(PR)的患者数量和在治疗结束后至少6个月的时间点患有稳定疾病(SD)的患者数量之和来测量临床受益率。此公式的简写是 $CBR = CR + PR + \text{超过6个月的SD}$ 。在一些实施例中,特定抗免疫检查点治疗方案的CBR为至少25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或更多。

[0616] 用于评估对抗免疫检查点疗法的应答的另外标准与“生存”有关,生存包含以下内容:生存至死亡,也称为总生存(其中所述死亡可能与病因无关或与肿瘤有关);“无复发生存”(其中术语复发应包含局部复发和远处复发);无转移生存;无病生存(其中术语疾病应包含癌症和与之相关的疾病)。所述存活长度可以通过参考定义的起点(例如,诊断时间或治疗开始)和终点(例如,死亡、复发或转移)来计算。另外,治疗功效的标准可以扩展为包含对化学疗法的应答、生存概率、给定时间段内的转移概率和肿瘤复发的概率。

[0617] 例如,为了确定适当的阈值,可以将特定的抗癌治疗方案施用于受试者群体,并且可以将结果与在施用任何抗免疫检查点疗法之前确定的生物标志物测量结果相关。结果测量可以是对在新辅助环境中给予的疗法的病理应答。可替代地,可以在一段时间内监测生物标志物测量值已知的抗免疫检查点疗法后受试者的结果测量值,如总生存和无病生存。在某些实施例中,对每个受试者施用相同剂量的抗免疫检查点剂。在相关实施例中,施用的剂量是本领域已知的抗免疫检查点药剂的标准剂量。监测的受试者的时间段可以变化。例如,可以监测受试者至少2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45、50、55或60个月。与抗免疫检查点疗法的结果相关的生物标志物测量阈值可以使用如实例部分中描述的那些等方法来确定。

[0618] XIV. 试剂盒

[0619] 另外,本公开还涵盖用于检测生物样品中KIR3DL3多肽或其片段的存在的试剂盒。例如,试剂盒可以包括能够检测生物样品中的KIR3DL3多肽或其片段的标记化合物或药剂;用于测定样品中KIR3DL3多肽或其片段的量的装置;以及用于将样品中KIR3DL3多肽或其片段的量与标准品进行比较的装置。可替代地,试剂盒可以包括一种或多种抗KIR3DL3抗体和/或抗HHLA2抗体(例如,本文所描述的那些),用于预后、治疗和/或免疫调节方法。化合物或药剂可以包装在合适的容器中。本公开所涵盖的试剂盒可以含有与固体支持物例如组织培养板或珠(例如,琼脂糖珠)偶联的抗体。

[0620] 试剂盒可以包含用于促进试剂盒设计的特定应用的另外组件。例如,可以提供含有用于在体外例如在ELISA或蛋白质印迹中检测和定量KIR3DL3的抗体的试剂盒。试剂盒可以含有的另外示例性药剂包含检测标记的方法(例如,用于酶标记的酶底物、用于检测荧光标记的过滤器组、适当的二级标记,如绵羊抗小鼠-HRP等)和对照所需的试剂(例如,对照生物样品或KIR3DL3蛋白质标准品)。试剂盒可以另外包含缓冲液和其它公认用于所公开的发明方法的试剂。非限制性实例包含用于减少非特异性结合的药剂,如载体蛋白或去污剂。本公开所涵盖的试剂盒还可以包含说明材料,所述说明材料公开或描述了所公开的发明的试剂盒或抗体在如本文提供的所公开的发明的方法中的用途。

[0621] 本发明通过以下实例进一步说明,所述实例不应被解释为限制性的。在本申请中引用的所有参考文献、专利和公开的专利申请的内容以及附图通过引用并入本文。

[0622] 实例

[0623] 实例1:材料和方法

[0624] 用于鉴定HHLA2的新型受体的表达筛选

[0625] 细胞微阵列技术用于鉴定新型HHLA2受体(英国海皮克的Retrogenix公司(Retrogenix, High Peak, UK))。覆盖超过3,500种不同质膜蛋白的具有约5500个全长cDNA克隆的文库在13个微阵列载玻片(“载玻片组”)中重复排列。人HEK293细胞在cDNA克隆上方生长并反向转染。在每个载玻片上一式四份地斑点化表达载体(pIRES-hEGFR-IRES-ZsGreen1),并且用于确保在每个载玻片上达到或超过转染效率的最小阈值。评估所得细胞微阵列与可溶性人HHLA2-mIgG2a融合蛋白的结合。

[0626] 将人HHLA2-mIgG2a融合蛋白以20 μ g/ml的浓度添加到固定的细胞微阵列载玻片中,并且用AF647标记的抗鼠IgG检测抗体检测结合相互作用。为13个载玻片组中的每一个载玻片筛选了两个复制载玻片。使用ImageQuant软件(通用电气公司(GE))分析和定量荧光

图像(用于转染效率)。蛋白质“命中”被定义为与背景水平相比示出信号升高的重复点。这是通过使用ImageQuant软件上网格化的图像进行目视检查来实现的。

[0627] 为了确定哪些命中(如果有的话)对人HLA2具有可重复性和特异性,将编码所有文库筛选命中的载体以及适当的对照KIR受体排列并在新载玻片上的HEK293细胞中表达。使用文库筛选中使用的剂量和温育条件或适当的阳性和阴性对照处理(n=每次处理2个载玻片),用可溶性HLA2-mIgG2a筛选相同的载玻片。

[0628] KIR3DL3抗体特异性测定

[0629] 将表达完整KIR家族cDNA组的复制微阵列载玻片固定并用含有PBS/0.5%BSA的缓冲液封闭,并且在室温下用PBS/0.1%BSA中以1:5、1:25和1:250稀释度的单个KIR3DL3 mAb杂交瘤上清液温育1小时。将细胞阵列用PBS洗涤,并且在室温下在含有AF647缀合的山羊抗鼠IgG(H+L)(生命技术公司,A21235)的PBS/0.1%BSA中温育1小时。将载玻片用PBS清洗,干燥,并且为ZsGreen1和AF647荧光成像。HLA2-mIgG2a(20 μ g/ml)用作阳性对照,以检测斑点阵列上与KIR3DL3和TMIGD2的结合。

[0630] 受体结合和阻断测定

[0631] 将KIR3DL3 mAb与KIR3DL3转染的300.19细胞一起在4 $^{\circ}$ C下预温育30分钟。添加HLA2-鼠IgG2a(在IgG2a L235E、E318A、K320A、K322A处突变)(10 μ g/ml的25 μ l),并且在4 $^{\circ}$ C下继续温育30分钟。洗涤细胞并且用5 μ g/ml Alexa 647偶联的298.6F8mAb(对在L235E、E318A、K320A、K322A处突变的鼠IgG2a具有特异性的鼠抗体)检测HLA2-鼠IgG2a的结合。使用GraphPad Prism®8进行EC50和IC50分析。

[0632] 细胞系和细胞培养

[0633] Raji细胞系(ATCC CCL-86)、Jurkat(克隆E6-1)(ATCC TIB-152)、CHO-K1(ATCC CCL-61)、A498(ATCC HTB-44)、786-O(ATCC CRL-1932)以及K562(ATCC CCL-243)和NK-92MI(ATCC CRL-2408)细胞获自美国典型培养物保藏中心(ATCC,美国维吉尼亚州马纳萨斯)。将786-O、A498、Raji、Jurkat和K562细胞在37 $^{\circ}$ C下在补充有10%胎牛血清(FBS,生命技术公司26140-079)、1%青霉素/链霉素(海克隆公司(Hyclone)SV30010.01)的RPMI1640培养基(生命技术公司A10491-01)中用5%CO₂进行温育。将NK-92MI细胞在37 $^{\circ}$ C下使用补充有10%FBS(生命技术公司26140-079)并且补充有10%人血清(西格玛奥德里奇公司(Sigma Aldrich)H3667-100ML)、1%青霉素/链霉素(海克隆公司SV30010.01)的X-VIVO 15TM无血清造血细胞培养基(龙沙公司(Lonza)04-418Q)用5%CO₂进行培养。在有指示的情况下,用IFN- γ (R&D#285-IF/CF;10 ng/ml)、IL-10(R&D#1064-IF/CF;10ng/ml)或TGF- β 1(R&D#4454-BH;10 ng/ml)处理细胞。

[0634] TMIGD2-NFAT-Jurkat稳定细胞系培养物补充有1000 μ g/ml GeneticinTM(生命技术公司11811031)和200 μ g/ml潮霉素(英杰公司10687010),以确保维持TMIGD2和NFAT报告基因的重组表达。KIR3DL3-IL2-Jurkat稳定细胞系培养物补充有1000 μ g/ml GeneticinTM和0.25 μ g/ml嘌呤霉素(InvivoGen ant-pr-1),以确保维持KIR3DL3和IL-2报告基因的表达。K562 HHLA2稳定细胞系补充有1 μ g/mL嘌呤霉素。CHO细胞维持在补充有10%FBS和1%青霉素/链霉素的F12-K(海克隆公司SH30526.01)培养基中。HLA2-抗CD3 scFV-CHO稳定细胞系培养物补充有1000 μ g/ml GeneticinTM和500 μ g/ml潮霉素,以确保维持HLA2和TCR激活剂的重组表达。

[0635] 人T细胞和NK细胞的激活和培养

[0636] RosetteSepTM人T细胞富集混合物(干细胞技术公司(Stemcell)#15021)用于通过阴性选择从健康供体的血液中分离T细胞。T细胞按照制造商推荐的方案(干细胞技术公司10971)使用ImmunoCultTM人CD3/CD28 T细胞激活剂四聚体激活,并且在存在100U/ml的IL-2(派普泰克(PeproTech)#200-02)的情况下,使用ImmunoCultTM-XF T细胞扩增培养基(干细胞技术公司10981)培养。在指定时间,将T细胞用以下抗体染色:Alexa 647 1G7抗体(KIR3DL3抗体)或Alexa 647鼠IgG2b、5ug/ml下的κ同型对照(百进生物(Biolegend)#400330)、BV785抗人CD3(百进生物#344842)、PE/花青7抗人CD8抗体(百进生物#344712)、PE/花青7抗人CD4抗体(百进生物#317414)、PE/花青7鼠IgG2b、κ同型(百进生物#400325)、PE/花青7鼠IgG1、κ同型(百进生物#400125)和BV785鼠IgG1、κ同型(百进生物#400169)。

[0637] NK-92(ATCC CRL-2407)和NK-92MI(ATCC CRL-2408)细胞获自美国典型培养物保藏中心(ATCC,美国维吉尼亚州马纳萨斯)。将NK-92MI细胞在37℃下使用补充有10%FBS(生命技术公司26140-079)并且补充有10%人血清(西格玛奥德里奇公司H3667-100ML)、1%青霉素/链霉素(海克隆公司SV30010.01)的X-VIVO 15TM无血清造血细胞培养基(龙沙公司04-418Q)用5%CO₂进行培养。

[0638] 质粒构建

[0639] TCR激活剂,即膜锚定嵌合抗体通过将人CD3 mAb OKT3(Kipriyanov等人1997,《PEDS》10:445-453)的单链可变片段(scFv)融合到小鼠CD8α(登录号:NP_001074579.1)的C端结构域(113-220)而构建。合成编码TCR激活剂的DNA序列,并且将其插入pIRES-hyg3载体(Clontech公司(Clontech))以制备所得构建体TCRa_pIRESHyg3。合成人HLA2(登录号:NM_009003)、TMIGD2(登录号:NM_144615)和KIR3DL3(对应于KIR3DL3*00402等位基因的基因库登录号BC143802.1),并且将其单独插入pIRES-Hyg3或pIRES-Neo3以制备HLA2_pIRESneo3、TMIGD2_pIRESHyg3和KIR3DL3_pIRESHyg3。NFAT报告基因含有在四个NFAT应答元件拷贝的控制下的萤火虫荧光素酶基因,接着是最小启动子。IL2报告基因含有在内源性IL2启动子的控制下的萤火虫荧光素酶基因。将编码报告基因的DNA序列插入pcDNA 3.1以生成NFAT-Luc-pcDNA和IL2-Luc-pcDNA。

[0640] 稳定细胞系的生成

[0641] Jurkat细胞(克隆E6-1)通过电穿孔依次与NFAT_Luc_pcDNA和TMIGD2_pIRESHyg3共转染。通过潮霉素(200μg/ml)和G418(1000μg/ml)双重选择和有限稀释生成稳定的克隆。所选择的稳定细胞克隆用补充有潮霉素和G418的完整细胞培养基维持。Jurkat细胞(克隆E6-1)通过电穿孔依次与IL2_Luc_pcDNA和KIR3DL3_puro共转染。通过嘌呤霉素(0.25μg/ml)和G418(1000μg/ml)双重选择和有限稀释生成稳定的克隆。所选择的稳定细胞克隆用补充有嘌呤霉素和G418的完整细胞培养基维持。将CHO-K1细胞通过Lipofectamine 2000(英杰公司)依次与TCRa_pIRESHyg3和HLA2_pIRESneo3共转染。通过潮霉素和G418双重选择和有限稀释生成稳定的克隆。所选择的稳定细胞克隆用补充有潮霉素和G418的完整细胞培养基维持。

[0642] 从Synthego公司(Synthego)订购靶向人β2-微球蛋白基因(5'-GCTACTCTCTCTTTCTGGCC)的sgRNA(万维网addgene.org/84381/),在第一个和最后3个核苷酸中具有2'-O-甲基3'硫代磷酸酯修饰。将2μl 66.88μM Cas9核酸酶(Aldevron公司

(Aldevron), SpyFi Cas9核酸酶9214-0.25MG) 与3 μ l 100 μ M sgRNA混合。将Cas9核酸酶和sgRNA在室温下温育20分钟。按照龙沙公司推荐的Raji细胞设置, 使用龙沙公司4D Nucleofector用Cas9 RNP对Raji细胞进行电穿孔。将Raji细胞培养48小时, 然后使用 β 2-微球蛋白抗体(百进生物395711) 分选 β 2-微球蛋白阴性。多次将 β 2-微球蛋白阴性细胞培养并且重新分选, 直到获得纯的 β 2-微球蛋白阴性细胞群体。

[0643] 报告基因测定

[0644] TMIGD2_NFAT_Jurkat报告基因活性:

[0645] 将HHLA2-TCR-CHO和TCR-CHO细胞以2 $\times 10^4$ 个细胞/孔的密度接种在白色不透明底部96孔板中的CHO-K1生长培养基中, 并且在37 $^{\circ}$ C下用5%CO₂温育过夜。第二天, 除去培养基, 并且将细胞与HHLA2抗体一起在50 μ l Jurkat细胞培养基中温育一小时, 然后在50 μ l Jurkat细胞培养基中以4-5 $\times 10^4$ 个细胞/孔添加TMIGD2 NFAT Jurkat报告基因细胞系(克隆#62)。将培养物温育3到6小时。根据制造商的方案和在发光计中测量的发光, 通过添加100 μ l ONE-StepTM荧光素酶测定系统(BPS生物科学公司(BPS Bioscience) 60690) 产生荧光素酶信号。

[0646] KIR3DL3_IL2_Jurkat报告基因活性

[0647] 将HHLA2-TCR-CHO(克隆#28) 或TCR-CHO细胞以2 $\times 10^4$ 个细胞/孔的密度接种在白色不透明底部96孔板中的CHO-K1生长培养基中, 并且在37 $^{\circ}$ C下用5%CO₂温育过夜。第二天, 除去培养基, 并且将细胞与HHLA2或KIR3DL3抗体一起在50 μ l Jurkat细胞培养基中温育一小时, 然后在50 μ l Jurkat细胞培养基中以4-5 $\times 10^4$ 个细胞/孔添加KIR3DL3_IL2_Jurkat报告基因细胞系(克隆#2-12) 以及在每孔100 μ L测定混合物中最终浓度为1 μ g/mL的CD28抗体(克隆9.3, BioXcell BE0248)。根据制造商的方案和在发光计中测量的发光, 通过添加100 μ l ONE-StepTM荧光素酶测定系统(BPS生物科学公司, 60690) 产生荧光素酶信号。

[0648] 抗体生成

[0649] HHLA2 mAb: 将BALB/c小鼠通过皮下注射含50 μ g重组HHLA2-mIg2a的完全弗氏佐剂致敏, 然后用50 μ g重组HHLA2-mIg2a加强3到4轮, 然后腹膜内注射含变性HHLA2-mIg2a的不完全弗氏佐剂。将表现出最高HHLA2抗体滴度的小鼠的脾脏和淋巴结细胞与SP2/0骨髓瘤细胞融合, 并且通过流式细胞术在HHLA2转染和亲本300.19细胞上筛选杂交瘤上清液。

[0650] KIR3DL3 mAb: 将BALB/c小鼠通过肌肉注射心脏毒素(10mM的50 μ l) 致敏, 并且通过相同的注射途径用含有KIR3DL3 cDNA的100 μ g质粒免疫。用KIR3DL3质粒DNA和KIR3DL3转染的NIH-3T3细胞进行了另外两轮心脏毒素预处理和加强。将表现出最高KIR3DL3抗体滴度的小鼠的脾脏和淋巴结细胞与SP2/0骨髓瘤细胞融合, 并且通过流式细胞术在KIR3DL3转染和亲本300.19细胞上筛选杂交瘤上清液。

[0651] NK细胞毒性测定

[0652] 使用KILR检测试剂盒(Eurofins/Discoverx公司(Eurofins/Discoverx) 97-0001M) 测定NK92-MI细胞的细胞毒性。使用制造商的建议, 将靶细胞、K562细胞用KILR逆转录病毒颗粒(贴壁和悬浮细胞(G418) 的KILR[®]逆转录病毒颗粒, Eurofins/Discoverx公司97-0006) 感染。在500 μ g/ml G418中选择感染细胞。将NK92-MI(效应子) 细胞在96孔板中与10⁴个K562靶细胞以1:1、3:1和5:1的效应子与靶标(E:T) 比率在37 $^{\circ}$ C下共培养4小时。在室温下向效应细胞或靶细胞中添加100 μ l KILR检测试剂1小时后, 在光度计上检测细胞裂解。

在有指示的情况下,将NK92-MI(效应子)细胞与浓度为0.1、1.0和10 μ g/ml的HHLA2或KIR3DL3阻断抗体和适当的同型对照一起温育,并且与K562(靶标)细胞以3:1的固定效应子与靶标(E:T)比率在37 $^{\circ}$ C下共培养4小时。特异性裂解百分比计算如下:

[0653] 特异性裂解(%)=[光密度(OD)实验组-0d靶细胞自然释放对照]/(OD靶细胞最大释放对照-0d靶细胞自然释放对照) $\times$ 100。在用制造商提供的裂解剂处理后测量最大释放。

[0654] 将Raji和HHLA-2转染的Raji细胞(β 2-微球蛋白敲除)在室温下用含1 μ M钙黄绿素AM(百进生物425201)的PBS染色20分钟,然后用PBS洗涤两次并以2 $\times$ 10⁶/ml重悬于RPMI完全培养基中。在存在HHLA2或KIR3DL3抗体或同型对照的情况下,将1:1、2:1和3:1E/T比率的5 $\times$ 10⁴个Raji靶细胞和NK-92MI效应细胞在圆底96孔板中在37 $^{\circ}$ C下用5%CO₂培养4小时。然后将板放在冰上并通过流式细胞术进行分析。使用FlowJo进行分析。细胞裂解百分比计算如下:细胞毒性%=在不存在效应子(100%)的情况下的钙黄绿素AM+靶细胞的%-在存在效应子(E/T比率+1)的情况下的钙黄绿素AM+靶细胞的%。

[0655] CD107脱粒测定

[0656] 将Raji β 2-微球蛋白KO和HHLA-2转染的Raji β 2-微球蛋白KO与NK-92MI以1:1、2:1和3:1的效应子与靶标比率(E:T)在37 $^{\circ}$ C下在圆底96孔板中用5%CO₂共培养3小时。使用10 μ g/ml的抗KIR3DL3抗体(1G7)和鼠IgG2b同型。以1:100稀释度使用抗体BV421抗人CD107a(百进生物#328625)、APC抗人CD56(百进生物#362503)、APC鼠IgG1、 κ 同型对照(百进生物#400121)和BV421鼠IgG1、 κ 同型对照(百进生物#400157)。以1:1000稀释度使用莫能菌素溶液(1,000X)(百进生物#420701),并且细胞刺激混合物、PMA/离子霉素(百进生物#423301)以1:500稀释度。随后将板置于冰上,并且使用流式细胞术和FlowJo软件分析细胞在CD56门控细胞上的CD107a表达。

[0657] HHLA2转染的K562和RAJI β -2微球蛋白敲除靶细胞的衍生:

[0658] 将K562细胞在37 $^{\circ}$ C下在补充有10%胎牛血清(FBS,生命技术公司26140-079)、1%青霉素/链霉素(海克隆公司SV30010.01)的RPMI1640培养基(生命技术公司A10491-01)中用5%CO₂温育。

[0659] 用pEF-Puro载体中的50 μ g Mlu I线性化HHLA2 cDNA对K562细胞进行电穿孔(300伏特,1600法拉),选择嘌呤霉素抗性,用PE缀合的HHLA2 mab 6F10进行染色,分选并克隆单细胞。将K562 HHLA2稳定细胞系在上述补充有1 μ g/mL嘌呤霉素的RPMI1640培养基中进行培养。

[0660] 蛋白质印迹分析

[0661] 根据制造商的说明(赛默飞世尔科技公司;完整Ultra片剂,微型,无EDTA,罗氏公司(Roche)),用具有蛋白酶抑制剂混合物的RIPA缓冲液制备蛋白质裂解物。将裂解物上样到单个宽泳道4-15%梯度mini-Protean TGX凝胶(伯乐公司(Biorad))中,并且通过半干法转移。用具有Tween20(TBST)的含12%脱脂牛奶和1%正常山羊血清的Tris缓冲盐水在室温下封闭膜1小时。将膜用TBST洗涤并且在多孔微型印迹仪(multi-well-mini-blotter)中用含5 μ g/ml抗KIR3DL3 mAb 574.1F12的TBST和1%BSA在4 $^{\circ}$ C下温育过夜。在室温下将膜用TBST洗涤三次,并且用含次级抗体(1:4000,HRP缀合的山羊抗鼠IgG,南方生物技术公司(Southern Biotech))的TBST、6%脱脂牛奶和0.5%正常山羊血清温育30分钟。用TBST另外洗涤3次后,将1:1比率的ECL底物:增强子添加到膜(SuperSignal West Pico稳定过氧化物

溶液, Supersignal West Pico 鲁米诺/增强子溶液, 赛默飞世尔科技公司) 中, 并且在 Hyblot CL 放射自显影胶片 (丹维尔科技公司 (Denville Scientific)) 上成像。

[0662] RNA 提取和定量实时 PCR

[0663] 使用 Purelink RNA 微型试剂盒 (赛默飞世尔科技公司) 从细胞沉淀中提取总 RNA。根据制造商的建议, 使用大容量 RNA 到 cDNA 试剂盒 (应用生物系统公司 (Applied Biosystems)、赛默飞世尔科技公司) 进行 cDNA 合成。根据制造商的建议, 使用 Power SYBRTM Green PCR Master 混合物进行 RT-PCR。使用的引物包含:

[0664] 18S: fw 5'-GTAACCCGTTGAACCCATT-3';

[0665] 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'

[0666] KIR3DL3: fw 5'-AGAAGACGGGATGCCTGTC-3';

[0667] rv 5'-GTGAAGTCAACATCTGTAGGT-3'

[0668] HHLA2: fw 5'-TACAAAGGCAGTGACCATTG-3';

[0669] rv 5'-AGGTGTAAATTCCTTCGTCCAGA-3'

[0670] PD-L1 (CD274): fw 5'-TGGCATTGCTGAACGCATTT-3';

[0671] rv 5'-TGCAGCCAGGTCTAATTGTTTT-3'

[0672] 18S 用作每个样品的内部对照。相对 mRNA 水平由 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 公式确定, 并且实验重复三次。

[0673] ccRCC 患者的 mRNA 表达分析

[0674] TCGA 肾透明细胞患者的 TCGA RSEM RNASeqV2 数据从万维网 (gdac.broadinstitute.org/runs/stddata__2016_01_28/data/KIRC/20160128/gdac.broadinstitute.org_KIRC.Merge_rnaseqv2_illumina_hiseq_rnaseqv2__uncedu__Level_3__RSEM_genes__data.Level_3.2016012800.0.0.tar.gz) 的 TCGA GDAC 下载。为了得出每百万转录物 (TPM), 将 “scaled_estimate” 输出值乘以 106。将这些 TPM 值转换为 $\log_2(TPM+1)$, 并且使用威尔科克森秩和测试 (Wilcoxon rank sum test) 比较每个基因的肿瘤和正常表达。

[0675] 细胞术:

[0676] 在 Gallios 流式细胞仪 (配置: 488nm、561nm、405nm、355nm 和 635nm) 或 BD Fortessa 流式细胞仪上分析细胞。用 FlowJo 或 Kaluza 软件分析数据。对于每个实验, 分析了 10,000 到 20,000 个细胞。

[0677] 统计:

