



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 112955469 B

(45) 授权公告日 2024. 08. 06

(21) 申请号 201980071097.6

(22) 申请日 2019.11.01

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112955469 A

(43) 申请公布日 2021.06.11

(30) 优先权数据
18203993.3 2018.11.01 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2021.04.27

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2019/080004 2019.11.01

(87) PCT国际申请的公布数据
W02020/089474 EN 2020.05.07

(73) 专利权人 生物发明国际公司
地址 瑞典,隆德

(72) 发明人 B·弗伦德修斯 英格丽德·泰格
L·玛藤松 P·霍尔姆奎斯特
M·塞姆里奇

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314
专利代理师 程伟

(51) Int.Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 31/00 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 107849142 A, 2018.03.27

审查员 黎舒婷

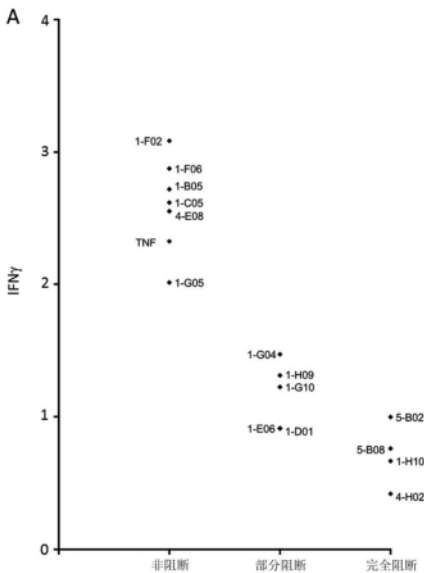
权利要求书3页 说明书46页
序列表78页 附图32页

(54) 发明名称

新型拮抗性抗TNFR2抗体分子

(57) 摘要

描述了新型拮抗性抗体分子,所述新型拮抗性抗体分子与靶细胞上的TNFR2特异性结合并且由此阻断TNF- α 与TNFR2的结合并且阻断TNFR2信号传导,其中所述抗体分子还通过其Fc区与Fc受体结合。还描述了此类抗体分子在治疗癌症或由细胞内病原体引起的感染中的用途。



1. 一种拮抗性抗体分子, 其与靶细胞上的TNFR2特异性结合并且由此阻断TNF- α 与TNFR2结合并且阻断TNFR2信号传导, 并且其中所述抗体分子还通过其Fc区与Fc γ 受体结合, 其中所述抗体分子包括:

包含以下CDR的可变重链(VH): SEQ.ID.NO:1、SEQ.ID.NO:2和SEQ.ID.NO:3, 和包含以下CDR的可变轻链(VL): SEQ.ID.NO:4、SEQ.ID.NO:5和SEQ.ID.NO:6。

2. 根据权利要求1所述的抗体分子, 其中所述抗体对活化Fc γ 受体结合的亲和力比对抑制性Fc γ 受体结合的亲和力更高。

3. 根据权利要求1或2所述的抗体分子, 其中所述抗体分子与TNFR2的结合导致患病组织中的TNFR2表达细胞的数量和/或频率发生变化。

4. 根据权利要求1或2所述的抗体分子, 其中所述抗体分子与TNFR2的结合导致T细胞和/或骨髓细胞浸润到患病组织中和/或患病组织中的T细胞和/或骨髓细胞的组成发生变化。

5. 根据权利要求1或2所述的抗体分子, 其中所述抗体分子选自由以下组成的组: 全尺寸抗体、嵌合抗体、单链抗体、和其保留通过其Fc区结合Fc受体的能力的抗原结合片段。

6. 根据权利要求1或2所述的抗体分子, 其与人TNFR2(hTNFR2) 和/或食蟹猴TNFR2(cmTNFR2) 结合。

7. 根据权利要求1或2所述的抗体分子, 其中所述抗体分子选自由人IgG抗体分子、人源化IgG抗体分子和人来源的IgG抗体分子组成的组。

8. 根据权利要求7所述的抗体分子, 其中所述抗体分子是人IgG1抗体。

9. 根据权利要求7所述的抗体分子, 其中所述抗体分子已经被工程化为用于改善与活化Fc γ 受体的结合。

10. 根据权利要求1、2和8到9中任一项所述的抗体分子, 其中所述抗体分子是单克隆抗体。

11. 根据权利要求1、2和8到9中任一项所述的抗体分子, 其中所述抗体分子不与包括序列KCSPG或由序列KCSPG组成的表位特异性结合。

12. 根据权利要求1、2和8到9中任一项所述的抗体分子, 其中所述抗体分子特异性结合结构域3中包含氨基酸残基134-160的表位。

13. 根据权利要求1、2和8到9中任一项所述的抗体分子, 其中所述抗体分子包括:

(i) SEQ.ID.NO:7的可变重链(VH) 氨基酸序列和SEQ.ID.NO:8的可变轻链(VL) 氨基酸序列。

14. 一种分离的核苷酸序列, 其编码根据权利要求1到13中任一项所述的抗体分子。

15. 一种质粒, 其包括根据权利要求14所述的核苷酸序列。

16. 一种病毒, 其包括根据权利要求14所述的核苷酸序列或根据权利要求15所述的质粒。

17. 根据权利要求16所述的病毒, 其进一步包括编码与检查点抑制剂特异性结合的抗体分子的核苷酸序列。

18. 一种细胞, 其包括根据权利要求14所述的核苷酸序列、根据权利要求14所述的质粒或根据权利要求16或17所述的病毒。

19. 根据权利要求1到13中任一项所述的抗体分子、根据权利要求14所述的核苷酸序

列、根据权利要求15所述的质粒、根据权利要求16或17所述的病毒和/或根据权利要求18所述的细胞,其用于治疗癌症或由细胞内病原体引起的感染,其中

所述癌症选自肺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肾癌、肝癌、胰腺癌、甲状腺癌、脑癌、中枢神经系统癌、黑素瘤、神经母细胞瘤、威尔姆斯瘤、横纹肌肉瘤、视网膜母细胞瘤、头颈癌、胃癌、淋巴瘤、骨癌和白血病。

20. 根据权利要求19所述的供使用的抗体分子、核苷酸序列、质粒、病毒和/或细胞,其中待治疗的患者是在患病组织中具有高TNFR2表达的患者。

21. 根据权利要求1到13中任一项所述的抗体分子、根据权利要求14所述的核苷酸序列、根据权利要求15所述的质粒、根据权利要求17所述的病毒和/或根据权利要求18所述的细胞,其用于与以下组合治疗癌症:

与检查点抑制剂特异性结合的抗体分子;

编码与检查点抑制剂特异性结合的抗体分子的核苷酸序列;

包括编码与检查点抑制剂特异性结合的抗体分子的核苷酸序列的质粒;和/或

包括以下的细胞:编码与检查点抑制剂特异性结合的抗体分子的核苷酸序列、包括编码与检查点抑制剂特异性结合的抗体分子的核苷酸序列的质粒或包括编码与检查点抑制剂特异性结合的抗体分子的核苷酸序列的病毒,其中

所述癌症选自肺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肾癌、肝癌、胰腺癌、甲状腺癌、脑癌、中枢神经系统癌、黑素瘤、神经母细胞瘤、威尔姆斯瘤、横纹肌肉瘤、视网膜母细胞瘤、头颈癌、胃癌、淋巴瘤、骨癌和白血病。

22. 一种根据权利要求1到13中任一项所述的抗体分子、根据权利要求14所述的核苷酸序列、根据权利要求15所述的质粒、根据权利要求16所述的病毒和/或根据权利要求18所述的细胞的用于制造用于治疗癌症或由细胞内病原体引起的感染的药物组合物的用途,其中

所述癌症选自肺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肾癌、肝癌、胰腺癌、甲状腺癌、脑癌、中枢神经系统癌、黑素瘤、神经母细胞瘤、威尔姆斯瘤、横纹肌肉瘤、视网膜母细胞瘤、头颈癌、胃癌、淋巴瘤、骨癌和白血病。

23. 根据权利要求22所述的用途,其中所述药物组合物用于治疗患病组织中具有高TNFR2表达的患者的癌症或感染。

24. 根据权利要求22或23所述的用途,其中所述药物组合物用于治疗癌症并且与以下组合施用:

与检查点抑制剂特异性结合的抗体分子;

编码与检查点抑制剂特异性结合的抗体分子的核苷酸序列;

包括编码与检查点抑制剂特异性结合的抗体分子的核苷酸序列的质粒;和/或

包括以下的细胞:编码与检查点抑制剂特异性结合的抗体分子的核苷酸序列、包括编码与检查点抑制剂特异性结合的抗体分子的核苷酸序列的质粒或包括编码与检查点抑制剂特异性结合的抗体分子的核苷酸序列的病毒,其中

所述癌症选自肺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肾癌、肝癌、胰腺癌、甲状腺癌、脑癌、中枢神经系统癌、黑素瘤、神经母细胞瘤、威尔姆斯瘤、横纹肌肉瘤、视网膜母细胞瘤、头颈癌、胃癌、淋巴瘤、骨癌和白血病。

25. 一种药物组合物,其包括以下或由以下组成:根据权利要求1到13中任一项所述的

抗体分子、根据权利要求14所述的核苷酸序列、根据权利要求15所述的质粒、根据权利要求16或17所述的病毒和/或根据权利要求18所述的细胞以及任选地药学上可接受的稀释剂、载体、媒剂和/或赋形剂。

26. 根据权利要求25所述的药物组合物,其用于治疗癌症或由细胞内病原体引起的感染,其中

所述癌症选自肺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肾癌、肝癌、胰腺癌、甲状腺癌、脑癌、中枢神经系统癌、黑素瘤、神经母细胞瘤、威尔姆斯瘤、横纹肌肉瘤、视网膜母细胞瘤、头颈癌、胃癌、淋巴瘤、骨癌和白血病。

27. 根据权利要求26所述的药物组合物,其用于与包括以下的药物组合物组合治疗癌症:

与检查点抑制剂特异性结合的抗体分子;

编码与检查点抑制剂特异性结合的抗体分子的核苷酸序列;

包括编码与检查点抑制剂特异性结合的抗体分子的核苷酸序列的质粒;和/或

包括以下的细胞:编码与检查点抑制剂特异性结合的抗体分子的核苷酸序列、包括编码与检查点抑制剂特异性结合的抗体分子的核苷酸序列的质粒或包括编码与检查点抑制剂特异性结合的抗体分子的核苷酸序列的病毒,其中

所述癌症选自肺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肾癌、肝癌、胰腺癌、甲状腺癌、脑癌、中枢神经系统癌、黑素瘤、神经母细胞瘤、威尔姆斯瘤、横纹肌肉瘤、视网膜母细胞瘤、头颈癌、胃癌、淋巴瘤、骨癌和白血病。

28. 根据权利要求21所述的供使用的抗体分子、根据权利要求21所述的供使用的核苷酸序列、根据权利要求21所述的供使用的质粒、根据权利要求17所述的病毒、根据权利要求21所述的供使用的病毒、根据权利要求21所述的供使用的细胞、根据权利要求24所述的用途、根据权利要求27所述的药物组合物,其中所述检查点抑制剂是PD-1。

29. 根据权利要求21所述的供使用的抗体分子、根据权利要求21所述的供使用的核苷酸序列、根据权利要求21所述的供使用的质粒、根据权利要求17所述的病毒、根据权利要求21所述的供使用的病毒、根据权利要求21所述的供使用的细胞、根据权利要求24所述的用途、根据权利要求27所述的药物组合物,其中所述检查点抑制剂是PD-L1。

30. 根据权利要求19、20、21、28或29所述的供使用的抗体分子、根据权利要求19、20、21、28或29所述的供使用的核苷酸序列、根据权利要求22、23、28或29所述的供使用的质粒、根据权利要求22、23、28或29所述的供使用的病毒、根据权利要求18、20、21、28或29所述的供使用的细胞、根据权利要求22、23、24、28或29所述的用途、根据权利要求26、27、28或29所述的药物组合物,其中所述癌症为实体癌,并且所述癌症选自肺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肾癌、肝癌、胰腺癌、甲状腺癌、脑癌、中枢神经系统癌、黑素瘤、神经母细胞瘤、威尔姆斯瘤、横纹肌肉瘤、视网膜母细胞瘤、头颈癌、胃癌、淋巴瘤和骨癌。

新型拮抗性抗TNFR2抗体分子

技术领域

[0001] 本发明涉及新型拮抗性抗体分子,所述新型拮抗性抗体分子与靶细胞上的肿瘤坏死因子受体2 (TNFR2) 特异性结合并且由此阻断配体TNF- α 与TNFR2结合并且还阻断TNFR2信号传导,所述抗体分子还通过其Fc区与Fc受体结合。本发明还涉及其在医学中,如在治疗癌症或由细胞内病原体引起的感染中的用途。

背景技术

[0002] 肿瘤坏死因子 (TNF) 受体2 (TNFR2、TNFR-2或TNFR11),也被称为肿瘤坏死因子受体超家族成员1B (TNFRSF1B) 和CD120b,是结合肿瘤坏死因子- α (TNF- α 或TNF α) 的膜受体。其发现于即T细胞、单核细胞和巨噬细胞的表面并且可以通过核因子 κ B (NF- κ B) 激活TNFR2受体表达细胞的增殖。值得注意的是,TNFR2在癌症中并且具体地在肿瘤浸润免疫细胞,例如调节性T细胞 (Treg)、CD8⁺细胞毒性效应T细胞和不同的骨髓细胞亚群中被高度上调。

[0003] 据讨论,TNFR2已成为癌症免疫疗法的有希望的靶标并且已被描述为是在具体地肿瘤内Treg和许多人类肿瘤细胞的表面上高度表达的 (Williams GS等人,《肿瘤靶标 (Oncotarget)》2016;7 (42):68278-68291;Vanamee ES等人,《分子医学趋势 (Trends in Molecular Medicine)》,2017,第23卷,第11期,1037-1046;《免疫学前沿 (Frontiers in Immunology)》,2017年11月|第8卷|第1482条;《科学信号 (Sci Signal.)》2018年1月2日;11 (511))。

[0004] 调节性T细胞 (其可以被称为Treg细胞、Treg或T_{reg},并且其先前被称为抑制T细胞或抑制性调节性T细胞) 构成能够抑制正常和病理性免疫环境中的其它免疫细胞的T细胞亚群。Treg是CD4阳性细胞 (CD4⁺细胞)。还存在不是Treg的其它CD4⁺T细胞;然而,Treg可以与非Treg CD4⁺细胞分离,因为Treg还是FOXP3阳性的 (FOXP3⁺),而非Treg CD4⁺细胞是FOXP3阴性的 (FOXP3⁻)。Treg也可以与非Treg CD4⁺细胞分离,因为Treg还是CD25⁺CD127^{neg/low},而非Treg CD4⁺细胞是CD25⁻CD127⁺或CD25⁺CD127⁻。

[0005] 还与以下结合对TNFR2进行了讨论:自身免疫疾病 (Faustman DL等人,《免疫学前沿 (Front Immunol)》2013;4:478;《临床与转化免疫学 (Clin Transl Immunology)》2016年1月8日;5 (1);《神经科学杂志 (J Neurosci.)》2016年5月4日;36 (18):5128-43) 和炎性疾病 (Ait-Ali D等人,《内分泌学 (Endocrinology)》2008年6月;149 (6):2840-52;《科学报告 (Sci Rep.)》2016年9月7日;6:32834)。

[0006] 先前也已经描述了不同类型并且具有各种特性的抗TNFR2抗体。例如,Williams等人 (《肿瘤靶标》2016年10月18日;7 (42):68278-68291) 描述了配体阻断激动性抗体和配体非阻断激动性抗体两者。

[0007] WO 2014/124134公开了TNFR2激动剂的用途,如激动性抗TNFR2抗体和/或用于体外产生富含CD4⁺CD25^{hi} Treg的组合物的NF- κ B激活子。据说所述组合物可用于治疗患者的免疫性病症或感染性疾病。WO 2014/124134进一步公开了可以结合TNFR2的一个或两个表位的TNFR2拮抗剂抗体。这些表位中的第一个表位包含序列QTAQMCCSKCSPGQHAKVFC,并且第

二个表位包含位于人TNFR的氨基酸中的一个特定位置中的一个特定氨基酸;第二表位可以包含序列RLCAPLRKCRPGF。据说此类TNFR2拮抗剂可用于产生富含淋巴细胞并且耗尽Treg的组合物。在源自此PCT申请的授权的美国专利第9 821 010号中,已将拮抗性抗体指定为与序列KQEGCRLCAPLRKCRPGF内的表位,如包括序列RLCAPLRKCRPGF的表位选择性地结合。据说TNFR2拮抗剂和使用TNFR2拮抗剂产生的组合物可用于治疗如癌症等增生性病症或感染性疾病。

[0008] WO 2016/187068公开了能够拮抗肿瘤坏死因子受体超家族成员,如TNFR2的抗体。据说所述抗体可用于调节Treg,如可用于以治疗增生性病症和感染性疾病的免疫疗法。具体地,其公开了与人TNFR2的特异性表位结合的拮抗性TNFR2抗体,并且其呈现了此类抗体的许多特异性CDR序列。据说WO 2016/187068中的数据证明了拮抗性TNFR2抗体的Fab区与TNFR2的特异性结合可能负责调节Treg细胞生长,而不是这些抗体的Fc区的非特异性结合。

[0009] WO 2017/040312公开了抗TNFR2抗体以及具体地能够促进TNFR2信号传导并且对Treg的扩增或增殖具有影响的激动性抗TNFR2抗体。WO 2017/040312公开了与包括序列KCSPG的表位特异性结合但不与包括序列KCRPG的表位特异性结合,因此排除了以上描述的US 9 821 010的抗体或者可替代地不与另一-TNFR超家族成员结合的抗体。据说所述激动性抗体可用于治疗免疫性疾病。WO 2017/040312进一步阐述了人TNFR2的完整序列。

[0010] WO 2017/083525讨论了包括抗TNFR2抗体的药理组合物以及其用于治疗与TNF- α 和/或TNFR2相关联的病症,如癌症中的用途。WO 2017/083525进一步讨论了包括对于与Fc γ 受体的结合以及对Treg的扩增的抑制无效的人IgG1 Fc结构域的抗体。

[0011] WO 2017/197331公开了包括具有特定序列的互补决定区-重链3的拮抗性TNFR2抗体并且讨论了减少或抑制Treg的增殖和/或对T效应细胞的增殖的抑制。

[0012] Fc受体是发现于免疫效应细胞的细胞表面上的膜蛋白,所述免疫效应细胞包含单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、嗜中性粒细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞和自然杀伤细胞以及B淋巴细胞。名称衍生自其对抗体的Fc区的结合特异性。Fc受体发现于细胞膜上-所述细胞膜另外被称为质膜或细胞质膜。Fc受体可以被细分为活化Fc γ R和抑制性Fc γ R,所述活化Fc γ R和抑制性Fc γ R已知通过聚集的免疫球蛋白G Fc's的结合来协调地调节细胞活化,以及通过细胞内ITAM或ITIM基序将活化或抑制性信号传输到细胞中。聚集的免疫球蛋白或免疫复合物的FcR结合可以介导抗体进入细胞的内化并且可能导致抗体介导的吞噬、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性或抗原呈递或交叉呈递。已知FcR还介导或增强抗体结合的细胞表面受体的交联。已知此交联是激活靶向的细胞的信号传导的一些(Li等人,2011“抑制性Fc γ 受体连接驱动激动性CD40抗体的佐剂和抗肿瘤活性(Inhibitory Fc γ receptor engagement drives adjuvant and anti-tumor activities of agonistic CD40 antibodies)”,《科学(Science)》,333:1030-4;White等人,2011“与Fc γ RIIB的相互作用对于抗CD40单克隆抗体的激动活性至关重要(Interaction with Fc γ RIIB is critical for the agonistic activity of anti-CD40 monoclonal antibody)”,《免疫学杂志(J Immunol)》,187:1754-63),但不是所有(Richman等人,2014,“抗人CD40单克隆抗体疗法在不进行FcR交联的情况下是有效的(Anti-human CD40 monoclonal antibody therapy is potent without FcR crosslinking)”,《肿瘤免疫学(Oncoimmunology)》,3:e28610)抗体能力所需要的,并且可能是也可能不是达到治疗效果

所需要的。

[0013] Fc受体的亚组是对IgG抗体具有特异性的Fc γ 受体 (Fc γ 受体、Fc γ R (FcgammaR) 或Fc γ R)。存在两种类型的Fc γ 受体:活化Fc γ 受体 (也表示为活化性Fc γ 受体) 和抑制性Fc γ 受体。活化和抑制性受体分别通过基于免疫受体酪氨酸的活化基序 (ITAM) 或基于免疫受体酪氨酸的抑制性基序 (ITIM) 传输其信号。在人类中,Fc γ RIIb (CD32b) 是抑制性Fc γ 受体,而Fc γ RI (CD64)、Fc γ RIIa (CD32a)、Fc γ RIIC (CD32c) 和Fc γ RIIIa (CD16a) 是活化Fc γ 受体。Fc γ gRIIb是在中性粒细胞上表达的GPI连接的受体,所述GPI连接的受体缺乏ITAM基序但通过其交联脂质筏并与其它受体连接的能力而也被视为是活化性的。在小鼠中,活化受体是Fc γ RI、Fc γ RIII和Fc γ RIV。

[0014] 众所周知,抗体可以通过与Fc γ 受体的相互作用来调节免疫细胞活性。具体地,抗体免疫复合物如何调节免疫细胞活化是通过其活化和抑制性Fc γ 受体的相对连接来确定的。不同抗体同种型以不同亲和力与活化和抑制性Fc γ 受体结合,从而产生不同的A:I比率 (活化:抑制比率) (Nimmerjahn等人;《科学》2005年12月2日;310(5753):1510-2)。

[0015] 通过与抑制性Fc γ 受体结合,抗体可以抑制、阻断和/或下调效应细胞功能。通过与抑制性Fc γ R结合,抗体可以通过在靶细胞上聚集抗体靶向的信号传导受体来进一步刺激细胞活化 (Li等人,2011,“抑制性Fc γ 受体连接驱动激动性CD40抗体的佐剂和抗肿瘤活性”,《科学》,333:1030-4;White等人,2011“与Fc γ RIIB的相互作用对于抗CD40单克隆抗体的激动活性至关重要”,《免疫学杂志》,187:1754-63;White等人2014“激动性CD40抗体在淋巴瘤疗法中的Fc γ 受体依赖性可以通过抗体多聚化来克服 (Fcgamma receptor dependency of agonistic CD40 antibody in lymphoma therapy can be overcome through antibody multimerization)”,《免疫学杂志》,193:1828-35)。

[0016] 通过与活化Fc γ 受体结合,抗体可以激活效应细胞功能并且由此触发以下机制,如抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)、抗体依赖性细胞吞噬 (ADCP)、细胞因子释放和/或抗体依赖性内吞以及在中性粒细胞的情况下的NETosis (即NET中性粒细胞细胞外陷阱的活化和释放)。抗体与活化Fc γ 受体的结合还可能导致某些活化标志物,如CD40、MHCII、CD38、CD80和/或CD86的增加。

[0017] 具体地本发明人发表的最新数据表明,分别与活化和抑制性Fc γ R的结合的CD8 T细胞激动剂和Treg耗竭型抗4-1BB抗体在治疗功效方面的关键性和差异性依赖性 (Buchan等人,“共刺激性受体4-1BB的抗体通过T调节性细胞耗竭以及对CD8 T细胞效应功能的促进来增强抗肿瘤免疫力 (Antibodies to Costimulatory Receptor 4-1BB Enhance Anti-tumor Immunity via T Regulatory Cell Depletion and Promotion of CD8 T Cell Effector Function)”,《免疫学 (Immunity)》2018 49(5):958-970)。此外并且至关重要是,同时施用分别在与活化和抑制性Fc γ R结合方面优化的CD8 T细胞激动剂和Treg耗竭型抗4-1BB抗体损害了治疗活性。这些数据表明了开发适当地且定制地连接活化和抑制性Fc γ R,以最大化具有独特作用机制的抗体的治疗活性的抗体的关键重要性。同时,其表明了活化和抑制性Fc γ R的次优连接可能会严重降低治疗功效。

[0018] 这些数据令人惊讶,因为其与其它TNFSR成员的抗体,值得注意地是免疫刺激性抗CD40抗体的发现相反,所述其它抗体显示出对抑制性而非活化Fc γ R的连接的专性需要 (Li等人,2011,“抑制性Fc γ 受体连接驱动激动性CD40抗体的佐剂和抗肿瘤活性”,《科学》,

333:1030-4;White等人,2011“与Fc γ RIIB的相互作用对于抗CD40单克隆抗体的激动活性至关重要”,《免疫学杂志》,187:1754-63)。综上所述,这些结果表明Fc γ R依赖性在同一受体超家族的不同靶标的抗体之间以及甚至在相同靶标的不同类型的抗体之间,可能会以不容易预测的方式发生变化,但是对于在开发用于治疗用途的抗体时进行理解和利用可能是至关重要的。

发明内容

[0019] 在导致本发明以及并行发明的工作中,标识了两种主要不同组的具有强大治疗作用以及不同特性和作用机制的抗TNFR2抗体。

[0020] 发明人首先识别出阻断TNF- α 与TNFR2受体的结合的拮抗性抗TNFR2抗体的强大治疗活性。对于体内治疗活性,此类抗体的活性被示出为取决于Fc γ R相互作用,以及具体地与活化性Fc γ R的结合。发现此组或类别的强大抗TNFR2治疗药剂的特征在于1)明显阻断并抑制TNF- α (配体)诱导的TNFR2信号传导,以及2)依赖于Fc γ R连接,从而最大得益于对抑制性Fc γ R进行活化的连接的活性。

[0021] 发明人然后标识了在体内具有同样强大的治疗活性的不同组的抗TNFR2抗体,但是其特性在许多方面与构成第一组和本发明的拮抗性阻断类型的TNFR2抗体的特性相反。此第二组的抗TNFR2抗体不依赖于TNFR2信号传导对治疗活性的TNF- α 阻断或抑制,而是其特征性在于对TNFR2信号传导的强烈激活。与第一组的阻断抗体进一步相反,第二组的激动性抗体未示出对抗体:Fc γ R连接的专性依赖性,即使利用Fc γ R:连接抗体变体提高了其活性也是如此。与第一组拮抗性且阻断抗体进一步相反的是,第二组激动性抗体在抗体变体中示出最大活性,与活化Fc γ R相比对抑制剂的结合增强。

[0022] 本发明涉及第一组抗TNFR2抗体,即涉及通过与TNFR2特异性结合而阻断TNF- α 与TNFR2的结合并且还阻断TNFR2的信号传导的拮抗性抗体分子。这些抗体分子还具有与Fc受体结合的Fc区,所述Fc区可用于赋予TNFR2阳性细胞的Fc γ R依赖性消除或功能性调节,如Treg耗竭或肿瘤相关巨噬细胞的调节。

[0023] 在下面的实例中使用了属于第二组的拮抗性抗体,以用于与本发明的激动性阻断TNFR2抗体分子进行比较。在实例中,还使用了具有某些特性的与第一组或第二组或两者的抗体相似的其它抗体以进行比较,如以下进一步解释的。

[0024] 因此,本发明涉及拮抗性抗体分子,所述拮抗性抗体分子与靶细胞上的TNFR2特异性结合并且由此阻断TNF- α 与TNFR2结合并且还阻断TNFR2信号传导,并且其中所述抗体分子还通过其Fc区与Fc γ 受体结合。

[0025] 本发明还涉及此类新型拮抗性且阻断抗TNFR2抗体分子的具体实例。

[0026] 本发明还涉及编码以上抗体分子中的至少一种抗体分子的分离的核苷酸序列。

[0027] 本发明还涉及包括以上核苷酸序列中的至少一种核苷酸序列的质粒。

[0028] 本发明还涉及包括以上核苷酸序列或质粒中的至少一种的病毒。

[0029] 本发明还涉及包括以上核苷酸序列之一,或以上质粒之一,或以上病毒之一的细胞。

[0030] 本发明还涉及用于医学的以上抗体分子、核苷酸序列、质粒、病毒和/或细胞。

[0031] 本发明还涉及用于治疗癌症或由细胞内病原体引起的感染的以上抗体分子、核苷

酸序列、质粒、病毒和/或细胞。

[0032] 本发明还涉及用于治疗癌症或由细胞内病原体引起的感染的以上抗体分子、核苷酸序列、质粒、病毒和/或细胞。

[0033] 本发明还涉及药物组合物,所述药物组合物包括以下或由以下组成:以上抗体分子、核苷酸序列、质粒、病毒和/或细胞中的至少一种以及任选地药学上可接受的稀释剂、载体、媒剂和/或赋形剂。此类药物组合物可以用于治疗癌症或由细胞内病原体引起的感染。

[0034] 本发明还涉及用于治疗患者的癌症或由细胞内病原体引起的感染的方法,所述方法包括向所述患者施用治疗有效量的所述以上抗体分子、核苷酸序列、质粒、病毒和/或细胞中的至少一种。

[0035] 本发明还涉及抗体分子、供使用的抗体分子、分离的核苷酸序列、供使用的分离的核苷酸序列、质粒、供使用的质粒、病毒、供使用的病毒、细胞、供使用的细胞、用途、药物组合物和治疗的方法,如本文参考所附说明书、实例和/或附图所描述的。

具体实施方式

[0036] 因此,本发明涉及拮抗性抗体分子,所述拮抗性抗体分子与靶细胞上的TNFR2特异性结合并且由此阻断TNF- α 与TNFR2结合并且还阻断TNFR2信号传导,并且其中所述抗体分子还通过其Fc区与Fc γ 受体结合。

[0037] 本文公开的拮抗性抗体分子阻断TNF- α 与TNFR2的结合以及TNFR2信号传导两者。拮抗性抗体分子阻断TNF- α 与TNFR2的结合在本文中意指与受体TNFR2结合的抗体分子由此阻止配体TNF- α 与同一受体结合。在实例3中对此进行了更详细的说明。本文公开的拮抗性抗体分子阻断TNFR2信号传导意指其阻断TNFR2介导的细胞活化。已经清楚地表明,通过TNFR2进行的TNF- α 介导的信号传导开始信号传导级联,所述信号传导级联终止于核转录因子NF κ B的活化(Thommesen等人“NF κ B的TNF受体1介导的活化与TNF受体2介导的活化之间的明显差异(Distinct differences between TNF receptor 1-and TNF receptor 2-mediated activation of NF κ B)”,《生物化学与分子生物学杂志(J Biochem Mol Biol.)》2005年5月31日;38(3):281-9;Yang等人“TNF-TNF受体2信号在调节性T细胞中的作用以及其治疗意义(Role of TNF-TNF Receptor 2Signal in Regulatory T Cells and Its Therapeutic Implications)”《免疫学前沿》2018年4月19日;9:784)。这进而导致细胞的活化和几种促炎因子的合成,几种促炎因子之一是NK细胞中的IFN- γ (Liu等人“炎症中的NF- κ B信号传导(NF- κ B signaling in inflammation)”《信号转导与靶向治疗(Signal Transduct Target Ther.)》2017;2.pii:17023;Tato等人“NF- κ B家族成员在调节NK细胞增殖和IFN- γ 的产生中的相反作用(Opposing roles of NF-kappaB family members in the regulation of NK cell proliferation and production of IFN-gamma)”《国际免疫学(Int Immunol.)》2006年4月;18(4):505-13)。在本文中术语TNFR2信号传导和TNFR2活化可互换使用。

[0038] 抗体分子与TNFR2特异性结合。众所周知的是,抗体与限定的靶分子或抗原特异性结合或相互作用,并且这意味着抗体优先地且选择性地结合其靶标而不是非靶标的分子。“特异性结合TNFR2的抗体分子”或“TNFR2特异性抗体分子”意指以剂量依赖性方式结合TNFR2蛋白但不与无关蛋白结合的抗体。另外,相同的抗体结合内源地表达TNFR2的细胞,

并且此结合可以通过将相同细胞与市售的多克隆TNFR2抗体试剂一起预培育来阻断,这示出了当TNFR2被多克隆试剂掩盖时可能无法检测到非特异性结合。这在实例2中示出。

[0039] 特异性结合TNFR2的抗体分子(或抗TNFR2抗体分子)是指与TNFR2的细胞外结构域中的至少一个表位特异性结合的抗体分子。细胞表面抗原和表位是免疫学或细胞生物学的技术人员容易理解的术语。

[0040] 评估蛋白质结合的方法是生物化学和免疫学的技术人员已知的。技术人员将理解,那些方法可以用于评估抗体与靶标的结合和/或抗体的Fc区与Fc受体的结合;以及相对强度或特异性,或那些相互作用中的抑制或预防或降低。可以用于评估蛋白质结合的方法的实例是,例如,免疫测定、BIAcore、蛋白质印迹(western blot)、放射免疫测定(RIA)和酶联免疫吸附测定(ELISA)以及流式细胞术(FACS)。(对于关于抗体特异性的讨论,参见《基础免疫学(Fundamental Immunology)》第二版,雷文出版社(Raven Press),纽约(New York)第332-336页(1989))。

[0041] 表达根据本发明的阻断抗体所结合的TNFR2的靶细胞包含免疫细胞和/或肿瘤细胞,如以上和以下讨论的。根据本发明的拮抗性抗体分子与TNFR2结合的作用可以是患病组织中的细胞组成发生变化。组成的此变化可以通过患病组织中的TNFR2表达细胞的数量和/或频率的改变而发生。例如,对癌症的影响包含肿瘤内T细胞数量增加,CD8⁺T细胞/Treg(即CD8⁺T细胞数量与Treg数量)的比率增加和/或与抗肿瘤相关联的骨髓细胞数量增加,这与促肿瘤特性相反。这在实例5进行了说明。在一些实施例中,这些作用导致组织Treg的数量减少,CD8⁺效应T细胞的数量增加以及组织骨髓细胞亚群的组成改变。实例5中详细示出了在体内治疗性发明后,用根据本发明的拮抗性抗体分子的替代物(3-F10)对组织中的TNFR2表达细胞进行调节。为了测试根据本发明的人拮抗性抗体分子的相似作用,可以在小鼠中执行在已经在小鼠TNFR2中缺失并已使对人TNFR2为转基因的类似实验。可替代地并且优选地,尽管需要大量的时间和资源,但是与先前针对CD40和hFc γ R所描述的相比,可以以类似方式产生对人TNFR2和人Fc γ R为转基因的动物。(Dahan等人,2016,“激动性人抗CD40单克隆抗体的治疗活性需要选择性Fc γ R连接(Therapeutic Activity of Agonistic, Human Anti-CD40 Monoclonal Antibodies Requires Selective Fc γ R Engagement)”,《癌细胞(Cancer Cell)》,29:820-31)。然后可以类似地使用此人源化TNFR2 Fc γ R小鼠来测试根据本发明的人拮抗性抗体分子的类似作用。

[0042] 患病组织在此上下文中意指肿瘤组织(即肿瘤微环境中的所有细胞,包含肿瘤细胞、免疫细胞、内皮细胞和基质细胞)或受细胞内病原体影响的组织。

[0043] 为了决定抗体分子是阻断还是不阻断配体与TNFR2的结合,可能的是使用ELISA测定确定在TNFR2特异性抗体存在下,与固定化的TNFR2受体结合的TNF- α 配体的量。阻断抗体将阻止配体TNF- α 与固定化的受体TNFR2结合。在以下实例3中对此进行了更详细的说明和解释。

[0044] 根据本发明的阻断抗体分子是另外能够拮抗TNFR2信号传导的完全阻断剂。

[0045] 完全阻断剂在本文中被定义为与在仅同种型对照抗体分子存在下的TNF- α 结合相比,将TNF- α 与TNFR2的结合降低多于多98%,即至多100%的抗体分子。同种型对照抗体是针对在研究下在测定中不以任何形式存在的蛋白质或其它结构提出的抗体。同种型对照理想地具有与比较抗体相同的框架,但至少相同的Fc部分。这对本领域的技术人员而言是众

