



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109863175 A

(43)申请公布日 2019.06.07

(21)申请号 201780064844.4

(22)申请日 2017.10.19

(30)优先权数据

62/410,880 2016.10.21 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.04.19

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/076751 2017.10.19

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/073363 EN 2018.04.26

(71)申请人 依奈特制药公司

地址 法国马赛

(72)发明人 卡里纳·帕蒂雷尔

埃莱娜·西卡尔

(74)专利代理机构 北京康信知识产权代理有限公司 11240

代理人 陈知宇

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

C07K 16/30(2006.01)

A61K 39/395(2006.01)

A61P 35/00(2006.01)

C07K 16/46(2006.01)

权利要求书3页 说明书61页

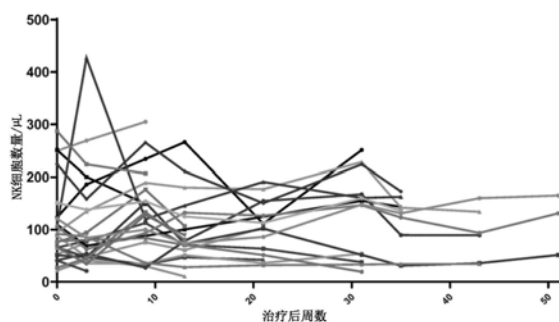
序列表35页 附图6页

(54)发明名称

用抗-KIR3DL2药剂进行治疗

(57)摘要

本披露涉及KIR3DL2靶向剂用于治疗CTCL的用途。本披露提供了特别是在一线CTCL中,使用抗-KIR3DL2抗体治疗CTCL的有利治疗方案。



1. 一种治疗具有组织表现的T细胞恶性肿瘤的方法,该方法对于具有血液受累的个体和缺乏血液受累的个体均有效,该方法包括:将结合KIR3DL2多肽并且能够引起效应细胞介导的表达KIR3DL2的细胞裂解的药剂给予患有T细胞恶性肿瘤的个体持续至少一个给予周期,其中以如下量给予该药剂至少两次,该量在该药剂的两次连续给予之间维持血液中至少为NK裂解能力的EC₆₀、EC₈₀、EC₉₀、或EC₁₀₀的浓度。

2. 如权利要求1所述的方法,其中该治疗对于具有高血液肿瘤负荷的个体和具有低血液肿瘤负荷的个体均有效。

3. 如权利要求1-2所述的方法,其中将治疗用作一线治疗。

4. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该个体未接受过骨髓移植或造血干细胞移植。

5. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中静脉内给予该药剂。

6. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中给予该药剂至少4、6、8或10次,任选地其中连续给予间隔一周至一个月的时间段。

7. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中结合KIR3DL2多肽的该药剂以一定量和频率给予,使得血液中的所述浓度维持至少10周、任选地至少3个月、任选地至少6个月。

8. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中具有组织表现的该T细胞恶性肿瘤是CTCL。

9. 如权利要求8所述的药剂或方法,其中该CTCL是惰性CTCL或II期或III期CTCL。

10. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该治疗或方法用于治疗或预防在循环中具有少于1,000/ μ L塞扎里细胞的个体中的T细胞增殖性疾病。

11. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该治疗或方法用于治疗或预防在循环中基本上缺乏可检测的表达KIR3DL2的恶性细胞的个体中的T细胞增殖性疾病。

12. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该治疗或方法用于治疗或预防具有高血液肿瘤负荷,任选地B2外周血受累的个体中的T细胞增殖性疾病。

13. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中相同的给予方案用于治疗或预防患有2期或3期蕈样真菌病的个体中的T细胞增殖性疾病。

14. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该药剂是特异性结合KIR3DL2多肽并且包含结合至人CD16多肽的人IgG同种型的Fc结构域的抗体。

15. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该抗体是全长抗体,该全长抗体包含融合至人 γ 1恒定区的重链可变区(VH)和融合至人 κ 恒定区的轻链可变区(VL)。

16. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该药剂是特异性结合KIR3DL2多肽并且能够引起可用于由抗-KIR3DL2抗体结合的细胞表面KIR3DL2多肽增加的抗体。

17. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该药剂是特异性结合KIR3DL2多肽、包含衍生自人IgG1同种型的Fc区的抗体,该抗体的特征在于针对来自健康志愿者的PBMC对HuT78肿瘤的裂解的⁵¹Cr-释放测定中的EC₅₀(a) 小于包含含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的重链可变区、含有SEQ ID NO:25或26的氨基酸序列的轻链可变区、以及人IgG1同种型的Fc区的抗体的EC₅₀或在其1-log内,和/或(b) 小于100ng/ml、任选地1与100ng/ml之间。

18. 如前述权利要求中任一项所述的方法,其中该抗体以维持循环中浓度为至少0.4 μ g/ml、任选地至少10 μ g/ml的量给予。

19. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中该药剂是特异性结合KIR3DL2多肽的抗体, 并且将该药剂每月1-4次, 并且以在0.75mg/kg与10mg/kg体重之间的量给予, 任选地以如下量, 任选地选自下组的量, 该组由以下组成: 0.75mg/kg、1.5mg/kg、3mg/kg、6mg/kg和10mg/kg体重。

20. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中该治疗之前是诱导时间段(或周期), 其中抗体以多次连续静脉内给予来给予, 并且将抗体以在0.75mg/kg与10mg/kg体重之间的量, 任选地以选自下组的量, 该组由以下组成: 0.75mg/kg、1.5mg/kg、3mg/kg、6mg/kg和10mg/kg体重, 以频率为每月1-2次给予, 任选地以频率为每月一次给予。

21. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中该药剂是特异性结合KIR3DL2多肽的抗体, 将该药剂以选自下组的量给予, 该组由以下组成: 0.75mg/kg、1.5mg/kg、3mg/kg、6mg/kg和10mg/kg体重, 并且其中该治疗方案包括:

诱导时间段(或周期), 其中所述量的该抗体以每周一次给予的频率、以多次连续静脉内给予来给予, 和

治疗时间段, 其中所述量的该抗体以每月一次或两次给予的频率、以多次连续静脉内给予来给予。

22. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中每次给予时给予的抗体量是6mg/kg。

23. 如权利要求1-21中任一项所述的方法, 其中每次给予时给予的抗体量是10mg/kg。

24. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中该个体呈现在皮肤中表达KIR3DL2的病原性细胞。

25. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中该疾病是塞扎里综合征、蕈样真菌病或NK/T淋巴瘤。

26. 一种治疗CTCL的方法, 其中个体中疾病的治疗或预防包括:

a) 确定结合KIR3DL2多肽的药剂的浓度, 该浓度在该药剂的两次连续给予之间维持人血液中的浓度以获得希望的NK裂解能力, 任选地NK裂解能力的至少至少EC₁₀、EC₆₀、EC₈₀、EC₉₀、或EC₁₀₀, 以及

b) 以在该药剂的两次连续给予之间维持血液中的浓度以获得希望的NK裂解能力的任何量和频率将结合KIR3DL2多肽的所述药剂给予该个体。

27. 如权利要求26所述的方法, 其中确定结合KIR3DL2多肽的药剂的维持人血液中的浓度以获得希望的NK裂解能力的浓度包括在体外细胞毒性测定中使用来自健康供体和HUT78肿瘤细胞的NK细胞测定该药剂, 如在⁵¹Cr释放测定中通过获得的最大肿瘤细胞裂解的百分比测量。

28. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其特征在于在用该药剂治疗之前不存在检测血液中表达KIR3DL2的恶性细胞的步骤。

29. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中该疾病是CD4⁺ T细胞癌症。

30. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中该疾病是CTCL。

31. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中结合KIR3DL2多肽的该药剂与抗体10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9竞争结合人KIR3DL2多肽。

32. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中该抗-KIR3DL2药剂基本上不增加或诱导KIR3DL2在表达KIR3DL2的细胞中的细胞内内化。

33. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中该抗-KIR3DL2药剂能够在表达KIR3DL2的细胞表面处引起KIR3DL2表达的增加, 任选地通过膜结合的KIR3DL2的稳定化。

34. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中该抗-KIR3DL2药剂干扰KIR3DL2与其天然配体之间的相互作用, 任选地其中该配体是HLA蛋白, 任选地HLA-B27蛋白。

35. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中该抗-KIR3DL2药剂结合人KIR3DL2但不结合至人KIR3DL1。

36. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中该抗-KIR3DL2药剂结合至人KIR3DL2的D0或D1结构域。

37. 如前述权利要求中任一项所述的药剂或方法, 其中该抗-KIR3DL2抗体与在残基P179和/或残基S181处具有突变的KIR3DL2多肽的结合相比于与SEQ ID NO:1的野生型KIR3DL2多肽的结合有所降低。

38. 如权利要求1-36中任一项所述的方法, 其中该抗-KIR3DL2抗体与在残基I60和/或残基G62处具有突变的KIR3DL2多肽的结合相比于与SEQ ID NO:1的野生型KIR3DL2多肽的结合有所降低。

39. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中该抗体根据卡巴特编号包含抗体10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9中的任一个的VL和VH CDR1、2和3。

40. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中该药剂是包含以下的抗体: (a) 分别包含SEQ ID NO:2 (HCDR1)、SEQ ID NO:3 (HCDR2) 和SEQ ID NO:4 (HCDR3) 的序列的重链CDR1、2和3 (HCDR1、HCDR2、HCDR3), 和分别包含SEQ ID NO:5 (LCDR1)、6 (LCDR2) 和7 (LCDR3) 的序列的轻链CDR1、2和3 (LCDR1、LCDR2、LCDR3), 或 (b) 分别包含SEQ ID NO:18 (HCDR1)、SEQ ID NO:19 (HCDR2) 和SEQ ID NO:20 (HCDR3) 的序列的重链CDR1、2和3 (HCDR1、HCDR2、HCDR3), 和分别包含SEQ ID NO:21 (LCDR1)、22 (LCDR2) 或23 (LCDR3) 的序列的轻链CDR1、2和3 (LCDR1、LCDR2、LCDR3)。

41. 如前述权利要求中任一项所述的方法, 其中该药剂是选自下组的抗体, 该组由以下组成:

(a) 包含含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的重链可变区, 和含有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的轻链可变区的抗体; 以及

(b) 包含含有SEQ ID NO:31的氨基酸序列的重链可变区, 和含有SEQ ID NO:26的氨基酸序列的轻链可变区的抗体。

用抗-KIR3DL2药剂进行的治疗

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2016年10月21日提交的美国临时申请号US 62/410,880的权益;将其通过引用以其全文并入本文;包括任何附图。

[0003] 序列表的引用

[0004] 本申请连同序列表一起以电子格式提交。序列表被提供为题“KIR-7_ST25”的文件,创建于2017年10月18日,大小是53KB。电子格式的序列表中的信息通过引用以其全文并入本文。

技术领域

[0005] 本发明涉及KIR3DL2靶向剂用于治疗CTCL的用途。

背景技术

[0006] 多种T细胞和B细胞肿瘤可以主要或次要地涉及皮肤。皮肤中存在原发性皮肤淋巴瘤,其中在诊断时没有真皮外疾病的证据。原发性皮肤淋巴瘤经常具有与组织学上相似的全身性淋巴瘤完全不同的临床表现和预后,其可能涉及皮肤其次,并且因此需要不同类型的治疗。皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)是一组淋巴细胞增殖性障碍,其特征是肿瘤性T淋巴细胞定位于皮肤。总的来说,CTCL被归类为一种非霍奇金淋巴瘤(NHL)。CTCL的治疗选择典型地取决于皮肤受累的程度、皮肤损伤的类型、以及癌症是否已扩散到淋巴结或其他内部器官。对于蕈样真菌病,治疗可以针对皮肤或整个身体。塞扎里(Sézary)综合征通常以血液受累(blood involvement)为特征,并且通常不用单独的皮肤定向疗法治疗。治疗可以单独或组合处方,以实现最佳的长期受益。CTCL中的皮肤定向疗法可用于斑点和有限的斑块疾病,并且尤其包括局部治疗,如皮质类固醇、类维生素A、或咪喹莫特、局部化疗、局部辐射、甲氨蝶呤、光分离置换法、紫外线(光疗)。

[0007] 最近,靶向在恶性细胞表面处表达的蛋白质的几种抗体治疗剂已显示出治疗CTCL的希望。

[0008] 阿仑单抗是已用于治疗CTCL和PTCL的、对CD52(由大多数T和B淋巴细胞表达的抗原)具有特异性的人源化IgG1 κ 单克隆抗体,通常的给予方案是30mg,每周三次。然而,虽然一些回顾性和前瞻性研究已显示在塞扎里综合征中的良好疗效,但阿仑单抗治疗导致NK和T细胞广泛耗竭,并导致血细胞减少和免疫耗竭。此外,Clark等人,2012 Sci. Trans. Med. [科学转化医学]4(117):117ra7 (DOI:10.1126/scitranslmed.3003008)报道,阿仑单抗治疗并未完全耗竭皮肤中的T细胞。阿仑单抗耗竭血液中的所有T细胞,但治疗后多种皮肤常驻T效应记忆细胞留在皮肤中。用阿仑单抗的T细胞耗竭需要中性粒细胞的存在,这种细胞在血液中很常见但在正常皮肤中很罕见,这表明中枢记忆T细胞因其在血液与皮肤之间的再循环而被耗竭,而皮肤驻留效应记忆T细胞则不受影响,因为它们是固着的和非再循环的。

[0009] 甚至更近来,莫加利珠单抗(KW-0761)已成为复发/难治性CTCL和PTCL的治疗方

法。莫加利珠单抗是一种耗竭CCR4的人源化抗-CCR4单克隆抗体,并且在日本已被批准用于治疗CCR4+ATLL、PTCL或CTCL。然而,莫加利珠单抗还导致健康的表达CCR4的细胞的耗竭,从而导致健康调节性T (TReg) 细胞的耗竭。健康TReg细胞的耗竭具有以下结果:其由于移植物抗宿主病的风险预先排除后续或组合的造血干细胞移植,或特别是针对其安全性需要正常功能的免疫系统的其他治疗剂。

[0010] 在治疗CTCL方面显示出有希望的功绩的另一种免疫治疗剂是本妥昔单抗,一种靶向CD30抗原并耗竭表达CD30的细胞的抗体-药物缀合物。Adcetris™(本妥昔单抗)是抗-CD30单克隆抗体(克隆cAC10),其通过蛋白酶可切割的接头与微管干扰剂单甲基奥瑞斯他汀E (MMAE) 附接。一旦与CD30结合,则本妥昔单抗被内化并且MMAE由于接头上溶酶体酶的作用被释放,从而导致细胞死亡。尽管本妥昔单抗已显示高效且可控毒性,但该治疗还可以靶向健康的表达CD30的免疫细胞,特别是激活的B细胞和T细胞。一些作者还提出,在肿瘤环境中释放的MMAE可能通过耗竭调节性T (TReg) 细胞而促成作用机制。

[0011] 最后,已提出KIR3DL2作为CTCL的靶标(参见例如,Ortonne等人(2006) Blood [血液] 107 (10) :4030-4038;和PCT公开号W002/50122)。KIR3DL2/CD158k是在健康的循环NK和CD8+ T淋巴细胞上表达的细胞表面受体。还发现KIR3DL2在CTCL细胞系和来自SS患者的新鲜分离的CD4+PBL的表面上,以及CTCL患者的循环恶性肿瘤细胞中(Nikolova等人(2002) Leuk Lymphoma. [白血病和淋巴瘤] 43 (4) :741-746)。Poszepczynska-Guigné J Invest Dermatol. [皮肤病学研究杂志] (2004) 122 (3) :820-3报道了大量患有塞扎里综合征并且循环对应于恶性克隆细胞群的CD4+CD158k+淋巴细胞的患者中通过流式细胞术分析的CD158k+血液淋巴细胞百分比与通过细胞形态学确定的非典型循环细胞(塞扎里细胞) 百分比之间的强烈正相关性。因此,KIR3DL2被提议作为标记物用于评估循环肿瘤负荷和患有塞扎里综合征的患者的随访。PCT公开号W0 2014/044686报道了抗-KIR3DL2抗体,特别是有效介导ADCC向循环表达KIR3DL2的肿瘤细胞或肿瘤细胞系的抗体。

[0012] 尽管许多CTCL治疗是可得的,但其中许多或大多数具有限制其使用的副作用,包括靶向在肿瘤细胞表面表达的蛋白质的抗体。值得注意的是,分别由阿仑单抗和莫加利珠单抗靶向的CD52和CC4二者也在健康细胞上表达,从而导致与健康T细胞和NK细胞耗竭相关的副作用,并且另外限制其他可用的抗-CTCL治疗的后续或组合使用的范围。因此需要改进的CTCL治疗。

发明内容

[0013] 本披露提供了耗竭性抗-KIR3DL2药剂作为免疫调节剂的用途,其量有效地诱导T细胞增殖性障碍的血管外,特别是皮肤部位处的免疫响应。具体地,该治疗能够耗竭表达恶性KIR3DL2的细胞而不会导致表达健康KIR3DL2的NK和T细胞的耗竭。这些药剂可以用于治疗,特别是皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL),而不考虑循环中是否存在可检测的恶性细胞。这些药剂可以有利地用于患有明显或晚期疾病但在循环中缺乏可检测的表达恶性KIR3DL2的细胞的患者。这些药剂可以有利地用于治疗患有惰性或早期T细胞淋巴瘤(例如CTCL)的患者,其特征在于在循环中具有低或无显著恶性细胞。在一个实施例中,这些药剂可以有利地用作T细胞淋巴瘤(例如CTCL)中的一线治疗。任选地,受试者尚未用化学治疗剂治疗。任选地,受试者尚未用免疫治疗剂(例如,莫加利珠单抗、阿仑单抗和/或本妥昔单抗)治疗。任选地,受

试者尚未用骨髓移植或造血干细胞移植治疗。任选地,受试者患有进展性疾病。在一个实施例中,这些药剂可以有利地用于在骨髓移植或造血干细胞移植之前治疗患者。

[0014] 在患有ADCC诱导抗-KIR3DL2抗体的人患者中复发/难治性CTCL的临床试验中,发明人惊讶地在接受极少量(足以在皮肤中达到极少量的恶性细胞的量)抗-KIR3DL2抗体的患者的皮肤损伤中观察到强烈的抗肿瘤作用,并且在某些剂量水平下,血液中仅一部分恶性细胞(如果有的话)存在。

[0015] 此外,在循环中缺乏可检测的表达恶性KIR3DL2的细胞的患者中观察到在皮肤病(红皮病、皮肤斑块或斑点)方面的强烈抗肿瘤作用。

[0016] 另外,临床试验的分析更普遍地揭示了在用耗竭性抗-KIR3DL2药剂按以便对循环中的KIR3DL2+细胞提供少至部分/最小的NK裂解活性,并且远低于将在皮肤肿瘤细胞中提供显著占据KIR3DL2受体的量(例如包括在具有高肿瘤负荷的患者中)的给予剂量治疗后,患者经历了皮肤疾病的强烈改善,包括恢复正常的皮肤结构和在疾病的皮肤部位处表达KIR3DL2的细胞的强烈减少。

[0017] 结果表明KIR3DL2结合剂,当给予以便在足够长的时期(例如10周或更长)内提供循环活性时,可以有效治疗组织(例如皮肤)中的疾病,尽管预期低量的治疗剂在组织中的疾病部位起作用。此外,与其他治疗中观察到的不同,该治疗有利地可以避免循环中表达健康的表达KIR3DL2的NK和/或T细胞的耗竭。因此,KIR3DL2结合剂可以特别有利地用于CTCL的一线治疗,包括但不限于患有早期和/或惰性疾病的个体。在一个实施例中,KIR3DL2结合剂在疾病的早期和晚期两个阶段与造血干细胞或骨髓移植(例如,在其之前)组合使用。在一个实施例中,KIR3DL2结合剂用于治疗一线CTCL。在一个实施例中,KIR3DL2结合剂用于治疗没有资格(例如由于高血液和/或皮肤肿瘤负荷)进行造血干细胞或骨髓移植的受试者的CTCL。在一个实施例中,KIR3DL2结合剂在不耗竭健康NK和/或T细胞的情况下实现血液和/或皮肤肿瘤负荷的降低,并使得受试者有资格进行造血干细胞或骨髓移植。

[0018] 在我们的研究中,我们使用了一种新的范例来确定抗-KIR3DL2抗体的剂量。而不是寻求在皮肤实体瘤中的恶性细胞上保持完整的KIR3DL2占据率,其被认为在具有与晚期疾病相关的较高肿瘤负荷的个体中需要特别高的血液浓度,抗-KIR3DL2抗体以较低但足以维持血液(例如血清)中提供例如至少60%、80%、90%或100%的NK%裂解能力的浓度的量和频率给药,导致显著的抗肿瘤响应,同时允许针对所有患者的单次给药方案。这些治疗方案可以用于延长的治疗期和/或几个治疗周期,任选地之前是其中采用更高的给予频率(或更高的剂量)的诱导或负荷时间段。在某些实施例中,单次治疗方案(例如相同的给予剂量和相同的给予频率)可以有利地用于具有低血液和/或皮肤疾病负荷的个体和具有高血液和/或皮肤疾病负荷的个体二者。

[0019] 在一个实施例中,不导致健康NK和/或T细胞耗竭的常见治疗方案(例如相同的给予剂量和相同的给予频率)可以有利地在个体中使用而不考虑初始的肿瘤负荷和/或疾病阶段,其中该常见治疗方案之前是其中抗-KIR3DL2抗体以更高的给予频率(任选地,其中该常见治疗方案和诱导方案中每次给予抗体的剂量是相同的)给予个体(例如具有高肿瘤负荷的个体)的诱导方案或负荷时间段。

[0020] 在一个方面,KIR3DL2受体可能是由疾病的皮肤表现引起的,而不是从循环恶性和非恶性CD4(+)T细胞群体克隆扩增。因此,在患者缺乏血液受累(在循环中缺乏可检测的表

达KIR3DL2的恶性细胞)的情况下,包括在惰性或早期CTCL中,KIR3DL2实际上可以在皮肤T细胞恶性肿瘤中充分表达,以允许通过抗-KIR3DL2结合剂进行治疗性靶向。另外地或可替代地,来自皮肤损伤的肿瘤细胞可以进入(或重新进入)循环,使得循环中少量肿瘤细胞的裂解有助于促进皮肤中更广泛的抗肿瘤响应。

[0021] 在一个方面,提供了一种结合KIR3DL2多肽并且能够引起效应细胞介导的表达KIR3DL2的细胞裂解的药剂,用于治疗CTCL。在一个实施例中,该CTCL具有疾病的组织表现,例如瘙痒、红皮病和/或皮肤肿瘤。在一个实施例中,该药剂用作一线治疗。在一个实施例中,提供了一种方法,该方法包括将结合KIR3DL2多肽并且能够引起效应细胞介导的表达KIR3DL2的细胞裂解的药剂给予患有T细胞恶性肿瘤(例如CTCL)的个体。在一个方面,提供了一种结合KIR3DL2多肽并且能够引起效应细胞介导的表达KIR3DL2的细胞裂解的药剂,用于使患有T细胞恶性肿瘤(例如CTCL)的个体准备好进行随后的骨髓移植或造血干细胞移植。在一个方面,提供了一种抗-KIR3DL2结合剂,用于治疗患有T细胞恶性肿瘤的个体,其具有疾病的组织表现(例如,具有瘙痒、红皮病和/或皮肤肿瘤的CTCL)但在循环中缺乏可检测的表达KIR3DL2的恶性细胞。在一个方面,提供了一种抗-KIR3DL2结合剂,用于治疗患有惰性或早期CTCL的个体。

[0022] 在一个方面,可以给予抗-KIR3DL2结合剂,其量在循环中有效实现少至可以足以在患者中诱导强烈抗肿瘤作用的NK裂解能力的 EC_{10} ,该患者患有具有疾病的皮肤表现(例如瘙痒、红皮病和/或皮肤肿瘤)的CTCL。在循环中维持少至NK裂解能力的 EC_{10} 的剂量减少了血液肿瘤负荷,并且在循环中维持少至NK裂解能力的 EC_{60} 的剂量恢复了正常皮肤结构并减少了疾病皮肤部位处表达KIR3DL2的细胞。因此,在一个实施例中,提供了一种抗-KIR3DL2结合剂,用于治疗具有CTCL皮肤表现但在循环中没有或具有低水平的可检测恶性细胞的个体,其中给予抗-KIR3DL2结合剂,其量在循环中有效维持少至可以足以诱导强烈抗肿瘤作用的NK裂解能力的 EC_{10} 。在另一个实施例中,提供了一种抗-KIR3DL2结合剂,用于治疗具有CTCL皮肤表现和循环中可检测(例如更高水平)恶性细胞的个体,其中该治疗包括多次给予抗-KIR3DL2结合剂,其量有效维持少至NK裂解能力的 EC_{10} 。

[0023] 因此,通过抗-KIR3DL2结合剂靶向KIR3DL2可以在几种治疗设置中是有利的,而且不需要事先测试循环和/或皮肤中恶性细胞上的KIR3DL2表达。此外,使用抗-KIR3DL2结合剂不需要将在具有多种肿瘤负荷的群体内的所有患者的皮肤病(例如红皮病、皮肤损伤)中维持肿瘤细胞的完全受体占据的剂量,并且可以受益于健康免疫细胞(例如NK细胞、CD8T细胞、 γ - δ T细胞)的能力以通过耗竭循环中少量表达KIR3DL2的肿瘤细胞(例如,低于检测限)(例如从皮肤损伤进入循环的肿瘤细胞),和/或通过诱导皮肤损伤中的抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)而促成更广泛的抗肿瘤响应。

[0024] 在一个方面,提供了用于给予能够诱导此类抗肿瘤响应的抗-KIR3DL2药剂的治疗方案。

[0025] 在一个方面,本文披露的治疗方案具有以下优点:适于治疗患有在循环中具有可检测的恶性细胞(例如表达KIR3DL2的恶性细胞)的T细胞淋巴瘤(例如CTCL)的个体,以及患有在循环中缺乏这种可检测的恶性细胞的T细胞淋巴瘤的个体。值得注意的是,单次给予剂量和/或给药方案可以用于治疗此类患者,从而避免作为循环中恶性细胞水平(或缺乏其)的函数的不同治疗的需要。有利地,治疗方案可以用于任选地在一段时间内重复和/或连续

地治疗具有高肿瘤负荷的患者,以产生针对皮肤表现的更广泛的响应。

[0026] 在一个实施例中,有利的治疗包括给予个体一定量和频率的抗-KIR3DL2药剂,其提供血液(例如血清)中至少对应于NK裂解能力的EC₁₀、EC₆₀、EC₈₀、EC₉₀、或EC₁₀₀的浓度。任选地,抗-KIR3DL2药剂的量和频率小于将维持皮肤中(或皮肤损伤或肿瘤(例如晚期疾病阶段、高肿瘤负荷或红斑)内)受体饱和的EC₉₀或EC₁₀₀的量和频率。

[0027] 在本文任何实施例的一个方面,有利的治疗包括多次给予一定量和频率的抗-KIR3DL2药剂,其提供血液(例如血清)中至少为NK裂解能力的EC₁₀、EC₆₀、EC₈₀、EC₉₀、或EC₁₀₀的浓度。任选地,给予该疗法持续至少10周、12周、3个月、4个月或6个月。任选地,给予间隔约一周至约两个月的一段时间。任选地,抗-KIR3DL2药剂给予至少4、6、8、10或20次。任选地,抗-KIR3DL2药剂的量和频率小于将提供皮肤中(或皮肤损伤或肿瘤(例如晚期疾病阶段、高肿瘤负荷或红斑)内)受体饱和的EC₉₀或EC₁₀₀的量和频率。

[0028] 在一个实施例中,有利的治疗包括给予个体一定量的抗-KIR3DL2药剂,其在两次连续给予之间维持血液(例如血清)中提供至少10%、任选至少60%、任选至少80%、任选至少90%或任选100%的NK%裂解能力的浓度。

[0029] 在一个实施例中,有利的治疗包括给予个体一定量的抗-KIR3DL2药剂,其在两次连续给予之间维持血液(例如血清)中至少为NK裂解能力的EC₁₀、EC₆₀、EC₈₀、EC₉₀、或EC₁₀₀的浓度。在一个实施例中,该治疗维持至少血液(例如血清)中至少为NK裂解能力的EC₁₀、EC₆₀、EC₈₀、EC₉₀、或EC₁₀₀的浓度的谷浓度。

[0030] 任选地,给予该治疗持续至少10周、12周、3个月、4个月或6个月。

[0031] 任选地,给予间隔约一周至约两个月的一段时间。

[0032] 任选地,该治疗包括至少4、6、8、10或20次连续给予抗-KIR3DL2药剂。

[0033] 在一个实施例中,在用抗-KIR3DL2药剂治疗之前,该个体(保留资格或取得资格)有资格进行造血干细胞移植或骨髓移植。

[0034] 在一个实施例中,该个体在用抗-KIR3DL2药剂治疗之前没有资格进行造血干细胞移植或骨髓移植,并且在用抗-KIR3DL2药剂治疗之后取得进行造血干细胞移植或骨髓移植的资格。

[0035] 任选地,用抗-KIR3DL2药剂进行的治疗是在造血干细胞移植或骨髓移植之前。任选地,该治疗方法是与造血干细胞移植或骨髓移植组合。在任何实施例中,治疗方法进一步包括在用抗-KIR3DL2药剂治疗后给予个体造血干细胞移植或骨髓移植。

[0036] 在一个实施例中,提供了一种结合KIR3DL2多肽并且能够引起效应细胞介导的表达KIR3DL2的细胞裂解的药剂,用于治疗具有组织表现的T细胞恶性肿瘤,其中该治疗对于具有血液受累的个体和缺乏血液受累的个体均有效。

[0037] 在一个实施例中,提供了一种方法,该方法包括将结合KIR3DL2多肽并且能够引起效应细胞介导的表达KIR3DL2的细胞裂解的药剂给予患有T细胞恶性肿瘤(例如CTCL)的个体持续至少一个给予周期,其中以如下量给予该药剂至少两次,该量在该药剂的两次连续给予之间维持循环中至少10%、任选至少60%、80%、或90%、或任选100%的裂解能力%。例如,给予该药剂,其量维持血液(例如血清)中至少为NK裂解能力的EC₁₀、EC₆₀、EC₈₀、EC₉₀、或EC₁₀₀的浓度。在一个实施例中,静脉内给予该药剂。在一个实施例中,给予该药剂至少4、6、8或10次,任选地其中连续给予间隔一周至一个月的时间段。在一个实施例中,给予结合

KIR3DL2多肽的药剂,使得在循环中提供所述裂解能力%(或EC值)的循环中浓度维持至少10周,任选至少3个月、任选至少6个月。在一个实施例中,该方法是一种治疗具有组织表现的T细胞恶性肿瘤的方法,该方法对于具有血液受累的个体和缺乏血液受累的个体均有效。在一个实施例中,该方法是一种用于使患有T细胞恶性肿瘤(例如CTCL)的个体准备好进行随后的骨髓移植或造血干细胞移植的方法。

[0038] 任选地,在任何实施例中,该治疗方案之前是其中抗-KIR3DL2结合剂以更高的量和/或频率给予的诱导或负荷时间段。任选地,在任何实施例中,该治疗方案之前是其中抗-KIR3DL2结合剂以相同的量但以更高的频率(例如以多个连续给予)给予的诱导或负荷时间段。

[0039] 任选地,抗-KIR3DL2药剂的量小于将提供组织(例如血管外组织、疾病组织、皮肤、皮肤损伤或肿瘤(包括例如晚期疾病阶段、高肿瘤负荷或红斑)内)中受体饱和的EC₈₀、EC₉₀、EC₁₀₀的量。

[0040] 在一个实施例中,抗-KIR3DL2结合剂是介导效应细胞介导的表达KIR3DL2的细胞(例如肿瘤细胞)的裂解的药剂。任选地,该药剂是抗原结合多肽,任选抗体或其片段(例如包含VH和/或VL结构域的蛋白质),其结合KIR3DL2多肽,或表达这种多肽的免疫效应细胞(例如嵌合抗原受体免疫效应细胞)、抗体或其他化合物。任选地,该抗体是耗竭性多肽(抗体)。任选地,该抗体是使ADCC和/或ADCP针对表达KIR3DL2的细胞的单特异性或多特异性(例如双特异性)抗体。