[0678] 除非另有说明, 否则使用 GraphPad Prism[®] 软件 7 分析数据。所有数据表示为平均值 $\pm$ S.D. (误差条), 除了在另有说明的情况下 (参见图例)。如图例所示使用斯图登氏 t 测试 (Student's t test) 和双向 ANOVA (非显著性 (ns), $P \geq 0.05$; * $P \leq 0.05$; ** $P \leq 0.01$; *** $P \leq 0.001$; **** $P \leq 0.0001$)。

[0679] 实例 2: KIR3DL3 作为 HHLA2 的第二受体的鉴定和表征

[0680] 为了鉴定 HHLA2 的抑制性受体, 使用可溶性人 HHLA2-mIgG2a 融合蛋白 (HHLA2-Ig) 对约 5500 个细胞表面受体的文库进行受体筛选, 每个细胞表面受体在载玻片上的 HEK293 细胞中单独表达。筛选将 KIR3DL3 鉴定为 HHLA2 结合的阳性信号 (图 1A 和 2A)。如预期的, HHLA2-Ig 还与 TMIGD2 和 Fc 受体 FCGR2A 结合, 但不与 EGFR、PD-1 或 PD-L1 结合 (图 1A)。KIR3DL3 是 KIR

基因家族的成员,其配体尚未被描述。KIR家族的其它成员存在于仅鉴定KIR3DL3的5500cDNA筛选中,但为了确认特异性,单独测试了HLA2-Ig与KIR3DL3和KIR基因家族的其它成员的结合。HLA2-Ig仅与KIR3DL3结合,并且不与KIR家族的其它成员结合(图1A和2A)。

[0681] 为了确认HLA2/KIR3DL3与HLA2/TMIGD2相互作用,测试了HLA2-Ig与表达TMIGD2和KIR3DL3的细胞的结合。KIR3DL3和TMIGD2在300.19小鼠前B细胞白血病细胞系中稳定过表达,并且将转染的细胞与HLA2-mIgG2a一起温育并通过流式细胞术分析。本文发现HLA2与其两个受体KIR3DL3和TMIGD2的剂量依赖性结合,所述两个受体具有表明这两个受体的结合亲和力类似的非常类似的50%最大结合水平(图1B和4A)。与未转染的300.19细胞或HLA2本身(用HLA2转染的300.19细胞)没有结合。用KIR3DL3和TMIGD2瞬时转染的293T细胞观察到类似的特异性结合(图4B和4C)。

[0682] 实例3:KIR3DL3单克隆抗体的衍生

[0683] 生成并分析了许多抗KIR3DL3单克隆抗体。简而言之,产生了人KIR3DL3 cDNA质粒和KIR3DL3转染的3T3或300.19细胞,并且用于对小鼠进行免疫以衍生KIR3DL3小鼠单克隆抗体。五只小鼠(Balb/c;C57Bl/6;Swiss-Webster),4到6周大,从查尔斯河实验室(Charles River Laboratories)(马萨诸塞州威明顿市)获得。所有动物都是根据哈佛动物常设委员会机构动物护理和使用委员会(the Institutional Animal Care and Use Committee of Harvard Standing Committee on Animals)的指导方针获取和维护的。在肌肉注射质粒DNA前五天,通过在胫骨肌中预注射50 μ l的10mM心脏毒素(黑颈喷毒眼镜蛇毒液;法国Latoxan实验室(Latoxan Laboratories,France))将小鼠致敏。将小鼠麻醉,并且将悬浮在杜尔贝氏磷酸盐缓冲盐水(Dulbecco's phosphate buffered saline)(PBS;纽约州格兰德岛的吉博科公司(GIBCO,Grand Island,NY))中的100微克cDNA注射到两个胫骨肌(每个胫骨肌50 μ l)中。在第14天和第28天重复心脏毒素预处理和cDNA加强。五周后,用在PBS中KIR3DL3转染的300.19细胞对小鼠进行免疫。两周后,用在PBS中KIR3DL3转染的NIH-3T3细胞对小鼠进行免疫。十天后,对小鼠取血并且通过流式细胞术在KIR3DL3转染的细胞上对血清KIR3DL3 mAb滴度进行评估。选择表现出最高血清KIR3DL3 mAb滴度的Balb/C小鼠动物#2以进行融合。先前免疫后五周,将小鼠#2在PBS中用KIR3DL3转染的NIH-3T3细胞加强,并且在4天后融合。将采集的脾脏和淋巴结制成细胞悬液,然后用DMEM洗涤。对脾脏/淋巴结细胞进行计数,并且使用脾脏:骨髓瘤比率2:1与不能分泌重链或轻链免疫球蛋白链的SP 2/0骨髓瘤细胞混合(Kearney等人(1979)《免疫学杂志》123:1548-1550和Kilpatrick等人(1997)《杂交瘤(Hybridoma)》16:381-389)。根据标准程序,将细胞与聚乙二醇1450在HAT选择培养基中的八个96孔组织培养板中融合(Kohler和Milstein(1975)《自然》256:495-497)。融合后介于10与21天之间,杂交瘤菌落变得可见,并且采集培养上清液,然后通过流式细胞术对用KIR3DL3 cDNA转染的300.19细胞筛选KIR3DL3结合,以及对未转染的300.19细胞缺乏反应性。

[0684] 衍生的KIR3DL3 mAb的结合特性,例如结合亲和力汇总在表3中。

[0685] 实例4:KIR3DL3 mAb的结合和选择性

[0686] 图5示出了KIR3DL3 mAb与KIR3DL3阳性细胞结合。将指定浓度的KIR3DL3 mAb与KIR3DL3转染的300.19前B细胞一起在4 $^{\circ}$ C下温育30分钟。用10 μ g/ml PE标记的山羊抗鼠IgG(H+L)检测KIR3DL3 mAb与转染的300.19细胞的结合。因此,KIR3DL3 mAb与细胞表达的

KIR3DL3结合。

[0687] 表4示出了大多数KIR3DL3 mAb与KIR3DL3特异性结合,但不与KIR家族的其它成员结合。一些KIR3DL3 mAb还表现出与KIR3DL1、KIR2DL5A和/或KIR2DL5B的弱到中等结合。在含有人HEK293细胞的载玻片上斑点化一组编码KIR家族基因的cDNA质粒,并且反向转染到HEK293细胞中以表达细胞表面KIR分子。在KIR分子板上温育1:5、1:25和1:250稀释度的KIR3DL3 mAb杂交瘤上清液,并且使用AlexaFluor647标记的抗鼠IgG (H+L) 抗体检测结合,然后进行荧光成像(表4)。HHLA2-mIgG2a (20ug/ml) 用作阳性对照,以检测斑点阵列上与KIR3DL3和TMIGD2的结合。

[0688] 图6示出了KIR3DL3 mAb在蛋白质印迹上与KIR3DL3结合。根据制造商的说明(赛默飞世尔科技公司)用RIPA缓冲液制备KIR3DL3转染的Jurkat细胞的蛋白质裂解物,并且在制备裂解物之前将蛋白酶抑制剂混合物添加到缓冲液(完整Ultra片剂、微型、无EDTA、罗氏公司)中。蛋白质裂解物由用人KIR3DL3稳定转染的Jurkat细胞制成。将七百μg裂解物上样到单个宽泳道4-15%梯度mini-Protean TGX凝胶(伯乐公司)中,并且通过半干法转移。用具有Tween20 (TBST)的含12%脱脂牛奶和1%正常山羊血清的Tris缓冲盐水在室温下封闭膜1小时。用TBST洗涤膜并且在多孔微型印迹仪中用含第一抗体(最终稀释度为1到10、1到30和1到90的杂交瘤上清液)抗KIR3DL3mAb的TBST和1%BSA在4℃下温育过夜。在室温下将膜用TBST洗涤三次,并且用含次级抗体(1:4000,HRP缀合的山羊抗鼠IgG,南方生物技术公司)的TBST、6%脱脂牛奶和0.5%正常山羊血清温育30分钟。用TBST另外洗涤3次后,将1:1比率的ECL底物:增强子添加到膜(SuperSignal West Pico稳定过氧化物溶液,Supersignal West Pico鲁米诺/增强子溶液,赛默飞世尔科技公司)中,并且在Hyblot CL放射自显影胶片(丹维尔科技公司)上成像。

[0689] 图3A-图3E和表5示出了抗体与抗原结合和阻断HHLA2与KIR3DL3或TMIGD2结合的能力的另外表征。分别观察到KIR3DL3和HHLA2抗体与KIR3DL3和HHLA2转染的300.19细胞的剂量依赖性结合(图3A和3C)。除6D10外,所有HHLA2抗体均表现出与其抗原的高亲和力和结合。鉴定了阻断和非阻断抗体。HHLA2抗体2G2和6F10阻断HHLA2与KIR3DL3和TMIGD2的相互作用,而2C4和6D10抗体仅阻断HHLA2/KIR3DL3相互作用但不阻断HHLA2/TMIGD2相互作用(图3D和3E、表5)。KIR3DL3 mAb 1G7、2F11和8F7以剂量依赖性方式表现出与KIR3DL3的有效结合(图3A)。1G7和2F11阻断了KIR3DL3与HHLA2的相互作用,而8F7仅弱阻断了相互作用(图3B和表5)。所有KIR3DL3抗体与KIR3DL3特异性结合,但不与除了2F11抗体之外的任何其它KIR家族成员特异性结合,所述2F11抗体也表现出与KIR2DL5A的弱结合(表4)。

[0690] 实例5:KIR3DL3 mAb阻断HHLA2与KIR3DL3结合

[0691] 图9示出了KIR3DL3 mAb阻断HHLA2与KIR3DL3的结合。将指定浓度的KIR3DL3 mAb与KIR3DL3转染的300.19细胞一起在4℃下预温育30分钟。添加HHLA2-鼠IgG2a(在IgG2a L235E、E318A、K320A、K322A处突变)(10ug/ml的25ul),并且在4℃下继续温育30分钟。洗涤细胞并且用5ug/ml Alexa647偶联的298.6F8 mAb(对在L235E、E318A、K320A、K322A处突变的鼠IgG2a具有特异性的鼠抗体)检测HHLA2-鼠IgG2a的结合。使用GraphPad Prism®进行EC50和IC50分析。

[0692]

表3: KIR3DL3 mAb特性汇总

KIR3DL3 mAb 574.2系列	同型	与KIR3DL3 的结合Kd (ug/ml)	对KIR3DL3 的选择性	对KIR3DL3 与HLA2的 结合的阻断 IC50 (ug/ml)	通过KIR3DL3 mAb 阻断对Jurkat IL-2荧 光素酶激活进行的刺激		KIR3DL3的 蛋白质印迹
					EC50 (ug/ml)	激活倍数	
1C7	IgG1	0.77	3DL3	0.32	77.0	8.2	ND
1F12	IgG2b	0.1	3DL3	非阻断剂	ND	ND	ND
1G7	IgG2b	0.13	3DL3	0.06	0.37	9.9	ND
2D8	IgG2b	0.46	3DL3, 2DL5A	0.21	1.3	14.9	ND
2F11	IgG2b	0.43	3DL3, 2DL5A	0.16	1.25	17.1	弱
2H1	IgG2b	0.42	3DL3, 2DL5A	0.19	1.79	16.2	ND
3H6	IgG2b	0.14	3DL3	非阻断剂	ND	ND	强
5E7	IgG2a	0.11	3DL3	ND	ND	8.0	ND
8F7	IgG1	1.0	3DL3	27.5	无激活	1.2	ND

ND: 未确定
抗KIR3DL3 mAb 1F12是人肾肿瘤组织免疫组织化学的首选，并且3H6是第二选择。

[0693]

表4: KIR3DL3与其它KIR家族成员的KIR3DL3 mAb结合选择性

KIR3DL3 mAb	同型	3DL3	3DL1	3DL2	2DL1	2DL2	2DL3	2DL4	2DL5A	2DL5B	2DS1	2DS2	2DS3	2DS5	3DS1
1C7	IgG1	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1D12	IgG2a	+++	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
1F12	IgG2b	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1G7	IgG2b	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2D8	IgG2b	+++	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
2F11	IgG2b	+++	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
2H1	IgG2b	+++	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
3H6	IgG2b	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5A7	IgG1	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5E7	IgG2a	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6C5	IgG2a	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7F1	IgG2a	+++	+/-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7H2	IgG1	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8C2	IgG2a	+++	-	-	-	-	-	-	++	+	-	-	-	-	-
8F7	IgG1	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

强结合: +++
中等结合: ++
弱/中等结合: +
非常弱结合: +/-
超过背景无结合: -

[0694] 在表4中,将表达KIR家族cDNA组的复制微阵列载玻片(如在图1A、图2B和图2C中)固定并用含有PBS/0.5%BSA的缓冲液封闭,并且在室温下用PBS/0.1%BSA中以1:5、1:25和

1:250稀释度的单个KIR3DL3 mAb杂交瘤上清液温育1小时。将细胞阵列用PBS洗涤,并且在室温下在含有AF647缀合的山羊抗鼠IgG (H+L) (生命技术公司,A21235)的PBS/0.1%BSA中温育1小时。将载玻片用PBS清洗,干燥,并且为ZsGreen1和AF647荧光成像。

[0695] 实例6:KIR3DL3在T细胞激活后在一些T细胞上被诱导并且在NK92-MI细胞上表达

[0696] 先前发表的研究表明,TMIGD2在原初T细胞和NK细胞上被表达,并随着激活而下调。如NKG2A和KIR受体等一些NK细胞受体可以在CD8淋巴细胞上表达。评估了T细胞上KIR3DL3的表达。从供体全血中纯化T细胞,用CD3/CD28抗体四聚体激活,并且在门控CD3+CD4+和CD3+CD8+T细胞中测定KIR3DL3表达(图10A)。在第0天(未激活)(图10B)观察到最小KIR3DL3表达(0.26%的CD4+细胞和0.39%的CD8+细胞),并且在第3天和第10天,CD4+和CD8+细胞中的KIR3DL3表达增加,所述表达在激活后第21天达到峰值(6.60%的CD4+细胞和5.69%的CD8+细胞)(图10C)。

[0697] 本文鉴定了内源性表达KIR3DL3的NK细胞系NK92-MI。NK92-MI通过转染IL-2cDNA源自原始NK92,并且过表达IL-2,无需外源应用IL-2。KIR3DL3在少数亲本NK92细胞上表达,但通过流式细胞术和蛋白质印迹在NK92-MI细胞中得到证实(图10D和图7)。另外,已报告在蜕膜NK细胞上的KIR3DL3表达,并且本文通过分析可公开访问的数据库中的单细胞RNA数据证实了这一点(图8)。

[0698] 实例7:KIR3DL3是HHLA2的免疫抑制性检查点受体,并且阻断抗体增强T细胞和NK活性

[0699] KIR3DL3的细胞质结构域含有一个ITIM基序,并且预计具有免疫抑制功能。为了评估HHLA2/KIR3DL3相互作用的功能,将表达KIR3DL3和含有驱动荧光素酶报告基因的NFAT、AP-1和NFkB应答元件的IL-2启动子的Jurkat T细胞与单独或组合HHLA2稳定表达细胞表面抗CD3 scFV的CHO细胞共培养。添加可溶性抗CD28 mAb以提供强共刺激信号并且评估荧光素酶活性。如预期的,CD3信号是T细胞激活所必需的,并且CD28共刺激信号显著增加了IL-2报告基因活性(图11A)。本文观察到,通过KIR3DL3的HHLA2介导的信号导致T细胞激活显著降低,如通过IL-2报告基因活性测量的。这些结果表明KIR3DL3是抑制性检查点受体。

[0700] 为了评估TMIGD2信号传导在HHLA2参与和抗CD3 mAb激活后的影响,TMIGD2在Jurkat细胞中过表达,所述Jurkat细胞表达驱动荧光素酶报告基因的NFAT应答元件。当TMIGD2转染的Jurkat细胞与单独或组合HHLA2稳定表达细胞表面抗CD3 scFV的CHO细胞共培养时,观察到与单独的CD3信号传导相比,HHLA2增加了T细胞激活(图12),这与TMIGD2的报告共刺激活性一致。

[0701] 为了评估阻断HHLA2/KIR3DL3相互作用的功能性结果,在KIR3DL3 Jurkat报告基因测定中对受体阻断和非阻断HHLA2和KIR3DL3抗体进行评估。与其受体阻断活性一致,阻断HHLA2 mAb 2C4、2G2和6F10增强了IL-2报告基因活性,而弱阻断剂6D10则没有(图11B)。类似地,KIR3DL3 mAb 1G7和2F11增强了与其受体阻断活性一致的IL-2报告活性和T细胞激活,而弱阻断剂8F7则没有(图11C和表5)。与1G7相比,2F11 mAb表现出对IL-2报告基因活性的诱导倍数更高,但是1G7的结合亲和力更高。

[0702] 实例8:KIR3DL3 mAb或HHLA2 mAb促进T细胞激活

[0703] 图13示出了响应于抗CD3-scFV和HHLA2介导的信号,KIR3DL3 mAb增强Jurkat-KIR3DL3 T细胞中IL-2启动子驱动的荧光素酶表达。将CHO-抗CD3 scFv-HHLA2细胞或CHO-

抗CD3 scFV细胞以 3.5×10^4 的浓度接种在0.15ml培养基中的96孔板中,其中孔A1作为仅含有0.15培养基的阴性对照。将细胞在37℃下用5%CO₂温育过夜。第二天,将八个连续两倍稀释的抗KIR3DL3或对照MOPC21抗体添加到适当的孔中。一行没有添加抗体作为另一个阴性对照。添加抗体后,将板在37℃下用5%CO₂温育三十分钟。接下来,在16μg/mL下将25μl抗CD28抗体添加到适当的孔中。阴性对照行没有添加抗CD28。采集表达KIR3DL3和IL-2启动子驱动的荧光素酶基因的Jurkat细胞,离心、洗涤并且以 2×10^6 /ml的浓度重悬于培养基中。最后,将25ul培养基中的50,000个Jurkat细胞添加到每个孔中(阴性对照A1除外),并且将孔混合。所有添加物的最终体积为100ul。将板在37℃下用5%CO₂温育6小时。在六小时的温育期后,将来自BPS生物科学公司的ONE-Step™荧光素酶测定系统的试剂解冻,并且根据制造商的说明在铝箔覆盖的管中以适当的比率混合(试剂是光敏的)。将一百μl试剂混合物添加到每个孔中,并且然后将板在轨道振荡器上在室温下摇动15分钟。在板被摇动后,立即在光度计上读取所述板。

[0704] 图14示出了响应于抗CD3-scFV和HHLA2介导的信号,HHLA2 mAb增强Jurkat-KIR3DL3 T细胞中IL-2启动子驱动的荧光素酶表达。将CHO-抗CD3 scFv-HHLA2细胞或CHO-抗CD3 scFV细胞以 3.5×10^4 的浓度接种在0.15ml培养基中的96孔板中,其中孔A1作为仅含有0.15培养基的阴性对照。将细胞在37℃下用5%CO₂温育过夜。第二天,将八个连续两倍稀释的抗HHLA2或对照MOPC21抗体添加到适当的孔中。一行没有添加抗体作为另一个阴性对照。添加抗体后,将板在37℃下用5%CO₂温育三十分钟。接下来,在16μg/mL下将25μl抗CD28抗体添加到适当的孔中。阴性对照行没有添加抗CD28。采集表达KIR3DL3和IL-2启动子驱动的荧光素酶基因的Jurkat细胞,离心、洗涤并且以 2×10^6 /ml的浓度重悬于培养基中。最后,将25ul培养基中的50,000个Jurkat细胞添加到每个孔中(阴性对照A1除外),并且将孔混合。所有添加物的最终体积为100ul。将板在37℃下用5%CO₂温育6小时。在六小时的温育期后,将来自BPS生物科学公司的ONE-Step™荧光素酶测定系统的试剂解冻,并且根据制造商的说明在铝箔覆盖的管中以适当的比率混合(试剂是光敏的)。将一百μl试剂混合物添加到每个孔中,并且然后将板在轨道振荡器上在室温下摇动15分钟。在板被摇动后,立即在光度计上读取所述板。

[0705] 实例9:阻断HHLA2-KIR3DL3相互作用增强CD19 CAR-T细胞对肿瘤细胞的细胞毒性

[0706] 图15A示出了KIR3DL3/CAR-19表达质粒和慢病毒产生。将编码KIR3DL3和CD19CAR(含有FMC63小鼠抗CD19 scFv)的DNA插入含有EF-1a启动子、来自GM-CSF的信号肽、铰链区、来自CD28和CD3ζ激活域的跨膜和共刺激域。CAR之后插入KIR3DL3 cDNA,由可自我切割的T2A核糖体跳跃序列分隔。将KIR3DL3/CD19 CAR DNA亚克隆到第三代慢病毒载体中以生成PMC456表达质粒。使用磷酸钙转染试剂盒(加利福尼亚州山景城的宝生物公司(Takara, Mountain View, CA)),用PMC456质粒和pPACKH1慢载体包装混合物转染HEK293细胞。48小时后采集细胞培养上清液并且通过在110K g下离心10分钟清除细胞碎片,然后重悬于AIM V-AlbuMAX®培养基(赛默飞世尔科技公司)中,并且分装并在-80℃下冷冻。使用Lenti-X™ qRT-PCR试剂盒(宝生物公司)和7099HT热循环仪(赛默飞世尔科技公司)通过定量RT-PCR确定病毒滴度。

[0707] 图15B示出了KIR3DL3/CD19-CAR-T细胞的生成和扩增以及KIR3DL3/CD19 CAR-T细胞(PMC456细胞)的FACS图。从人外周血血沉棕黄层中分离出PBMC,并且以 1×10^6 个细胞/ml

悬浮在含有10%FBS和100IU/ml IL-2的AIM V™培养基中。将T细胞用CD3/CD28 Dynabeads™(赛默飞世尔科技公司)激活过夜,然后用DEAE葡聚糖(5ug/ml)处理并且在24小时和48小时后用KIR3DL3/CAR19慢病毒感染(MOI为10)。在8天内每2到3天对细胞进行计数,并且补充含有IL-2的新鲜培养基以将细胞密度维持在 $1-3 \times 10^6$ 个细胞/ml。在第10天,CAR-T细胞通过与涂覆有生物素化抗FMC63抗体的磁珠顺序结合进行分离。将第10天的细胞在CAR-T细胞分离前后用抗KIR3DL3 mAb 1G7和生物素化的抗FMC63抗体的混合物进行染色。冲洗后,将细胞用APC缀合的山羊抗鼠IgG和PE缀合的链霉亲和素的混合物染色。将细胞冲洗并且通过流式细胞术分析。

[0708] 图15C示出了稳定的HeLa-CD19和HeLa-CD19+HHLA2表达性肿瘤细胞的生成和其FACS图。用表达人CD19的慢病毒载体转导HeLa细胞以生成HeLa-CD19细胞。单独地,用含有新霉素抗性基因的编码HHLA2的质粒转染HeLa细胞,并且使用1mg/ml G418选择新霉素抗性。然后用编码人CD19的慢病毒转导这些细胞以生成HeLa-CD19+HHLA2表达性细胞。用PE缀合的抗HHLA2 6F10 mAb、抗CD19 mAb或同型对照(鼠IgG1) mAb对肿瘤细胞进行染色。将细胞冲洗并且通过流式细胞术分析。

[0709] 图15D示出了使用HHLA2 mAb阻断HHLA2-KIR3DL3相互作用增强KIR3DL3CD19-CAR-T细胞对HHLA2+CD19转染的HeLa肿瘤细胞的细胞毒性。实时细胞分析(RTCA®)用于测量富集的KIR3DL3/CAR19 T细胞的溶细胞活性。将贴壁的HeLa-CD19-HHLA2细胞以每孔 1×10^4 个细胞接种到96孔E-plates®(艾森生物科学公司(Acea Biosciences))中,并且使用基于阻抗的xCELLigence®系统(艾森生物科学公司)在培养中监测过夜。第二天,去除培养基并更换为含有 3×10^4 或 1×10^5 个效应细胞(KIR3DL3/CAR19 T细胞或非转导T细胞)和一式三份的所示HHLA2 mAb或同型对照的培养基。使用RTCA®系统监测E-plates®,持续另一天,并且随时间绘制肿瘤细胞单层的阻抗。百分比(%)细胞毒性计算为(在没有效应细胞的情况下的靶细胞的阻抗-有效应细胞的情况下的靶细胞的阻抗)/在没有效应细胞的情况下的靶细胞的阻抗 $\times 100$ 。

[0710] 实例10:阻断HHLA2-KIR3DL3相互作用增强NK细胞对肿瘤细胞的细胞毒性

[0711] 图16A示出了KIR3DL3表达质粒和慢病毒产生。将KIR3DL3 cDNA亚克隆到第三代慢病毒载体中以生成PMC579表达质粒。质粒还含有在PGK启动子下的eGFP cDNA。如前一节所描述制备慢病毒并且用于转导人NK细胞系NK-92。

[0712] 图16B示出了KIR3DL3转导的NK92细胞的衍生。用表达KIR3DL3的慢病毒(含有MNDU3启动子的PMC579表达质粒)以为10的MOI转导三百万个NK92细胞,并且在具有20%FBS和50ng/ml IL-2的RPMI培养基中在培养物扩增10天,然后根据GFP表达水平对一部分细胞(1900万)进行分类。将这些细胞重新放入具有20%FBS和50ng/ml IL-2的RPMI培养基中的培养物中,持续另外10天。