所周知的。在本文所述的实例中,同种型对照具有相同的构架、相同的Fc部分,并且对荧光素异硫氰酸 (FITC) 具有特异性。在一些实施例,完全阻断剂将的TNF- α 结合降低了多于99.5%。

[0046] 其它类型的阻断剂是部分阻断剂和弱阻断剂。如本文所用,部分阻断剂是与在仅同种型对照抗体分子的存在下的TNF- α 结合相比,将TNF- α 与TNFR2的结合降低60-98% (例如,降低60%、61%、62%、63%、64%、65%、66%、67%、68%、69%、70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%或98%以及其间的所有十进制数) 的抗体分子,并且弱阻断剂是与在仅同种型对照抗体分子存在下的TNF- α 结合相比,将TNF- α 与TNFR2的结合降低少于60%,如50-59.9% (或50%、51%、52%、53%、54%、55%、56%、57%、58%、59或59.9%以及其间的所有十进制数) 的抗体分子。

[0047] 相反,非阻断TNFR2抗体分子是与在仅同种型对照抗体分子存在下的TNF- α 结合相比,将TNF- α 与TNFR2的结合降低少于50%的抗体分子。在一些实施例,这在高剂量单点ELISA或剂量滴定ELISA中得到确定,如实例3以及图6和7中示出的。

[0048] 在实例中使用了部分阻断、弱阻断和非阻断抗体,以用于与本发明的拮抗性阻断抗体分子进行比较。

[0049] 几种性质和特征可以奠定和 (共同) 确定抗体的生物活性。除了阻断配体与受体结合的能力之外,重要的此类性质包含调节受体信号传导,即激动或拮抗受体信号传导的抗体能力,以及对用于赋予治疗活性的Fc γ R相互作用的抗体依赖性。

[0050] 首先表征了完全阻断、部分阻断和非阻断抗体调节TNFR2信号传导的能力。标识了两个极端。

[0051] 在第一个极端中,标识了完全阻断配体与TNFR2的结合,阻断TNF- α 诱导的TNFR2信号传导,并且在与细胞内源性表达的TNFR2结合时本身并不诱导信号传导的抗体。此组配体阻断拮抗性抗体形成本发明的基础。

[0052] 在另一极端中,标识了不阻断配体与TNFR2的结合,但在与TNFR2结合时内源性表达的细胞激动受体的抗体。此第二组抗体构成了单独发明并且包含在此以用于比较。

[0053] 由部分阻断激动性、部分阻断非激动性和完全阻断非拮抗性定义的抗体和类别被另外标识为展示出抗TNFR2抗体的复杂生物学和巨大异质性,这清楚地展示了本发明的抗体形成独特的组。

[0054] 为了确定抗体是否具有激动剂活性或拮抗活性,可能的是使用如实例4中所述的自然杀伤(NK)细胞测定。简而言之,已经描述了NK细胞利用分泌IFN- γ 对IL-2和IL-12刺激作出反应。可溶性TNF- α 是内源地产生的并且以鲁棒但次优的浓度(约20-100pg/ml)存在,用于TNFR2信号传导,这意味着IFN- γ 可以通过调节TNFR2信号传导来增加和减少。因此,外源地添加TNFR2信号传导最优浓度的TNF- α 增强了此测定中的IFN- γ 浓度,与激动剂抗TNFR2抗体一起进行的培育也是如此(图8C)。相反,与抗TNF- α 抗体或本文所述的配体阻断拮抗剂抗体共同培育降低了此测定中的IFN- γ 释放。因此,此测定可以用于标识抗TNFR2抗体的激动剂或拮抗剂活性或抗TNFR2抗体的缺乏。(TNF α 通过TNFR2增强了细胞因子诱导的NK细胞IFN γ 产生。Almishri W.等人,《先天免疫杂志(J Innate Immun.)》2016;8: 617-629)。因此,在此实验设置中,拮抗性抗体防止TNFR2表达细胞中的TNF- α 诱导的信号传

导并且在与TNFR2受体结合时自身并不刺激所述TNFR2受体。具体地,在此测定中,拮抗性抗体在与以上提及的NK细胞结合后不增加IFN- γ 释放而是抑制IFN- γ 释放。如图8中示出的,本发明所述的完全阻断抗体未诱导TNFR2信号传导,而是降低了此含TNF- α 的NK细胞测定中的TNFR2信号传导,导致释放的IFN- γ 的量降低。如图8实例4中指示的,本发明的抗体因此可以被分类为配体阻断拮抗性抗TNFR2抗体。使用此测定,将拮抗性抗体定义为导致IFN- γ 释放降低>30% (例如35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或100%)的抗体,条件是此培养物中的基础TNF- α 水平为至少20pg/ml。由于此测定使用来自PBMC供体的原代细胞,因此需要包含至少4个供体,并且均值应根据所有供体计算。来自在计算均值时要包含的每个供体的细胞必须对与利用同种型对照进行的处理相比IFN- γ 水平增加>100% (>2倍)的阳性对照(可溶性TNF- α)处理作出反应。

[0055] 拮抗剂活性也可以使用IL-2介导的记忆性T细胞的活化来证明。活化在此通过上调T细胞活化标志物CD25来测量。使用此测定,添加非阻断激动性TNFR2抗体进一步地上调CD25表达,而根据本发明的阻断拮抗性TNFR2抗体则导致与同种型对照相比较低的CD25表达。对于本发明的人抗体以及鼠替代抗体而言确实如此,并示出在实例4中。

[0056] 除了与TNFR2结合并且由此阻断TNF- α 结合和信号传导以外,根据本发明的抗体分子还与Fc γ 受体结合。在小鼠癌症实验模型中使用有效地连接或不有效地连接Fc γ R结合的抗体变体证明了对属于本发明的用于治疗功效的TNF- α 阻断拮抗性组的抗体的抗TNFR2抗体的Fc γ R相互作用的专性依赖性。此配体阻断拮抗性抗体对体内治疗活性的专性依赖性,以及其为了最大治疗性体内活性而相对于抑制性Fc γ R优先结合/连接活化性Fc γ R示出在实例5中。在此实例中包含了证明激动剂非阻断抗TNFR2抗体的Fc γ R无关的体内活性,以及其为了最大治疗性活性而相对于活化Fc γ R差异性地优先连接抑制性Fc γ R的数据,以用于仅比较和对比目的。总的来说,数据证明了可以产生几种类型的抗TNFR2抗体。此外,数据证明,哪些抗体变体将是治疗最有效的,是否其依赖于阻断、激动剂或拮抗剂(外部或固有)性质以及其是依赖于还是不依赖于Fc γ R连接或在相关于与活化或抑制性Fc γ 受体优先/强结合的抗体格式中最有效并不是不重要的并且可能无法预测。

[0057] 小鼠与人Fc γ R系统之间的相对高的同源性解释了物种之间保守的Fc γ R介导的机制的许多一般方面。然而,小鼠和人IgG亚类在其对其同源Fc γ R的亲合力方面有所不同,使其在将小鼠系统中的Fc γ R介导的观察转化为基于人IgG的治疗剂以选择示出与人活化与抑制性Fc γ R的适当结合的抗体、抗体亚类和/或经工程化的亚类变体时非常重要。人抗体分子对单独人Fc γ 受体的亲和力和/或亲合力可以使用表面等离子体共振 (SPR) 来确定。在一些实施例中,阻断TNFR2抗体分子对活化Fc γ 受体结合的亲合力比对抑制性Fc γ 受体结合的亲合力更高。对活化Fc γ 受体的亲合力比对抑制性Fc γ 受体的亲合力更高,包含了与对抑制性Fc γ 受体的亲合力相比,变体对活化Fc γ 受体,例如Fc γ RIIA、Fc γ RIIIA和/或Fc γ RI结合的亲合力更高的含义。

[0058] 在一些实施例中,抗体分子是可以通过抗体分子的Fc区与Fc γ 受体之间的正常相互作用而与Fc γ 受体结合的IgG。

[0059] 在一些实施例中,拮抗性阻断TNFR2抗体分子是人IgG1。众所周知,人IgG1以对活化人Fc γ RI的高亲合力结合,并且以对人活化性Fc γ 受体Fc γ RIIA、Fc γ RIIIA以及对人抑制性Fc γ RIIB的更低且相似的亲合力结合。这已经使用例如表面等离子共振 (SPR) 证明。

[0060] 在一些实施例中,拮抗性阻断TNFR2抗体分子是示出改善了与一种或几种活化性Fc受体的结合和/或被工程化为用于改善与一种或几种活化性Fc γ 受体的结合和/或被工程化为用于改善相对于抑制性Fc γ 受体与活化性Fc γ 受体相对结合的IgG抗体分子。在一些实施例中,抗TNFR2抗体是经Fc工程化的人IgG1抗体。此类经工程化的抗体变体的实例包含抗体与Fc γ RIIIA的结合选择性地改善的岩藻糖基化抗体,以及通过定向、突变或其它方式、导致与抑制性Fc γ RIIB相比,改善与一种或几种活化Fc γ 受体的结合的氨基酸取代进行工程化的抗体(Richards等人,2008“抗体与Fc γ RIIIa的结合的优化增强了肿瘤细胞的巨噬细胞吞噬(Optimization of antibody binding to Fc γ RIIIa enhances macrophage phagocytosis of tumor cells)”,《分子癌症疗法(Mol Cancer Ther)》7:2517-27;Lazar等人,2006“具有增强的效应功能的经工程化的抗体Fc变体(Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function)”,《美国国家科学院院刊》,103:4005-10)。

[0061] 在一些实施例中,被工程化用于改善与活化Fc γ 受体的结合的人IgG抗体可以是在其Fc部分中具有两个突变S239D和I332E或三个突变S239D、I332E和A330L和/或G236A突变的人IgG抗体。在一些实施例中,被工程化用于改善与活化Fc γ 受体的结合的人IgG抗体可以是岩藻糖基化的人IgG抗体。

[0062] 本发明的拮抗性阻断抗体分子的Fc区所结合的Fc γ 受体可以是如上所述的表达免疫效应细胞的Fc γ 受体。

[0063] TNFR2特异性抗体分子与靶细胞上的TNFR2表面受体的结合以及Fc γ R在同一细胞或免疫效应细胞上的紧密共连接可能导致抗体分子所结合的TNFR2阳性靶细胞的耗竭或功能调节。细胞的耗竭在本文中是指通过细胞的物理清除来耗竭、缺失或消除细胞。

[0064] 细胞的耗竭可以通过ADCC,即抗体依赖性细胞介导的细胞毒性或抗体依赖性细胞毒性,和/或ADCP,即抗体依赖性细胞吞噬来实现。这意味着当向患者,如人施用如本文所述的抗体分子时,其与在如Treg等细胞的表面上表达的TNFR2特异性结合,并且此结合导致细胞耗竭。通常,与低表达细胞相比,高表达细胞更有效地缺失。如实例5、图14中示出的,Treg是肿瘤设置中的最高表达细胞。

[0065] ADCC是具有Fc受体的效应细胞通过其可以识别并杀死,即耗竭在其表面上表达肿瘤来源的抗原,即在当前情况下,TNFR2的抗体涂覆的靶细胞的免疫机制。ADCP是类似的机制,但是其会导致靶细胞通过吞噬而非细胞毒性被杀死-即,耗竭。

[0066] 另外,抗体分子的Fc区与Fc γ 受体的结合的改善也可以改善借助于ADCC或ADCP通过Fc受体依赖性死亡耗竭靶细胞。这对于与活化Fc γ 受体的结合改善的抗体分子尤其相关。

[0067] 抗体分子对TNFR2阳性细胞具有耗竭作用意指在施用于如人等患者后,此抗体分子与在TNFR2阳性细胞的表面上表达的TNFR2特异性结合,并且此结合导致此类靶细胞的耗竭。

[0068] 耗竭的细胞可以是许多不同细胞,如以上结合靶细胞是什么的讨论所解释的。通常是,具有最高TNFR2表达的细胞将耗竭。也表达TNFR2但不那么高的其它细胞也可能耗竭,但与具有最高TNFR2表达的细胞相比,程度却很小。

[0069] 如以上所提及的,TNFR2在发现于各种癌症患者的肿瘤中的Treg上高度表达,并且

在此类患者中,本发明的抗体分子将与Treg优先结合,并且由此导致Treg耗竭。Treg对其它免疫细胞(如CD8阳性(CD8⁺)细胞)的增殖、活化和细胞毒性能力具有抑制作用,并且因此Treg的耗竭将至少间接地导致CD8⁺细胞的增殖、活化和可能的迁移增加以及由此肿瘤内CD8⁺细胞的数量增加。CD8⁺T细胞对于免疫介导的肿瘤细胞清除至关重要(McKinney等人,《免疫学当前观点(Curr Opin Immunol)》2016年12月;43:74-80;Klebanoff等人,《免疫学综述(Immunol Rev.)》2006Jun;211:214-24;Alexander-Miller《免疫学研究(Immunol Res.)》2005;31(1):13-24)。因此,CD8⁺T细胞的增殖、活化和细胞毒性能力的增加将对癌症患者高度有益并且可能导致根除癌症。

[0070] CD8⁺T细胞的增殖、活化和细胞毒性能力的增加还将对治疗由细胞内病原体引起的感染高度有益。来自细胞内病原体的抗原通常存在于MHC I分子上,这在活化CD8⁺T细胞中是关键。CD8⁺T细胞由此识别感染的细胞并且使受感染的细胞裂解,从而破坏病原体。

[0071] TNFR2特异性抗体分子的结合和TNF- α 信号传导的阻断还可能导致细胞表型的功能性调节,例如将促肿瘤骨髓细胞调节为具有杀肿瘤性质的骨髓细胞。

[0072] 在一些实施例中,TNFR2阳性细胞,即靶细胞是CD4阳性(CD4⁺)细胞,即表达CD4的细胞。

[0073] 在一些实施例中,TNFR2阳性细胞是CD4⁺和FOXP3⁺两者,即表达CD4和FOXP3两者。这些细胞是Treg。CD8⁺T细胞也表达TNFR2,但Treg表达的TNFR2的水平显著高于CD8阳性T细胞,如实例5中的图14中示出的。与较低表达CD8⁺细胞相比,这使Treg更易于耗竭。

[0074] 在一些情况下,TNFR2优先在肿瘤微环境中的免疫细胞(肿瘤浸润细胞,TILS)上表达。

[0075] 在一些实施例中,Treg将是肿瘤微环境中具有最高TNFR2表达,从而导致与TNFR2特异性结合的抗体分子(或抗TNFR2抗体分子)具有Treg耗竭作用的细胞。这在以下,例如在实例5中并且结合图13和15进行了更详细的讨论。

[0076] 在一些实施例中,TNFR2阳性细胞将是实体瘤中的Treg。此类Treg将具有非常高的TNFR2表达,并且因此施用与TNFR2特异性结合的抗体分子将优先导致此类Treg的耗竭。

[0077] 为了确定抗体分子是否是如本文所提及的,对TNFR2阳性细胞具有耗竭作用的抗体分子,可以使用PBMC-NOG/SCID中的体内测试。体内测试是基于PBMC小鼠和NOG/SCID小鼠的组合用途,这在本文中被称作PBMC-NOG/SCID模型。NOG小鼠和SCID小鼠是技术人员已知的(Ito M等人,(2002)NOD/SCID/ γ c^{null}小鼠:用于植入人类细胞的优异接受者小鼠模型《血液(Blood)》100(9):3175-3182;Bosma GC等人;《自然(Nature)》1983年2月10日;301(5900):527-30;小鼠中的严重的组合免疫缺陷突变)并且PBMC-NOG模型是已知的(Cox等人“抗体介导的Orai1钙通道的靶向抑制T细胞功能(Antibody-mediated targeting of the Orai1 calcium channel inhibits T cell function)”《公共科学图书馆·综合(PLoS One.)》2013年12月23日;8(12):e82944;以及Søndergaard等人“人T细胞依赖于功能性钙调神经磷酸酶、肿瘤坏死因子- α 和CD80/CD86以在小鼠中扩增和活化(Human T cells depend on functional calcineurin,tumor necrosis factor- α and CD80/CD86 for expansion and activation in mice)”《临床与实验免疫学(Clin Exp Immunol.)》2013年5月;172(2):300-10)。PBMC-NOG/SCID模型中的体内测试包括以下连续的九个步骤:

[0078] 1) 将人PBMC(外周血单核细胞)分离、洗涤并重悬于无菌PBS中。在一些实施例中,

以 75×10^6 个细胞/ml将PBMC重悬于PBS中。

[0079] 2) 向NOG小鼠i.v. (静脉内) 注射适当量(如200 μ l)的来自步骤1)的细胞悬浮液。如果注射200 μ l,则这对应于 15×10^6 个细胞/小鼠。

[0080] 3) 在注射之后的合适时间,如2周,分离来自NOG小鼠的脾脏并且使其成为单细胞悬浮液。任选地,提取来自单细胞悬浮液的小样品,以通过FACS确定TNFR2在人T细胞上的表达,以便确认TNFR2表达。

[0081] 4) 将来自步骤3)的细胞悬浮液重悬于无菌PBS中。在一些实施例中,以 50×10^6 个细胞/ml将细胞悬浮液重悬于无菌PBS中。如果步骤3)中包含了任选TNFR2表达的确定,则在步骤4)中重悬细胞悬浮液的其余部分。

[0082] 5) 向SCID小鼠i.p. (腹腔内) 注射适当的量(如200 μ l)的来自步骤4)的悬浮液。如果注射200 μ l,则这对应于 10×10^6 个细胞/小鼠。

[0083] 6) 在步骤5)中的注射之后的合适时间,如1小时,用适当量(如10mg/kg)的待测试的抗体分子、阳性对照抗体(例如,已知耗竭Treg的抗CD25抗体)或同种型对照单克隆抗体对SCID小鼠进行治疗。

[0084] 7) 在步骤6)中的处理之后的合适时间,如24小时,收集经治疗的SCID小鼠的腹膜液。

[0085] 8) 使用以下标志物通过FACS标识人T细胞亚群并对其进行量化:CD45、CD4、CD8、CD25和/或CD127。公认的是,人Treg在人PBMC群中可以被区分为CD4⁺CD25⁺CD127^{low/-}。

[0086] 9) 将来自对来自用测试的抗体分子治疗的小鼠的T细胞亚群的标识和量化的结果与来自对来自用阳性对照抗体治疗的小鼠的T细胞亚群的标识和量化的结果以及来自对来自用同种型对照单克隆抗体治疗的小鼠的T细胞亚群的标识和量化的结果进行比较。来自用待测试的抗体分子治疗的小鼠的腹膜液中的Treg的数量比来自用同种型对照治疗的小鼠的腹膜液中的Treg的数量低证明了抗体分子对TNFR2阳性Treg具有耗竭作用。

[0087] 此测定在以下实例5中结合图15进行了更详细的展示。

[0088] 如以上所提及的,其它细胞也可以表达TNFR2,如癌细胞。在一些实施例中,抗体分子与在癌细胞上表达的TNFR2优先结合,并且所述结合然后直接导致癌细胞的耗竭。

[0089] 抗体是免疫学和分子生物学领域的技术人员众所周知的。通常,抗体包括两条重(H)链和两条轻(L)链。在此,有时将此完整抗体分子称为全尺寸(full-size)或全长(full-length)抗体。抗体的重链包括一个可变结构域(VH)和三个恒定结构域(CH1、CH2和CH3),并且抗体的分子轻链包括一个可变结构域(VL)和一个恒定结构域(CL)。可变结构域(有时统称为F_V区)与抗体的靶标或抗原结合。每个可变结构域包括三个环,所述环被称为互补决定区(CDR),其负责靶标结合。恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合,而是表现出各种效应功能。根据抗体或免疫球蛋白的重链恒定区的氨基酸序列,所述抗体或免疫球蛋白可以被分配到不同类别。存在免疫球蛋白的五个主要类别:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且在人类中,这些类别中的几个类别被进一步划分为亚类(同种型),例如,IgG1、IgG2、IgG3和IgG4、IgA1和IgA2。

[0090] 抗体的另一部分是Fc区(另外被称为片段可结晶结构域),其包括所述抗体的重链中的每条重链的恒定结构域中的两个恒定结构域。如上所提及的,Fc区负责抗体与Fc受体之间的相互作用。

[0091] 如本文所使用的术语抗体分子涵盖全长或全尺寸抗体以及全长抗体的功能片段和此类抗体分子的衍生物。

[0092] 全尺寸抗体的功能片段具有与对应全尺寸抗体相同的抗原结合特性并且包含与对应全尺寸抗体相同的可变结构域(即,VH和VL序列)和/或相同的CDR序列。功能片段不总是含有对应全长抗体的所有六个CDR。应当理解的是,含有三个或更少个CDR区(在一些情况下,甚至仅单个CDR或其一部分)的分子能够保留一个或多个CDR所衍生的抗体的抗原结合活性。例如,在Gao等人,1994,《生物化学杂志》,269:32389-93中,描述了整个VL链(包含所有三个CDR)对其底物具有高亲和力。

[0093] 含有两个CDR区的分子描述于例如,Vaughan和Sollazzo 2001,《组合化学与高通量筛选(Combinatorial Chemistry&High Throughput Screening)》,4:417-430中。在第418页(右栏—3“设计策略(Our Strategy for Design)”)中,描述了仅包含散布在框架区内的H1和H2CDR高变区的微抗体。所述微抗体被描述为能够与靶标结合。Vaughan和Sollazzo引用了以下Pessi等人,1993,《自然》,362:367-9和Bianchi等人,1994,《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》,236:649-59,并且所述文献更详细地描述了H1和H2微抗体和其性质。在Qiu等人,2007,《自然生物技术(Nature Biotechnology)》,25:921-9中,证明了由两个连接的CDR组成的分子能够结合抗原。Quioco 1993,《自然》,362:293-4提供了“微抗体”技术的总结。Ladner 2007,《自然生物技术》,25:875-7指出,含有两个CDR的分子能够保留抗原结合活性。

[0094] 含有单个CDR区的抗体分子描述于例如,Laune等人,1997,《生物化学杂志》,272:30937-44中,其中证明了衍生自CDR的一系列六肽显示出抗原结合活性,并且注意到完整的单个CDR的合成肽显示出强结合活性。在Monnet等人,1999,《生物化学杂志》,274:3789-96中,示出了一系列12聚体肽和相关框架区具有抗原结合活性,并且指出CDR3样肽单独能够结合抗原。在Heap等人,2005,《普通病毒学杂志(J.Gen.Virol.)》,86:1791-1800中,报道了“微抗体”(含有单个CDR的分子)能够结合抗原,并且示出来自抗HIV抗体的环状肽具有抗原结合活性和功能。在Nicaise等人,2004,《蛋白质科学(Protein Science)》,13:1882-91中,示出了单个CDR可以赋予抗原结合活性和对其溶菌酶抗原的亲和力。

[0095] 因此,具有五个、四个、三个或更少的CDR的抗体分子能够保留其所衍生的全长抗体的抗原结合性质。

[0096] 抗体分子也可以是全长抗体的衍生物或此抗体的片段,条件是片段的此衍生物保留了Fc γ 受体结合能力。当使用衍生物时,所述衍生物应当具有与对应全长抗体相同的抗原结合特性,在某种意义上所述衍生物与靶标上的和全长抗体相同的表位结合。

[0097] 因此,如本文所使用的术语“抗体分子”包含所有类型的抗体分子以及其功能片段和其衍生物,包含:单克隆抗体、多克隆抗体、合成抗体、重组产生的抗体、多特异性抗体、双特异性抗体、人抗体、人来源抗体、人源化抗体、嵌合抗体、单链抗体、抗体重链、抗体重链的同二聚体、抗体重链的异二聚体以及抗体轻链的异二聚体。

[0098] 进一步地,如本文所使用的术语“抗体分子”包含所有类别的抗体分子和功能片段,包含:IgG、IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA、IgM、IgD和IgE,除非另有说明。

[0099] 在一些实施例中,抗体分子是人抗体分子、人源化抗体分子或人来源的抗体分子。在一些此类实施例中,抗体分子是IgG抗体。在一些实施例中,抗体分子具有以最优方式连

接活化Fc受体的同种型。在一些实施例中,抗体分子是IgG1抗体。

[0100] 技术人员应当理解,小鼠IgG2a和人IgG1与活化性Fc γ 受体连接,并且分享通过由例如ADCP和ADCC对具有活化性Fc γ 受体的免疫细胞进行的活化来激活靶细胞的缺失的能力。在一些实施例中,抗TNFR2抗体是鼠或人源化鼠IgG2a抗体。

[0101] 在一些实施例中,特异性结合TNFR2的抗体分子是人IgG2抗体分子。

[0102] 在一些实施例中,抗TNFR2抗体是与人TNFR2具有交叉反应性的鼠抗体。

[0103] 如上所概述的,本发明涵盖不同类型和形式的抗体分子,并且所述不同类型和形式的抗体分子将是免疫学领域的技术人员已知的。众所周知的是,用于治疗目的的抗体通常被修饰抗体分子的性质的另外的组分修饰。

[0104] 因此,包含了本文所述的抗体分子,或如本文所述的使用抗体分子(例如,单克隆抗体分子和/或多克隆抗体分子和/或双特异性抗体分子)包括可检测部分和/或细胞毒性部分。

[0105] “可检测部分”包含来自包括以下的组的一种或多种:酶;放射性原子;荧光部分;化学发光部分;生物发光部分。可检测部分允许抗体分子在体外和/或体内和/或离体可视化。

[0106] “细胞毒性部分”包含放射性部分和/或酶,例如其中酶是胰天蛋白酶和/或毒素,例如其中毒素是细菌毒素或毒液;其中细胞毒性部分能够诱导细胞裂解。

[0107] 进一步包含了抗体分子可以呈分离的形式和/或经纯化的形式,和/或可以是聚乙二醇化的。聚乙二醇化是向分子,如抗体分子或衍生物,添加聚乙二醇聚合物以修饰其行为,例如以通过增加其水动力学尺寸来延长其半衰期,从而防止肾清除的方法。

[0108] 如上所讨论的,抗体的CDR与抗体靶标结合。向本文所描述的每个CDR分配氨基酸符合根据以下的定义:Kabat EA等人,1991,“免疫学上所关注的蛋白质的序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)”第五版,NIH出版号:91-3242,第xv-xvii页。

[0109] 如技术人员将了解的,还存在用于向每个CDR分配氨基酸的其它方法。例如,国际免疫遗传学信息系统(International ImMunoGeneTics information system) (IMGT(R)) (<http://www.imgt.org/>),以及Lefranc和Lefranc“免疫球蛋白概况(The Immunoglobulin FactsBook)”,由学术出版社(Academic Press)出版,2001)。

[0110] 在一些实施例中,特异性结合TNFR2的抗体分子是人抗体。

[0111] 在一些实施例中,特异性结合TNFR2的抗体分子是人来源的抗体,即已经如本文所描述的进行修饰的最初人抗体。

[0112] 在一些实施例中,特异性结合TNFR2的抗体分子是人源化抗体,即已经被修饰以增加其与人抗体的相似性的最初非人抗体。人源化抗体可以具有例如鼠抗体或lama抗体。

[0113] 在一些实施例中,抗TNFR2抗体是单克隆抗体。

[0114] 在一些实施例中,抗TNFR2抗体是多克隆抗体。

[0115] 在一些实施例中,特异性结合TNFR2的抗体分子包括以下表1中列出的VH-CDR1序列之一。

[0116] 在一些实施例中,特异性结合TNFR2的抗体分子包括以下表1中列出的VH-CDR2序列之一。

[0117] 在一些实施例中,特异性结合TNFR2的抗体分子包括以下表1中列出的VH-CDR3序

列之一。

[0118] 在一些实施例中,特异性结合TNFR2的抗体分子包括以下表1中列出的VL-CDR1序列之一。

[0119] 在一些实施例中,特异性结合TNFR2的抗体分子包括以下表1中列出的VL-CDR2序列之一。

[0120] 在一些实施例中,特异性结合TNFR2的抗体分子包括以下表1中列出的VL-CDR3序列之一。

[0121] 在一些实施例中,抗TNFR2抗体分子是:包括具有以下的6个CDR的抗体分子:SEQ.ID.NO:1、2、3、4、5和6;或包括具有以下的6个CDR的抗体分子:SEQ.ID.NO:9、10、11、12、13和14;或包括具有以下的6个CDR的抗体分子:SEQ.ID.NO:17、18、19、20、21和22。

[0122] 在一些实施例中,抗TNFR2抗体分子是:包括具有以下的6个CDR的抗体分子:SEQ.ID.NO:1、2、3、4、5和6。

[0123] 在一些实施例中,抗TNFR2抗体分子是选自由包括VH的抗体分子组成的组的抗体分子,所述VH选自由以下组成的组:SEQ.ID.NO:7、15和23。

[0124] 在一些实施例中,抗TNFR2抗体分子是选自由包括VL的抗体分子组成的组的抗体分子,所述VL选自由以下组成的组:SEQ.ID.NO:8、16和24。

[0125] 在一些实施例中,抗TNFR2抗体分子是包括具有SEQ.ID.NO:7的VH的抗体分子。

[0126] 在一些实施例中,抗TNFR2抗体分子是包括具有SEQ.ID.NO:8的VL的抗体分子。

[0127] 在一些实施例中,抗TNFR2抗体分子包括具有SEQ.ID.NO:7的VH和具有SEQ.ID.NO:8的VH。

[0128] 在一些实施例中,抗TNFR2抗体分子包括具有SEQ.ID.NO:217的CH。

[0129] 在一些实施例中,抗TNFR2抗体分子包括具有SEQ.ID.NO:218的CL。

[0130] 在一些实施例中,抗TNFR2抗体分子包括具有SEQ.ID.NO:7的VH、具有SEQ.ID.NO:8的VH、具有SEQ.ID.NO:217的CH和具有SEQ.ID.NO:218的CL。

[0131] 表1:根据本发明的拮抗性TNFR2阻断抗体分子的特定序列(在VH和VL序列中,CDR序列以粗体标记)

[0132]

抗体克隆	区	序列	SEQ.ID. NO:
001-H10	VH-CDR1	FDDYGMSWVRQAPG	1
	VH-CDR2	SVIYSGGSTYYADSVKGR	2
	VH-CDR3	CARDRSSSWYRDGMDV	3
	VL-CDR1	CTGSSSNIGAGYDVH	4
	VL-CDR2	GNSNRPS	5
	VL-CDR3	CAAWDDSLSGWV	6
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FDDYGMSWVRQAPG KGLEWV SVIYSGGSTYYADSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC CARDRSSSWYRDGMDV WGQGLTVTVSS	7
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTIS CTGSSSNIGAGYDVH WYQQLPGTAPKLLI YGN SNRPS GVDPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYY CAAWDDSLSGWV FGGGTKLTVLG	8
004-H02	VH-CDR1	FDDYGMSWVRQAPG	9
	VH-CDR2	STIYSGDNAYYGASVRGR	10
	VH-CDR3	ARVYSSSWRKRAFDI	11
	VL-CDR1	CSGTSSNIESNTVN	12
	VL-CDR2	SDNQRP	13
	VL-CDR3	CAAWDDSLSGWV	14

[0133]

005-B08	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FDDYGMSWVRQAPG KGLEWV STIYSGDNAYYGASVRGR FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARVYSSSWRKRAFDI WGQGLTVTVSS	15
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTIS CSGTSSNIESNTVN WYQQLPGTAPKLLI YSDNQRP SGVPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYY CAAWDDSLSGWV FGGGTKLTVLG	16
	VH-CDR1	FSDYYMSWIRQAPG	17
	VH-CDR2	AIISYDGGGKYFADPVKGR	18
	VH-CDR3	ARYYGDGGFDP	19
	VL-CDR1	CTGSSSNIGAGYVVH	20
	VL-CDR2	SNNQRPS	21
	VL-CDR3	CAAWDDSLNGPV	22
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSDYYMSWIRQAPG KGLEWV AIISYDGGGKYFADPVKGR FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARYYGDGGFDP WGQGLTVTVSS	23
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTIS CTGSSSNIGAGYVVH WYQQLPGTAPKLLI YSNNQRPS GVDPDRFSGSKSGTSASLAISGLRSEDEADYY CAAWDDSLNGPV FGGGTKLTVLG	24

[0134] 表2:非拮抗性的并且在本文中用于比较的TNFR2阻断抗体分子的特定序列(在VH和VL序列中,CDR序列以粗体标记)

[0135]

005-B02	VH-CDR1	FSDYYMSWIRQAPG	25
	VH-CDR2	ALIWYDGGNEYADSVKGR	26
	VH-CDR3	VRETGNYGMDV	27
	VL-CDR1	CTGSSSNIGAGYDVH	28
	VL-CDR2	RNNQRPS	29
	VL-CDR3	CATWDDRVNGPV	30
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSDYYMSWIRQAPG KGLEWV ALIWYDGGNEYADSVKGR FTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCV VRETGNYGMDV WGQ TLVTSS	31
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTIS CTGSSSNIGAGYDVH WYQ QLPGTAPKLLIY RNNQRPS GVDPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYY CATWDDRVNGPV FGGGTKLTVLG	32
001-E06	VH-CDR1	FSSNYMSWVRQAPG	33
	VH-CDR2	ALIWYDGSNKYYADSVKGR	34
	VH-CDR3	AKDPLFDS	35
	VL-CDR1	CTGRSSNIGAGYDVH	36
	VL-CDR2	DNNKRPS	37
	VL-CDR3	CAAWDDSLNGPV	38
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSSNYMSWVRQAPG KGLEWV ALIWYDGSNKYYADSVKGR FTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC AKDPLFDS WGQGT LTVSS	39
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTIS CTGRSSNIGAGYDVH WY QQLPGTAPKLLIY DNNKRPS GVDPDRFSGSKSGTSASLAIS	40

[0136]

		GLRSEDEADYYCAAWDDSLNGPVFGGGTKLTVLG	
001-G04	VH-CDR1	FNTYSMNWVRQAPG	41
	VH-CDR2	SVLYSDDDDTHYADSVKGR	42
	VH-CDR3	ARDCGGDCHSGDDAFDI	43
	VL-CDR1	CSGSSSNIGSNTVN	44
	VL-CDR2	DNDKRPS	45
	VL-CDR3	CAAWHDSLNGWV	46
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYSMNWV RQAPGKGLEWVSVLYSDDDDTHYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARD CGGDCHSGDDAF DIWGQGLTVTVSS	47
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTVISC SGSSSNIGSNTVN WYQQ LPGTAPKLLIY DNDKRPS GVDPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYCAAWHDSLNGWV LG GGG TKLTVLG	48
001-G10	VH-CDR1	FSAYGMHWVRQAPG	49
	VH-CDR2	AVVSYDGREKHYADSVKGR	50
	VH-CDR3	ARSDGGYDSDSGY	51
	VL-CDR1	CSGSTSNIGSNFVY	52
	VL-CDR2	DNNKRPS	53
	VL-CDR3	CSSYAYSNDIL	54
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSAYGMHWV RQAPGKGLEWVAVVSYDGREKHYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR SDGGYDSDSGYW GQGLTVTVSS	55
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTVISC SGSTSNIGSNFVY WYQQ LPGTAPKLLIY DNNKRPS GVDPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYY CSSYAYSNDIL FGGG TKLTVLG	56
001-C08	VH-CDR1	FSNAWMSWVRQAPG	57
	VH-CDR2	SGISSSGSSAYYADSVKGR	58
	VH-CDR3	ARHYYYHIAGYYYDTFDI	59
	VL-CDR1	CSGSSSNIGGNTVN	60
	VL-CDR2	GNTNRPS	61
	VL-CDR3	CAAWDDSLSGVV	62
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNAWMSWV RQAPGKGLEWVSGISSSGSSAYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHYYYHIAGYYY DTF DIWGQGLTVTVSS	63
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTVISC SGSSSNIGGNTVN WYQQ LPGTAPKLLIY GNTNRPS GVDPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYCAAWDDSLSGVV F GGG TKLTVLG	64
001-H09	VH-CDR1	FSSYAMSWVRQAPG	65
	VH-CDR2	ATISYHGSDKDYADSVKGR	66
	VH-CDR3	ARDANYHSSGYYYDVFDI	67
	VL-CDR1	CSGSSSNIGSNTVN	68
	VL-CDR2	GNSNRPS	69
	VL-CDR3	CAAWDDSLSTWV	70
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVATISYHGSDKDYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDANYHSSGYYY DVF DIWGQGLTVTVSS	71