[0041] 在本文任何实施例的一个方面,KIR3DL2结合剂包含能够介导ADCC的人IgG同种型的抗-KIR3DL2抗体,并且给予个体至少两次,其量有效实现(和/或维持指定的时间段或在两次连续给予之间)至少0.1 μ g/ml(或任选至少0.4、1、2、10 μ g/mL)、任选小于60或小于100 μ g/mL、任选在2与30 μ g/mL之间、任选在2与60 μ g/mL之间的抗-KIR3DL2抗体血液(血清)浓度。在一个实施例中,每周一次、每两周一次、每月(或四周)一次,任选地每月一次至每两个月一次,静脉内施给予该抗体。

[0042] 这些方面将在本文提供的本发明的描述中更加完全地描述,并且另外的方面、特征和优点将是明显的。

附图说明

[0043] 图1A示出,虽然预期抑制受体内化/循环的在4 $^{\circ}$ C下孵育导致至少相等水平的细胞表面KIR3DL2,但用抗体2B12(人IgG1)染色在37 $^{\circ}$ C下高于在4 $^{\circ}$ C下。此外,随着孵育持续时间的增加,观察到更高的中值荧光,在孵育24小时后观察到最大的KIR3DL2表达。

[0044] 图1B示出了抗体2B12(暗线/正方形)和KIR3DL2水平的同种型对照(亮线/圆圈)的作用。可以看出,游离受体和2B12结合的KIR3DL2受体读数是相关的,具有相似的EC₅₀。最右边的图示出,与2B12孵育20小时增加了细胞表面处的总KIR3DL2受体水平,如通过与APC连接的非竞争性抗-KIR3DL2(mAb2)所检测。

[0045] 图1C示出了在37 $^{\circ}$ C下与抗体2B12一起孵育以剂量依赖性方式增加KIR3DL2的表面表达(如通过非竞争性抗-KIR3DL2(mAb2)或通过2B12本身+次级Ab所检测)。在37 $^{\circ}$ C下1h后已经观察到这种增加,并且在24h后似乎达到其最大值。24h后染色是最佳的(就总染色和检测到的Ab结合受体而言)。

[0046] 图2示出了IPH4102的PK模拟模型,这是具有平行一阶和可饱和消除途径的二室模型。

[0047] 图3示出了IPH4102未导致NK细胞的耗竭,如通过在长达50周的时间段内从患者的NK细胞中基线(第1周的第1天)的变化%所示的。

[0048] 图4示出了IPH4102未导致NK细胞的耗竭,如通过在长达50周的时间段内患者的NK细胞(NK细胞/ μ l)的数量所示的。

具体实施方式

[0049] 如本文所用,“一种/一个(a/an)”可以意指一种/一个或多种/一个。如在一个或多个权利要求中所用,当与词“包括(comprising)”结合使用时,这些词“一种/一个(a/an)”可以意指一种/一个或多种/一个。如本文所用,“另一个”可以意指至少第二个或更多个。

[0050] 当使用“包括”时,这可以任选地被“基本上由……组成”或通过“由……组成”代替。

[0051] 每当关于疾病和抗-KIR3DL2结合剂(例如抗体)提及“治疗”时,意指:(a)治疗疾病的方法,所述方法包括以允许治疗疾病的剂量(治疗有效量),例如以如上文和下文所述的剂量(量),给予(对于至少一种治疗)需要这种治疗的温血动物、特别是人抗-KIR3DL2结合剂(例如在药学上可接受的载体材料中)的步骤;(b)使用抗-KIR3DL2结合剂用于治疗疾病,或使用抗-KIR3DL2结合剂用于所述治疗(尤其在一个人)中;(c)一种抗-KIR3DL2结合剂用于制造用于治疗疾病的药物制剂的用途,一种使用抗-KIR3DL2结合剂用于制造用于治疗疾病的药物制剂的方法,该方法包括混合抗-KIR3DL2结合剂与药学上可接受的载体、或一种包含有效剂量的抗-KIR3DL2结合剂(适用于治疗疾病)的药物制剂;或者(d) a)、b)和c)的任何组合,这是根据允许在提交本申请的国家取得专利权的本发明主题。

[0052] 如本文所用的术语“活检样品”被定义为去除组织用于检查如以建立诊断的目的。活组织检查的类型的实例包括通过应用吸取,如通过附接到注射器的针;通过仪器去除组织的片段;通过用适当的仪器去除;通过手术切除例如整个病损;等等。

[0053] 如本文所用,术语“抗体”是指多克隆和单克隆抗体。根据重链中恒定区的类型,抗体被分配到五个主要类别之一: IgA、IgD、IgE、IgG和IgM。其中一些进一步分为亚类或同种型,例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4等。示例性免疫球蛋白(抗体)结构单元包括四聚物。每个四聚体由两对相同的多肽链构成,每对具有一条“轻”链(约25kDa)和一条“重”链(约50kDa-70kDa)。每个链的N端定义了具有约100至110个或更多个氨基酸的一个可变区,主要负责抗原识别。术语可变轻链(V_L)和可变重链(V_H)分别指这些轻链和重链。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别被称为“ α ”、“ δ ”、“ ϵ ”、“ γ ”和“ μ ”。不同类别的免疫球蛋白的亚单元结构和三维构型是熟知的。IgG是本文使用的示例性抗体类别,因为它们是在生理状况下最常见的抗体且在实验室条件下最容易制备。在一个实施例中,抗体是单克隆抗体。提供了人源化的、嵌合的、人的或其他适合人的抗体。“抗体”还包括本文所述的抗体中任一种的任何片段或衍生物。“片段”包括完整抗体的一部分,通常为抗原结合位点或可变区。抗体片段的实例包括Fab、Fab', Fab'-SH、F(ab')₂和Fv片段;双抗体;任何为具有由连续氨基酸残基的未中断序列组成的一级结构的多肽的抗体片段(本文称为“单链抗体片段”或“单链多

肽”) ,包括但不限于(1) 单链Fv分子, (2) 仅含一个轻链可变结构域的单链多肽,或其包含该轻链可变结构域的三个CDR的片段,不含相关的重链部分,以及(3) 仅含一个重链可变区的单链多肽,或其包含该重链可变区的三个CDR的片段,不含相关的轻链部分;以及由抗体片段形成的多特异性(例如双特异性) 抗体。尤其包括纳米抗体、结构域抗体、单结构域抗体或“dAb”。

[0054] 术语“特异地结合至”意指抗体在竞争结合测定中可以结合至结合配偶体,例如KIR3DL2,如使用这些蛋白的重组形式、其中的抗原表位或存在于分离的靶细胞表面上的天然蛋白所评价。用于确定特异性结合的竞争性结合测定和其他方法在下面进一步描述,并且在本领域中是熟知的。

[0055] 当抗体被称为与具体的单克隆抗体竞争时,它意指在使用重组体KIR3DL2分子或表面表达的KIR3DL2分子结合测定中,该抗体与该单克隆抗体竞争。例如,如果测试抗体在结合测定中降低19H12、12B11、10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9与KIR3DL2多肽或表达KIR3DL2的细胞的结合,则该抗体被称为分别与19H12、12B11、10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9“竞争”。

[0056] 如本文所用,术语“亲和力”意指抗体与表位结合的强度。抗体的亲和力通过解离常数Kd(定义为 $[Ab] \times [Ag] / [Ab-Ag]$) 给出,其中 $[Ab-Ag]$ 是抗体-抗原复合物的摩尔浓度, $[Ab]$ 是未结合的抗体的摩尔浓度,并且 $[Ag]$ 是未结合的抗原的摩尔浓度。亲和力常数Ka是由 $1/Kd$ 定义的。用于确定mAb的亲和力的方法可以发现于Harlow等人, *Antibodies: A Laboratory Manual* [抗体:实验室手册], Cold Spring Harbor [冷泉港实验室出版社], 冷泉港实验室, 纽约N.Y., 1988), Coligan等人编著, *Current Protocols in Immunology* [当代免疫学实验手册], Greene Publishing Assoc. and Wiley Interscience [格林出版联盟和威力跨学科], 纽约, (1992, 1993), 以及Muller, *Meth. Enzymol.* [酶学方法] 92:589-601 (1983) 中,将这些文献通过引用完全并入本文。本领域中熟知的用于确定mAb亲和力的一种标准的方法是使用表面等离子体共振 (SPR) 筛选 (如通过用BIAcore™ SPR分析装置分析)。

[0057] 术语“表位”是指抗原决定簇,并且是在抗原上与抗体结合的面积或区域。蛋白质表位可以包括直接参与结合的氨基酸残基连同通过特异性抗原结合的抗体或肽被有效地阻断的氨基酸残基,即,抗体“足迹”内的氨基酸残基。它是可以与例如抗体或受体组合的复杂抗原分子上的最简单形式或最小结构区域。表位可以是线性的或构象性的/结构性的。术语“线性表位”被定义为由在氨基酸的线性序列(一级结构) 上连续的氨基酸残基构成的表位。术语“构象性表位或结构性表位”被定义为由多个氨基酸残基构成的表位,这些氨基酸残基不全是连续性的,并且因此表示了通过分子折叠(二级、三级和/或四级结构) 而彼此邻近的氨基酸线性序列的分离的部分。构象性表位取决于三维结构。因此,术语“构象性”经常与“结构性”可互换地使用。

[0058] 术语“细胞内内化”或“内化”在提及KIR3DL2多肽和/或结合其的抗体时,是指与将分子从细胞的细胞外表面转移到细胞的细胞内表面的过程相关的分子的、生物化学的和细胞的事件。负责分子细胞内内化的过程是熟知的,并且尤其可能涉及以下的内化:细胞外分子(如激素、抗体、和小有机分子);膜相关分子(如细胞表面受体);以及与细胞外分子结合的膜相关分子(例如,与跨膜受体结合的配体或与膜相关分子结合的抗体) 的复合物。因此,“诱导和/或增加细胞内内化”包括其中开始细胞内内化和/或增加细胞内内化的速率和/或

程度的事件。

[0059] 关于表达KIR3DL2的细胞,术语“耗竭(depleting)”、“耗竭(deplete)”或“耗竭(depletion)”意指可以杀死、消除、裂解或诱导此类杀死、消除或裂解的工艺、方法、或组合物,以便负面影响存在于样品中或受试者中的表达KIR3DL2的细胞的数量。例如,细胞的耗竭可以经由ADCC发生。

[0060] 本文使用术语“药剂”来表示化合物、化合物混合物、生物大分子、细胞、或由生物学材料制备的提取物。术语“治疗剂”是指具有生物活性的药剂。

[0061] “人源化”或“人”抗体是指一种抗体,其中一种或多种人免疫球蛋白的恒定和可变框架区与动物免疫球蛋白的结合区例如CDR相融合。这类抗体被设计成保持衍生出这些结合区的非人抗体的结合特异性,但是却要避免对抗非人抗体的免疫反应。此类抗体可以获自转基因小鼠或其他动物,这些动物已被“工程化”以产生响应于抗原激发的特异性人抗体(参见例如,Green等人(1994) *Nature Genet* [自然遗传学] 7:13;Lonberg等人(1994) *Nature* [自然] 368:856;Taylor等人(1994) *Int Immun* [国际免疫学] 6:579,将其全部传授内容通过引用并入本文)。还可以通过遗传学或染色体转染方法、以及噬菌体展示技术来构建完全人抗体,所有这些在本领域内是已知的(参见例如,McCafferty等人(1990) *Nature* [自然] 348:552-553)。人抗体也可以通过体外激活的B细胞产生(参见例如,美国专利号5,567,610和5,229,275,通过引用以其全文并入本文)。

[0062] “嵌合抗体”是一种抗体分子,其中(a)恒定区或其一部份被改变、替换或交换,这样使得抗原结合位点(可变区)被连接至不同的或改变的类别、效应子功能和/或种类的恒定区,或连接至赋予该嵌合抗体新特性的完全不同的分子,例如酶、毒素、激素、生长因子、药物等;或者(b)可变区或其一部份被具有不同的或改变的抗原特异性的可变区改变、替换或交换。

[0063] 术语“Fc结构域”、“Fc部分”、以及“Fc区”是指抗体重链的C-末端片段,例如人 γ (γ)重链的从约氨基酸(aa) 230至约aa 450或其他类型的抗体重链(例如人抗体的 α 、 δ 、 ϵ 和 μ)中的其对应序列、或其天然存在的同种异型。除非另外指明,否则贯穿本披露使用普遍接受的免疫球蛋白卡巴特(Kabat)氨基酸编号(参见Kabat等人(1991) *Sequences of Protein of Immunological Interest* [免疫学上感兴趣的蛋白的序列],第5版,United States Public Health Service [美国公共卫生署],National Institute of Health [美国国立卫生研究院],贝塞斯达,马里兰州)。

[0064] 术语“NK%裂解能力”是指来自健康供体的NK细胞在体外细胞毒性测定中裂解肿瘤细胞(例如HUT78细胞)的能力,如在 ^{51}Cr 释放测定中通过获得的最大肿瘤细胞裂解的百分比(=肿瘤细胞裂解/饱和时最大肿瘤细胞裂解 $\times 100$)测量。采用PBMC和HUT78细胞作为效应细胞和靶细胞的适合测定的实例描述于本文的实例中。关于NK裂解能力的“EC₁₀”(或“EC₆₀”、“EC₈₀”、“EC₉₀”、或“EC₁₀₀”)是指抗-KIR3DL2药剂关于这种NK裂解能力产生其最大响应或效果的10%(或当分别提及“EC₆₀”、“EC₈₀”、“EC₉₀”、或“EC₁₀₀”时的60%、80%、90%或100%)的有效浓度。

[0065] 术语“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”是在本领域中已被充分理解的术语,并且是指细胞介导的反应,其中表达Fc受体(FcR)的非特异性细胞毒性细胞识别靶细胞上的结合抗体并且随后导致该靶细胞溶解。介导ADCC的非特异性细胞毒性细胞包括自然

杀伤(NK)细胞、巨噬细胞、单核细胞、嗜中性粒细胞、以及嗜酸性粒细胞。

[0066] 术语“分离的”、“纯化的”或“生物学纯的”是指基本上或本质上不含在天然状态下发现的通常伴随其的组分的物质。纯度和均质性典型地是使用分析化学技术(例如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱法)来确定的。制剂中存在的主要种类的蛋白基本上是纯化的。

[0067] 术语“多肽”、“肽”以及“蛋白”在本文中可互换地使用,是指氨基酸残基的聚合物。这些术语应用到氨基酸聚合物上,其中一个或多个氨基酸残基是对应的天然发生氨基酸的人工化学模拟物,并且应用到天然发生的氨基酸聚合物以及非天然发生的氨基酸聚合物上。

[0068] 术语“重组”当用于指例如一种细胞、核酸、蛋白或载体时表明该细胞、核酸、蛋白或载体已经通过导入异源核酸或蛋白或者改变天然的核酸或蛋白进行修饰,或者表明该细胞衍生自这样修饰的细胞。因此,例如,这些重组细胞表达在细胞的天然形式(非重组体)中未发现的基因或表达以其他方式异常表达的、低表达的或根本不表达的天然基因。

[0069] 术语“修饰”在提及氨基酸序列(例如,“氨基酸修饰”)时意指多肽序列中的氨基酸取代、插入、和/或缺失。“修饰”或“氨基酸修饰”意指多肽序列中的氨基酸取代、插入、和/或缺失。本文中的“氨基酸取代”或“取代”意指在蛋白质序列中的给定位置处的氨基酸被另一个氨基酸替换。例如,取代P14S是指亲本多肽的变体,其中位置14处的脯氨酸被丝氨酸替换。多肽的“变体”是指具有与参考多肽(通常为天然或“亲本”多肽)基本相同的氨基酸序列的多肽。多肽变体可以在天然氨基酸序列内的某些位置处具有一个或多个氨基酸取代、缺失和/或插入。

[0070] 在本文上下文中,“结合”多肽的或表位的术语抗体指定结合所述具有特异性和/或亲和力决定簇的抗体。

[0071] 术语“同一性”或“相同的”当用于两种或更多种多肽的序列之间的关系时,是指多肽之间的序列关联程度,如通过两个或更多个氨基酸残基链之间匹配的数量所确定。“同一性”使用由具体数学模型或计算机程序(即,“算法”)解决的空位比对(如果有的话)测量两个或更多个序列中较短序列之间的相同匹配的百分比。相关多肽的同一性可以通过已知方法容易地计算出。此类方法包括但不限于在以下文献中描述的那些:Computational Molecular Biology[计算分子生物学],Lesk,A.M.,编辑,Oxford University Press[牛津大学出版社],纽约,1988;Biocomputing:Informatics and Genome Projects[生物计算:信息学和基因组项目],Smith,D.W.,编辑,Academic Press[学术出版社],纽约,1993;Computer Analysis of Sequence Data[序列数据的计算机分析],第1部分,Griffin,A.M.,和Griffin,H.G.,编辑,Humana Press[胡玛纳出版社],新泽西州,1994;Sequence Analysis in Molecular Biology[分子生物学的序列分析],von Heinje,G.,Academic Press[学术出版社],1987;Sequence Analysis Primer[序列分析引物],Gribskov,M.和Devereux,J.,编辑,M.Stockton Press[斯托克顿出版社],纽约,1991;以及Carillo等人,SIAM J.Applied Math.[工业和应用数学学会应用数学杂志]48,1073(1988)。

[0072] 用于确定同一性的方法被设计为在测试的序列之间给出最大的匹配。确定同一性的方法描述于公开地可获得的计算机程序中。用于确定两个序列之间的同一性的计算机程序方法包括GCG程序包,该GCG程序包包括GAP(Devereux等人,Nucl.Acid.Res.[核酸研究])

12,387 (1984);威斯康星州麦迪逊的威斯康星大学 (University of Wisconsin) 的 Genetics Computer Group 的 BLASTP、BLASTN、和 FASTA (Altschul 等人, J. Mol. Biol. [分子生物学杂志] 215, 403-410 (1990))。BLASTX 程序可以公开地获自美国国家生物技术信息中心 (NCBI) 以及其他来源 (BLAST Manual [BLAST 手册], Altschul 等人 NCB/NLM/NIH 贝塞斯达, 马里兰州 20894; Altschul 等人, 同上)。公知的 Smith Waterman 算法也可以用来确定同一性。

[0073] 疾病的治疗

[0074] 本文披露的抗-KIR3DL2 药剂和给予方案可以有利地用于治疗 KIR3DL2 表达 T 细胞淋巴瘤 (特别是 CTCL)、任选地作为一线治疗、任选塞扎里综合征 (SS)、任选地蕈样真菌病 (MF)、任选地转化的 MF、任选地晚期疾病 (例如 IIB、III、IIIA、IIIB、IVA1、IVA2 或 IVB 期)、任选地伴有外周血受累的疾病、任选地在外周血中具有可检测或高水平的表达 KIR3DL2 的恶性细胞的疾病、任选地惰性或早期疾病、任选地 IA、IB 或 IIA 期疾病、任选地没有外周血液受累的疾病、任选地在外周血中没有可检测或具有低水平的表达 KIR3DL2 的恶性细胞的疾病。在另一方面, 提供了一种在患有 CTCL 的个体中预防淋巴瘤的方法。在另一方面, 提供了一种在患有 CTCL 的个体中降低疾病进展风险、降低已经历起始的细胞群中淋巴瘤风险的方法。在另一方面, 提供了一种使受试者准备好或使受试者有资格进行造血干细胞或骨髓移植的方法。

[0075] 皮肤 T 细胞淋巴瘤 (CTCL) (参见下图) 是一组淋巴细胞增殖性障碍, 其特征不在于肿瘤性 T 淋巴细胞定位于皮肤。总的来说, CTCL 被归类为一种非霍奇金淋巴瘤 (NHL)。世界卫生组织-欧洲癌症研究和治疗组织 (WHO-EORTC) 对 CTCL 的分类报道于 Willemze 等人 (2005) Blood [血液] 105: 3768-3785 中。WHO-EORTC 将 CTCL 分为具有惰性临床行为和具有侵袭性亚型的那些。第三类是前体血液肿瘤, 其不是 T 细胞淋巴瘤 (CD4+/CD56+ 血液皮肤肿瘤、急性自然杀伤 (NK)-细胞淋巴瘤或 B 细胞衍生的原发性皮肤肿瘤)。可以具有惰性临床行为的 CTCL 包括蕈样真菌病 (MF) 及其变体、原发性皮肤 CD30+ 淋巴细胞增殖性障碍 (例如原发性皮肤间变性大细胞淋巴瘤、淋巴瘤性丘疹病)、皮下脂膜炎样 T 细胞淋巴瘤 (临时) 和原发性皮肤 CD4+ 小/中型多形性 T 细胞淋巴瘤 (临时)。具有侵袭性临床行为的 CTCL 包括塞扎里综合征 (SS)、成人 T 细胞白血病/淋巴瘤、结外 NK/T 细胞淋巴瘤、鼻型、原发性皮肤外周 T 细胞淋巴瘤、未指明的原发性皮肤侵袭性表皮性 CD8+ T 细胞淋巴瘤 (临时) 和皮肤 γ/δ 阳性 T 细胞淋巴瘤 (临时)。

[0076] 最常见的 CTCL 是 MF 和 SS。其特征在例如 Willemze 等人 (2005) Blood [血液] 105: 3768-3785 中审查, 将其披露内容通过引用并入本文。在 MF 的大多数情况下, 由于其临床特征、疾病史、以及组织形态学和细胞形态学发现, 因此达到了诊断。区分 CTCL 和炎性皮肤病的另外的诊断标准是通过分子测定 (例如, Southern 印迹、聚合酶链式反应 (PCR)) 证明皮肤活检标本中的显性 T 细胞克隆。还可以考虑遗传测试。经典蕈样真菌病分为三个阶段: (1) 斑点 (萎缩性或非萎缩性): 非特异性皮炎、下躯干和臀部上的斑点; 最小/无瘙痒; (2) 斑块: 强烈瘙痒斑块、淋巴结病和 (3) 肿瘤: 容易溃烂。塞扎里综合征是由红皮病和白血病定义的。体征和症状包括水肿性皮肤、淋巴结病、手掌和/或足底角化过度、脱发、甲营养不良、外翻和肝脾肿大。对于塞扎里综合征的诊断, 标准典型地包括通过分子或细胞遗传学方法显示的外周血中的绝对塞扎里细胞计数、免疫表型异常、T 细胞抗原的丧失和/或 T 细胞克隆。

[0077] 根据TNM分类,并酌情根据外周血受累,CTCL阶段包括I、II、III和IV。伴有蕈样真菌病或塞扎里综合征(MF/SS)细胞的外周血受累与更晚期的皮肤阶段、淋巴结和内脏受累、以及生存期缩短相关。MF和SS具有由国际皮肤淋巴瘤协会(ISCL)和欧洲癌症研究和治疗组织(EORTC)提出的正式分期系统。参见Olson等人,(2007) Blood.[血液]110(6):1713-1722;和Agar等人(2010) J.Clin.Oncol.[临床肿瘤学杂志]28(31):4730-4739,将其披露内容通过引用并入本文。在SS和MF中,IV期(IVA1、IVA2和IVB)可以包括B2外周血受累(高血肿瘤负荷:≥1,000/ μ L具有阳性克隆的塞扎里细胞)。SS和MF阶段包括I(IA和IB)、II(IIA和IIB)、III(III、IIIA和IIIB)和IV(IVA1、IVA2和IVB)。

[0078] 通过裂解至少少量的循环细胞(例如在疾病的细胞外表现中,与总体上的恶性细胞相比),通过激活循环中有限数量的效应细胞,和/或通过对皮肤损伤中的有限数量的恶性细胞诱导抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP),设计用于实现效应细胞介导的恶性KIR3DL2+细胞在循环中的裂解的治疗可以产生导致消除恶性细胞和皮肤损伤中的一般疾病改善的抗肿瘤响应。通过重复给药KIR3DL2-结合抗体,经由设计用于维持循环中特定量的抗-KIR3DL2结合剂的不同治疗方案有效地提供NK裂解能力的EC₁₀来获得响应。虽然给予方案改善了具有低或无血液受累患者的皮肤损伤,但重复给予方案也改善了具有高血液受累患者的皮肤损伤。

[0079] 在诊断CTCL后,可以用抗-KIR3DL2结合剂治疗受试者。无论肿瘤负荷如何,该治疗均可以用于消除恶性细胞,同时维持健康的NK和T细胞。因此,该治疗与随后的BMT或HSCT相容。在一个实施例中,本披露提供了抗-KIR3DL2结合剂作为一线疗法用于治疗患有CTCL的受试者的用途。如本文所用的术语“一线疗法”是指用于治疗CTCL给予的第一类全身药物疗法。这可以是诊断后最初提供的单一药剂、组合或维持疗法。

[0080] 在一个方面,提供了用于治疗个体中CTCL的方法,该方法包括给予个体抗-KIR3DL2结合剂,而无需事先测试来自血液样品的恶性细胞上KIR3DL2表达的步骤。

[0081] 在一个方面,提供了用于治疗个体中CTCL的方法,该方法包括给予个体抗-KIR3DL2结合剂,而无需事先测试来自皮肤活检样品的恶性细胞上KIR3DL2表达的步骤。

[0082] 在一个方面,提供了用于治疗在循环中缺乏可检测的表达KIR3DL2的恶性细胞(例如表达KIR3DL2的塞扎里细胞)的个体中的CTCL的方法,该方法包括给予个体抗-KIR3DL2结合剂。在一个方面,提供了用于治疗在循环中具有低水平可检测的表达KIR3DL2的恶性细胞(例如表达KIR3DL2的塞扎里细胞)的个体中的CTCL的方法,该方法包括给予个体抗-KIR3DL2结合剂。

[0083] 在一个方面,提供了用于治疗患有少于B2期外周血受累的个体中的CTCL的方法,该方法包括给予个体抗-KIR3DL2结合剂。任选地,该个体具有少于1,000/ μ L塞扎里细胞的血液-肿瘤负荷,和/或没有阳性克隆。

[0084] 在一个方面,提供了用于治疗惰性CTCL的方法,该方法包括给予个体抗-KIR3DL2结合剂。

[0085] 在实施例中,提供了一种治疗CTCL的方法,该方法包括:(a)评价患有CTCL的个体中CTCL的阶段和/或疾病预后;和(b)如果该个体患有II或III期疾病,任选IIB、IIIA或IIIB,则给予该个体抗-KIR3DL2结合剂。

[0086] 在一个方面,提供了用于治疗I期CTLC的方法,该方法包括给予个体抗-KIR3DL2结

合剂。在一个方面,提供了用于治疗II期CTLC的方法,该方法包括给予个体抗-KIR3DL2结合剂。在一个方面,提供了用于治疗III期CTLC的方法,该方法包括给予个体抗-KIR3DL2结合剂。

[0087] 在一个方面,提供了用于治疗患有少于B2期外周血受累的个体中的CTCL的方法,该方法包括给予个体抗-KIR3DL2结合剂。任选地,该个体缺乏或具有低血液肿瘤负荷,任选地其中该个体具有B0(没有显著的血液受累,例如 $\leq 5\%$ 的外周血淋巴细胞是非典型(塞扎里)细胞)或B1(低血液-肿瘤负荷,例如 $> 5\%$ 的外周血淋巴细胞是非典型(塞扎里)细胞,不符合B2的标准)外周血受累。

[0088] 在任何上述的一个方面,患有CTCL的个体具有皮肤损伤,任选显著或晚期皮肤病,任选T2(覆盖 $\geq 10\%$ 皮肤表面的斑点、丘疹、或斑块,任选进一步T2a(仅斑点)或T2b(斑块±斑点)、T3(至少一个肿瘤($\geq 1\text{cm}$ 直径)或T4期覆盖 $\geq 80\%$ 体表面积的皮肤受累红斑)。在一个实施例中,该个体具有多重和/或高皮肤肿瘤负荷。在一个实施例中,该个体具有一个或多个直径大于 1cm 的皮肤肿瘤。

[0089] 在任何上述的一个方面,患有CTCL的个体具有覆盖 $\geq 10\%$ 皮肤表面的斑点、丘疹、或斑块。在任何上述的一个方面,患有CTCL的个体具有至少一个直径 $\geq 1\text{cm}$ 的肿瘤。在任何上述的一个方面,患有CTCL的个体具有覆盖 $\geq 80\%$ 体表面积的红斑。

[0090] 在实施例中,提供了一种治疗CTCL的方法,该方法包括:(a)评价患有CTCL的个体中CTCL的阶段和/或疾病预后;和(b)如果该个体患有IV期疾病,任选IVA1或IVA2疾病,任选IVB疾病,则给予该个体抗-KIR3DL2结合剂。

[0091] 应当理解,本披露的治疗方法可以包括或不包括在治疗之前表征CTCL的步骤。在实施例中,提供了一种治疗CTCL的方法,该方法包括:(a)确定个体是否患有包含CTCL皮肤表现(例如红皮病、皮肤损伤或肿瘤)的CTCL,任选以表达病原性KIR3DL2的细胞为特征的皮肤表现;和(b)如果该个体具有CTCL的皮肤表现,任选以表达病原性KIR3DL2的细胞为特征的皮肤表现,则给予该个体抗-KIR3DL2结合剂。任选地,确定个体是否患有包含CTCL皮肤表现的CTCL的步骤包括表征皮肤损伤的程度;任选地,如果该个体患有斑块和/或溃疡性肿瘤,则给予该个体抗-KIR3DL2结合剂。任选地,确定个体是否患有包含CTCL皮肤表现的CTCL的步骤包括表征皮肤病的阶段(例如T2、T3、或T4疾病)。任选地,如果个体具有CTCL的晚期皮肤表现(例如T2、T3、或T4疾病),则给予该个体抗-KIR3DL2结合剂。

[0092] 在实施例中,提供了一种治疗CTCL的方法,该方法包括:(a)评价患有CTCL的个体中CTCL的阶段和/或疾病预后;和(b)如果该个体患有惰性CTCL,则给予该个体抗-KIR3DL2结合剂。

[0093] 应当理解,本披露的治疗方法可以包括或不包括在治疗之前表征肿瘤细胞的KIR3DL2表达的步骤。在实施例中,提供了一种治疗CTCL的方法,该方法包括:(a)确定个体中CTCL的皮肤表现是否包含病原性表达KIR3DL2的细胞(例如红皮病和/或皮肤损伤中表达KIR3DL2的细胞);和(b)如果该个体具有包含病原性表达KIR3DL2的细胞的CTCL的皮肤表现,则给予该个体抗-KIR3DL2结合剂。

[0094] 应当理解,本披露的治疗方法可以包括或不包括在治疗之前表征肿瘤细胞的KIR3DL2表达的步骤。在实施例中,提供了一种治疗CTCL的方法,该方法包括:(a)从个体获得血液样品或活检样品(例如皮肤活检样品)并确定该样品是否包含病原性表达KIR3DL2的

细胞(KIR3DL2+肿瘤细胞);和(b)如果该样品包含病原性表达KIR3DL2的细胞,则给予该个体抗-KIR3DL2结合剂。在另一个实施例中,提供了一种治疗CTCL的方法,该方法包括:(a)从个体获得血液样品并确定该样品是否包含病原性表达KIR3DL2的细胞(KIR3DL2+肿瘤细胞);和(b)如果该样品不包含可检测的表达病原性KIR3DL2的细胞,则给予该个体抗-KIR3DL2结合剂。

[0095] 任选地,该方法进一步包括确定疾病细胞是否还在其表面处表达异常淋巴细胞的其他标记物,例如确定细胞是否是CD4、CD30、CD3、CD8细胞。

[0096] 在一些方面,抗-KIR3DL2结合剂可以给予在CTCL治疗后处于缓解期的个体或对第一(一种或多种)抗-CTCL治疗(即使用非KIR3DL2)具有阳性响应的个体,任选地具有低血液-肿瘤负荷。

[0097] 在一些方面,抗-KIR3DL2结合剂可以给予具有差疾病预后和/或复发,对使用第一(一种或多种)治疗剂的疗法具有抗性或无响应的个体。

[0098] 本文提供的治疗方案可以用于治疗具有低或无血液肿瘤负荷(和/或无可检测的KIR3DL2+肿瘤细胞)的CTCL,或具有血液受累或具有高血液肿瘤负荷(和/或具有可检测的KIR3DL2+肿瘤细胞)的CTCL。然而,应当理解,这些方案还可以分别用于一个或另一个亚组。