[0713] 图16C示出了HHLA2转染的K562和HeLa肿瘤细胞的衍生。用pEF-Puro载体中的50ug/ml I线性化HHLA2 cDNA对K562细胞进行电穿孔(300伏特,1600法拉),选择嘌呤霉素抗性,用PE缀合的HHLA2 mab 6F10进行染色,分选并克隆单细胞。用编码HHLA2的慢病毒转导HeLa肿瘤细胞。

[0714] 图17A示出了KIR3DL3-HHLA相互作用/途径对NK92细胞毒性的抑制。NK92亲本细胞

或KIR3DL3转导的NK92细胞用于针对单独的HeLa或HeLa+HHLA2表达性细胞的NK细胞毒性测定。通过在AceaxCelligence®阻抗测定中以0.5:1的效应子与靶(E/T)比率培养NK细胞来测量NK介导的细胞杀伤。将靶细胞添加到96孔E-plates® (20,000HeLa, HeLa-HHLA2)中并且监测阻抗过夜。第二天除去培养基,并且向每个孔中添加NK-92培养基中的150u1 NK-KIR3DL3或NK-NV(无病毒载体)细胞。隔夜监测板的阻抗可能性。

[0715] 图17B示出了HHLA2 mAb和KIR3DL3 mAb对NK92细胞毒性的增强。阻断HHLA2mAb 2G2、2C4和KIR3DL3 mAb 1C7和2F11逆转HHLA2对NK92细胞毒性的抑制。非阻断HHLA2 mAb 6G8和KIR3DL3 mAb 8F7不会逆转HHLA2对NK92细胞毒性的抑制。图17C示出了细胞毒性测定的示意图。

[0716] 实例11:HHLA2-KIR3DL3相互作用抑制NK细胞溶细胞活性,所述细胞溶细胞活性可被HHLA2或KIR3DL3抗体逆转

[0717] 为了评估HHLA2-KIR3DL3相互作用对NK细胞毒性的影响,使用了内源性产生IL2并表达KIR3DL3的NK细胞系NK92-MI(图10B)。为了证实HHLA2表达抑制NK细胞毒性,Raji细胞首先被工程化为通过CRISPR介导的β2-微球蛋白(B2M)缺失消除MHC I类的表面表达,从而使其成为NK细胞的良好靶标。NK细胞因靶细胞上不存在MHC I类而被激活,并且本文证实Raji-B2M KO细胞被NK92-MI细胞有效裂解(图18)。Raji-B2M KO细胞被工程化成表达HHLA2,并且图19A示出了Raji-B2M KO细胞上的HHLA2表达抑制在所有效应子与靶标的比率下的NK-92-MI细胞的细胞毒性。

[0718] 为了评估HHLA2或KIR3DL3抗体对HHLA2介导的NK细胞毒性抑制的影响,将HHLA2-Raji-B2M KO模型在各种E/T比率下与NK92-MI细胞和固定浓度的KIR3DL3抗体1G7和2F11一起温育。

[0719] 与同型对照相比,KIR3DL3阻断mAb 1G7和2F11增强了NK细胞毒性(图19B)。另外,HHLA2阻断抗体2C4和2G2增强了NK细胞毒性(图19C)。8F7,即KIR3DL3抗体和6D10,即作为KIR3DL3:HHLA2相互作用的弱阻断剂的HHLA2抗体不会增强细胞毒性(图19B和图19C)。

[0720] 为了检查KIR3DL3在调节NK细胞裂解活性中的作用,进行了CD107a脱粒测定。如通过NK92-MI细胞表面上的CD107a表达(脱粒)所测量的,Raji B2M KO细胞上的HHLA2表达抑制NK92-MI脱粒(图19D),并且用1G7 mAb阻断KIR3DL3导致这些NK细胞脱粒增强(图19E)。

[0721] 实例12:HHLA2在RCC肿瘤中表达,并且与PD-L1表达不同

[0722] 泛癌转录组分析表明,HHLA2在多种肿瘤类型中表达,与正常组织相比,肾细胞癌(RCC)示出最高表达水平。在分析TCGA中B7家族成员的mRNA表达时,本文发现与正常肾组织相比,HHLA2是ccRCC中最高度上调的B7家族成员(图20)。与正常肾脏相比,ccRCC中的PD-L1、PD-L2、B7-H3和VISTA转录物仅略高,并且ccRCC中的B7-H4转录物显著降低。如预期的,与正常肾脏相比,ccRCC中的CD8转录物上调,反映了ccRCC中的高免疫浸润。PD-L1与HHLA2表达之间存在负相关,尤其是在肿瘤内。

[0723] HHLA2是具有免疫刺激性和抑制性功能的B7家族成员。TMIGD2先前已被表征为T细胞和NK细胞中HHLA2的免疫刺激性受体,但HHLA2可以抑制T和NK的机制尚不清楚(图21A和图21B)。本文假设存在可以介导这种作用的抑制性受体。本文使用细胞表面受体阵列上的可溶性重组HHLA2-mIgG2a对另外的HHLA2受体进行筛选,并且将KIR3DL3鉴定为HHLA2的新型受体。KIR3DL3是KIR受体家族的成员,但迄今为止其配体尚不清楚。本文表明HHLA2-

KIR3DL3相互作用在T细胞和NK细胞中是免疫抑制性的,并且阻断这种相互作用的抗体会逆转免疫抑制。RCC患者肿瘤中HHLA2表达的分析示出与PD-L1的不部分不重叠的表达模式。总之,这些发现表明阻断KIR3DL3/HHLA2相互作用可以表示癌症免疫疗法的新方法。

[0724] 杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)通过其NK细胞和T细胞的表达促进先天性和适应性免疫应答。已鉴定出13个KIR中的9个的HLA I类配体,但未鉴定出KIR3DL3的HLA配体。KIR家族的成员具有类似的蛋白质结构,所述蛋白质结构具有2个或3个细胞外Ig结构域和含有基于免疫受体酪氨酸的抑制性基序(ITIM)的短(激活DS形式)或长细胞内结构域(抑制DL形式)。KIR3DL3基因编码三个细胞外Ig结构域,具有仅一个ITIM,并且缺少编码Ig结构域与跨膜区之间的茎的外显子。尽管KIR3DL3的结构暗示了抑制性受体,但KIR3DL3的功能尚未得到证实,并且尚未鉴定出同源配体。

[0725] KIR基因家族由13个编码抑制性或激活受体的基因组成。单个KIR基因的表达是克隆分布的,只有一小部分NK细胞和T细胞表达给定的KIR库。在个体中,13个KIR基因的存在和拷贝数会变化,但KIR3DL3在KIR家族中是独一无二的,因为它存在于所有个体中。KIR3DL3启动子是最强的KIR启动子,但通常被甲基化沉默。KIR3DL3具有高度多态性;然而,基于KIR3DL3结构模型,157个多态性残基中的大多数映射到与其它KIR的已知HLA配体结合位点不同的位点。这指示这些多态性不太可能影响HHLA2配体结合。

[0726] 除胎盘蜕膜NK细胞和激活的NK细胞外,KIR3DL3很少在正常组织中表达。HHLA2在胎盘滋养细胞上高度表达。这种表达模式类似于胎盘滋养细胞和其它免疫特权位点上的PD-L1表达,并且与免疫抑制中的主要天然作用一致。本文首次表明HHLA2是KIR3DL3的配体并且在NK细胞和T细胞中起抑制性受体的作用。

[0727] 与HHLA2/KIR3DL3相互作用抑制T细胞中CD28依赖性CD3信号传导的本发明观察一致,Reider等人还示出HHLA2-Fc抑制由CD3和CD28信号传导和ERK2酪氨酸磷酸化介导的T细胞激活。这些观察类似于示出PD-L1/PD-1相互作用抑制依赖于酪氨酸磷酸化和MEK-1/ERK2激活的CD3信号传导途径的结果。PD-L1对CD3信号传导的抑制是通过PD-1ITSM基序的酪氨酸磷酸化和SHP-2磷酸酶的募集,这使TCR和CD28途径的近端信号传导分子去磷酸化。总之,上述结果指示PD-1和KIR3DL3在T细胞激活后可能共享类似的途径,并且两种途径的抑制可以是相加的。

[0728] T细胞上抑制性免疫受体的表达随着激活而动态调节。HHLA2:KIR3DL3途径与B7:CTLA-4途径相似。静息T细胞表达免疫刺激受体,如CD28(对于CD80/86)和TMIGD2(对于HHLA2)。TMIGD2主要在原初T细胞上表达,并且在T细胞激活时下调,并仅在22%的记忆CD4+T细胞和29%的记忆CD8+T细胞上表达。类似地,CD28仅在50%的经受抗原的人CD8 T细胞上表达。激活时,T细胞上调包含如本文呈现的CTLA-4、PD-1和KIR3DL3的抑制性受体的表达。示出KIR3DL3表达在未激活的T细胞中很少见,并且在用抗CD3和CD28 mAb刺激后在适度的CD4和CD8 T细胞亚群中被诱导。与T细胞激活后的早期PD-1表达不同,KIR3DL3表达较晚,并且在T细胞激活后的第21天左右达到峰值。这种调节模式预测经受新抗原的T细胞将在激活后的不同时间表达免疫抑制性受体的优势。如果存在同源配体(B7或HHLA2),则T细胞抑制可能成为主要结果。

[0729] RCC是具有许多近期治疗进展的恶性肿瘤。RCC是高度免疫浸润性的,并且历来具有免疫应答性。自1992年以来,IL-2疗法一直是患者的免疫选择。最近,PD-1途径抑制剂不

仅示出作为单一疗法的活性,而且还被批准与VEGFR TKI疗法或CTLA-4组合。然而,许多患者对疗法产生抗性,因此需要新的治疗选择。

[0730] 本文表明HHLA2表达和PD-L1表达在RCC中不重叠。这与先前关于非小细胞肺癌(NSCLC)的报告一致,其中64%的肿瘤样品为HHLA2阳性,并且在这些中67%为PD-L1阴性。在NSCLC中的这项研究以及本文呈现的ccRCC中的HHLA2和PD-L1表达研究为在这些癌症或其它涉及HHLA2抑制途径的癌症中单独靶向HHLA2/KIR3DL3免疫检查点途径或组合PD-1抑制剂提供理论依据。

[0731] 这项研究的关键成就之一是将KIR3DL3鉴定为HHLA2的抑制性受体,并且生成了逆转HHLA2-KIR3DL3介导的T细胞和NK细胞抑制作用的检查点抑制剂抗体。在这项研究之前,尚不知HHLA2与TMIGD2和KIR3DL3的结合是否是通过一个常见的重叠表位或通过不同的相互作用位点发生的。目前的研究结果示出,大多数HHLA2抗体生成了HHLA2与TIMGD2和KIR3DL3的阻断结合。仅阻断这两种受体相互作用之一的抗体很少见,因此TMIGD2和KIR3DL3上的HHLA2结合位点似乎重叠但不相同。本文表明,阻断KIR3DL3-HHLA2相互作用但保留TMIGD2刺激性信号的HHLA2抗体是治疗开发的一种选择。另外,选择性阻断KIR3DL3-HHLA2相互作用的KIR3DL3抗体也是治疗开发的有吸引力的候选者。

[0732] 许多免疫组合已在临床前模型中进行了测试,并且多个候选者已进入临床试验。大多数免疫组合尚未表现出显著的临床活性。这种有限功效的一个假设是,许多与PD-L1共同靶向的途径共享表达上调的机制。例如,吡哆胺2,3-双加氧酶(IDO)在癌症中的抑制作用已是所关注的,但IDO-PD-1组合的临床试验并未产生有希望的结果。IFN- γ 上调IDO和PD-L1表达。本文证明HHLA2表达不受IFN- γ 调节,因此表示了肿瘤免疫逃避的独立调节机制。另外,HHLA2免疫信号传导不仅在T细胞中而且在NK细胞中都很重要,并且通过KIR3DL3抑制HHLA2信号传导可能会影响免疫微环境中介导先天性和适应性免疫应答的多种淋巴细胞。在肿瘤中,HHLA2和PD-L1表达似乎不重叠且独立调节。

[0733] HHLA2-KIR3DL3-TMIGD2途径的受体和配体均在灵长类动物中表达,并且在包含啮齿动物的多种其它哺乳动物中未发现,这在B7和CD28家族内是独一无二的。因此,此途径的功能研究仅限于使用人细胞系和原代免疫细胞的体外模型。为了评估此途径的体内作用,需要开发人源化模型。需要包含基因组调控区和完整基因的三重敲入方法,因为受体和配体均没有鼠直系同源物。

[0734] PD-1途径的免疫检查点抑制现在是癌症免疫疗法的基石。尽管PD-1抑制取得了成功,但许多患者产生了抗性,并且鉴定新型、非冗余的免疫抑制性途径是此领域的重要需求。将免疫抑制性和刺激性途径的平衡从抑制中转移可以优化抗肿瘤免疫应答。总之,KIR3DL3在本文中被鉴定为HHLA2的免疫抑制性受体。本文还开发了HHLA2和KIR3DL3抗体,所述抗体特异性阻断免疫抑制性活性但保留TMIGD2的共刺激性活性(图21A和图21B)。目前正在开发测试HHLA2途径抑制的安全性和初步功效的I期临床试验。

[0735] 实例13:KIR3DL3 x PD-1 mAb IgG-scFV双特异性抗体的衍生

[0736] 选择KIR3DL3 mAb 574.2.2F11(简称2F11)和PD-1mAb EH13.2A11(简称EH13)小鼠杂交瘤克隆用于构建双特异性抗体。基于它们对靶标的高亲和力和T细胞中检查点抑制的效力选择2F11和EH13克隆。作为第一步骤,2F11和EH13 VH和VL基因被表达为人IgG4或scFv抗体,并且在如表6方法中描述的Octet结合测定中分别测试与它们的抗原KIR3DL3和PD-1

的结合。将结合亲和力与相应的亲本杂交瘤克隆进行比较。如表6和图23所示,KIR3DL3 mAb 2F11人IgG4和scFV形式的KD在对照亲本杂交瘤克隆的2到3倍内(0.29nM与0.51nM)。与对照杂交瘤相比,PD-1mAb EH13人IgG4在1到2倍内表现出类似的结合(6.9nM与7.1nM)。然而,与亲本对照杂交瘤相比,EH13 scFV表现出低4-5倍的亲和力(31.6nM与6.88nM)。

[0737] 基于这些结果,选择包含PD-1mAb EH13人IgG4和KIR3DL3 mAb 2F11 scFV的双特异性抗体形式用于构建双特异性抗体。

[0738] PD-1和KIR3DL3 IgG4、scFV和双特异性抗体的氨基酸序列分别示出在表7、8和9中。

[0739] 靶向KIR3DL3和PD-1的药剂可以用于调节免疫应答和/或治疗癌症。例如,KIR3DL3 x PD-1双特异性抗体是激活肿瘤中的T细胞和NK细胞的检查点免疫疗法。在一些情况下,KIR3DL3 x PD-1双特异性抗体与PD-1或PD-L1或其它检查点免疫疗法相加或协同。此外,所述肿瘤中的HHLA2或KIR3DL3表达是对KIR3DL3 mAb和/或KIR3DL3 x PD-1双特异性抗体检查点阻断的应答性的有用生物标志物。

[0740] 表5:HHLA2和KIR3DL3 mAb结合和受体阻断特性

[0741]

HHLA2 mAb	HHLA2 结合 EC50 (ug/ml)	KIR3DL3 阻断 IC50 (ug/ml)	TMIGD2 阻断 IC50 (ug/ml)
2C4 (IgG2a)	0.28	1.22	>20
2G2 (IgG1)	0.24	0.88	1.18
6D10 (IgG1)	2.3	3.74	>20
6F10 (IgG1)	0.3	1.11	1.43
KIR3DL3 mAb	KIR3DL3 结合 EC50 (ug/ml)	KIR3DL3 阻断 IC50 (ug/ml)	TMIGD2 阻断 IC50 (ug/ml)
1G7 (IgG2b)	0.13	0.61	-
2F11 (IgG2b)	0.43	0.42	-
8F7 (IgG1)	1.0	>10	-

[0742] 在表5中,示出了与HHLA2或KIR3DL3转染的300.19细胞结合的HHLA2(顶部)或KIR3DL3(底部)mAb的EC50值。示出了HHLA2和KIR3DL3 mAb阻断HHLA2-mIgG2a与KIR3DL3和TMIGD2转染的细胞的结合的IC50值。

[0743]

表6: KIR3DL3和PD-1人IgG4和scFv抗体的结合亲和力和
方法和动力学常数

SR #	SR-18985
日期	2020年8月6日
科学家	YEE
设备	Octet RED96
测定缓冲液	0.1% BSA, 1XPBS, 0.02% Tween-20, 0.05% NaN3
再生缓冲液	N/A

程序:

在25°C下在Octet Red上执行结合实验。将人抗体上样到抗hIgG Fc捕获生物传感器上，并且将小鼠抗体上样到抗mIgG Fc捕获生物传感器上，两者均持续300秒。将上样有配体的传感器浸入抗原（PD-1和KIR3DL3）的3倍系列稀释液（从300 nM开始），持续240秒，然后解离400秒。使用单价（1:1）结合模型计算动力学常数。
抗原：人PD1，义翘神州生物公司（Sino Biological）目录号：HPLC-10377-H08H
抗原：人KIR3DL3，义翘神州生物公司目录号：16055-H08H

上样品ID	样品ID	KD (M)	kon(1/Ms)	kdis(1/s)	完全X^2	完全R^2
LP PD-1 mAb (TP-31850)	PD-1	6.88E-09	1.99E+05	1.37E-03	0.0126	0.9993
LP PD-1 scFv (TP-31852)	PD-1	3.16E-08	1.08E+05	3.41E-03	0.0082	0.9854
PD-1 mAb EH13.2A11.17.1	PD-1	7.10E-09	2.16E+05	1.54E-03	0.0053	0.9985
LP KIR3DL3 mAb (TP-31851)	KIR3DL3	2.89E-10	2.48E+05	7.19E-05	0.0326	0.9996
LP KIR3DL3 scFv (TP-31853)	KIR3DL3	2.68E-10	1.65E+05	4.42E-05	0.0531	0.9995
KIR3DL3 mAb 574.2.2F11	KIR3DL3	5.06E-10	2.33E+05	1.18E-04	0.0288	0.9995

注释:

在观察期间未观察到裸传感器（AHC、AMC）与抗原之间的非特异性结合



[0744] 表7:PD-1EH13和KIR3DL3 2F11 mAb人IgG4的代表性示例性氨基酸序列

抗体: PD-1 EH13.2A11.17.1

重链

参考: MHC801HC.2

同型: 人IgG4 (S228P)

信号肽 EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSSFTLSWVRQTPEKRLEWVAYISYGGADTYYPDTVKGK
FTIFRDNAKNTLYLQMSLKSSEDARYYCARHGPYKGDDYAMDYWGQGSTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAAL
GCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPC
P₂CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG*

轻链

参考: MHC801LC.1

同型: 人κ (Km3同种异型)

信号肽 DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDDFGISFMNWFQQKPGQPPKLLIFAASKQSGSVPARFS
SGSGGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKEVPWTFGGVTKLEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

[0745]

抗体: KIR3DL3 mAb 574.2.2F11.2.7.4

重链

参考: AVS-3703HCT.2

同型: 人IgG4 (S228P)

信号肽 DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSAASGFTFSYFGMHVRRRAPEKGLEWVAFISSDSTTIYYTDTVKGK
FTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDTAIYYCARFYDGAMDYWGQGSTVTVSTASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD
YFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCP₂CPAP
EFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDW
LNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTT
PPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLG*

轻链

参考: AVS-3703LCT.2

同型: 人κ (Km3同种异型)

信号肽 DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSITCKASQSVRTAVAWYQQKPGQSPKVLIIYLASNRHTGVPDRFTGSGS
GTDFTLTISNVQSEDLADYFCLQHWNYPLTFGAGTKLELKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW
KVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

[0746] 表8:PD-1EH13和KIR3DL3 2F11 mAb scFv的代表性示例性氨基酸序列

蛋白质: PD-1 scFv

参考: MHC801HC.2, MHC801LC.1

同型: 人IgG4 (S228P) Fc

信号肽 ESKYGPPCP₂CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK
GGGGAGGGGEVKLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSSFTLSWVRQTPEKRLEWVAYISYGGADTYYPDTVKGKFTIFR
DNAKNTLYLQMSLKSSEDARYYCARHGPYKGDDYAMDYWGQGSTVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIVLTQSPASLAVSL
GORATISCRASESVDDFGISFMNWFQQKPGQPPKLLIFAASKQSGSVPARFSGSGGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSK
EVPWTFGGVTKLEIK*

[0747]

蛋白质: KIR3DL3 scFv

参考: AVS-3703HCT.2, AVS-3703LCT.2

同型: 人IgG4 (S228P) Fc

信号肽 ESKYGPPCP₂CPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLT
CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGK
GGGGAGGGGDVQLVESGGGLVQPGGSRKLSAASGFTFSYFGMHVRRRAPEKGLEWVAFISSDSTTIYYTDTVKGKFTISR
DNPKNTLFLQMTSLRSEDTAIYYCARFYDGAMDYWGQGSTVTVSTGGGGSGGGSGGGSDIVMTQSQKFMSTSVGDRVSI
TCKASQSVRTAVAWYQQKPGQSPKVLIIYLASNRHTGVPDRFTGSGGTDFTLTISNVQSEDLADYFCLQHWNYPLTFGAGT
KLELK*

[0748] 在一些实施例中,重链/Fc构建体被设计为去除了C末端赖氨酸以产生更均一的产物,如Cai等人(2011)《生物技术与生物工程(Biotechnol Bioeng)》,108(2):404-12所引用

的。表8中列出的序列是末端赖氨酸已被去除的序列。

[0749] 在一些实施例中,序列被密码子优化用于哺乳动物表达。

[0750] 在一些实施例中,具有所列元件和标签的基因插入物将包含在最终构建体中用于表达。在一些实施例中,将完整插入物克隆到高表达哺乳动物载体中。

[0751] 表9:示例性PD-1 x KIR3DL3双特异性抗体的代表性氨基酸序列——PD-1 EH13 IgG4 mAb和KIR3DL3 2F11 scFv双特异性抗体

抗体: PD-1-IgG4_KIR3DL3-ScFv

重链

参考:

- H12858, pLEV123-PD-1 EH13.2A11.17.1-hIgG4 (S228P, L235E)
- J2876, pLEV123-KIR3DL3 scFv

同型: 人IgG4 (S228P、L235E)

[0752] 信号肽 EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSAASGFTFSSTLSWVRQTPEKRLEWVAYISYGGADTYYPDTVKGRTIFRDNKNTLYLQMSSLKSEDTARIYCARHGPYGGDYAMDYWGQGSTVTSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGP
PCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLT
VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGLGGGGAGGGGDVQLVESGGGLVQPG
GSRKLSAASGFTFSYFGMHWVRRPEKGLEWVAFISSDSTTIYYTDTVKGRFTISRDNPKNLTFLQMTSLRSEDTAIYY
CARFYDGAMDYWGQGSTVTSTGGGGSGGGSGGGGSDIVMTQSQKFMSTSVGDRVSIITCKASQSVRTAVAWYQQKPGQSP
KVLIYLASNRHTGVPDRFTGSGSGTDFLTITISNVQSEDLADYFCLQHWNYPITFGAGTKLEL*

轻链[与L12858相同的LC]

参考: L12858, pLEV123-PD-1 EH13.2A11.17.1-hκ

同型: 人κ (Km3同种异型)

信号肽 DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDDFGISFMNWFQOKPGQPPKLLIFAASKQSGSVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMVFCQSQSKEVPWTFGGVTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*

[0753] 在一些实施例中,重链/Fc构建体被设计为去除了C末端赖氨酸以产生更均一的产物,如Cai等人(2011)《生物技术与生物工程》,108(2):404-12所引用的。表9中列出的序列是末端赖氨酸已被去除的序列。

[0754] 在一些实施例中,序列被密码子优化用于哺乳动物表达。表9中的序列先前已经在SR-18230中进行了密码子优化和构建。

[0755] 在一些实施例中,具有所列元件和标签的基因插入物将包含在最终构建体中用于表达。在一些实施例中,将完整插入物克隆到高表达哺乳动物载体中。

[0756] 参考文献

[0757] 1.Zou W、Wolchok JD、Chen L.用于癌症疗法的PD-L1 (B7-H1) 和PD-1途径阻断:机制、应答生物标志物和组合(PD-L1 (B7-H1) and PD-1 pathway blockade for cancer therapy: Mechanisms, response biomarkers, and combinations.)《科学转化医学期刊(Sci Transl Med.)》2016;8(328):328rv4。

[0758] 2.Baumeister SH、Freeman GJ、Dranoff G、Sharpe AH.癌症免疫疗法中的共抑制途径(Coinhibitory Pathways in Immunotherapy for Cancer.)《免疫学年度评论》2016;34:539-73。

[0759] 3.Sharma P、Allison JP.免疫检查点疗法的未来(The future of immune checkpoint therapy.)《科学》2015;348(6230):56-61。