[0137]

	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQ LPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYCAAWDDSLSTWVFGGGTKLTVLG	72
005-F10	VH-CDR1	FSDYYMTWIRQAPG	73
	VH-CDR2	SGISGSGGYIHADSVKGR	74
	VH-CDR3	AREGLLPDAFD	75
	VL-CDR1	CSGSSSNIGNNYVS	76
	VL-CDR2	RNNQRPS	77
	VL-CDR3	CAAWDDSVSGWV	78
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYYMTWIR QAPGKGLEWVSGISGSGGYIHADSVKGRFTISRDN NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREGLLPDAFDIWGQGT LTVSS	79
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGNNYVSWYQQ LPGTAPKLLIYRNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYCAAWDDSVSGWVFGGGTKLTVLG	80
001-B11	VH-CDR1	FSSYSMNWVRQAPG	81
	VH-CDR2	AVMSYDEYNTYYADSVKGR	82
	VH-CDR3	AKGFYGDYPLWDY	83
	VL-CDR1	CSGGNSNIGTNTVD	84
	VL-CDR2	SNNQRPS	85
	VL-CDR3	CAAWDDSVNGPV	86
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVR QAPGKGLEWVAVMSYDEYNTYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKGFYGDYPLWDYWG QGT LTVSS	87
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGGNSNIGTNTVDWYQ QLPGTAPKLLIYSNNQRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYYCAAWDDSVNGPVFGGGTKLTVLG	88
001-C07	VH-CDR1	FSSYEMNWVRQAPG	89
	VH-CDR2	STITGGGSIYDANSVQGR	90
	VH-CDR3	ARDSTYHSSGYYYDVFDI	91
	VL-CDR1	CSGSSSNIGSNTVN	92
	VL-CDR2	GNSNRPS	93
	VL-CDR3	CAAWDDSLSGHWV	94
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYEMNWVR QAPGKGLEWVSTITGGGSIYDANSVQGRFTISRDN TLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDSTYHSSGYYYDVFDI WGQGT LTVSS	95
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQ LPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYYCAAWDDSLSGHWVFGGGTKLTVLG	96
001-D01	VH-CDR1	FSSYGMHWVRQAPG	97
	VH-CDR2	SAVFGSGHGNTFYADAVKGR	98
	VH-CDR3	AREQLWFGQDAFDI	99
	VL-CDR1	CSGSSSNIGSNTVN	100
	VL-CDR2	GNSNRPS	101
	VL-CDR3	CQSYDSSLASV	102
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGPLRLSCAASGFTFSSYGMHWV RQAPGKGLEWVSAVFGSGHGNTFYADAVKGRFTISR	103

[0138]

003-F10		NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREQLWFGQDAFDI WGQGLTVTVSS	
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQ LPGTAPKLLIYGNSNRPSGVPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYY CQSYDSSL SASVFGGGTKLTVLG	104
	VH-CDR1	FSDAWMTWVRQAPG	105
	VH-CDR2	SDLSDSGGSTYYADSVKGR	106
	VH-CDR3	GRLAAGGPVDY	107
	VL-CDR1	CTGSSSNIGAGYDVH	108
	VL-CDR2	SNNQRPS	109
	VL-CDR3	CSVWDDSLNSWV	110
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSDAWMTWV RQAPGK GLEWV SDLSDSGGSTYYADSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC GRLAAGGPVDY WGQ GTLTVTVSS	111
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTIS CTGSSSNIGAGYDVH WYQ QLPGTAPKLLIYS SNNQRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYY CSVWDDSLNSWV FGGGTKLTVLG	112

[0139] 为了确定或证明本发明的抗体分子的特征,将其与不断断TNF- α 配体与TNFR2结合的抗体分子进行了比较。此类抗体示出在表3中。

[0140] 表3:本文提及的作为参考抗体的非断断TNFR2抗体分子的特定序列(在VH和VL序列中,CDR序列以粗体标记)

[0141]

抗体克隆	区	序列	SEQ.ID. NO:
001-F02	VH-CDR1	FSDYYMSWVRQAPG	113
	VH-CDR2	ANINTDGSEKYYLDSVKGR	114
	VH-CDR3	AREEYGAFDI	115
	VL-CDR1	CSGSSSNIGSNTVN	116
	VL-CDR2	DNNKRPS	117
	VL-CDR3	CQSFDRGLSGSIV	118
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSDYYMSWVR QAPGK GLEWVANINTDGSEKYYLDSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREEYGAFDIWGQGL TVTVSS	119
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNTVNWYQQ LPGTAPKLLIY DNNKRPS GVPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYY CQSFDRGLSGSIV FGGGTKLTVLG	120
001-F06	VH-CDR1	FSSYAMHWVRQAPG	121
	VH-CDR2	SAISGGATTTYADSVKGR	122
	VH-CDR3	AKGGTGDPPYFDY	123
	VL-CDR1	CTGSSSNIGAGYDVH	124
	VL-CDR2	RNNQRPS	125
	VL-CDR3	CAARDDGLSGPV	126
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSSYAMHWVR QAPGK GLEWV SAISGGATTTYADSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA KGGTGDPPYFDY WGQ	127

[0142]

		GTLVTVSS	
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQ QLPGTAPKLLIY RNNQRPS GVDPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYY CAARDDGLSGPV FGGGTKLTVLG	128
001-A09	VH-CDR1	FSSNYMSWVRQAPG	129
	VH-CDR2	SVISGSGGSTYYADSVKGR	130
	VH-CDR3	ARDRGWFDG	131
	VL-CDR1	CSGSRSNIDNSYVS	132
	VL-CDR2	RNNQRPS	133
	VL-CDR3	CATWDDSLSGPV	134
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSSNYMSWVR QAPG KGLEWV SVISGSGGSTYYADSVKGR FTISRDN NTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARDRGWFDG WGQGT LTVSS	135
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTIS CSGSRSNIDNSYVSWYQQ LPGTAPKLLIY RNNQRPS GVDPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYY CATWDDSLSGPV FGGGTKLTVLG	136
001-B05	VH-CDR1	FSNAWMSWVRQAPG	137
	VH-CDR2	SSISSASGYIYYGDSVKGR	138
	VH-CDR3	ARGTLYGDFDEF	139
	VL-CDR1	CSGSSSNIGNNAVN	140
	VL-CDR2	GNTNRPS	141
	VL-CDR3	CQSYDSSLGYVV	142
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSNAWMSWV RQAPG KGLEWV SSISSASGYIYYGDSVKGR FTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARGTLYGDFDEF WGQ GTLVTVSS	143
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTIS CSGSSSNIGNNAVNWYQQ LPGTAPKLLIY GNTNRPS GVDPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYY CQSYDSSLGYVV FGGGTKLTVLG	144
001-B09	VH-CDR1	FSRHAMNWVRQAPG	145
	VH-CDR2	SSISTGSSYIDYADSVKGR	146
	VH-CDR3	AREKGHYYYGMDV	147
	VL-CDR1	CTGSSSNIGAGYDVH	148
	VL-CDR2	GNSYRPS	149
	VL-CDR3	CQSYDTLSAYVV	150
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSRHAMNWV RQAPG KGLEWV SSISTGSSYIDYADSVKGR FTISRDN NTLYLQMNSLRAEDTAVYYC CAREKGHYYYGMDV WG QGTLVTVSS	151
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGAGYDVHWYQ QLPGTAPKLLIY GNSYRPS GVDPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYY CQSYDTLSAYVV FGGGTKLTVLG	152
001-C03	VH-CDR1	FSNAWMSWVRQAPG	153
	VH-CDR2	SAISVSGINTYYADSVKGR	154
	VH-CDR3	ARDTGSLGVDY	155
	VL-CDR1	CSGSSSNIGSNTVN	156
	VL-CDR2	RNNQRPS	157
	VL-CDR3	CQSYDSSLISV	158
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FSNAWMSWV	159

[0143]

		RQAPGKGLEWVSAISVSGINTYYADSVKGRFTISRDN KNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDT GLGVDYWGQG TLVTVSS	
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNTVN WYQQ LPGTAPKLLIY RNNQRPSG VPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYY CQSYDSSL SISVFGGGTKLTVLG	160
001-C05	VH-CDR1	FSSNEMSWIRQAPG	161
	VH-CDR2	SVIYSGGSTYYADSVKGR	162
	VH-CDR3	ARREGWLVPFDY	163
	VL-CDR1	CSGSSSNIGSNTVN	164
	VL-CDR2	GNIIRPS	165
	VL-CDR3	CQSFDTTSLGSIV	166
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSNEMSWIR QAPGKGLEWVSVIYSGGSTYYADSVKGRFTISRDN SKN TLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARREGWLVPFDYWGQ GT LTVSS	167
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGSNTVN WYQQ LPGTAPKLLIY GNIIRPSG VPDRFSGSKSGTSASLAISGLR SEDEADYY CQSFDTTSLGSIV FSGGGTKLTVLG	168
001-G05	VH-CDR1	FSSYAMSWVRQAPG	169
	VH-CDR2	SVISGSGGSTYYADAVKGR	170
	VH-CDR3	TTDSGSGSYL	171
	VL-CDR1	CTGSSSNIGAGYDVH	172
	VL-CDR2	SNNQRPS	173
	VL-CDR3	CAAWDDSLNGPV	174
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSVISGSGGSTYYADAVKGRFTISRDN SK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYC TTDSGSGSYLWGQ GT LTVSS	175
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTIS CTGSSSNIGAGYDVH WYQ QLPGTAPKLLIY SNNQRPSG VPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYY CAAWDDSLNGPV FSGGGTKLTVLG	176
001-A10	VH-CDR1	FSDYYMTWIRQAPG	177
	VH-CDR2	SSISGGSTYYADSRKGR	178
	VH-CDR3	AREPGYSYGFFDY	179
	VL-CDR1	CTGSSSNIGAGYDVH	180
	VL-CDR2	SNNQRPS	181
	VL-CDR3	CQSYDRSLSGSIV	182
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLS CAASGFTFSDYYMTWIR QAPGKGLEWVSSISGGSTYYADSRKGRFTISRDN SKNT LYLQMNSLRAEDTAVYYC AREPGYSYGFFDYWGQ GT LTVSS	183
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTIS CTGSSSNIGAGYDVH WYQ QLPGTAPKLLIY SNNQRPSG VPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYY CQSYDRSLSGSIV FSGGGTKLTVLG	184
001-C06	VH-CDR1	SSSYWMSWVRQAPG	185
	VH-CDR2	SAISGSGGSTYYADSVKGR	186
	VH-CDR3	AREYSGYEFDF	187
	VL-CDR1	CTGSSSNIGARSDVH	188
	VL-CDR2	GNNRNRPS	189

[0144]

	VL-CDR3	CQSFDRGLSGSIV	190
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTSSSYWMSWVR QAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAREYSGYEFDFWGQGT LTVSS	191
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGARSDVHWYQ QLPGTAPKLLIY GNRNRPS GVDPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYY CQSFDRGLSGSIV FGGGTKLTVLG	192
001-H03	VH-CDR1	FSSNYMSWVRQAPG	193
	VH-CDR2	SSISSSSYIYYADSVKGR	194
	VH-CDR3	ARDRGRTGTDY	195
	VL-CDR1	CSGTTSNIGSYAVN	196
	VL-CDR2	GNINRPS	197
	VL-CDR3	CQSYDSSLASL	198
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSNYMSWVR QAPGKGLEWVSSISSSSYIYYADSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARDRGRTGTDYWGQGT LTVSS	199
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGTTSNIGSYAVNHWYQ LPGTAPKLLIY GNINRPS GVDPDRFSGSKSGTSASLAISGL RSEDEADYY CQSYDSSLASL FGGGTKLTVLG	200
004-E08	VH-CDR1	FSRYWMHWVRQVPG	201
	VH-CDR2	SGISDSGVVTTYADSVKGR	202
	VH-CDR3	ARAQSVAFDI	203
	VL-CDR1	CSGSSSNIGAGHDVH	204
	VL-CDR2	YDDLPS	205
	VL-CDR3	CAAWDDSLSGWV	206
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSRYWMHWV RQVPGKGLEWVSGISDSGVVTTYADSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARAQSVAFDIWGQGT LTVSS	207
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCSGSSSNIGAGHDVHWYQ QLPGTAPKLLIY YDDLPS GVDPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYY CAAWDDSLSGWV FGGGTKLTVLG	208
005-A05	VH-CDR1	FSSYAMSWVRQAPG	209
	VH-CDR2	STIIGSGANTWYADSVKGR	210
	VH-CDR3	ARHEGYYYYGMDV	211
	VL-CDR1	CTGSSSNIGAGYVH	212
	VL-CDR2	GNSNRPS	213
	VL-CDR3	CAAWDDSLNGRV	214
	VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVR QAPGKGLEWVSTIIGSGANTWYADSVKGR FTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHEGYYYYGMDVWG QGT LTVSS	215
	VL	QSVLTQPPSASGTPGQRTISCTGSSSNIGAGYVVHWYQ QLPGTAPKLLIY GNSNRPS GVDPDRFSGSKSGTSASLAISG LRSEDEADYY CAAWDDSLNGRV FGGGTKLTVLG	216

[0145] 以上表1、2和3中的序列均为人类起源的并且衍生自 n-CoDeR®库,如实例1中详细解释的。

[0146] 在一些实施例中,特异性结合本文所述的TNFR2的抗体分子还可以包括以下表4中列出的恒定区(CH和/或CL)中的一个或两个。

[0147] 表4:

[0148]

区	序列	SEQ.ID. NO:
CH	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDK KVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	217
CL	QPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVK AGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRYSYSCQVTHEGSTVEK TVAPTECS	218
CH	AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSS GVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIE PRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDV SEDDPDVQISWVFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDW MSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKK QVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMY SKLRVEKKNWVERNYSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK	219
CH	AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTLTWNSGSLSS GVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPSQSITCNVAHPASSTKVDKKIE PRGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDV SEDDPDVQISWVFVNNVEVHTAQTQTHREDYASTLRVVSALPIQHQDW MSGKEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKK QVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMY SKLRVEKKNWVERNYSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK	220
CL	QPKSSPSVTLFPPSSEELTNKATLVCTITDFYPGVVTVDWKVDGTPVT QGMETTQPSKQSNNKYMSSYLTLTARAWERHSSYSCQVTHEGHTVE KSLSRADCS	221

[0149] 以上表4中的第一CH (SEQ. ID. NO: 217) 和第一CL (SEQ. ID. NO: 218) 序列为人类起源。表4中的第二CH (SEQ. ID. NO: 219) 和第三CH (SEQ. ID. NO: 220) 均来自鼠IgG2a, 其区别在于第三CH序列 (SEQ. ID. NO: 220) 含有N297A突变。第二CL序列 (SEQ. ID. NO: 221) 来自鼠λ轻链恒定区。这些鼠序列在实例中用于替代抗体。

[0150] 在一些实施例中, 抗体分子结合人TNFR2 (hTNFR2)。

[0151] 在一些实施例中, 有利的是, 抗体分子与hTNFR2和食蟹猴TNFR2 (cmTNFR2或cynoTNFR2) 结合。与在恒河猴, 也被称为食蟹猴或长尾猴体内的细胞上表达的TNFR2的交叉反应可能是有利的, 因为这使得能够在不使用替代抗体的情况下, 在特别关注耐受性的情况下进行抗体分子的动物测试。

[0152] 在一些实施例中, 需要的是使用替代抗体测试小鼠体内的相关体内模型中的抗体分子的功能活性。为了确保人体内的抗体分子的作用与小鼠体内的替代抗体的体内结果之间的可比性, 必要的是选择具有与人抗体分子相同的体外特性的功能等效的替代抗体。

[0153] 在一些实施例中, 抗体分子不与包括序列KCSPG或由序列KCSPG组成的TNFR2的表位特异性结合。

[0154] 在一些实施例中, 本发明或根据本发明使用的抗体分子是能够与本文提供的特异性抗体竞争, 例如能够与包括以下的抗体分子竞争以用于与TNFR2结合的抗体分子: 选自由SEQ. ID. NO: 7、15和23组成的组的VH; 和/或选自由SEQ. ID. NO: 8、16和24组成的组的VL。

[0155] “能够竞争”意指竞争性抗体能够至少部分地抑制或另外干扰如本文定义的抗体分子与特异性靶标TNFR2的结合。

[0156] 例如,此竞争性抗体分子能够将本文所述的拮抗性阻断抗体分子的结合抑制至少约10%;例如至少约20%、或至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少100%和/或将本文所述的抗体防止或减少TNFR2与特定靶配体TNF- α 的结合的能力抑制至少约10%;例如至少约20%、至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%或约100%。

[0157] 竞争性结合可以通过本领域的技术人员众所周知的方法来确定,如酶联免疫吸附测定(ELISA)。

[0158] 可以使用ELISA测定来评价表位修饰或阻断抗体。适用于标识竞争性抗体的另外的方法公开于《抗体:实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual)》,Harlow和Lane中,所述文献通过引用并入本文(例如,参见第567页到第569页、第574页到第576页、第583页以及第590到第612页,1988,冷泉港实验室(CSHL),纽约(NY),ISBN 0-87969-314-2)。

[0159] 在一些实施例中,所关注的是不使用抗体分子自身,而是使用编码此抗体分子的核苷酸序列。因此,本发明涵盖编码以上拮抗性阻断TNFR-2抗体分子的核苷酸序列。

[0160] 以上所述的拮抗性阻断抗体分子和核苷酸序列可以用于医学中,并且然后此类抗体分子和/或核苷酸序列可以包含在药物组合物中,如以下进一步讨论的。

[0161] 以上所述的拮抗性阻断抗体分子、核苷酸序列和/或药物组合物可以用于治疗癌症,如下文进一步讨论的。

[0162] 以上所述的拮抗性阻断抗体分子、核苷酸序列和/或药物组合物可以用于治疗由细胞内病原体引起的感染,如下文进一步讨论的。

[0163] 以上所述的拮抗性阻断抗体分子和/或核苷酸序列可以用于制造用于治疗癌症的药物组合物。

[0164] 以上所述的拮抗性阻断抗体分子和/或核苷酸序列可以用于制造用于治疗由细胞内病原体引起的感染的药物组合物。

[0165] 以上所述的拮抗性阻断抗体分子和/或药物组合物可以在用于治疗患者的癌症的方法中使用,在所述方法中向所述患者施用治疗有效量的抗体分子或药物组合物。

[0166] 以上所述的拮抗性阻断抗体分子和/或药物组合物可以在用于治疗患者的由细胞内病原体引起的感染的方法中使用,在所述方法中向所述患者施用治疗有效量的抗体分子或药物组合物。

[0167] 在涉及治疗癌症的一些实施例中,所述癌症是实体癌或白血病。实体癌是通常不含有囊肿或液体区域的异常组织块。实体癌可以是良性的(不是癌症)或恶性的(癌症)。恶性实体癌在本文中被称作实体癌。不同类型的实体癌针对形成其的细胞的类型而命名。实体癌或癌症的实例是肉瘤、癌和淋巴瘤。

[0168] 实体癌的更具体实例是肺癌、乳腺癌、结肠直肠癌、前列腺癌、膀胱癌、卵巢癌、子宫内膜癌、肾癌、肝癌、胰腺癌、甲状腺癌、脑癌、中枢神经系统癌、黑素瘤、神经母细胞瘤、威尔姆斯瘤(Wilms tumor)、横纹肌肉瘤、视网膜母细胞瘤、头颈癌、胃癌、淋巴瘤和骨癌。

[0169] 白血病癌症的更具体的实例是急性淋巴细胞性白血病、慢性骨髓增殖性疾病、急性非淋巴细胞性白血病、B细胞急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病、T细胞急性淋巴细胞性白血病、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma)和慢性淋巴细胞增殖性疾

病。

[0170] 在涉及治疗由细胞内病原体,如病毒或细菌引起的感染的一些实施例中,细胞内病原体的具体实例是嗜肺军团菌(*Legionella pneumophila*)、立克次氏菌(*Rickettsia*)、结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*)、单核细胞增多性李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)、沙门氏菌(*Salmonella* spp)、侵袭性大肠杆菌(*invasive Escherichia coli*)、奈瑟菌属(*Neisseria* spp)、布鲁氏菌属(*Brucella* spp)、志贺氏菌属(*Shigella* spp)、流感病毒、疱疹病毒、肝炎病毒、柯萨基病毒(*Coxsackievirus*)、艾普斯登-巴尔病毒(*Epstein-Barr virus*)或鼻病毒。

[0171] 在涉及治疗癌症的一些实施例中,上述拮抗性阻断抗体分子可以和与检查点抑制剂特异性结合的抗体分子组合使用。可替代地,以上讨论的编码阻断TNFR2抗体分子的核苷酸序列可以和与检查点抑制剂或共刺激性激动性抗体特异性结合的抗体分子组合使用。检查点抑制剂的抗体包含靶向CTLA4、PD1、PD-L1、VISTA、TIGIT、CD200、CD200R、BTLA、LAG3、TIM3、B7-H3、B7-H4、B7-H7的抗体。共刺激性激动性抗体的实例是靶向OX40、41BB、OX40L、41BBL、GITR、ICOS、DR3、DR4、DR5、CD40、CD27、RANK、HVEM、LIGHT和B7-H6的抗体。可替代地,以上讨论的拮抗性阻断TNFR2抗体分子可以和编码与检查点抑制剂或共刺激性激动剂特异性结合的抗体分子的核苷酸序列组合使用。可替代地,以上讨论的编码阻断TNFR2抗体分子的核苷酸序列可以和编码与检查点抑制剂或共刺激性激动剂特异性结合的抗体分子的核苷酸序列组合使用。在一些实施例中,与检查点抑制剂特异性结合的抗体分子是抗PD-1抗体。PD-1(或PD1)抗体被视为阻断主要CD8⁺T细胞中的通过PD-L1介导的抑制性信号;并且由此允许增加T细胞介导的抗肿瘤反应。耗竭Treg的拮抗性TNFR2抗体将通过单独机制起作用,以增加抗肿瘤反应。因此这些治疗可以彼此协同。这对于其它检查点抑制剂和激动性共刺激性抗体也是如此。

[0172] 另外,以上讨论的拮抗性阻断TNFR2抗体分子可以与其它抗癌治疗组合使用,如化学疗法(例如但不限于多柔比星(doxorubicin)、卡铂、环磷酰胺、太平洋紫杉醇、吉西他滨(gemcitabine)、5-氟尿嘧啶、多西他赛(docetaxel)、长春新碱(vincristine)、米托蒽醌(Mitoxantrone)、密吐霉素(mutamycin)、表柔比星(epirubicin)和甲氨蝶呤(methotrexate))、小分子酪氨酸激酶或丝氨酸/苏氨酸激酶抑制剂(例如但不限于依鲁替尼(ibrutinib)、伊马替尼(imatinib)、舒尼替尼(sunitinib)、瑞格拉非尼(regorafenib)、索拉非尼(sorafenib)、达沙替尼(dasatinib)、厄洛替尼(erlotinib)、凡德他尼(vandetanib)、米喹妥林(midostaurin)、维莫非尼(vemurafenib)、达拉非尼(dabrafenib)、帕博西尼(palbociclib)、瑞博西尼(ribociclib)、曲美替尼(Trametinib)或艾乐替尼(alectinib))、靶向生长因子受体的抑制剂(例如但不限于靶向EGFR/HER1/Erbb1、EGFR2/HER2/Erbb2、EGFR3/HER3/Erbb3、VEGFR、PDGFR、HGFR、RET、胰岛素样生长因子受体IGFR、FGFR的药物)、抗血管生成剂(例如但不限于贝伐单抗(Bevacizumab)、依维莫司(Everolimus)、来那度胺(Lenalidomide)、沙利度胺(Thalidomide)、齐夫-阿非西普(Ziv-aflibercept))或辐射。典型地,以上提及的抗癌药物均引起癌细胞死亡,这将导致新抗原暴露和发炎。在新抗原暴露并且肿瘤中存在炎性细胞涌入时,可能发生抗癌药物的协同作用,并且添加可以耗竭Treg并且由此可以增强免疫系统的拮抗性配体阻断TNFR2抗体甚至更进一步。

[0173] 医学领域的技术人员将理解,药物可以用不同添加剂来修饰,例如以改变身体吸收药物的速率;并且药物可以以不同形式修饰,例如以允许到身体的特定施用途径。

[0174] 因此,包含了本文所述的拮抗性阻断抗体分子、核苷酸序列、质粒、病毒和/或细胞可以与药学上可接受的赋形剂、载体、稀释剂、媒剂和/或佐剂一起组合成药物组合物。在此上下文中,术语药物组合物与术语药物制剂、药物调配物、治疗组合物、治疗制剂、治疗调配物和治疗实体可互换使用。

[0175] 本文所述的药物组合物可以包括以下,或在一些实施例中可以由以下组成:抗体分子、核苷酸序列、质粒、病毒或细胞。

[0176] 在一些实施例中,本文所述的药物组合物可以由质粒组成或包括质粒,所述质粒包括编码上述抗体分子或包括上述核苷酸序列的核苷酸序列。

[0177] 在一些实施例中,药物组合物可以包括编码整合在细胞或病毒基因组中或病毒体中的本文所述的抗体分子的部分或完整抗体分子的核苷酸序列。然后,药物组合物可以包括作为本发明的抗体的递送媒剂的细胞或病毒(或编码本发明的抗体的核苷酸序列的递送媒剂)。例如,在实施例中,病毒可以呈治疗性溶瘤病毒的形式,所述治疗性溶瘤病毒包括编码本文所述的抗体分子中的至少一个抗体分子的核苷酸序列。在一些实施例中,此溶瘤病毒包括编码全长人IgG抗体的核苷酸序列。

[0178] 在一些实施例中,本发明涉及包括本发明的核苷酸序列或本发明的质粒的病毒。优选地,病毒是溶瘤病毒,如治疗性溶瘤病毒。此类病毒是医学和病毒学领域的技术人员已知的。

[0179] 在一些实施例中,此溶瘤病毒包括编氨基酸序列的与以上表1中列示的序列具有至少80%同一性的核苷酸序列。在一些实施例中,此溶瘤病毒包括与以上表1中列示的序列具有至少85%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,此溶瘤病毒包括与以上表1中列示的序列具有至少90%同一性的氨基酸序列。在一些实施例中,此溶瘤病毒包括与以上表1中列示的序列具有至少95%同一性的氨基酸序列。

[0180] 例如,编码抗体001-H10的核苷酸序列可以如表5中呈现的。

[0181] 表5:编码抗体001-H10的核苷酸序列的实例-表中带下划线的序列的一部分分别编码001-H10的VH和VL序列

编码	序列	SEQ.ID. NO:
[0182]	001-H10	<u>222</u>
	VH	
	GAGGTGCAGCTGTTGGAGTCTGGGGGAGGCTTGGTACAGCCTGGG	
	GGGTCCCTGAGACTCTCTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTTGATGA	
	TTATGGCATGAGCTGGGTCCGCCAAGCTCCAGGGAAGGGGCTGGA	
	GTGGGTCTCAGTTATTTATAGCGGTGGTAGTACATATTACGCAGACT	
	CCGTGAAGGGCCGATTACCATCTCCAGAGACAATTCCAAGAACAC	
	GCTGTATCTGCAAATGAACAGCCTGAGAGCCGAGGACACTGCCGTG	
	TATTACTGTGCGAGAGATCGAAGCAGCAGCTGGTACCGCGATGGTA	
	TGGACGTCTGGGGCCAAGGTACACTGGTCACCGTGAGCTCAGCCTC	
	CACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGC	
	ACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTAC	

[0183]	TTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGGAACCTCAGGCGCCCTGACC AGCGGCGTGACACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCT ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCAC CCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAA GGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACAAAACCTCACAC ATGCCACCGTGCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTC TTCCTCTTCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGA CCCCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACC CTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCATAA TGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG TGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGC AAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGCCCTCCCAGCCCCC ATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCA CAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACC AGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACAT CGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAA GACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTAC AGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGT CTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGC AGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA	
001-H10 VL	<u>CAGTCTGTGCTGACTCAGCCACCCTCAGCGTCTGGGACCCCCGGGC</u> <u>AGAGGGTCACCATCTCCTGCACTGGGAGCAGCTCCAACATCGGGGC</u> <u>AGGTTATGATGTACACTGGTATCAGCAGCTCCCAGGAACGGCCCCC</u> <u>AACTCCTCATCTATGGTAACAGCAATCGGCCCTCAGGGGTCCCTG</u> <u>ACCGATTCTCTGGCTCCAAGTCTGGCACCTCAGCCTCCCTGGCCATC</u> <u>AGTGGGCTCCGGTCCGAGGATGAGGCTGATTATTACTGTGCAGCAT</u> <u>GGGATGACAGCCTGAGTGGTTGGGTGTTCCGGCGGAGGAACCAAGC</u> <u>TGACGGTCCTAGGTACAGCCAAGGCTGCCCCCTCGGTCACTCTGTT</u> <u>CCCGCCCTCCTCTGAGGAGCTTCAAGCCAACAAGGCCCACTGGT</u> <u>GTGTCTCATAAGTGACTTCTACCCGGGAGCCGTGACAGTGGCCTGG</u> <u>AAGGCAGATAGCAGCCCCGTCAAGGCGGGAGTGGAGACCACCACA</u> <u>CCCTCCAAACAAAGCAACAACAAGTACGCGGCCAGCAGCTATCTG</u> <u>AGCCTGACGCCTGAGCAGTGGAAGTCCCACAGAAGCTACAGCTGC</u> <u>CAGGTCACGCATGAAGGGAGCACCGTGGAGAAGACAGTGGCCCCCT</u> <u>ACAGAATGTTTCATGA</u>	

[0184] 一些溶瘤病毒具有容纳足够大的DNA插入以适应全长人抗体序列整合的能力。减弱型痘苗病毒和单纯疱疹病毒是其基因组大到足以允许整合全长IgG抗体序列的治疗性溶瘤病毒的实例(Chan等人,2014,“溶瘤痘病毒(Oncolytic Poxviruses)”,《病毒学年度评论(Annu Rev Virol)》1:119-41;Bommareddy等人,2018,“在组合癌症免疫疗法中整合溶瘤病毒(Integrating oncolytic viruses in combination cancer immunotherapy)”,《自然综述免疫学(Nat Rev Immunol)》18:498-513)。已经将全长IgG抗体成功整合成溶瘤牛痘病毒,这引起在病毒易感性宿主细胞,例如癌细胞感染时表达和细胞外释放(产生)全长IgG抗体(Kleinpeter等人,2016,“在抗体、Fab和scFv的溶瘤牛痘病毒中针对程序性细胞死亡-1(PD-1)的载体化允许其肿瘤内递送以及改善肿瘤生长抑制(Vectorization in an oncolytic vaccinia virus of an antibody,a Fab and a scFv against programmed cell death-1(PD-1)allows their intratumoral delivery and an improved tumor-growth inhibition)”,《肿瘤免疫学(Oncoimmunology)》5:e1220467)。腺病毒也可以被工程为编码在细胞感染时功能性地产生并且分泌的全长IgG抗体(MarinoN.等人,2017“用于治疗性转基因的局部肿瘤内表达的多功能溶瘤病毒平台的开发(Development of aversatile oncolytic virus platform for local intra-tumoural expression of

therapeutic transgenes)”《公共科学图书馆·综合》12:e0177810)。

[0185] 本发明还涵盖包括病毒,如上文所讨论的溶瘤病毒以及药学上可接受的稀释剂、媒剂和/或佐剂的药物组合物。

[0186] 本发明还包括其它治疗方式或“形状”的药物,如抗体药物缀合物、输注蛋白质等,以及包括此类治疗方式的药物组合物。

[0187] 本文所述的抗体分子、核苷酸序列、质粒、病毒、细胞和/或药物组合物可以适合于肠胃外施用,其包含水性和/或非水性无菌注射溶液,所述水性和/或非水性无菌注射溶液可以含有抗氧化剂和/或缓冲剂和/或抑菌剂和/或使调配物与预期接受者的血液等渗的溶质;和/或水性和/或非水性无菌悬浮液,所述水性和/或非水性无菌悬浮液可以包含悬浮剂和/或增稠剂。本文所述的抗体分子、核苷酸序列、质粒、细胞和/或药物组合物可以在单位剂量或多剂量容器(例如密封安瓿和小瓶)中呈现并且可以在冷冻干燥(即冻干)条件下储存,仅需要在立即使用之前添加无菌液体载体,例如注射用水。

[0188] 可以由前述种类的无菌粉末和/或颗粒和/或片剂制备临时注射溶液和悬浮液。

[0189] 对于人类患者的肠胃外施用,抗TNFR2抗体分子的日常剂量水平通常将为1mg/kg患者体重到20mg/kg,或者在一些情况下以单个剂量或分开的剂量施用甚至高达100mg/kg。在特殊情况下,例如在结合长期施用的情况下,可以使用较低剂量。在任何情况下,医生将确定最适合于任何个体患者的实际剂量,并且所述实际剂量将随着特定患者的年龄、体重和反应而变化。上述剂量是一般情况的示例。当然,可以存在个别情况,其中更高或更低的剂量范围是理所当然的,并且此剂量处于本发明的范围内。

[0190] 典型地,本文所述的包括抗体分子的药物组合物(或药物)将含有浓度介于大约2mg/ml与150mg/ml之间或介于大约2mg/ml与200mg/ml之间的抗TNFR2抗体分子。

[0191] 通常,在人类中,本文所述的抗体分子、核苷酸序列、质粒、病毒、细胞和/或药物组合物的口服或肠胃外施用是优选途径,是最方便的。对于兽医用途,本文所述的抗体分子、核苷酸序列、质粒、病毒、细胞和/或药物组合物根据正常兽医实践,以适当可接受的调配物形式施用,并且兽医将确定最适合于特定动物的给药方案和施用途径。因此,本发明提供了包括一定量的对于治疗各种病状有效的本发明的抗体分子、核苷酸序列、质粒、病毒和/或细胞的药物调配物(如上文和下文进一步描述的)。优选地,本文所述的抗体分子、核苷酸序列、质粒、病毒、细胞和/或药物组合物适用于通过选自包括以下的组的途径递送:静脉内(IV或i.v.);肌肉内(IM或i.m.);皮下(SC或s.c.)或肿瘤内。

[0192] 本发明还包含包括本发明的靶结合分子或部分的药学上可接受的酸或碱加成盐的本文所述的抗体分子、核苷酸序列、质粒、病毒、细胞和/或药物组合物。用于制备可用于本发明的上述碱化合物的药学上可接受的酸加成盐的酸是形成无毒酸加成盐的酸,即含有药理学上可接受的阴离子的盐,如盐酸盐、氢溴酸盐、氢碘酸盐、硝酸盐、硫酸盐、硫酸氢盐、磷酸盐、酸性磷酸盐、乙酸盐、乳酸盐、柠檬酸盐、酸性柠檬酸盐、酒石酸盐、酒石酸氢盐、琥珀酸盐、马来酸盐、富马酸盐、葡萄糖酸盐、蔗糖酸盐、苯甲酸盐、甲磺酸盐、乙磺酸盐、苯磺酸盐、对甲苯磺酸盐和双羟萘酸盐[即,1,1'-亚甲基-双-(2-羟基-3萘甲酸酯)]盐等。也可以使用药学上可接受的碱加成盐来产生药学上可接受的盐形式的根据本发明的药剂。可以用作试剂以制备在性质上为酸性的本发明药剂的药学上可接受的碱盐的化学碱是与此类化合物形成无毒碱盐的那些。此类无毒碱盐包含但不限于:衍生自此类药理学上可接受的