[0099] 在一个实施例中,任选地以低剂量给予抗-KIR3DL2结合剂,任选地其量被设计为低于将在所有患者(包括具有高血液和皮肤肿瘤负荷的那些患者)的皮肤病(例如红皮病、皮肤损伤或肿瘤)中维持肿瘤细胞的完全受体占据的量;这样的剂量可以具有以下有利特性:通过耗竭循环中少量表达KIR3DL2的肿瘤细胞(例如,低于检测限)(例如从皮肤肿瘤进入循环的肿瘤细胞)产生更广泛的抗肿瘤响应,和/或通过诱导皮肤肿瘤中的抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)产生更广泛的抗肿瘤响应。在一个实施例中,重复抗-KIR3DL2结合剂的剂量,具体地,该治疗包括第一、第二、和任选地进一步给予抗-KIR3DL2结合剂。任选地,选择给予时间表(例如两次连续给予之间的时间)和剂量以便维持抗-KIR3DL2结合剂的谷水平,其提供血液中的浓度(例如,血清),其提供血液(例如血清)中至少对应于NK裂解能力的EC₁₀、EC₆₀、EC₈₀、EC₉₀、或EC₁₀₀的浓度。

[0100] 在一些实施例中,抗-KIR3DL2药剂以一定剂量和频率给予,以便获得和/或维持血液(例如血清)中至少对应于NK裂解能力的EC₁₀,任选至少或至少约EC₆₀、EC₈₀、EC₉₀、或EC₁₀₀的浓度。

[0101] 任选地,在本文的任何实施例中,当每周给予时,抗-KIR3DL2药剂的量和频率小于提供血液(例如血清)中对应于由25mg/kg、20mg/kg、15mg/kg、10mg/kg、7.5mg/kg或6mg/kg体重提供的浓度的量和频率。任选地,在本文的任何实施例中,给予的抗-KIR3DL2药剂的量或剂量可以指定为小于25mg/kg、20mg/kg或15mg/kg体重。

[0102] 在本文任何方面的另一个实施例中,治疗方法是减少或预防CTCL进展、维持CTCL缓解、或预防CTCL复发或预防CTCL中淋巴瘤复发的方法。在本文任何方面的另一个实施例中,治疗方法是增加相关时间段内存活可能性的方法。在本文任何方面的另一个实施例中,治疗方法是改善个体生活质量的方法。在本文任何方面的另一个实施例中,治疗方法是减少个体中循环淋巴瘤细胞(例如塞扎里细胞)数量的方法。在本文任何方面的另一个实施例中,治疗方法是降低个体中血液肿瘤负荷的方法。

[0103] 在本文任何方面的另一个实施例中,治疗方法是预防早期CTCL进展至CTCL更晚期

的方法。在本文任何方面的另一个实施例中,治疗方法是预防早期I、II或III CTCL进展至IV期CTCL的方法。在本文任何方面的另一个实施例中,治疗方法是预防没有血液肿瘤或具有低血液肿瘤负荷的CTCL进展至具有血液肿瘤负荷或高血液肿瘤负荷的CTCL的方法。在本文任何方面的另一个实施例中,治疗方法是预防具有B0或B1血液肿瘤负荷的CTCL进展至具有B2血液肿瘤负荷的CTCL的方法。

[0104] 向受试者递送抗-KIR3DL2药剂(例如抗体或其片段)(通过作为分离的蛋白质结合剂直接给予,通过作为细胞(如在其表面处表达抗-KIR3DL2结合蛋白的CAR效应细胞)给予,或通过从其核酸(如来自包含一种或多种编码抗-KIR3DL2抗体的核酸序列的痘病毒基因转移载体)表达蛋白质结合剂)并实施本文的其他方法可以用于减少、治疗、预防、或以其他方式改善如本文披露的CTCL的任何适合方面。这些治疗可以胃肠外(例如静脉内)给予,并且可以特别用于减少和/或改善皮肤损伤中异常淋巴细胞的增殖、恢复正常皮肤结构和强烈减少病源性T细胞。

[0105] 在本文的某些实施例中,将KIR3DL2结合剂给予个体持续至少一个给予周期,其中以如下量给予该药剂至少两次,该量提供血液(例如血清)中至少对应于NK裂解能力的EC₁₀、EC₆₀、EC₈₀、EC₉₀、或EC₁₀₀的浓度。任选地,给予该药剂,其量在该药剂的两次连续给予之间有效实现和/或维持提供血液(例如血清)中至少对应于NK裂解能力的EC₁₀、EC₆₀、EC₈₀、EC₉₀、或EC₁₀₀的浓度的浓度。任选地,给予周期包括至少第一和第二(和任选第三、第四、第五、第六、第七和/或第八或进一步)给予该药剂。任选地,静脉内给予该药剂。任选地,该治疗具有至少10周、2个月、3个月、4个月或6个月的持续时间。

[0106] 在本文任何实施例的一个方面,将KIR3DL2结合剂给予个体,其量提供(例如实现和/或维持)血液(例如血清)中至少为NK裂解能力的EC₁₀、EC₆₀、EC₈₀、EC₉₀、或EC₁₀₀的浓度。

[0107] 在本文任何实施例的一个方面,将KIR3DL2结合剂给予个体,其量维持血液(例如血清)中对应于NK裂解能力的EC₁₀与EC₇₀之间、EC₁₀与EC₈₀之间、EC₁₀与EC₉₀之间、或EC₆₀与EC₁₀₀之间的浓度持续至少1周、至少2周、至少1个月或至少2个月。

[0108] 在本文任何实施例的一个方面,将KIR3DL2结合剂给予个体,其量少于在该药剂的两次连续给予之间维持皮肤(例如皮肤损伤或肿瘤)中的CTCL细胞上基本上完全KIR3DL2占据的量。在本文任何实施例的一个方面,将KIR3DL2结合剂给予个体,其量少于在该药剂的两次连续给予之间维持皮肤(例如皮肤损伤或肿瘤)中至少对应于NK裂解能力的EC₅₀、EC₇₀、EC₈₀、EC₉₀、或EC₁₀₀的浓度的量。在本文任何实施例的一个方面,人IgG同种型的抗-KIR3DL2抗体,任选地是一种抗体,其特征针对于来自健康志愿者的PBMC对HuT78肿瘤的裂解的⁵¹Cr-释放测定中的EC₅₀小于100ng/ml、任选在1与100ng/ml之间、任选在1与50ng/ml之间、任选约50ng/ml,并且给予个体,其量(例如每周给予)小于15、20或30mg/kg体重。

[0109] 在本文任何实施例的一个方面,KIR3DL2结合剂包含人IgG同种型的抗-KIR3DL2抗体,任选地是一种抗体,其特征针对于来自健康志愿者的PBMC对HuT78肿瘤的裂解的⁵¹Cr-释放测定中的EC₅₀小于100ng/ml、任选在1与100ng/ml之间、任选在1与50ng/ml之间、任选约50ng/ml,并且给予个体,其量有效实现(和/或维持指定的时间段或在两次连续给予之间)至少0.1μg/ml(或任选至少0.4、1、2或10μg/mL)的抗-KIR3DL2抗体血液(血清)浓度。在一个实施例中,每周一次、每两周一次、每三周一次、每月一次,任选地每月一次至每两个月一次,静脉内施给予该抗体。在一个实施例中,将该抗体给予个体,其量在两次连续给予之间

有效维持至少7ng/ml (例如10%裂解能力)、任选至少70ng/ml (例如60%裂解能力)、任选至少0.4μg/ml (例如80%裂解能力)、任选至少2μg/ml (例如90%裂解能力)、任选至少10μg/ml (例如100%裂解能力)、或任选至少20μg/ml、50μg/ml或80μg/ml的抗-KIR3DL2抗体的血液(血清)浓度。

[0110] 在本文任何实施例的一个方面,KIR3DL2结合剂包含人IgG同种型的抗-KIR3DL2抗体并且给予个体,其量有效维持(指定的时间段或在两次连续给予之间)0.1-0.5μg/ml之间、任选0.4-2μg/ml之间、任选2-7μg/ml之间、任选2-10μg/ml之间、任选2-50μg/ml之间、任选10与20μg/ml之间、任选20与50μg/ml之间、或任选50与100μg/ml之间的抗-KIR3DL2抗体的最小(谷)血液(血清)浓度。在一个实施例中,每月一次,任选地每月一次至每两个月一次,静脉内给予该抗体。

[0111] 可以基于特定抗体的特性确定实现特定血液浓度所需的抗体量。在本文任何实施例的一个方面,KIR3DL2结合剂包含人IgG同种型的抗-KIR3DL2抗体,任选地是一种抗体,其特征在于针对来自健康志愿者的PBMC对HuT78肿瘤的裂解的⁵¹Cr-释放测定中的EC₅₀与本文披露的抗-KIR3DL2抗体的EC₅₀相当(例如,具有低于本文披露的抗体(例如2B12抗体)的EC₅₀或在其1-log或0.5-log内的EC₅₀,任选小于100ng/ml、任选1与100ng/ml之间、任选1与50ng/ml之间、任选约50ng/ml的EC₅₀。在本文任何实施例的一个方面,将KIR3DL2结合剂静脉内给予个体,其剂量在0.1-0.75mg/kg之间、任选0.2-0.75mg/kg、任选0.4-1mg/kg、任选0.75-1.5mg/kg、任选约0.01mg/kg、任选约0.2mg/kg、任选约0.75mg/kg、或任选约1.5mg/kg体重。在一个实施例中,每月一次,任选地每月一次至每两个月一次,静脉内给予该抗体,其剂量在0.1-0.75mg/kg之间、任选0.2-0.75mg/kg、任选0.4-1mg/kg、任选0.75-1.5mg/kg、任选约0.01mg/kg、任选约0.2mg/kg、任选约0.75mg/kg、任选约1mg/kg、或任选约1.5mg/kg体重。

[0112] 在本文任何实施例的一个方面,将KIR3DL2结合剂静脉内给予个体,其剂量在0.75与10mg/kg之间、任选0.75-1.5mg/kg之间、任选1-3mg/kg之间、任选1.5-3mg/kg、任选3-6mg/kg、任选6-10mg/kg、任选约1mg/kg、任选约1.5mg/kg、任选约3mg/kg、任选约6mg/kg、或任选约10mg/kg体重。在一个实施例中,每周一次(任选地每2周一次)、或每周一次至每月(或每4周)一次,静脉内给予该抗体,其剂量在1-3mg/kg之间、任选1.5-3mg/kg、任选3-6mg/kg、任选1.5-8mg/kg、任选6-10mg/kg、任选约1mg/kg、任选约1.5mg/kg、任选约3mg/kg、任选约4mg/kg、任选约6mg/kg、任选少于10mg/kg体重、或任选约10mg/kg体重。

[0113] 在本文任何实施例的一个方面,将KIR3DL2结合剂静脉内给予个体,其剂量在1-3mg/kg之间、任选1.5-3mg/kg、任选3-6mg/kg、任选6-10mg/kg、任选约1mg/kg、任选约1.5mg/kg、任选约3mg/kg、任选约6mg/kg、或任选约10mg/kg体重。在一个实施例中,每月一次至每两个月一次,静脉内给予该抗体,其剂量在1-3mg/kg之间、任选1.5-3mg/kg、任选3-6mg/kg、任选6-10mg/kg、任选约1mg/kg、任选约1.5mg/kg、任选约3mg/kg、任选约6mg/kg、任选少于约10mg/kg体重、或任选约10mg/kg体重。

[0114] 在任何实施例中,mg/kg剂量可以表示为使用例如体重为65kg或75kg的任何剂量的固定剂量当量,例如10mg/kg的固定剂量当量可以定义为750mg。

[0115] 在一个实施例中,提供了治疗个体(例如患有如本文所述的CTCL的个体)中CTCL的方法,该方法包括给予个体KIR3DL2结合剂持续至少一个给予周期,其中以如下量给予该药剂至少两次,该量提供血液(例如血清)中至少为NK裂解能力的EC₁₀、EC₆₀、EC₈₀、EC₉₀、或EC₁₀₀

的浓度。任选地,给予该药剂,其量在该药剂的两次连续给予之间有效实现和/或维持提供血液(例如血清)中至少为NK裂解能力的EC₁₀、EC₆₀、EC₈₀、EC₉₀、或EC₁₀₀的浓度的浓度。任选地,给予周期包括至少第一和第二(和任选第三、第四、第五、第六、第七和/或第八或进一步)给予该药剂。任选地,静脉内给予该药剂。

[0116] 任选地,治疗方案可以包括诱导周期。例如,用于人IgG同种型的抗-KIR3DL2抗体(任选地是一种抗体,其特征针对于来自健康志愿者的PBMC对HuT78肿瘤的裂解的⁵¹Cr-释放测定中的EC₅₀与本文披露的抗-KIR3DL2抗体的EC₅₀相当(例如,具有低于本文披露的2B12抗体的EC₅₀或在其1-log或0.5-log内的EC₅₀;任选地是一种抗体,其特征针对于来自健康志愿者的PBMC对HuT78肿瘤的裂解的⁵¹Cr-释放测定中的EC₅₀小于100ng/ml、任选1与100ng/ml之间、任选1与50ng/ml之间、任选约50ng/ml)的方案可以包括:

[0117] (a) 诱导治疗周期,其包括多次给予该抗体,其中将该抗体静脉内给予个体,其量有效维持(指定的时间段或在两次连续给予之间)至少50、80、90、100、200或300μg/ml、任选50与200μg/ml之间、任选50与100μg/ml之间的抗-KIR3DL2抗体的最小(谷)血液(血清)浓度,随后是:

[0118] (b) 治疗周期,其包括多次给予该抗体,其中将该抗体静脉内给予该个体,其量有效维持(指定的时间段或在两次连续给予之间)少于100μg/ml、任选少于50μg/ml、任选至少0.1-0.5μg/ml、任选0.4-2μg/ml之间、任选2-7μg/ml之间、任选2-10μg/ml之间、任选2-50μg/ml之间、任选10与20μg/ml之间、任选20与50μg/ml之间的抗-KIR3DL2抗体的最小(谷)血液(血清)浓度。在一个实施例中,在治疗周期(b)中给予的量与在治疗周期(a)中给予的量相同,但给予频率较少。

[0119] 在针对人IgG同种型的抗-KIR3DL2抗体的另一个示例性治疗方案中,该治疗包括:

[0120] (a) 诱导治疗周期,其包括多次(例如至少2、4、8、或10次)给予该抗体,其中将该抗体静脉内给予个体,其剂量在1-20mg/kg之间、任选1-10mg/kg、任选1-3mg/kg、任选1.5-3mg/kg、任选3-6mg/kg、任选6-10mg/kg、任选约1mg/kg、任选约1.5mg/kg、任选约3mg/kg、任选约6mg/kg、或任选约10mg/kg体重,其频率为每月约2、3或4次,任选每周一次,随后是:

[0121] (b) 治疗周期(例如维持周期),其包括多次(例如至少2、4、8、或10次)给予该抗体,其中将该抗体静脉内给予该个体,其剂量在1-20mg/kg之间、任选1-10mg/kg、任选1-3mg/kg、任选1.5-3mg/kg、任选3-6mg/kg、任选6-10mg/kg、任选约1mg/kg、任选约1.5mg/kg、任选约3mg/kg、任选约6mg/kg、或任选约10mg/kg体重,其频率为每1-3个月约一次,任选每月约一次。在一个实施例中,在治疗周期(b)中给予的剂量(例如1、1.5、3、6或10mg/kg)与在治疗周期(a)中给予的剂量相同。

[0122] 在一个实施例中,不导致健康NK和/或T细胞耗竭的常见治疗方案(例如相同的给予剂量和相同的给予频率)可以有利地在个体中使用而不考虑初始的肿瘤负荷和/或疾病阶段,其中该常见治疗方案之前是其中抗-KIR3DL2抗体以更高的给予频率(任选地,其中该常见治疗方案和诱导方案中每次给予抗体的剂量是相同的)给予个体(例如具有高肿瘤负荷的个体)的诱导方案或负荷时间段。

[0123] 在一个实施例中,提供了治疗患有癌症(例如实体瘤)的个体的方法,该方法包括给予个体人IgG同种型的抗-KIR3DL2抗体,持续至少一个给予周期,其中该方法包括:

[0124] a. 诱导时间段(或周期),其中以多次连续静脉内给予来给予抗体,其剂量在0.75

与10mg/kg体重之间,其频率为每月2-4次给予(例如每周一次给予),和

[0125] b.维持时间段(或周期),其中以多次连续静脉内给予来给予该抗体,其剂量在0.75与10mg/kg体重之间,其频率为每一个或两个月一次给予(例如每周一次给予)。在一个实施例中,维持时间段内的第一次给予在最后剂量的负荷时间段后不超过一个月发生。在一个实施例中,(a)的诱导周期中每次给予的剂量和(b)的维持时间段中每次给予的剂量是相同的(例如在诱导周期和维持时间段二者中均使用0.75mg/kg、1.5mg/kg、6mg/kg或10mg/kg)。

[0126] 在包括诱导周期或时间段的任何治疗的一个实施例中,诱导时间段包括4、5、6、7、8或更多次给予。在一个实施例中,以下(例如维持)时间段包括至少2、3、4、5、6、7或8次给予。在一个实施例中,将该抗体在负荷时间段和维持时间段二者中以相同剂量给予。在一个实施例中,诱导时间段和维持时间段各自包括以0.75mg/kg体重的剂量给予该抗体。在一个实施例中,诱导时间段和维持时间段各自包括以1.5mg/kg体重的剂量给予该抗体。在一个实施例中,诱导时间段和维持时间段各自包括以3mg/kg体重的剂量给予该抗体。在一个实施例中,诱导时间段和维持时间段各自包括以6mg/kg体重的剂量给予该抗体。在一个实施例中,诱导时间段和维持时间段各自包括以10mg/kg体重的剂量给予该抗体。在一个实施例中,该抗体包含重链可变区,其包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列。在一个实施例中,该抗体包含重链可变区,其包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列;和轻链可变区,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

[0127] 任选地,本披露的治疗不引起表达KIR3DL2的健康免疫细胞(例如NK细胞、CD8T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞)的耗竭。任选地,药剂的量是通过耗竭循环中表达KIR3DL2的肿瘤细胞(例如,此类细胞很少或低于检测限,例如在具有低/无血液肿瘤负荷的个体中)(例如从皮肤损伤进入循环的肿瘤细胞)而有效产生更广泛的抗肿瘤响应的量。任选地,药剂的量是通过诱导皮肤损伤中的抗体依赖性细胞吞噬作用(ADCP)而有效产生更广泛的抗肿瘤响应的量。

[0128] 在一个方面,本文的任何治疗方案均用于治疗患有CTCL的个体,其中该治疗方案(例如相同剂量的抗-KIR3DL2药剂和给予频率)用于患有SS的个体和患有MF的个体。

[0129] 在一个方面,本文的任何治疗方案均用于治疗患有CTCL的个体,其中该治疗方案(例如相同剂量的抗-KIR3DL2药剂和给予频率)用于患有惰性疾病的个体和患有侵袭性疾病的个体。

[0130] 在一个方面,本文的任何治疗方案均用于治疗患有CTCL的个体,其中该治疗方案(例如相同剂量的抗-KIR3DL2药剂和给予频率)用于在循环中缺乏可检测的表达KIR3DL2的恶性细胞(例如表达KIR3DL2的塞扎里细胞)的个体,以及在循环中具有可检测的表达KIR3DL2的恶性细胞(例如表达KIR3DL2的塞扎里细胞)的个体。

[0131] 在一个方面,本文的任何治疗方案均用于治疗患有CTCL的个体,其中该治疗方案(例如相同剂量的抗-KIR3DL2药剂和给予频率)用于在循环中具有低数量可检测的表达KIR3DL2的恶性细胞(例如表达KIR3DL2的塞扎里细胞)的个体,以及在循环中具有高数量可检测的表达KIR3DL2的恶性细胞(例如表达KIR3DL2的塞扎里细胞)的个体。

[0132] 在一个方面,本文的任何治疗方案均用于治疗患有CTCL的个体,其中该治疗方案(例如相同剂量的抗-KIR3DL2药剂和给予频率)用于具有低或无血液肿瘤负荷的个体和具有(或具有高)血液肿瘤负荷的个体。在一个实施例中,无或低肿瘤负荷是B0(没有显著的血

液受累,例如 $\leq 5\%$ 的外周血淋巴细胞是非典型(塞扎里)细胞)或B1(低血液-肿瘤负荷,例如 $> 5\%$ 的外周血淋巴细胞是非典型(塞扎里)细胞。在一个实施例中,具有血液肿瘤负荷或具有高血液肿瘤负荷是B2(高血液-肿瘤负荷: $\geq 1,000/\mu\text{L}$ 具有阳性克隆的塞扎里细胞)。

[0133] 在一个方面,本文的任何治疗方案均用于治疗患有CTCL的个体,其中该治疗方案(例如相同剂量的抗-KIR3DL2药剂和给予频率)用于患有早期CTCL(例如I、II和/或III期)的个体和患有晚期CTCL(例如,IV期)的个体。

[0134] 在一个方面,本文的任何治疗方案均用于治疗患有CTCL的个体,其具有皮肤损伤,任选显著或晚期皮肤病,任选T2(覆盖 $\geq 10\%$ 皮肤表面的斑点、丘疹、或斑块,任选进一步T2a(仅斑点)或T2b(斑块±斑点)、T3(至少一个肿瘤($\geq 1\text{cm}$ 直径)或T4期覆盖 $\geq 80\%$ 体表面积的皮肤受累红斑)。在一个实施例中,该个体具有多重和/或高皮肤肿瘤负荷。在一个实施例中,该个体具有一个或多个直径大于 1cm 的皮肤肿瘤。

[0135] 抗-KIR3DL2结合剂可以与一种或多种其他治疗或治疗剂(包括通常用于给予该药剂的特定治疗目的的治疗和药剂)组合使用。另外的治疗或药剂将通常以在用于正在治疗的具体疾病或病症的单次疗法中针对该治疗或药剂典型使用的量和治疗方案来给予。在这些治疗方法中,KIR3DL2结合化合物和第二治疗剂或治疗可以顺序给予。该KIR3DL2-结合化合物可以是在给予该第二治疗剂或治疗之前给予。例如,该KIR3DL2-结合化合物可以是在给予该第二治疗剂或治疗之前大约0至30天给予。在一些实施例中,KIR3DL2-结合化合物是在给予该第二治疗剂或治疗之前从约30分钟至约2周、从约30分钟至约1周、从约1小时至约2小时、从约2小时至约4小时、从约4小时至约6小时、从约6小时至约8小时、从约8小时至1天、或从约1至5天给予。在一个实施例中,该治疗是骨髓移植或造血干细胞移植。在一些实施例中,KIR3DL2-结合化合物是与治疗剂的给予同时给予的。

[0136] 在一个实施例中,受试者在用骨髓移植或造血干细胞移植治疗之前接受用抗-KIR3DL2药剂治疗。例如,移植可以在用抗-KIR3DL2药剂治疗结束后的1、2或3个月内给予。

[0137] 在一个实施例中,抗-KIR3DL2药剂之前是用选自下组的针对CTCL的另外的治疗剂或治疗进行治疗,该组由以下组成:皮质类固醇、氮芥、卡莫司汀、局部他克莫司(Protopic®)、咪喹莫特(Aldara®; 3M公司)、局部类维生素A、和rexinoids(蓓萨罗丁;

Targretin®; 加利福尼亚州圣地亚哥的Ligand Pharmaceuticals公司)、莫加利珠单抗、阿仑单抗、本妥昔单抗、以及紫外线疗法(补骨脂素+UVA(PUVA)、窄带UVB、和UVB)、光动力疗法(PDT)和身体照射、组蛋白去乙酰化酶抑制剂(如沃诺司他(辛二酰苯胺异羟肟酸,Zolinza®)和洛米迪星(缩酚酸肽,FK-228,Istodax®))、选择性抑制组蛋白去乙酰化酶同种型1、2、4和6的环肽、化疗或组合化疗、吉西他滨、抗叶酸类似物如普拉曲沙(Folotyn®)、IMiDs(免疫调节药物)、CC-5013(来那度胺; Revlimid®)、CC-4047(Actimid)、和ENMD-0995,蛋白酶体抑制剂和硼替佐米(Velcade®)。抗-KIR3DL2药剂可以有利地用于未接受上述治疗中的一种或多种(或任何)的个体。

[0138] 在一个实施例中,抗-KIR3DL2药剂组合物任选地不包含其他治疗剂。在一个实施例中,抗-KIR3DL2药剂组合物可以用作单一疗法,例如对于给予抗-KIR3DL2药剂的特定治疗目的(特别是对于CTCL的治疗),不需要组合给予另一种治疗剂。

[0139] KIR3DL2结合剂

[0140] 结合KIR3DL2多肽的药剂(可与术语抗-KIR3DL2药剂、KIR3DL2结合剂、抗-KIR3DL2结合剂等互换使用)可以是适合结合KIR3DL2并具有根据本披露的功能的任何药剂。

[0141] KIR3DL2 (CD158k) 是约140kD的三-Ig结构域分子的二硫键连接的同型二聚体,描述于Pende等人(1996) J. Exp. Med. [实验医学杂志]184:505-518中,将其披露内容通过引用并入本文。KIR3DL2多肽的几种等位基因变体已经被报道,这些中的每一种通过术语KIR3DL2涵盖。成熟的人KIR3DL2 (等位基因*002) 的氨基酸序列示于以下SEQ ID NO:1中,对应于Genbank登录号AAB52520,其中21个氨基酸残基前导序列已略去:

[0142]

LMGGQDKPF	LSARPSTVVP	RGGHVALQCH	YRRGFNNFML	YKEDRSHVPI	FHGRIFQESF
IMGPVTPAHA	GTYRCRGSRP	HSLTGWSAPS	NPLVIMVTGN	HRKPSLLAHP	GPLLKSGETV
ILQCWSDVMF	EHFFLHRDGI	SEDPSRLVGQ	IHDGVSKANF	SIGPLMPVLA	GTYRCYGSVP
HSPYQLSAPS	DPLDIVITGL	YEKPSLSAQF	GPTVQAGENV	TLSCSSWSSY	DIYHLSREGE
AHERRLRAMP	KVNRTFQADF	PLGPATHGGT	YRCFGSFRAL	PCVWSNSSDP	LLVSVTGNPS
SSWPSPTEPS	SKSGICRHLH	VLIGTSVVIF	LFILLLFLL	YRWCSNKKNA	AVMDQEPAGD
RTVNRQDSDE	QDPQEVTYAQ	LDHCVFIQRK	ISRPSQRPKT	PLTDTSVYTE	LPNAEPRSKV
VSCPRAPQSG	LEGVF				

(SEQ ID NO: 1)。

[0143] 还包括代表SEQ ID NO:1中所示的KIR3DL2的等位基因变体的任何核酸或蛋白质,例如共享至少95%、97%、98%、99%或更高氨基酸同一性的KIR3DL2蛋白质。

[0144] 密切相关的KIR3DL1 (CD158e1) 是约70kD的单体分子,描述于Colonna和Samaridis (1995) Science [科学]268 (5209), 405-408中。编码KIR3DL1 (CD158e2) 多肽(等位基因*00101) 的cDNA示于Genbank登录号L41269中;编码的氨基酸序列示于Genbank登录号AAA69870中。在一个实施例中,本文提及的KIR3DL1多肽是等位基因*00101。

[0145] KIR3DL2结合剂可以容易地衍生自任何适合的来源,例如KIR3DL2结合剂可以来自多种免疫球蛋白或非免疫球蛋白支架,例如基于葡萄球菌蛋白A的Z结构域的亲和体、工程化库尼茨(Kunitz)结构域、基于人纤连蛋白III的第10细胞外结构域的单体或adnectin、衍生自脂质运载蛋白的anticalin、DARPin (经设计的锚蛋白重复结构域)、多聚化LDLR-A模块、亲和多聚体(avimer)或富含半胱氨酸的knottin肽。参见例如,Gebauer和Skerra (2009) Current Opinion in Chemical Biology [化学生物学新见]13:245-255,将其披露内容通过引用并入本文。在某些实施例中,KIR3DL2结合剂包含抗体(或抗体片段)。

[0146] 用于治疗CTCL的KIR3DL2结合剂(例如抗体、抗体片段)可以例如是分离的蛋白质的形式,或者它可以存在于细胞(例如CAR效应细胞,如T细胞、NK细胞或NKT细胞)的表面上或由其核酸(如来自包含一种或多种编码抗-KIR3DL2抗体的核酸序列的痘病毒基因转移载体)编码。可以构建表达嵌合抗原受体(CAR)的细胞。CAR的实例被工程化以包含与T细胞抗原受体复合物 ζ 链的细胞内信号转导结构域融合的细胞外单链抗体(scFv),并且当在效应细胞(如T细胞、NKT细胞或NK细胞)中表达时具有基于单克隆抗体特异性的重新定向抗原识别(即KIR3DL2识别)的能力。在一个方面,提供了遗传工程化免疫细胞,其在细胞表面膜上表达并承载KIR3DL2特异性嵌合免疫受体,该KIR3DL2特异性嵌合免疫受体包含细胞内信号转导结构域、跨膜结构域(TM)和KIR3DL2特异性细胞外结构域(例如,衍生自特异性结合至

KIR3DL2 (例如本文所披露抗体中的一种) 的单克隆抗体的可变重链和轻链区域的结构域)。还提供了KIR3DL2特异性嵌合免疫受体、编码这些受体的DNA构建体、以及含有适当表达方向的这些构建体的质粒表达载体。

[0147] 在一个实施例中, KIR3DL2结合抗体是一种使ADCC并且任选进一步ADCP针对表达KIR3DL2的细胞的抗体。

[0148] 在一个实施例中, 在本文的任何实施例中使用的抗体结合KIR3DL2多肽, 任选地其中该抗体基本上不结合至KIR3DL1多肽, 其特征在于对人KIR3DL2多肽具有少于(优于) 100ng/ml, 任选地1与100ng/ml之间的结合亲和力(K_D)。

[0149] 该抗体任选地特征在于针对来自健康志愿者的PBMC对HuT78肿瘤的裂解的 ^{51}Cr -释放测定中的 EC_{50} 小于100ng/ml、任选地1与100ng/ml之间、任选地1与50ng/ml之间、任选地25与75ng/ml之间、任选地约50ng/ml。该抗体任选地特征在于针对来自健康志愿者的PBMC对HuT78肿瘤的裂解的 ^{51}Cr -释放测定中的 EC_{50} 与本文披露的抗-KIR3DL2抗体的 EC_{50} 相当(例如, 具有低于本文披露的2B12抗体的 EC_{50} 或在其1-log或0.5-log内的 EC_{50} , 该2B12抗体具有SEQ ID NO 31: 的VH和SEQ ID NO: 25或26的VL, 包含野生型或修饰的人IgG1同种型的Fc结构域, 并介导ADCC。

[0150] 示例性抗-KIR3DL2抗体的特征可以在于具有关于KIR3DL2的小于 $1 \times 10^{-9}\text{M}$ 的平均解离常数(K_D), 如通过例如表面等离子体共振 (SPR) 筛选 (如通过用BIAcore™ SPR分析装置分析) 所确定。任选地, 该抗-KIR3DL2抗体对于KIR3DL2具有约 $1 \times 10^{-8}\text{M}$ 至约 $1 \times 10^{-10}\text{M}$ 、或约 $1 \times 10^{-9}\text{M}$ 至约 $1 \times 10^{-11}\text{M}$ 的 K_D 。

[0151] 在一个方面, 特异性结合KIR3DL2的抗体的特征可以在于具有以下特性中的一种或多种 (包括其任何组合, 在这种组合不矛盾的情况下):

[0152] (a) 对于结合至KIR3DL2多肽, 具有小于 10^{-8}M 、优选小于 10^{-9}M 、或优选小于 10^{-10}M 的 K_D ;

[0153] (b) 结合至对应于KIR3DL2多肽的残基1-98或残基193-292的区段中的至少一个残基;

[0154] (c) 与抗体10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3和/或20E9竞争结合至KIR3DL2多肽;

[0155] (d) 与KIR3DL2的天然配体 (例如HLA多肽, 任选HLA-B27) 竞争结合至KIR3DL2多肽 (例如在多肽相互作用测定中);

[0156] (e) 在表达KIR3DL2的细胞中基本上不增加或诱导KIR3DL2多肽的内化和/或不内化到表达KIR3DL2的细胞内;

[0157] (f) 抑制或不抑制由KIR3DL2的天然配体 (例如HLA多肽; HLA-B27) 诱导的KIR3DL2信号传导;

[0158] (g) 基本上不结合至KIR3DL1、KIR3DS1、KIR3DL3、KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DL3、KIR2DL1和/或KIR2DS4多肽;

[0159] (h) 结合至包含KIR3DL2多肽的氨基酸残基R13、P14、S15、H23、A25、Q27、H32、G33、I60、G62、R78、L82、W226、I231和/或R246中的任何一个或多个的表位; 以及

[0160] (i) 具有与在KIR3DL2多肽的残基R13、P14、S15、H23、A25、Q27、H32、G33、I60、G62、R78、L82、W226、I231和/或R246中的一个或多个处具有突变的KIR3DL2多肽的降低的结合。