[0760] 4.Pitt JM、Vetizou M、Daillere R、Roberti MP、Yamazaki T、Routy B等人癌症

免疫检查点阻断的抗性机制:肿瘤内在和外在因素 (Resistance Mechanisms to Immune-Checkpoint Blockade in Cancer:Tumor-Intrinsic and-Extrinsic Factors.)《免疫性 (Immunity.)》2016;44 (6):1255-69。

[0761] 5.Zaretsky JM、Garcia-Diaz A、Shin DS、Escuin-Ordinas H、Hugo W、Hui-Lieskovan S等人黑色素瘤中与获得性PD-1阻断抗性相关的突变 (Mutations Associated with Acquired Resistance to PD-1Blockade in Melanoma.)《新英格兰医药杂志 (N Engl J Med.)》2016;375 (9):819-29。

[0762] 6.O'Donnell JS、Long GV、Scolyer RA、Teng MW、Smyth MJ.对PD1/PDL1检查点抑制的抗性 (Resistance to PD1/PDL1 checkpoint inhibition.)《癌症治疗综述 (Cancer Treat Rev.)》2017;52:71-81。

[0763] 7.Crespo J、Vatan L、Maj T、Liu R、Kryczek I、Zou W.CD28H(+)免疫细胞亚群的表型和组织分布 (Phenotype and tissue distribution of CD28H(+)immune cell subsets.)《肿瘤免疫学 (Oncoimmunology.)》2017;6 (12):e1362529。

[0764] 8.Janakiram M、Chinai JM、Fineberg S、Fiser A、Montagna C、Medavarapu R等人最新B7家族成员HHLA2蛋白的表达、临床意义和受体鉴定 (Expression,Clinical Significance,and Receptor Identification of the Newest B7 Family Member HHLA2 Protein.)《临床癌症研究》2015;21 (10):2359-66。

[0765] 9.Zhou QH、Li KW、Chen X、He HX、Peng SM、Peng SR等人HHLA2和PD-L1共表达预测患有肾透明细胞癌的患者不良预后 (HHLA2 and PD-L1 co-expression predicts poor prognosis in patients with clear cell renal cell carcinoma.)《癌症免疫疗法杂志 (J Immunother Cancer.)》2020;8 (1)。

[0766] 10.Wang B、Ran Z、Liu M、Ou Y.人肿瘤中潜在免疫检查点成员HHLA2的预后意义:综合分析 (Prognostic Significance of Potential Immune Checkpoint Member HHLA2 in Human Tumors:A Comprehensive Analysis.)《免疫学前沿 (Front Immunol.)》2019;10:1573。

[0767] 11.Zhu Y、Yao S、Iliopoulou BP、Han X、Augustine MM、Xu H等人B7-H5通过CD28H共刺激人T细胞 (B7-H5 costimulates human T cells via CD28H.)《自然通讯》2013;4:2043。

[0768] 12.Zhao R、Chinai JM、Buhl S、Scandiuzzi L、Ray A、Jeon H等人HHLA2是B7家族的成员,并且抑制人CD4和CD8 T细胞功能 (HHLA2 is a member of the B7 family and inhibits human CD4 and CD8 T-cell function.)《美国国家科学院院刊》2013;110 (24):9879-84。

[0769] 13.Wang J、Manick B、Wu G、Hao R.三个新B7家族成员的生物功能 (IRM7P.486) (Biofunctions of three new B7 family members (IRM7P.486).)《免疫学杂志》2014;192 ((1增刊)):126.11。

[0770] 14.Xiao Y、Freeman GJ.癌症免疫疗法的新B7:CD28家族检查点靶标:HHLA2 (A New B7:CD28 Family Checkpoint Target for Cancer Immunotherapy:HHLA2.)《临床癌症研究》2015;21 (10):2201-3。

[0771] 15.Zhuang X、Long EO.CD28同源物是用于裂解B7H7(+)肿瘤细胞的天然杀伤细胞

的强激活剂(CD28 Homolog Is a Strong Activator of Natural Killer Cells for Lysis of B7H7(+) Tumor Cells.)《癌症免疫学研究》2019;7(6):939-51。

[0772] 16.Pende D、Falco M、Vitale M、Cantoni C、Vitale C、Munari E等人杀伤Ig样受体(KIR):它们在NK细胞调节和发展中的作用导致其临床开发(Killer Ig-Like Receptors (KIRs):Their Role in NK Cell Modulation and Developments Leading to Their Clinical Exploitation.)《免疫学前沿》2019;10:1179。

[0773] 17.Bakker AB、Phillips JH、Figdor CG、Lanier LL.MHC I类分子的杀伤细胞抑制性受体调节由NK细胞、 $\gamma\delta$ T细胞和抗原特异性CTL介导的黑色素瘤细胞的裂解(Killer cell inhibitory receptors for MHC class I molecules regulate lysis of melanoma cells mediated by NK cells,gamma delta T cells,and antigen-specific CTL.)《免疫学杂志》1998;160(11):5239-45。

[0774] 18.Guerra N、Guillard M、Angevin E、Echchakir H、Escudier B、Moretta A等人杀伤抑制性受体(CD158b)调节浸润肾细胞癌的肿瘤特异性T淋巴细胞的裂解活性(Killer inhibitory receptor(CD158b)modulates the lytic activity of tumor-specific T lymphocytes infiltrating renal cell carcinomas.)《血液》2000;95(9):2883-9。

[0775] 19.Mingari MC、Schiavetti F、Ponte M、Vitale C、Maggi E、Romagnani S等人表达HLA I类特异性抑制性受体的人CD8⁺ T淋巴细胞亚群表示寡克隆或单克隆扩增的细胞群体(Human CD8⁺ T lymphocyte subsets that express HLA class I-specific inhibitory receptors represent oligoclonally or monoclonally expanded cell populations.)《美国国家科学院院刊》1996;93(22):12433-8。

[0776] 20.Rieder SA、Wang J、White N、Qadri A、Menard C、Stephens G等人B7-H7(HHLA2)在存在TCR和CD28信号传导的情况下抑制T细胞激活和增殖(B7-H7(HHLA2) inhibits T-cell activation and proliferation in the presence of TCR and CD28 signaling.)《细胞与分子免疫学(Cell Mol Immunol.)》2020。

[0777] 21.Leaton LA、Shortt J、Kichula KM、Tao S、Nemat-Gorgani N、Mentzer AJ等人信号传导潜能的保守性、广泛杂合性和收敛性都表明KIR3DL3在高等灵长类动物中的关键作用(Conservation,Extensive Heterozygosity,and Convergence of Signaling Potential All Indicate a Critical Role for KIR3DL3 in Higher Primates.)《免疫学前沿》2019;10:24。

[0778] 22.Trompeter HI、Gomez-Lozano N、Santourlidis S、Eisermann B、Wernet P、Vilches C等人三种结构上和功能上不同种类的启动子调节克隆分布的杀伤细胞Ig样受体(KIR)、KIR2DL4和KIR3DL3的表达(Three structurally and functionally divergent kinds of promoters regulate expression of clonally distributed killer cell Ig-like receptors(KIR),of KIR2DL4,and of KIR3DL3.)《免疫学杂志》2005;174(7):4135-43。

[0779] 23.Vivian JP、Duncan RC、Berry R、O'Connor GM、Reid HH、Beddoe T等人杀伤细胞免疫球蛋白样受体3DL1介导的人白细胞抗原B的识别(Killer cell immunoglobulin-like receptor 3DL1-mediated recognition of human leukocyte antigen B.)《自然》2011;479(7373):401-5。

- [0780] 24.Trundley AE、Hiby SE、Chang C、Sharkey AM、Santourlidis S、Uhrberg M等人KIR3DL3的分子表征 (Molecular characterization of KIR3DL3.)《免疫遗传学》2006; 57 (12):904-16。
- [0781] 25.Brown JA、Dorfman DM、Ma FR、Sullivan EL、Munoz O、Wood CR等人阻断树突细胞上的程序性死亡-1配体增强T细胞激活和细胞因子产生 (Blockade of programmed death-1ligands on dendritic cells enhances T cell activation and cytokine production.)《免疫学杂志》2003;170 (3):1257-66。
- [0782] 26.Sheppard KA、Fitz LJ、Lee JM、Benander C、George JA、Wooters J等人PD-1抑制T细胞受体诱导的ZAP70/CD3 ζ 信号体的磷酸化和向PKC θ 的下游信号传导 (PD-1inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3zeta signalosome and downstream signaling to PKC θ .)《欧洲生化学会联合会快报 (FEBS Lett.)》2004;574 (1-3):37-41。
- [0783] 27.Chemnitz JM、Parry RV、Nichols KE、June CH、Riley JL.SHP-1和SHP-2在原发性人T细胞刺激时与基于免疫受体酪氨酸的程序性死亡1开关基序相关,但只有受体交联才能防止T细胞激活 (SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death lupon primary human T cell stimulation,but only receptor ligation prevents T cell activation.)《免疫学杂志》2004;173 (2):945-54。
- [0784] 28.Hui E、Cheung J、Zhu J、Su X、Taylor MJ、Wallweber HA等人T细胞共刺激性受体CD28是PD-1介导的抑制的主要靶标 (T cell costimulatory receptor CD28 is a primary target for PD-1-mediated inhibition.)《科学》2017;355 (6332):1428-33。
- [0785] 29.Patsoukis N、Duke-Cohan JS、Chaudhri A、Aksoylar HI、Wang Q、Council A等人SHP-2 SH2结构域与PD-1 ITSM的相互作用诱导PD-1二聚化和SHP-2激活 (Interaction of SHP-2 SH2 domains with PD-1 ITSM induces PD-1 dimerization and SHP-2 activation.)《通讯生物学 (Commun Biol.)》2020;3 (1):128。
- [0786] 30.Boussiotis VA.PD-1检查点途径的分子和生化方面 (Molecular and Biochemical Aspects of the PD-1 Checkpoint Pathway.)《新英格兰医药杂志》2016; 375 (18):1767-78。
- [0787] 31.Sharpe AH、Freeman GJ.B7-CD28超家族 (The B7-CD28 superfamily.)《自然综述免疫学》2002;2 (2):116-26。
- [0788] 32.Tian Y、Sun Y、Gao F、Koenig MR、Sunderland A、Fujiwara Y等人CD28H表达鉴定在人外周组织和癌症中具有较少细胞毒性的常驻记忆CD8⁺ T细胞 (CD28H expression identifies resident memory CD8⁺ T cells with less cytotoxicity in human peripheral tissues and cancers.)《肿瘤免疫学》2019;8 (2):e1538440。
- [0789] 33.Zhong C、Lang Q、Yu J、Wu S、Xu F、Tian Y.表达CD28H/B7-H5的不同免疫细胞的表型和潜在功能特性和其与癌症预后的关系 (Phenotypical and potential functional characteristics of different immune cells expressing CD28H/B7-H5 and their relationship with cancer prognosis.)《临床与实验免疫学 (Clin Exp Immunol.)》2020;200 (1):12-21。

[0790] 34.Lum LG,Orcutt-Thordarson N,Seigneuret MC,Hansen JA.由新的人T细胞抗原定义的T细胞亚群对免疫球蛋白合成的体外调控(9.3) (In vitro regulation of immunoglobulin synthesis by T-cell subpopulations defined by a new human T-cell antigen(9.3).)《细胞免疫学(Cell Immunol.)》1982;72(1):122-9。

[0791] 35.Linsley PS,Green J, Tan P,Bradshaw J,Ledbetter JA,Anasetti C等人CTLA-4和CD28在激活T淋巴细胞上的共表达和功能合作(Coexpression and functional cooperation of CTLA-4 and CD28 on activated T lymphocytes.)《实验医学杂志》1992;176(6):1595-604。

[0792] 36.Agata Y,Kawasaki A,Nishimura H,Ishida Y,Tsubata T,Yagita H等人PD-1抗原在受刺激的小鼠T和B淋巴细胞表面的表达(Expression of the PD-1 antigen on the surface of stimulated mouse T and B lymphocytes.)《国际免疫学》1996;8(5):765-72。

[0793] 37.Margolin KA,Rayner AA,Hawkins MJ,Atkins MB,Dutcher JP,Fisher RI等人实体瘤的白细胞介素2和淋巴因子激活杀伤细胞疗法:毒性分析和指南(Interleukin-2 and lymphokine-activated killer cell therapy of solid tumors: analysis of toxicity and management guidelines.)《临床肿瘤学杂志》1989;7(4):486-98。

[0794] 38.Atkins MB,Lotze MT,Dutcher JP,Fisher RI,Weiss G,Margolin K等人患有转移性黑色素瘤的患者的高剂量重组白细胞介素2疗法:对1985年与1993年之间治疗的270名患者的分析(High-dose recombinant interleukin 2 therapy for patients with metastatic melanoma:analysis of 270 patients treated between 1985 and 1993.)《临床肿瘤学杂志》1999;17(7):2105-16。

[0795] 39.Motzer RJ, Penkov K,Haanen J,Rini B,Albiges L,Campbell MT等人用于晚期肾细胞癌的阿维鲁单抗加阿昔替尼与舒尼替尼(Avelumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma.)《新英格兰医药杂志》2019;380(12):1103-15。

[0796] 40.Rini BI,Plimack ER,Stus V,Gafanov R,Hawkins R,Nosov D等人用于晚期肾细胞癌的帕普利珠单抗加阿昔替尼与舒尼替尼(Pembrolizumab plus Axitinib versus Sunitinib for Advanced Renal-Cell Carcinoma.)《新英格兰医药杂志》2019;380(12):1116-27。

[0797] 41.Motzer RJ,Tannir NM,McDermott DF,Aren Frontera O,Melichar B,Choueiri TK等人晚期肾细胞癌中的纳武利尤单抗加易普利姆玛与舒尼替尼(Nivolumab plus Ipilimumab versus Sunitinib in Advanced Renal-Cell Carcinoma.)《新英格兰医药杂志》2018;378(14):1277-90。

[0798] 42.Cheng H,Borczuk A,Janakiram M,Ren X,Lin J,Assal A等人替代性免疫检查点分子B7x和HHLA2在PD-L1阴性人肺癌中的广泛表达和意义(Wide Expression and Significance of Alternative Immune Checkpoint Molecules,B7x and HHLA2,in PD-L1-Negative Human Lung Cancers.)《临床癌症研究》2018;24(8):1954-64。

[0799] 43.Munn DH.阻断IDO活性以增强抗肿瘤免疫力(Blocking IDO activity to

enhance anti-tumor immunity.)《生物科学前沿(Front Biosci)》(Elite编辑).2012;4:734-45。

[0800] 44.Gaule P、Smithy JW、Toki M、Rehman J、Patell-Socha F、Cougot D等人程序性细胞死亡1配体1抗体的定量比较(A Quantitative Comparison of Antibodies to Programmed Cell Death 1 Ligand 1.)《JAMA肿瘤学(JAMA Oncol.)》2017;3(2):256-9。

[0801] 45.Mahoney KM、Sun H、Liao X、Hua P、Callea M、Greenfield EA等人PD-L1抗体对其胞质结构域的描绘在肿瘤细胞的免疫组化染色中最为清晰(PD-L1 Antibodies to Its Cytoplasmic Domain Most Clearly Delineate Cell Membranes in Immunohistochemical Staining of Tumor Cells.)《癌症免疫学研究》2015;3(12):1308-15。

[0802] 46.Callea M、Albiges L、Gupta M、Cheng SC、Genega EM、Fay AP等人透明细胞肾细胞癌原发位点与转移位点之间PD-L1的差异表达(Differential Expression of PD-L1 between Primary and Metastatic Sites in Clear-Cell Renal Cell Carcinoma.)《癌症免疫学研究》2015;3(10):1158-64。

[0803] 47.Perez JA、Goldsack E、Norambuena L.甲状腺髓样癌.临床病例([Medullary carcinoma of the thyroid.Clinical case])《智利医学杂志(Rev Med Chil.)》1989;117(4):431-4。

[0804] 48.Pignon JC、Jegade O、Shukla SA、Braun DA、Horak CE、Wind-Rotolo M等人irRECIST用于评估纳武利尤单抗在转移性透明细胞肾细胞癌中的应答候选生物标志物:II期前瞻性临床试验分析(irRECIST for the Evaluation of Candidate Biomarkers of Response to Nivolumab in Metastatic Clear Cell Renal Cell Carcinoma:Analysis of a Phase II Prospective Clinical Trial.)《临床癌症研究》2019;25(7):2174-84。

[0805] 通过引用并入

[0806] 本文所提及的所有公开、专利以及专利申请通过引用整体特此并入,如同每个单独的公开、专利或专利申请被专门地且单独地指示通过引用并入。在冲突的情况下,将以本申请(包含本文的任何定义)为准。

[0807] 还通过引用整体并入的是任何多核苷酸和多肽序列,其引用与公共数据库中的条目相关的登录号,如由万维网tigr.org上的基因组研究所(The Institute for Genomic Research,TIGR)和/或万维网ncbi.nlm.nih.gov上的国家生物技术信息中心(NCBI)维护的那些登录号。