阳离子的碱盐,如碱金属阳离子(例如,钾和钠)和碱土金属阳离子(例如,钙和镁)的那些;铵或水溶性胺加成盐,如N-甲基葡萄糖胺-(葡甲胺);以及低级链烷醇铵和药学上可接受的有机胺的其它碱盐等。本文所述的抗体分子、核苷酸序列、质粒、病毒和/或细胞可以冻干以用于在使用前储存并在合适的载体中重组。可以采用任何合适的冻干方法(例如,喷雾干燥、滤饼干燥(cake drying))和/或重组技术。本领域的技术人员将理解,冻干和重组可能导致不同程度的抗体活性损失(例如,利用常规免疫球蛋白,IgM抗体的活性损失往往比IgG抗体更大),并且可能必须向上调整使用水平以进行补偿。在一个实施例中,当再水化时,冻干的(冷冻干燥的)多肽结合部分损失的活性(在冻干之前)不超过约20%、或不超过约25%、或不超过约30%、或不超过约35%、或不超过约40%、或不超过约45%、或不超过约50%。

[0193] 本文所述的抗TNFR2抗体分子、核苷酸序列和药物组合物可以用于治疗受试者或患者的癌症。在本文中,术语受试者和患者可互换使用。

[0194] 如本文所用的术语“患者”(或受试者)是指已经被诊断为患有具体疾病的动物,包含人。

[0195] 在一些实施例中,患者(或受试者)是已被诊断为患有癌症和/或表现出癌症的症状的动物,包含人。

[0196] 在一些实施例中,患者(或受试者)是已被诊断为患有由细胞内病原体引起的感染和/或表现出由细胞内病原体引起的感染的症状的动物,包含人。

[0197] 在一些实施例中,患者(或受试者)是患病组织中具有高TNFR2表达的患者。在此上下文中,高表达意指与对应健康组织相比更高水平的TNFR2表达。通常,用于此比较的健康组织是从一个或几个健康个体的健康组织中收集的参考组织(或标准参考)。表达的水平可以通过标准技术测量,如免疫组织化学(IHC)、荧光激活细胞分选(FACS)或mRNA表达测量。

[0198] 包含了患者可以是哺乳动物或非哺乳动物。优选地,哺乳动物患者是人、马、牛、羊、猪、骆驼、狗或猫。最优选地,哺乳动物患者是人。

[0199] “表现出”癌症的症状包含了,患者展现出癌症症状和/或癌症诊断标志物和/或所述癌症症状和/或癌症诊断标志物可以被测量和/或评估和/或量化。

[0200] 对于医学技术人员容易理解的是,癌症症状和癌症诊断标志物将是什么以及如何测量和/或评估和/或量化癌症症状的严重度是否降低或增加、或癌症诊断标志物是否减少或增加;以及如何可以使用那些癌症症状和/或癌症诊断标志物来形成癌症的预后。

[0201] 癌症治疗通常以一系列治疗的治疗形式施用,也就是说,治疗剂在一段时间内施用。一系列治疗的时间的长度将取决于许多因素,所述许多因素可以包含所施用的治疗剂的类型、所治疗的癌症的类型、所治疗的癌症的严重度以及患者的年龄和健康状况等其它原因。

[0202] “治疗期间”包含了,患者当前正在接受一系列治疗程和/或正在接受治疗剂、和/或正在接受一系列治疗剂。

[0203] 在一些实施例中,根据本发明的待治疗的癌症是实体瘤。

[0204] 上述癌症中的每一种癌症都是众所周知的,并且如用于治疗那些癌症的治疗剂一样对症状和癌症诊断标志物进行了很好的描述。因此,症状、癌症诊断标志物和用于治疗以上提及的癌症类型的治疗剂将是医学技术人员已知的。

[0205] 对大量癌症的诊断、预后和进展的临床定义依赖于被称为分期的某些分类。那些

分期系统用于核对许多不同癌症诊断标志物和癌症症状,以提供对癌症的诊断和/或预后和/或进展的概述。肿瘤学的技术人员将理解如何使用分期系统评估癌症的诊断和/或预后和/或进展,以及应该使用哪些癌症诊断标志物和癌症症状来进行评估。

[0206] “癌症分期”包含: Rai分期,所述Rai分期包含0期、I期、II期、III期和IV期;和/或 Binet分期,所述Binet分期包含A期、B期和C期;和/或安娜堡分期(Ann Arbour staging),所述安娜堡分期包含I期、II期、III期和IV期。

[0207] 已知的是,癌症可以引起细胞形态的异常。这些异常通常可再现地发生在某些癌症中,这意味着在癌症的诊断或预后中可以使用检查形态的这些变化(另外被称为组织学检查)。用于使样品可视化以检查细胞形态并且用于制备用于可视化的样品的技术是本领域众所周知的;例如,光学显微镜或共聚焦显微镜。

[0208] “组织学检查”包含: 存在小型成熟淋巴细胞;和/或存在具有狭窄细胞质边界的小型成熟淋巴细胞;存在具有缺乏可辨别的核仁的致密核的小型成熟淋巴细胞;和/或存在具有狭窄细胞质边界并且具有缺乏可辨别的核仁的致密核的小型成熟淋巴细胞;和/或存在非典型细胞和/或裂解的细胞和/或幼淋巴细胞。

[0209] 众所周知,癌症是细胞DNA突变的结果,所述突变可能导致细胞避免细胞死亡或不可控制地增殖。因此,检查这些突变(也被称为细胞遗传学检查)可能是用于评估癌症的诊断和/或预后的有用工具。这一点的实例是染色体位置13q14.1的缺失,这是慢性淋巴细胞性白血病的特性。用于检查细胞的突变的技术是本领域中众所周知的;例如,荧光原位杂交(FISH)。

[0210] “细胞遗传学检查”包含检查细胞以及具体地染色体中的DNA。细胞遗传学检查可以用于标识DNA的变化,所述变化可能与难治性癌症和/或复发性癌症的存在相关联。此类变化可以包含: 染色体13的长臂中的缺失;和/或染色体位置13q14.1的缺失;和/或染色体12的三体性;和/或染色体12的长臂中的缺失;和/或染色体11的长臂中的缺失;和/或11q的缺失;和/或染色体6的长臂中的缺失;和/或6q的缺失;和/或染色体17的短臂中的缺失;和/或17p缺失;和/或t(11:14)易位;和/或(q13:q32)易位;和/或抗原基因受体重排;和/或BCL2重排;和/或BCL6重排;和/或t(14:18)易位;和/或t(11:14)易位;和/或(q13:q32)易位;和/或(3:v)易位;和/或(8:14)易位;和/或(8:v)易位;和/或t(11:14)和(q13:q32)易位。

[0211] 已知的是,患有癌症的患者表现出某些身体症状,所述身体症状通常是由于癌症对身体的负担引起的。那些症状通常再发生在同一癌症中,并且因此可以作为疾病的诊断和/或预后和/或进展的特性。医学领域的技术人员将理解哪些身体症状与哪些癌症相关联,以及评估那些身体系统如何与疾病的诊断和/或预后和/或进展相关。“身体症状”包含肝肿大和/或脾肿大。

附图说明

[0212] 在下文的实例中,参考以下附图:

[0213] 图1展示了本发明抗体结合TNFR2。图1A-D:通过ELISA示出了人抗体以产生不同的EC50值的剂量依赖性方式与人TNFR2蛋白结合。图1E:鼠抗体3-F10和5-A05以类似亲和力与mTNFR2结合。

[0214] 图2示出了TNFR2特异性 **n-CoDeR®** 抗体与体外活化的CD4⁺T细胞的结合。用IL-2和CD3/CD28 **Dynabeads®** 将人血来源的CD4⁺T细胞(图2A-D)和小鼠脾CD4⁺T细胞(图2E)活化。通过FACS分析了在范围为0.002-267nM(人)和0.00003-133nM(小鼠)的浓度下TNFR2特异性 **n-CoDeR®** 抗体对活化的细胞的亲和力。曲线示出了减去同种型对照背景后的平均荧光强度的(MFI)(图2A(完全和部分阻断剂),图2B(部分阻断剂)、图C和D(非阻断剂)、图2E(小鼠完全阻断剂(3-F10)和非阻断剂(5-A05)))。

[0215] 尽管人TNFR2抗体以不同亲和力与体外活化的CD4结合(EC50值范围为0.59到53nM),但小鼠TNFR2抗体以类似亲和力结合(EC50值范围为0.072到0.11nM)。

[0216] 图3示出了TNFR2 **n-CoDeR®** 抗体与TNFR2特异性结合。用重组IL-2和CD3/CD28活化珠将人血来源的CD4⁺T细胞(图3A)和小鼠脾CD4⁺T细胞(图3B)活化3天。用多克隆TNFR2抗体(灰色线)阻断体外活化的细胞,或将体外活化的细胞保持在PBS中(黑色线)30分钟,然后用次优浓度的不同TNFR2 **n-CoDeR®** 抗体或同种型对照(虚线)对其进行染色,持续15分钟。然后洗涤细胞,并且与APC缀合的二级抗体一起培育30分钟,然后通过流式细胞术进行分析。

[0217] 所有抗体均可以通过多克隆TNFR2抗体阻断,因此其示出了TNFR2 **n-CoDeR®** 抗体(人和小鼠)对TNFR2具有特异性。

[0218] 图4示出了人TNFR2特异性 **n-CoDeR®** 抗体与食蟹猴的交叉反应性。从食蟹猴血液中分离出了CD4⁺T细胞并且用PMA和离子霉素(Ionomycin)对其进行刺激。2天后,用0.1μg/ml、1μg/ml或10μg/ml TNFR2特异性 **n-CoDeR®** 抗体或同种型对照对细胞进行标记,然后与APC缀合的二级α-人抗体一起培育。通过流式细胞术分析细胞。所述图示出了单个抗体的TNFR2⁺T细胞相对于同种型对照的百分比。结果是2-3个单独实验的均值和SD。

[0219] 大多数TNFR2抗体示出了与食蟹猴细胞的交叉反应性结合。

[0220] 图5示出了所有本文所述的TNFR2特异性 **n-CoDeR®** 抗体均结合TNFR2蛋白的除了TNFR2克隆MR2-1以外的其它表位。用rhIL-2和CD3/CD28活化珠将人血来源的CD4⁺T细胞刺激2-3天。由40μg/ml MR2-1抗体(图5A,黑色条)阻断活化的细胞,或将活化的细胞与PBS(图5A,灰色条)一起保持30分钟,然后添加TNFR2特异性 **n-CoDeR®** 抗体/多克隆TNFR2(pTNFR2),并且将细胞培育15分钟。与APC缀合的二级抗体一起培育后,通过FACS分析结合的TNFR2 **n-CoDeR®** 抗体的百分比。在图5B中,用40μg/ml TNFR2特异性 **n-CoDeR®** 抗体/pTNFR2(黑色条)阻断活化的CD4⁺T细胞,或将其与PBS(灰色条)一起保持,并且然后与PE缀合的MR2-1抗体一起培育15分钟。然后通过FACS分析细胞。

[0221] MR2-1抗体不干扰TNFR2特异性 **n-CoDeR®** 抗体的结合,并且 **n-CoDeR®** 抗体不影响MR2-1与活化的细胞的结合,这示出了 **n-CoDeR®** 抗体均结合TNFR2蛋白的除了MR2-1抗体之外的其它结构域。

[0222] 图6示出了抗人TNFR2抗体的配体阻断活性。用对hTNFR2具有特异性的 **n-CoDeR®** mAb执行阻断ELISA,以评价配体阻断特性。图6A:以10μg/ml对所有抗体进行培育。随后,对将利用同种型对照实现的信号降低多于50%(由虚线指示)的所有抗体给药,以进一步探索配体阻断潜力。图6B示出了完全阻断mAb,图6C和D示出了部分阻断mAb,并且图6E示出了弱阻断mAb。所有其它mAb均被视为非阻断mAb。

[0223] 图7示出了抗小鼠TNFR2抗体的配体阻断活性。用对mTNFR2具有特异性的

n-CoDeR® mAb执行阻断ELISA,以评价配体阻断特性。图7A:以10 μ g/ml对所有抗体进行培育。随后,对将利用同种型对照实现的信号降低多于50% (由虚线指示)的所有抗体给药,以进一步探索配体阻断潜力。图7B示出了完全阻断mAb,图7C和D示出了部分阻断mAb,并且图7E示出了弱阻断mAb。所有其它mAb均被视为非阻断mAb。基于此,选择抗体3-F10和5-A05来分别代表完全阻断抗体和非阻断抗体。

[0224] 图8根据其激动/拮抗TNFR2信号传导的能力和阻断TNF- α 与TNFR2结合的能力对TNFR2特异性**n-CoDeR®**抗体进行的分类。使用IL-2和IL-12刺激的NK细胞监测TNFR2特异性**n-CoDeR®**抗体增强或减少IFN- γ 产生的能力,并且将其绘制为抗体阻断TNF- α 配体与以上所述的TNFR2结合的能力的函数。图8A:用20ng/ml rhIL-2和20ng/ml rhIL-12对人血来源的NK细胞进行刺激,同时添加10 μ g/ml TNFR2特异性**n-CoDeR®**抗体、同种型对照或100ng/ml rhTNF- α ,持续24小时。使用MSD测量培养上清液中的IFN- γ 的量。IFN- γ 的量相对于同种型对照归一化(在图中同种型对照的IFN- γ 值=1)并且示出在图8A中。在分析中不包含体外活化的CD4⁺T细胞的具有比25nM高的EC50值的人抗体。图8B:在这些培养物中,人NK细胞也会产生TNF- α (数据示出为两个供体的平均TNF- α 水平)。收集了细胞培养物上清液,并且使用MSD分析了产生的IFN- γ 的量。结果针对同种型对照归一化。IFN- γ 结果是2个独立实验中3个供体的均值。结果揭示了两个极端组,其特征分别为:1)具有完全阻断和拮抗剂性质的抗体,以及2)具有激动剂非阻断性质的抗体。激动性非阻断抗体是激动性的并且增强由细胞因子刺激的NK细胞产生IFN- γ ,而阻断抗体则是拮抗性的并且抑制IFN- γ 释放。图8C示出了IFN- γ 释放是TNF- α 依赖性的,因为可溶性TNF- α 的中和降低了IFN- γ ,而外源性TNF- α 增加IFN- γ 。图8D示出了添加阻断抗TNF- α 抗体导致可溶性TNF- α 的剂量依赖性中和。以1 μ g/ml的剂量,上清液中不可能检测到可溶性TNF- α 。

[0225] 图9示出了非阻断激动性而非阻断拮抗性TNFR2特异性**n-CoDeR®**抗体增强了记忆性CD4⁺T细胞群内的CD25⁺细胞的比例。用重组IL-2和TNFR2特异性**n-CoDeR®**抗体、同种型对照或重组TNF- α 将人血来源的CD4⁺T细胞(图9A)和小鼠脾CD4⁺T细胞(图9B)活化。培养3天后,对细胞进行CD25和CD45RO(人)/CD44和CD62L(小鼠)染色并且通过流式细胞术进行分析。结果示出了记忆性(CD45RO⁺细胞(人)/CD44⁺CD62L⁻(小鼠))群上的CD25表达细胞的百分比对在培养物中用同种型对照恢复的CD25⁺细胞的百分比。结果是7个供体(图9A,人)和3只小鼠(2个独立实验中,图9B)的均值和SEM。在人类和小鼠培养物两者中,非阻断TNFR2抗体均诱导CD25⁺记忆性细胞的百分比,而阻断抗体对记忆群无此作用。对于人类培养物(图9A)和鼠(图9B)两者,添加外源性TNF- α 将CD25⁺记忆性T细胞群增加 $*=p<0.05$,如通过单向ANOVA计算的。

[0226] 图10A示出了配体阻断拮抗性抗体作为mIgG2a(优先连接活化性Fc受体的同种型),具有最显著的抗肿瘤作用。对Balb/c小鼠皮下注射 1×10^6 个CT26细胞。8天后,利用10mg/kg抗体i.p.每周两次对平均肿瘤大小为 3×3 mm的小鼠进行治疗,如图中所指示的。两次/周测量肿瘤,直到其直径达到15mm,然后将小鼠处死。上图示出了经同种型对照治疗的小鼠的肿瘤生长,然后下面的两个图,在左图中,示出了Fc γ R缺陷型Ig格式的拮抗性配体-阻断剂抗体(中图)和激动性非配体阻断抗体(下图)。中图示出了主要连接活化性Fc γ R的鼠IgG2a格式的相同抗体,并且右图为主要连接抑制性Fc γ RIIb的鼠IgG1格式的抗体。对于图10B,对存活小鼠跟踪70天。如附图中看到的,阻断拮抗性抗体作为主要连接活化性Fc γ R

的IgG2a格式的肿瘤治疗最有效,并且在利用缺陷型Fc γ R结合的格式中没有作用。另一方面,非阻断激动性抗体作为主要连接抑制性Fc γ R的IgG1格式的肿瘤治疗最有效。另外,激动性抗体具有固有的Fc γ R独立的抗肿瘤作用,如使用N297A格式所见。与同种型对照相比, $***=p<0.001$,如通过对数秩Mantel Cox测试计算的。

[0227] 图11示出了配体阻断拮抗性抗体作为抗肿瘤治疗与抗PD1的组合是有效的。对C57/BL6小鼠皮下注射 1×10^6 个MC38细胞。利用10mg/kg抗体i.p.每周两次对平均肿瘤大小为 3×3 mm的小鼠进行治疗,如图中所指示的。所述图示出了单独小鼠的肿瘤生长曲线。图11A:同种型对照,图11B:PD-1靶向抗体,图11C:3-F10抗体(替代抗体、配体阻断剂、拮抗剂),图11D:3-F10和PD1的组合。两次/周测量肿瘤,直到其直径达到15mm,然后将小鼠处死。图11E示出了四个不同治疗组的存活曲线,与同种型对照相比, $**=p<0.01$, $***=p<0.001$,如通过对数秩Mantel Cox测试计算的。

[0228] 图12示出了阻断拮抗性抗体作为抗肿瘤治疗与抗PD-L1的组合是有效的。对C57/BL6小鼠皮下注射 1×10^6 个MC38细胞。在平均肿瘤大小为 5×5 mm时,用同种型对照抗体或3F10治疗小鼠两次(第1天和第4天),或用抗PD-L1治疗连续四天,然后两天后进行第五次注射(在第1天、第2天、第3天、第4天和第7天总计五次注射)或两者的组合。以10mg/kg i.p.施用所有抗体。附图示出了平均肿瘤生长 $\pm$ SEM, $n=10$ /组。 $*=p<0.05$, $***=p<0.001$,如使用单向ANOVA测试计算的。

[0229] 图13:对C57/BL6小鼠皮下注射 1×10^6 个B16.F10细胞。3天后每周两次利用10mg/kg抗体i.p.治疗小鼠,如图中指示的。两次/周测量肿瘤,直到其直径达到15mm,然后将小鼠处死。图13A:同种型对照,图13B:3-F10抗体(替代抗体、配体阻断剂、拮抗剂)。图13C示出了两个不同治疗组的存活曲线。与同种型对照相比, $*=p<0.05$,如通过对数秩Mantel Cox测试计算的。

[0230] 图14示出了配体阻断拮抗性替代抗体3F10改变了肿瘤中的免疫细胞组成。如所描述的,用CT26肿瘤细胞对小鼠进行接种,并且在肿瘤的大小达到大约 7×7 mm时,如所指示的对其注射抗体。3次注射后,在治疗开始后第8天,使小鼠牺牲并收获肿瘤。通过FACS分析肿瘤单细胞悬液的免疫细胞含量。图14A:配体阻断拮抗性替代抗体3F10引起Treg耗竭,并且图14B:CD8⁺T细胞流入或扩增。这导致CD8⁺/Treg T细胞比率发生变化,如图14C描绘的。图14D示出了,T细胞的数量以及骨髓细胞的数量,在此为肿瘤相关巨噬细胞(TAM,定义为CD11b⁺F4/80⁺MHCII⁺,但对Ly6G和Ly6C两者均为阴性)非常显著地降低。配体非阻断激动性替代抗体5A05也调节TAM数量,但仍与配体阻断抗体3F10显著不同。

[0231] 图15示出了人肿瘤中的T细胞表达的TNFR2水平类似于从PBMC重组的NOG小鼠中检索到的T细胞。简而言之,对NOG小鼠i.v.注射 $15-20 \times 10^6$ 个PBMC细胞。10-12天后,从小鼠中去除脾脏,制备单细胞悬浮液,并且通过FACS评估TNFR2表达。先前,已经评估了分别从来自3名或9名癌症患者的血液和肿瘤样品中取得的T细胞的TNFR2表达。如图中示出的,Treg和CD8⁺T细胞上的TNFR2表达在NOG小鼠体内体内生长和活化的人类T细胞与来自人类肿瘤的T细胞之间非常具有可比性。

[0232] 图16示出了配体阻断拮抗性抗体1-H10以Fc γ R依赖性方式在体内耗竭Treg。对NOG小鼠i.v.注射 $15-20 \times 10^6$ 个PBMC细胞。10-12天后,从小鼠中去除脾脏,制备单细胞悬浮液,并且然后将其i.p.注射到SCID小鼠体内。 $(10-15 \times 10^6$ /小鼠)。1小时后,用10mg/kg抗体

i.p. 治疗小鼠, 并且在抗体注射后24小时, 从小鼠中收集i.p. 液, 并且使用FACS分析液体中的细胞。图16A示出了染色的Treg (定义为 $CD45^+CD3^+CD4^+CD25^+CD127^{low/neg}$) 除以人 $CD45^+$ 群的平均百分比并且示出了Treg被阻断抗体1-H10显著耗竭。图16B示出了 $CD8^+T$ 除以人 $CD45^+$ 的平均百分比并且示出了1-H10显著增加了 $CD8^+T$ 细胞群。图16C示出了 $CD8^+T$ 细胞相对于Treg的比率通过1-H10显著增加。图16A-C中的数据表示为四个不同实验的均值, 其中每个点代表一只小鼠。使用了Yervoy和可商购的抗CD25抗体作为阳性对照。将所有数据归一化为同种型对照, 使得在图16A和B中, 同种型对照被设置为100%, 并且在图16C中被设置为1。图16D示出了单独实验, 其中使用了Fc γ R结合缺陷型1-H10 IgG1N297Q抗体 (在图中指定为1-H10NQ) 来评估Fc γ R结合对Treg耗竭的依赖性。如图中示出的, 相比于Fc缺陷型 (1-H10NQ), 耗竭在野生型IgG1格式 (1-H10) 中最有效。

[0233] 图17示出了拮抗性配体非阻断TNFR2抗体不诱导体外细胞因子释放。在三种不同的体外系统中测量了由各种TNFR2特异性抗体诱导的IFN- γ 释放。作为阳性和抗CD3抗体=OKT3, 使用了抗CD52抗体=阿仑珠单抗 (Alemtuzumab) 和抗CD28抗体。使用同种型对照作为阴性对照。每个点表示来自一个人类供体的PBMC。图17A示出了来自高密度细胞培养物的结果, 其中PBMC以 1×10^7 个细胞/ml培养。48小时后, 添加 $10 \mu\text{g/ml}$ 抗体并且培育24小时。如图中所见, 阿仑珠单抗和OKT3两者均诱导显著的IFN- γ 释放, 但不诱导任何TNFR2特异性抗体。图17B示出了通过在添加PBMC之前用抗体涂覆96孔板的孔执行的固相体外培养。再次, 阿仑珠单抗和OKT3两者均诱导显著的IFN- γ 释放以及一些TNFR2特异性抗体。然而, 完全阻断抗体1-H10未诱导高于同种型对照抗体的细胞因子释放。图17C示出了用抗体刺激全血, 并且在此阿仑珠单抗诱导显著的IFN- γ 释放, 但不诱导任何TNFR2特异性抗体。

[0234] 图18示出了拮抗性配体非阻断TNFR2抗体不诱导体内细胞因子释放。对NOG小鼠i.v. 注射 25×10^6 个PBMC细胞。14天后, 当小鼠的血液示出为由大约40%人类T细胞组成时, 用 $10 \mu\text{g}$ 抗体对小鼠进行治疗。注射后1小时测量体温 (图18A)。注射后5小时终止实验, 并且分析血液的IFN- γ (图18B) 或TNF- α (图18C) 含量。****= $p < 0.0001$ 并且**= $p < 0.01$, 如利用单向ANOVA计算的。

[0235] 图19示出了与缺乏单个结构域的TNFR2变体的结合。以流式细胞术方法对与在HEK细胞上表达的TNFR2变体结合的抗体进行了测试。结构域1和2的缺乏不会显著影响结合 (图19A和B), 而3和部分4则完全消除了抗体与TNFR2之间的相互作用 (图19C和D)。类似地, 结构域1+3的缺乏完全阻止了所有抗体 (1F06除外) 的结合 (图19E), 而结构域2+4的缺乏完全消除了激动性抗体 (1F02、1F06、4E08) 的结合并且还显著降低了拮抗剂 (1H10、4H02、5B08) 的结合 (图19F)。深灰色表示阳性对照, 并且白色表示阴性对照抗体。

[0236] 图20示出了TNFR2的人 (H-D3) 和小鼠 (M-D3) 结构域3的氨基酸序列的比较。相似的氨基酸用白色标记, 而差异用灰色标记。下面的五个序列代表测试抗体所针对的5种不同构建体。人与小鼠序列的交换是加下划线的, 而未标记的序列是完全人的。结构域1、2和4是人的并且不含有任何取代或突变。

[0237] 图21示出了与野生型人和小鼠TNFR2的结合 (左图)。使用了突变的hTNFR2构建体 (m1、m2、m3和m4) 来缩小不同抗hTNFR2抗体的结合位点。流式细胞术分析显示, aa 119-132中的突变不影响抗体结合, 而aa 151-160中的突变则完全消除了所有抗体的结合。134-144中的突变仅破坏阻断抗体和拮抗性抗体的结合, 但不会显著影响激动性抗体。深灰色条表

示阳性对照,并且白色为阴性对照抗体。虚线是阴性对照抗体的水平。

[0238] 实例

[0239] 现在将描述体现本发明的某些方面的具体非限制性实例。

[0240] 在许多实例中,具体地体内实例中,已经使用了抗体3-F10。这是小鼠抗体,是本文公开的人抗体的替代抗体。已经基于其与鼠TNFR2结合的能力,其对鼠TNF- α 配体与TNFR2的结合的阻断,并且基于其在鼠T细胞活化测定中的拮抗活性选择小鼠抗体,如实例4中所述。在一些实例中,测试了3-F10抗体并且以与相比于抑制性Fc γ 受体(mIgG2a)与活化性Fc γ 受体的强且优先的结合,与小鼠抑制性Fc γ R(mIgG1)的强且优先的结合或与小鼠Fc γ R(mIgG2a N297A)的缺陷型结合相关联的不同抗体格式对其进行了比较。

[0241] 在一些实例中,已经使用的抗体5-A05。其是出于参考和出于比较原因包含在本文中的人抗TNFR2非阻断激动性抗体的小鼠替代抗体。基于其与鼠TNFR2结合的能力、对鼠TNF- α 配体与TNFR2的结合的阻断作用的缺乏以及其在鼠T细胞活化测定中的激动活性选择5-A05作为替代物,如实例4中描述的。在一些实例中,测试了5-A05抗体并且以与相比于抑制性Fc γ 受体(mIgG2a)与活化Fc γ 受体的强且优先的结合,相比于活化性Fc γ R(mIgG1)与小鼠抑制性Fc γ R的强且优先的结合或与小鼠Fc γ (N297A)的缺陷型结合相关联的不同抗体格式对其进行了比较。

[0242] 在一些实例和附图中,使用了抗体克隆的略微不同的命名,例如,克隆001-H10有时会缩短为1-H10或1H10,005-B08有时会缩短为5-B08或5B08等。

[0243] 实例1-TNFR2特异性抗体的产生

[0244] (另请参见图1和此图的以上描述)。

[0245] scFv抗体片段的分离

[0246] 使用了 n-CoDeR® scFv库(BioInvent公司, Söderlind E等人,《自然生物技术(Nat Biotechnol.)》2000;18(8):852-6)来分离识别人或小鼠TNFR2的scFv抗体片段。

[0247] 在针对重组人或小鼠蛋白的三个连续淘选中使用了噬菌体库。在噬菌体培育后,洗涤细胞以去除未结合的噬菌体。用胰蛋白酶洗脱结合噬菌体并在大肠杆菌(E.coli)中扩增结合噬菌体。将所得噬菌体原种转化为scFv格式。用scFv携带质粒转换大肠杆菌,并且表达单独scFv克隆。

[0248] 独特TNFR2结合scFv的标识

[0249] 使用均质FMAT分析(美国加利福尼亚州卡尔斯巴德的应用生物系统公司(Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA))测定来自第三次淘选经转化的scFv,以用于与被转染成表达人或小鼠TNFR2或非相关蛋白的293FT细胞结合。

[0250] 简而言之,将经转染的细胞与来自表达板的含scFv的上清液(按1:7稀释)、小鼠抗His Tag抗体(0.4 μ g/ml;R&D系统公司(R&D Systems))和APC缀合的山羊抗小鼠抗体(0.2 μ g/ml;目录号:115-136-146,杰克逊免疫研究实验室有限公司(Jackson ImmunoResearch))一起添加到清澈底板。在读数前,将FMAT板在室温下温育9小时。经细菌克隆结合TNFR2转染的细胞而不是用非相关蛋白转染的细胞被归类为活性物,并将其最佳挑选到96孔板中。

[0251] ELISA中与TNFR2的IgG结合

[0252] 在4°C下,用重组人或小鼠TNFR2-Fc蛋白(义翘神州生物技术公司(Sino Biological))以1pmol/孔涂覆96孔板(葛莱娜公司(Greiner)的Lumitrac 600LIA板)过夜。

洗涤后,允许滴定剂量的20 μ g/ml到0.1ng/ml (133nM到1pM) 的抗TNFR2 mAb结合1小时。然后再次洗涤板,并且用以50ng/ml稀释的抗人F(ab)-HRP二级抗体(杰克逊免疫研究实验室有限公司)检测结合的抗体。使用Super Signal ELISA Pico(赛默科技公司(Thermo Scientific))作为底物,并且使用Tecan Ultra Microplate读数器分析板。

[0253] 表6和图1A-D中示出的数据示出人抗TNFR2抗体均与人TNFR2蛋白结合。EC50值的范围从1-C08的0.082nM到1-A09的4.4nM。

[0254] 另外,小鼠抗体替代克隆3-F10和5-A05也与mTNFR2蛋白结合。这两个克隆以非常相似的亲和力结合(表6和图1E)。

[0255] 表6与TNFR2蛋白(克隆3F10和5A05除外的人类蛋白)结合的抗体的EC50值

克隆	EC ₅₀ (nM)
1-C08	0.082
1-E06	0.20
1-G10	0.29
1-H10	0.29
4-H02	0.20
5-B02	0.15
5-B08	0.17
1-G04	1.7
1-H09	0.30
1-D01	0.37
5-F10	0.22
1-B11	0.25
1-C07	0.26
1-B05	0.23
1-F02	0.31
1-F06	0.15
4-E08	0.38
1-G05	0.54
1-A09	4.4
1-B09	0.18
1-C03	0.75
1-C05	0.38
3-F10 (小鼠)	0.97
5-A05 (小鼠)	1.4

[0258] 实例2-抗体的特异性

[0259] (另请参见图2-5和这些图的以上描述)。

[0260] CD4⁺T细胞的分离

[0261] 使用Ficoll-Paque PLUS (GE医疗公司(GE Healthcare))梯度分离来自人血沉棕黄层和食蟹猕猴(食蟹)全血的PBMC。通过磁性细胞分选使用均来自美天旎公司(Miltenyi)的CD4⁺T细胞分离试剂盒(人)或CD4微珠(非人灵长类(食蟹猴))从PBMC中分离出CD4⁺T细胞。使用来自美天旎公司的CD4⁺T细胞分离试剂盒(小鼠)从脾脏中分离出小鼠CD4⁺T细胞。

[0262] TNFR2特异性n-CoDeR®抗体的滴定

[0263] 使用体外活化的CD4⁺T细胞获得TNFR2 n-CoDeR®抗体与在细胞上表达的TNFR2结合的能力和亲和力。用50ng/ml rhIL-2 (R&D系统公司) 和Dynabeads® T-Activator CD3/CD28刺激人类CD4⁺T细胞,以用于在37°C下将T细胞扩增或活化 (Gibco) 2-3天。用对TNFR2或同种型对照具有特异性、范围为0,002-267nM的增加量的n-CoDeR®抗体标记体外活化的细胞。然后将细胞与APC缀合的α-人IgG二级抗体 (杰克逊公司) 一起培育,然后通过流式细胞术 (碧迪公司 (BD) 的FACSVerse) 进行分析。所产生的滴定曲线在图2A-D中示出。用135U/ml rmIL-2 (R&D系统公司) 和Dynabeads® T-Activator CD3/CD28刺激小鼠CD4⁺T细胞,以用于在37°C下将T细胞扩增或活化 (Gibco) 2-3天。用对TNFR2或同种型对照具有特异性、范围为0.00003-133nM的增加量的n-CoDeR®抗体标记体外活化的细胞。然后将细胞与APC缀合的α-小鼠IgG二级抗体 (杰克逊公司) 一起培育,然后通过流式细胞术 (碧迪公司的FACSVerse) 进行分析。滴定曲线在图2E中示出。滴定曲线的EC50值在Microsoft Excel中计算并且示出在表7中。对于人抗体,EC50值从0.6nM (4-H02) 到52.7nM (1-C03) 不等。小鼠抗体与体外活化的细胞以相似的亲和力 (0.072nM (3-F10) 和0.11nM (5-A05)) 结合。

[0264] TNFR2 n-CoDeR®抗体的特异性

[0265] 在FACS阻断实验中利用商用多克隆TNFR2抗体 (R&D系统公司) 获得了TNFR2抗体对TNFR2的特异性。用40μg/ml 多克隆TNFR2抗体 (R&D系统公司) 将用50ng/ml rhIL-2 (R&D系统公司) (人)/135U/ml rm IL-2 (R&D系统公司) (小鼠) 和Dynabeads® T-Activator CD3/CD28刺激2-3天,以用于T细胞扩增和活化 (Gibco) 的CD4⁺T细胞 (小鼠和人) 阻断30分钟,之后立即与TNFR2 n-CoDeR®抗体或同种型对照一起培育15分钟。所使用的n-CoDeR®抗体的浓度基于单独TNFR2 n-CoDeR®抗体的滴定曲线,并选择了每种抗体的次优浓度。然后洗涤细胞并且将其与APC缀合的二级抗体 (杰克逊公司) 一起培育30分钟。通过流式细胞术 (碧迪公司的FACSVerse) 分析细胞。TNFR2特异性n-CoDeR®抗体 (人和小鼠两者) 的所有结合都可以被多克隆TNFR2抗体阻断,如图3中示出的。这些结果证实了TNFR2 n-CoDeR®抗体特异性地结合体外活化的CD4⁺T细胞上的TNFR2。

[0266] TNFR2特异性n-CoDeR®抗体针对TNFR2抗体克隆MR2-1的表位作图

[0267] TNFR2抗体克隆MR2-1 (英杰公司 (Invitrogen)) 结合TNFR2蛋白的特定结构域。通过FACS阻断实验测试了TNFR2特异性n-CoDeR®抗体是否与和MR2-1相同的结构域结合。