[0161] 在本文实施例中的任一个中,抗体的特征可以在于上述(a)-(i)中的任何一个或多个特征。在本文实施例中的任一个中,抗体的特征可以在于(a)、(b)、(c)、和(g)的特征,进一步与(d)或(f)的特征组合,并且任选进一步与上述(e)的特征组合。任选地,该抗体的特征进一步在于特征(h)和/或(i)。

[0162] 在一个实施例中,该抗体是人适合的。在一个实施例中,该抗体是嵌合的,例如含有非人或鼠来源的可变区,以及人或非鼠来源的恒定区。在一个实施例中,该抗体是人的或人源化的。

[0163] 在一个实施例中,该抗体包含Fc结构域或具有由Fc γ R(例如Fc γ RIIIA)结合的同种型,例如IgG1或IgG3同种型的抗体。

[0164] 结合人KIR3DL2的示例性抗体包括抗体19H12、12B11、10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9。这些和其他抗体提供于二者均在2013年9月17日提交的PCT/EP2013/069302和PCT/EP2013/069293中,将其中抗体的披露内容通过引用并入本文。这些抗体选择性结合至KIR3DL2并且不结合KIR3DL1(或KIR3DS1)。虽然抗体10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9可以用作例如给予个体用于耗竭KIR3DL2表达靶标(例如通过诱导ADCC针对表达病原性KIR3DL2的细胞)的治疗剂,抗体12B11和19H12将有利地在检测(例如体外测定)细胞表面上的KIR3DL2表达中使用,因为12B11和19H12在检测测定中均特别有效地检测KIR3DL2阳性细胞,12B11对于使用冷冻组织切片的免疫组织化学测定是有利的,而19H12对于流式细胞术检测是有利的。

[0165] 抗体10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9的重链和轻链可变区的氨基酸序列列于表C中。在具体的实施例中,抗-KIR3DL2抗体与单克隆抗体10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9中的任一个基本上结合相同的表位或决定簇;任选地该抗体包含抗体10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9的抗原结合区。在本文实施例中的任一个中,抗体10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9可以通过其氨基酸序列和/或对其进行编码的核酸序列来表征。在一个实施例中,该单克隆抗体包含10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9的Fab或F(ab')₂部分。单克隆抗体可以包含10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9的重链可变区。根据一个实施例,该单克隆抗体包含10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9的重链可变区的三个CDR。单克隆抗体可以进一步包含10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9的可变轻链可变区或者10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9的轻链可变区的CDR中的一个、两个或三个。任选地,所述轻链或重链CDR中的任何一个或多个可以含有一个、两个、三个、四个或五个或更多个氨基酸修饰(例如取代、插入或缺失)。任选地,包含抗体10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9的部分或全部的抗原结合区的轻链和/或重链可变区中的任一个被融合到人IgG类型(任选地人恒定区,任选地人IgG1或IgG3同种型)的免疫球蛋白恒定区。

[0166] 在另一个方面,该抗体包含:10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9的HCDR1区,其包含如表A所示的氨基酸序列或其至少4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9的HCDR2区,其包含如表A所示的氨基酸序列或其至少4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可

以被不同的氨基酸取代;10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9的HCDR3区,其包含如表A所示的氨基酸序列或其至少4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9的LCDR1区,其包含如表B所示的氨基酸序列或其至少4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9的LCDR2区,其包含如表B所示的氨基酸序列或其至少4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9的LCDR3区,其包含如表B所示的氨基酸序列或其至少4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以缺失或被不同的氨基酸取代。HCDR1、2、3和LCDR1、2、3序列可以任选地被指定为所有(或每个,独立地)是卡巴特编号系统的那些(对于每个CDR如表A和/或B中所示),乔西亚(Chotia)编号系统的那些(对于每个CDR如表A中所示),IMGT编号系统的那些(对于每个CDR如表A中所示),或任何其他适合的编号系统。

[0167] 表A

[0168]

mAb	CDR 定义	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		SEQ ID	序列	SEQ ID	序列	SEQ ID	序列
10F6	卡巴特	51	IAGMQ	54	WINTHSGVPKYAEDFKG	20	GGDEGVMDY
	乔西亚	52	GYTFTI	55	WINTHSGVPK	20	GGDEGVMDY
	AbM	53	GYTFTIAGMQ		WINTHSGVPK	20	GGDEGVMDY
2B12	卡巴特	18	TAGMQ	19	WINSHSGVPKYAEDFK	20	GGDEGVMDY
	乔西亚	56	GYTFTT	58	WINSHSGVP	59	GGDEGVMDYW
	AbM	57	GYTFTTAGMQ	58	WINSHSGVP	59	GGDEGVMDYW
10G5	卡巴特	2	SYTMH	3	YINPSSGYTENNRKF	4	RLGKGLLPFDY
	乔西亚	60	GYTFTS	62	YINPSSGY	63	RLGKGLLPFDY
	AbM	61	GYTFTSYTMH		YINPSSGY		RLGKGLLPFDY
13H1	卡巴特	64	GYTMN	67	LINPYNGDTTYNQKFKG	69	ENWGYPYAMDY
	乔西亚	65	HYSFIG	68	LINPYNGDTT	69	ENWGYPYAMDY
	AbM	66	HYSFIGYTMN	68	LINPYNGDTT	69	ENWGYPYAMDY
1E2	卡巴特	70	DYAMN	73	VISTYYGDANYNQKFKG	75	IYYDYDGSY
	乔西亚	71	GYTFTD	74	VISTYYGDAN	75	IYYDYDGSY
	AbM	72	GYTFTDYAMN	74	VISTYYGDAN	75	IYYDYDGSY
9E10	卡巴特	76	SYTMH	79	YINPSSGYTDYNQKFKD	81	LGKGLLPFDY
	乔西亚	77	GYTFTS	80	YINPSSGYTD	81	LGKGLLPFDY

[0169]

							Y
	AbM	78	GYTFTSYTMH	80	YINPSSGYTD	81	LGKGLLPFDY
1C3	卡巴特	82	SYWMQ	85	AIYPGDGDTRYTQKFKG	87	RYDGYHFDY
	乔西亚	83	GYTFTS	86	AIYPGDGDTR	87	RYDGYHFDY
	AbM	84	GYTFTSYWMQ	86	AIYPGDGDTR	87	RYDGYHFDY
20E9	卡巴特	88	TYWMQ	91	AIYPGDGDTRYTQKFKG	93	RGDYGNYGMDY
	乔西亚	89	GFTFTT	92	AIYPGDGDTR	93	RGDYGNYGMDY
	AbM	90	GFTFTTYWMQ	92	AIYPGDGDTR	93	RGDYGNYGMDY

[0170] 表B

[0171]

mAb	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		序列		序列		序列
10F6	21	KASQDVSTAVA	22	WASTRHT	94	QQHYNTPWT
2B12	21	KASQDVSTAVA	22	WTSTRHT	23	QQHYSTPWT
10G5	5	RASENIYSNLA	6	AATNLAD	7	QHFWGTPYT
13H1	95	RASESVDNFGISFMN	96	AASNQGS	97	QQSKEVPYT
1E2	98	RSSQSLVHSNGNTYLH	99	KVSNRFS	100	SQSTHVPPYT
9E10	101	KSNQNLLWSGNQRYCLV	102	WTSDRY	103	QQHLHIPYT
1C3	104	KSSQSLLWSVNQKNYLS	105	GASIRES	106	QHNHGSFLPLT
20E9	107	RSSQSIVHSNGNTYLE	108	KVSNHFS	109	FQGSHPPT

[0172] 表C

[0173]

抗体部分		氨基酸序列
10F6 VH	34	Q I Q L V Q S G P E L K K P G E T V R I S C K A S G Y T F T I A G M Q W V Q K M P G K G L K W I G W I N T H S G V P K Y A E D F K G R F A F S L E T S A N I A Y L Q I S N L K N E D T A T Y F C A R G G D E G V M D Y W G Q G T S V T V S
10F6 VL	35	D I V M T Q S H K F M S T S V G D R V S I T C K A S Q D V S T A V A W Y H Q K P G Q S P K L L I Y W A S T R H T G V P D R F S G S G S G T D Y T L T I S A L Q A E D L A L Y Y C Q Q H Y N T P W T F G G G T K L E I K
2B12 VH	36	Q I Q L V Q S G P E L K K P G E T V R I S C K A S G Y T F T T A G M Q W V Q K T P G K G L K W I G W I N S H S G V P K Y A E D F K G R F A F S L E T S A S T A Y L Q I S T L K N E D T A T Y F C A R G G D E G V M D Y W G Q G T S V T V S
2B12 VL	37	D I V M T Q S H K F M S T S L G D R V S F T C K A S Q D V S T A V A W Y Q Q K P G Q S P K L L I Y W T S T R H T G V P D R F T G S G S G T D Y T L T I S S V Q A E D L A L Y Y C Q Q H Y S T P W T F G G G T K L E I K

[0174]

10G5 VH	38	Q V Q L Q Q S A A E L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T S Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S S G Y T E N N R K F K D K T T L T A D K S S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R L G K G L L P P F D Y W G Q G T T L T V S S A K T T P P S V Y P L A P G S A A Q T
10G5 VL	39	D I Q M T Q S P A S L S V S V G E T V T I T C R A S E N I Y S N L A W Y Q Q K Q G K S P Q L L V Y A A T N L A D G V P S R F S G S G S G T Q Y S L K I N S L Q S E D F G S Y Y C Q H F W G T P Y T F G G G T K L E I K
13H1 VH	40	E V Q L Q Q S G P E L V K P G A S M K I S C K A S H Y S F I G Y T M N W V K Q R H G K N L E W I G L I N P Y N G D T T Y N Q K F K G K A S L T V D K S S S T A Y M E I L S L T S E D S A V Y Y C A R E N W G Y P Y A M D Y W G Q G T S V T V S
13H1 VL	41	D I V L T Q S P A S L A V S L G Q R A T I S C R A S E S V D N F G I S F M N W F Q Q K P G Q P P K L L I Y A A S N Q G S G V P A R F S G S R S G T D F S L N I H P M E E D D T A M Y F C Q Q S K E V P Y T F G G G T K L E I K
1E2 VH	42	Q V Q L Q Q S G A E L V R P G V S V K I S C K G S G Y T F T D Y A M N W V K Q S H A K S L E W I G V I S T Y Y G D A N Y N Q K F K G K A T M T V D K S S S T A Y M E L A R L T S E D S A I Y Y C A L I Y Y D Y D G S Y W G Q G T T L T V S
1E2 VL	43	D V V M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S L V H S N G N T Y L H W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V Y F C S Q S T H V P P Y T F G G G T K L E I K
9E10 VH	44	Q V Q L Q Q S A A E L A R P G A S V K M S C K A S G Y T F T S Y T M H W V K Q R P G Q G L E W I G Y I N P S S G Y T D Y N Q K F K D K T T L T A D R S S S T A Y M Q L S S L T S E D S A V Y Y C A R L G K G L L P P F D Y W G Q G S T L T V S S
9E10 VL1	45	E I V L T Q S I P S L T V S A G E R V T I S C K S N Q N L L W S G N Q R Y C L V W H Q W K P G Q T P T P L I T W T S D R Y S G V P D R F I G S G S V T D F T L T I S S V Q A E D V A V Y F C Q Q H L H I P Y T F G G G T K L E I K
9E10 VL2	46	D I Q M T Q S P A S L S V S V G E T V T I T C R A S E N I Y S N L A W Y Q Q K Q G K S P Q L L V Y A A T N L A D G V P S R F S G S G S G T Q Y S L K I N S L Q S E D F G S Y Y C Q H F W G T P Y T F G G G T K L E I K
1C3 VH	47	Q V Q L Q Q S G A E L A R P G A S V K L S C K A S G Y T F T S Y W M Q W V K Q R P G Q G L E W I G A I Y P G D G D T R Y T Q K F K G K A T L T A D K S S S T A Y M Q L S S L A S E D S A V Y Y C A R R Y D G Y Y H F D Y W G Q G T T L T V S
1C3 VL	48	D I V M T Q S P S S L A V T A G E K V T M S C K S S Q S L L W S V N Q K N Y L S W Y Q Q K Q R Q P P K L L I Y G A S I R E S W V P D R F T G S G S G T D F T L T I S N V H A E D L A V Y Y C Q H N H G S F L P L T F G S G T K L

[0175]

		E I K
20E9 VH	49	Q V Q L Q Q S G A E V A R P G A S V K L S C K S S G F T F T T Y W M Q W V K Q R P G Q G L E W I G A I Y P G D G D T R Y T Q K F K G K A T L T A D K S S I T A Y M Q L S S L A S E D S A V Y Y C A R R G D Y G N Y G M D Y W G Q G T S V T V S S
20E9 VL	50	D V L M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S I V H S N G N T Y L E W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N H F S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V Y Y C F Q G S H V P P T F G G G T K L E I K

[0176] 抗体10G5的人源化VH和VL氨基酸序列的实例分别示于表D和SEQ ID NO:13-17和8-12中。在一个方面,提供了一种结合人KIR3DL2多肽的分离的人源化抗体,其中该抗体包含:HCDR1区,其包含如SEQ ID NO:2所示的氨基酸序列SYTMH或其至少3或4个氨基酸的序列;HCDR2区,其包含如SEQ ID NO:3所示的氨基酸序列YINPSSGYTENNRKF或其至少4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸的序列;HCDR3区,其包含如SEQ ID NO:4所示的氨基酸序列LGKGLLPFDY或其至少4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸的序列;LCDR1区,其包含如SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列RASENIYSNLA或其至少4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸的序列;LCDR2区,其包含如SEQ ID NO:6所示的氨基酸序列AATNLAD或其至少3、4或5个连续氨基酸的序列;LCDR3区,其包含如SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列QHFWGTPYT或其至少4、5、6、7、或8个连续氨基酸的序列。

[0177] 在一个方面,结合人KIR3DL2多肽的人源化10G5抗体包含:

[0178] (a) 包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR-H1;

[0179] (b) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR-H2;

[0180] (c) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的CDR-H3;

[0181] (d) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的CDR-L1;

[0182] (e) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR-L2;

[0183] (f) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR-L3;以及

[0184] (g) 人框架序列。

[0185] 在一个实施例中,人源化抗体包含来自人亚组VH1的重链框架以及JH6,任选地这些抗体包含IGHV1-46*03,以及IGHJ6*01。在一个实施例中,人源化抗体包含来自人亚组VK1的轻链框架,任选IGKV1-NL1*01。

[0186] 任选地该人框架包含一个或多个突变,例如显示结合KIR3DL2的保留能力的回复突变。因此,本发明的实施例包括使用Abnum编号在以下残基的任何一个或多个(或任何组合)处具有回复突变的回复突变的10G5重链变体:

[0187] 10G5 VH:5、11、12、13、20、38、40、48、66、67、69、71、72a、75。

[0188] Abnum氨基酸编号命名法描述于Abhinandan和Martin, (2008) Molecular Immunology[分子免疫学]45:3832-3839中,其披露内容通过引用并入。使用Abnum系统的序列编号也可以在<http://www.bioinfo.org.uk/abs/abnum>下自动生成。然而,应当理解,本领域技术人员可以使用替代编号系统并鉴定对应于Abnum编号的位置,例如可以使用卡巴特编号系统(Kabat等人(1991) Sequences of Protein of Immunological Interest[具有免疫学重要性的蛋白质序列],第5版,美国公共卫生署,国立卫生研究院,贝塞斯达,马里兰

州)。

[0189] 因此,本发明的其他实施例包括在以下残基的任何一个或多个(或任何组合)处具有回复突变的回复突变的10G5轻链变体:

[0190] 10G5 VL:17、18、40、45、48、70、76、100。

[0191] 人源化抗体可以进一步包含人框架序列中的一个或多个另外的突变(例如回复突变),以例如增强人源化抗体的亲和力、稳定性、或其他特性。

[0192] 在一个方面,结合人KIR3DL2多肽的人源化10G5抗体包含:

[0193] (a) 包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的CDR-H1;

[0194] (b) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR-H2;

[0195] (c) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的CDR-H3;

[0196] (d) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的CDR-L1;

[0197] (e) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR-L2;

[0198] (f) 包含SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR-L3;以及

[0199] (g) 人框架序列,其中谷氨酰胺(Q)残基存在于VH结构域的位置39处和VL结构域的位置38处。任选地,人框架序列进一步包含一个或多个回复突变。

[0200] 位置39处的谷氨酰胺(Q)残基可以天然存在于人VH框架序列中,或者可以通过氨基酸取代或序列的其他修饰被引入。

[0201] 在另一方面,人源化抗体可以包含与SEQ ID NO:13-17的10G5的VH结构域具有至少约80%序列同一性(例如至少约85%、90%、95%、97%、98%、或更多同一性)的VH结构域。在另一个特定方面,人源化抗体可以包含(a) VH结构域,其包含并入人VH结构域的非人CDR残基,其中该VH结构域与SEQ ID NO:13-17的人源化10G5 VH至少约80%(如至少90%、95%、97%、98%)相同,和(b) VL结构域,其包含并入人VL结构域的非人CDR残基,其中该VL结构域与SEQ ID NO:8-12的人源化10G5 VL至少约80%(如至少90%、95%、97%、98%)相同。

[0202] 抗体2B12的人源化VH和VL氨基酸序列的实例分别示于表D和SEQ ID NO:24-28和30-33中。在一个方面,人源化抗体包含:HCDR1区,其包含如SEQ ID NO:18所示的氨基酸序列TAGMQ或其至少3或4个连续氨基酸的序列;HCDR2区,其包含如SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列WINSHSGVPKYAEDFK或其至少4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸的序列;HCDR3区,其包含如SEQ ID NO:20所示的氨基酸序列GGDEGVMDY或其至少、5、6、7、或8个连续氨基酸的序列;LCDR1区,其包含如SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列KASQDVSTAVA或其至少4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸的序列;LCDR2区,其包含如SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列WTSTRHT或其至少3、4或5个连续氨基酸的序列;和/或LCDR3区,其包含如SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列QQHYSTPWT或其至少4、5、6、7、或8个连续氨基酸的序列。

[0203] 在本文实施例中的任一个中,这些重链和轻链的CDR 1、2和3中的任一个可以通过以下项来表征:其至少4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸的序列,和/或表征为具有一个氨基酸序列,该氨基酸序列与列于相应SEQ ID NO中的具体CDR或CDR组共享至少70%、80%、85%、90%或95%序列同一性。

[0204] 在一个方面,人源化2B12抗体包含:

[0205] (a) 包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的CDR-H1;

- [0206] (b) 包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CDR-H2;
[0207] (c) 包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CDR-H3;
[0208] (d) 包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR-L1;
[0209] (e) 包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的CDR-L2;
[0210] (f) 包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDR-L3;以及
[0211] (g) 人框架序列。

[0212] 在一个实施例中,人源化抗体包含来自人亚组VH1和/或VH7的重链框架以及JH6,任选地这些抗体包含IGHV7-4-1*02和/或IGHV1-c*01,以及IGHJ6*01。在一个实施例中,人源化抗体包含来自人亚组VK1和/或VK4的轻链框架,任选IGKV4-1*01和/或IGKV1-39*01,以及JH4,任选IGKJ4*01。

[0213] 例如,任选地人框架包含一个或多个突变,例如回复突变。任选地,使用Abnum编号,以下氨基酸序列(SEQ ID NO:29)的2B12重链变体可以在以下残基的任何一个或多个(或任何组合)处具有回复突变:

[0214] 2B12 VH:2、38、39、40、43、48、68、72c、91、108。

[0215] QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTTAGMQWVRQAPGQGLEWMGWINS HSGV PKY

[0216] AEDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYYCARGGDEGVMDYWGQGTTTVTVSS

[0217] (SEQ ID NO:29)。

[0218] 因此,本发明的其他实施例包括在以下残基的任何一个或多个(或任何组合)处具有回复突变的回复突变的2B12轻链变体:

[0219] 2B12 VL:3、8、9、21、43、71、78、104。

[0220] 人源化抗体可以进一步包含人框架序列中的一个或多个另外的突变(例如回复突变),以例如增强人源化抗体的亲和力、稳定性、或其他特性。

[0221] 在一个方面,人源化2B12抗体包含:

- [0222] (a) 包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的CDR-H1;
[0223] (b) 包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列的CDR-H2;
[0224] (c) 包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列的CDR-H3;
[0225] (d) 包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列的CDR-L1;
[0226] (e) 包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列的CDR-L2;
[0227] (f) 包含SEQ ID NO:23的氨基酸序列的CDR-L3;以及

[0228] (g) 人框架序列,其中谷氨酰胺(Q)残基存在于VH结构域的位置39处和VL结构域的位置38处。任选地,人框架序列进一步包含一个或多个回复突变。

[0229] 在另一方面,人源化抗体包含与SEQ ID NO:30-33的2B12或人源化2B12的VH结构域具有至少约80%序列同一性(例如至少约85%、90%、95%、97%、98%、或更多同一性)的VH结构域。在另一个特定方面,人源化抗体包含:(a) VH结构域,其包含并入人VH结构域的非人CDR残基,其中该VH结构域与SEQ ID NO:30-33的人源化2B12 VH至少约80%(如至少90%、95%、97%、98%)相同,和(b) (a) VL结构域,其包含并入人VL结构域的非人CDR残基,其中该VL结构域与SEQ ID NO:24-28的人源化2B12 VL至少约80%(如至少90%、95%、97%、98%)相同。

[0230] 位置39处的谷氨酰胺(Q)残基可以天然存在于人VH框架序列中,或者可以通过氨

基酸取代或序列的其他修饰被引入。

[0231] 10G5或2B12抗体可以进一步包含天然或工程化的人IgG恒定结构域。任选地,该恒定结构域是IgG1结构域,任选地进一步包含增加Fc受体结合的修饰。

[0232] 表D

[0233]

抗体结构域	氨基酸序列 (SEQ ID NO)
10G5-L 0	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSNLAWYQQKPGKAPKLLLYAATNLADGV PS RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 8)
10G5-L 2	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSNLAWYQQKPGKAPQLLVYAATNLADGV PS RFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 9)
10G5-L 3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSNLAWYQQKPGKAPQLLVYAATNLADGV PS RFSGSGSGTQYTLTISSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 10)
10G5-L 4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSNLAWYQQKQKAPQLLVYAATNLADGV PS RFSGSGSGTQYTLTINSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 11)
10G5-L 5	DIQMTQSPSSLSASVGETVTITCRASENIYSNLAWYQQKQKAPQLLVYAATNLADGV PS RFSGSGSGTQYTLTINSLQPEDFATYYCQHFWGTPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 12)
10G5-H 0	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYTMHWVRQAPGQGLEWMGYINPSSGYT EN NRKFKDRVTMTTRDTSTSTVYMESSLRSEDTAVYYCARLGKGLLPFDYWGQGTTVTV SS (SEQ ID NO: 13)
10G5-H 3	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSSGYT EN NRKFKDKTTMTADTSTSTAYMESSLRSEDTAVYYCARLGKGLLPFDYWGQGTTVTV SS (SEQ ID NO: 14)
10G5-H 4	QVQLQQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSSGYT EN NRKFKDKTTLTADTSTSTAYMESSLRSEDTAVYYCARLGKGLLPFDYWGQGTTLTV SS (SEQ ID NO: 15)
10G5-H 5	QVQLVQSGAELARPGASVKVSCKASGYTFTSYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSSGYT EN

[0234]

	NRKFKDKTTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLGKGLLPFDYWGQGTTTVTVSS (SEQ ID NO: 16)
10G5-H 6	QVQLQQSGAEVKKPGASVKMSCKASGYTFTSYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSSGYTEN NRKFKDKTTLTADKSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARLGKGLLPFDYWGQGTTTLTVSS (SEQ ID NO: 17)
2B12-L 0	DIQMTQSPSFLSASVGDRVITITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQPPLLIYWTSTRHTGVPD RFGSGSGGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSTPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 24)
2B12-L 1	DIQMTQSPSFLSASVGDRVITITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQPPLLIYWTSTRHTGVPD RFGSGSGGTDYTLTISSLQAEDVAVYYCQQHYSTPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 25)
2B12-L 2	DIVMTQSPSFLSASVGDRVITITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQPPLLIYWTSTRHTGVPD RFGSGSGGTDYTLTISSVQAEDVAVYYCQQHYSTPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 26)
2B12-L 3	DIVMTQSPSFLSASVGDRVITITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWTSTRHTGVPD RFGSGSGGTDYTLTISSVQAEDVAVYYCQQHYSTPWTFGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 27)
2B12-L 4	DIVMTQSHKFLSASVGDRVITITCKASQDVSTAVAWYQQKPGQSPKLLIYWTSTRHTGVPD RFGSGSGGTDYTLTISSVQAEDVAVYYCQQHYSTPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 28)
2B12-H 1	QVQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTTAGMQWVQKSPGQGLEWMGWINSHSGVPKY AEDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYFCARGGDEGVMDYWGQGTTTVTVSS (SEQ ID NO: 30)
2B12-H 2	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTTAGMQWVRQAPGQGLEWIGWINSHSGVPKY AEDFKGRFVFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYFCARGGDEGVMDYWGQGTTTVTVSS (SEQ ID NO: 31)
2B12-H 3	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTTAGMQWVQKSPGQGLEWIGWINSHSGVPKY AEDFKGRFAFSLDTSVSTAYLQISSLKAEDTAVYFCARGGDEGVMDYWGQGTTTVTVSS (SEQ ID NO: 32)
2B12-H 4	QIQLVQSGSELKKPGASVKVSKASGYTFTTAGMQWVQKTPGKLEWIGWINSHSGVPKY AEDFKGRFAFSLDTSASTAYLQISSLKAEDTAVYFCARGGDEGVMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 33)

[0235] 在一个实施例中,人源化2B12单克隆抗体包含:

[0236] (a) 重链可变区,其包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列,和

[0237] (b) 轻链可变区,其包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列。在一个实施例中,人源化2B12单克隆抗体包含:

[0238] (a) 重链可变区,其包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列,和

[0239] (b) 轻链可变区,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

- [0240] 在一个实施例中,人源化2B12单克隆抗体包含:
- [0241] (a) 重链可变区,其包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列,和
- [0242] (b) 轻链可变区,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。
- [0243] 在一个实施例中,人源化2B12单克隆抗体包含:
- [0244] (a) 重链可变区,其包含SEQ ID NO:33的氨基酸序列,和
- [0245] (b) 轻链可变区,其包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。
- [0246] 在一个实施例中,人源化10G5单克隆抗体包含:
- [0247] (a) 重链可变区,其包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列,和
- [0248] (b) 轻链可变区,其包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列。
- [0249] 在一个实施例中,人源化10G5单克隆抗体包含:
- [0250] (a) 重链可变区,其包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,和
- [0251] (b) 轻链可变区,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。
- [0252] 在一个实施例中,人源化10G5单克隆抗体包含:
- [0253] (a) 重链可变区,其包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列,和
- [0254] (b) 轻链可变区,其包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列。
- [0255] 在一个方面,根据本文治疗方法使用的抗-KIR3DL2药剂结合至KIR3DL2多肽上的表位,该表位至少部分地重叠、或包括在对应于以下的区段中的至少一个残基:SEQ ID NO:1 (或其子序列) 的KIR3DL2多肽的残基1-192、残基1-98、或残基99-192。在一个实施例中,该表位的所有关键残基是在对应于SEQ ID NO:1的KIR3DL2多肽的残基1-192、残基1-98或残基99-192的区段中。在一个实施例中,这些抗体结合一种表位,该表位包含在对应于SEQ ID NO:1的KIR3DL2多肽的残基1-192、1-98或99-192的区段中的1、2、3、4、5、6、7或更多个残基。优选地,被该抗体结合的残基存在于KIR3DL2多肽的表面上。
- [0256] 在一个方面,根据本文治疗方法使用的抗-KIR3DL2药剂结合一种表位,该表位包含选自下组的残基中的一个、两个、三个、四个、五个或更多个,该组由以下组成:R13、P14、S15、H23、A25、Q27、I60和G62 (参考SEQ ID NO:1),和/或具有与在选自下组的残基处具有突变的KIR3DL2多肽的降低的结合,该组由以下组成:R13、P14、S15、H23、A25、Q27、I60和G62 (参考SEQ ID NO:1)。
- [0257] 用于本文突变的简化符号是:野生型残基:在多肽中的位置,具有如SEQ ID NO:1中所示的残基编号;突变残基。
- [0258] 在一个方面,抗-KIR3DL2药剂结合包含KIR3DL2多肽的残基R13、A25和/或Q27的表位,和/或具有与在残基R13、A25和/或Q27处具有突变 (参考SEQ ID NO:1) 的KIR3DL2多肽的降低的结合。例如,抗体可以具有与具有突变R13W、A25T和/或Q27R的KIR3DL2多肽的降低的结合。任选地,该表位另外地包含残基I60和/或G62中的一个或多个 (参考SEQ ID NO:1),并且/或者这些抗体具有与在残基I60和/或G62处具有突变 (参考SEQ ID NO:1,例如I60N、G62S) 的KIR3DL2多肽的降低的结合。任选地,该表位另外或可替代地包含残基P14、S15和/或H23中的一个或多个 (参考SEQ ID NO:1),并且/或者这些抗体具有与在残基P14、S15和/或H23处具有突变 (参考SEQ ID NO:1,例如P14S、S15A、H23S) 的KIR3DL2多肽的降低的结合。任选地,该表位不包含残基R32和/或G33 (参考SEQ ID NO:1),并且/或者这些抗体不具有与在残基R32和/或G33处具有突变 (参考SEQ ID NO:1,例如R32H和/或G33R) 的KIR3DL2多肽的

降低的结合。任选地,该表位不包含残基F50和/或R53(参考SEQ ID NO:1),并且/或者这些抗体不具有与在残基F50和/或R53处具有突变(参考SEQ ID NO:1,例如F50A、R53S)的KIR3DL2多肽的降低的结合。该抗体可以(例如阻断KIR3DL2-HLA B27和-HLA A3相互作用的抗体)或不可以(例如非内化抗体)结合至残基Q56和/或E57,和/或残基F9和/或S11;因此,在一个实施例中,任选地,该表位不包含残基F9、S11、Q56和/或E57(参考SEQ ID NO:1),并且/或者这些抗体不具有与在残基F9、S11、Q56和/或E57处具有突变(参考SEQ ID NO:1,例如F9S和S11A、Q56S和E57A)的KIR3DL2多肽的降低的结合;在另一个实施例中,任选地,该表位包含残基F9、S11、Q56和/或E57(参考SEQ ID NO:1),并且/或者这些抗体具有与在残基F9、S11、Q56和/或E57处具有突变(参考SEQ ID NO:1,例如F9S和S11A、Q56S和E57A)的KIR3DL2多肽的降低的结合。任选地,该表位不包含残基H29和/或F34(参考SEQ ID NO:1),并且/或者这些抗体不具有与在残基H29和/或F34处具有突变(参考SEQ ID NO:1,例如H29S、F34A)的KIR3DL2多肽的降低的结合。任选地,该表位不包含残基F9和/或S11中的一个或多个(参考SEQ ID NO:1),并且/或者这些抗体不具有与在残基F9和/或S11处具有突变(参考SEQ ID NO:1,例如F9S、S11A)的KIR3DL2多肽的降低的结合。

[0259] 在一个方面,抗-KIR3DL2药剂结合包含SEQ ID NO:1的KIR3DL2多肽的残基I60和/或G62的表位,和/或具有与在残基I60和/或G62处具有突变(参考SEQ ID NO:1)的KIR3DL2多肽的降低的结合。例如,抗体可以具有与具有突变I60N和/或G62S的KIR3DL2多肽的降低的结合。任选地,该表位另外或可替代地包含残基P14、S15和/或H23中的一个或多个(参考SEQ ID NO:1),并且/或者这些抗体具有与在残基P14、S15和/或H23处具有突变(参考SEQ ID NO:1,例如P14S、S15A、H23S)的KIR3DL2多肽的降低的结合。任选地,这些抗体不结合KIR3DL2多肽的残基R13、A25和/或Q27,和/或不具有与在残基R13、A25和/或Q27处具有突变的KIR3DL2多肽(例如具有突变R13W、A25T和/或Q27R的KIR3DL2多肽)的降低的结合。

[0260] 在一个方面,抗-KIR3DL2药剂结合包含SEQ ID NO:1的KIR3DL2多肽的残基P14、S15和/或H23的表位,和/或具有与在残基P14、S15和/或H23处具有突变(参考SEQ ID NO:1,例如P14S、S15A、H23S)的KIR3DL2多肽的降低的结合。