[0808] 等效物

[0809] 本领域技术人员将认识到或仅使用常规实验就能够确定本文所描述的本公开所涵盖的具体实施例的许多等效形式。此类等效形式旨在为下列权利要求所涵盖。

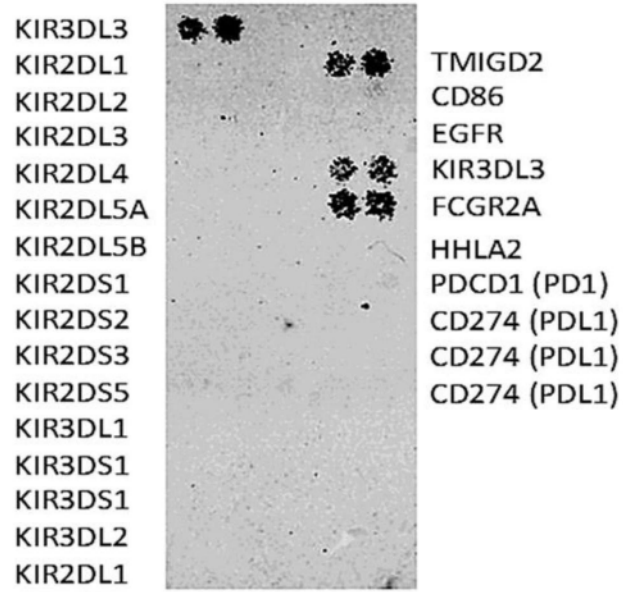


图1A

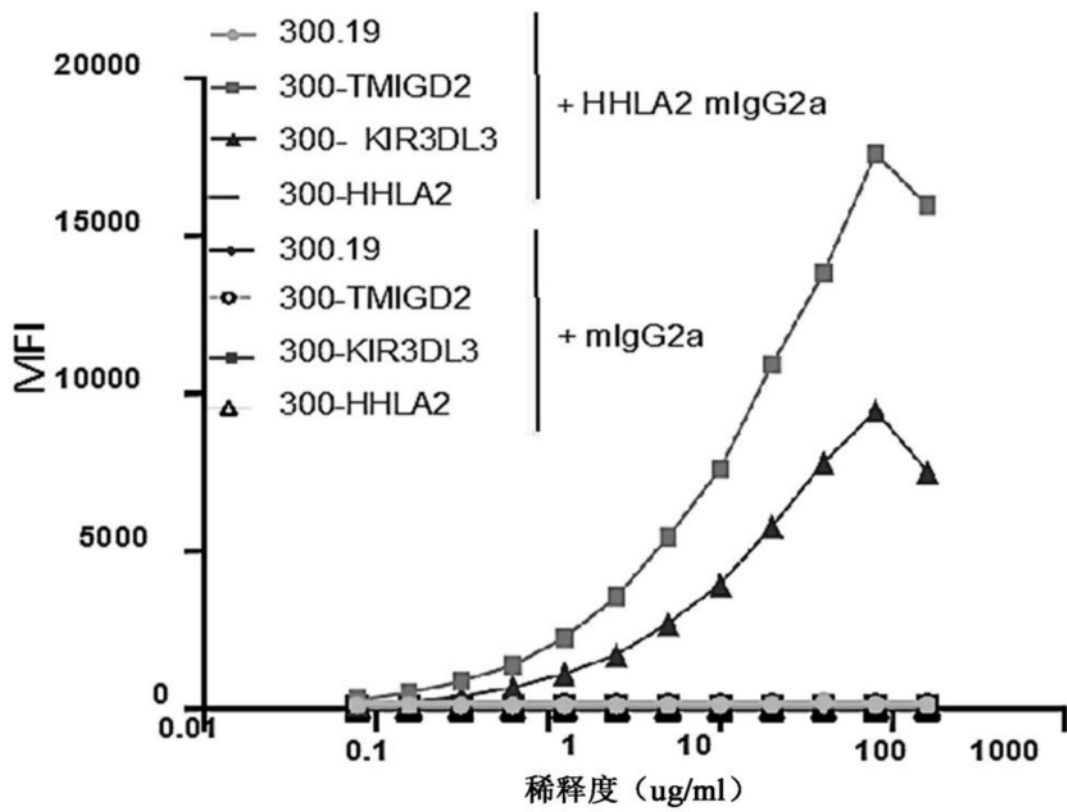


图1B

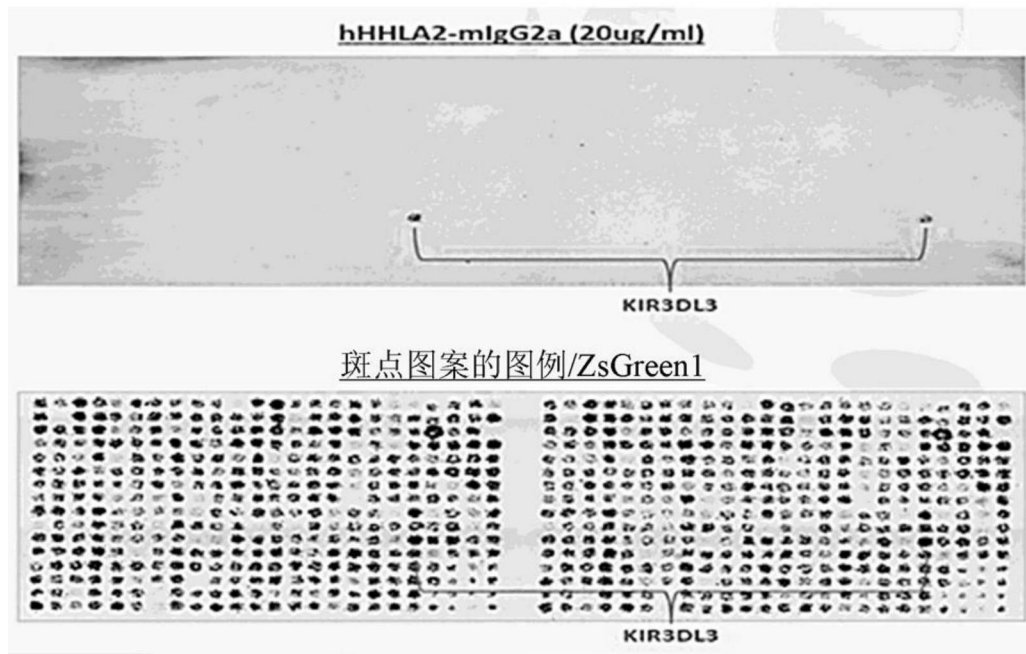


图2A

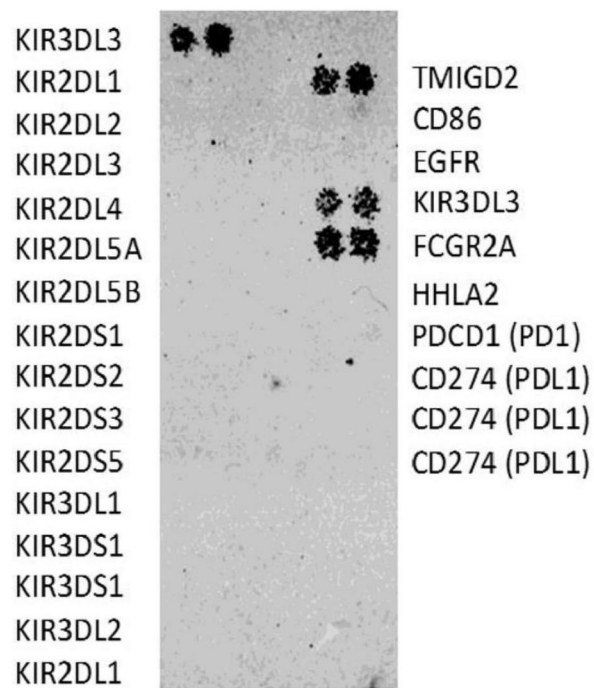


图2B

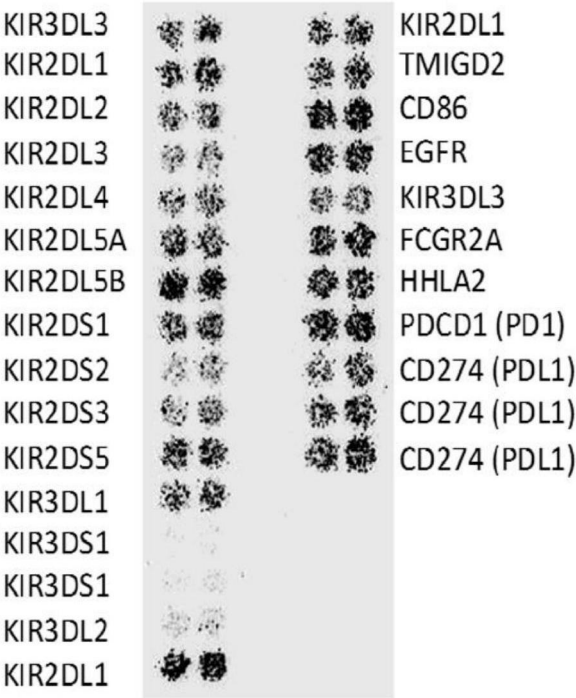


图2C

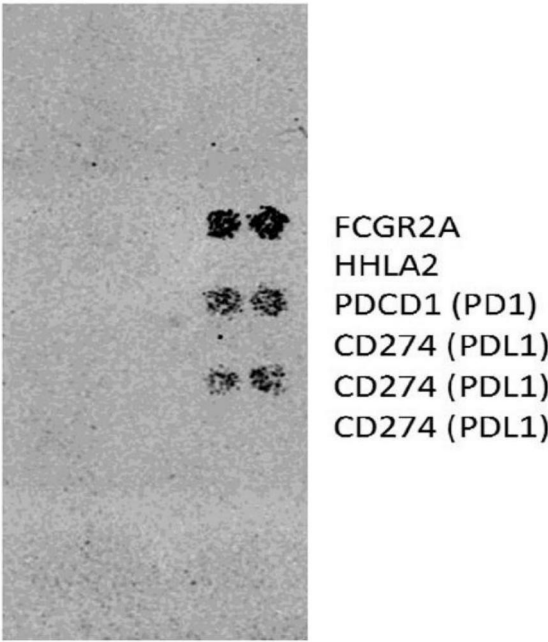


图2D

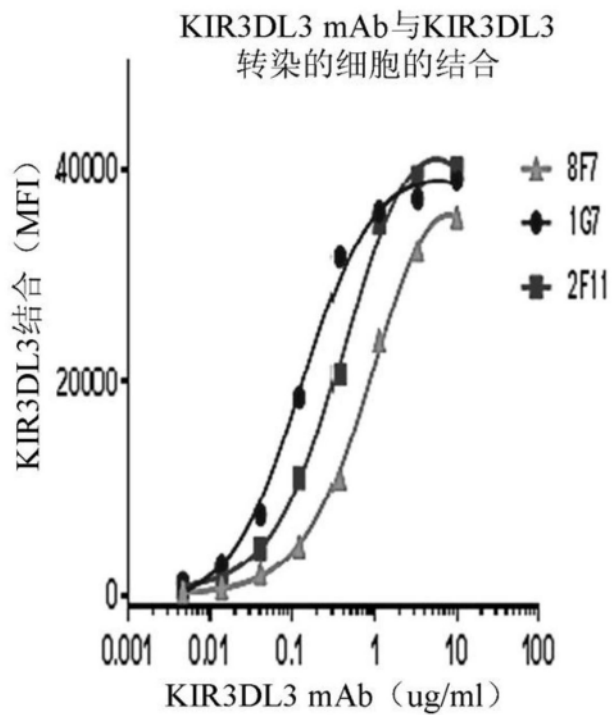


图3A

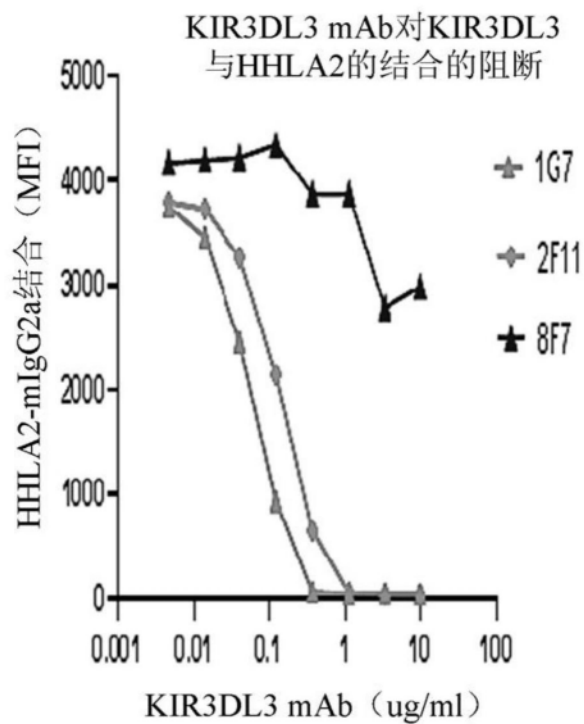


图3B

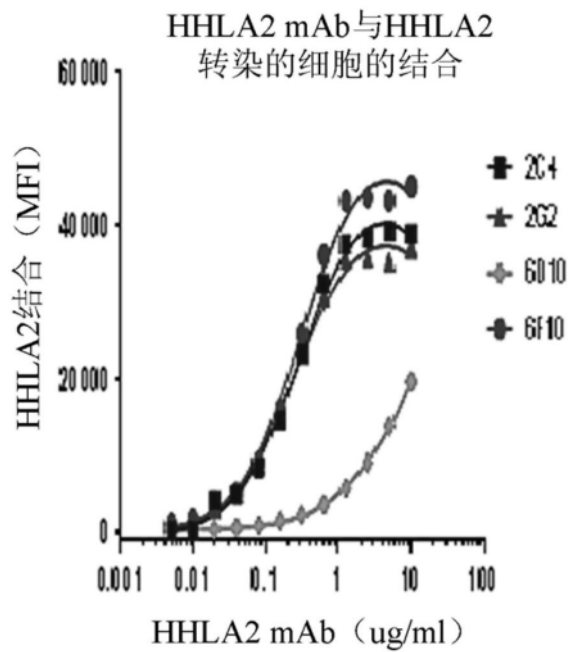


图3C

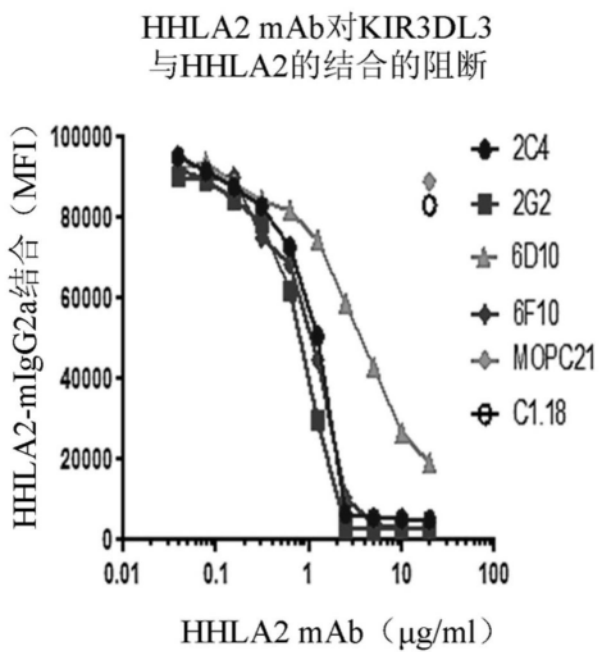


图3D

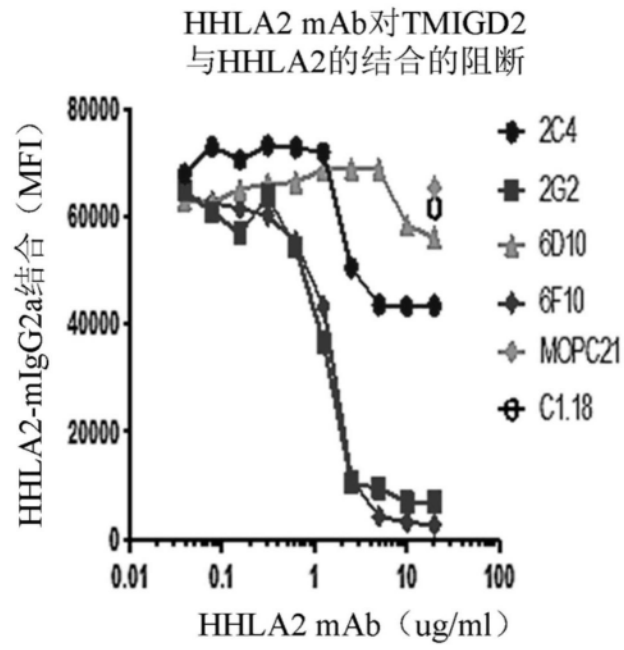


图3E

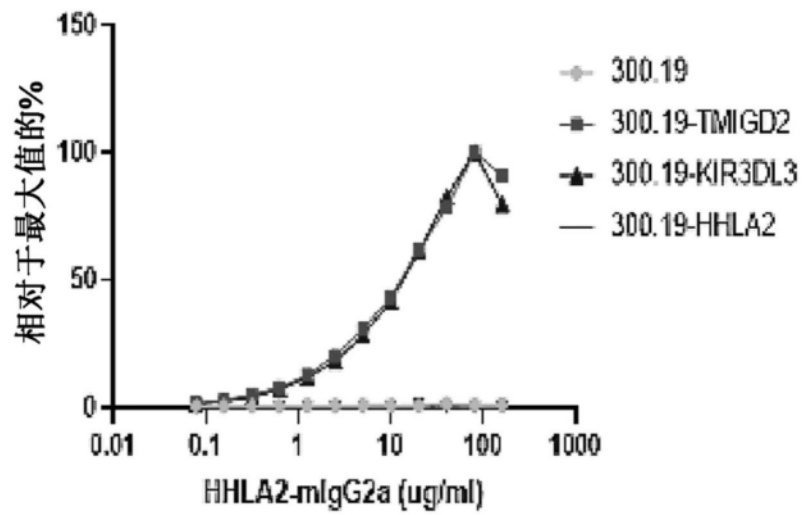


图4A

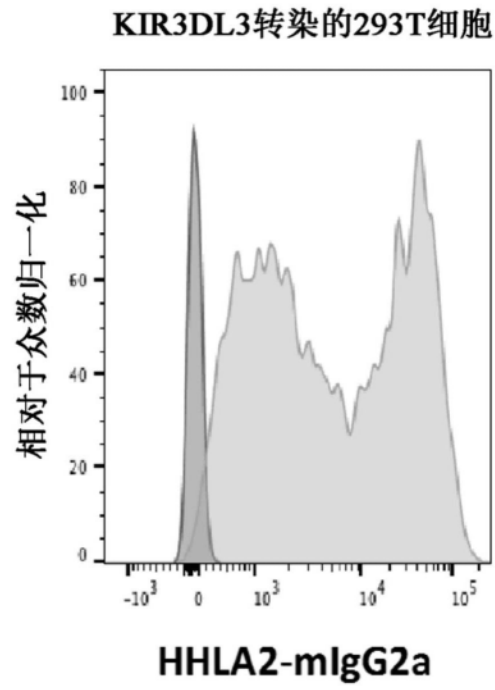