[0268] 用50ng/ml rhIL-2 (R&D系统公司) 和Dynabeads® T-Activator CD3/CD28将人类CD4⁺T细胞刺激2-3天,以用于T细胞扩增或活化 (Gibco)。用40μg/ml MR2-1 (图5A中的黑色条) 或PBS (图5中的灰色条) 阻断活化的细胞。培育30分钟后,立即对细胞进行TNFR2特异性n-CoDeR®抗体或多克隆TNFR2 (pTNFR2) 染色,持续15分钟。在用APC缀合的二级抗人IgG试剂 (杰克逊) 一起培育后,通过流式细胞术 (碧迪公司 (BD) 的FACSVerse) 分析细胞。在图5B中,用40μg/ml TNFR2特异性n-CoDeR®抗体或pTNFR2 (黑色条) 阻断活化的CD4⁺T细胞,或将其与PBS (灰色条) 一起保持,并且然后与PE缀合的MR2-1抗体一起培育15分钟。再次,然后通过FACS分析细胞。由于阻断的n-CoDeR®的MR2-1+细胞的百分比与未阻断的细胞相同 (图5B) 并且有或没有MR2-1阻断的n-CoDeR®抗体的结合都相同 (图5A),所以这些数据示出了n-CoDeR®抗体结合TNFR2蛋白的除了MR2-1抗体以外的其它表位。

[0269] TNFR2n-CoDeR®抗体与食蟹猴的结合

[0270] 为了验证TNFR2抗体对食蟹猴的交叉反应性,用50ng/ml PMA (西格玛公司 (Sigma)) 和100ng/ml离子霉素 (西格玛公司) 将食蟹猴CD4⁺T细胞刺激2天,以引起TNFR2的上调。将细胞与3种不同浓度 (0.1μg/ml、1μg/ml和10μg/ml) 的TNFR2特异性n-CoDeR®抗体一起培育,并且然后与APC缀合的二级α-人IgG试剂 (杰克逊公司) 一起培育。通过流式细胞术 (碧迪公司的FACSVerse) 分析细胞,并且结果示出大多数人TNFR2特异性n-CoDeR®抗体均可以结合食蟹猴TNFR2,单独抗体的结果呈现在图4中。

[0271] 总之,实例2中的数据示出了人抗体与在人类免疫细胞上内源地表达的TNFR2特异性地结合。此外,数据示出,此结合可以通过添加TNFR2的显示出对TNFR2的非常高的特异性的多克隆可商购抗体来阻断。对于关于表达鼠TNFR2的鼠细胞的替代克隆3F10和5A05也是如此。同样,人克隆的结合不受显示出与MR2-1不同的表位特异性的MR2-1抗体的影响。

[0272] 表7.按照体外活化的CD4⁺T细胞的TNFR2特异性抗体的滴定计算的EC₅₀值。

克隆	EC ₅₀ (nM)
1-C08	2.6
1-E06	4.1
1-G10	3.3
1-H10	1.1
4-H02	0.59
5-B02	0.80
5-B08	1.2
1-G04	18
1-H09	16
1-D01	3.9
5-F10	32
1-B11	27
1-C07	36
1-B05	1.5
1-F02	0.79
1-F06	2.5
4-E08	2.3
1-G05	0.66
1-A09	48
1-B09	29
1-C03	53
1-C05	12
3-F10 (小鼠)	0.072
5-A05 (小鼠)	0.11

[0274] 实例3-配体阻断特性的测试

[0275] (另请参见图6-7和这些图的以上描述)。

[0276] ELISA方法

[0277] 在ELISA包被缓冲液(0.1M碳酸钠pH 9.5)中,用hTNFR2(Sinobiologicals目录号10414-H08H)或mTNFR2(Sinobiologicals目录号50128M08H)以2.5pmol/孔涂覆96孔板,并且在4℃下培育过夜。在ELISA洗涤缓冲液(含0.05% Tween20的PBS)中洗涤后,将板与n-CoDeR®mAb以10μg/ml(单剂量ELISA)或33nM以及随后1:2的稀释度(滴定ELISA)在室温下在缓慢搅拌下在含有0.45%鱼明胶的阻断缓冲液中培育1小时。随后,添加最终浓度分别5nM和2nM的重组hTNF-α-bio(R&D目录号BT210)或mTNF-α(Gibco目录号PMC3014)并且允许其培育另外15分钟。之后,洗涤板。对于人ELISA,添加在阻断缓冲液中以1:2000稀释的链霉亲和素-HRP(Streptavidin-HRP)(杰克逊目录号016-030-084),并且再次在室温下培育1小时,然后首先在ELISA缓冲液中洗涤并且然后在Tris缓冲液中洗涤(pH 9.8)。之后根据制造商说明稀释底物(来自赛默飞世尔公司的Super Signal ELISA Pico,目录号37069),向孔中添加底物并且在黑暗中培育10分钟,然后在Tecan Ultra中读取。对于小鼠ELISA,添加稀释到1μg/ml的兔抗mTNF-α(义翘神州生物技术公司目录号:50349-RP02)并且允许其室温下培育1小时。洗涤后,添加在阻断缓冲液中以1:10 000稀释的抗兔HRP并且再次在室温下培育1小时。如上执行底物添加和读取。

[0278] 数据呈现在以下表8和9中以及图6和7中。

[0279] 表8.配体阻断人抗体的EC50值:滴定抗体并且计算EC50值。

[0280]

克隆	EC50 (nM)	阻断
001-H10	0.9	完全
004-H02	0.4	完全
005-B08	0.3	完全
005-B02	0.2	完全
001-E06	0.3	部分
001-G10	1.6	部分
001-C08	1.1	部分
001-H09	1.4	部分
005-F10	0.03	部分
001-G04	3.2	部分
001-B11	1.0	弱
001-C07	0.8	弱
001-D01	1.4	弱

[0281] 表9.配体阻断鼠抗体的EC50值:滴定抗体并且计算EC50值。

[0282]	克隆	EC50 (nM)	阻断
	3-F10	1.9	完全
	4-C01	2.7	完全
	4-A06	2.0	部分
	4-A07	> 500	部分
	4-F06	6.2	部分
	5-C09	8.6	部分
[0283]	2-D09	4.4	部分
	4-B12	> 500	部分
	3-G06	13	部分
	2-H01	25	弱
	4-C02	> 500	弱
	4-G09	2.6	弱
	4-C03	8.3	弱

[0284] 阻断定义

[0285] • 完全阻断剂被定义为将TNF- α 结合降低多于98%。

[0286] • 部分阻断剂被定义为将TNF- α 结合降低60-98%。

[0287] • 弱阻断剂被定义为将TNF- α 结合降低少于60%。

[0288] • 非阻断抗体被定义为在高剂量单点ELISA中未达到不多于50%阻断,如图6A和7A中示出的。

[0289] 此实例中示出的数据示出,已经产生了各种抗体,其范围从完全抑制配体TNF- α 结合的抗体到根本不抑制配体阻断的抗体。对于人抗体和鼠替代物两者都是如此。

[0290] 实例4-抗体的体外功能

[0291] (另请参见图8-9和这些图的以上描述)。

[0292] TNFR2抗体调节细胞因子刺激的NK细胞IFN- γ 产生的能力

[0293] 使用Almishri等人描述的NK细胞测定评价了TNFR2特异性抗体的激动性/拮抗性特性。(“TNF α 通过TNFR2增强细胞因子诱导的NK细胞IFN γ 产生 (TNF α Augments Cytokine-Induced NK Cell IFN γ Production through TNFR2)”Almishri W.等人,《先天免疫杂志 (J Innate Immun.)》2016;8:617-629)。

[0294] 简而言之,使用“NK分离试剂盒”(美天旎公司)通过MACS从人PBMC中分离出人NK细胞。将100 μ l NK细胞(1×10^6 个细胞/ml)与20ng/ml rhIL-2(R&D系统公司)和20ng/ml rhIL-12(R&D系统公司)连同10 μ g/ml TNFR2特异性抗体、10 μ g/ml同种型对照或100ng/ml TNF- α (R&D系统公司)一起在U型底板(西格玛奥德里奇公司(Sigma-Aldrich)的Corning® 96孔经TC处理的微板)中培养。24小时后收集上清液,并且通过MSD评估产生的IFN- γ 的量。

[0295] 作为对照,包含了中和TNF- α 的抗TNF- α 抗体(目录号AF-210-NA,R&D系统公司)。如图8D中所见,1 μ g/ml的剂量完全中和了可溶性TNF- α ,并且此剂量也降低了IFN- γ 释放。

[0296] 人非阻断TNFR2抗体显著增强了IL-2和IL-12刺激的NK细胞IFN- γ 产生(与同种型对照相比多2-3倍的IFN- γ),而拮抗性抗体(此处示出为完全阻断剂)示出了对NK细胞的拮抗性作用以及减少的IFN- γ 产生(图8A)。

[0297] 由于鼠培养物中缺乏内源地产生的TNF- α 以及抑制性Fc γ R在鼠NK细胞上的表达,同时仅活化Fc γ R在人对应物上的表达,所以此测试被视为对用小鼠替代抗体执行是非代表性。相反,使用了以下所述的记忆性T细胞活化测定(CD25的诱导)来解决小鼠替代抗体的激动剂或拮抗性。

[0298] TNFR2抗体对CD25表达记忆性CD4⁺T细胞的诱导

[0299] 为了进一步理解TNFR2抗体的激动性/拮抗性特性,对其增强CD25表达记忆性CD4⁺T细胞的比例的能力进行了评价。

[0300] 简而言之,使用来自美天旎公司的“CD4⁺T细胞分离试剂盒”通过MACS从PBMC中分离出CD4⁺T细胞。将CD4与10ng/ml rhIL-2(R&D系统公司)和10 μ g/ml TNFR2特异性抗体或指定量的rhTNF- α (R&D系统公司)一起培养。3天后,通过FACS分析CD25在记忆性细胞(CD45RO⁺细胞)上的表达(图9A)。

[0301] 类似地,使用“CD4⁺T细胞分离试剂盒”(美天旎公司)通过MACS从脾脏中分离出小鼠CD4⁺T细胞,并且将其与10ng/ml rmIL-2(R&D系统公司)和10 μ g/ml TNFR2特异性抗体或指定量的rmTNF- α (R&D系统公司)一起培养。3天后通过FACS分析CD25在记忆性细胞(CD44⁺CD62L⁻细胞)上的表达(图9B)。

[0302] 增强了CD25表达细胞在人和小鼠两者中的用非阻断TNFR2刺激的记忆性细胞培养物中的百分比。然而,用阻断抗体进行的刺激不会增加这些培养物中的CD25表达而是减少其表达。

[0303] 总之,实例4中的数据示出,配体阻断抗体是拮抗性的,如通过几种体外方法测量的:对NK细胞介导的IFN- γ 释放的抑制以及对CD4⁺记忆性细胞的活化如通过CD25表达测量的。拮抗性配体阻断抗体被示出为与本发明一致,而包含激动性配体非阻断抗体以用于比较。

[0304] 实例5-替代配体阻断拮抗性抗小鼠TNFR2 mAb具有体内抗肿瘤作用

[0305] (另请参见图10-16和这些图的以上描述)。

[0306] 不同肿瘤模型的治疗作用

[0307] 为了评估配体阻断拮抗性抗TNFR2 mAb的体内抗肿瘤作用,在不同肿瘤模型中,使用不同同种型格式,并且单独或与如下所述的抗PD-1组合体内研究了被称为3F10的小鼠替代物。

[0308] 根据内政部(home office)的指导方针,在本地设施中饲养并维持小鼠。由泰康利(Taconic)(丹麦博姆霍尔特(Bomholt, Denmark))供应六到八周大的雌性BalbC和C57/BL6小鼠并且将其维持在本地动物设施中。使CT26、MC38和B16.F10细胞(ATCC)在补充有10% FCS的谷氨酰胺(glutamax)缓冲的RPMI中生长。当细胞半汇合时将其与胰蛋白酶分离并且以 10×10^6 个细胞/ml将其重悬于无菌PBS中。向小鼠s.c.注射100 μ l细胞悬浮液,这对应于 1×10^6 个细胞/小鼠。注射后3-8天(取决于模型),用10mg/kg抗体i.p.(同种型对照,3-F10或5-A05)并且如图所指示的每周两次治疗小鼠。两次/周测量肿瘤,直到其直径达到15mm,然后将小鼠处死。

[0309] 配体阻断蚂蚁激动性抗小鼠TNFR2 mAb 3-F10在三种不同肿瘤模型中示出了治疗性抗肿瘤作用(图10-13),在更具治疗敏感性的CT26(图10)中具有治愈作用并且在更具治疗耐性的MC38和B16中具有肿瘤生长抑制作用(图11-13)。

[0310] 配体阻断拮抗性抗小鼠TNFR2 mAb的抗肿瘤作用是Fc:Fc γ R依赖性的

[0311] 为了评估Fc-Fc γ R相互作用对配体阻断拮抗性抗TNFR2小鼠替代mAb的体内抗肿瘤作用的重要性,在CT26肿瘤模型中体内研究了此抗体的不同Fc格式,如下所述。

[0312] 如上所述饲养和维持小鼠。使CT26细胞(ATCC)生长并注射,如上所述。当肿瘤达到 $3 \times 3\text{mm}$ 时,每周两次用 10mg/kg 抗体i.p.(同种型对照、3-F10 IgG1、3-F10 IgG2a或3-F10-N297A(Fc缺陷型))治疗小鼠。两次/周测量肿瘤,直到其直径达到 15mm ,然后将小鼠处死。

[0313] Fc缺陷型3-F10-N297A示出了与同种型对照相比很小的治疗活性或无治疗活性,这表明Fc连接对此配体阻断拮抗性抗小鼠TNFR2 mAb的治疗功效是关键(图10A和B)。IgG1和IgG2a格式均示出显著的治疗功效。然而,与活化Fc γ 受体优先结合的IgG2a格式示出了优越的治疗效果,这表明Treg的耗竭/吞噬是此配体阻断拮抗性抗小鼠TNFR2 mAb的一个重要作用机制(图10A-B)。这与在Fc缺陷型格式中示出某种活性并且在鼠IgG1格式中示出最佳活性,已知与抑制性Fc γ R优先结合的非阻断激动性替代抗体5A05相反。配体阻断拮抗性抗体(3F10)与本发明一致,并且包含配体非阻断激动性抗体(5A05)以用于进行参考。

[0314] 抗PD-1mAb的组合作用

[0315] 为了评估配体阻断拮抗性抗TNFR2 mAb(小鼠替代物(3-F10))与抗PD-1的组合体内抗肿瘤作用,在MC38肿瘤模型中体内研究了治疗组合,如以下所述。

[0316] 如上所述饲养和维持小鼠。使MC38细胞(ATCC)生长并注射,如上所述。注射八天后,每周两次用 10mg/kg 抗体i.p.(同种型对照、抗小鼠PD-1、3-F10或抗小鼠P-D-1和3-F10的组合)并且如图11A-E中所指示的治疗小鼠。两次/周测量肿瘤,直到其直径达到 15mm ,然后将小鼠处死。

[0317] 抗小鼠PD-1和配体阻断拮抗性抗小鼠TNFR2 mAb 3-F10两者均在MC38模型中示出肿瘤生长抑制治疗作用(图11A-E)。当抗PD1和拮抗性抗小鼠TNFR2 mAb 3-F10组合时,治愈了具有治疗耐性的MC38的肿瘤(图11D-E)。

[0318] 抗PD-L1 mAb的组合作用

[0319] 为了评估配体阻断拮抗性抗TNFR2 mAb的组合体内抗肿瘤作用,将小鼠替代物(3F10)与抗PD-L1进一步组合,以用于MC38肿瘤模型中的治疗,如下所述。

[0320] 如上所述饲养和维持小鼠。如上所述使MC38细胞(从南安普敦大学(Southampton University)的M.Cragg博士获得)生长并且注射。注射六天后,两次用同种型对照抗体或3F10治疗小鼠(第1天和第4天),或用抗PD-L1(Bioxcell公司的克隆10F.9G2)治疗连续四天,然后两天后进行第五次注射(在第1天、第2天、第3天、第4天和第7天总计五次注射)或两者的组合。以 10mg/kg i.p.施用所有抗体。用卡尺每周两次测量肿瘤,直到其直径达到 2000mm^3 的体积,然后将小鼠处死。

[0321] 抗小鼠PD-L1和配体阻断拮抗性抗小鼠TNFR2 mAb 3-F10两者均在MC38模型中示出肿瘤生长抑制治疗作用(图12)。当抗PD-L1和拮抗性抗小鼠TNFR2 mAb 3-F10组合时,抗肿瘤作用甚至进一步增强(图12)。

[0322] 体内免疫细胞调节

[0323] 为了研究免疫细胞在肿瘤中的体内作用,如上所述用CT26细胞接种BalbC小鼠。在肿瘤达到大约 $7 \times 7\text{mm}$ 之后,如图中指示的用i.p.施用的 10mg/kg 抗体治疗小鼠。在第1天、第4天和第7天治疗小鼠,并在第8天处死小鼠。将肿瘤切开,机械地分成小块,并且在 37°C 下使

用胶原酶100 μ g/ml释放酶和100 μ g/ml脱氧核糖核酸酶的混合物消解2 $\times$ 5分钟,之间放置Vortex。在通过70 μ m过滤液过滤后,用含有10%FBS的PBS洗涤细胞悬浮液(400g,持续10分钟)。之后,将细胞重悬于MACS缓冲液中并且用染色CD45、CD3、CD8、CD4和CD25的抗体组或染色MHCII、F4/80、Ly6C、CD11b和Ly6G的抗体组进行染色。染色前,使用100 μ g/ml IVIG(经过纯化的静脉内免疫球蛋白)阻断细胞的非特异性结合。在FACS Verse中分析细胞。将小鼠Treg量化为CD45⁺CD3⁺CD4⁺CD25⁺,并且将TAM量化为CD11b⁺Ly6G⁻Ly6C⁺F4/80⁺MHCII⁺。结果显示于图14中。

[0324] 如图14中所见,用配体阻断/拮抗性TNFR2抗体进行治疗导致肿瘤中的Treg耗竭。还看到朝CD8⁺T细胞的涌入增加的趋势较弱。一起,这导致CD8⁺T细胞与Treg的比率大大提高(图14C)。另外,拮抗性抗体通过减少肿瘤相关巨噬细胞的数量来调节骨髓隔室(图14D)。

[0325] PBMC-NOG/SCID模型

[0326] 为了证实关于配体阻断拮抗性抗小鼠TNFR2替代mAb的耗竭活性的体内发现,分析了配体阻断拮抗性抗人TNFR2 mAb 1-H10在PBMC-NOG/SCID模型中在体内的耗竭能力,如下所述。

[0327] 根据内政部的指导方针,在本地设施中饲养并维持小鼠。由泰康利(丹麦博姆霍尔特)供应八周大的雌性SCID和NOG小鼠并且将其维持在本地动物设施中。对于PBMC-NOG/SCID(原代人异种移植)模型,使用Ficoll Paque PLUS分离出人PBMC,并且在洗涤后以75 $\times$ 10⁶个细胞/ml将细胞重悬于无菌PBS中。向NOG小鼠i.v.注射200 μ l细胞悬浮液,这对应于15 $\times$ 10⁶个细胞/小鼠。注射之后2周,分离脾脏并使其成为单细胞悬浮液。之后,提取小样品以通过FACS确定TNFR2在人T细胞上的表达(图15)。此FACS示出了,Treg和CD8⁺T细胞上的TNFR2表达在NOG小鼠体内体内生长和活化的人类T细胞与来自人类肿瘤的T细胞之间非常具有可比性。以50 $\times$ 10⁶个细胞/ml将大多数细胞悬浮液重悬于无菌PBS中。向SCID小鼠i.p.注射200 μ l悬浮液,这对应于10 $\times$ 10⁶个细胞/小鼠。1小时之后,用10mg/kg的Yervoy、抗CD25、1-H10、1-H10-N297Q(Fc缺陷型版本的1-H10)或同种型对照mAb治疗小鼠。24小时后手机小鼠的腹腔液。使用以下标志物通过FACS标识人T细胞亚群并对其进行量化:CD45、CD3、CD4、CD8、CD25、CD127(均来自碧迪生物科学公司)。

[0328] 1-H10的Treg耗竭活性优于Yervoy和1-H10N297Q(图16),证实了配体阻断拮抗性抗TNFR2 mAb 1-H10使Treg耗竭并且Fc相互作用涉及此耗竭(图16D)。

[0329] 总之,实例5示出:

[0330] 1. 拮抗性配体阻断抗体可以具有跨几种肿瘤模型的强大抗肿瘤作用。

[0331] 2. 此作用可以通过与抗PD1抗体组合而增加。

[0332] 3. 作用取决于活化Fc γ R的连接。

[0333] 4. 用拮抗性配体阻断替代抗体进行治疗显著改变了肿瘤中的T细胞组成,其中CD8⁺T细胞/Treg比率增加并且肿瘤相关巨噬细胞减少。

[0334] 5. 在人类肿瘤中,最高的TNFR2表达细胞是Treg。

[0335] 6. 在其中在T细胞上模仿肿瘤TNFR2表达的人异种移植模型中,人Treg缺失并且CD8⁺T细胞水平增加。

[0336] 7. 如果抗体可以连接活化Fc γ R,则此Treg缺失最显著。

[0337] 实例6-拮抗性配体阻断抗体不诱导大量促炎细胞因子

[0338] (另请参见图17-18和这些图的以上描述)。

[0339] 大量促炎细胞因子的释放是用于治疗患者的免疫调节性抗体的一种可能的副作用。因此,在此使用两种不同方法测量了通过拮抗性配体阻断抗体诱导的细胞因子释放。第一种方法基于体外培养物中的抗体刺激,并且第二种方法基于将人类免疫细胞异种移植到免疫缺陷型小鼠。对于体外而言,培养物的设置已经示出很大程度上影响细胞因子的释放(Vessillier等人,《免疫方法杂志(J Immunol Methods)》2015年9月;424:43-52)。为了解决方法的差异,根据最近的出版物,使用了三种不同体外培养物装置。

[0340] 对于高密度细胞培养(HDC)细胞因子释放测定(CRA),以 1×10^7 个细胞/ml在补充有2mM谷氨酰胺、1mM丙酮酸、100IU/ml盘尼西林和链霉素的无血清CTL测试培养基(细胞科技有限公司(Cell Technology Limited))中培养PBMC。将2ml的细胞培养物铺板在12孔板中。48小时后,向96孔平底板中的 1×10^5 个预培育的PBMC添加10 μ g/ml抗体,并且培育24小时。

[0341] 通过用1 μ g/ml抗体涂覆96孔板的孔1小时来执行PBMC固相(SP)CRA。用PBS洗涤板后,每孔添加含 1×10^5 个PBMC的200 μ l完全培养基并且培育48小时。

[0342] 还在用5 μ g/ml的抗体刺激200 μ l的全血48小时后,测量了细胞因子释放。

[0343] 培育阶段结束时,将板离心,并且提取培养上清液并在-20 $^{\circ}$ C下储存。根据制造商的说明(美国Meso Scale Discovery),使用定制的MSD板测量了IFN- γ 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-10、IL-8和TNF- α 的浓度。

[0344] 总之,在任何体外设置中,阻断拮抗性抗体均未诱导任何显著的细胞因子释放。阳性对照抗体阿仑珠单抗和OKT3确实诱导细胞因子,其中最明显的是IFN- γ ,但是如图17中所见,除了同种型对照抗体以外,1H10抗体未诱导IFN- γ 。1H10没有其它细胞因子升高(数据未示出)。

[0345] PBMC-NOG耐受性模型

[0346] 为了研究配体阻断拮抗性抗人TNFR2 mAb 1-H10的耐受性,如下所述分析了PBMC-NOG模型中的体内细胞因子释放。

[0347] 根据内政部的指导方针,在本地设施中饲养并维持小鼠。由泰康利(丹麦博姆霍尔特)供应八周大的雌性NOG小鼠并且将其维持在本动物设施中。对于PBMC-NOG(原代人异种移植)模型,使用Ficoll Paque PLUS分离出人PBMC,并且在洗涤后以 125×10^6 个细胞/ml将细胞重悬于无菌PBS中。向NOG小鼠i.v.注射200 μ l细胞悬浮液,这对应于 25×10^6 个细胞/小鼠。注射后2周,提取血液样品以分析“人源化”水平,即NOG小鼠血液中的细胞的量。血液由大约40%人类T细胞构成,并且小鼠被视为是人源化的。然后用10 μ g Yervoy、抗CD3(OKT-3)、1-H10或同种型对照mAb治疗小鼠。在抗体注射之前和注射后1小时测量体温,图18A。如图18A中所见,阳性对照抗体OKT3如先前公开的诱导体温的急剧降低,并且与此抗体在临床上所见的毒性一致。相反,1-H10未示出对体温的任何影响。注射抗体后五小时终止实验并且收集血液以用于分析细胞因子释放(MSD)。测量的细胞因子为人IFN- γ 、TNF- α 、IL-6和IL1 β 。在这些中,IFN- γ 和TNF- α 以足够高的水平被量化为可靠的。如图18B和C中看到的,阳性对照抗体OKT3诱导了显著的IFN- γ 和TNF- α 两者的释放(与此抗体在临床上所见的毒性一致),而经1H10治疗的小鼠没有显著的IFN- γ 释放。然而,TNF- α 释放的趋势增加,但不显著并且不如OKT3那样急剧。

[0348] 总而言之,实例6示出了在此用被称为1-H10的抗体例示的TNFR2配体阻断抗体不会诱导显著水平的细胞因子释放,如通过几种先前公开的方法测量的。由于细胞因子释放是几种免疫调节抗体临床开发的限制因素,因此这表明了在此方面的可接受的安全概况。

[0349] 实例7-产生的TNFR2靶向抗体的表位

[0350] 结构域构建体敲除

[0351] 在第一组实验中,使用了编码TNFR2的不同变体的、丢失表10中所述的4个细胞外结构域中的一个或多个的DNA构建体。在第二组实验中,使用了编码TNFR2的变体的,其中如表11中所述的将结构域3的不同部分与对应鼠部分交换的DNA构建体。后者是可能的,因为没有一种抗体与鼠TNFR是交叉反应的。在两种情况下,从GeneArt公司(赛默飞世尔公司)购买构建体。将构建体克隆到含有CMV启动子和质粒复制的OriP起源(OriP origin)的表达载体中,并在悬浮液适应的HEK293-EBNA细胞中瞬时表达。

[0352] 表10. 用于在一个或几个结构域缺失的情况下进行转染的TNFR2构建体.

[0353]	构建体	说明
	hTNFR2	野生型全长人TNFR2(uniprot#P20333)
	hTNFR2- Δ 1	结构域TNFR-Cys 1(aa 39-76)缺失的hTNFR2
	hTNFR2- Δ 2	结构域TNFR-Cys 2(aa 77-118)缺失的hTNFR2
	hTNFR2- Δ 3	结构域TNFR-Cys 3(aa 119-162)缺失的hTNFR2
	hTNFR2- Δ 4	结构域TNFR-Cys 4(aa 163-201)缺失的hTNFR2
	hTNFR2- Δ 1+3	结构域TNFR-Cys 1和3(aa 39-76和119-162)缺失的hTNFR2
	hTNFR2- Δ 2+4	结构域TNFR-Cys 2和4(aa 77-118和163-201)缺失的hTNFR2

[0354] 表11. 已经针对对应鼠序列交换了用于结构域3的转染各个部分的TNFR2构建体。

[0355]	构建体	说明
	hTNFR2	野生型全长人 TNFR2 (uniprot #P20333)
[0356]	mTNFR2	野生型全长鼠 TNFR2 (uniprot #P25119)
	hTNFR2-m1	aa 119-132 被来自 mTNFR2 的 aa 120-133 替代的 hTNFR2
	hTNFR2-m2	aa 134-144 被来自 mTNFR2 的 aa 135-146 替代的 hTNFR2
	hTNFR2-m3	aa 151-160 被来自 mTNFR2 的 aa 153-162 替代的 hTNFR2
	hTNFR2-m4	aa 130-144 被来自 mTNFR2 的 aa 131-146 替代的 hTNFR2

[0357] 基于流式细胞术的结合分析

[0358] 使用Lipofectamin 2000用TNFR2变体的相应cDNA质粒转染了HEK-293-E细胞。转染后48小时,收获细胞并用指定的抗体将细胞染色30分钟。在利用PBS的2个洗涤步骤后,用偶联到APC的第二抗IgG对表面结合的抗体染色。在BD-Verse流式细胞仪上进行流式细胞术分析之前,洗涤细胞并对细胞染色以用于检测活/死。

[0359] 经转染的HEK 293细胞的基于流式细胞术的结合实验清楚地示出,结构域1和结构域2不会影响抗体中的任何抗体与这些细胞结合(结构域1)或者仅略微影响抗体中的任何抗体与这些细胞结合(结构域2)。使用了多克隆抗人TNFR2抗体作为阳性对照。阳性对照抗体示出了与所有测试的构建体的高结合,而阴性抗体未示出结合(图19)。所有测试的抗体均示出完全丧失了与缺乏结构域3的TNFR2的结合。类似地,如果结构域4丢失,则大多数抗

体可能不会与TNFR2结合。相比于与TNFR2 Δ 1和TNFR2 Δ 2结合,所有拮抗性抗体(1H10、4H02和5B08)均示出与TNFR2 Δ 4的结合大大降低了多于50%。类似地,从TNFR2中去除两个结构域清楚地示出,结构域3或4的缺乏严重消除了所有测试的抗体与TNFR2的结合,可能激动性抗体1F06除外,而结构域4的缺乏则消除了激动性抗体的结合并且显著降低了拮抗性抗体的结合。(图19E和F)。

[0360] 与小鼠人嵌合TNFR2的结合

[0361] 为了进一步缩小结合位点并定义表位,用对应小鼠序列替代了人TNFR2结构域3的一部分。由于所有抗体均示出对小鼠TNFR2的交叉反应性非常低,因此与某些构建体的结合的丧失将允许细化结合表位。图20显示了不同的小鼠-人嵌合TNFR2构建体。进行了四种不同替代,将来自人序列的14(m1)、12(m2)、10(m3)或16(m4)氨基酸与对应小鼠序列交换。其它三个结构域(1、2、4)排他地含有人类序列。

[0362] 然后将这些构建体(在3中具有突变的TNFR2结构域1-4)转染成HEK293细胞,并且使用流式细胞术方法测试抗体的结合。作为阳性对照,使用了小鼠TNFR2以及人TNFR2的多克隆抗体。如所期望的,由于序列相似性,两种多克隆对照抗体均示出显著的交叉反应性并且识别人和小鼠TNFR2两者。显然,在将抗体与其预期靶标匹配时,获得了最佳信号。

[0363] 单克隆抗体示出了与人TNFR2的强结合,但与小鼠TNFR2不结合或结合很少(图21左图)。对于所有克隆,观察到与在aa 119-132中具有突变的hTNFR2 m1构建体的结合相似,几乎没有减少,这表明没有抗体与所述区内的表位结合。然而,aa 134-144(hTNFR2 m2构建体)中的突变完全消除了测试的抗体的对应于拮抗性阻断抗体1-H10、4-H02和5-B08的一半的结合,这表明所述抗体至少部分地在此区中结合。1-G10是也受到此替代的强烈影响的部分阻断剂。值得注意的是,使用构建体2,激动性抗体(1-F02、1-F06和4-E08)保持了结合,这强烈表明与拮抗性抗体不同的表位。有趣的是,所有抗体都丧失了与在aa 151-160中具有突变的hTNFR2 m3构建体的结合。这表明,所有抗体(激动剂和拮抗剂两者)在所述序列内均具有至少部分表位。测试在aa 130-144中具有突变的稍大构建体hTNFR2 m4示出了与构建体hTNFR2 m2相似的结合。

[0364] 结论结合表位

[0365] 将抗体分组为其功能作用,激动性抗体(1-F02、1-F06和4-E08)似乎结合了结构域3的涵盖aa 151-160的非常远侧的C端部分并且可能延伸到结构域4的更大部分,然而拮抗剂(1-H10、5-B08和4-H02)的表位更多地朝结构域3的涵盖aa 134-160的中心移位并且可能覆盖结构域4的较小部分。然而,尽管如此,其表位似乎在一定程度上重叠。

[0366] 没有抗体与域3的aa 119-134的N端部分结合。与结构域4的结合位点很有可能针对所有抗体但尚未完全标识出来。

序列表

<110> 生物发明国际公司 (BioInvent International AB)

<120> 新型拮抗性抗TNFR2抗体分子

<130> BI84 PCT

<150> EP18203993.3

<151> 2018-11-01

<160> 223

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Phe Asp Asp Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
1 5 10

[0001]

<210> 2

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly Arg

<210> 3

<211> 16

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Cys Ala Arg Asp Arg Ser Ser Ser Trp Tyr Arg Asp Gly Met Asp Val
1 5 10 15

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

Cys	Thr	Gly	Ser	Ser	Ser	Asn	Ile	Gly	Ala	Gly	Tyr	Asp	Val	His
1				5					10					15

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 5

Gly	Asn	Ser	Asn	Arg	Pro	Ser
1			5			

<210> 6

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人

<400> 6

Cys	Ala	Ala	Trp	Asp	Asp	Ser	Leu	Ser	Gly	Trp	Val
1				5					10		

[0002]

<210> 7

<211> 121

<212> PRT

<213> 智人

<400> 7

Glu	Val	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5					10					15	

Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asp	Asp	Tyr
			20					25					30		

Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			

Ser	Val	Ile	Tyr	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys
	50					55					60				

Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu
65					70					75				80	

Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala
				85					90					95	

Arg Asp Arg Ser Ser Ser Trp Tyr Arg Asp Gly Met Asp Val Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 8
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

[0003] Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser
85 90 95

Leu Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 9
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9

Phe Asp Asp Tyr Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
1 5 10

<210> 10

<211> 18
<212> PRT
<213> 智人

<400> 10

Ser Thr Ile Tyr Ser Gly Asp Asn Ala Tyr Tyr Gly Ala Ser Val Arg
1 5 10 15

Gly Arg

<210> 11
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11

Ala Arg Val Tyr Ser Ser Ser Trp Arg Lys Arg Ala Phe Asp Ile
1 5 10 15

[0004]

<210> 12
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 12

Cys Ser Gly Thr Ser Ser Asn Ile Glu Ser Asn Thr Val Asn
1 5 10

<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 13

Ser Asp Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 14
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 14

Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Trp Val
1 5 10

<210> 15
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 15

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Asp Tyr
 20 25 30

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Thr Ile Tyr Ser Gly Asp Asn Ala Tyr Tyr Gly Ala Ser Val Arg
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

[0005] Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Val Tyr Ser Ser Ser Trp Arg Lys Arg Ala Phe Asp Ile Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 16
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 16

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Thr Ser Ser Asn Ile Glu Ser Asn
 20 25 30

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

Ile Tyr Ser Asp Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 17
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 17

Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly
1 5 10

[0006] <210> 18
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 18

Ala Leu Ile Trp Tyr Asp Gly Gly Asn Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly Arg

<210> 19
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 19

Ala Arg Tyr Tyr Gly Asp Gly Gly Phe Asp Pro
1 5 10

<210> 20
<211> 15

<212> PRT
<213> 智人

<400> 20

Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Val Val His
1 5 10 15

<210> 21
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 21

Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 22
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 22

[0007] Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val
1 5 10

<210> 23
<211> 118
<212> PRT
<213> 智人

<400> 23

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Ile Ile Ser Tyr Asp Gly Gly Gly Lys Tyr Phe Ala Asp Pro Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Tyr Tyr Gly Asp Gly Gly Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 24
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人

<400> 24

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30

[0008] Tyr Val Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser
85 90 95

Leu Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 25
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 25

Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly
1 5 10

<210> 26
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 26

Ala Leu Ile Trp Tyr Asp Gly Gly Asn Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly Arg

<210> 27
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 27

Val Arg Glu Thr Gly Asn Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

[0009] <210> 28
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 28

Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
1 5 10 15

<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 29

Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 30
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 30

Cys Ala Thr Trp Asp Asp Arg Val Asn Gly Pro Val
1 5 10

<210> 31
<211> 118
<212> PRT
<213> 智人

<400> 31

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Leu Ile Trp Tyr Asp Gly Gly Asn Glu Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

[0010] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Val Arg Glu Thr Gly Asn Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 32
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人

<400> 32

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Arg
85 90 95

Val Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 33
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 33

[0011] Phe Ser Ser Asn Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
1 5 10