[0261] 在一个方面,抗-KIR3DL2药剂展示与以下的降低的结合:(1)在残基I60和/或G62处具有突变(参考SEQ ID NO:1,例如I60N、G62S)的KIR3DL2多肽,和(2)在残基P14、S15和/或H23处具有突变(参考SEQ ID NO:1,例如P14S、S15A、H23S)的KIR3DL2多肽。

[0262] 在一个方面,抗-KIR3DL2药剂结合包含以下的表位:(a)KIR3DL2多肽的残基R13、A25和/或Q27中的1、2或3个和(b)残基I60和/或G62中的一个或两个。在一个方面,抗体具有与具有以下的KIR3DL2多肽的降低的结合:(a)残基R13、A25和/或Q27中的1、2或3个处的突变和(b)残基I60和/或G62中的一个或两个处的突变。

[0263] 在一个方面,抗-KIR3DL2药剂结合包含SEQ ID NO:1的KIR3DL2多肽的残基R78和/或L82的表位,和/或具有与在残基R78和/或L82处具有突变(参考SEQ ID NO:1)的KIR3DL2多肽的降低的结合。例如,抗体可以具有与具有突变R78H和L82P的KIR3DL2多肽的降低的结合。任选地,该表位另外地包含或排除残基K7、Y30、R31、P79、H80、S81、T83、G84、W85、S86和/或A87中的一个或多个(参考SEQ ID NO:1),并且/或者这些抗体具有或不具有与在残基K7、Y30、R31、P79、H80、S81、T83、G84、W85、S86和/或A87处具有突变(参考SEQ ID NO:1)的KIR3DL2多肽的降低的结合。在一个实施例中,这些抗体结合一种表位,该表位包含在对应

于KIR3DL2多肽的残基1至98的区段中的1、2、3、4、5、6、7或更多个残基(参考SEQ ID NO:1), 任选地进一步其中该表位包含残基K7、Y30、R31、R78、P79、H80、S81、L82、T83、G84、W85、S86和/或A87中的一个或多个(例如1、2、3、4、5个)。

[0264] 在一个方面, 抗-KIR3DL2药剂结合包含SEQ ID NO:1的KIR3DL2多肽的残基W226的表位, 和/或具有与在残基W226处具有突变(参考SEQ ID NO:1)的KIR3DL2多肽的降低的结合。任选地, 该表位另外地包含残基I231和/或R246中的一个或多个(参考SEQ ID NO:1), 并且/或者这些抗体具有与在残基I231和/或R246处具有突变(参考SEQ ID NO:1, 例如I231M、R246P)的KIR3DL2多肽的降低的结合。任选地, 该表位另外地包含残基E239(参考SEQ ID NO:1), 并且/或者这些抗体具有与在残基E239处具有突变(参考SEQ ID NO:1, 例如E239G)的KIR3DL2多肽的降低的结合。

[0265] 在一个方面, 抗-KIR3DL2药剂结合包含SEQ ID NO:1的KIR3DL2多肽的残基I231和/或R246的表位, 和/或具有与在残基I231和/或R246处具有突变(参考SEQ ID NO:1)的KIR3DL2多肽的降低的结合。

[0266] 在一个方面, 抗-KIR3DL2药剂结合包含KIR3DL2多肽的残基W226和残基I231和/或R246中的一个或两个的表位。

[0267] 在一个方面, 抗-KIR3DL2药剂具有与在残基W226处具有突变且在残基I231和/或R246中的一个或两个处具有突变的KIR3DL2多肽的降低的结合。

[0268] 对抗-KIR3DL2抗体与用KIR3DL2突变体转染的细胞的结合进行测量, 并且将其与抗-KIR3DL2抗体结合野生型KIR3DL2多肽(SEQ ID No:1)的能力进行比较(参见国际专利公开号W02014/044686, 将其披露内容通过引用并入本文)。在如本文所用的抗-KIR3DL2抗体与突变体KIR3DL2多肽之间的结合的降低意味着在结合亲和力上有所降低(例如, 如通过已知的方法测量, 如对表达特定突变体的细胞进行FACS测试, 或通过Biacore测试与突变体多肽的结合), 和/或在抗-KIR3DL2抗体的总结合能力上有所降低(例如, 如通过在抗-KIR3DL2抗体浓度对多肽浓度的曲线中B_{max}的降低所证实)。在结合上的显著降低指示在抗-KIR3DL2抗体结合至KIR3DL2时突变的残基直接参与与抗-KIR3DL2抗体的结合, 或紧密靠近该结合蛋白。因此抗体表位将可以包括这种残基并且可以包括另外的在空间上邻近于这种残基的残基。

[0269] 在一些实施例中, 在结合上的显著降低意味着在抗-KIR3DL2抗体与突变体KIR3DL2多肽之间的结合亲和力和/或能力相对于在该抗体与野生型KIR3DL2多肽(例如, 示于SEQ ID NO:1中的多肽)之间的结合降低了大于40%、大于50%、大于55%、大于60%、大于65%、大于70%、大于75%、大于80%、大于85%、大于90%或大于95%。在某些实施例中, 结合降至检测限以下。在一些实施例中, 结合的显著降低是在以下情况下被证实: 抗-KIR3DL2抗体与突变体KIR3DL2多肽的结合是小于观察到的在抗-KIR3DL2抗体与野生型KIR3DL2多肽(例如, 在SEQ ID NO:1中示出的胞外结构域)之间的结合的50%(例如, 小于45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%或10%)。此类结合测量可以使用多种本领域中已知的结合测定来实现。一种这种测定的具体实例描述于实例部分中。

[0270] 在一些实施例中, 抗-KIR3DL2抗体展示对于突变体KIR3DL2多肽(其中野生型KIR3DL2多肽(例如, SEQ ID No:1)中的一个残基被取代)(例如如实例1中所述的突变体)的显著更低的结合。在这里使用的简化符号中, 格式为: 野生型残基: 在多肽中的位置: 突变残

基,具有如SEQ ID NO:1中所示的残基编号。

[0271] 任选地,这些抗体具有与以下KIR3DL2多肽的降低的结合,该多肽在SEQ ID NO:1的残基N99、H100、E130、H131、F132、V178、P179、H180、S181、P182、Y183和/或残基Q184处具有取代。

[0272] 在一些实施例中,抗-KIR3DL2抗体结合具有SEQ ID NO:1序列的野生型KIR3DL2多肽,但具有与含以下突变中的一个或多个(例如,1、2、3或4个)的突变体KIR3DL2多肽的降低的结合:P179T和/或S181T(参考SEQ ID NO:1)。在一个实施例中,与突变体KIR3DL2的结合相比于与野生型KIR3DL2的结合显著地降低。

[0273] 在一些实施例中,抗-KIR3DL2抗体展示对于突变体KIR3DL2多肽(其中在对应于野生型KIR3DL2多肽(例如,SEQ ID NO:1)中的残基1-98、残基99-292、或残基99-192(或其子序列)的区段中的残基被不同的氨基酸取代)的显著更低的结合。

[0274] 在一个方面,抗体可以与单克隆抗体10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9竞争,并且识别结合至与单克隆抗体10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9基本上或本质上相同或相同的在KIR3DL2分子上的表位或“表位位点”,或具有对于与这些单克隆抗体基本上或本质上相同或相同的在KIR3DL2分子上的表位或“表位位点”的免疫特异性。在其他实施例中,该单克隆抗体由抗体10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9组成,或者是这些抗体的衍生物或片段。

[0275] 应当理解的是,尽管抗体可以结合至与抗体10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9相同的表位,但适合的抗体可以识别KIR3DL2多肽的任何部分并针对其产生,只要该抗体结合KIR3DL2并且具有希望的功能性。例如,KIR3DL2例如人KIR3DL2的任何片段或KIR3DL2片段的任何组合,可以用作免疫原以产生抗体,并且这些抗体可以识别KIR3DL2多肽内的任何位置处的表位,只要它们可以在如本文所述的表达KIR3DL2的NK细胞上这样做。在一个实施例中,被识别的表位存在于该细胞表面上,即它们可接近存在于细胞外部的抗体。任选地,该表位是被抗体10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9特异性识别的表位。此外,识别KIR3DL2内的不同表位的抗体可以组合使用,例如从而在不同个体中的最大功效和幅度结合至KIR3DL2多肽。

[0276] 这些抗体可以通过多种本领域中已知的技术产生。典型地,它们是通过用免疫原对非人动物(任选地是小鼠)进行免疫而产生的,该免疫原包含KIR3DL2多肽,任选地是人KIR3DL2多肽。KIR3DL2多肽可以包含人KIR3DL2多肽的全长序列,或其片段或衍生物,典型地是免疫原片段,即包含暴露于表达KIR3DL2多肽的细胞表面上的表位(优选地被10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9抗体识别的表位)的多肽的一部分。此类片段典型地含有成熟多肽序列的至少约7个连续氨基酸,或其至少约10个连续氨基酸。片段典型地基本上是从受体的胞外结构域衍生的。在一个实施例中,该免疫原包含在脂质膜(典型地在细胞的表面处)内的野生型人KIR3DL2多肽。在一个实施例中,该免疫原包含完整细胞,特别是完整的人细胞,任选地是经处理或裂解的。在另一个实施例中,该多肽是重组KIR3DL2多肽。

[0277] 对非人哺乳动物用抗原进行免疫的步骤可以按任何本领域中熟知的方式进行,以刺激在小鼠体内产生抗体(参见例如,E.Harlow and D.Lane,Antibodies:A Laboratory Manual.[抗体:实验室手册],Cold Spring Harbor Laboratory Press[冷泉港实验室出版

社],冷泉港,纽约(1988),将其全部披露内容通过引用并入本文)。对于示例性单克隆抗体,下一个步骤是将脾细胞从免疫的非人哺乳动物进行分离,并且随后将那些脾细胞与永生化细胞进行融合以形成产生抗体的杂交瘤。一旦分离并且存在于单细胞悬液中,淋巴细胞即可以融合至永生化细胞系。

[0278] 还可以通过选择免疫球蛋白的组合文库来产生抗体,如披露于例如(Ward等人,Nature[自然],341(1989)544页中,其全部披露内容通过引用并入本文)。

[0279] 对一种或多种结合至KIR3DL2的抗体的鉴定可以易于使用其中可以评价抗体竞争的多种免疫筛选测定中的任何测定来确定。许多此类测定是常规实践的并且是本领域熟知的(参见例如,美国专利号5,660,827,发布于1997年8月26日,将其特定地通过引用并入本文)。应当理解,实际上,确定本文所述抗体结合至其上的表位并不是以鉴定与跟本文所述单克隆抗体的相同或基本上相同的表位相结合的抗体所要求的任何方式。

[0280] 例如,当有待检查的测试抗体获自不同来源的动物时,或甚至具有不同的Ig同种型时,可以采用简单的竞争测定法,其中将对照(例如10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9)和测试抗体混合(或预吸附)并且应用到含有KIR3DL2多肽的样品。基于蛋白质印迹法的实验方案和使用BIACORE分析适合用于这类竞争研究。

[0281] 在某些实施例中,在应用到KIR3DL2抗原样品之前将对照抗体(例如10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9)与不同量的测试抗体预先混合(例如约1:10或约1:100)持续一段时间。在其他实施例中,在暴露于KIR3DL2抗原样品期间该对照和不同量的测试抗体可以简单地混合。只要可以区分结合抗体与游离抗体(例如,通过使用分离或洗涤技术以消除未结合抗体)和区分10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9与测试抗体(例如,通过使用物种特异性或同种型特异性第二抗体或通过用可检测标记特异性标记10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9),即可以确定测试抗体是否使10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9与抗原的结合降低。在不存在完全不相关抗体的情况下,(标记的)对照抗体的结合可以用作对照高值。通过将标记的(10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9)抗体与完全相同类型的未标记抗体(10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9)一起孵育,可以获得对照低值,其中将发生竞争并降低标记抗体的结合。在测试测定中,标记的抗体反应性在测试抗体存在下显著降低指示测试抗体可以识别大致上相同的表位。以10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9:测试抗体在约1:10与约1:100之间的任何比率,测试抗体可以例如使10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9与KIR3DL2抗原的结合降低至少约50%,如至少约60%,或更优选至少约80%或90%(例如约65%-100%)。例如这种测试抗体可以使10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9与KIR3DL2抗原的结合降低至少约90%(例如,约95%)。

[0282] 竞争还可以通过例如流式细胞术测试来评价。在这种测试中,可以将带有给定KIR3DL2多肽的细胞首先与例如10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9一起孵育,并且然后与标记有荧光染料或生物素的测试抗体一起孵育。如果在与饱和量的10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9一起预孵育时获得的结合是在没有与10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9一起预孵育时由该抗体获得的结合(如通过荧光的平均值测量)的约80%、约50%、约40%或更少(例如约30%、20%或

10%)，则该抗体被称为与10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9竞争。可替代地，如果在与饱和量的测试抗体一起预孵育的细胞上用标记的10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9抗体(通过荧光染料或生物素)获得的结合是在没有与测试抗体一起预孵育时获得的结合的约80%、约50%、约40%、或更少(例如约30%、20%或10%)，则该抗体被称为与10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9竞争。

[0283] 还可以采用简单的竞争测定，其中测试抗体被预吸收，并以饱和浓度被施加到其上固定有KIR3DL2抗原的表面。该简单竞争测定中的表面是例如BIACORE芯片(或适合于表面等离子体共振分析的其他介质)。然后在KIR3DL2饱和浓度下使对照抗体(例如10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9)与该表面接触，并且测量对照抗体的KIR3DL2和表面结合。将该对照抗体的这种结合与在不存在测试抗体时该对照抗体与含KIR3DL2的表面的结合进行比较。在测试测定中，在测试抗体的存在下，在含KIR3DL2的表面与对照抗体的结合方面的显著降低指示测试抗体竞争并且可以识别与对照抗体基本上相同的表位。可以选择使对照抗体(如10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9)与KIR3DL2抗原的结合降低至少约30%或更多、或约40%的任何测试抗体。例如，这种测试抗体将使对照抗体(例如10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9)与KIR3DL2抗原的结合降低至少约50%(例如，至少约60%、至少约70%、或更多)。应当理解的是对照和测试抗体的顺序可以逆转：即，在竞争测定中可以首先将对照抗体结合至表面并且之后使测试抗体与该表面接触。例如，具有对于KIR3DL2抗原的更高亲和力的抗体首先结合至该表面，因为预期观察到对于第二抗体结合的降低(假定这些抗体是交叉反应的)幅度较大。此类测定的其他实例提供于例如Sauna(1995) *J. Immunol. Methods* [免疫学方法杂志] 183:33-41中，将其披露内容通过引用并入本文。

[0284] 确定抗体是否结合在表位区内可以用本领域的普通技术人员已知的方式进行。作为此类作图/表征方法的一个实例，对于抗-KIR3DL2抗体的表位区可以使用在KIR3DL2蛋白中暴露的胺/羧基的化学修饰通过表位“足迹法(foot-printing)”来确定。这种足迹法技术的一个具体实例是使用HXMS(通过质谱法检测氢-氘交换)，其中发生受体和配体蛋白酰胺质子的氢/氘交换、结合、以及反向交换，其中保护参与蛋白结合的主链酰胺基团免受反向交换并且因此将保持被氘化。可以在这一点上通过胃蛋白酶水解作用、快速微孔高效液相色谱分离、和/或电喷雾离子化质谱法来鉴定相关区域。参见例如，Ehring H, *Analytical Biochemistry* [分析生物化学]，第267卷(2)，第252-259页(1999)；Engen, J.R. 和 Smith, D.L., (2001) *Anal. Chem.* [分析化学] 73, 256A-265A。适当的表位鉴定技术的另一个实例是核磁共振表位作图(NMR)，其中典型地将游离抗原和与结合抗原肽复合的抗原的二维NMR谱图中信号的位置进行比较。典型地用¹⁵N对该抗原进行选择核素标记，这样使得在NMR谱图中可以看到仅相应于抗原的信号以及没有来自该抗原结合肽的信号。与游离抗原的谱图相比，在复合物的谱图中由涉及与抗原结合肽的相互作用的氨基酸来源的抗原信号典型地将移动位置，并且那样可以鉴定涉及该结合的氨基酸。参见例如，Ernst Schering Res Found Workshop [系统鲁棒性分析]，2004；(44)：149-67；Huang等人，*Journal of Molecular Biology* [分子生物学杂志]，281卷(1) 61-67页(1998)；以及Saito和Patterson, *Methods* [方法] 1996年6月；9(3)：516-24。

[0285] 表位作图/表征还可以使用质谱法进行。参见例如，Downward, *J Mass Spectrom.*

[质谱杂志]2000年4月;35(4):493-503以及Kiselar和Downard,Anal Chem.[年度化学]1999年5月1日;71(9):1792-801。在表位作图和鉴定的上下文中,蛋白酶消化技术也可能是有用的。抗原决定簇-相关区域/序列可以通过蛋白酶消化来确定,例如通过以与KIR3DL2比率为大约1:50使用胰蛋白酶或在pH 7-8过夜消化,随后为质谱(MS)分析以用于肽鉴定。通过抗-KIR3DL2结合剂来保护免受胰蛋白酶裂解的肽可以随后通过将经胰蛋白酶消化的样品与经过与抗体一起孵育并然后经受被例如胰蛋白酶消化的样品进行比较(由此揭露针对结合剂的足迹)来鉴定。其他酶(像胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶等)也可以或可替代地可以在类似的表位表征方法中使用。此外,酶消化可以提供快速方法以分析潜在抗原决定簇序列是否是在未暴露于表面并且因此最有可能与免疫原性/抗原性方面不相关的KIR3DL2多肽的一个区内。关于类似技术的讨论,参见例如,Manca,Ann Ist Super Sanita.1991;27:15-9。

[0286] 定点诱变是可用于阐明结合表位的另一种技术。例如,在“丙氨酸扫描”中,蛋白区段中每个残基均用丙氨酸残基替换,并且测量结合亲和力的结果。如果该突变导致结合亲和力的显著降低,则它最可能参与结合。可以使用对结构性表位具有特异性的单克隆抗体(即不结合未折叠蛋白的抗体)来验证该丙氨酸代替不影响蛋白的整体折叠。参见例如,Clackson和Wells,Science[科学]1995;267:383-386;和Wells,Proc Natl Acad Sci USA[美国国家科学院院刊]1996;93:1-6。

[0287] 电子显微镜也可以用于表位“足迹法”。例如,Wang等人,Nature[自然]1992;355:275-278,使用冷冻电子显微镜术、三维图像重构、以及X射线晶体学的协调应用以确定Fab片段在天然豇豆花叶病毒的衣壳表面上的物理足迹。

[0288] 其他形式的用于表位评估的“无标签”测定包括表面等离子体共振(SPR、BIACORE)和反射干涉光谱法(RIFS)。参见例如,Fägerstam等人,Journal Of Molecular Recognition[分子识别杂志]1990;3:208-14;Nice等人,J.Chromatogr.[层析杂志]1993;646:159-168;Leipert等人,Angew.Chem.Int.Ed.[应用化学国际版]1998;37:3308-3311;Kröger等人,Biosensors and Bioelectronics[生物传感器与生物电]2002;17:937-944。

[0289] 还应当指出,结合与抗体相同或基本上相同的表位的抗体可以在本文所述的示例性竞争测定的一个或多个中鉴定。

[0290] 一旦抗体被鉴定为能够结合KIR3DL2和/或具有其他所希望的特性,还将典型地使用标准的方法对它们进行评价,这些方法包括本文所述的那些,评价它们结合至其他多肽(包括不相关多肽)的能力。理想地,这些抗体仅以显著亲和力结合至KIR3DL2例如人KIR3DL2,并且不以显著水平结合至非相关多肽。然而,应当理解的是,只要对KIR3DL2的亲和力比对于其他不相关多肽的亲和力显著更高(例如5倍、10倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、10,000倍,或更多倍),则这些抗体适合用于本发明的方法中。

[0291] 在任何实施例的一个方面,根据本发明方法制备的抗体是单克隆抗体。在另一个方面,用于产生抗体的该非人动物是哺乳动物,如啮齿动物、牛、猪、家禽(fowl)、马、兔、山羊、或绵羊。

[0292] 根据一个替代实施例,编码结合呈现在KIR3DL2多肽上的表位的抗体的DNA是分离自杂交瘤,并且将其置于适当的表达载体中以转染进适当的宿主中。然后使用宿主以用于

抗体或其变体的重组产生,这些变体如人源化形式的该单克隆抗体、抗体的活性片段、包含抗体的抗原识别部分的嵌合抗体、或包含可检测部分的形式。

[0293] 编码单克隆抗体例如抗体10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、5H1、1E2、1C3或20E9的DNA可以使用常规的程序容易地分离并测序(例如,通过使用能够特异性地结合到编码鼠抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。一旦被分离,可以将DNA置于表达载体中,然后将这些载体转染到不另外产生免疫球蛋白的宿主细胞(如大肠杆菌细胞、猿COS细胞、中国仓鼠卵巢(CHO)细胞、或骨髓瘤细胞)中,以在重组宿主细胞中获得单克隆抗体的合成。如在本说明书的其他地方所说明,可以出于多个目的中任何一项(例如,用于人源化抗体、产生片段或衍生物、或用于修饰抗体的序列)而例如在抗原结合位点中对这类DNA序列进行修饰,从而优化该抗体的结合特异性。

[0294] 对该抗体编码的DNA在细菌内的重组表达在本领域中是熟知的(参见例如,Skerra等人,Curr.Opinion in Immunol.[当前免疫学观点],5,256页(1993);和Pluckthun,Immunol.[免疫学]130,151页(1992))。

[0295] 在一个实施例中,抗体能够经由ADCC(和任选地进一步经由ADCP)介导表达病理性KIR3DL2的细胞(例如肿瘤细胞)的耗竭。一旦获得抗原结合化合物,则可以对其诱导ADCC趋势、抑制表达KIR3DL2的靶细胞的活性和/或增殖、和/或引起对这些靶细胞的清除的能力进行评价。评价该抗原结合化合物诱导ADCC或总体上导致表达KIR3DL2的靶细胞的清除或活性抑制的能力可以在该方法的任何适合的阶段进行。这种评价可以在预定用于治疗用途的抗体(或其他化合物)的鉴定、生产和/或发展中所涉及的一个或多个不同步骤中进行。例如,活性可以在用以鉴定候选抗原结合化合物的筛选方法的背景下来评价,或在以下方法中来对活性进行评价:在这些方法中对抗原结合化合物进行选择并且制成适合人(例如,在抗体的情况下制成嵌合的或人源化的),表达抗原结合化合物的细胞(例如,表达重组抗原结合化合物的宿主细胞)已经获得并且被针对其产生功能性抗体(或其他化合物)的能力进行评价,和/或一个量的抗原结合化合物已经产生并且被针对其活性进行评价(例如,测试多个批次的或大量的产物)。通常,将已知该抗原-结合化合物会特异性地结合至KIR3DL2多肽。该步骤可以涉及对多个(例如,使用高通量筛选方法非常大量的,或更少量的)抗原结合化合物进行测试。

[0296] 测试ADCC可以进行,可以通过各种测定来确定,这些测定包括本领域中已知的那些和描述于本文实验实例中的那些。测试ADCC典型地涉及评价细胞-介导的细胞毒性,其中表达KIR3DL2的靶细胞(例如乳糜泻细胞或其他表达KIR3DL2的细胞)与结合的抗-KIR3DL2抗体是由具有Fc受体的效应细胞识别,而不涉及补体。不表达KIR3DL2抗原的细胞可以任选地用作对照。NK细胞细胞毒性的激活是通过测量细胞因子产生(例如IFN- γ 产生)或细胞毒性标记物(例如CD107动员)的增加来评价的。在一个实施例中,与对照抗体(例如,不结合至KIR3DL2的抗体,具有鼠恒定区的KIR3DL2抗体)相比,在靶细胞的存在下该抗体将诱导细胞因子产生、细胞毒性标记物表达、或靶细胞裂解增加至少20%、50%、80%、100%、200%或500%。在另一个实例中,例如在铬释放测定中检测靶细胞的裂解,例如该抗体将诱导至少10%、20%、30%、40%或50%的靶细胞的裂解。

[0297] 在一个实施例中,抗-KIR3DL2抗体基本上不增加或诱导在细胞表面处表达的KIR3DL2的细胞内内化。如本文所用,不是“内化的”或不“内化”的抗-KIR3DL2抗体是在哺乳

动物细胞(即细胞表面KIR3DL2)上结合KIR3DL2时基本上不被细胞吸收(即进入)的抗体。

[0298] 在一个实施例中,抗-KIR3DL2抗体能够引起可用于由抗-KIR3DL2抗体结合的细胞表面KIR3DL2多肽的增加,特别是在恶性细胞上。在一个实施例中,抗体可以增加KIR3DL2多肽在(例如恶性细胞的)细胞表面上的表达水平。在一个实施例中,抗体可以增加可用于由抗-KIR3DL2抗体结合的细胞表面上的KIR3DL2多肽的量或数量。在一个实施例中,抗体可以稳定和/或引起细胞表面上存在的KIR3DL2多肽的积累,例如它们可以减少KIR3DL2多肽的受体循环或内化。增加细胞表面KIR3DL2的抗体例如在病原性CD4⁺ T细胞上具有增加的效力,因为它们允许更多数量的抗体与表达KIR3DL2的细胞(例如靶细胞,恶性细胞)结合。在一个实施例中,提供了一种分离的单克隆抗体,其在表达KIR3DL2的细胞的表面上结合KIR3DL2多肽,其中该抗体在与细胞接触(体内或体外)至少1小时、3小时、6小时、12小时或24小时后引起细胞表面处可检测的KIR3DL2多肽的量或数量增加。该增加可以与对照抗体(例如同种型对照,或结合KIR3DL2的另一种抗体(例如具有不同重链和/或轻链可变区氨基酸序列的抗体))相比。

[0299] 抗-KIR3DL2抗体是否在哺乳动物细胞上结合KIR3DL2时内化,或者KIR3DL2多肽是否经历细胞内内化(例如在被抗体结合时)可以通过各种测定来确定,包括描述于实验实例PCT/EP2013/069302和PCT/EP2013/069293中的那些,二者均在2013年9月17日提交。例如,在存在或不存在添加到培养基中的相关抗体的情况下,可以将细胞在组织培养皿中孵育,并且在希望的时间点处理以进行显微分析。如果使用放射性标记的抗体,则可以通过显微镜检查或通过自动射线照相术直接观察细胞中内化的、标记的抗体的存在。任选地,在显微镜下,可以评价与已知的多肽或其他细胞组分的共定位;例如,与内体/溶酶体标记物LAMP-1 (CD107a)的共定位可以提供关于内化抗体的亚细胞定位的信息。

[0300] 测试抗体是否能够增加细胞表面处KIR3DL2多肽的数量可以通过将测试抗体与表达KIR3DL2的细胞(例如T细胞淋巴瘤)一起孵育并在孵育时间段后检测细胞表面处的KIR3DL2多肽来进行。KIR3DL2多肽可以使用适合的亲和试剂(例如一种或多种抗体)进行。示例性测定示于PCT/EP2013/069302和PCT/EP2013/069293中。例如,与对照抗体(例如不与KIR3DL2结合的抗体,一种不同的抗-KIR3DL2抗体)相比,抗体可以诱导在测试抗体存在下孵育(例如至少1、3、6、12、24或48小时)后细胞表面处可检测的KIR3DL2多肽数量增加至少20%、50%、75%或100%。任选地,孵育后细胞表面处可检测的KIR3DL2多肽的数量是使用测试抗体可检测的数量。任选地,孵育后细胞表面处可检测的KIR3DL2多肽的数量是使用不与测试抗体竞争结合KIR3DL2的第二抗-KIR3DL2抗体可检测的数量。

[0301] 在一个实施例中,可以测试抗-KIR3DL2抗体可检测地降低(或消除)KIR3DL2与KIR3DL2的HLA天然配体之间结合的能力。示例性测定示于PCT/EP2013/069302和PCT/EP2013/069293中。在一个实施例中,提供了一种结合KIR3DL2多肽的抗体,其中所述抗体可检测地降低(或消除)KIR3DL2与KIR3DL2的第一HLA天然配体之间的结合,但未可检测地降低(或消除)KIR3DL2与KIR3DL2的第二HLA天然配体之间的结合。

[0302] 在一个实施例中,该抗体任选地可检测地降低KIR3DL2与KIR3DL2的HLA I类配体(例如HLA-B27)之间的结合。在一个实施例中,该抗体任选地可检测地降低KIR3DL2与HLA-B27之间的结合,但未可检测地降低KIR3DL2与HLA-A3之间的结合。

[0303] 当已鉴定出结合KIR3DL2多肽的药剂时,可以通过测试NK细胞在体外细胞毒性测

定中裂解肿瘤细胞(例如HUT78细胞)的能力对其进行测试以确定提供特定“NK%裂解能力”的浓度,如在⁵¹Cr释放测定中通过获得的最大肿瘤细胞裂解的百分比(=肿瘤细胞裂解/饱和时最大肿瘤细胞裂解×100)测量。采用PBMC和HUT78细胞作为效应细胞和靶细胞的适合测定的实例描述于本文的实例中。可以测试抗-KIR3DL2药剂以确定其关于这种NK裂解能力的最大响应或效果的EC₁₀、EC₆₀、EC₈₀、EC₉₀、或EC₁₀₀。典型地,NK细胞是来自健康人供体的NK细胞,例如在PBMC内。可以使用来自不同供体的样品(例如10、20或更多种不同的供体样品)进行适合数量的实验。

[0304] 在某些实施例中,产生抗体的杂交瘤的DNA可以在插入表达载体之前进行修饰,例如通过将用于人重链和轻链恒定结构域的编码序列取代同源性非人序列(例如Morrison等人,PANS[美国科学院院报],第6851页(1984))或通过将非免疫球蛋白多肽的编码序列的全部或部分共价地连接至免疫球蛋白编码序列。以该方式,制备了具有原始抗体的结合特异性的“嵌合”或“杂合”抗体。典型地,这种非免疫球蛋白多肽可被取代为抗体的恒定结构域。

[0305] 因此,根据另一个实施例,该抗体是人源化的。据此的“人源化”形式的抗体是特异性嵌合的免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(例如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或其他结合抗原的抗体亚序列),它们含有来自鼠免疫球蛋白的最小序列。大多数情况下,人源化的抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自该受体的互补决定区(CDR)的残基被来自初始抗体(供体抗体)的CDR的残基替换,同时保持所希望的初始抗体的特异性、亲和力、以及能力。

[0306] 在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv框架残基可以被相应的非人残基替代。此外,人源化抗体可以包括在受体抗体中或在输入的CDR或框架序列中未发现的残基。进行这些修饰以进一步改进和优化抗体性能。总体上,人源化抗体将包括基本上全部的至少一个、并且典型地两个可变区,其中全部或基本上全部的CDR区相应于初始抗体的情况,并且全部或基本上全部的FR区是人免疫球蛋白一致序列的情况。人源化抗体还任选地包括免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,典型地是人免疫球蛋白的至少一部分。更多的细节,参见Jones等人,Nature[自然],321,第522页(1986);Reichmann等人,Nature[自然],332,第323页(1988);Presta,Curr.Op.Struct.Biol.[当前结构生物学观点],2,第593页(1992);Verhoeyen等人Science[科学],239,第1534页;以及美国专利号4,816,567,将其全部披露通过引用并入本文。用于人源化抗体的方法是本领域所熟知的。

[0307] 选择用于制备人源化抗体的人轻链和重链可变结构域,这对于降低抗原性是非常重要的。根据所谓的“最佳适配”方法,针对已知人可变结构域序列的整个文库来筛选抗体的可变结构域的序列。然后将最接近于小鼠序列的人序列接受为用于人源化抗体的人框架(FR)(Sims等人,J.Immunol.[免疫学杂志]151,第2296页(1993);Chothia和Lesk,J.Mol.[分子生物学杂志]196,1987,第901页)。另一种方法采用来自具有特定亚组轻链或重链的全部人抗体的共有序列的特定框架。相同的框架可用于几种不同的人源化抗体(Carter等人,PNAS 89,第4285页(1992);Presta等人,J.Immunol.[免疫学杂志],151,第2623页(1993))。

[0308] 进一步重要的是将抗体人源化,同时保留对于KIR3DL2受体的高亲和力以及其他有利的生物学特性。为了实现这个目标,根据一种方法,通过使用亲本序列和人源化序列的三维模型,分析亲本序列和多种概念性人源化产物的过程而制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型是通常可得到的并且对于本领域普通技术人员而言是熟悉的。可以得到说明并且