图4B

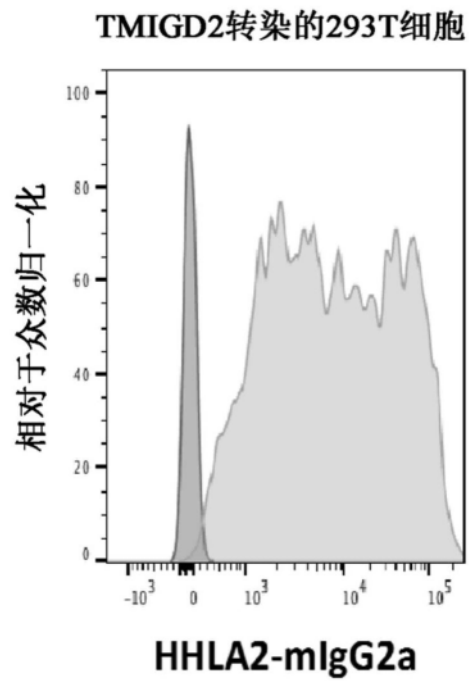


图4C

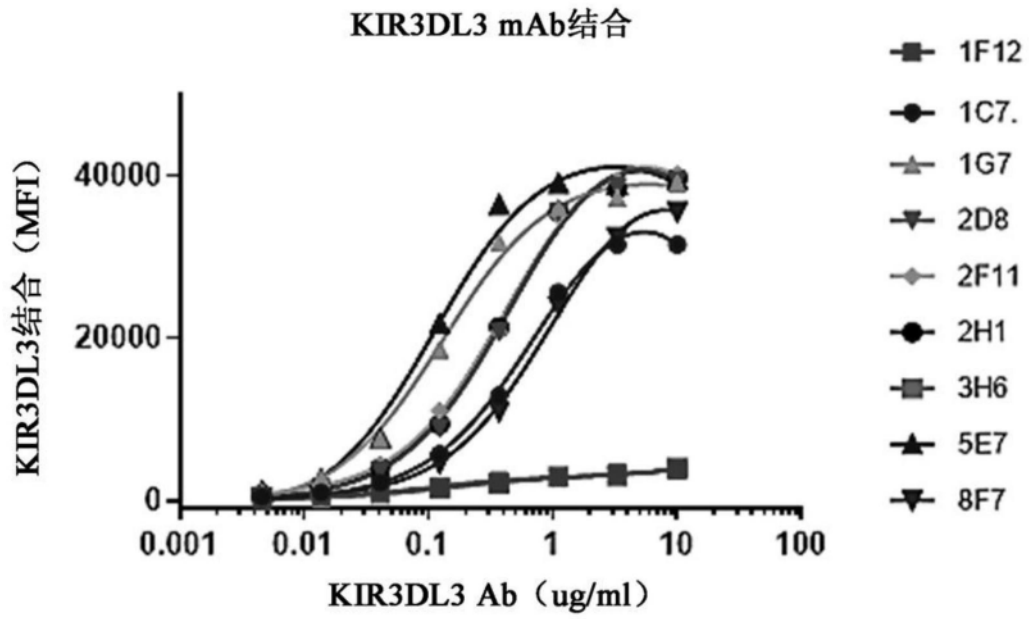


图5

使用用KIR3DL3转染的Jurkat细胞对KIR3DL3 mAb进行的蛋白质印迹分析

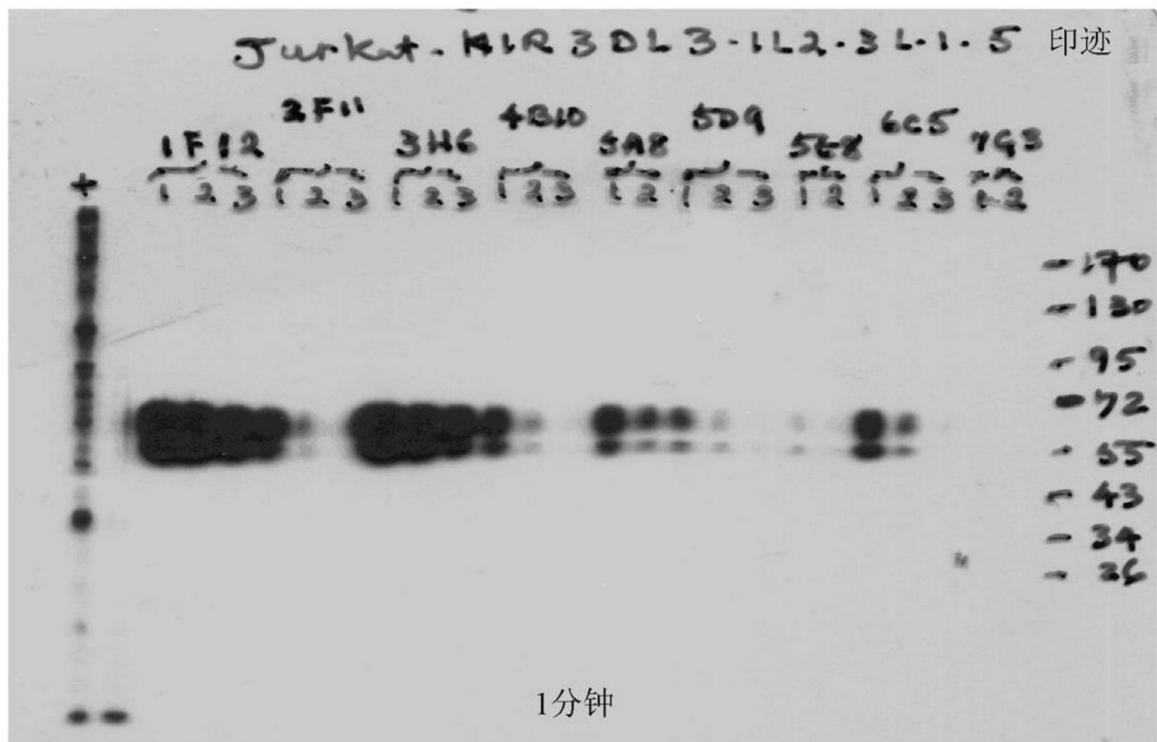


图6

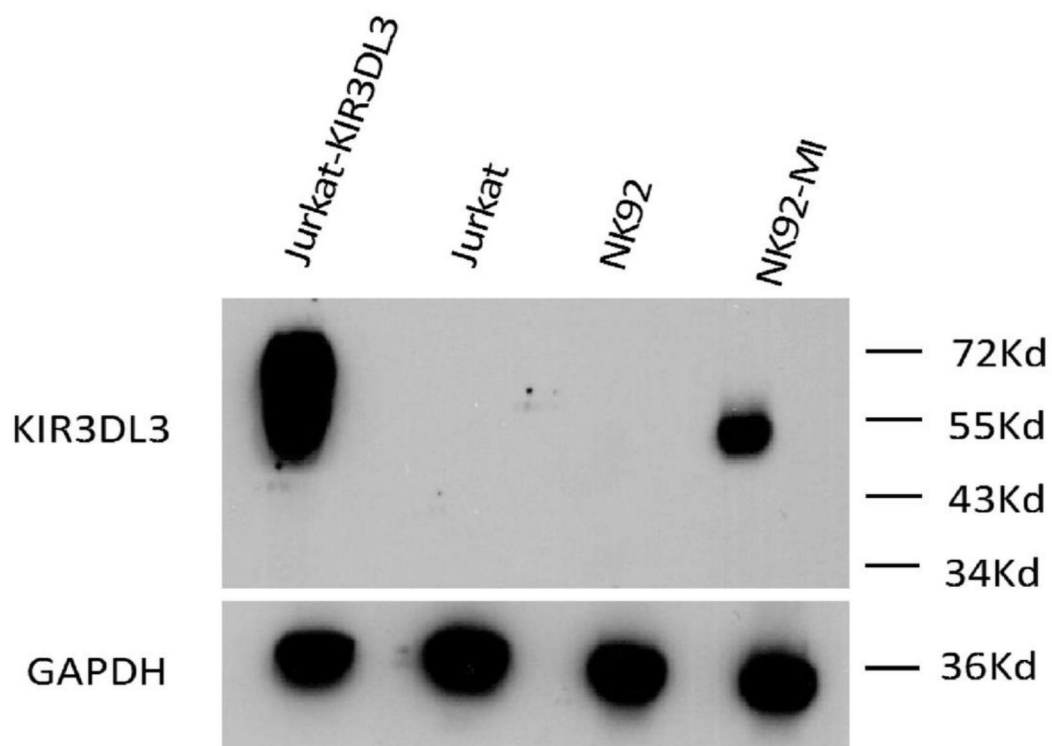


图7

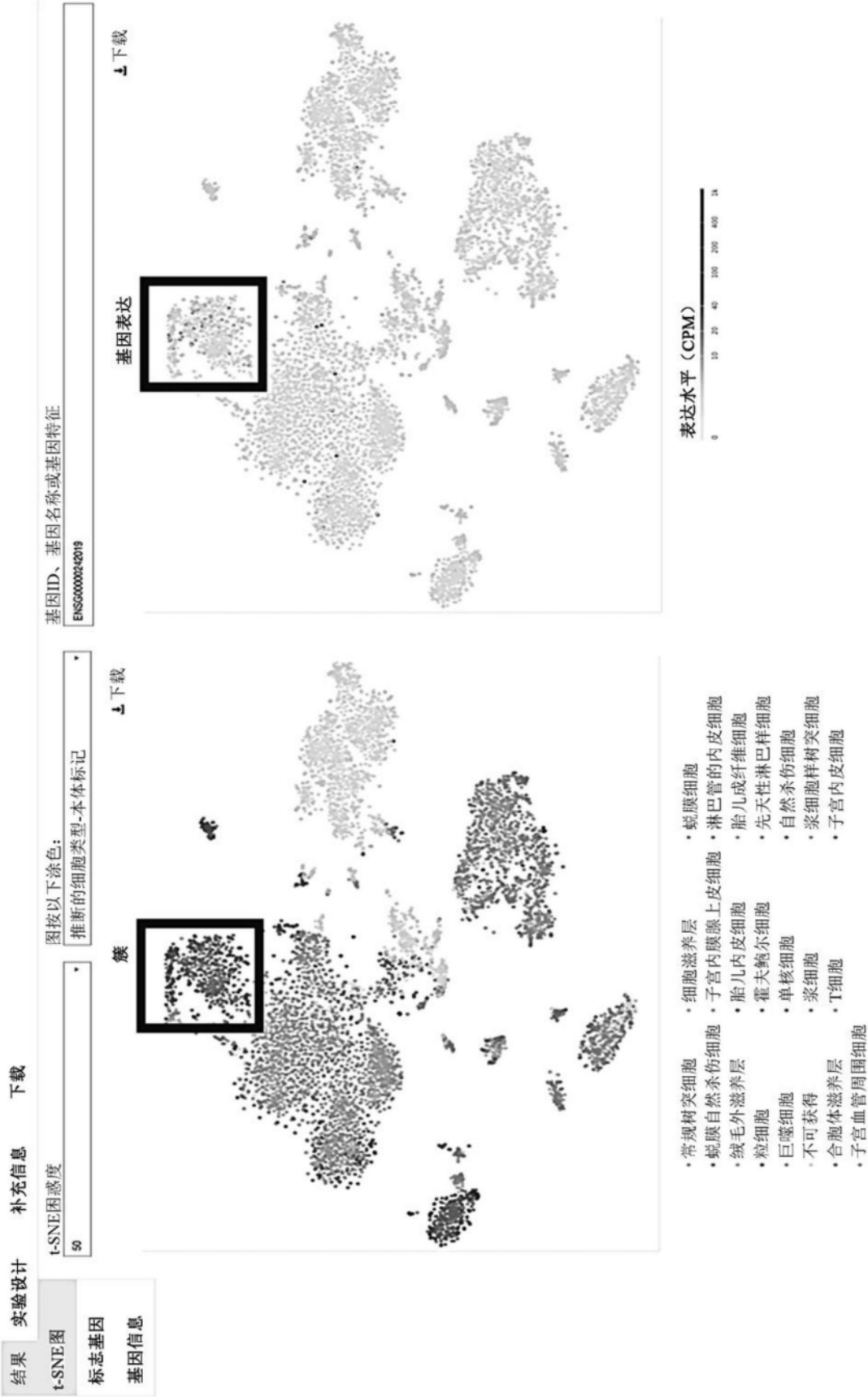


图8

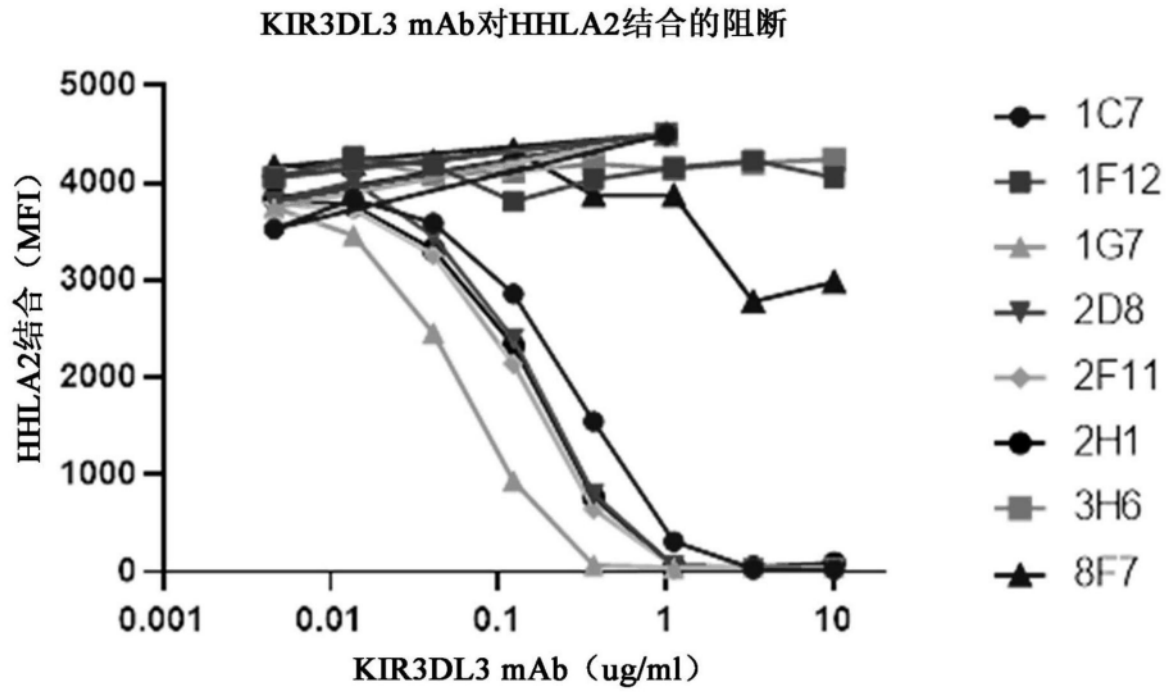


图9

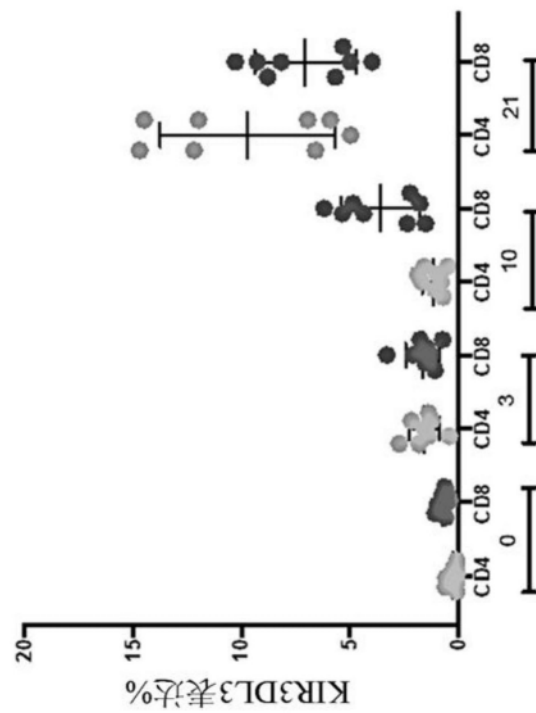


图10A

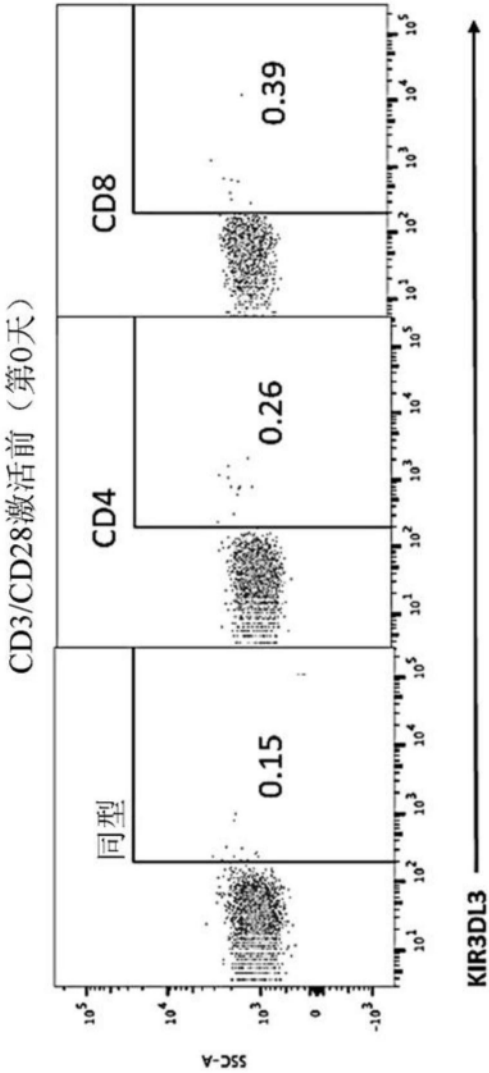


图10B

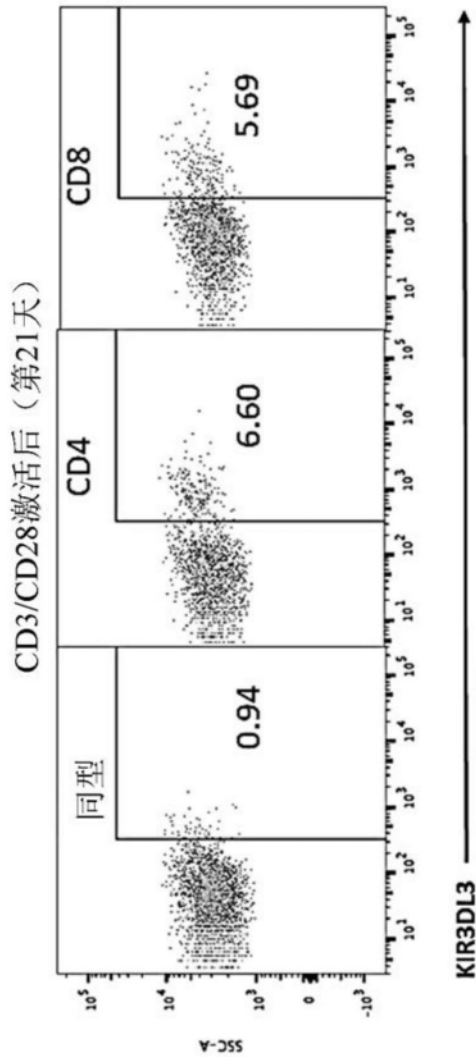


图10C

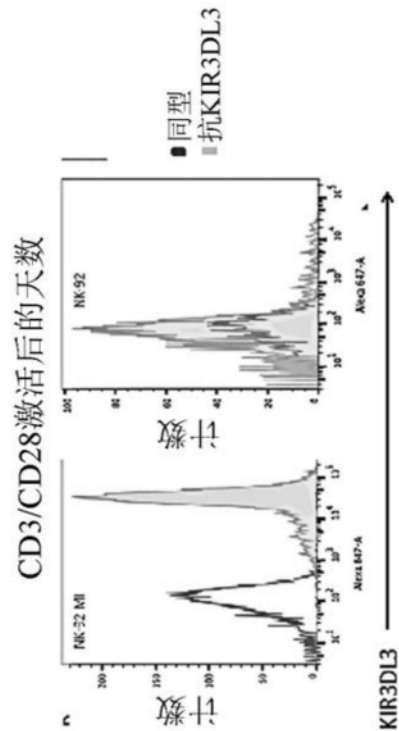


图10D

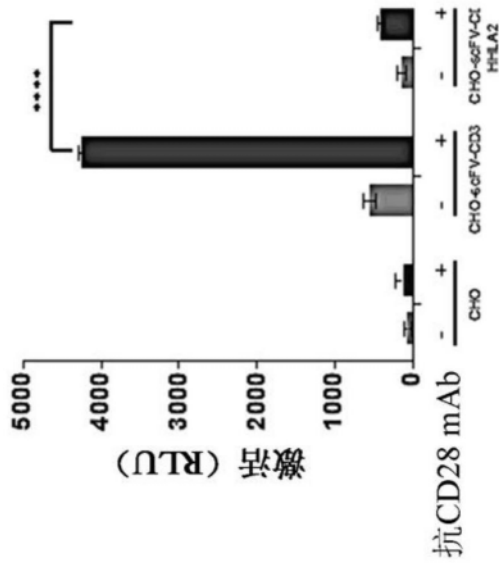


图11A

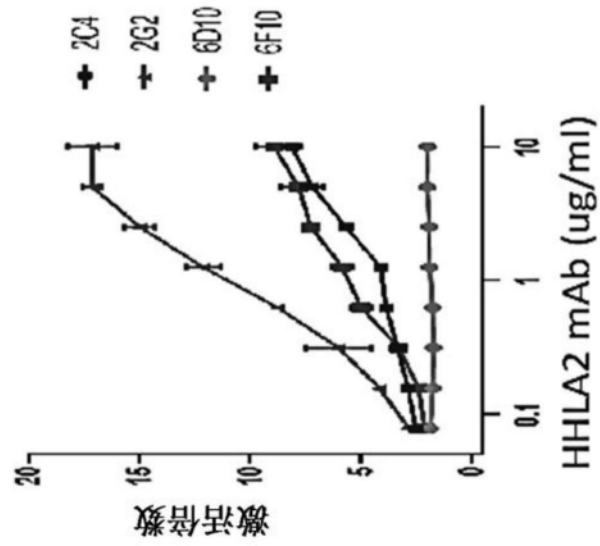


图11B

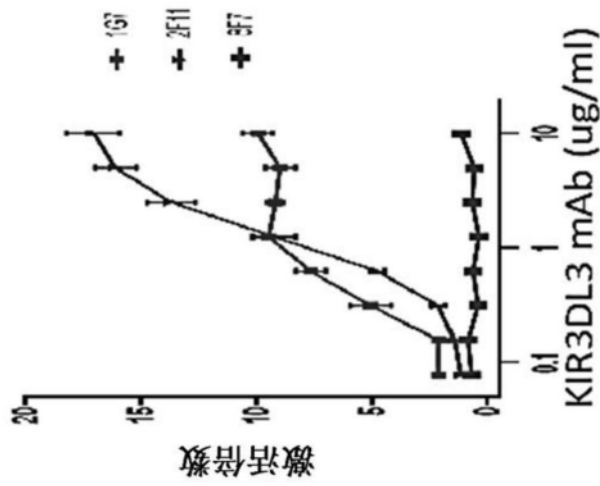


图11C