<210> 34
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 34

Ala Leu Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly Arg

<210> 35
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 35

Ala Lys Asp Pro Leu Phe Asp Ser
1 5

<210> 36
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 36

Cys Thr Gly Arg Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
 1 5 10 15

<210> 37
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 37

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
 1 5

<210> 38
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 智人

[0012]

<400> 38

Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val
 1 5 10

<210> 39
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 39

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Asn
 20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ala Leu Ile Trp Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Asp Pro Leu Phe Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr
100 105 110

Val Ser Ser
115

<210> 40

<211> 112

<212> PRT

<213> 智人

<400> 40

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

[0013] Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Arg Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser
85 90 95

Leu Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 41

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 41

Phe Asn Thr Tyr Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
1 5 10

<210> 42
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人

<400> 42

Ser Val Leu Tyr Ser Asp Asp Asp Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly Arg

<210> 43
<211> 17
<212> PRT
<213> 智人

<400> 43

[0014] Ala Arg Asp Cys Gly Gly Asp Cys His Ser Gly Asp Asp Ala Phe Asp
1 5 10 15

Ile

<210> 44
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 44

Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn
1 5 10

<210> 45
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 45

Asp Asn Asp Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 46
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 46

Cys Ala Ala Trp His Asp Ser Leu Asn Gly Trp Val
 1 5 10

<210> 47
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 47

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
 20 25 30

[0015] Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Val Leu Tyr Ser Asp Asp Asp Thr His Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Asp Cys Gly Gly Asp Cys His Ser Gly Asp Asp Ala Phe Asp Ile
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 48
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 48

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Asn Asp Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp His Asp Ser Leu
85 90 95

Asn Gly Trp Val Leu Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

[0016]

<210> 49
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 49

Phe Ser Ala Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
1 5 10

<210> 50
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 50

Ala Val Val Ser Tyr Asp Gly Arg Glu Lys His Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly Arg

<210> 51
<211> 14
<212> PRT

<213> 智人

<400> 51

Ala Arg Ser Asp Gly Gly Tyr Asp Ser Asp Ser Gly Tyr Tyr
1 5 10

<210> 52

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 52

Cys Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Ser Asn Phe Val Tyr
1 5 10

<210> 53

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 53

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

[0017]

<210> 54

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 54

Cys Ser Ser Tyr Ala Tyr Ser Asp Asn Ile Leu
1 5 10

<210> 55

<211> 121

<212> PRT

<213> 智人

<400> 55

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ala Tyr
20 25 30

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

	35	40	45
	Ala Val Val Ser Tyr Asp Gly Arg Glu Lys His Tyr Ala Asp Ser Val 50 55 60		
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr 65 70 75 80		
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95		
	Ala Arg Ser Asp Gly Gly Tyr Asp Ser Asp Ser Gly Tyr Tyr Trp Gly 100 105 110		
	Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 115 120		
	<210> 56 <211> 110 <212> PRT <213> 智人		
[0018]	<400> 56		
	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln 1 5 10 15		
	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Thr Ser Asn Ile Gly Ser Asn 20 25 30		
	Phe Val Tyr Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu 35 40 45		
	Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser 50 55 60		
	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg 65 70 75 80		
	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Ser Tyr Ala Tyr Ser Asp 85 90 95		
	Asn Ile Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly 100 105 110		

<210> 57
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 57

Phe Ser Asn Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
1 5 10

<210> 58
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 58

Ser Gly Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly Arg

[0019] <210> 59
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人

<400> 59

Ala Arg His Tyr Tyr Tyr His Ile Ala Gly Tyr Tyr Tyr Asp Thr Phe
1 5 10 15

Asp Ile

<210> 60
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 60

Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Gly Asn Thr Val Asn
1 5 10

<210> 61
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 61

Gly Asn Thr Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 62

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人

<400> 62

Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Val Val
1 5 10

<210> 63

<211> 125

<212> PRT

<213> 智人

<400> 63

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

[0020]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Gly Ile Ser Ser Ser Gly Ser Ser Ala Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Tyr Tyr Tyr His Ile Ala Gly Tyr Tyr Tyr Asp Thr Phe
100 105 110

Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 64
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 64

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Gly Asn
 20 25 30

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

Ile Tyr Gly Asn Thr Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

[0021] Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
 85 90 95

Ser Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 65
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 65

Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 1 5 10

<210> 66
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 66

Ala Thr Ile Ser Tyr His Gly Ser Asp Lys Asp Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly Arg

<210> 67
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人

<400> 67

Ala Arg Asp Ala Asn Tyr His Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Asp Val Phe
1 5 10 15

Asp Ile

<210> 68
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 68

[0022] Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn
1 5 10

<210> 69
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 69

Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 70
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 70

Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Thr Trp Val
1 5 10

<210> 71
<211> 125
<212> PRT
<213> 智人

<400> 71

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Thr Ile Ser Tyr His Gly Ser Asp Lys Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

[0023]

Ala Arg Asp Ala Asn Tyr His Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Asp Val Phe
100 105 110

Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 72

<211> 111

<212> PRT

<213> 智人

<400> 72

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Thr Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 73

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 73

Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Thr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly
1 5 10

<210> 74

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人

[0024] <400> 74

Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Tyr Ile His Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly Arg

<210> 75

<211> 11

<212> PRT

<213> 智人

<400> 75

Ala Arg Glu Gly Leu Leu Pro Asp Ala Phe Asp
1 5 10

<210> 76

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 76

Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Tyr Val Ser

	1	5	10
	<210> 77 <211> 7 <212> PRT <213> 智人 <400> 77		
	Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser 1 5		
	<210> 78 <211> 12 <212> PRT <213> 智人 <400> 78		
	Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Val Ser Gly Trp Val 1 5 10		
[0025]	<210> 79 <211> 119 <212> PRT <213> 智人 <400> 79		
	Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly 1 5 10 15		
	Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr 20 25 30		
	Tyr Met Thr Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val 35 40 45		
	Ser Gly Ile Ser Gly Ser Gly Gly Tyr Ile His Tyr Ala Asp Ser Val 50 55 60		
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr 65 70 75 80		
	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95		
	Ala Arg Glu Gly Leu Leu Pro Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly		

	100	105	110
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 115		
<210>	80		
<211>	111		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	80		
	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln 1 5 10 15		
	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn 20 25 30		
	Tyr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu 35 40 45		
	Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser 50 55 60		
[0026]			
	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg 65 70 75 80		
	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Val 85 90 95		
	Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly 100 105 110		
<210>	81		
<211>	14		
<212>	PRT		
<213>	智人		
<400>	81		
	Phe Ser Ser Tyr Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly 1 5 10		
<210>	82		
<211>	19		
<212>	PRT		
<213>	智人		

<400> 82

Ala Val Met Ser Tyr Asp Glu Tyr Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly Arg

<210> 83

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 83

Ala Lys Gly Phe Tyr Gly Asp Tyr Pro Leu Trp Asp Tyr
1 5 10

<210> 84

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 84

[0027]

Cys Ser Gly Gly Asn Ser Asn Ile Gly Thr Asn Thr Val Asp
1 5 10

<210> 85

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 85

Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 86

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人

<400> 86

Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Val Asn Gly Pro Val
1 5 10

<210> 87

<211> 120

<212> PRT
<213> 智人

<400> 87

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ser Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Val Met Ser Tyr Asp Glu Tyr Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

[0028]

Ala Lys Gly Phe Tyr Gly Asp Tyr Pro Leu Trp Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 88
<211> 111
<212> PRT
<213> 智人

<400> 88

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Gly Asn Ser Asn Ile Gly Thr Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

50

55

60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Val
85 90 95

Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 89

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 89

Phe Ser Ser Tyr Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
1 5 10

[0029]

<210> 90

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 90

Ser Thr Ile Thr Gly Gly Gly Ser Ile Tyr Asp Ala Asn Ser Val Gln
1 5 10 15

Gly Arg

<210> 91

<211> 18

<212> PRT

<213> 智人

<400> 91

Ala Arg Asp Ser Thr Tyr His Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Asp Val Phe
1 5 10 15

Asp Ile

<210> 92

<211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 92

Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn
 1 5 10

<210> 93
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 93

Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser
 1 5

<210> 94
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 94

[0030] Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly His Trp Val
 1 5 10

<210> 95
 <211> 124
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 95

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Glu Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Thr Ile Thr Gly Gly Gly Ser Ile Tyr Asp Ala Asn Ser Val Gln
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
85 90 95

Arg Asp Ser Thr Tyr His Ser Ser Gly Tyr Tyr Tyr Asp Val Phe Asp
100 105 110

Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 96
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人

<400> 96

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

[0031] Thr Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu
35 40 45

Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Gly His Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 97
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 97

Phe Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly

1	5	10
<210> 98 <211> 20 <212> PRT <213> 智人 <400> 98 Ser Ala Val Phe Gly Ser Gly His Gly Asn Thr Phe Tyr Ala Asp Ala 1 5 10 15		

Val Lys Gly Arg
20

<210> 99 <211> 14 <212> PRT <213> 智人 <400> 99 Ala Arg Glu Gln Leu Trp Phe Gly Gln Asp Ala Phe Asp Ile 1 5 10
--

[0032]

<210> 100 <211> 14 <212> PRT <213> 智人 <400> 100 Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn 1 5 10
--

<210> 101 <211> 7 <212> PRT <213> 智人

<400> 101

Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser
1 5

<210> 102 <211> 12 <212> PRT <213> 智人
--

<400> 102

Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10

<210> 103
<211> 122
<212> PRT
<213> 智人

<400> 103

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Pro Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Val Phe Gly Ser Gly His Gly Asn Thr Phe Tyr Ala Asp Ala
50 55 60

[0033] Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu
65 70 75 80

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Glu Gln Leu Trp Phe Gly Gln Asp Ala Phe Asp Ile Trp
100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 104
<211> 111
<212> PRT
<213> 智人

<400> 104

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 105
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 105

[0034] Phe Ser Asp Ala Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
1 5 10

<210> 106
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 106

Ser Asp Leu Ser Asp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly Arg

<210> 107
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 107

Gly Arg Leu Ala Ala Gly Gly Pro Val Asp Tyr
1 5 10

<210> 108
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 108

Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
 1 5 10 15

<210> 109
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 109

Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser
 1 5

<210> 110
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 智人

[0035]

<400> 110

Cys Ser Val Trp Asp Asp Ser Leu Asn Ser Trp Val
 1 5 10

<210> 111
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 111

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Ala
 20 25 30

Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Asp Leu Ser Asp Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Gly Arg Leu Ala Ala Gly Gly Pro Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 112

<211> 112

<212> PRT

<213> 智人

<400> 112

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

[0036] Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ser Val Trp Asp Asp Ser
85 90 95

Leu Asn Ser Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 113

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 113

Phe Ser Asp Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
1 5 10

<210> 114

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人

<400> 114

Ala Asn Ile Asn Thr Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Leu Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly Arg

<210> 115

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 115

[0037] Ala Arg Glu Glu Tyr Gly Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 116

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 116

Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn
1 5 10

<210> 117

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 117

Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser
1 5

<210> 118

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 118

Cys Gln Ser Phe Asp Arg Gly Leu Ser Gly Ser Ile Val
1 5 10

<210> 119

<211> 117

<212> PRT

<213> 智人

<400> 119

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

[0038] Ala Asn Ile Asn Thr Asp Gly Ser Glu Lys Tyr Tyr Leu Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Glu Tyr Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 120

<211> 112

<212> PRT

<213> 智人

<400> 120

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Asp Asn Asn Lys Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Asp Arg Gly Leu
85 90 95

Ser Gly Ser Ile Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 121
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

[0039]

<400> 121

Phe Ser Ser Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
1 5 10

<210> 122
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 122

Ser Ala Ile Ser Gly Gly Ala Thr Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly Arg

<210> 123
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 123

Ala Lys Gly Gly Thr Gly Asp Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 124
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 124

Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
1 5 10 15

<210> 125
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 125

Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

[0040] <210> 126
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 126

Cys Ala Ala Arg Asp Asp Gly Leu Ser Gly Pro Val
1 5 10

<210> 127
<211> 120
<212> PRT
<213> 智人

<400> 127

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Gly Ala Thr Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Gly Gly Thr Gly Asp Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 128

<211> 112

<212> PRT

<213> 智人

<400> 128

[0041]

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Arg Asp Asp Gly
85 90 95

Leu Ser Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 129

<211> 14

<212> PRT
<213> 智人

<400> 129

Phe Ser Ser Asn Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
1 5 10

<210> 130
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 130

Ser Val Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly Arg

[0042] <210> 131
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 131

Ala Arg Asp Arg Gly Trp Phe Asp Pro
1 5

<210> 132
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 132

Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Asp Asn Ser Tyr Val Ser
1 5 10

<210> 133
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 133

Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 134
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 134

Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Pro Val
 1 5 10

<210> 135
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 135

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Asn
 20 25 30

[0043] Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Val Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Asp Arg Gly Trp Phe Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
 100 105 110

Thr Val Ser Ser
 115

<210> 136
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 136

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Arg Ser Asn Ile Asp Asn Ser
20 25 30

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

Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Thr Trp Asp Asp Ser Leu
85 90 95

Ser Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

[0044]

<210> 137
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 137

Phe Ser Asn Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
1 5 10

<210> 138
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 138

Ser Ser Ile Ser Ser Ala Ser Gly Tyr Ile Tyr Tyr Gly Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly Arg

<210> 139
<211> 12
<212> PRT

<213> 智人

<400> 139

Ala Arg Gly Thr Leu Tyr Gly Asp Phe Asp Glu Phe
1 5 10

<210> 140

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 140

Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn Ala Val Asn
1 5 10

<210> 141

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 141

Gly Asn Thr Asn Arg Pro Ser
1 5

[0045]

<210> 142

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 142

Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Gly Tyr Val Val
1 5 10

<210> 143

<211> 119

<212> PRT

<213> 智人

<400> 143

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

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

	35	40	45
	Ser Ser Ile Ser Ser Ala Ser Gly Tyr Ile Tyr Tyr Gly Asp Ser Val 50 55 60		
	Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr 65 70 75 80		
	Leu Gln Met Asn Asn Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys 85 90 95		
	Ala Arg Gly Thr Leu Tyr Gly Asp Phe Asp Glu Phe Trp Gly Gln Gly 100 105 110		
	Thr Leu Val Thr Val Ser Ser 115		
	<210> 144 <211> 112 <212> PRT <213> 智人		
[0046]	<400> 144		
	Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln 1 5 10 15		
	Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Asn Asn 20 25 30		
	Ala Val Asn Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu 35 40 45		
	Ile Tyr Gly Asn Thr Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser 50 55 60		
	Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg 65 70 75 80		
	Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu 85 90 95		
	Ser Gly Tyr Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly 100 105 110		

<210> 145
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 145

Phe Ser Arg His Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
1 5 10

<210> 146
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 146

Ser Ser Ile Ser Thr Gly Ser Ser Tyr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly Arg

[0047]

<210> 147
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 147

Ala Arg Glu Lys Gly His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 148
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 148

Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
1 5 10 15

<210> 149
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 149

Gly Asn Ser Tyr Arg Pro Ser

1 5

<210> 150
<211> 13
<212> PRT
<213> 智人

<400> 150

Cys Gln Ser Tyr Asp Thr Ser Leu Ser Ala Tyr Val Val
1 5 10

<210> 151
<211> 120
<212> PRT
<213> 智人

<400> 151

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg His
20 25 30

[0048]

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Thr Gly Ser Ser Tyr Ile Asp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Glu Lys Gly His Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 152
<211> 113
<212> PRT
<213> 智人

<400> 152

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Tyr Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Thr Ser
85 90 95

[0049] Leu Ser Ala Tyr Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

Gly

<210> 153

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 153

Phe Ser Asn Ala Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
1 5 10

<210> 154

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人

<400> 154

Ser Ala Ile Ser Val Ser Gly Ile Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly Arg

<210> 155
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 155

Ala Arg Asp Thr Gly Ser Leu Gly Val Asp Tyr
1 5 10

<210> 156
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 156

Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn
1 5 10

[0050]

<210> 157
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 157

Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 158
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 158

Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Ile Ser Val
1 5 10

<210> 159
<211> 118
<212> PRT
<213> 智人

<400> 159

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Ala
20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Ala Ile Ser Val Ser Gly Ile Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Thr Gly Ser Leu Gly Val Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

[0051]

<210> 160
<211> 111
<212> PRT
<213> 智人

<400> 160

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
20 25 30

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

Ile Tyr Arg Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ile Ser Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 161
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 161

Phe Ser Ser Asn Glu Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly
1 5 10

<210> 162
<211> 18
<212> PRT
<213> 智人

<400> 162

Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

[0052]

Gly Arg

<210> 163
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 163

Ala Arg Arg Glu Gly Trp Leu Val Pro Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 164
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 164

Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn Thr Val Asn
1 5 10

<210> 165

<211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 165

Gly Asn Ile Ile Arg Pro Ser
 1 5

<210> 166
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 166

Cys Gln Ser Phe Asp Thr Thr Leu Ser Gly Ser Ile Val
 1 5 10

<210> 167
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 167

[0053] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Asn
 20 25 30

Glu Met Ser Trp Ile Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95

Arg Arg Glu Gly Trp Leu Val Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 168
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 168

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ser Asn
 20 25 30

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

Ile Tyr Gly Asn Ile Ile Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
 65 70 75 80

[0054]

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Asp Thr Thr Leu
 85 90 95

Ser Gly Ser Ile Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
 100 105 110

<210> 169
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 169

Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
 1 5 10

<210> 170
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 170

Ser Val Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ala Val

1 5 10 15

Lys Gly Arg

<210> 171
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 171

Thr Thr Asp Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Leu
1 5 10

<210> 172
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 172

Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Asp Val His
1 5 10 15

[0055]

<210> 173
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 173

Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser
1 5

<210> 174
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 174

Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Pro Val
1 5 10

<210> 175
<211> 117
<212> PRT
<213> 智人

<400> 175

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Val Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ala Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Thr Asp Ser Gly Ser Gly Ser Tyr Leu Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

[0056]

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 176

<211> 112

<212> PRT

<213> 智人

<400> 176

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30

Tyr Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Ser Asn Asn Gln Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu

65	70	75	80
Arg Ser Glu Asp	Glu Ala Asp Tyr Tyr	Cys Ala Ala Trp Asp	Asp Ser
	85	90	95

Leu Asn Gly	Pro Val Phe Gly Gly Gly	Thr Lys Leu Thr	Val Leu Gly
	100	105	110

<210> 177
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 177

Ser Ser Ser Tyr	Trp Met Ser Trp Val	Arg Gln Ala Pro Gly
1	5	10

<210> 178
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 178

[0057]

Ser Ala Ile Ser	Gly Ser Gly Gly Ser	Thr Tyr Tyr Ala Asp	Ser Val
1	5	10	15

Lys Gly Arg

<210> 179
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 179

Ala Arg Glu Tyr	Ser Gly Tyr Glu Phe	Asp Phe
1	5	10

<210> 180
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 180

Cys Thr Gly Ser	Ser Ser Asn Ile Gly	Ala Arg Ser Asp	Val His
1	5	10	15

<210> 181
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 181

Gly Asn Arg Asn Arg Pro Ser
 1 5

<210> 182
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 182

Cys Gln Ser Phe Asp Arg Gly Leu Ser Gly Ser Ile Val
 1 5 10

<210> 183
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 智人

[0058] <400> 183

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ser Ser Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Tyr Ser Gly Tyr Glu Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 184
<211> 113
<212> PRT
<213> 智人

<400> 184

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Arg
20 25 30

Ser Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Arg Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

[0059] Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Asp Arg Gly
85 90 95

Leu Ser Gly Ser Ile Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

Gly

<210> 185
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 185

Ser Ser Ser Tyr Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
1 5 10

<210> 186

<211> 19
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 186

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 1 5 10 15

Lys Gly Arg

<210> 187
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 187

Ala Arg Glu Tyr Ser Gly Tyr Glu Phe Asp Phe
 1 5 10

[0060]

<210> 188
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 188

Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Arg Ser Asp Val His
 1 5 10 15

<210> 189
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 189

Gly Asn Arg Asn Arg Pro Ser
 1 5

<210> 190
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 190

Cys Gln Ser Phe Asp Arg Gly Leu Ser Gly Ser Ile Val
 1 5 10

<210> 191
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 191

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Ser Ser Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80

[0061] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Ala Arg Glu Tyr Ser Gly Tyr Glu Phe Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 192
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 192

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Arg
 20 25 30

Ser Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
 35 40 45

Leu Ile Tyr Gly Asn Arg Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Phe Asp Arg Gly
85 90 95

Leu Ser Gly Ser Ile Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105 110

Gly

<210> 193
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 193

[0062] Phe Ser Ser Asn Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
1 5 10

<210> 194
<211> 19
<212> PRT
<213> 智人

<400> 194

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly Arg

<210> 195
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人

<400> 195

Ala Arg Asp Arg Gly Arg Thr Gly Thr Asp Tyr
1 5 10

<210> 196
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 196

Cys Ser Gly Thr Thr Ser Asn Ile Gly Ser Tyr Ala Val Asn
 1 5 10

<210> 197
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 197

Gly Asn Ile Asn Arg Pro Ser
 1 5

<210> 198
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 智人

[0063]

<400> 198

Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu
 1 5 10

<210> 199
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 199

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Asn
 20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Ser Ser Tyr Ile Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Asp Arg Gly Arg Thr Gly Thr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 200
<211> 111
<212> PRT
<213> 智人

<400> 200

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

[0064] Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Thr Thr Ser Asn Ile Gly Ser Tyr
20 25 30

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

Ile Tyr Gly Asn Ile Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu Arg
65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Tyr Asp Ser Ser Leu
85 90 95

Ser Ala Ser Leu Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 201
<211> 14
<212> PRT
<213> 智人

<400> 201

Phe Ser Arg Tyr Trp Met His Trp Val Arg Gln Val Pro Gly
1 5 10

<210> 202

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人

<400> 202

Ser Gly Ile Ser Asp Ser Gly Val Val Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly Arg

<210> 203

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人

<400> 203

[0065] Ala Arg Ala Gln Ser Val Ala Phe Asp Ile
1 5 10

<210> 204

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 204

Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly His Asp Val His
1 5 10 15

<210> 205

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 205

Tyr Asp Asp Leu Leu Pro Ser
1 5

<210> 206

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人

<400> 206

Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Ser Gly Trp Val
1 5 10

<210> 207

<211> 117

<212> PRT

<213> 智人

<400> 207

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Tyr
20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Val Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

[0066] Ser Gly Ile Ser Asp Ser Gly Val Val Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg Ala Gln Ser Val Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110

Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 208

<211> 112

<212> PRT

<213> 智人

<400> 208

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

Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30

His Asp Val His Trp Tyr Gln Gln Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu
35 40 45

Leu Ile Tyr Tyr Asp Asp Leu Leu Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser
85 90 95

Leu Ser Gly Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 209

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

[0067]

<400> 209

Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly
1 5 10

<210> 210

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人

<400> 210

Ser Thr Ile Ile Gly Ser Gly Ala Asn Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val
1 5 10 15

Lys Gly Arg

<210> 211

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 211

Ala Arg His Glu Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val
1 5 10

<210> 212
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 212

Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly Tyr Val Val His
1 5 10 15

<210> 213
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 213

Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser
1 5

[0068] <210> 214
<211> 12
<212> PRT
<213> 智人

<400> 214

Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu Asn Gly Arg Val
1 5 10

<210> 215
<211> 120
<212> PRT
<213> 智人

<400> 215

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ser Thr Ile Ile Gly Ser Gly Ala Asn Thr Trp Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Arg His Glu Gly Tyr Tyr Tyr Tyr Gly Met Asp Val Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 216

<211> 112

<212> PRT

<213> 智人

<400> 216

[0069] Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Ala Ser Gly Thr Pro Gly Gln
1 5 10 15

Arg Val Thr Ile Ser Cys Thr Gly Ser Ser Ser Asn Ile Gly Ala Gly
20 25 30

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

Leu Ile Tyr Gly Asn Ser Asn Arg Pro Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe
50 55 60

Ser Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Ser Leu Ala Ile Ser Gly Leu
65 70 75 80

Arg Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser
85 90 95

Leu Asn Gly Arg Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly
100 105 110

<210> 217

<211> 330

<212> PRT

<213> 智人

<400> 217

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

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

[0070]

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

[0071] Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 218
<211> 105
<212> PRT
<213> 智人

<400> 218

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

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

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

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

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

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

Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 219

<211> 330

<212> PRT

<213> 小家鼠

<400> 219

Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly
1 5 10 15

Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
35 40 45

[0072]

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
50 55 60

Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile
65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
85 90 95

Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys
130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp
145 150 155 160

	Phe	Val	Asn	Asn	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala	Gln	Thr	Gln	Thr	His	Arg	
					165					170					175		
	Glu	Asp	Tyr	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg	Val	Val	Ser	Ala	Leu	Pro	Ile	Gln	
				180					185					190			
	His	Gln	Asp	Trp	Met	Ser	Gly	Lys	Glu	Phe	Lys	Cys	Lys	Val	Asn	Asn	
			195					200					205				
	Lys	Asp	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Arg	Thr	Ile	Ser	Lys	Pro	Lys	Gly	
		210					215					220					
	Ser	Val	Arg	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Val	Leu	Pro	Pro	Pro	Glu	Glu	Glu	
	225					230					235					240	
	Met	Thr	Lys	Lys	Gln	Val	Thr	Leu	Thr	Cys	Met	Val	Thr	Asp	Phe	Met	
					245					250					255		
	Pro	Glu	Asp	Ile	Tyr	Val	Glu	Trp	Thr	Asn	Asn	Gly	Lys	Thr	Glu	Leu	
				260					265					270			
[0073]	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Glu	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	
			275					280					285				
	Met	Tyr	Ser	Lys	Leu	Arg	Val	Glu	Lys	Lys	Asn	Trp	Val	Glu	Arg	Asn	
		290					295					300					
	Ser	Tyr	Ser	Cys	Ser	Val	Val	His	Glu	Gly	Leu	His	Asn	His	His	Thr	
	305					310					315					320	
	Thr	Lys	Ser	Phe	Ser	Arg	Thr	Pro	Gly	Lys							
					325					330							
	<210>																
	<211>																
	<212>																
	<213>																
	<400>																
	Ala	Lys	Thr	Thr	Ala	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Val	Cys	Gly	
	1				5					10					15		
	Asp	Thr	Thr	Gly	Ser	Ser	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	
				20					25					30			

Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
50 55 60

Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile
65 70 75 80

Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
85 90 95

Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys
100 105 110

Pro Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
115 120 125

Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys
130 135 140

[0074]

Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp
145 150 155 160

Phe Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg
165 170 175

Glu Asp Tyr Ala Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln
180 185 190

His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn
195 200 205

Lys Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly
210 215 220

Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu
225 230 235 240

Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met
245 250 255

Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu
260 265 270

Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe
275 280 285

Met Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn
290 295 300

Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
305 310 315 320

Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
325 330

<210> 221
<211> 105
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 221

[0075] Gln Pro Lys Ser Ser Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu
1 5 10 15

Glu Leu Glu Thr Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Thr Ile Thr Asp Phe
20 25 30

Tyr Pro Gly Val Val Thr Val Asp Trp Lys Val Asp Gly Thr Pro Val
35 40 45

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

Tyr Met Ala Ser Ser Tyr Leu Thr Leu Thr Ala Arg Ala Trp Glu Arg
65 70 75 80

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

Lys Ser Leu Ser Arg Ala Asp Cys Ser
100 105

<210> 222

<211> 1356
<212> DNA
<213> 智人

<400> 222
gaggtgcagc tgttggagtc tgggggaggc ttggtacagc ctggggggtc cctgagactc

60

tcctgtgcag cctctggatt cacctttgat gattatggca tgagctgggt ccgccaagct

120

ccagggaagg ggctggagtg ggtctcagtt atttatagcg gtggtagtag atattacgca

180

gactccgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatt ccaagaacac gctgtatctg

240

caaatgaaca gcctgagagc cgaggacact gccgtgtatt actgtgcgag agatcgaagc

300

agcagctggt accgcgatgg tatggacgtc tggggccaag gtacactggt caccgtgagc

[0076]

360

tcagcctcca ccaagggcc atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct

420

gggggcacag cggcctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg

480

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt cctacagtcc

540

tcaggactct actccctcag cagcgtgggt accgtgccct ccagcagctt gggcaccag

600

acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag

660

cccaaattct gtgacaaaac tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg

720

ggaccgtcag tcttctcttt cccccaaaa cccaaggaca cctcatgat ctcccgacc

780

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt caagttcaac

840

tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaaagaaa agccgcggga ggagcagtac

900

aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc accgtcctgc accaggactg gctgaatggc

960

aaggagtaca agtgcaaggt ctccaacaaa gccctcccag ccccatcga gaaaaccatc

1020

tccaaagcca aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgcccc atcccgggat

1080

gagctgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta tcccagcgac

1140

atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca actacaagac cagcctccc

1200

[0077]

gtgctggact ccgacggctc cttcttctc tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg

1260

tggcagcagg ggaacgtctt ctcatgctcc gtgatgcatg aggtcttgca caaccactac

1320

acgcagaaga gcctctccct gtctccgggt aaatga

1356

<210> 223

<211> 654

<212> DNA

<213> 智人

<400> 223

cagtctgtgc tgactcagcc accctcagcg tctgggaccc ccgggcagag ggtcaccatc

60

tcctgcactg ggagcagctc caacatcgga gcaggttatg atgtacactg gtatcagcag

120

ctcccaggaa cggcccccaa actctctatc tatggtaaca gcaatcggcc ctccaggggc

180

cctgaccgat tctctggctc caagtctggc acctcagcct ccctggccat cagtgggctc

240

cgggccgagg atgaggctga ttattactgt gcagcatggg atgacagcct gagtggttgg

300

gtgttcggcg gaggaaccaa gctgacggtc ctaggtcagc ccaaggctgc ccctcggtc

360

actctgttcc cgccctcctc tgaggagctt caagccaaca aggccacact ggtgtgtctc

[0078] 420

ataagtgact tctacccggg agccgtgaca gtggcctgga aggcagatag cagccccgtc

480

aaggcgggag tggagaccac cacaccctcc aaacaaagca acaacaagta cgcggccagc

540

agctatctga gcctgacgcc tgagcagtgg aagtcccaca gaagctacag ctgccaggtc

600

acgcatgaag ggagcacctg ggagaagaca gtggccccta cagaatgttc atga

654

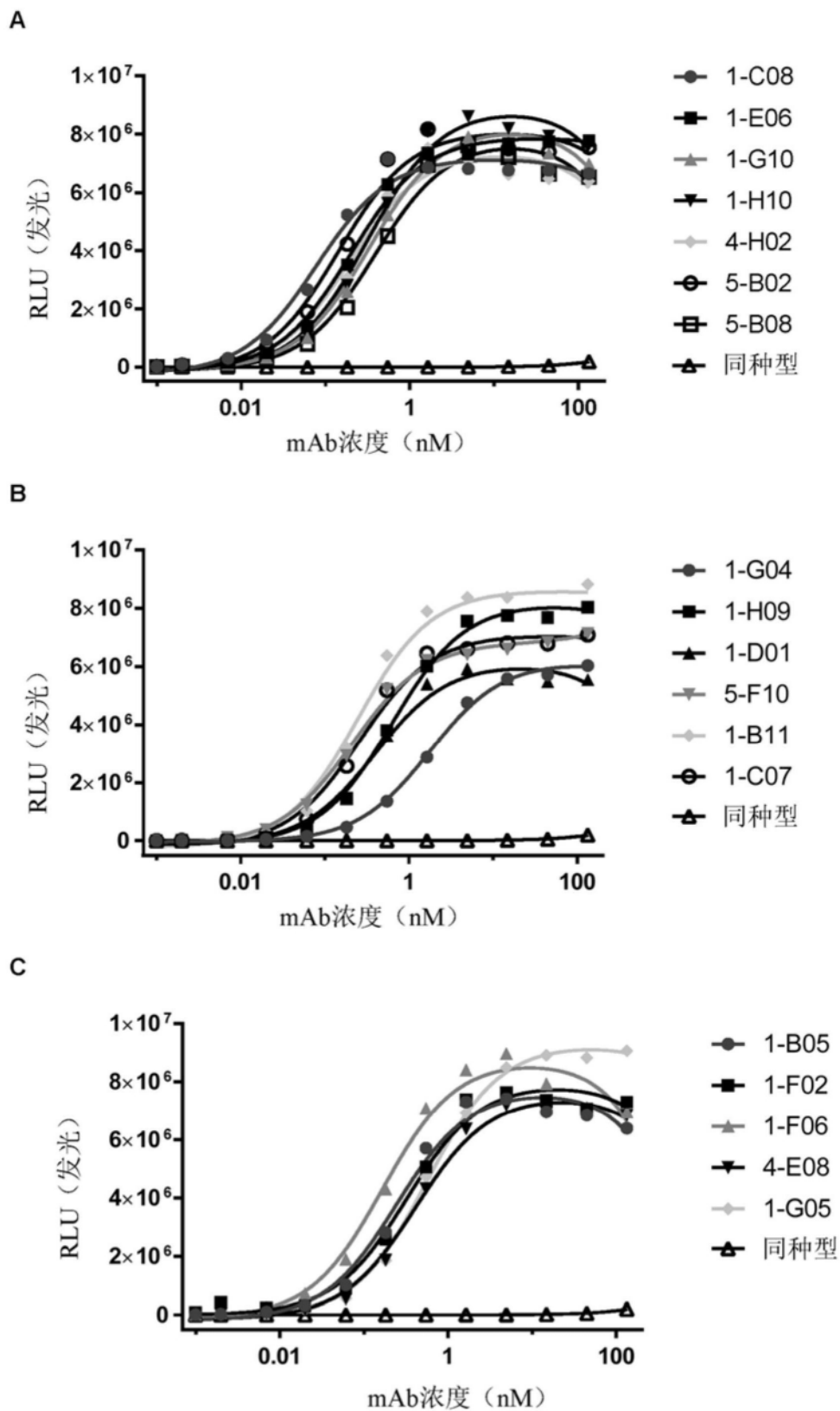
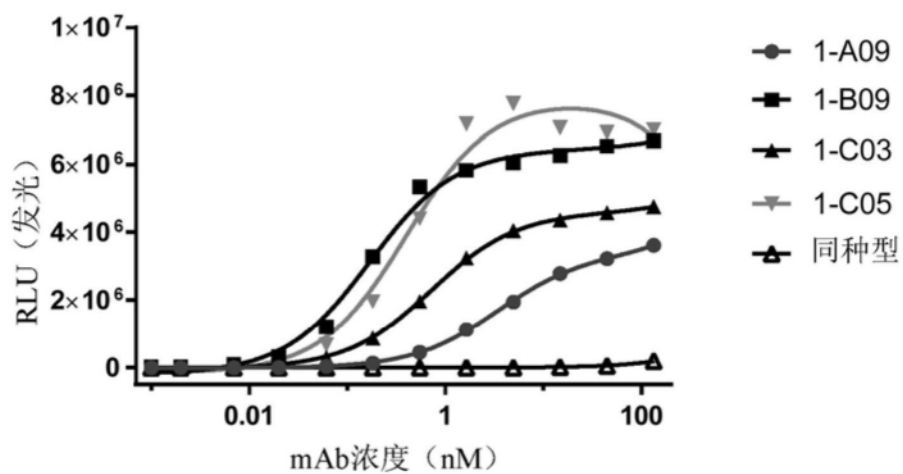