展示所选候选免疫球蛋白序列的可能的三维结构的计算机程序。这些展示的检查允许对残基在候选免疫球蛋白序列的功能方面的可能作用进行分析,即对影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基进行分析。按照此方式,可以从一致的并且输入的序列中选择并且组合FR残基,这样使得所希望的抗体特征,如增加一种或多种靶抗原的亲和力得以实现。总体上,CDR残基直接地并且在多数情况下实质上涉及影响抗原结合。

[0309] 另一种制备“人源化”单克隆抗体的方法是使用一种XenoMouse (安根尼克斯 (Abgenix), 菲蒙市 (Fremont), 加利福尼亚州 (CA)) 作为用于免疫的小鼠。XenoMouse是一种鼠宿主,它的免疫球蛋白基因由功能性人免疫球蛋白基因替代。因此,由这种小鼠产生的抗体或从这种小鼠的B细胞制备的杂交瘤中产生的抗体已经被人源化。XenoMouse描述于美国专利号6,162,963中,将其通过引用以其全文并入本文。

[0310] 还可以根据各种其他技术,如通过使用已经被工程化以表达人抗体谱系的其他转基因动物用于免疫 (Jakobovitz等人, Nature [自然] 362 (1993) 255) 或者通过使用噬菌体展示方法选择抗体谱系来产生人抗体。此类技术是技术人员已知的并且可以从如在本申请中披露的单克隆抗体开始来实施。

[0311] 鉴于抗-KIR3DL2抗体诱导ADCC的能力,这些抗体可以采用修饰制成,这些修饰增加了它们结合Fc受体的能力,这可以影响效应子功能,如抗体依赖性细胞毒性、肥大细胞脱颗粒、以及吞噬,连同免疫调节信号 (如调节淋巴细胞增殖和抗体分泌)。典型的修饰包括修饰的人IgG1恒定区,所述修饰的人IgG1恒定区包含至少一个氨基酸修饰 (例如取代、缺失、插入)、和/或改变类型的糖基化,例如低岩藻糖基化。此类修饰可以影响与Fc受体的相互作用:Fc γ RI (CD64)、Fc γ RII (CD32)、和Fc γ RIII (CD 16)。Fc γ RI (CD64)、Fc γ RIIA (CD32A) 以及Fc γ RIII (CD 16) 是激活型 (即,免疫系统增强型) 受体,而Fc γ RIIB (CD32B) 是抑制型 (即,免疫系统阻滞型) 受体。一种修饰可以例如增加Fc结构域与效应 (例如NK) 细胞上的Fc γ RIIIa的结合。

[0312] 抗-KIR3DL2抗体可以包含人IgG1或IgG3同种型的Fc结构域 (或其部分),任选地是经修饰的。残基230-341 (卡巴特EU) 是Fc CH2区。残基342-447 (卡巴特EU) 是Fc CH3区。抗-KIR3DL2抗体可以包含变体Fc区,所述变体Fc区在一个或多个部份中具有一个或多个氨基酸修饰 (例如,取代、缺失、插入),所述修饰增加了变体Fc区对Fc γ R (包括激活型和抑制性Fc γ R) 的亲和力和亲合力。在一些实施例中,所述一个或多个氨基酸修饰增加了变体Fc区对Fc γ RIIIA和/或Fc γ RIIA的亲和力。在另一个实施例中,变体Fc区与可比的亲本抗体 (即,一种这样的抗体,具有与该抗体相同的氨基酸序列,除了Fc区中的一个或多个氨基酸修饰) 的Fc区相比,进一步以更低的亲和力特异性地结合Fc γ RIIB。例如,在氨基酸位置310和435处的组氨酸残基中的一个或两个可被例如赖氨酸、丙氨酸、甘氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、甲硫氨酸、色氨酸、苯丙氨酸、丝氨酸或苏氨酸取代 (参见例如PCT公开号WO 2007/080277); 此类取代的恒定区提供了与抑制性Fc γ RIIB的降低的结合,而并未降低与激活型Fc γ RIIIA的结合。在一些实施例中,相对于亲本抗体,此类修饰增加了变体Fc区对Fc γ RIIIA和/或Fc γ RIIA的亲和力,并且还增强了变体Fc区对Fc γ RIIB的亲和力。在其他实施例中,相对于该亲本抗体的Fc区,所述一个或多个氨基酸修饰增加了变体Fc区对Fc γ RIIIA和/或Fc γ RIIA的亲和力,但未改变该变体Fc区对Fc γ RIIB的亲和力。在另一个实施例中,相对于亲本抗体,所述一种或多种氨基酸修饰增强了变体Fc区对Fc γ RIIIA和Fc γ

RIIA的亲合力但降低了对Fc γ RIIB的亲合力。当亲本分子(没有修饰的Fc区)的结合活性不能在细胞中检测到时,增加的亲和力和/或亲合力导致与表达低水平Fc γ R的细胞中Fc γ R或Fc γ R相关活性的可检测的结合。

[0313] 这些分子对于Fc γ R的亲合力和结合特性可以使用本领域中已知的用于确定抗体-抗原或Fc-Fc γ R相互作用(即,分别为抗原与抗体的特异性结合或Fc区与Fc γ R的特异性结合)的体外测定(基于生物化学或免疫学的测定)来确定,所述体外测定包括但不限于ELISA测定、表面等离子体共振测定、免疫沉淀测定。

[0314] (IgG1 Fc结构域中)影响(增强)Fc γ RIIIa或FcRn结合的特定突变也在下面列出。

[0315]

同种型	物种	修饰	效应子功能	修饰的效果
IgG1	人	T250Q/M428L	增加与 FcRn 的结合	增加半衰期
IgG1	人	1M252Y/S254T/T256E + H433K/N434F	增加与 FcRn 的结合	增加半衰期
IgG1	人	E333A	增加与 Fc γ RIIIa 的结合	增加 ADCC 和 CDC
IgG1	人	S239D/I332E 或 S239D/A330L/I332E	增加与 Fc γ RIIIa 的结合	增加 ADCC
IgG1	人	P257I/Q311	增加与 FcRn 的结合	未改变半衰期
IgG1	人	S239D/I332E/G236A	增加 Fc γ RIIIa/Fc γ RIIb 比率	增加巨噬细胞吞噬作用比率

[0316] 在一些实施例中,包含变体Fc区的分子在Fc区的CH3结构域中包括至少一个氨基酸修饰(例如,具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、或更多个氨基酸修饰)。在其他实施例中,包含变体Fc区的分子在Fc区的CH2结构域中包括至少一个氨基酸修饰(例如,具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、或更多个氨基酸修饰),该CH2结构域被定义为从氨基酸231-341延伸。在一些实施例中,这些分子包括至少两个氨基酸修饰(例如,具有2、3、4、5、6、7、8、9、或更多个氨基酸修饰),其中至少一个这样的修饰是在CH3区中并且至少一个这样的修饰是在CH2区中。氨基酸修饰可以例如在铰链区制成。在一个具体实施例中,本发明涵盖在Fc区的CH1结构域中的氨基酸修饰,该CH1结构域被定义为从氨基酸216-230延伸。

[0317] 可以制得Fc修饰的任何组合,例如在以下文献中披露的不同修饰的任何组合:美国专利号US,7,632,497;7,521,542;7,425,619;7,416,727;7,371,826;7,355,008;7,335,742;7,332,581;7,183,387;7,122,637;6,821,505和6,737,056;PCT公开号WO 2011/109400;WO 2008/105886;WO 2008/002933;WO 2007/021841;WO 2007/106707;WO 06/088494;WO 05/115452;WO 05/110474;WO 04/1032269;WO 00/42072;WO 06/088494;WO 07/024249;WO 05/047327;WO 04/099249和WO 04/063351;以及Presta,L.G.等人(2002) Biochem.Soc.Trans.[生物化学学会会刊]30(4):487-490;Shields,R.L.等人(2002) J.Biol.Chem.[生物化学杂志]26;277(30):26733-26740以及Shields,R.L.等人(2001)

J.Biol.Chem.[生物化学杂志]276(9):6591-6604)。

[0318] 抗-KIR3DL2抗体可以包含变体Fc区,其中相对于野生型Fc区,该变体Fc区包括至少一个氨基酸修饰(例如,具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、或更多个氨基酸修饰),使得该分子相对于包含野生型Fc区的分子而言具有增强的效应子功能,任选地其中该变体Fc区包括在以下位置的任何一个或多个处的取代:221、239、243、247、255、256、258、267、268、269、270、272、276、278、280、283、285、286、289、290、292、293、294、295、296、298、300、301、303、305、307、308、309、310、311、312、316、320、322、326、329、330、332、331、332、333、334、335、337、338、339、340、359、360、370、373、376、378、392、396、399、402、404、416、419、421、430、434、435、437、438和/或439。

[0319] 抗-KIR3DL2抗体可以包含变体Fc区,其中相对于野生型Fc区,该变体Fc区包含至少一个氨基酸修饰(例如,具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、或更多个氨基酸修饰),使得该分子相对于包含野生型Fc区的分子而言具有增强的效应子功能,任选地其中该变体Fc区包括在以下位置的任何一个或多个处的取代:329、298、330、332、333和/或334(例如S239D、S298A、A330L、I332E、E333A和/或K334A取代)。

[0320] 在一个实施例中,具有变体或野生型Fc区的抗体可以具有改变的糖基化模式,这些模式增加抗体的Fc受体结合能力。可以通过例如在具有改变的糖基化机构的宿主细胞中表达抗体完成此类糖类修饰。在本领域中已经说明了具有改变的糖基化机构的细胞,并且这些细胞可以用作宿主细胞,在这些宿主细胞中表达重组抗体从而由此产生具有改变的糖基化的抗体。参见例如,Shields,R.L.等人(2002)J.Biol.Chem.[生物化学杂志]277:26733-26740;Umana等人(1999)Nat.Biotech.[自然生物技术]17:176-1,以及欧洲专利号:EP 1,176,195;PCT公开案WO 06/133148;WO 03/035835;WO 99/54342,将它们各自通过引用以其全文并入本文。

[0321] 通常,具有改变的糖基化的此类抗体是“糖基化优化的”,使得抗体具有特定的N-多糖结构,其产生某些希望的特性,包括但不限于与以下抗体相比增强的ADCC和效应细胞受体结合活性,这些抗体是未修饰的抗体或具有天然存在的恒定区并由鼠骨髓瘤NS0和中国仓鼠卵巢(CHO)细胞(Chu和Robinson,Current Opinion Biotechnol[生物技术新见].2001,12:180-7)产生的抗体、如本文实例部分中或通常用于产生重组治疗性抗体的其他哺乳动物宿主细胞系产生的HEK293T表达的抗体。

[0322] 在哺乳动物宿主细胞中产生的单克隆抗体包括在每个重链的Asn297处的N-连接的糖基化位点。抗体上的聚糖典型地是复杂的双触角(biantennary)结构,具有非常低的或没有平分型N-乙酰葡萄糖胺(平分型GlcNAc)和高水平的核心岩藻糖基化作用。聚糖末端包含非常低的或不含末端唾液酸和可变量的半乳糖。关于糖基化对抗体功能的作用的综述,参见例如,Wright和Morrison,Trend Biotechnol.[生物技术趋势]15:26-31(1997)。大量的工作显示,抗体聚糖结构的糖组成的改变可以改变Fc效应子功能。对抗体活性有贡献的重要的碳水化合物结构被认为是经由 α -1,6连键附接至Fc区N-连接的寡糖的最里面的N-乙酰葡萄糖胺(GlcNAc)残基的岩藻糖残基(Shields等人,2002)。

[0323] Fc γ R结合需要共价地在人IgG1、IgG2或IgG3类型的Fc区中的保守Asn297处附接的寡糖的存在。非岩藻糖基化寡糖结构最近已经与大幅增加的体外ADCC活性相关联。“Asn 297”指的是在Fc区中位于大约位置297处的氨基酸天冬酰胺;基于抗体的小幅序列变化,

Asn297还可以位于上游或下游若干氨基酸(通常不多于+3个氨基酸)处。

[0324] 历史上,在CHO细胞中产生的抗体在群体中含有大约2%至6%是非岩藻糖基化的。已经报道YB2/0(大鼠骨髓瘤)和Lec13细胞系(CHO系的凝集素突变体,该突变体具有有缺陷的GDP-甘露糖4,6-脱水酶,导致缺乏作为 α 6-岩藻糖基转移酶底物的GDP-岩藻糖或GDP糖中间体)可产生具有78%至98%非岩藻糖基化种类的抗体。在其他实例中,RNA干扰(RNAi)或敲除技术可以用来改造细胞,以便降低FUT8mRNA转录物水平或完全敲除基因表达完全,并且此类抗体已被报道为含有高达70%非岩藻糖基化的聚糖。

[0325] 结合至KIR3DL2的抗体可以被Asn297处的糖链糖基化。在一个实施例中,抗体将包含恒定区,该恒定区在Fc区中包含改善抗体与Fc γ RIIIa和/或ADCC的结合的至少一个氨基酸改变。

[0326] 在一个方面,这些抗体在它们的恒定区中是低岩藻糖基化的。此类抗体可以包括一个氨基酸改变或可以不包括一个氨基酸改变,但是可以在用以产生这种低岩藻糖基化的条件下产生或处理。在一个方面,抗体组合物包含本文所述的嵌合的、人或人源化抗体,其中在该组合物中至少20%、30%、40%、50%、60%、75%、85%、90%、95%或基本上全部的抗体种类具有包含缺乏岩藻糖的核心碳水化合物结构(例如复杂的、杂合的和高甘露糖的结构)的恒定区。在一个实施例中,提供了一种抗体组合物,该抗体组合物不含有包含核心碳水化合物结构(具有岩藻糖)的抗体。该核心碳水化合物将优选地是在Asn297处的糖链。

[0327] 在一个实施例中,一种抗体组合物,例如一种包含结合至KIR3DL2的抗体的组合物,是Asn297处的糖链被糖基化的,其中这些抗体是部分岩藻糖基化的。部分岩藻糖基化的抗体的特征在于,在Asn297处的糖链内缺乏岩藻糖的抗-KIR3DL2抗体在该组合物中的比例是在20%与90%之间,在20%与80%之间,在20%与50%、55%、60%、70%或75%之间,在35%与50%、55%、60%、70%或75%之间,或在45%和50%、55%、60%、70%或75%之间。任选地,该抗体是人IgG1或IgG3类型。

[0328] 糖链显示可以进一步显示任何特征(例如复杂的、杂合的和高甘露糖的结构的存在和比例),包括附接至来自人细胞的抗体的Asn297上的N-连接的聚糖的特征,或在啮齿动物细胞、鼠类细胞(如CHO细胞)或禽类细胞中重组表达的抗体的特征。

[0329] 在一个实施例中,该抗体被表达于缺乏岩藻糖基转移酶的细胞中,使得该细胞系产生在其核心碳水化合物中缺乏岩藻糖的蛋白质。例如,细胞系Ms704、Ms705以及Ms709缺乏岩藻糖基转移酶基因,FUT8(α (1,6)岩藻糖转移酶),使得在Ms704、Ms705、以及Ms709细胞系中表达的抗体中缺乏在它们的核心碳水化合物上的岩藻糖。这些细胞系是通过使用两个置换型载体由CHO/DG44细胞中的FUT8基因的靶向破坏而产生(参见Yamane等人的美国专利公开号20040110704;和Yamane-Ohnuki等人(2004) *Biotechnol Bioeng* [生物技术与生物工程] 87:614-22,将其披露内容通过引用并入本文)。其他实例已经包括使用反义抑制、双链RNA(dsRNA)干扰、发夹RNA(hpRNA)干扰或包含内含子的发夹RNA(ihpRNA)干扰,以功能性地破坏FUT8基因。在一个实施例中,该抗体表达于具有功能破坏的FUT8基因(该FUT8基因编码岩藻糖基转移酶)的细胞系中,从而通过降低或清除 α 1,6键相关的酶使得在这种细胞系中表达的抗体展现出低岩藻糖基化。

[0330] 在一个实施例中,该抗体表达于被改造为表达糖蛋白修饰糖基转移酶(例如, β (1,4)-N-乙酰葡萄糖胺基转移酶III(GnTHI))的细胞系中,使得在改造的细胞系中表达的抗体展

现出增加的平分型GlcNac结构,这导致了抗体的ADCC活性的提高(Umana等人的PCT公开案WO 99/54342;和Umana等人(1999)Nat.Biotech.[生物技术与生物工程]17:176-180,将其披露内容通过引用并入本文)。

[0331] 在另一个实施例中,该抗体被表达并且该一个或多个岩藻糖基残基是使用岩藻糖苷酶进行裂解的。例如,岩藻糖苷酶 α -L-岩藻糖苷酶将岩藻糖残基从抗体中去除(Tarentino等人(1975)Biochem.[生物化学]14:5516-5523)。在其他实例中,产生抗体的细胞系可以用糖基化抑制剂来处理;Zhou等人Biotech.and Bioengin.[生物技术与生物工程]99:652-665(2008)描述了用 α -甘露糖苷酶I抑制剂几夫碱(kifunensine)对CHO细胞进行处理导致产生了具有非岩藻糖基化的寡甘露糖型N-葡聚糖的抗体。

[0332] 在一个实施例中,该抗体被表达于这样一种细胞系中,该细胞系天然具有低的用于将岩藻糖基添加至与抗体Fc区结合的N-乙酰葡萄糖胺的酶活性,或者不具有该酶活性,例如大鼠骨髓瘤细胞系YB2/0(ATCC CRL 1662)。细胞系的其他实例包括CHO细胞系变种Led 3细胞,其具有降低的将岩藻糖附接至Asn(297)-连接的碳水化合物上的能力,这也导致在该宿主细胞中表达的抗体的低岩藻糖基化(WO 03/035835(Presta等人);以及Shields,RX.等人(2002)J.Biol.Chem.[生物化学杂志]277:26733-26740,将其披露内容通过引用并入本文)。在另一个实施例中,该抗体是表达于禽类细胞中,例如天然地产生具有低岩藻糖含量的抗体的EBx®细胞(维瓦里斯(Vivalis),法国),例如WO 2008/142124。低岩藻糖基化的聚糖还可以是在植物来源的细胞系中产生,例如WO 07/084926A2(比洛克西公司(Bioplex Inc.))、WO 08/006554(Greenovation Biotech GMBH),将其披露内容通过引用并入本文。

[0333] 抗体配制品

[0334] 可用于这些组合物中的药学上可接受的载体包括但不限于离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白例如人血清白蛋白、缓冲物质例如磷酸盐、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的部分甘油酯混合物、水、盐或电解质例如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、纤维素基物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡类、聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段聚合物、聚乙二醇和羊毛脂。该方法包括使所述组合物与所述患者接触的步骤。这种方法将可用于预防和治疗目的二者。

[0335] 对于在给予患者方面的用途,该组合物将被配制为用于给予该患者。组合物可以胃肠外给予,特别是通过静脉内注射或输注技术。

[0336] 这些组合物的无菌可注射形式可为水性或油状悬浮液。这些悬浮液可以按照本领域中已知的技术利用恰当的分散或湿润剂以及悬浮剂来配制。无菌可注射的制剂还可以是在非毒性的、胃肠外可接受的稀释剂或溶剂中的无菌可注射的溶液或悬浮液,例如作为在1,3-丁二醇中的溶液。可采用的可接受的载体以及溶剂有水、林格氏溶液、以及等渗氯化钠溶液。此外,常规采用无菌的固定油作为溶剂或悬浮介质。为此目的,可采用任何温和的非挥发油,包括合成的单甘油酯或二甘油酯。脂肪酸,例如油酸及其甘油酯衍生物可用于制备可注射物,天然的药学上可接受的油类例如橄榄油或蓖麻油、尤其是它们的聚氧乙烯化的形式也是如此。这些油溶液或混悬液也可以含有长链醇稀释剂或分散剂,例如羧甲基纤维素或通常用于配制药学上可接受的剂型(包括乳液和悬浮液)的类似分散剂。其他常用的表面活性剂例如吐温类、司盘类以及其他乳化剂或生物利用率增强剂(通常用于制造药学上

可接受的固体、液体、或其他剂型)也可以用于配制目的。

[0337] 若干种单克隆抗体已经显示在临床情形中是高效的,例如利妥昔(Rituxan)TM(利妥昔单抗)、赫赛汀TM(曲妥单抗)或艾克斯莱尔(Xolair)TM(奥马佐单抗),并且类似的给予方案(即,配制品和/或剂量和/或给予方案)可以用于这些抗体。例如,存在于药物组合物中的抗体可以按照在100mg (10mL) 或500mg (50mL) 一次性小瓶中10mg/mL的浓度提供。

[0338] 其他方面和优点将在以下实验章节中进行披露,它应当被认为是说明性的而不限制本申请的范围。

[0339] 实例

[0340] 实例1-KIR3DL2选择性抗体的产生

[0341] 免疫和筛选

[0342] 通过用重组KIR3DL2-Fc融合蛋白对小鼠进行免疫来产生结合KIR3DL2但不密切相关KIR3DL1的抗体,描述于美国专利公开号US-2015-0232556-A1中。对生长中的杂交瘤的上清液(SN)通过在塞扎里综合征细胞系(HUT78, COU-L) 和HEK-293T/KIR3DL2结构域0-eGFP上进行流式细胞术来测试。通过在96孔板中的有限稀释技术,对选自初始筛选的潜在感兴趣的杂交瘤进行克隆。第二次筛选涉及通过流式细胞术在HUT78、COU-L、HEK-293T/KIR3DL1结构域0-eGFP和HEK-293T/KIR3DL2结构域0-eGFP上,测试亚克隆的上清液来选择感兴趣的杂交瘤。将阳性亚克隆注射到小鼠中以产生腹水,并且将感兴趣的抗体在Biacore测定中测试之前进行纯化,该Biacore测定使用rec KIR3DL2芯片,该测定之后为基于与人表达KIR3DL2的细胞的结合的不同测定形式。

[0343] 将抗体的重链(VH) 和轻链(VL) 可变结构域的序列从每种抗体的cDNA经PCR扩增。将扩增的序列在琼脂糖凝胶上跑电泳,并且然后使用凯杰(Qiagen) 凝胶提取试剂盒纯化。然后使用InFusion系统(Clontech) 根据厂商说明书将VH和VL序列亚克隆到隆萨(Lonza) 表达载体(双基因载体) 中。在测序之后,使用普洛麦格纯化生产(Promega PureYield)TM质粒大量制备系统(Plasmid Maxiprep System) 将含有VH和VL序列的载体制备为大量制备品(Maxiprep)。然后使用英杰公司的脂质转染胺(Lipofectamine) 2000根据厂商说明书,将载体用于HEK-293T细胞转染。产生的抗体包括,尤其是,10G5、2B12、19H12和12B11。

[0344] 表位作图

[0345] 对抗体结合至一系列KIR3DL2突变体进行进一步测试。抗体19H12和12B11未显示出与未突变的野生型KIR3DL2 (WTaKIR3DL2) 结合的任何损失,但失去与具有P179T和S181T取代的突变体11的结合连同与具有V178A和H180S取代的突变体11A1的结合。因此这些抗体19H12、18B10和12B11的主要表位包括残基P179、S181、V178和/或H180。在突变体11中的位置179和181处的这些残基对应于在KIR3DL1中存在的残基(KIR3DL1具有T179和T181)。具体而言残基P179和S181是在KIR3DL2的D1结构域内,并且在HLA结合区(即HLA结合口袋)的KIR3DL2蛋白质上的相对面上。抗体15C11、19H12、18B10和12B11中的每一个具有与具有取代E130S、H131S和R145S的突变体M11A4的降低的结合(对于15C11和19H12,结合全部损失)。在突变体11中的位置179和181处的这些残基对应于在KIR3DL1中存在的残基(KIR3DL1具有T179和T181)。具体而言残基P179和S181是在KIR3DL2的D1结构域内,并且在HLA结合区(即HLA结合口袋)的KIR3DL2蛋白质上的相对面上。邻近于这些突变残基的表面暴露的残基还可以贡献于抗体的表位,包括例如残基N99、H100、E130、H131、F132、V178、H180、P182、Y183、

和Q184(参考SEQ ID NO:1),这些残基位于KIR3DL2表面,是在P179/S181表位区域中但在KIR3DL2突变的区域的外面,这不导致抗体结合损失的(例如,突变体5(残基P66)和突变体8(残基V127))。抗体2B12具有与含I60N和G62S取代的突变体的结合的损失,以及与含P14S、S15A和H23S取代的突变体的结合的降低,但不损失与任何其他突变体的结合。因此这些抗体的主要表位包括残基I60和/或G62(并且该表位任选地进一步包括P14、S15、以及H23中的一种或多种)。残基60和62是在KIR3DL2的D0结构域内。残基14、15、23、60和61是在KIR3DL2的D0结构域内。

[0346] 抗体增加可用细胞表面KIR3DL2受体的数量

[0347] 第1部分:

[0348] 染色条件对表达KIR3DL2的细胞的2B12标记的影响

[0349] 该研究旨在评估染色条件对表达KIR3DL2的细胞的2B12标记的影响,在4℃或37℃下对总细胞进行门控,并且孵育时间为2小时、4小时或24小时。简言之,将每孔100,000个HUT78细胞与从0.0005μg/ml起始至30μg/ml的一定剂量范围2B12抗体一起孵育(在完全培养基中连续稀释1/3)。使用的方案如下所示:孵育2H;4H并在4℃和37℃下过夜;在RPMI 10%中染色,具有或没有PFA固定;在SB中洗涤2次(150μl/w);在4℃下加入抗-人-Fc PE持续30min;在SB中洗涤2次(100μl/w);并且使用FACS CANTO II检测。

[0350] 结果示于图1A中。虽然预期抑制受体内化/循环的在4℃下孵育导致至少相等水平的可用细胞表面KIR3DL2,但用抗体2B12(人IgG1)染色在37℃下高于在4℃下。此外,随着孵育持续时间的增加,观察到更高的中值荧光,在孵育24小时后观察到最大的KIR3DL2表达。

[0351] 第2部分:

[0352] 在过夜孵育后在HUT78肿瘤细胞上检测到总的、游离的和2B12结合的KIR3DL2

[0353] 本研究旨在通过观察结合2B12(人IgG1)、游离(非抗体结合)细胞表面KIR3DL2多肽和总细胞表面KIR3DL2多肽的量来评估与抗体2B12一起孵育20小时对细胞表面KIR3DL2水平的影响。简言之,将HUT78(100,000个细胞/孔)在37℃下与从8.88μg/ml起始(递减)的一定剂量范围2B12抗体一起孵育20h,1/3连续稀释,11个浓度。将剂量范围一式两份,以便进行以下2种染色条件:

[0354] -总KIR3DL2+结合KIR3DL2(GaH IgG Fc-PE+mAb2-APC(非竞争性抗-KIR3DL2 mAb)(10μg/ml)

[0355] -游离KIR3DL2:2B12-PE(10μg/ml)

[0356] 在4℃下在染色缓冲液中进行染色1h,并用FACS Canto II HTS进行分析。结果示于图1B中。暗线/正方形表示抗体2B12,而亮线/圆圈表示同种型对照。可以看出,当用10μg/ml的2B12-PE孵育细胞并用非竞争性抗-KIR3DL2抗体检测游离受体时,可以检测到游离的KIR3DL2受体。可以看出,可以通过将细胞与山羊抗-人IgG Fc-PE二级Ab一起孵育来检测2B12结合的KIR3DL2受体。两个读数均是相关的,具有相似的EC₅₀。最右边的图示出,与2B12孵育20小时增加了细胞表面处的KIR3DL2受体水平,如通过非竞争性抗-KIR3DL2抗体mAb2-APC所检测。抗体2B12可以在结合时引起构象变化,在细胞表面处引起受体稳定化/积累和/或内化/再循环阻断。

[0357] 第3部分:

[0358] 在1、24或48小时后在HUT78肿瘤细胞上检测到总的、游离的和2B12结合的KIR3DL2

[0359] 本研究旨在通过观察与抗体2B12孵育不同时间段后总的、游离的和2B12结合的KIR3DL2的量来评估KIR3DL2受体表达的动力学。简言之,将HUT78细胞(50,000个细胞/孔)在37℃下在完全培养基中与2B12(人IgG1)一起孵育1h、24h或48h,剂量范围从10μg/ml起始(递减),1/3连续稀释,11种浓度,或与同种型对照(IC)一起孵育,剂量范围从10μg/ml起始(递减),1/3连续稀释,11种浓度。将剂量范围一式三份,以便进行3种染色条件:

[0360] -结合KIR3DL2(在4℃下30min):GaH IgG Fc-PE,

[0361] -游离KIR3DL2+总KIR3DL2(在4℃下1h):2B12-PE(10μg/ml)+mAb2-APC(非竞争性抗-KIR3DL2)(10μg/ml),

[0362] -总KIR3DL2(在4℃下1h+30min):2B12(10μg/ml)+GaH IgG Fc-PE。

[0363] 在4℃下在染色缓冲液中进行染色,并用HTFC Intellicyt进行分析。

[0364] 结果示于图1C中。在这些培养条件下(96孔板,50,000个HUT78/孔,在T0下),细胞表面处的KIR3DL2检测在没有任何Ab的情况下降低(如由mAb2-APC、2B12-PE或2B12+GaH-PE所检测,Y轴上的点)。

[0365] 在37℃下与2B12一起孵育以剂量依赖性方式增加KIR3DL2的表面表达(如通过非竞争性mAb2或通过2B12本身+次级Ab所检测)。同种型对照未产生KIR3DL2的任何变化。在37℃下1h后已经观察到这种增加,并且在24h后似乎达到其最大值。24h后染色是最佳的(就总染色和检测到的Ab结合受体而言)。

[0366] 抗体不内化到塞扎里综合征细胞系中

[0367] 使用HUT78 SS细胞系通过荧光显微镜评价抗体10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、13H1、4B5、5H1、1E2、1C3和20E9以及抗体AZ158(作为比较的抗-结构域0mAb)和如PCT申请WO 2014/044686和WO 2014/044681中披露的其他抗-D1抗体的内化。

[0368] 材料与方法:

[0369] 将Hut-78细胞在4℃下在1H期间4℃与10μg/ml不同抗体一起孵育。在该孵育后,将细胞固定(t=0H)或在37℃下孵育2H。然后将孵育2H的细胞固定并染色。使用偶联至Alexa594(英杰公司,A11032)的山羊抗小鼠抗体染色抗体。使用通过偶联至FITC(Abcam ab6717)的山羊抗-兔多克隆抗体揭示的兔抗-LAMP-1抗体(Abcam,ab24170)对LAMP-1室进行染色。使用Apotome装置(Zeiss)获取图片并使用Axiovision软件进行分析。

[0370] 结果:

[0371] 抗-KIR3DL2 mAb以红色可见,而LAMP-1室以绿色可见。在添加抗体时,KIR3DL2染色在细胞表面处以红色可见,而绿色的LAMP-1在细胞内以绿色可见。然而,在添加抗体后2小时,抗体AZ158、13H1和4B5以及抗-D1抗体各自引起红色染色与绿色染色共定位,同时细胞表面处的红色染色减少,这表明AZ158、13H1和4B5,以及抗-D1抗体快速内化。然而,抗体10F6、2B12、18C6、9E10、10G5、5H1、1E2、1C3和20E9未被内化,并且在添加抗体后2小时,红色染色完全保留在细胞表面上。

[0372] 抗体能够经由抗体依赖性细胞毒性(ADCC)杀灭表达KIR3DL2的靶标

[0373] 在基于放射性的⁵¹Cr释放实验中对通过ADCC机制的细胞裂解进行监测(从预负载的靶细胞释放的放射性水平与它们的死亡是呈比例的)。在37℃使一百万靶标细胞负载⁵¹Cr持续1小时,并且洗涤3次。每个孔(U形底96-孔板)接种3,000个细胞,并且以10或20μg/ml最终浓度(或如果研究剂量-响应关系的话以递增浓度)添加测试mAb。以限定的效应子:靶标

比率(通常为10:1)添加效应细胞,并且将混合物在37℃孵育4h。将上清液在Lumaplate设备上进行分析。

[0374] 以相同的用以杀灭KIR3DL2-转染的B221靶细胞的最终浓度(10 μ g/ml)测试实例1中选择的抗-KIR3DL2 mAb。mAb有效介导针对表达KIR3DL2的B221靶标的ADCC。

[0375] 实例2-在表达KIR3DL2的人肿瘤的小鼠异种移植物模型中的活性

[0376] 肿瘤细胞系B221和RAJI被制造为表达人KIR3DL2。用于B221-KIR3DL2的免疫受损的小鼠和RAJI-KIR3DL2模型是购自查尔斯河实验室(Charles River Laboratories)的NOD-SCID。在以下模型中,在0天(D0)即在治疗开始之前1天(D1),将5百万个人B221-KIR3DL2或RAJI-KIR3DL2肿瘤细胞(在100 μ l作为媒介物的PBS中)通过静脉注射(IV)移入。从D1,将小鼠通过静脉注射(IV)不同剂量的稀释于PBS中的抗-KIR3DL2 mAb(剂量适应小鼠体重)来处理,每周注射2次,持续整个实验时期。