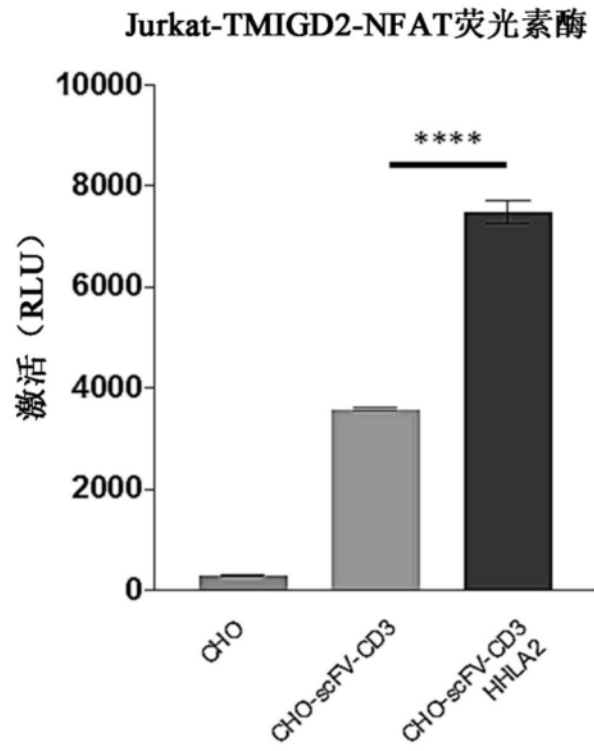


图12

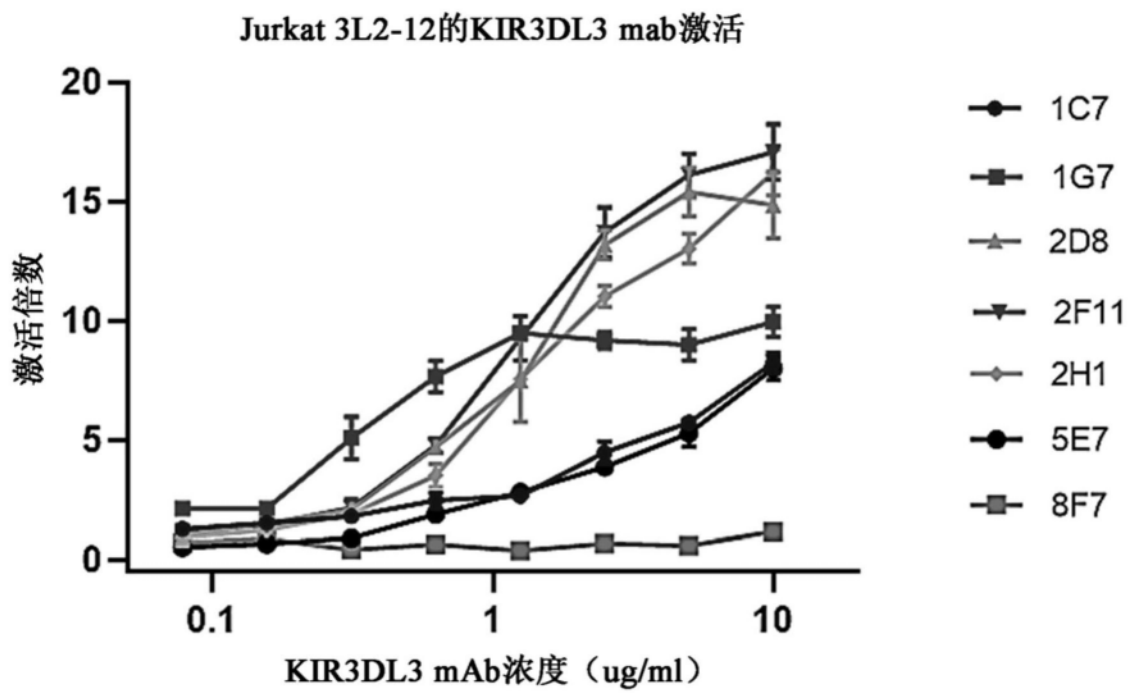


图13

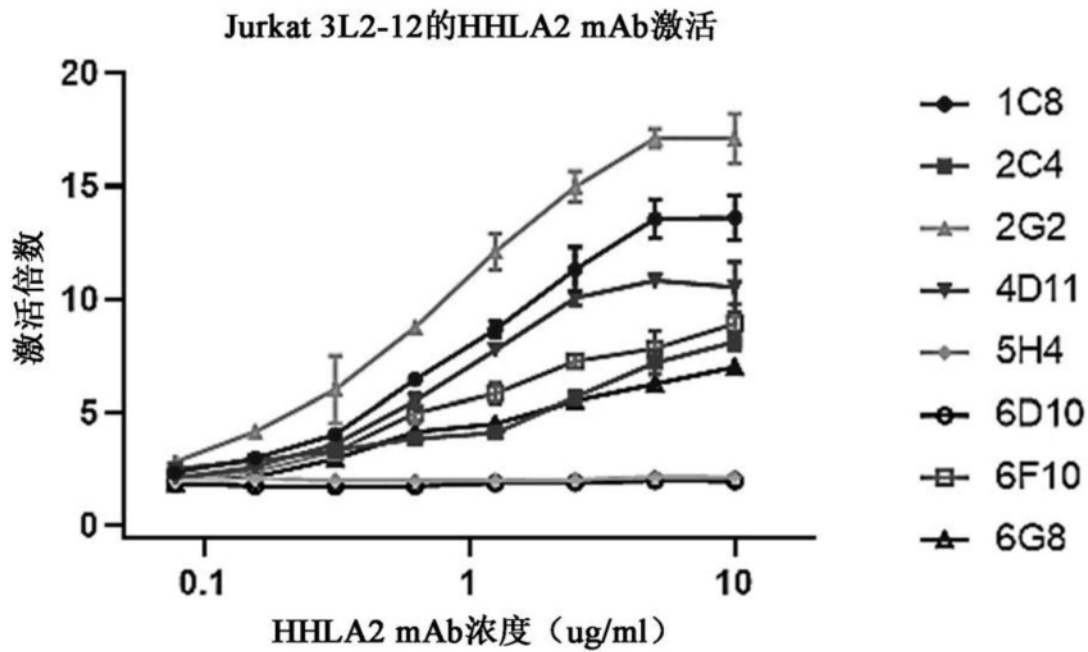


图14

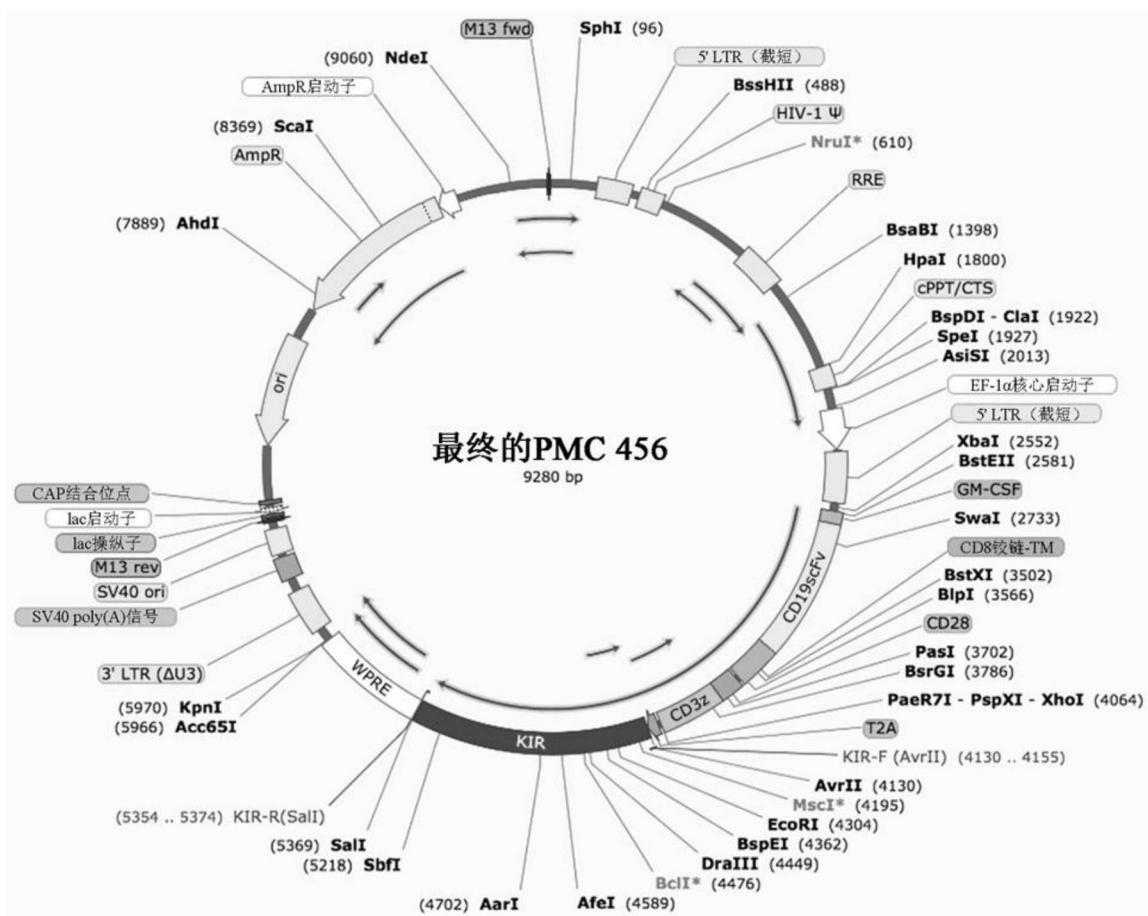


图15A

KIR3DL3/CAR-19 T细胞（PMC456细胞）的FACS图

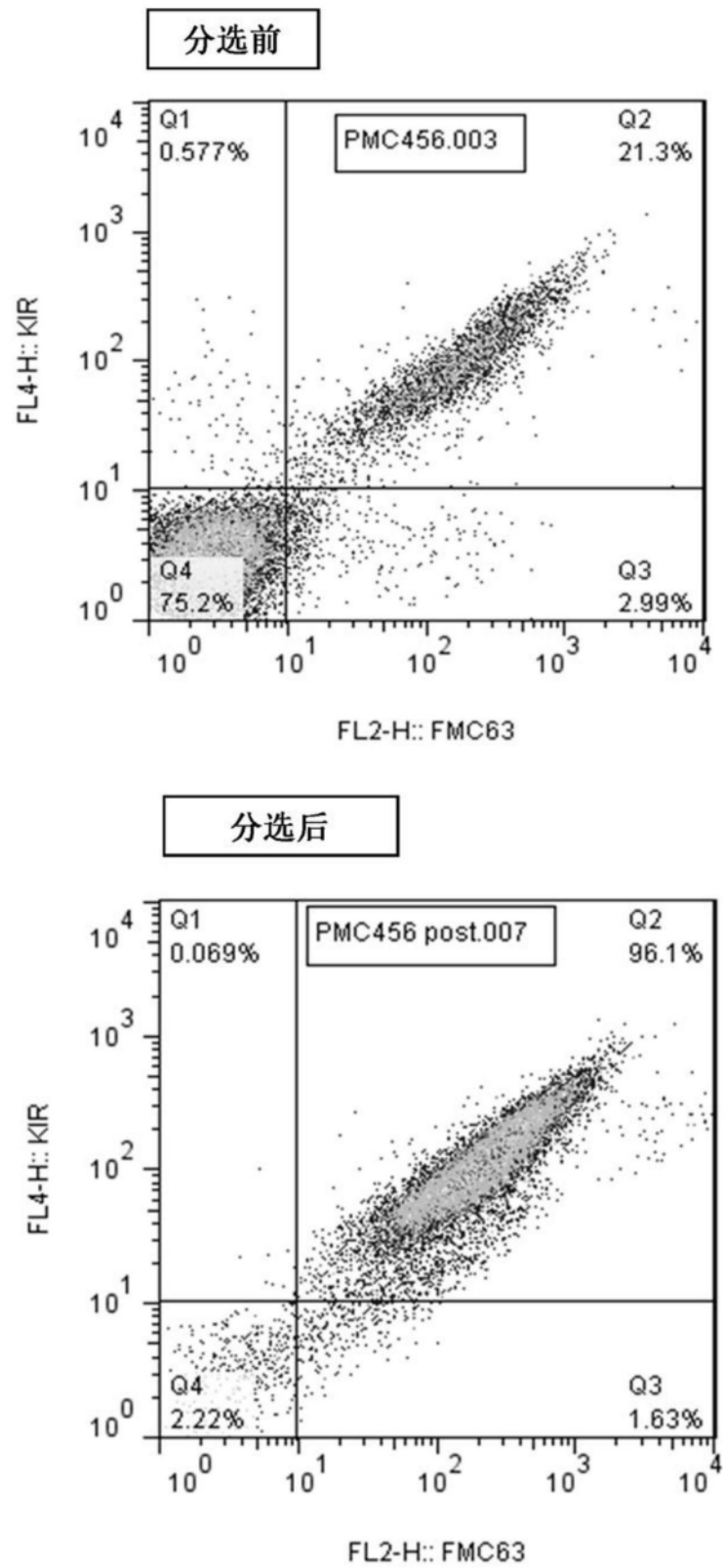


图15B

HeLa-CD19和HeLa-CD19-HHLA2肿瘤细胞的FACS图

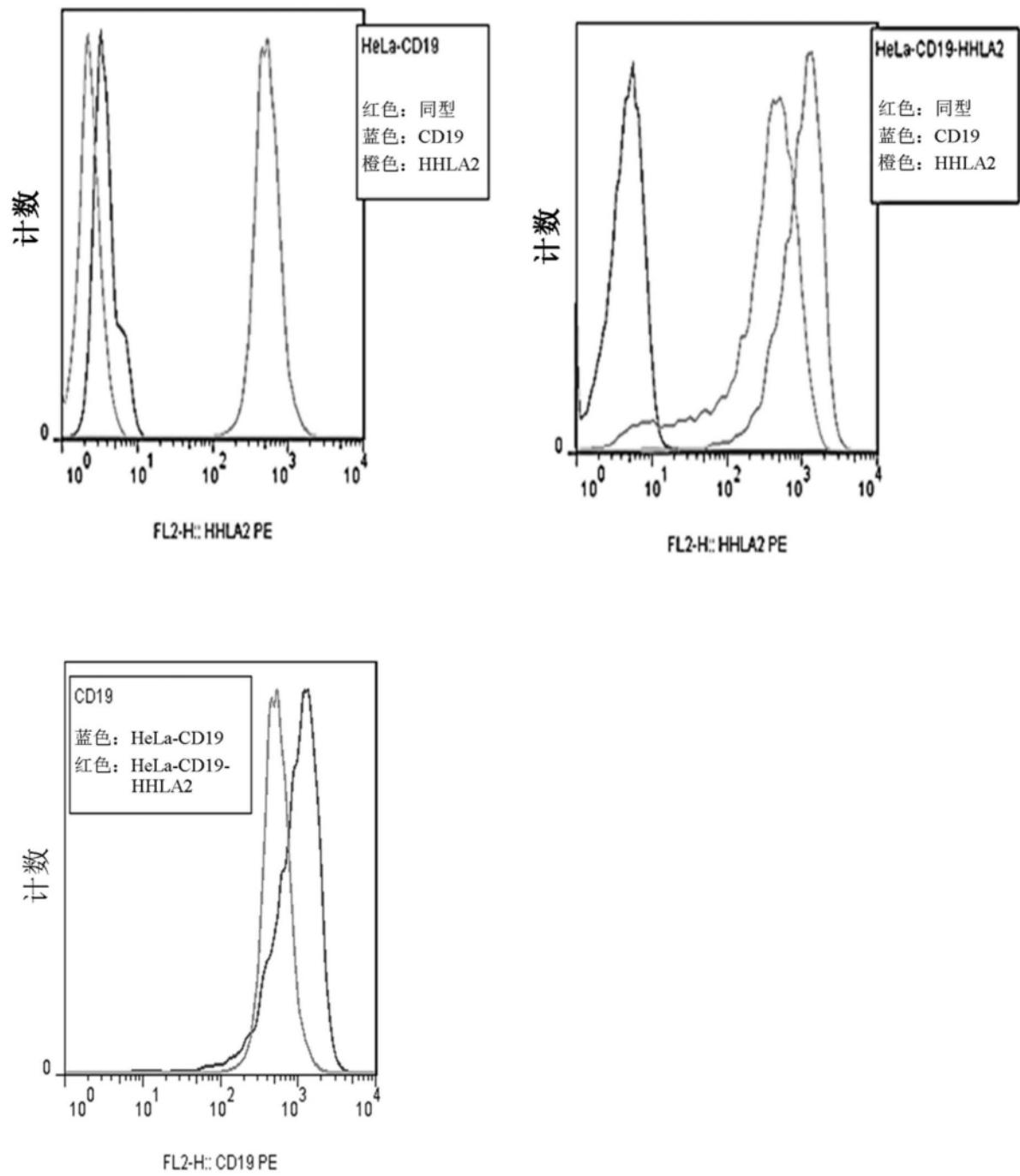


图15C

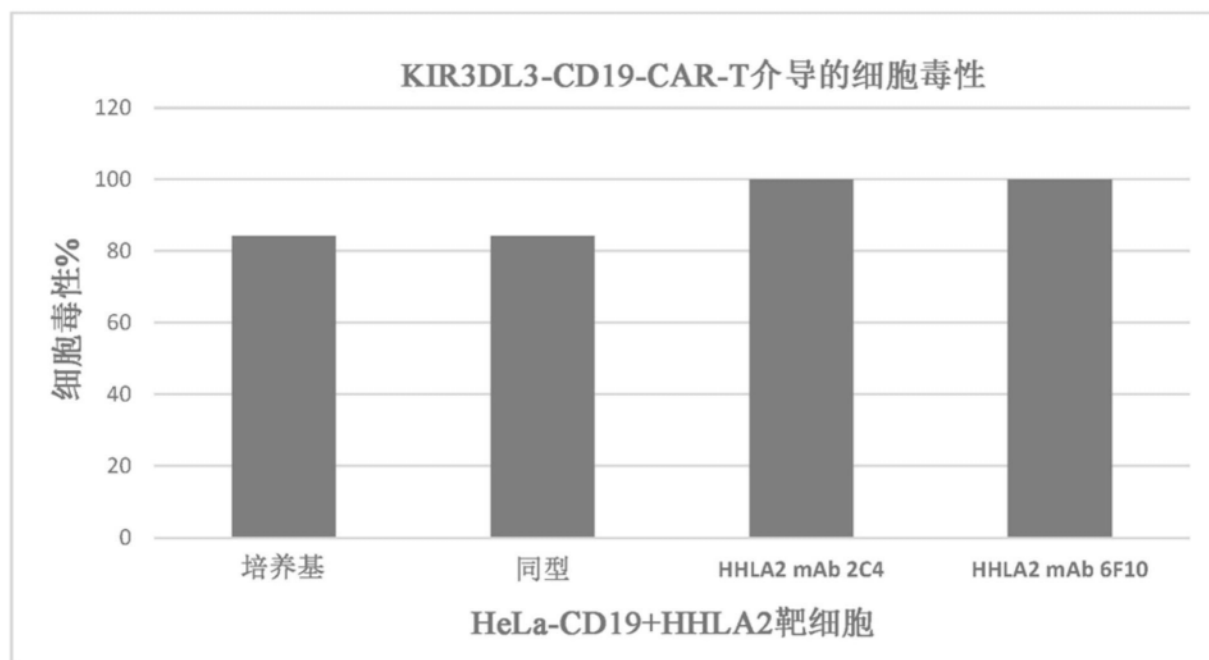


图15D

PMC579 KIR/NK92

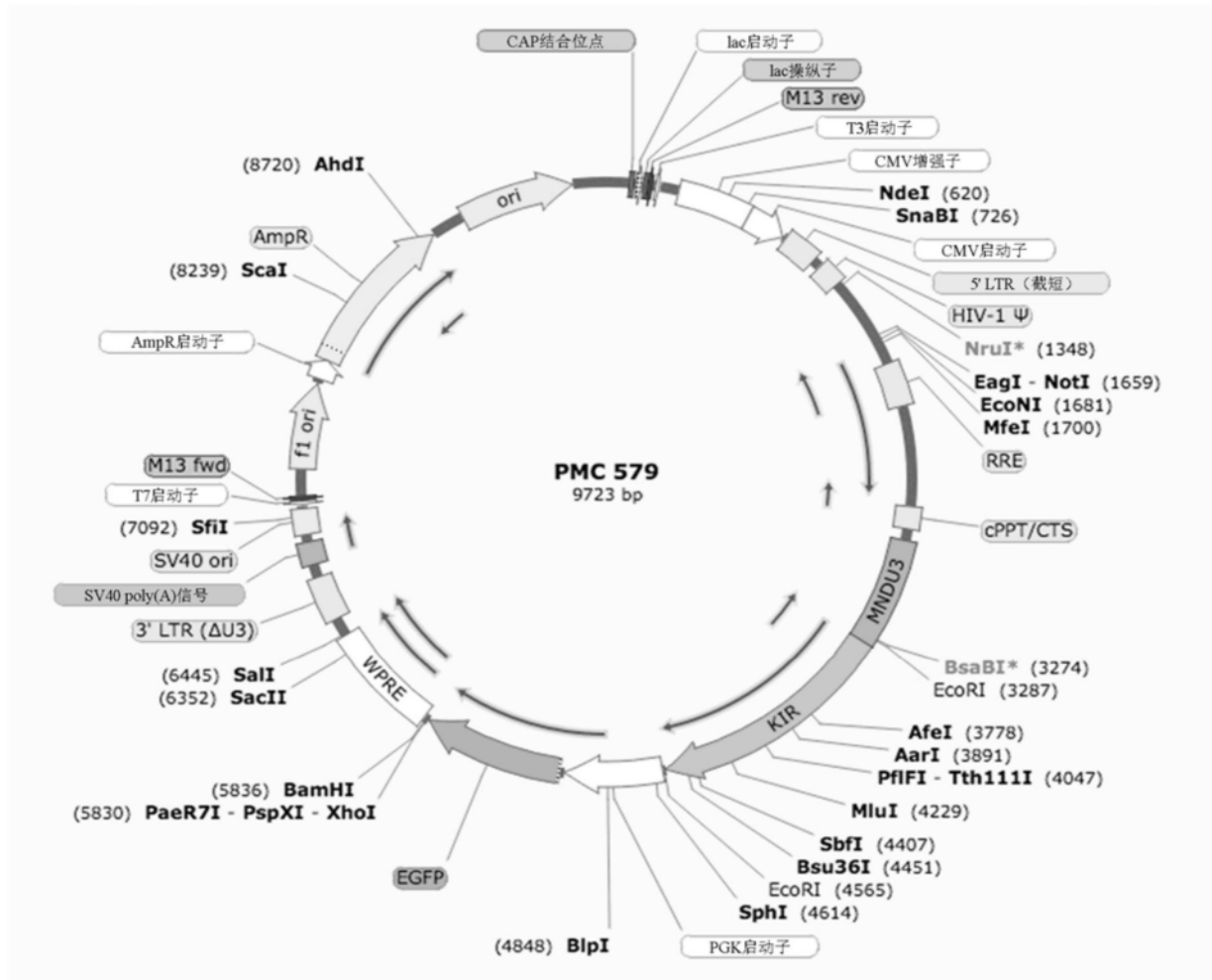


图16A

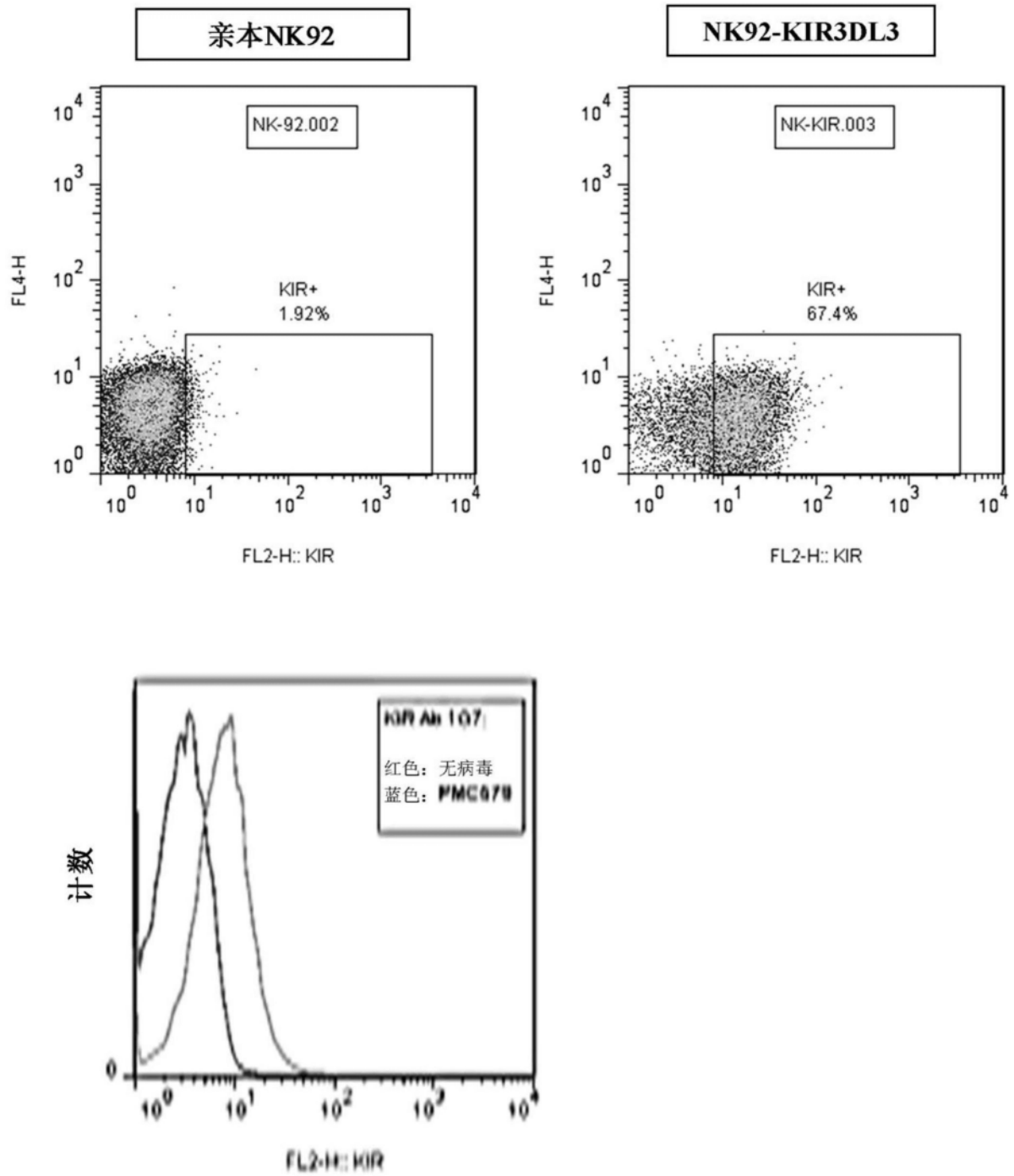


图16B

HHLA2转染或转导的K562和HeLa肿瘤细胞的FACS图

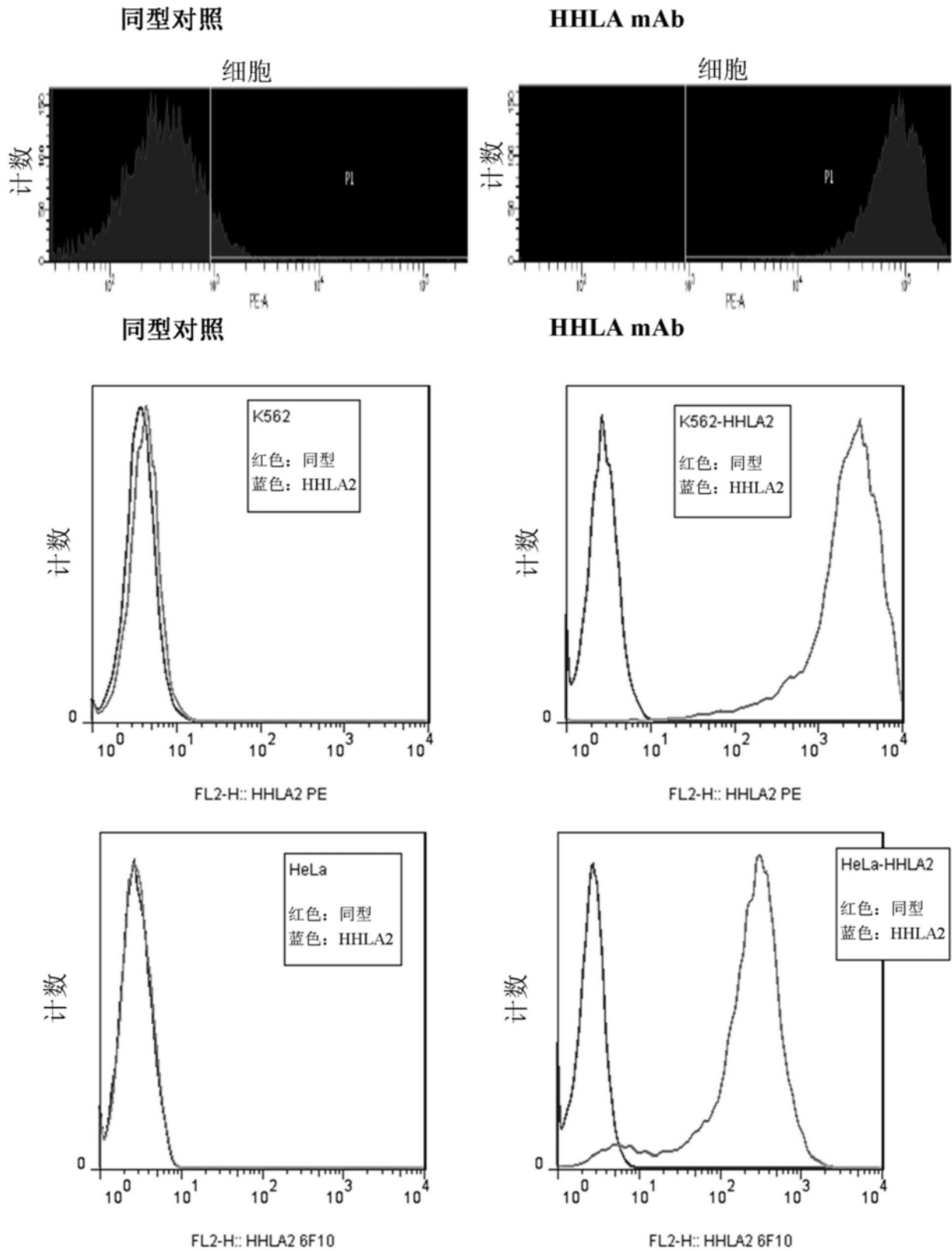


图16C

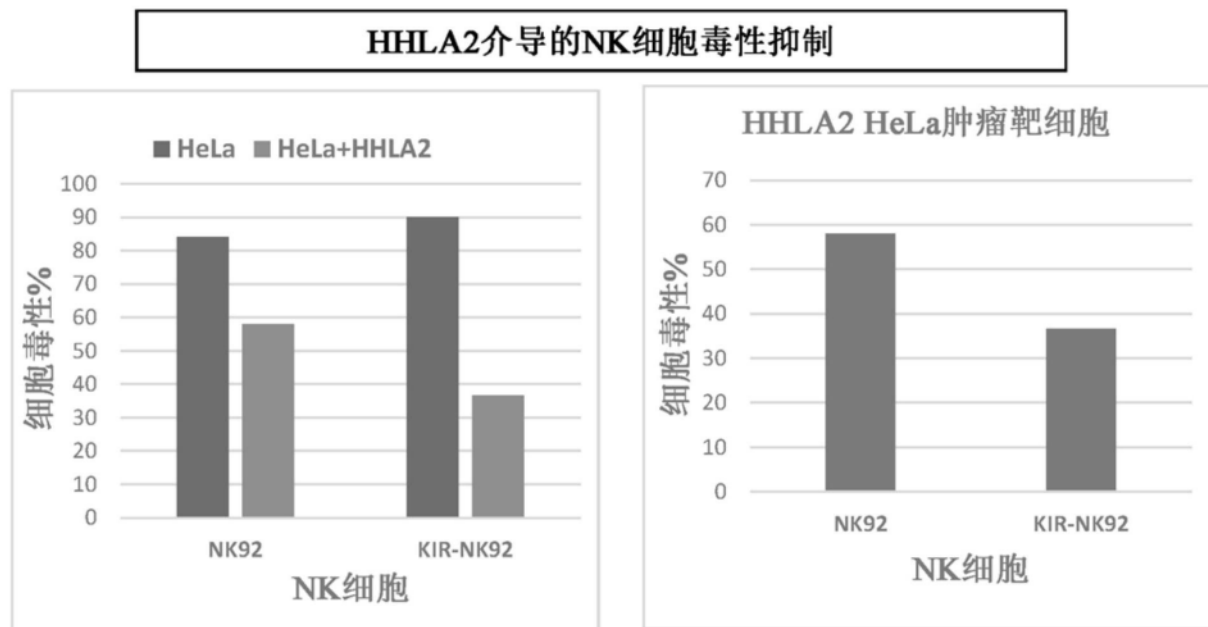


图17A

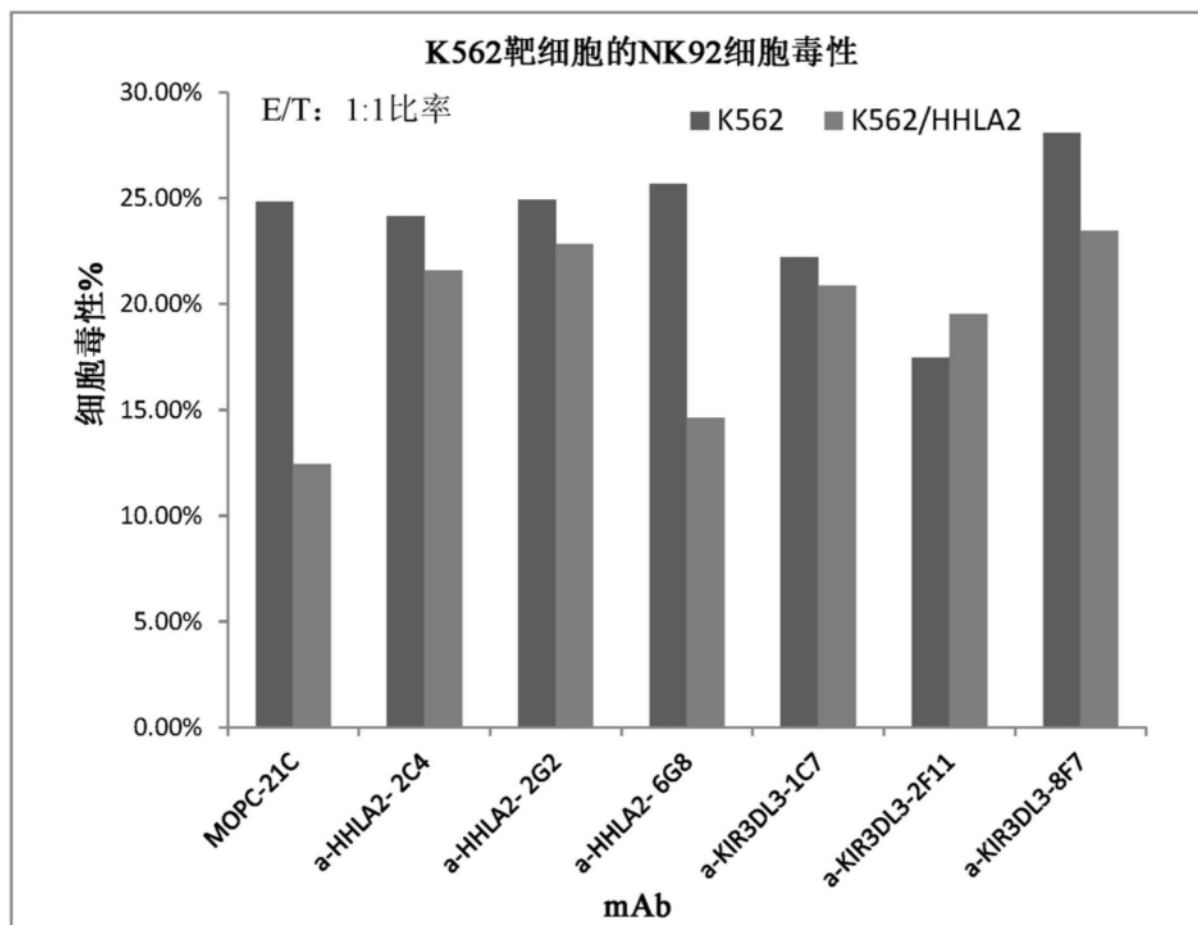