图1

D



E

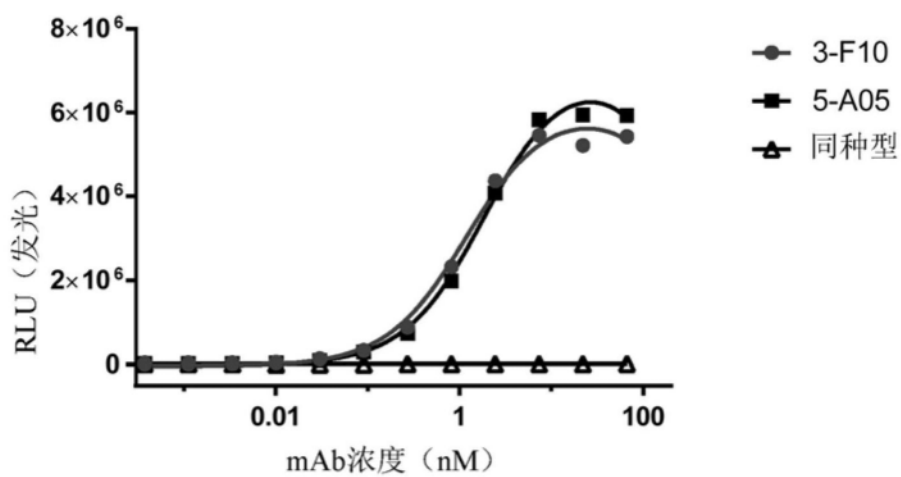


图1续

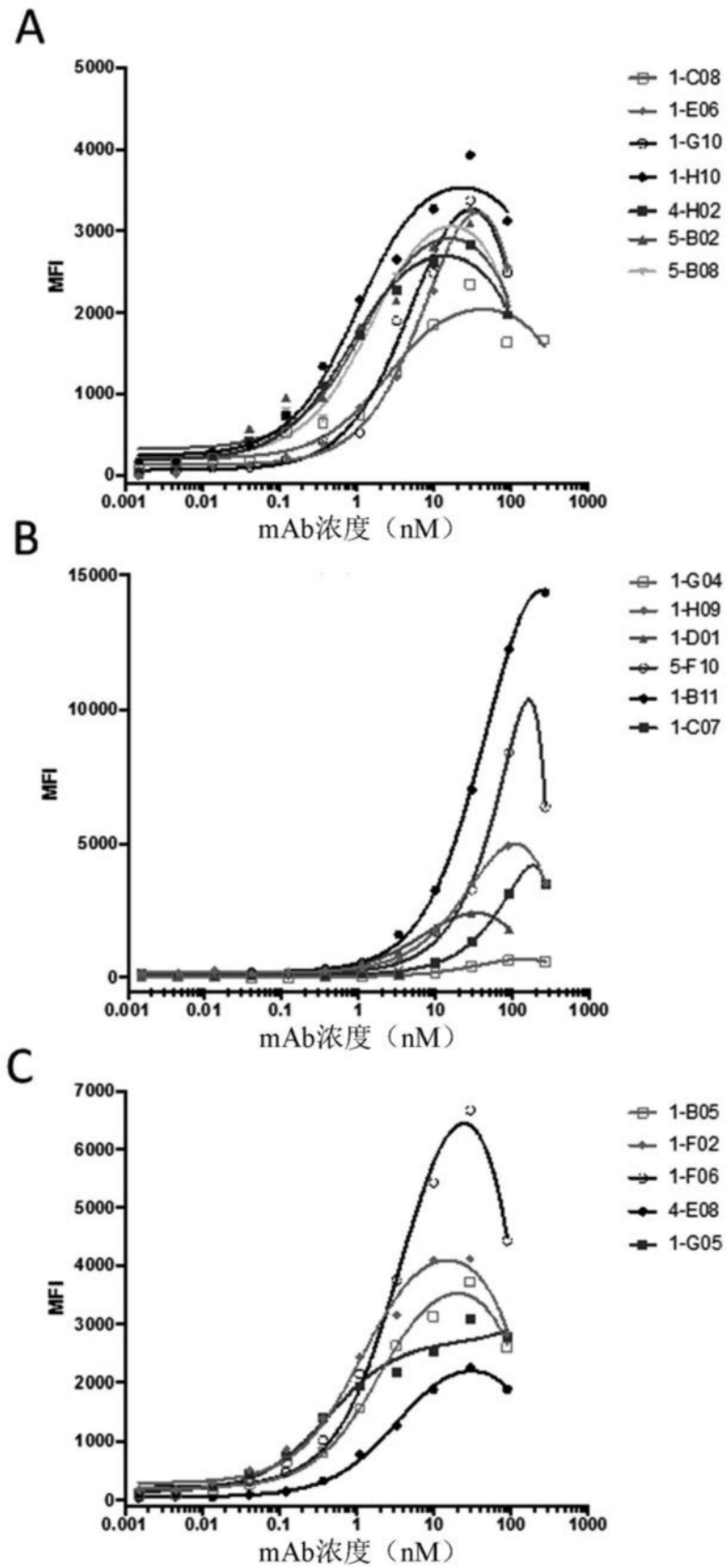


图2

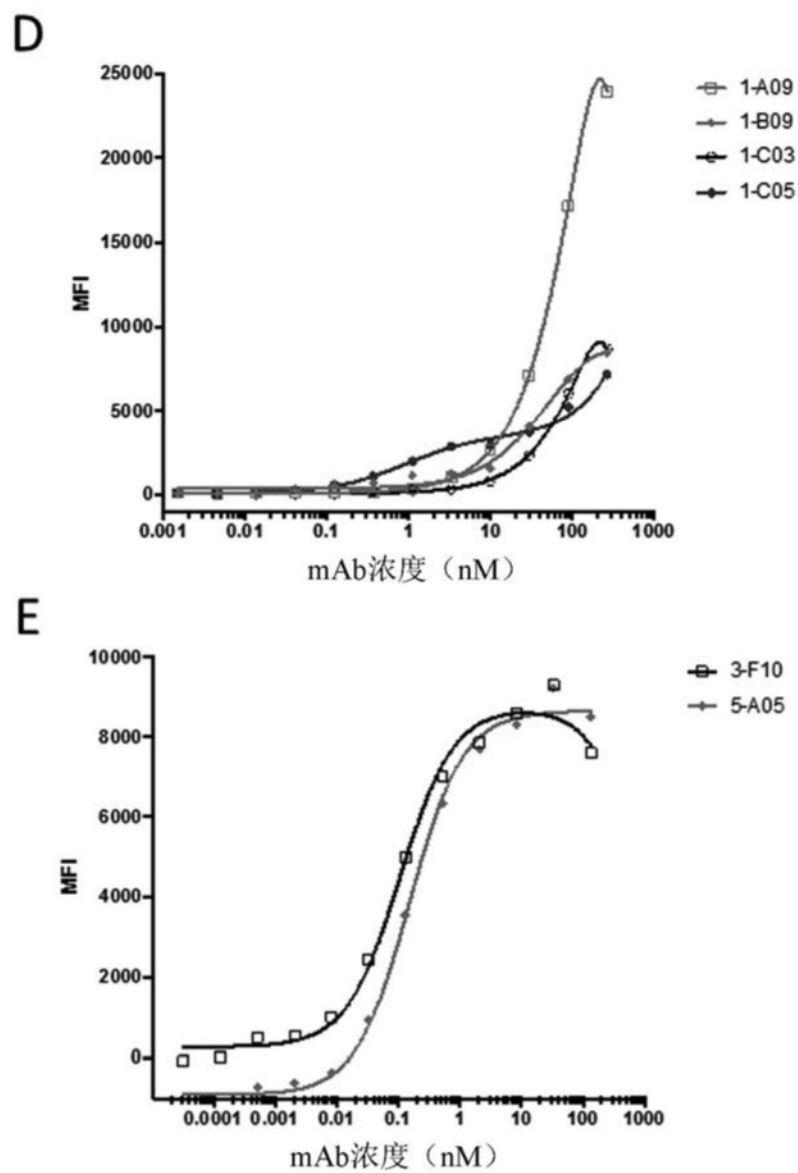


图2续

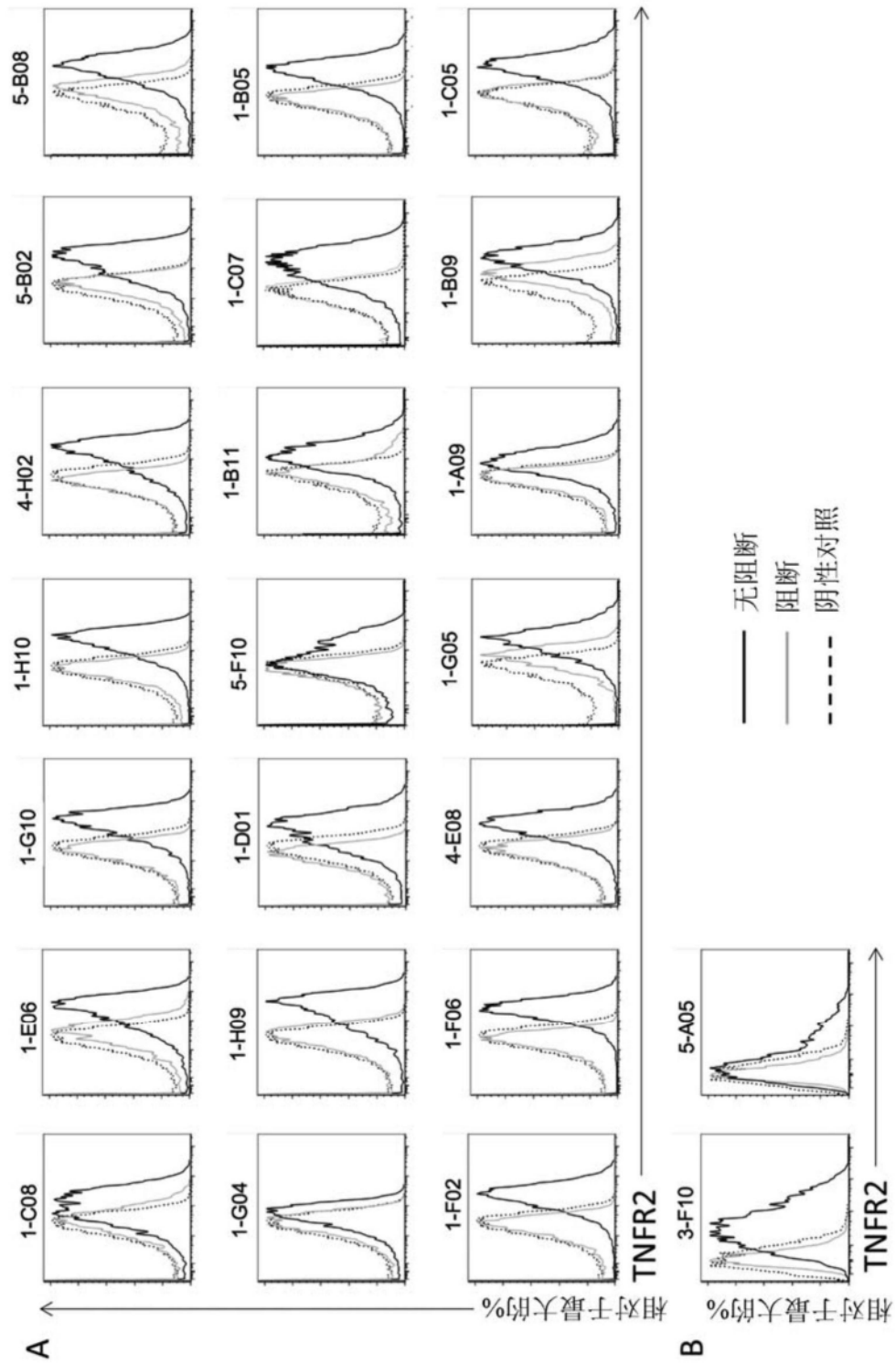


图3

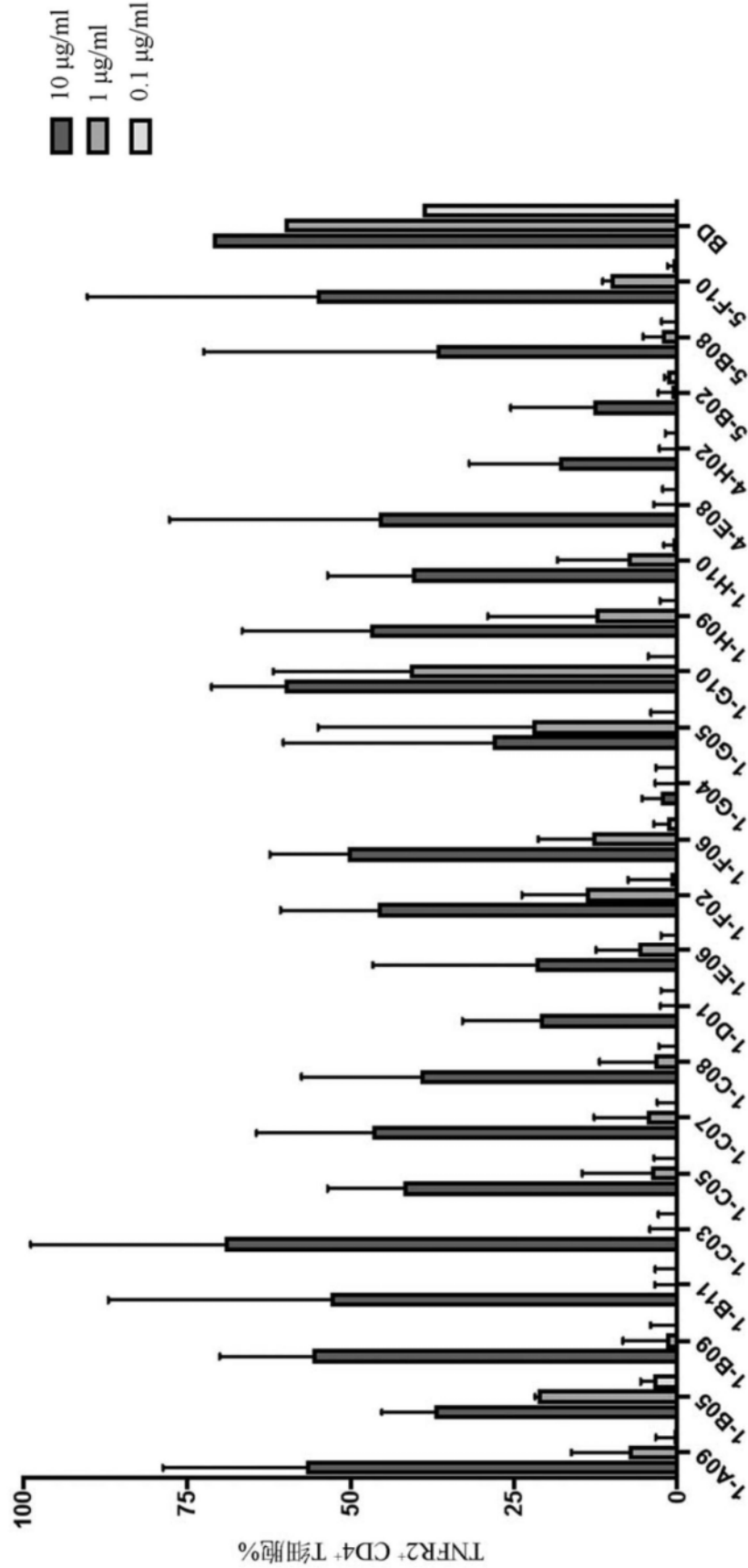


图4

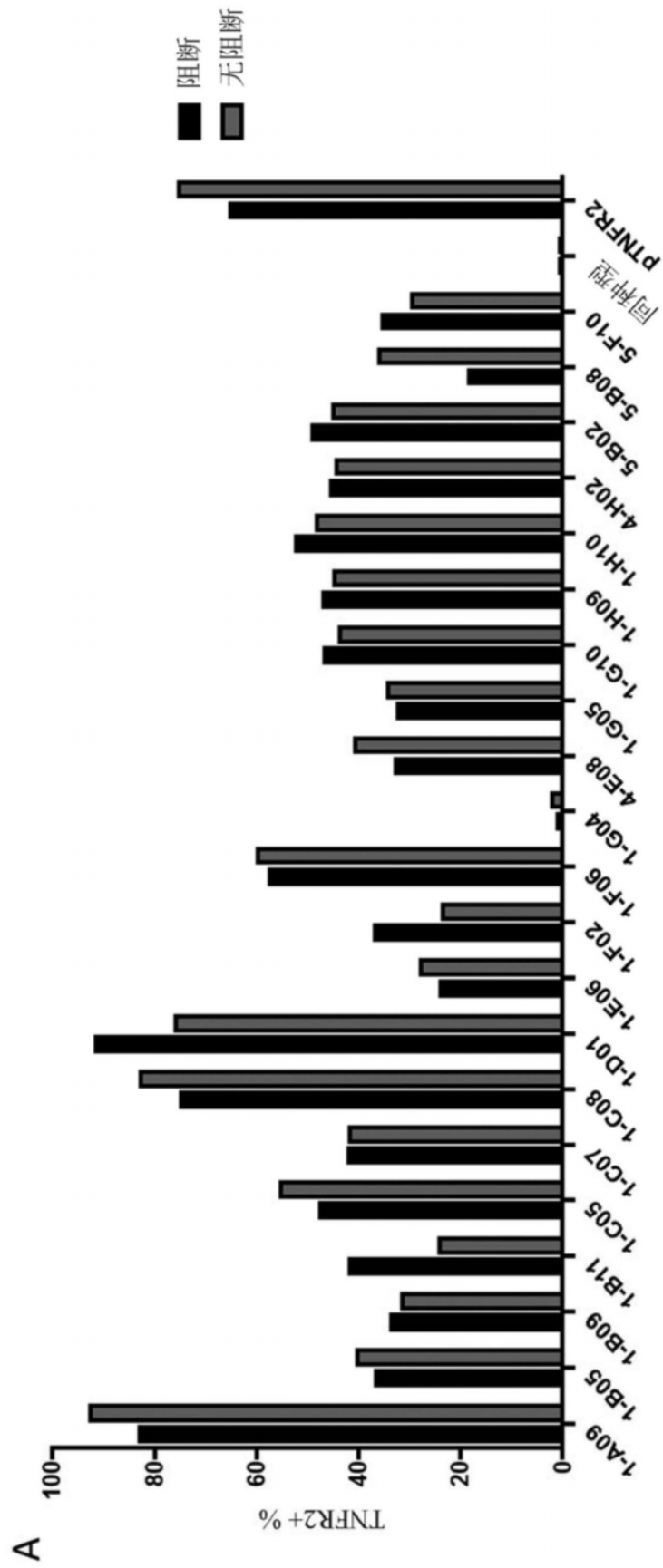


图5



图5续

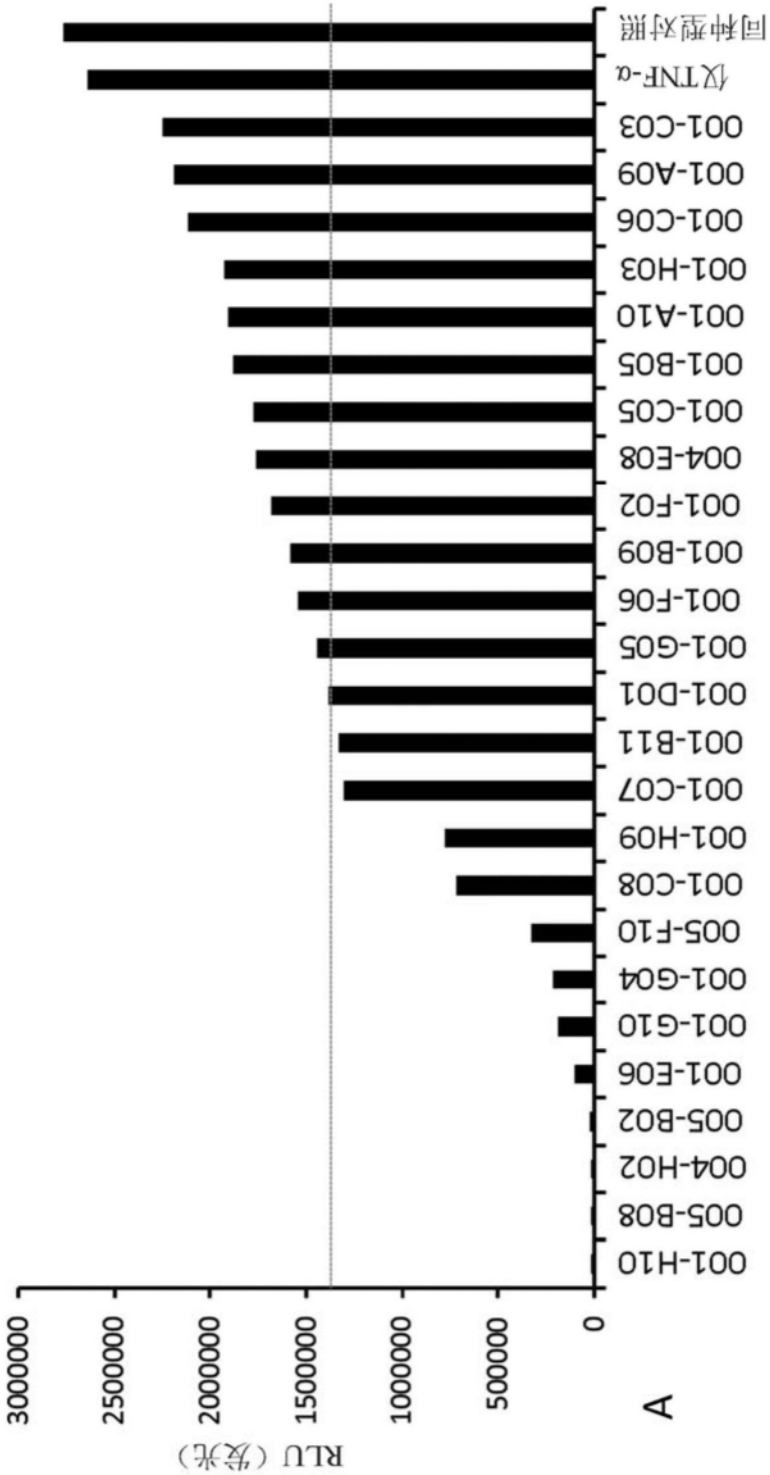


图6

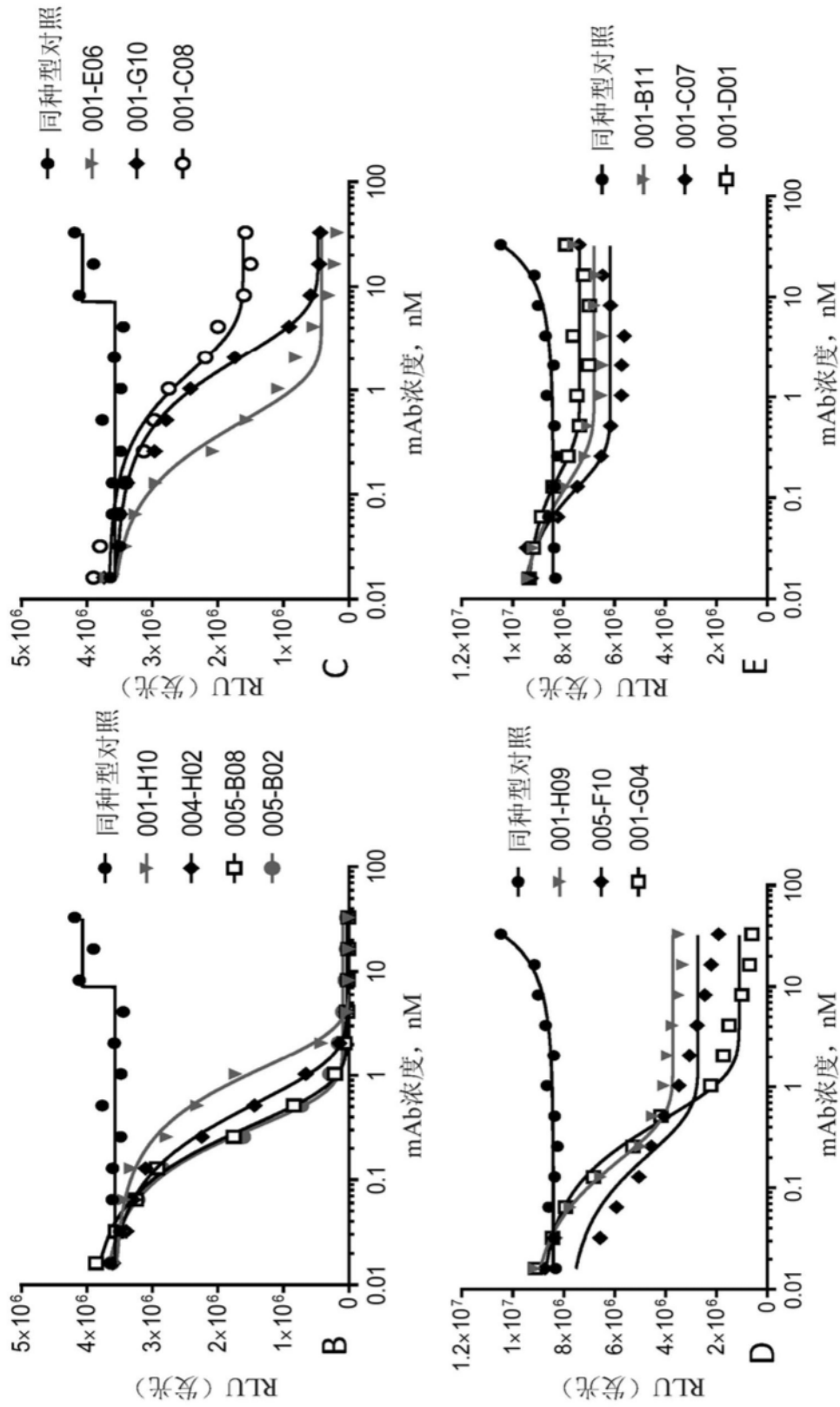


图6续

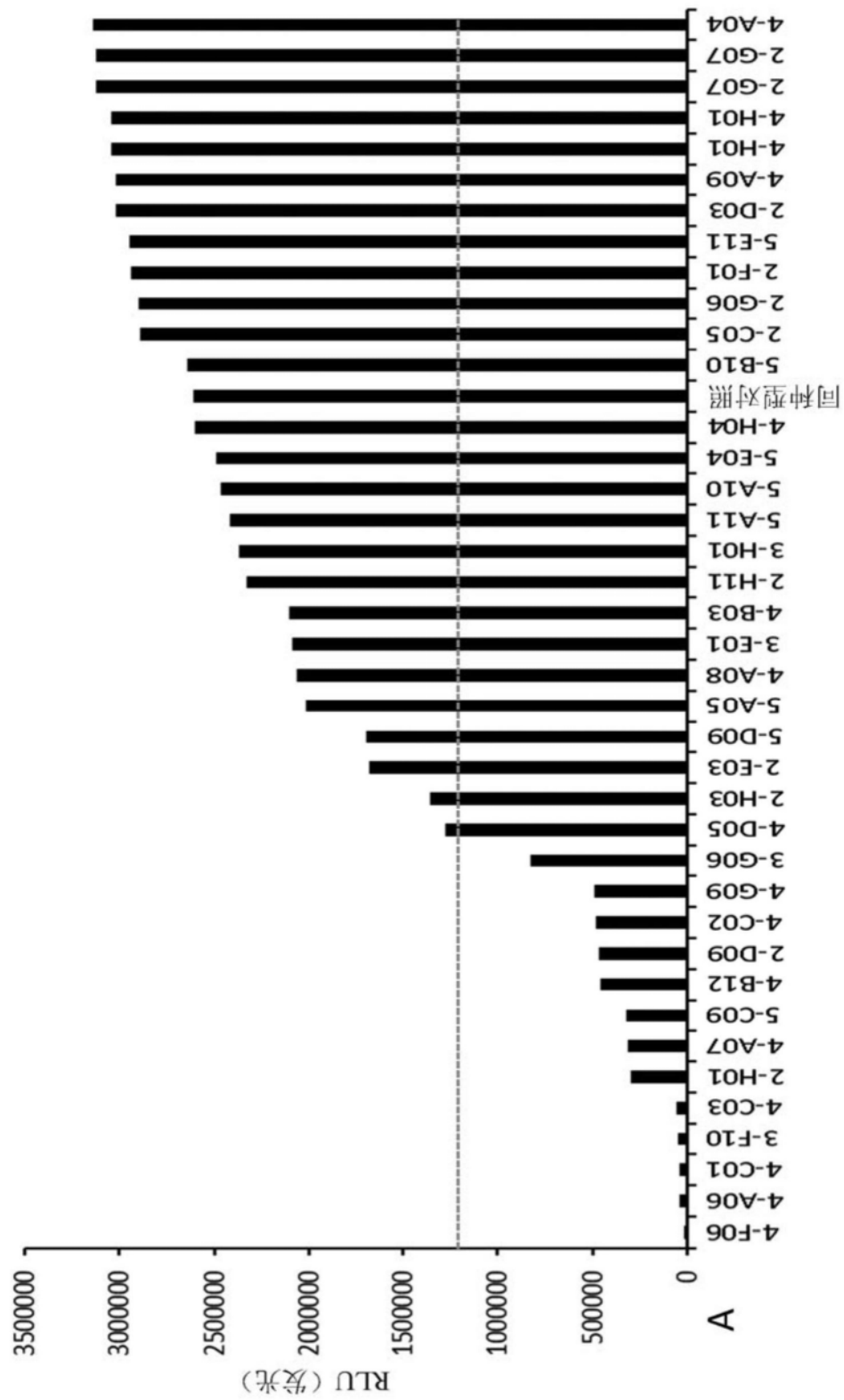


图7

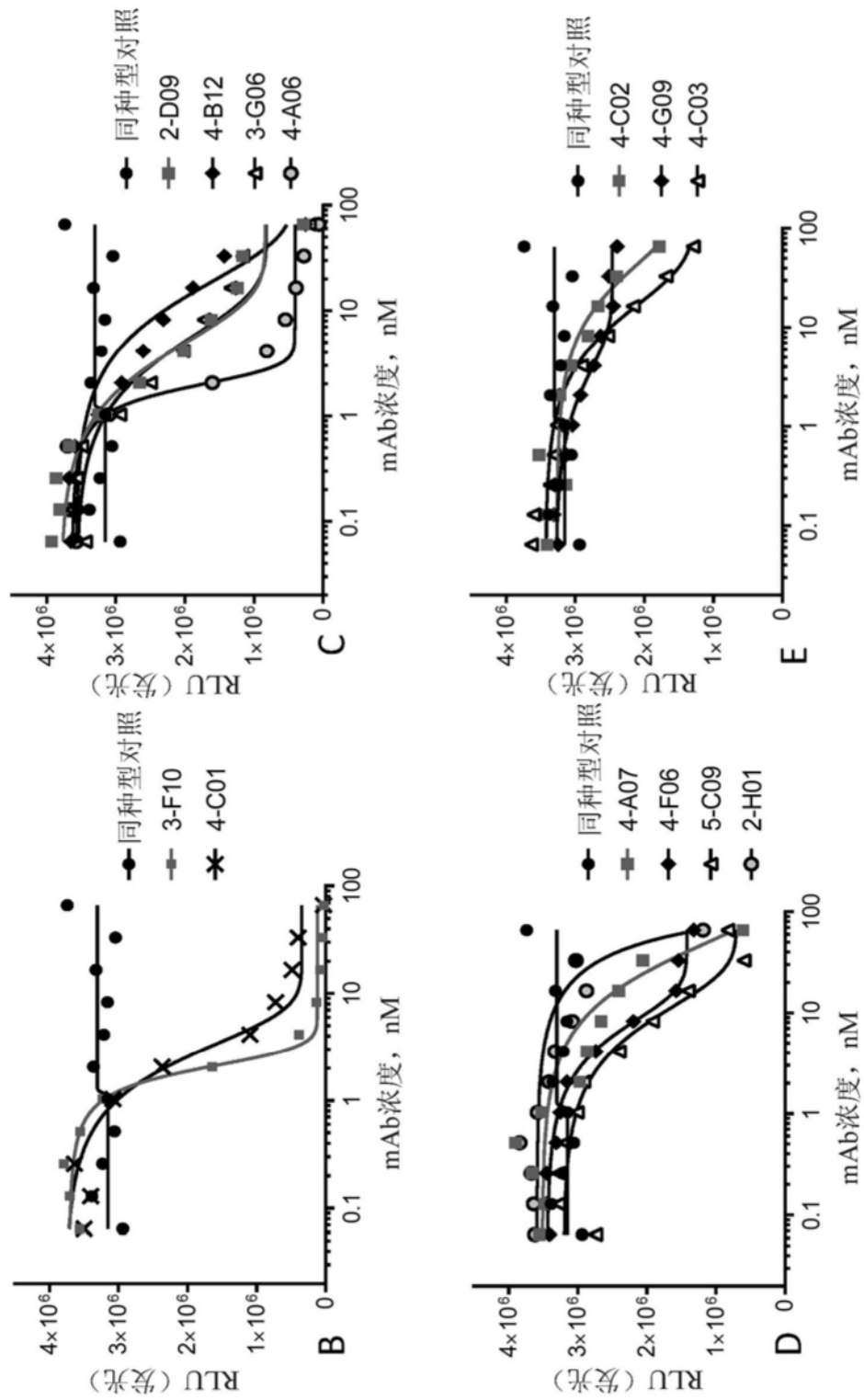


图7续

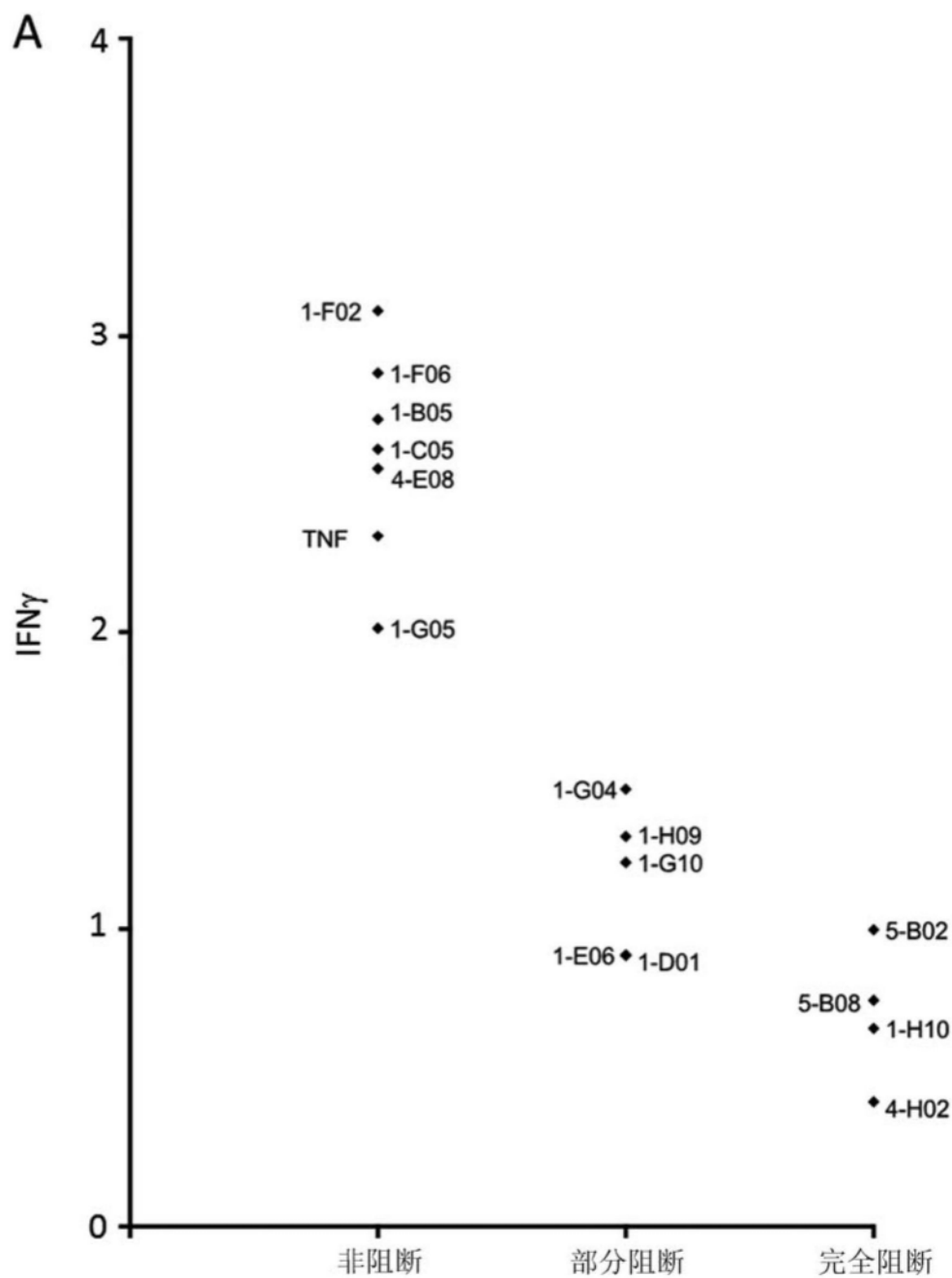


图8

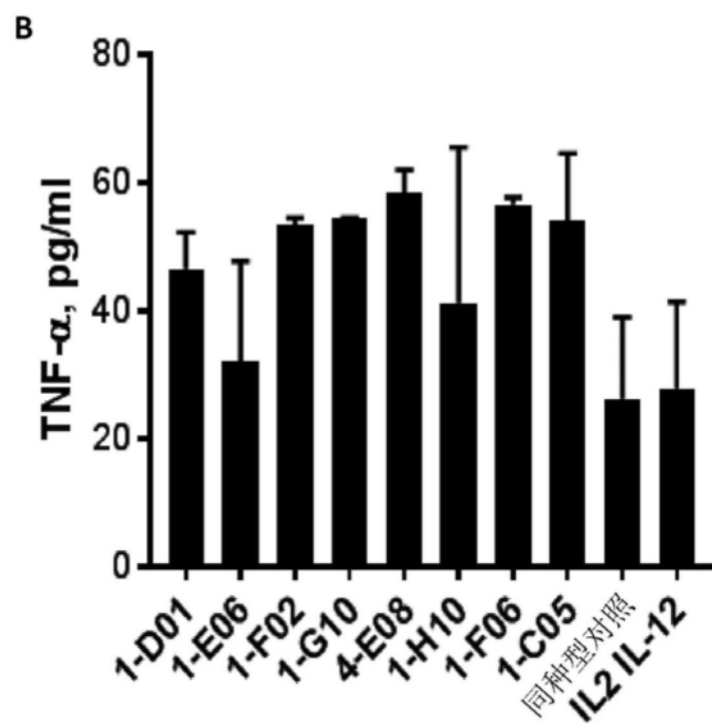
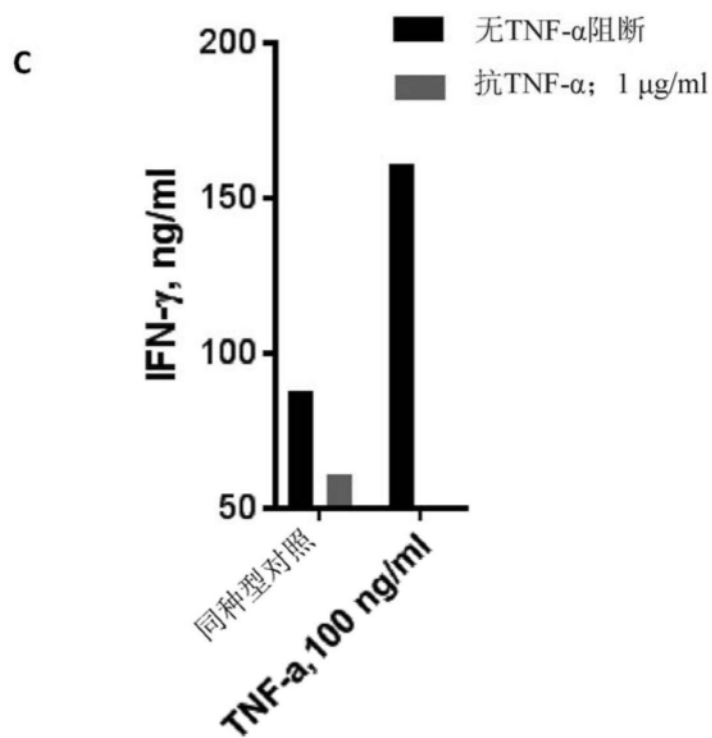