[0377] 对照组取决于实验包括:

[0378] -PBS/安慰剂处理的小鼠,作为正常/未受影响的肿瘤生长的对照;

[0379] -用相同剂量的、同种型对照匹配的、针对不相关抗原的mAb注射的小鼠。

[0380] 取决于模型,每2至5天对小鼠称重,并观察临床征象。体重变化的百分比被计算为相比于在肿瘤移入之前在D0时的体重或相比于在实验期间达到的最高体重。对小鼠死亡或重要的重量损失进行记录,并且用于绘制卡普兰-迈耶存活曲线并计算与小鼠对照组相比时在存活方面的改进。

[0381] 对IgG2b同种型鼠抗-KIR3DL2 19H12抗体(以300 μ g/小鼠给予,每周两次)的功效分别针对SC B221-KIR3DL2异种移植物或RAJI-KIR3DL2异种移植物(n=6NOD-SCID小鼠/组)进行测试。用抗-KIR3DL2抗体处理的动物显示出相比于用同种型对照匹配的mAb处理的小鼠在存活方面的增加。

[0382] 实例3-改进的检测方法揭露KIR3DL2阳性肿瘤

[0383] 获得来自RAJI-KIR3DL2模型和RAJI-KIR3DL2细胞系的肿瘤活检样品,并且使用AZ158抗体(参见W02010/081890)或抗体12B11(参见实例1)对冷冻样品进行染色。通过DAB生色检测根据标准方案(这些标准方案被改编用于用基准(BenchMark)XT Ventana Roche进行免疫染色),将KIR3DL2用抗-KIR3DL2抗体染色。对于所有染色,进行对照同种型(mIgG1)和对照DAB。令人惊讶地是,在抗体的相同浓度(5 μ g/ml)下使用12B11抗体时,虽然AZ158是阴性的,肿瘤却是阳性的(参见图1)。提高抗体AZ158的浓度(至50 μ g/ml)产生广泛背景染色,不允许肿瘤样品与健康组织区分开来。

[0384] 接着,将先前用AZ158染色的来自癌症患者的肿瘤活检样品使用抗体12B11进行重新检查。采用AZ158时已呈KIR3DL2阴性的活检样品被12B11染色(即变为KIR3DL2-阳性)。

[0385] 实例4:NK裂解能力测定

[0386] 在基于放射性的⁵¹Cr释放实验中对通过ADCC机制的细胞裂解进行监测(从预负载的靶细胞HUT78(ATCC参考TIB-161™,获自LGC Standards公司)释放的放射性水平与它们的死亡是呈比例的)。简言之,在一定剂量范围IPH4102 mAb(人源化2B12 mAb)存在下,将来自健康供体的人外周血单核细胞(PBMC)与HUT78靶细胞系(KIR3DL2⁺)一起孵育。使用为100的E:T比率,在4小时的铬释放测定中监测PBMC对HUT78细胞的裂解。

[0387] 效应细胞制备

[0388] 在CPT管上取出人血液(每个供体含有7-8ml血液, n=6至8个管)。在收集后30分钟内, 在室温(RT)下, 将CPT管在1500g下以低加速度和低制动力离心30分钟。在离心后, 将分离凝胶上方上清液中的单核细胞转移到50ml锥形管中(将2至3个CPT管的内容物合并到一个50ml管中), 用RPMI-1640完成至50ml并在RT下以600g离心10分钟。将所有细胞沉淀合并到一个50ml锥形管中, 并用50ml RPMI-1640洗涤(离心10min, 130g, RT)。通过在细胞沉淀上加入1ml冷NH₄Cl并在RT下孵育5-10min, 可以在该步骤进行剩余的红细胞(RBC)裂解。当需要RBC裂解时, 通过用RPMI-1640将管填充至50ml进行另外的洗涤步骤(离心10min, 130g, RT)。将细胞沉淀重悬于20ml CCM中, 并使用Cellometer细胞计数器通过用台盼蓝染色排除死细胞来计数PBMC。

[0389] 用CCM将PBMC浓度调节至 6×10^6 个细胞/ml用于靶细胞裂解测定(⁵¹Cr释放, 50μl/w = 3×10^5 个细胞), 和调节至 2.5×10^6 个细胞/ml用于NK细胞激活测定(CD137表达, 50μl/w = 1.25×10^5 个细胞)。

[0390] 靶细胞制备

[0391] 使用Cellometer细胞计数器, 通过用台盼蓝染色排除死细胞来计数HUT78靶细胞。通过在圆底14ml聚丙烯管中的细胞沉淀上加入50μCi的⁵¹Cr/ 10^6 个细胞, 用⁵¹Cr标记 2×10^6 个细胞, 并在37℃下孵育1h。在铬标记后, 用10ml CCM洗涤细胞3次(离心5min, 500g, RT)。使用Kovaslide, 通过用台盼蓝染色排除死细胞来计数细胞。将细胞浓度调节至 3×10^4 个细胞/ml (100μl/w = 3×10^3 个细胞)。

[0392] mAb溶液制备

[0393] 在CCM中制备抗-KIR3DL2抗体(1.6ml)、阴性同种型对照(1.6ml)和阿仑单抗(抗-CD52, 阳性对照, 1.2ml)的4X溶液(50μl/w, 最终200μl/w), 并且在台式离心机中在4℃下以最大速度(16100g)离心10min(以消除潜在的聚集体)。

[0394] 最高测试浓度对于同种型对照和阿仑单抗是10μg/ml(即40μg/ml为4X溶液)并且对于抗-KIR3DL2抗体是8.88μg/ml(即35.5μg/ml为4X溶液)。通过将400μl mAb溶液转移到1.2ml CCM中, 在96-深孔板中进行同种型对照和抗-KIR3DL2抗体的1/4系列稀释。测试了两种Ab的11种浓度, 而阿仑单抗仅在10μg/ml下测试。

[0395] 测定程序

[0396] 将mAb溶液(50μl/w)从96深孔板转移到U形底板中, 一式三份。将效应细胞(PBMC, 50μl/w)和负载有⁵¹Cr(HUT78, 100μl/w)的靶细胞加入孔中。最终E/T比率是100/1。在分别含有培养基中的靶细胞和培养基+2% Triton X-100中的靶细胞的专用孔(每板n=8)中测量靶细胞的自发和最大铬释放。将板以300g离心1分钟, 然后在37℃下孵育4小时。在孵育4h后, 将板以300g离心3分钟, 并将50μl上清液转移到含有闪烁体的Lumaplate中。使上清液在56℃下干燥, 并使用TopCount NXT™微孔板闪烁计数器(珀金埃尔默公司(Perkin Elmer))定量释放到培养上清液中的铬。

[0397] 使用以下公式计算靶细胞的特异性裂解:

$$[0398] \quad \text{特异性裂解(\%)} = \frac{(\text{实验释放} - \text{自发释放})}{(\text{最大释放} - \text{自发释放})} \times 100$$

[0399] 实例5-基于NK细胞%裂解活性的模型的开发以确定抗-KIR3DL2抗体的剂量

[0400] 通常使用二室模型, 对治疗性mAb的药代动力学建模(Dirks和Meibohm, 2010;

Lobo等人,2004;Morell等人,1970;Roskos等人,2004)。将根据实例1获得的抗-KIR3DL2抗体2B12人源化(表D中所示的VH和VL氨基酸序列;还参见WO 2015/136052,将其披露内容通过引用并入本文);抗体(称为IPH4102)作为全长人IgG1同种型抗体产生,并在食蟹猴和小鼠中进行评估。基于食蟹猴和小鼠二者的临床前PK结果,预期IPH4102展示出与人体中其他治疗性mAb相似的PK特性,除了化合物特异性靶介导的作用。在SS和MF患者中,除了KIR3DL2⁺正常淋巴细胞之外,IPH4102还将结合血液和组织中的KIR3DL2⁺肿瘤细胞。预计靶介导的药物处置(TMDD)可能影响人体中IPH4102的PK。因此,用于描述TMDD的参数包括在PK模型中。

[0401] 最终的PK模拟模型是具有平行一阶和可饱和消除途径的二室模型,如图2所示。该TMDD模型可以用于描述IPH4102的预计人PK,并且包括:

[0402] -二室分布(从血液到外周),其特征在于室隔间隙(Q)以及中央和外周室的分布体积(分别为V_c和V_p)。

[0403] -从中央室的一阶消除,其特征在于单个间隙参数,CL。

[0404] -中央和外周最大靶结合能力(分别为TB_{峰c}和TB_{峰p}),描述IPH4102的量,其可以分别在中央和外周室中在完全饱和时由可用的KIR3DL2抗原结合。该系统中动力学的特征在于缔合的速率常数K_{on},解离的速率常数K_{off},和KIR3DL2阳性细胞的转换率K_{细胞}。在实践中,缔合的速率常数K_{on}确定为K_{on}=K_{off}/K_D,其中K_D是IPH4102与KIR3DL2结合的亲和力。

[0405] 将PK模型扩展到包括人体中预测的IPH4102血清浓度与NK细胞裂解能力之间的关联,以及KIR3DL2饱和度预测。

[0406] 将使用单一效能参数EC₅₀的标准E_{max}型关系用于描述IPH4102浓度(Conc)与NK溶解能力之间的关联,如例如在⁵¹Cr释放测定中通过获得的最大肿瘤细胞裂解的百分比(=肿瘤细胞裂解/饱和时最大肿瘤细胞裂解×100)测量:

[0407] $NK裂解能力\% = 100 \times Conc / (Conc + EC_{50})$

[0408] 用于治疗性mAb的室中的最大靶结合(TB_峰)可以如下计算:TB_峰=Rec×C_{细胞}×V×A_N×MW_{mAb}×10⁹

[0409] 其中:

[0410] Rec是受体密度=靶受体/细胞的数量,

[0411] C_{细胞}是室中靶阳性细胞的浓度(数量/mL),

[0412] V是室的体积,

[0413] A_N是阿伏伽德罗常数,用于将实体数转换为摩尔数=6.023×10²³/mol,

[0414] MW_{mAb}是IPH4102的分子量=150,000g/mol,并且

[0415] 10⁹从g转换为ng。

[0416] PK/PD模型的结构描述于图1中。基于体外数据和文献信息得出该模型的每个室的参数,如以下进一步描述。

[0417] 基于食蟹猴和小鼠二者的临床前PK结果鉴定参数(CL、V_c、Q、V_p)的值,显示IPH4102预期展示与人体中的其他治疗性mAb相似的PK特性,从而定义人体中IgG的标准二室模型。

[0418] 测定了对血液中正常免疫细胞的靶结合能力。简言之,使用来自健康志愿者的非介入性、单中心描述性和前瞻性开放研究的结果来确定表达KIR3DL2的淋巴细胞的总数。总

共40名志愿者入选了两个群组,群组1包括20名年龄低于60岁的志愿者,并且群组2包括20名年龄超过61岁的志愿者。将由每个供体的血液配制品给出的白细胞(WBC)的数量用于标准化流式细胞术数据。处理新鲜全血样品并用一组荧光染料缀合的mAb(8色组合)分析以定义血细胞亚群。流式细胞术中的门控策略旨在将每个细胞亚群表达为WBC的百分比。通过使用来自血液配制品的这些百分比和WBC数,在每 μL 血液的细胞中定义不同的血细胞亚群。使用PE标记的抗-KIR3DL2 mAb(1至10个管的平均值),将淋巴细胞和饱和的MESF中KIR3DL2⁺免疫细胞群的绝对数量(1至10个管的平均值)用于计算人体中淋巴细胞上KIR3DL2受体的总数。

[0419] 最初没有关于KIR3DL2⁺淋巴细胞的组织与血液比率的具体信息。因此,基于表达KIR3DL2的血液淋巴细胞的数量估计对组织中正常免疫细胞的靶结合能力,并且假设KIR3DL2⁺细胞具有与其他淋巴细胞的一般分布相似的分布,其中组织中的细胞数量比血液中高大约50倍。假设KIR3DL2受体密度在血液与组织之间是相当的。

[0420] 评价SS患者对血液中白血病肿瘤细胞的靶结合能力。为了评估SS患者中IPH4102对血液肿瘤细胞的靶结合,基于血液配制品计数和全血细胞中CD3⁺CD4⁺KIR3DL2⁺细胞的%,使用PE标记的抗-KIR3DL2 mAb在9名SS患者中测定KIR3DL2⁺肿瘤细胞的总数。确定每个患者在原发性塞扎里肿瘤细胞的细胞表面处表达的KIR3DL2分子的数量。计算KIR3DL2⁺肿瘤细胞(CD4⁺CD3⁺KIR3DL2⁺)的绝对数量的所有测量值的平均值。评估SS肿瘤细胞的细胞表面处的KIR3DL2密度。

[0421] 对于组织中肿瘤细胞的靶结合能力,对于CTCL患者最初没有关于皮肤中肿瘤T细胞总数的具体信息。由于总皮肤驻留T细胞被评估为200亿个细胞,因此假定总肿瘤KIR3DL2⁺ T细胞将不大大超过该水平,并且肿瘤细胞上的中值KIR3DL2密度被假设与SS患者中的循环肿瘤细胞相似。结果是发现,组织中肿瘤细胞产生的TB_峰与循环肿瘤细胞上IPH4102与KIR3DL2的靶结合能力范围相同,如在SS患者中观察到的。

[0422] 靶向介导的处置的机制限于NK和肿瘤细胞的规则更新,假设其独立于IPH4102浓度。

[0423] 体外亲和力(K_D)和解离速率(K_{off})。用PE标记的IPH4102在KIR3DL2转染的细胞系、表达KIR3DL2的塞扎里综合征(SS)肿瘤细胞系和从患者血液样品收集的SS原发性肿瘤上进行的浓度-响应流式细胞术实验中评估IPH4102对KIR3DL2的体外结合亲和力。使用重组人KIR3DL2蛋白(对Biacore的平均二价结合亲和力),在NK细胞上门控的来自健康志愿者的全血的流式细胞术实验中和在表面等离子体共振(SPR)实验中证实IPH4102与KIR3DL2结合的浓度-响应。

[0424] 在KIR3DL2⁺塞扎里细胞系(如HuT78或COU-L)和原发性塞扎里肿瘤细胞上用IPH4102进行的体外浓度-响应结合实验揭示,无论KIR3DL2表达水平如何,细胞系和原发性塞扎里细胞上IPH4102结合的EC₅₀是相似的(HuT78为0.06 $\mu\text{g}/\text{mL}$,COU-L为0.087 $\mu\text{g}/\text{mL}$,患者原发性肿瘤细胞为0.07 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。总之,在PK/PD模型中,IPH4102对血液中肿瘤和免疫细胞的结合亲和力设定为70ng/mL。在过夜染色条件下,PE标记对IPH4102对KIR3DL2的亲和力仅具有很小的影响。重要的是,在SPR中发现了相似的亲和力(IPH4102对Biacore上的重组KIR3DL2的平均二价结合亲和力,0.146nM,对应于21.9ng/mL,如下表所示。从SPR实验获得IPH4102与重组KIR3DL2解离的解离速率。使用两步实验装置测定KIR3DL2抗原结合活性。首

先,将IPH4102样品以恒定浓度注射到蛋白-A芯片上(抗体捕获步骤)。其次,将KIR3DL2-His抗原样品以恒定浓度注射到捕获的抗体上(抗原结合步骤),并在注射用于基线校正的再生缓冲液(空白减法)之前使其解离。对于批次间比较,使用结合抗原与捕获的抗体之间的平均($n=3$)反射单位(RU)比率作为比较指数(0.4)。

[0425] 使用三价结合的解离速率的三次测定的平均值($1.4 \times 10^{-4} \text{s}^{-1}$,对应于 0.504h^{-1})。

[0426] 表:SPR的KIR3DL2结合亲和力

	K_D (nM)			
	N = 1	N = 2	N = 3	平均 K_D
[0427] K_D (nM)	0.1616	0.1314	0.1436	1.46E-01
K_{on} (1/Ms)	9.68E+05	9.53E+05	9.65E+05	9.62E+05
K_{off} (1/s)	1.56E-04	1.25E-04	1.39E-04	1.40E-04

[0428] 为了评估IPH4102在生理环境中的生物学和潜在毒性活性,在与HuT78细胞和增加剂量的IPH4102 mAb共孵育的15个人健康供体PBMC上体外测定IPH4102的体外浓度-响应测定。并行研究了三个读数:通过CD137表达(流式细胞术)激活NK细胞,通过PBMC裂解靶细胞(经典 ^{51}Cr -释放测定)以及5种细胞因子和趋化因子的分泌:IFN- γ 、TNF- α 、IL-6、IL-8、MCP-1。简言之,在一定剂量范围IPH4102 mAb存在下,将来自健康供体的PBMC与HuT78靶细胞系(KIR3DL2 $^{+}$)一起孵育。使用激活标记物CD137,使用为2.5:1的E:T(效应物:靶)比率监测孵育20小时后PBMC中NK细胞的激活。用AlphaLISA技术(珀金埃尔默公司)定量在20h孵育期间在培养上清液中由PBMC产生的细胞因子(CD137测定)。并行地,如实例4所述,使用为100:1的E:T比率,在4小时 ^{51}Cr -释放测定中监测PBMC对HuT78细胞的裂解。

[0429] 选择用于测定给药的与IPH4102安全性和药理学活性最相关的参数作为 ^{51}Cr 释放测定中健康供体的PBMC对HuT78肿瘤细胞的裂解(NK细胞裂解能力)。 ^{51}Cr 释放测定中的中值 EC_{10} 和 EC_{50} ($\pm \text{SD}$)分别是 $2(\pm 2.8) \text{ng/mL}$ 和 $45(\pm 40) \text{ng/mL}$ 。

[0430] 因此,将具有单一效能参数的标准Emax型关系、 ^{51}Cr 释放测定中IPH4102的 EC_{50} ,即 $=45 \text{ng/mL}$,用于描述IPH4102浓度(Conc)与NK细胞介导的肿瘤细胞裂解的最大能力%之间的关联,如通过NK裂解能力%所测量:

[0431] $\text{NK裂解能力}\% = 100 \times \text{Conc} / (\text{Conc} + \text{EC}_{50})$

[0432] 最终参数概述于下表中。

[0433] 表:IPH4102PK/PD模型参数概述

[0434]

参数	描述	值
CL	清除率	0.12 mL/h/kg
Vc	中央分布体积	40 mL/kg
Q	室隔间隙	1 mL/h/kg
Vp	外周分布体积	40 mL/kg
K 细胞 c	血液中 KIR3DL2 阳性细胞（淋巴细胞和肿瘤细胞）的转换率	HD 和 MF 为 0.003/h; SS 为 0.02/h
K 细胞 p	外周中 KIR3DL2 阳性细胞（淋巴细胞和肿瘤细胞）的转换率	HD 为 0.003/h; MF 和 SS 为 0.02/h
K _{off}	解离速率常数	0.504/h
K _D	结合亲和力	70 ng/mL
TB _{峰c}	血液中的靶结合能力	HD 和 MF 为 5 ng/kg; SS 为 198 ng/kg
TB _{峰p}	外周中的靶结合能力	HD 为 257; MF 和 SS 为 450 ng/kg
EC ₅₀	来自健康志愿者的 PBMC 对 HuT 78 肿瘤的裂解的 ⁵¹ Cr-释放测定中的 EC ₅₀ 。	45 ng/mL

[0435] 然后使用软件Phoenix WinNonLin版本6.4进行PD/PK模拟,并且在GraphPad Prism 5版本5.04中完成结果的绘图。将该模型在WinNonLin中实施并用于在一系列剂量水平下向人体静脉内输注IPH4102 1小时后模拟随时间的PK。基于此,鉴定了首次人体(FIH)试验的剂量。用于MABEL计算的所选药理学参数是⁵¹Cr释放测定中健康供体PBMC对Hut 78肿瘤细胞的裂解,其是对SS患者中生物IPH4102介导的响应的保守评估。我们确定了将在HuT 78肿瘤裂解的体外测定中导致低但可辨别的效果的剂量(参见实例4)。采用该测定中的10%响应作为低MABEL响应(EC₁₀=2ng/mL)。因此,特别感兴趣的是在C_峰下导致预定义的10%⁵¹Cr-释放的剂量。基于PK模拟,在健康供体、MF(没有循环肿瘤细胞)和SS(循环肿瘤细胞)患者中预测不同剂量的C_峰、在C_峰下的NK裂解能力的%和在t=3-6h下实现的最大KIR3DL2-占据,并且有助于将FHD鉴定为0.1μg/kg。

[0436] 对于MF和SS患者,多剂量I期临床研究的在第1和第4剂量后的模拟AUC0-7天、C_峰和积累指数呈现于下表中。

[0437] 表:多剂量I期的C_峰和积累指数

[0438]

MF	剂量水平	剂量倍数增加	C _峰 周期 1 (6h)	C _谷 周期 1 (168h)	C _峰 周期 4 (510h)	AUC _{7 天} 周期 1	AUC _{7 天} 周期 4	积累指数
	μg/kg		ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng*h/mL	ng*h/mL	
	0.1	-	2	1	4	176	373	2.67
	1	x10	22	7	37	1770	3923	2.67
	10	x10	216	82	407	18476	47084	2.68
	50	x5	1081	444	2138	95579	254699	2.69
	200	x4	4326	1824	8663	386736	1039066	2.70
	750	x3.75	16226	6890	32597	1455032	3916529	2.72
	1500	x2	32454	13799	65235	2911884	7840478	2.74
	3000	x2	64909	27617	130511	5825602	15688410	2.82
	6000	x2	129820	55253	261062	11653058	31384281	3.01
	10000	x1.6	216368	92101	435131	19423001	52312143	3.29
SS	剂量水平	剂量倍数增加	C _峰 周期 1 (6h)	C _谷 周期 1 (168h)	C _峰 周期 4 (510h)	AUC _{7 天} 周期 1	AUC _{7 天} 周期 4	积累指数
	μg/kg		ng/ml	ng/ml	ng/ml	ng*h/mL	ng*h/mL	
	0.1	-	2	1	3	161	318	2.35
	1	x10	21	7	34	1639	3412	2.35
	10	x10	213	77	394	17818	44704	2.36
	50	x5	1077	436	2121	94584	251534	2.36
	200	x4	4322	1815	8645	385644	1035723	2.37
	750	x3.75	16222	6881	32579	1453914	3913141	2.38
	1500	x2	32449	13790	65216	2910759	7837082	2.39
	3000	x2	64905	27607	130492	5824478	15685020	2.43
	6000	x2	129815	55243	261043	11651930	31380900	2.57
	10000	x1.6	216363	92091	435112	19421868	52308744	2.81

[0439] 在0.1μg/kg的剂量下,在MF和SS患者中,KIR3DL2-占据将保持低于3%并且由IPH4102刺激的NK细胞介导的NK裂解能力的%将保持低于6%。对于MF和SS患者,下表分别总结了对于在C_峰和C_谷下循环中NK裂解能力%的预期值的模拟,MF患者中重复每周给予的第1周期和第4周期,剂量水平高达1500μg/kg。

[0440] 表:MF患者

剂量水平	在 C _峰 周期 1 时的 NK 裂解能力% (6 h)	在 C _谷 周期 1 时的 NK 裂解能力% (168 h)	在 C _峰 周期 4 时的 NK 裂解能力% (510 h)	在 C _谷 周期 4 时的 NK 裂解能力% (672 h)
	μg/kg			
0.1	5	2	7	4
1	32	14	45	28
10	83	65	90	84
50	96	91	98	97
200	99	98	99	99
750	100	99	100	100
1500	100	100	100	100

[0442] 表:SS患者

剂量水平	在 C _峰 周期 1 时的 NK 裂解能力% (6 h)	在 C _谷 周期 1 时的 NK 裂解能力% (168 h)	在 C _峰 周期 4 时的 NK 裂解能力% (510 h)	在 C _谷 周期 4 时的 NK 裂解能力% (672 h)
	μg/kg			
0.1	4	1	7	3
1	31	13	43	25
10	83	63	90	83
50	96	91	98	97
200	99	98	99	99
750	100	99	100	100
1500	100	100	100	100

[0444] 实例6-复发/难治性CTCL的人I期临床试验

[0445] IPH4102 (人源化IgG1抗-KIR3DL2抗体2B12) 目前正在首次人体剂量发现阶段1研究 (NCT02593045) 中进行研究, 从而评估在复发/难治性CTCL患者中重复给予单一药剂IPH4102。

[0446] 主要目标是通过表征剂量限制性毒性和不良事件来评价增加剂量的IPH4102的安全性和耐受性。次要目标包括PK、免疫原性和抗肿瘤临床活性的信号。探索性生物标记物旨在表征涉及组织/室中表达KIR3DL2和非表达细胞并用IPH4102治疗监测它们的变化。分子残留疾病的测量在皮肤、血液和/或淋巴结中进行。在SS患者的给药前还进行离体NK细胞介导的针对自体肿瘤细胞的ADCC的评价。

[0447] 该研究具有两个连续的部分, 剂量递增, 随后是群组扩展部分。剂量递增部分具有3+3设计, 其具有加速滴定并且旨在确定最大耐受剂量 (MTD) 或推荐的2期剂量 (RP2D)。测试的剂量包括: 0.0001mg/kg、0.001mg/kg、0.01mg/kg、0.05mg/kg、0.2mg/kg、0.75mg/kg、1.5mg/kg、3mg/kg、6mg/kg和10mg/kg体重。在扩展部分中, 将研究两个CTCL亚型特异性群组, 每个群组包括10名另外的患者以进一步探索MTD或RP2D。符合条件的CTCL患者必须已接受至少2个先前的抗肿瘤全身疗法线。纳入需要在皮肤或血液中的恶性细胞上集中评价KIR3DL2表达。

[0448] 患者每周接受IPH4102给予直至进展或不可接受的毒性。允许患者内剂量递增, 仅在第5周通过第一次完整的临床评价, 并且提供由安全委员会宣布是安全的下一个剂量水平上限。

[0449] 在已经(或仍在)治疗的14名患者中, 11名患有SS, 2名患有MF并且1名患有CD4+ CTCL, 未另行指定(NOS)。临床评价根据公布的推荐标准化评分系统进行, 用于通过使用描述于Olsen等人(2011) American Society of Clinical Oncology[美国临床肿瘤学会]29, 2598-2607中的复合全局响应评分和临床终点的常见定义, 评价肿瘤负荷并定义皮肤、淋巴结、血液、和内脏的响应。在该系统中, 全局完全响应(CR)被定义为所有疾病临床证据的完全消失, 并且仅在所有涉及的器官, 即所有TNMB类别中记录CR时才可以实现。相反, 任何TNMB类别中的任何进行性疾病(PD)均有资格获得全局PD。在中间情况下, 根据TNMB类别实现部分响应(PR)或稳定疾病(SD)的全局评分(描述于Olsen等人(2011), 同上中。进行的临床评价包括:

[0450] -完全TNMB评分(可能需要成像), 其在给药前进行, 并且然后在第5周(W5)、W14、W26进行, 并且然后每4周进行一次, 直至治疗中止;

[0451] -皮肤特异性mSWAT测量在给药前、在第5周进行, 然后每2周进行一次直至W26, 然后每4周进行一次; 以及

[0452] -血液受累的评价(通过塞扎里细胞计数或免疫表型或细胞形态学)也在给药前、在W5进行, 然后每2周进行一次直至W26, 然后每4周进行一次。

[0453] 临床试验仍在进行中。留在研究中的患者的临床评价详述于下表中:

[0454]

患者	初始剂量 (mg/kg)	给予的数量 剂量	CTCL 亚型	研究开始时的阶段	客观的最佳响应	治疗持续时间(天)
1	0.0001	15	SS	T4N0M0B2	PR(第22周; 0.05 mg/kg)	> 200
2	0.001	12	SS	T4NxM0B2	标准差	133
3	0.01	12	MF	T2N0M0B0 a	PR(第10周; 0.01 mg/kg)	161
4	0.05	11	转化的 SS	T4NxM0B2	PR(第10周; 0.05 mg/kg)	133
5	0.05	7	MF	T2NxM0B0 a	标准差	62
6	0.05	9	SS	T2N0M0B2	标准差	118
7	0.2	9	SS	T4N2aM0B 2	标准差	91
8	0.2	7	SS	T4N2M0B2	标准差	64
9	0.2	7	CD4 T 细 胞(NOS)	TxN0M0	标准差	63
10	0.75	5	SS	T1N0M0B2	标准差	36
11	0.75	4	SS	T4N0M0B2	标准差	27

[0455] 上表还展示了每个患者进入试验的剂量水平、他们接受的IPH4102给予次数、CTCL亚型和研究开始时的TNMB阶段。三名患者经历了全局PR,分别持续了28天、74天和70天,并且仍在进行中。这些响应的发生时间以及发生时接受的剂量水平示于同一列中。

[0456] 特别是对于塞扎里综合征患者,特别注意血液中的临床响应。在参与该研究的五名SS患者中,两名已实现PR并且一名已实现血液中的CR,如下表所示。

[0457]

患者	初始剂量 (mg/kg)	给予的 剂量	CTCL 亚型	研究开始时的 阶段	塞扎里 计数基 线 (细胞 /μL)	塞扎里 计数最 低点 (细胞 /μL)	血液中的 最好响应 (第1次 观察)
1	0.0001	13	SS	T4N0M0B2	5273	507	PR (第5周)
2	0.001	11	SS	T4NxM0B2	19219	3407	PR (第14周)
4	0.05	7	转化的 SS	T4NxM0B2	4644	76	CR (第10周)
6	0.05	7	SS	T2N0M0B2	128	108	标准差
7	0.2	5	SS	T4N2aM0B2	9197	8636	标准差

[0458] 总体而言,仅报告了1级或2级相关不良事件(AE)。没有参与试验的患者经历DLT或任何3-5级相关的AE。直至测试的剂量水平下,未观察到与IPH4102相关的皮疹或感染。

[0459] 离体功能测定结果证实了SS患者的NK细胞具有功能并且能够通过ADCC杀死自体肿瘤细胞。

[0460] IPH4102未导致NK细胞的耗竭。图3示出了在长达50周的时间段内从患者的NK细胞中基线(第1周的第1天)的变化%。图4示出了在长达50周的时间段内患者的NK细胞(NK细胞/μl)的数目。

[0461] 在IPH4102重复给予之前和之后取得的皮肤活检样品中获得初步的IHC结果。在患有SS和MF的患者中观察到IPH4102在皮肤损伤中的药理学活性的信号,其中在一些情况下证实KIR3DL2⁺细胞显著减少。代表性实例包括:

[0462] 患者3患有MF并且以0.01mg/kg剂量水平开始试验。他在筛选时进行了2次活检(B1和B2),分别为54%和26%的KIR3DL2⁺细胞。在第5周,在B1(0.5%)中观察到KIR3DL2染色减少但在B2(32%)中没有观察到,并且在W14,两个损伤均显示KIR3DL2⁺细胞下降(分别为1%和16%)。该患者自第10周起处于全局PR中。

[0463] 患者4患有塞扎里综合征并且以0.05mg/kg剂量水平开始试验,其在筛选时取得的皮肤活检样品中具有52%的KIR3DL2⁺细胞。在第5周,观察到KIR3DL2染色显著减少,仅有4.4%的细胞是KIR3DL2⁺。该患者自研究的第10周起处于全局PR中,具有血液中的CR。

[0464] 患者6患有SS并且以0.05mg/kg开始试验。筛选活检样品显示17.5%KIR3DL2⁺细胞在第5周降至3%。另外,该损伤的组织学在第5周在筛选时从斑块到斑点得到改善。然而,该患者仍处于全局SD(皮肤为SD且血液为SD)中。

[0465] 患者7患有SS并且以0.2mg/kg开始试验。筛选活检样品显示76%KIR3DL2+细胞在第5周保持稳定(62%)。该损伤的组织学也从斑块到斑点得到改善,但该患者仍处于全局SD(皮肤和血液中的SD)中。

[0466] 总之,临床活动初步迹象的中间分析显示,IPH4102能够为重复给药的晚期CTCL患者提供有意义的临床益处;具有响应的患者接受的剂量低至0.0001mg/kg(血液受累响应)或0.01mg/kg(皮肤病响应)。即使在血液受累非常高的患者中也观察到血液(SS患者)中的临床响应(如患者2,其在研究开始时具有超过19,000个血液塞扎里细胞/ μ L血液。有趣的是,在治疗期间观察到相当低于完全NK裂解活性的抗肿瘤效果。此外,在0.01mg/kg剂量水平下,预期IPH4102在皮肤中最多达到极少量的恶性细胞。