图17B

KILR®细胞毒性测定的无与伦比的特异性

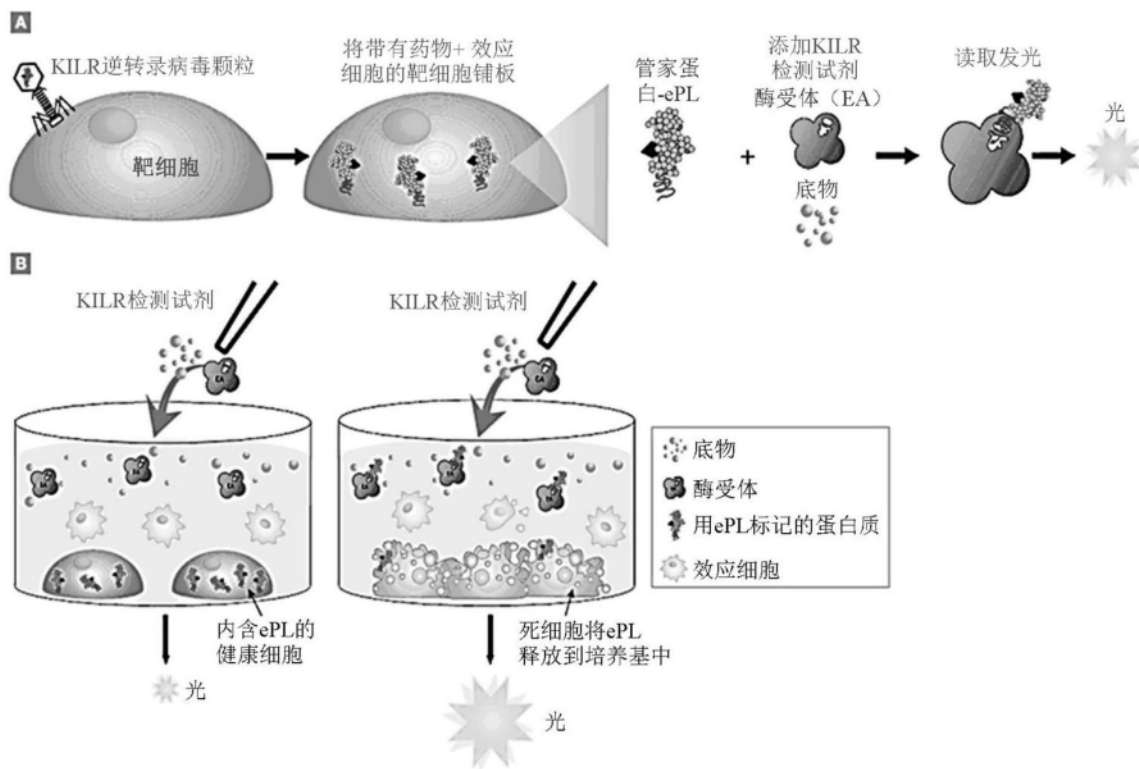


图17C

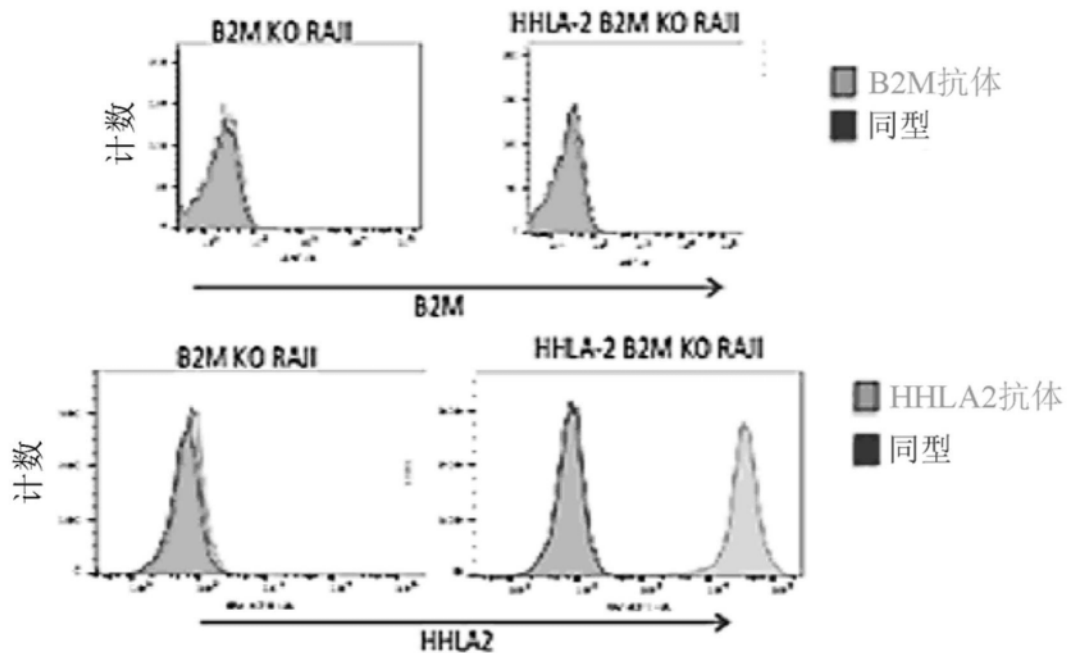


图18

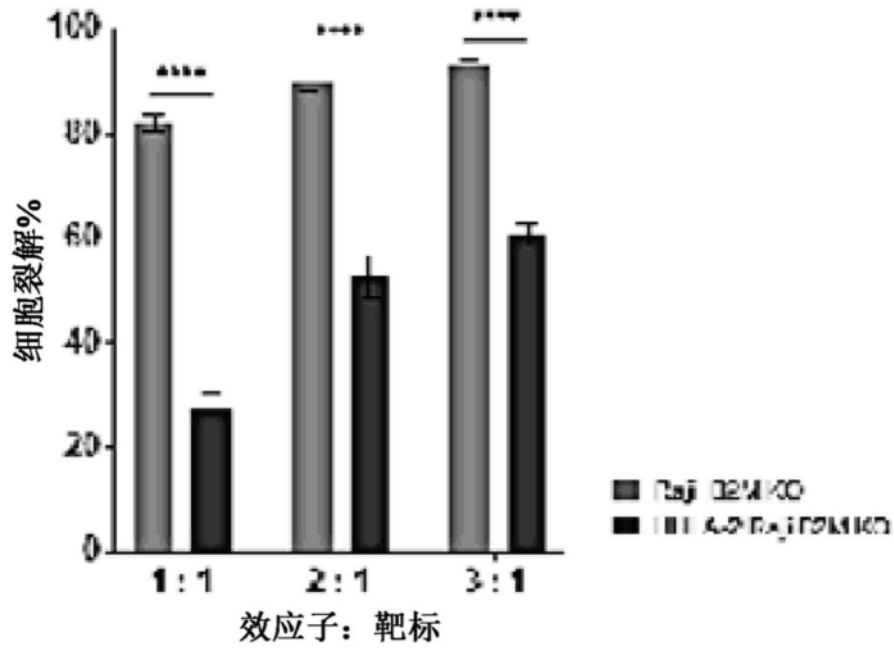


图19A

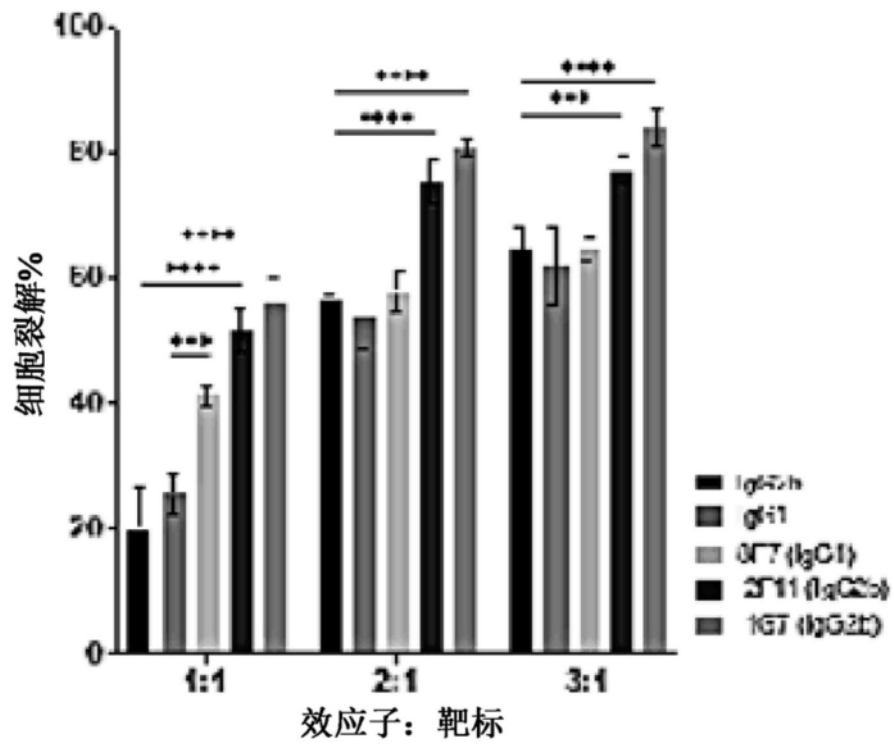


图19B

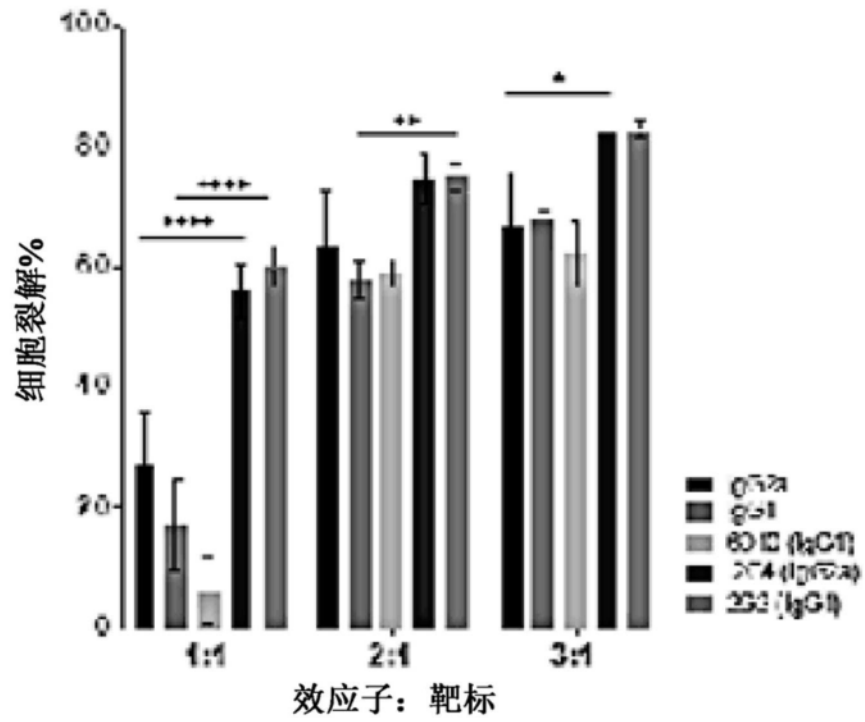


图19C

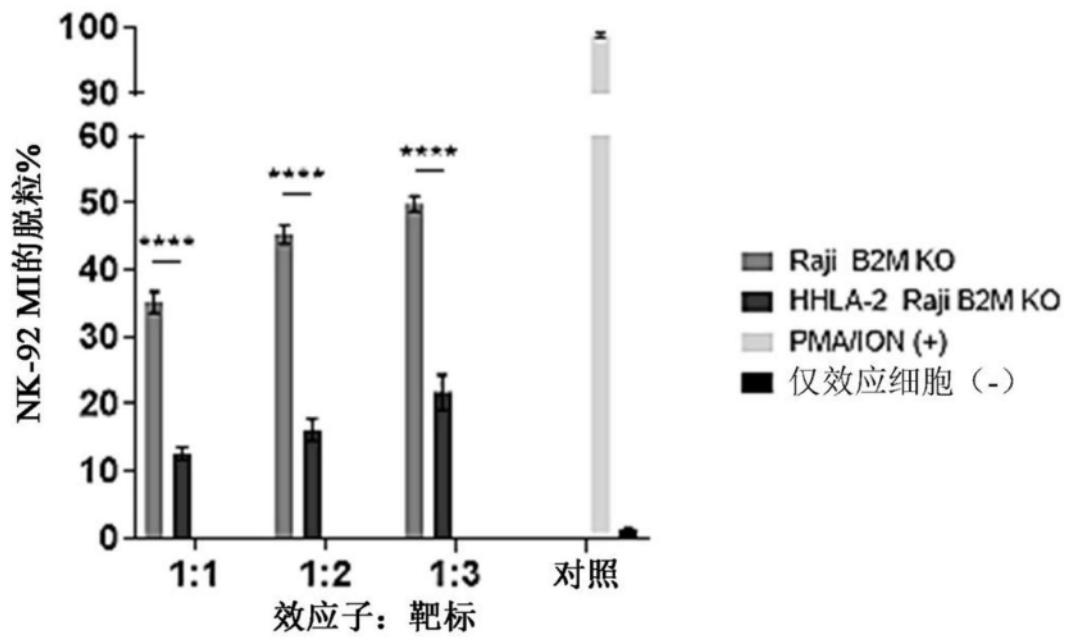


图19D

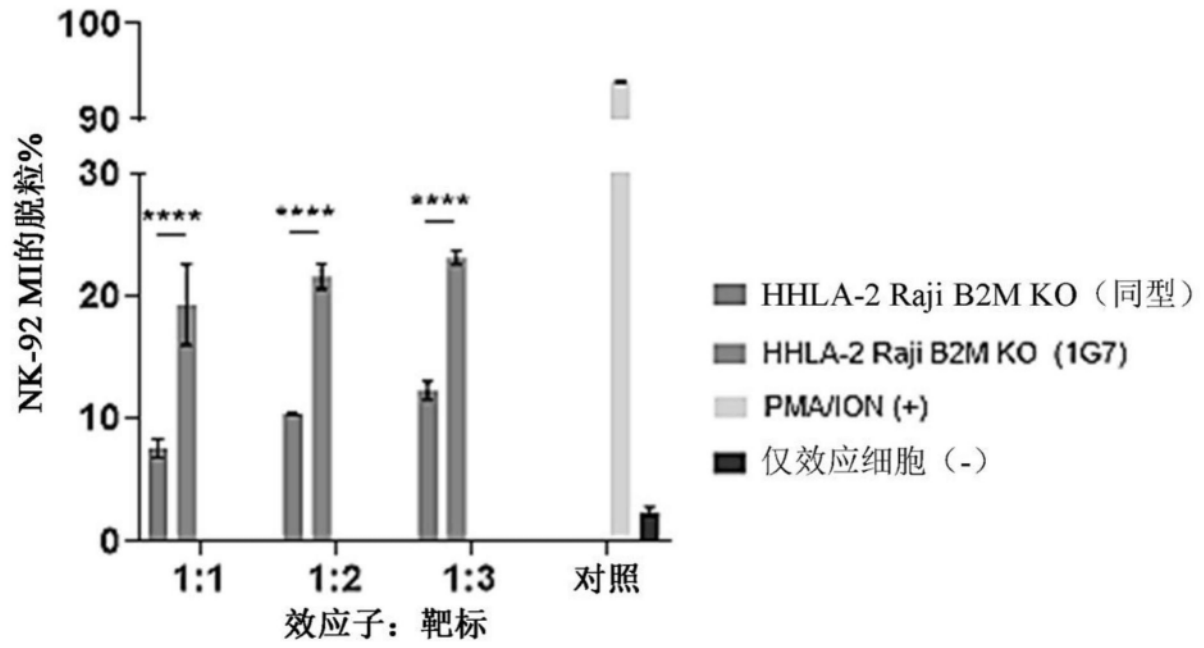


图19E

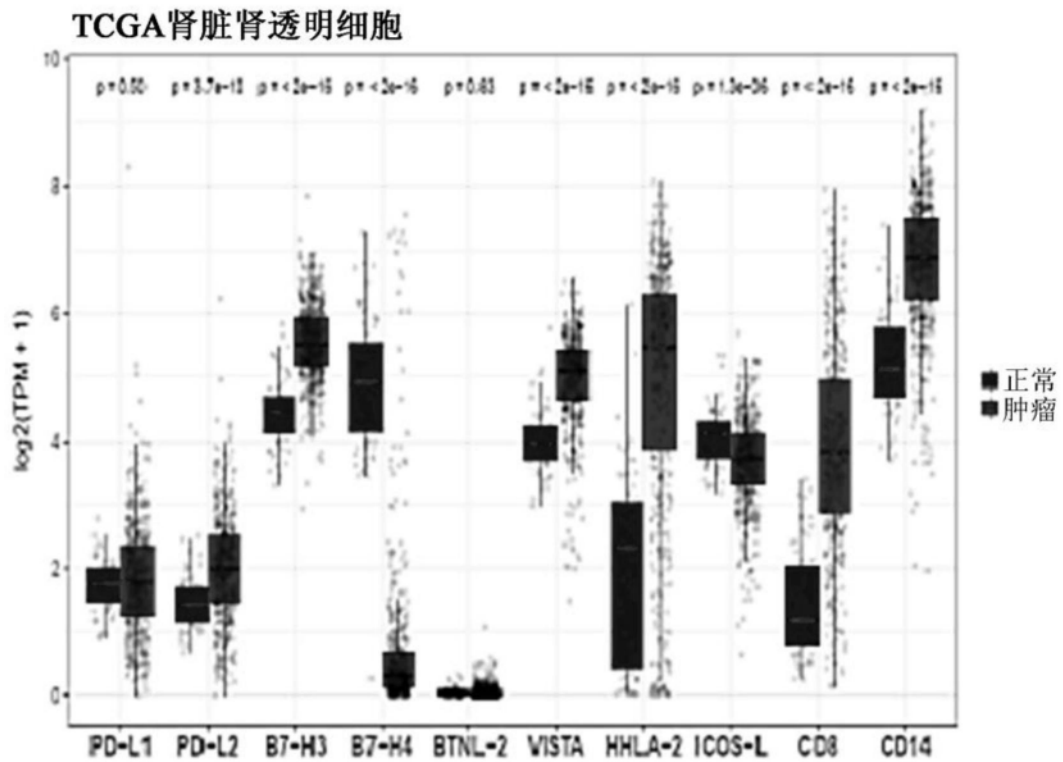


图20

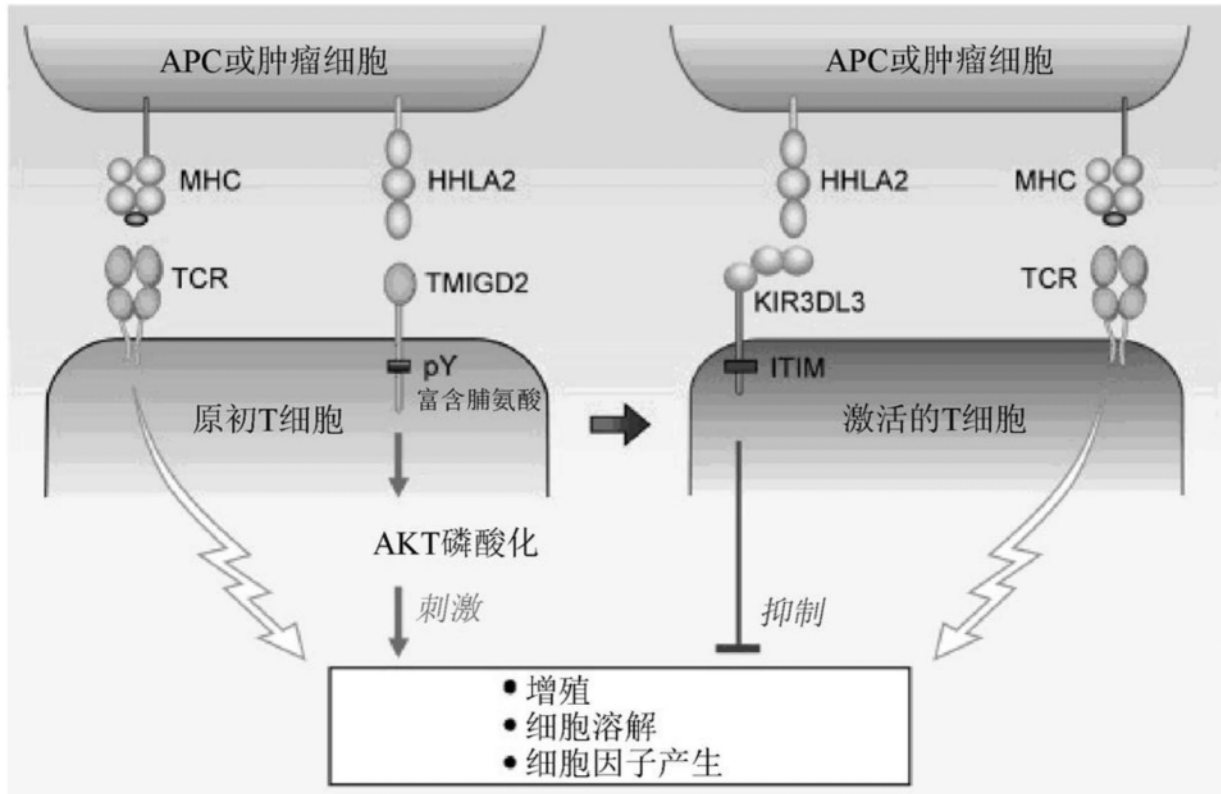


图21A

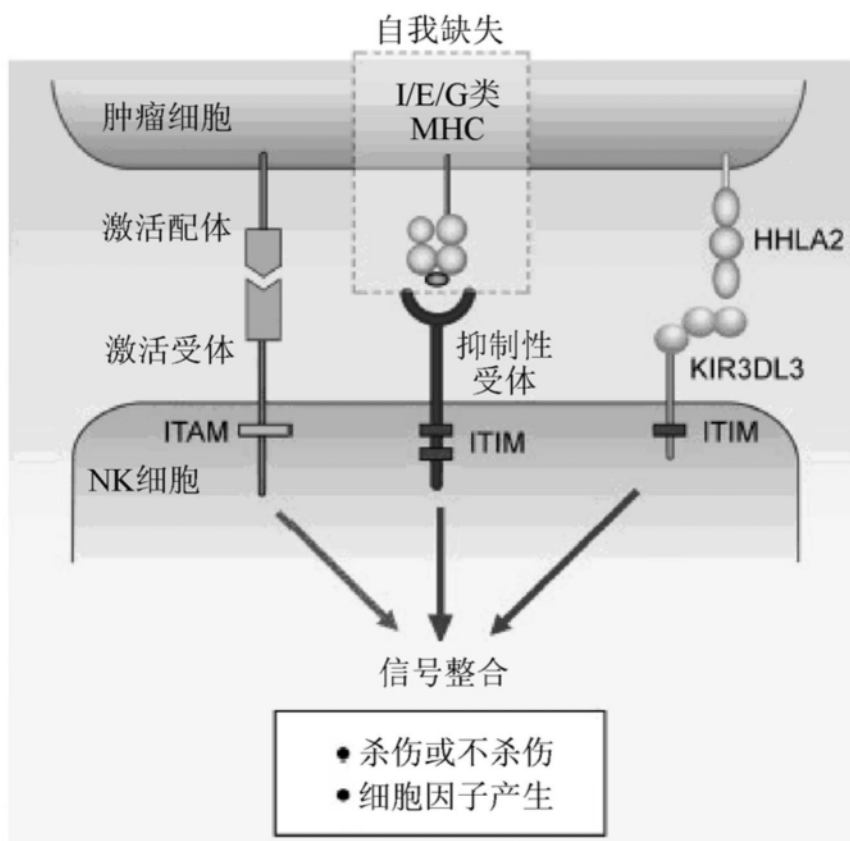


图21B

3部分双特异性抗体产生

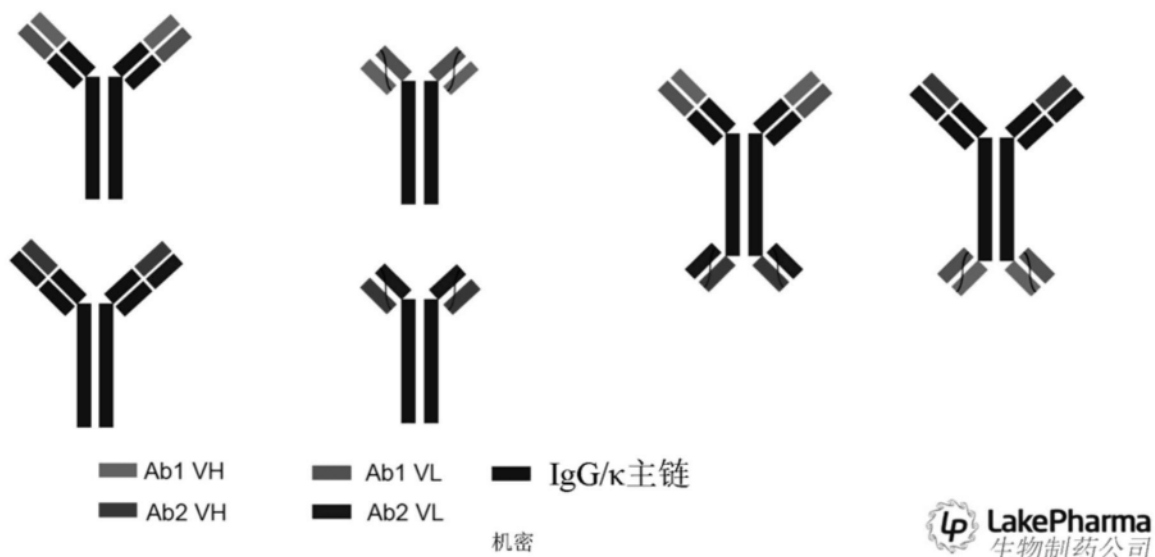
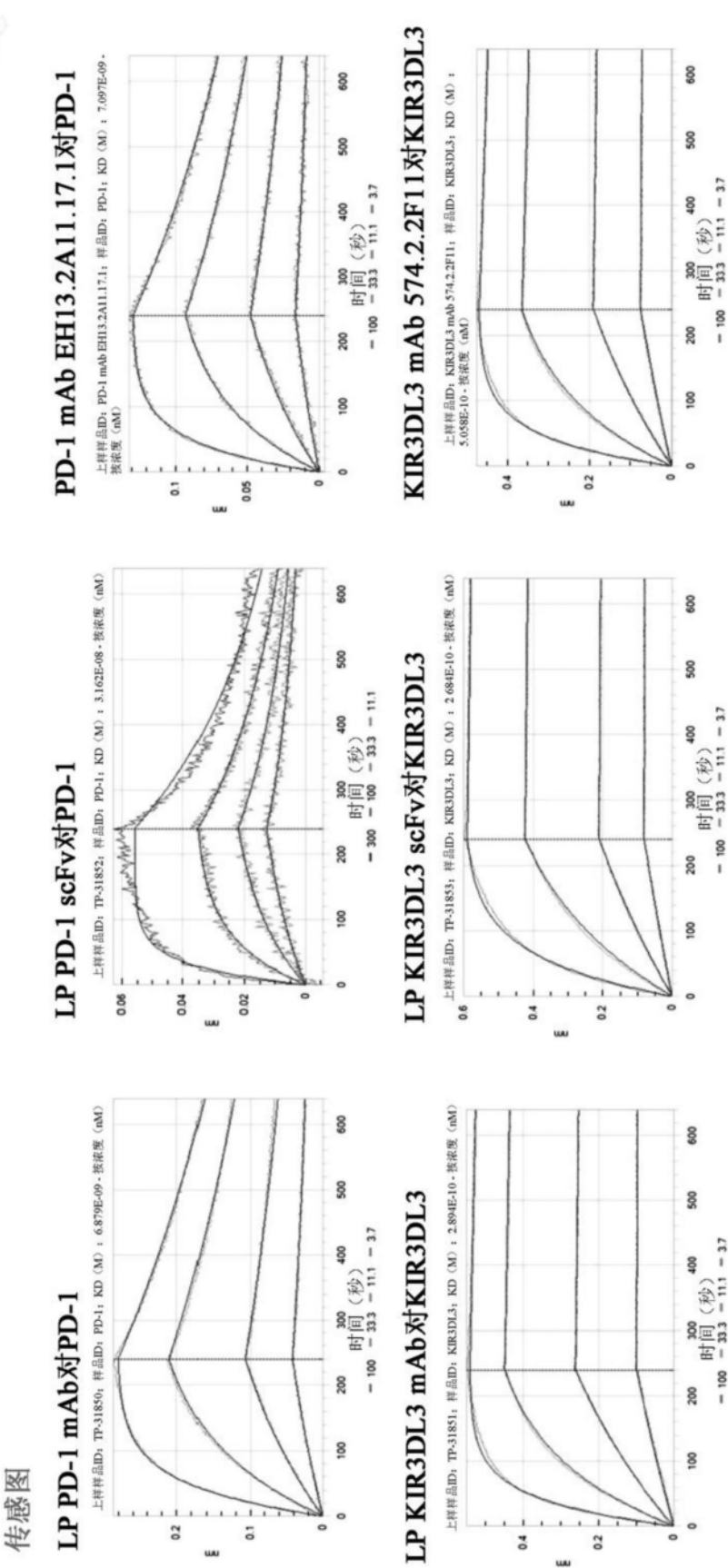


图22



注释:
观察到LP PD-1 scFv对PD-1的结合相对较低

机密

LakePharma
生物制药有限公司

图23

167