[0467] 另外,有趣的是,在没有血液受累的患者(患者3,0.01mg/kg)中观察到抗肿瘤响应(在皮肤中)。这表明IPH4102将用于治疗患有惰性或早期CTCL且无明显血液受累的个体。

[0468] 此外,通过静脉内给予IPH4102治疗皮肤病的能力,而且以低剂量且不耗竭NK细胞(显著部分的NK细胞表达KIR3DL2)无论是在较低还是较高剂量下均是有利的,因为单一给予方案可以用于患有或不患有血液受累和/或具有不同肿瘤负荷的患者。尽管CTCL患者中存在宽范围的血液和皮肤肿瘤负荷,但IPH4102仍有望甚至用于高肿瘤负荷,其剂量低于在这些高负荷患者中占据肿瘤细胞上KIR3DL2将需要的剂量,这表明高剂量治疗不需要在这些患者中使用以便维持KIR3DL2在恶性细胞(例如,皮肤中)上的饱和,并且另外地可以使用单一的非NK耗竭治疗方案而不依赖于血液或皮肤肿瘤负荷水平(通常认为在组织中实现完全受体占据需要抗体的血液浓度是实现循环中完全占据所需的至少10倍)。该试验的最终结果证实了IPH4102在该老年人和经过大量预处理的患者群体(n=25)中的良好安全性和有希望的活性。在1.5mg/kg剂量水平下或其之上(1.5、3、6和10mg/kg),无论注射方案如何,在所有患者中均实现了血液肿瘤细胞饱和,而不管其血液肿瘤负荷如何。20名患有塞扎里综合征的患者的客观响应率是50%;分别地,ORR4(持续至少4个月以上的响应率)是40%,疾病控制率(DCR)是90%,中值响应持续时间(DOR)是9.9个月并且中值无进展生存期(PFS)是10.8个月。数据显示具有全局临床响应的患者的瘙痒症显著改善,且患有稳定疾病的患者也显著改善。

[0469] 本文所引用的所有参考文献(包括出版物、专利申请、和专利)均通过引用以其全文特此结合,并且引用的程度如同每个参考文献被个别地并且明确地指示通过引用结合并且以其全文在本文中阐述(至法律允许的最大程度),而不考虑本文其他地方做出的具体文件的任何单独提供的结合。

[0470] 除非本文另外指示或与上下文明显矛盾,否则在描述本发明的上下文中,术语“一个/种”和“该”以及类似指称对象的使用应解释为包括单数和复数二者。

[0471] 除非另有说明,否则所有本文提供的精确值均代表相应的近似值(例如,所有精确的示例值是相对于具体因子提供的,或者测量可以视为还包括提供相应的近似测量,在适当时由“约”修饰)。

[0472] 除非另外陈述或与上下文明显矛盾,否则本文对于使用了涉及一种或多种要素的术语如“包含”、“具有”、“包括”或“含有”的本发明的任何方面或实施例的描述,旨在提供对“由那一种或多种特定要素组成”、“基本上由那一种或多种特定要素组成”或“基本上包含那一种或多种特定要素”的本发明的类似方面或实施例的支持(例如,除非另外陈述或与上

下文明显矛盾,否则本文所述的包含特定要素的组合物应理解为也描述由那个要素组成的组合物)。

[0473] 本文提供的任何和所有实例或示例性语言(如“例如”)的应用仅旨在更好地说明本发明,而不对另外要求保护的本发明范围做出限制。说明书中的语言不应当被解释为指示任何未要求保护的要素为实践本发明所必需的。

序列表

<110> 依奈特制药公司 (INNATE PHARMA)

<120> 用抗-KIR3DL2药剂进行治疗

<130> KIR-7

<150> US 62/410,880

<151> 2016-10-21

<160> 109

<170> PatentIn版本3.5

<210> 1

<211> 434

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

```

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

```

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

Val Phe

<210> 2

<211> 5

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 2

Ser Tyr Thr Met His

1

5

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 3

Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Glu Asn Asn Arg Lys Phe

1 5 10 15

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 4

Arg Leu Gly Lys Gly Leu Leu Pro Pro Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 5

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Asn Leu Ala

1 5 10

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 6

Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp

1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 7

Gln His Phe Trp Gly Thr Pro Tyr Thr

1 5

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 嵌合

<400> 8

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

<210> 9

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 嵌合

<400> 9

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

<210> 10

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 嵌合

<400> 10

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

<210> 11

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 嵌合

<400> 11

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

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 嵌合

<400> 12

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

<210> 13

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 嵌合

<400> 13

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

				85					90					95			
Ala	Arg	Leu	Gly	Lys	Gly	Leu	Leu	Pro	Pro	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln		
				100					105					110			
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
				115					120								
<210>	14																
<211>	120																
<212>	PRT																
<213>	人工																
<220>																	
<223>	嵌合																
<400>	14																
Gln	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala		
1				5					10					15			
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr		
				20					25					30			
Thr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile		
				35					40					45			
Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Ser	Gly	Tyr	Thr	Glu	Asn	Asn	Arg	Lys	Phe		
				50					55				60				
Lys	Asp	Lys	Thr	Thr	Met	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr		
65					70					75					80		
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys		
				85					90					95			
Ala	Arg	Leu	Gly	Lys	Gly	Leu	Leu	Pro	Pro	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln		
				100					105					110			
Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser										
				115					120								
<210>	15																
<211>	120																
<212>	PRT																
<213>	人工																
<220>																	
<223>	嵌合																
<400>	15																
Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala		
1				5					10					15			
Ser	Val	Lys	Met	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr		
				20					25					30			

Thr	Met	His	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
	35						40					45			
Gly	Tyr	Ile	Asn	Pro	Ser	Ser	Gly	Tyr	Thr	Glu	Asn	Asn	Arg	Lys	Phe
	50					55					60				
Lys	Asp	Lys	Thr	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70				75					80	
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Arg	Leu	Gly	Lys	Gly	Leu	Leu	Pro	Pro	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln
			100					105					110		
Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser								
	115						120								

<210> 16

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 嵌合

<400> 16

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

<210> 17

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 嵌合

<400> 17

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

<210> 18

<211> 5

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 18

Thr Ala Gly Met Gln
 1 5

<210> 19

<211> 16

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 19

Trp Ile Asn Ser His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala Glu Asp Phe Lys
 1 5 10 15

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 20

Gly Gly Asp Glu Gly Val Met Asp Tyr

1 5
 <210> 21
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 小家鼠
 <400> 21
 Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
 1 5 10
 <210> 22
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 小家鼠
 <400> 22
 Trp Thr Ser Thr Arg His Thr
 1 5
 <210> 23
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 小家鼠
 <400> 23
 Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
 1 5
 <210> 24
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> 人工
 <220>
 <223> 嵌合
 <400> 24
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
 20 25 30
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Trp Thr Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
 65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 25

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 嵌合

<400> 25

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Thr Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 26

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 嵌合

<400> 26

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Trp Thr Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly

$\langle 210 \rangle$	27
$\langle 211 \rangle$	107
$\langle 212 \rangle$	PRT
$\langle 213 \rangle$	人工
$\langle 220 \rangle$	
$\langle 223 \rangle$	嵌合
$\langle 400 \rangle$	27

$\langle 210 \rangle$	28
$\langle 211 \rangle$	107
$\langle 212 \rangle$	PRT
$\langle 213 \rangle$	人工
$\langle 220 \rangle$	
$\langle 223 \rangle$	嵌合
$\langle 400 \rangle$	28

77

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

<210> 29

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 嵌合

<400> 29

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

<210> 30

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 嵌合

<400> 30

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

<210> 31

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 嵌合

<400> 31

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

115

<210> 32

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 嵌合

<400> 32

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

115

<210> 33

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 嵌合

<400> 33

Gln	Ile	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ser	Glu	Leu	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Thr	Ala
			20					25					30		
Gly	Met	Gln	Trp	Val	Gln	Lys	Thr	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
			35				40					45			
Gly	Trp	Ile	Asn	Ser	His	Ser	Gly	Val	Pro	Lys	Tyr	Ala	Glu	Asp	Phe
	50					55				60					

Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	His	Lys	Phe	Met	Ser	Thr	Ser	Val	Gly
1				5					10					15	
Asp	Arg	Val	Ser	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Val	Ser	Thr	Ala
			20					25					30		
Val	Ala	Trp	Tyr	His	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile

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

<210> 36

<211> 117

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 36

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

<210> 37

<211> 107

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 37

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Ser Phe Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala
20 25 30

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

<210> 38

<211> 139

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 38

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

<210> 39

<211> 107

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 39

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ser	Val	Ser	Val	Gly
-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----

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

<210> 40

<211> 119

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 40

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

<210> 41

<211> 111

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 41

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

<210> 42

<211> 117

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 42

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

Thr Leu Thr Val Ser
 115

<210> 43

<211> 113

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 43

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

Lys

<210> 44

<211> 120

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 44

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

<210> 45

<211> 113

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 45

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

Lys

<210> 46

<211> 107

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 46

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

<210> 47

<211> 118

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 47

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

<210> 48

<211> 115

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 48

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

115

<210> 49

<211> 120

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 49

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

<210> 50

<211> 112

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 50

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

Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 51

<211> 5

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 51

Ile Ala Gly Met Gln

1 5

<210> 52

<211> 6

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 52

Gly Tyr Thr Phe Thr Ile

1 5

<210> 53

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 53

Gly Tyr Thr Phe Thr Ile Ala Gly Met Gln

1 5 10

<210> 54

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 54

Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys Tyr Ala Glu Asp Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 55

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 55

Trp Ile Asn Thr His Ser Gly Val Pro Lys

1 5 10

<210> 56

<211> 6

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 56

Gly Tyr Thr Phe Thr Thr

1 5

<210> 57

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 57

Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Ala Gly Met Gln

1 5 10

<210> 58

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 58

Trp Ile Asn Ser His Ser Gly Val Pro

1 5

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 59

Gly Gly Asp Glu Gly Val Met Asp Tyr Trp

1 5 10

<210> 60

<211> 6

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 60

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser

1 5

<210> 61

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 61

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Thr Met His

1 5 10

<210> 62

<211> 8

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 62

Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr

1 5

<210> 63

<211> 12

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 63

Arg Leu Gly Lys Gly Leu Leu Pro Pro Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 64

<211> 5

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 64

Gly Tyr Thr Met Asn

1 5

<210> 65

<211> 6

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 65

His Tyr Ser Phe Ile Gly

1 5

<210> 66

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 66

His Tyr Ser Phe Ile Gly Tyr Thr Met Asn

1 5 10

<210> 67

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 67

Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 68

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 68

Leu Ile Asn Pro Tyr Asn Gly Asp Thr Thr

1 5 10

<210> 69

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 69

Glu Asn Trp Gly Tyr Pro Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 70

<211> 5

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 70

Asp Tyr Ala Met Asn

1 5

<210> 71

<211> 6

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 71

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp

1 5

<210> 72

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 72

Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ala Met Asn

1 5 10

<210> 73

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 73

Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Ala Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 74

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 74

Val Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Ala Asn

1 5 10

<210> 75

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 75

Ile Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Ser Tyr

1 5

<210> 76

<211> 5

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 76

Ser Tyr Thr Met His

1 5

<210> 77

<211> 6

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 77

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser

1 5

<210> 78

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 78

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Thr Met His

1 5 10

<210> 79

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 79

Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 80

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 80

Tyr Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Asp

1 5 10

<210> 81

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 81

Leu Gly Lys Gly Leu Leu Pro Pro Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 82

<211> 5

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 82

Ser Tyr Trp Met Gln

1 5

<210> 83

<211> 6

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 83

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser

1 5

<210> 84

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 84

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Met Gln

1 5 10

<210> 85

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 85

Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 86

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 86

Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg

1 5 10

<210> 87

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 87

Arg Tyr Asp Gly Tyr Tyr His Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 88

<211> 5

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 88

Thr Tyr Trp Met Gln

1 5

<210> 89

<211> 6

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 89

Gly Phe Thr Phe Thr Thr

1 5

<210> 90

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 90

Gly Phe Thr Phe Thr Thr Tyr Trp Met Gln

1 5 10

<210> 91

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 91

Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 92

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 92

Ala Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg

1 5 10

<210> 93

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 93

Arg Gly Asp Tyr Gly Asn Tyr Gly Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 94

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 94

Gln Gln His Tyr Asn Thr Pro Trp Thr

1 5

<210> 95

<211> 15

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 95

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Phe Gly Ile Ser Phe Met Asn

1 5 10 15

<210> 96

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 96

Ala Ala Ser Asn Gln Gly Ser

1 5

<210> 97

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 97

Gln Gln Ser Lys Glu Val Pro Tyr Thr

1 5

<210> 98

<211> 16

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 98

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 99

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 99

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 100

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 100

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Pro Tyr Thr

1 5 10

<210> 101

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 101

Lys Ser Asn Gln Asn Leu Leu Trp Ser Gly Asn Gln Arg Tyr Cys Leu

1 5 10 15

Val

<210> 102

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 102

Trp Thr Ser Asp Arg Tyr Ser

1 5

<210> 103

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 103

Gln Gln His Leu His Ile Pro Tyr Thr

1 5

<210> 104

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 104

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Trp Ser Val Asn Gln Lys Asn Tyr Leu

1 5 10 15

Ser

<210> 105

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 105

Gly Ala Ser Ile Arg Glu Ser

1 5

<210> 106

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 106

Gln His Asn His Gly Ser Phe Leu Pro Leu Thr

1 5 10

<210> 107

<211> 16

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 107

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 108

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 108

Lys Val Ser Asn His Phe Ser

1 5

<210> 109

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 109

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr

1 5

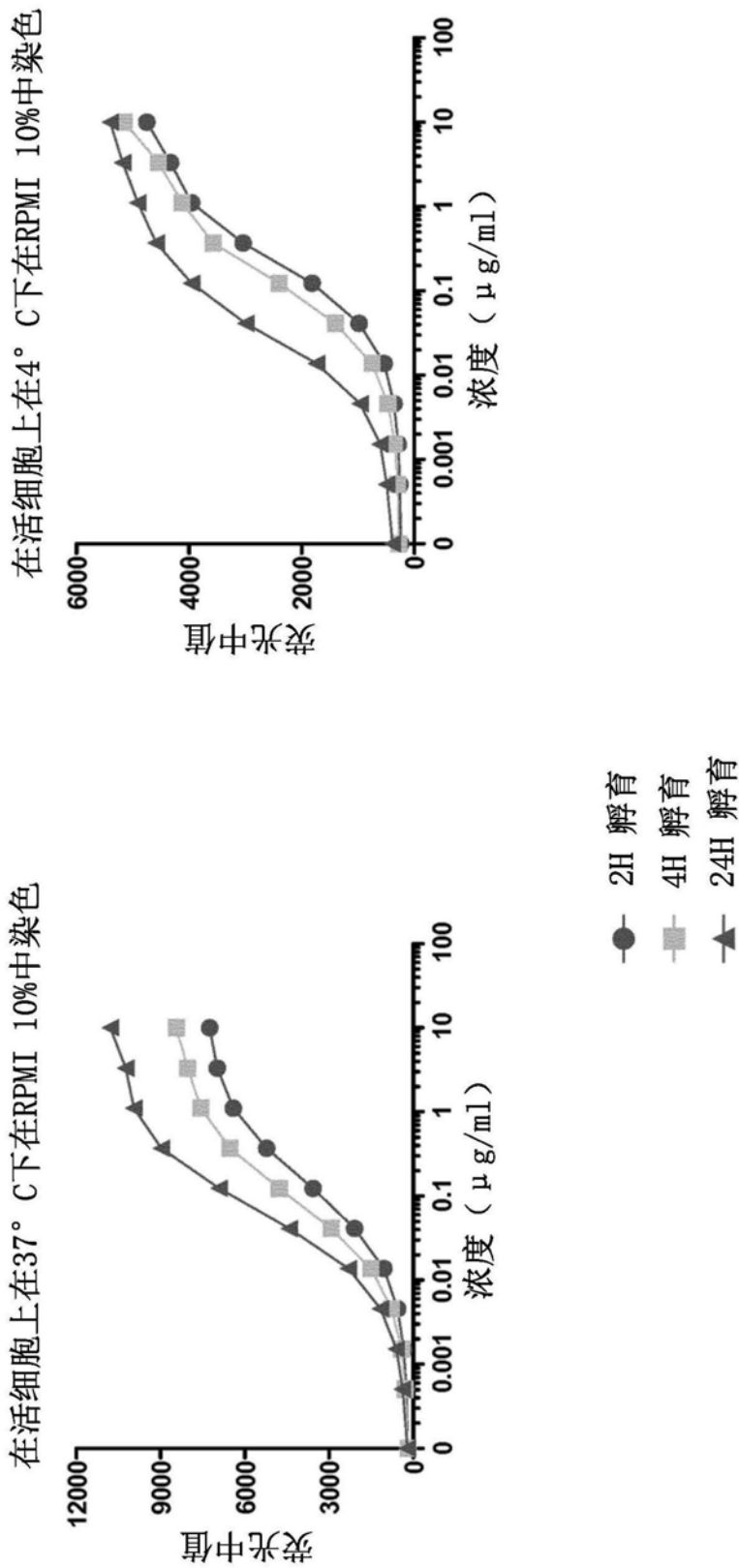


图1A

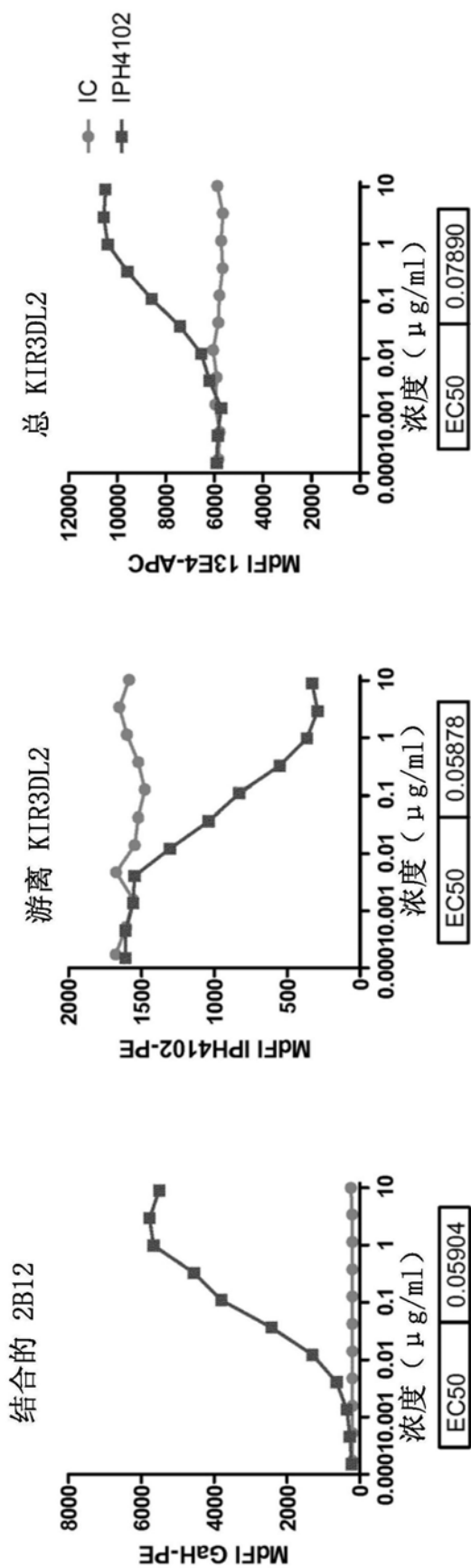


图1B

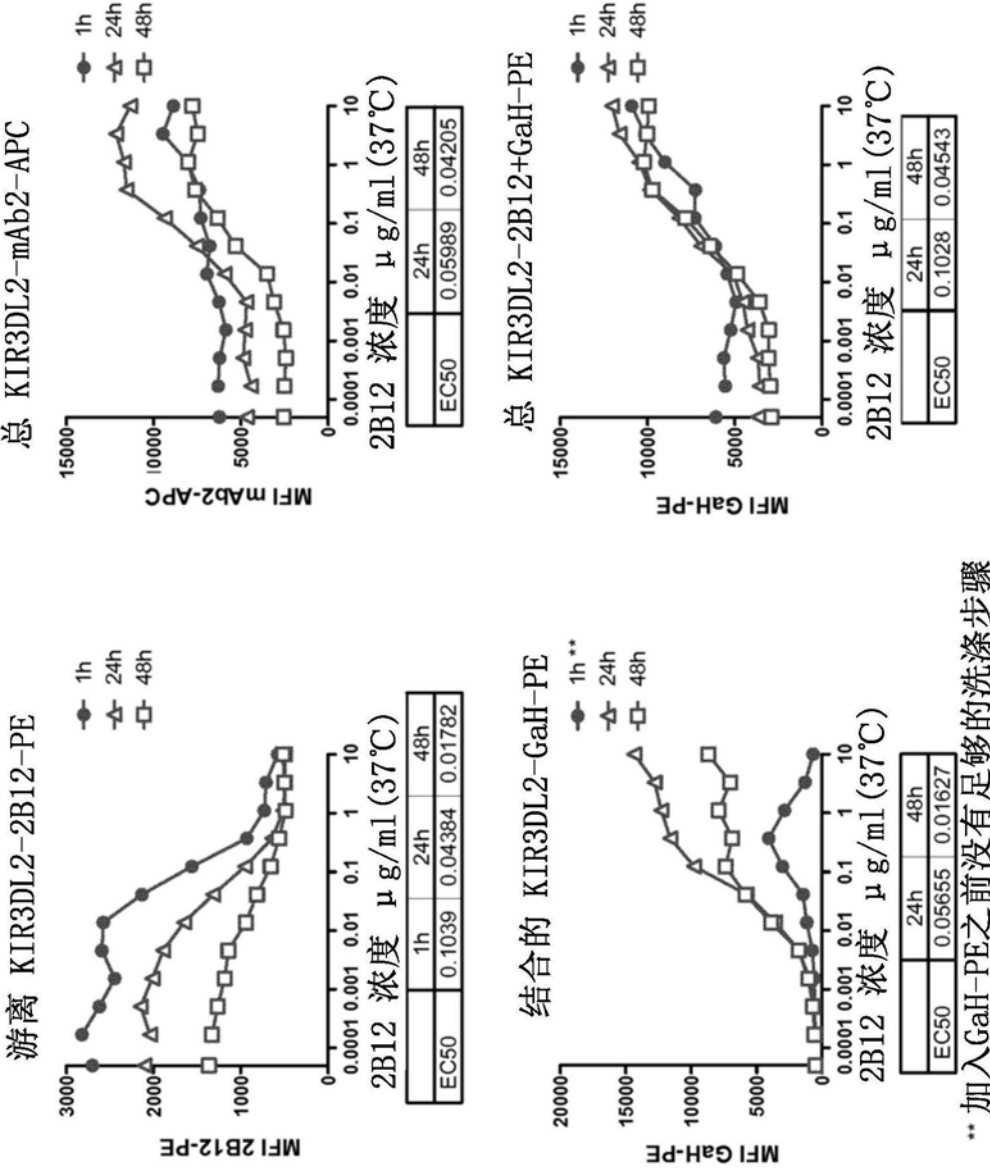


图1C

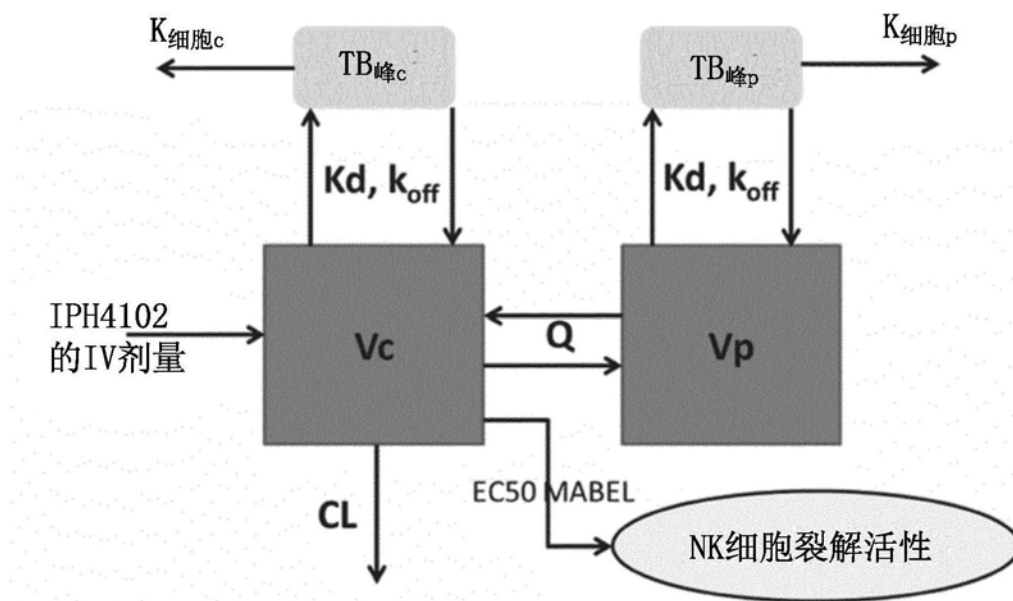


图2

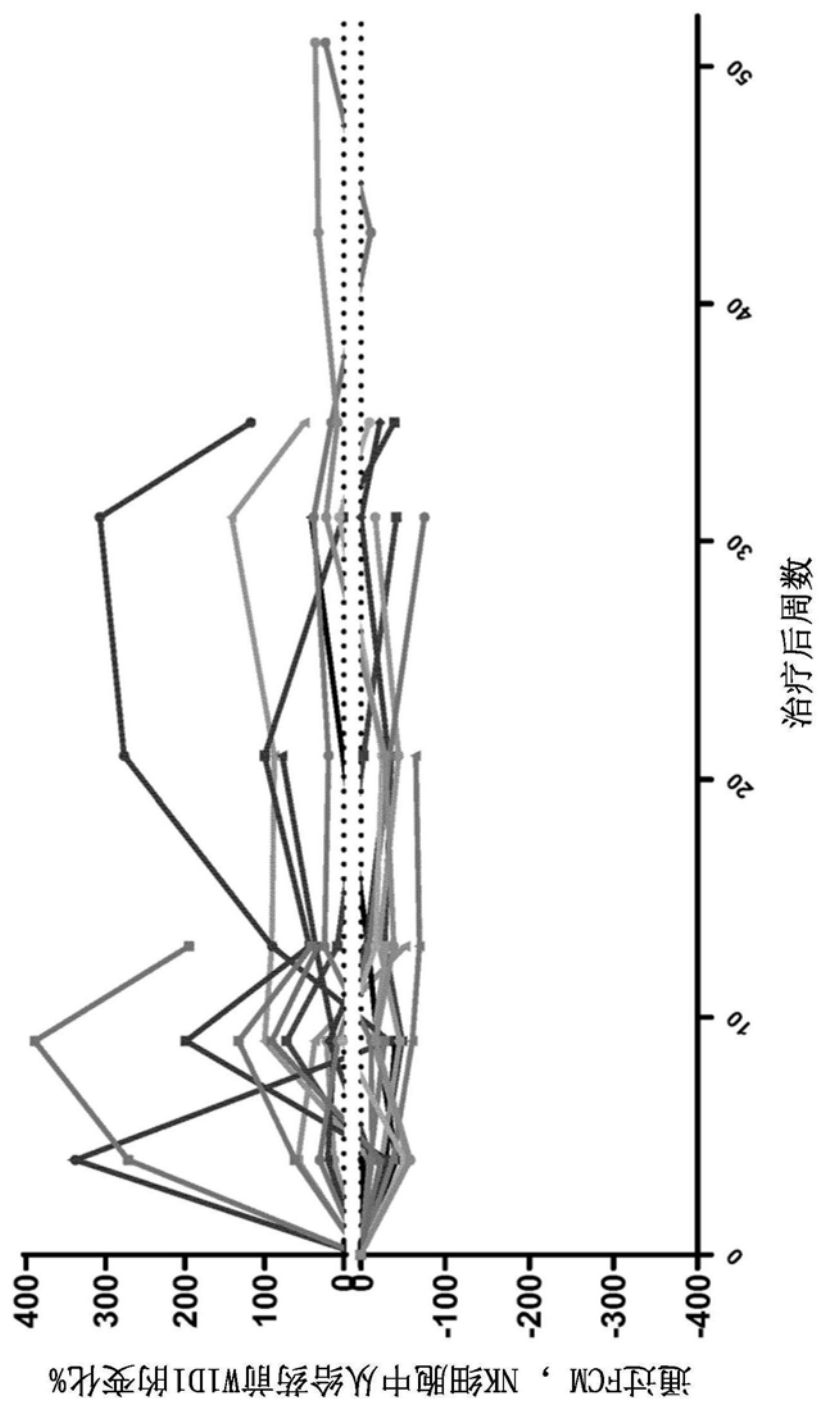


图3

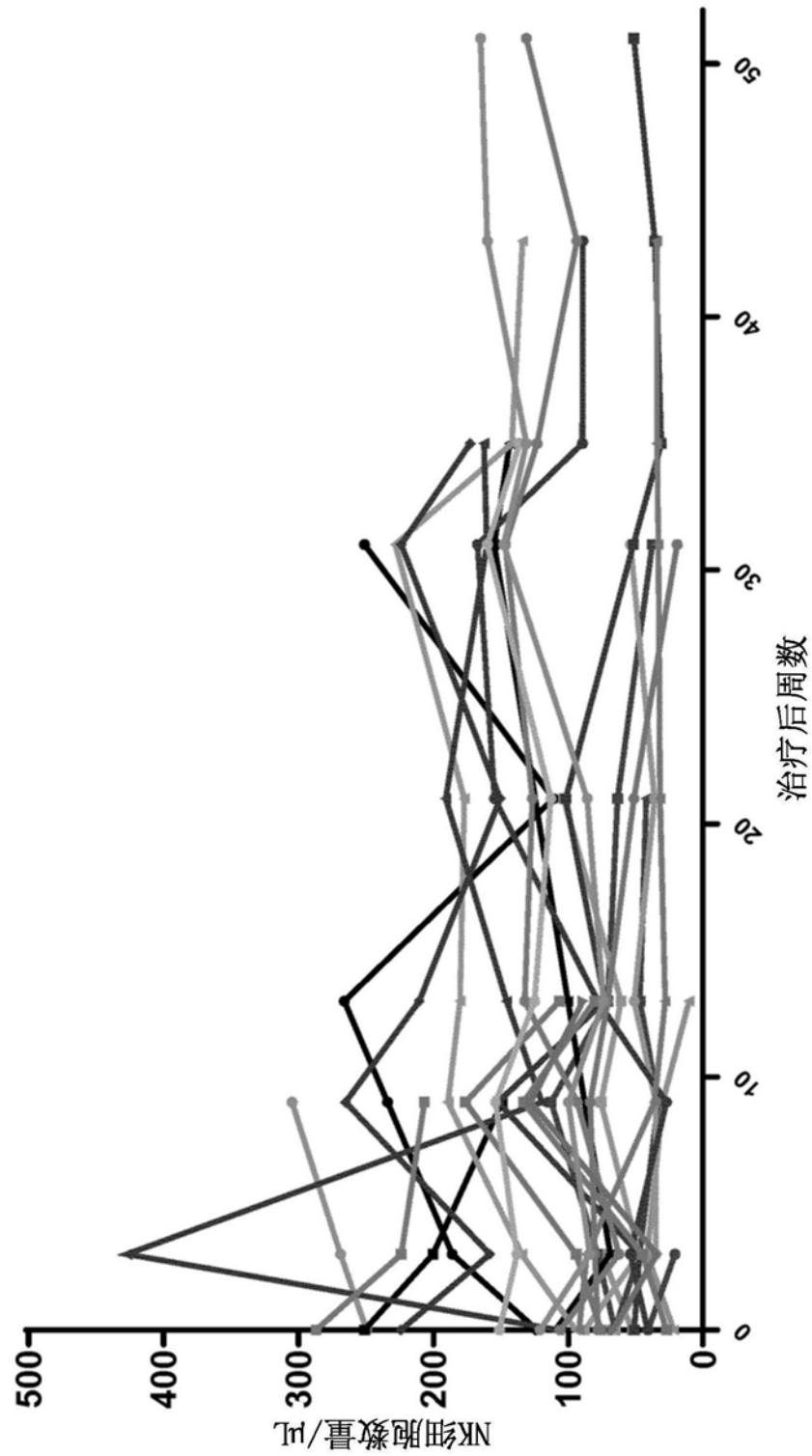


图4