图8续



D

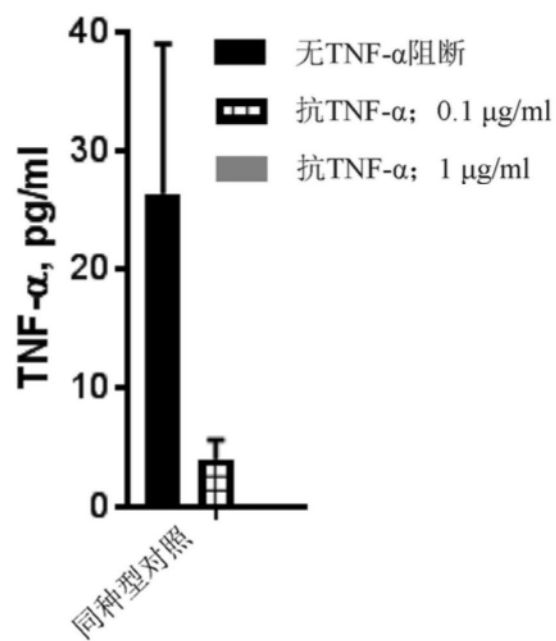


图8续

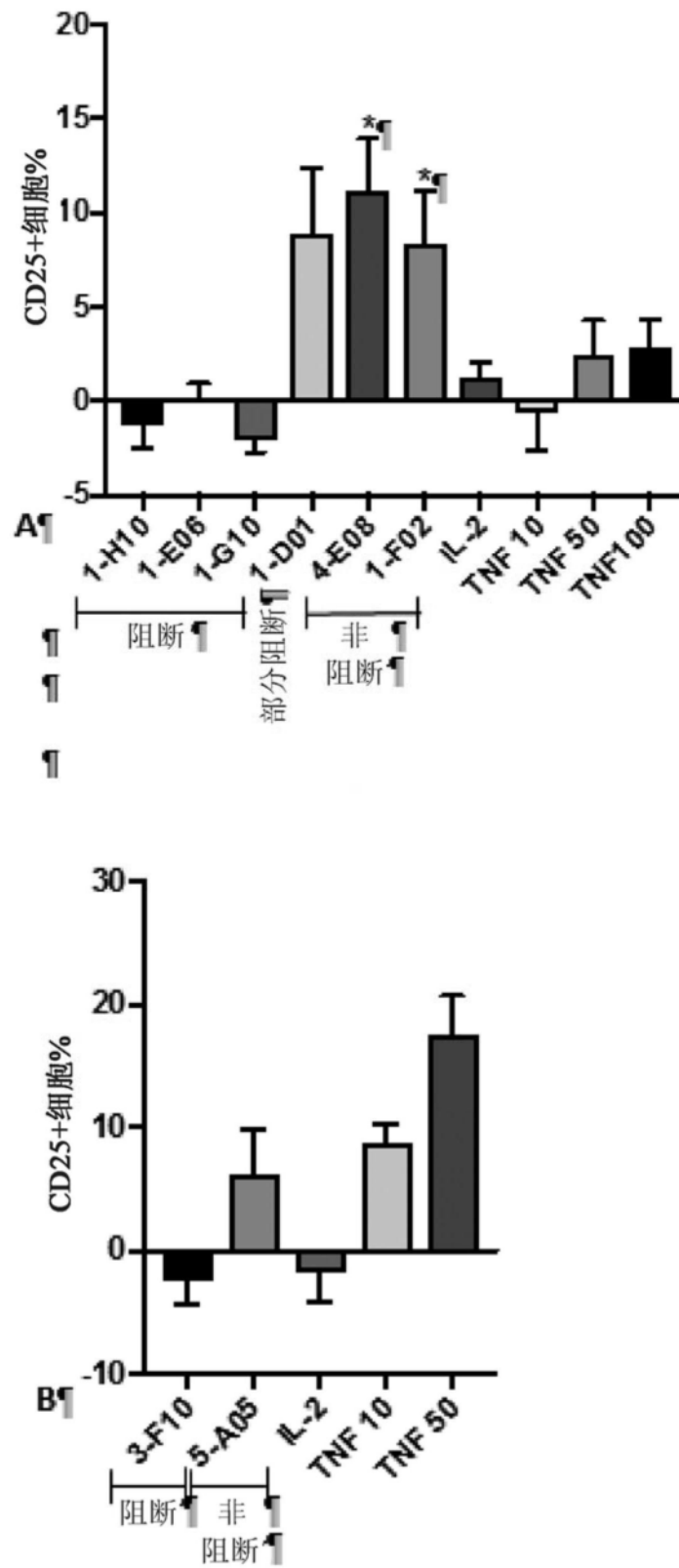


图9

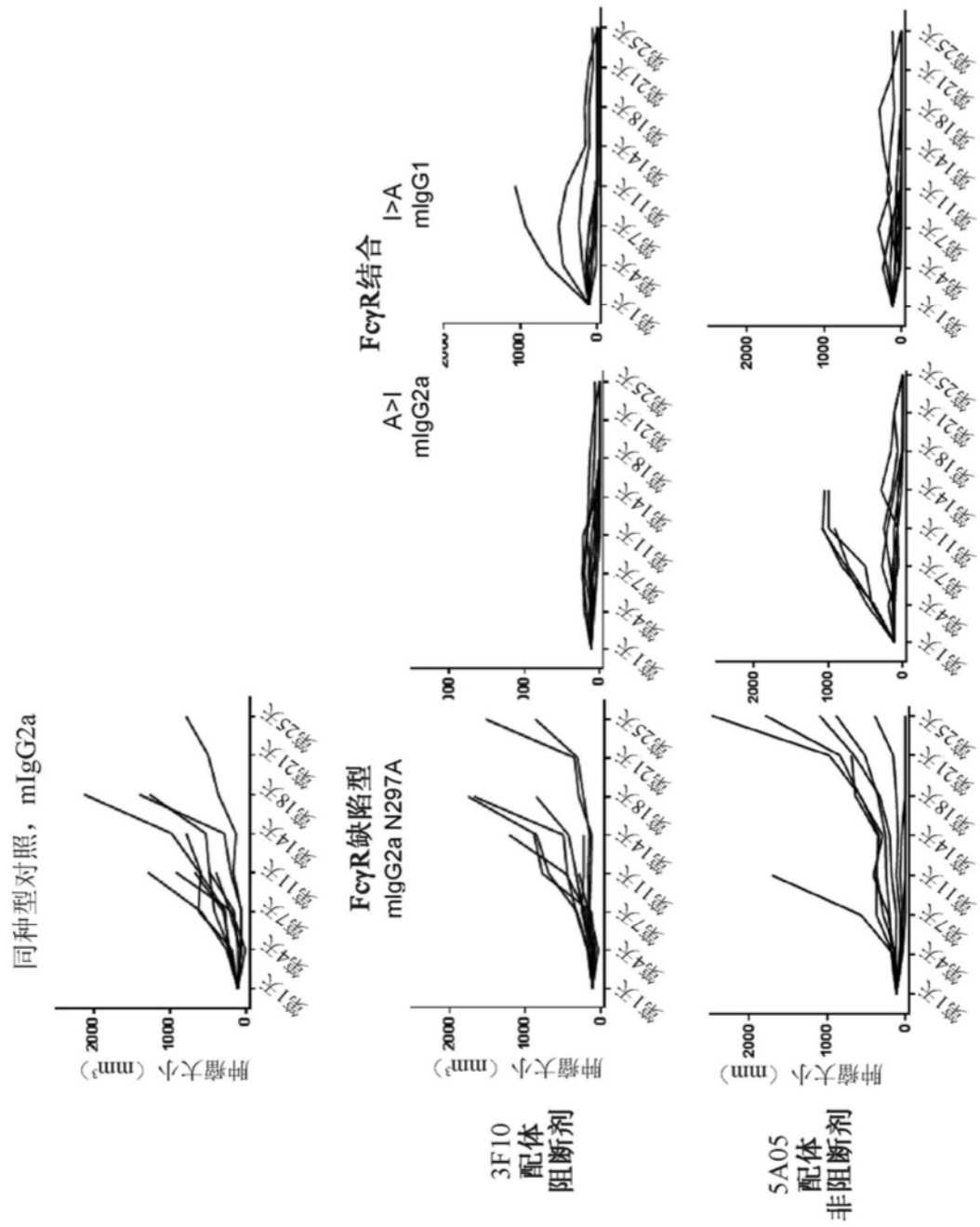
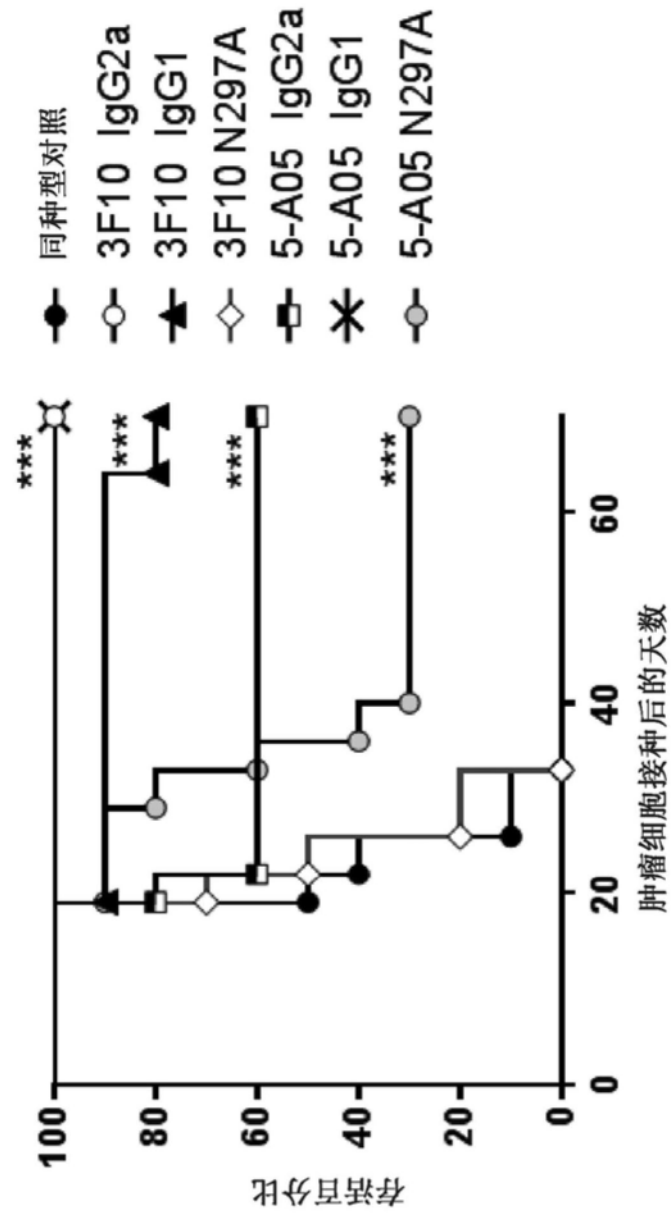


图10



B

图10续

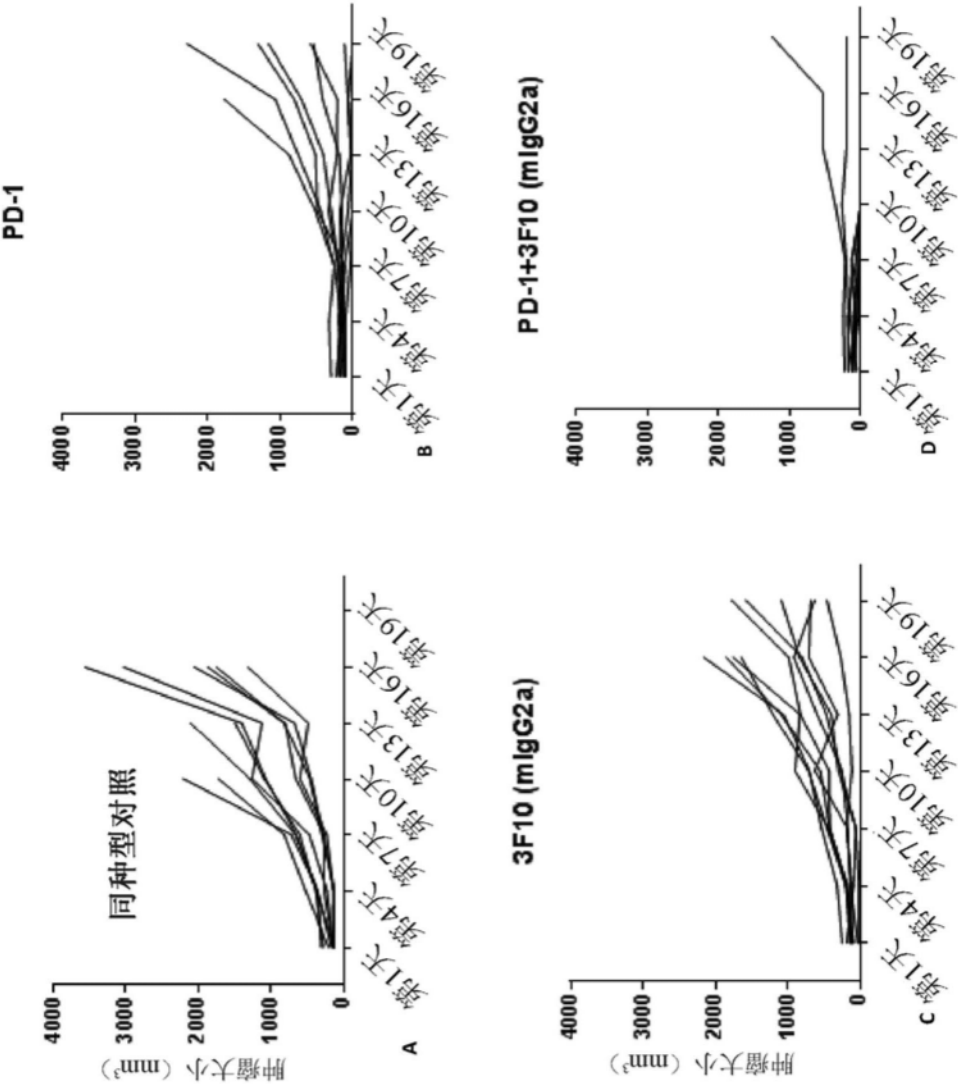


图11

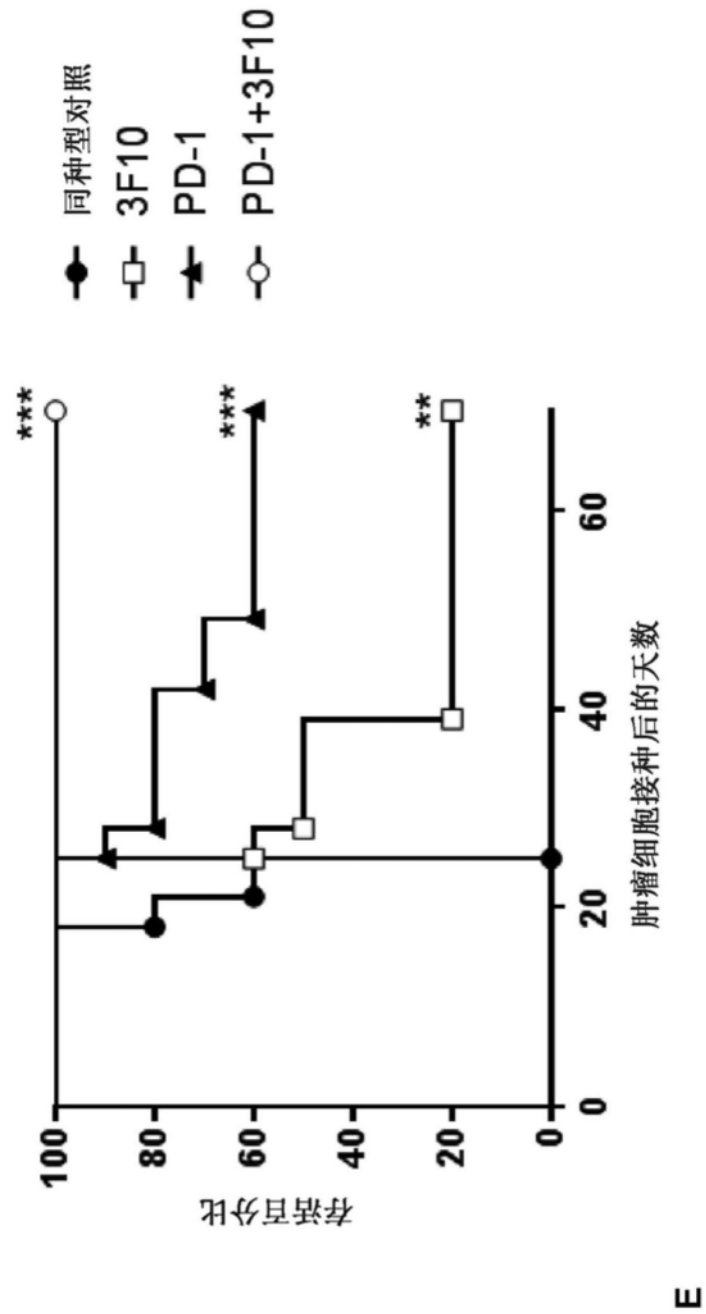


图11续

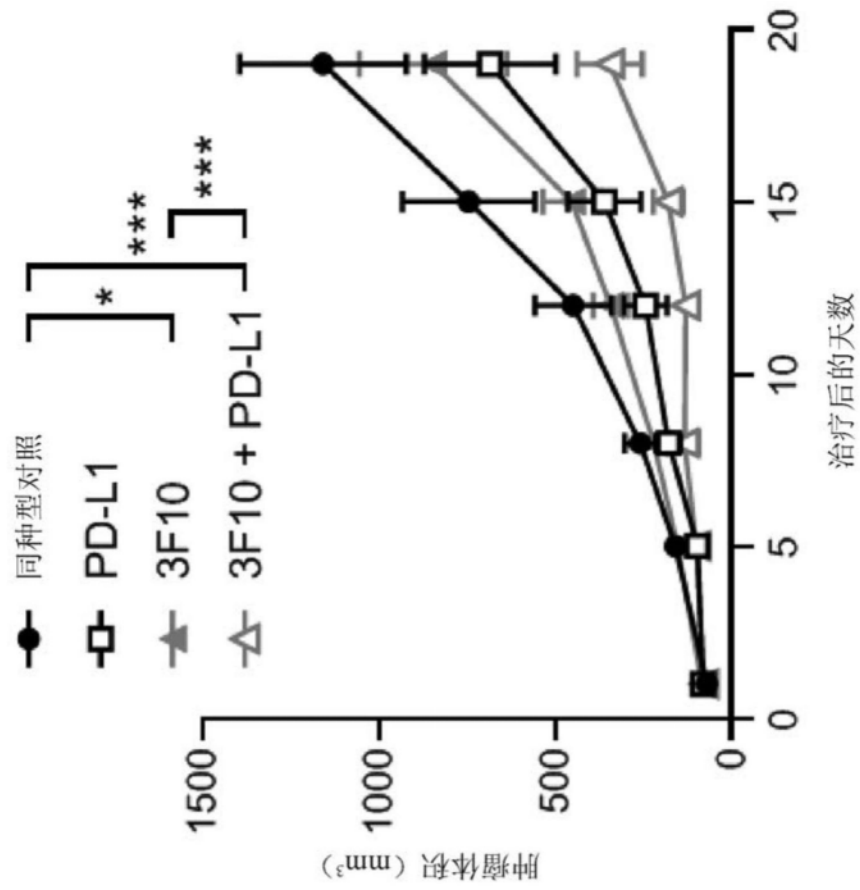


图12

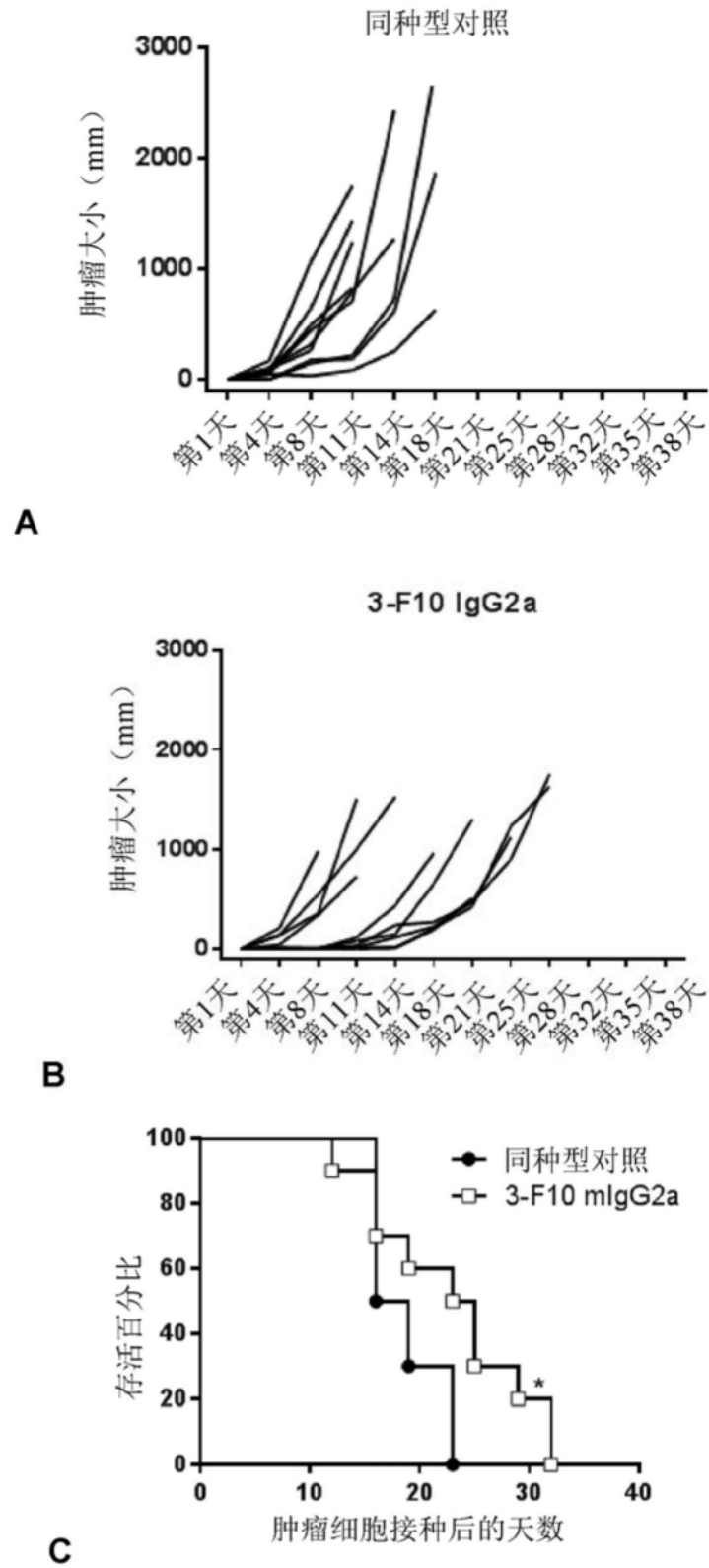


图13

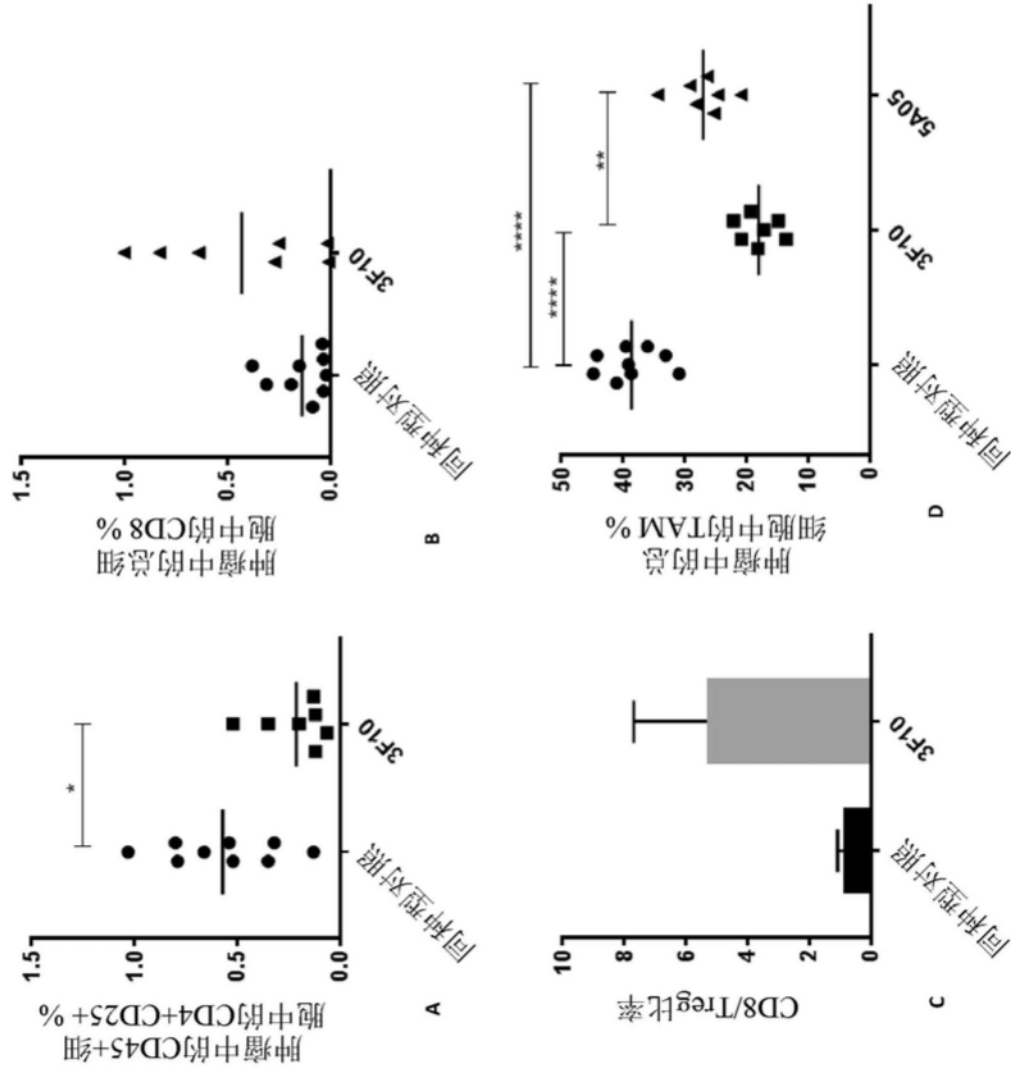


图14

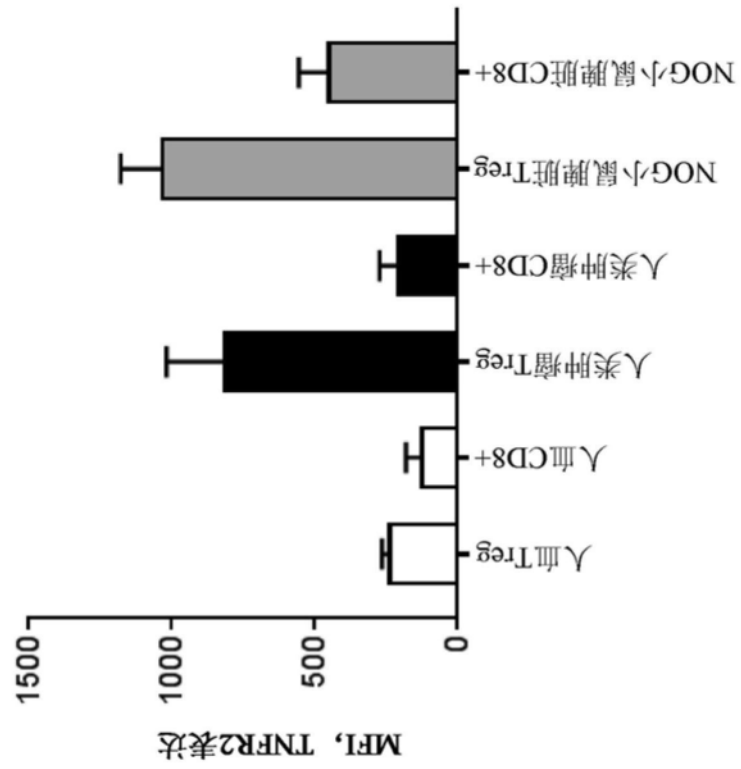


图15

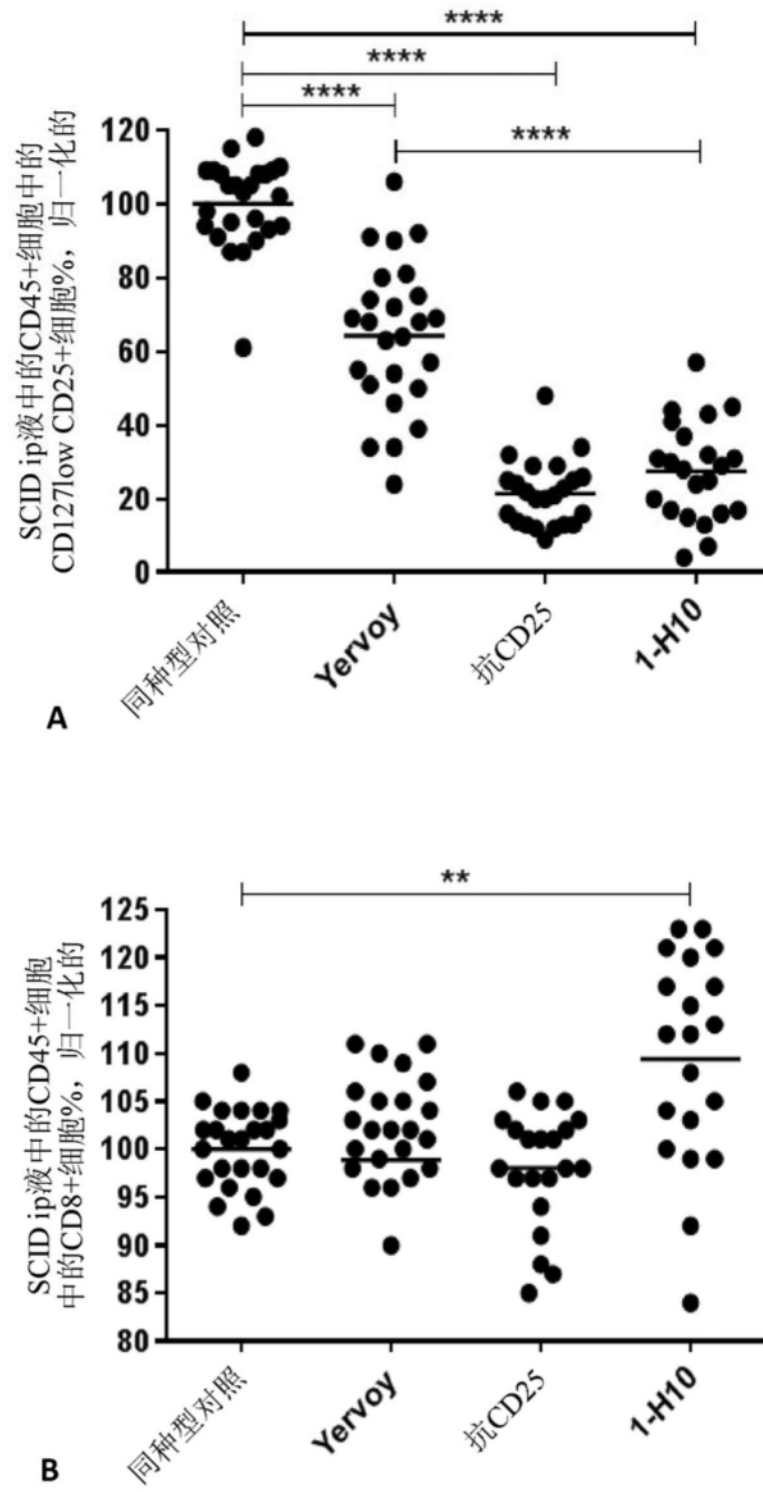


图16

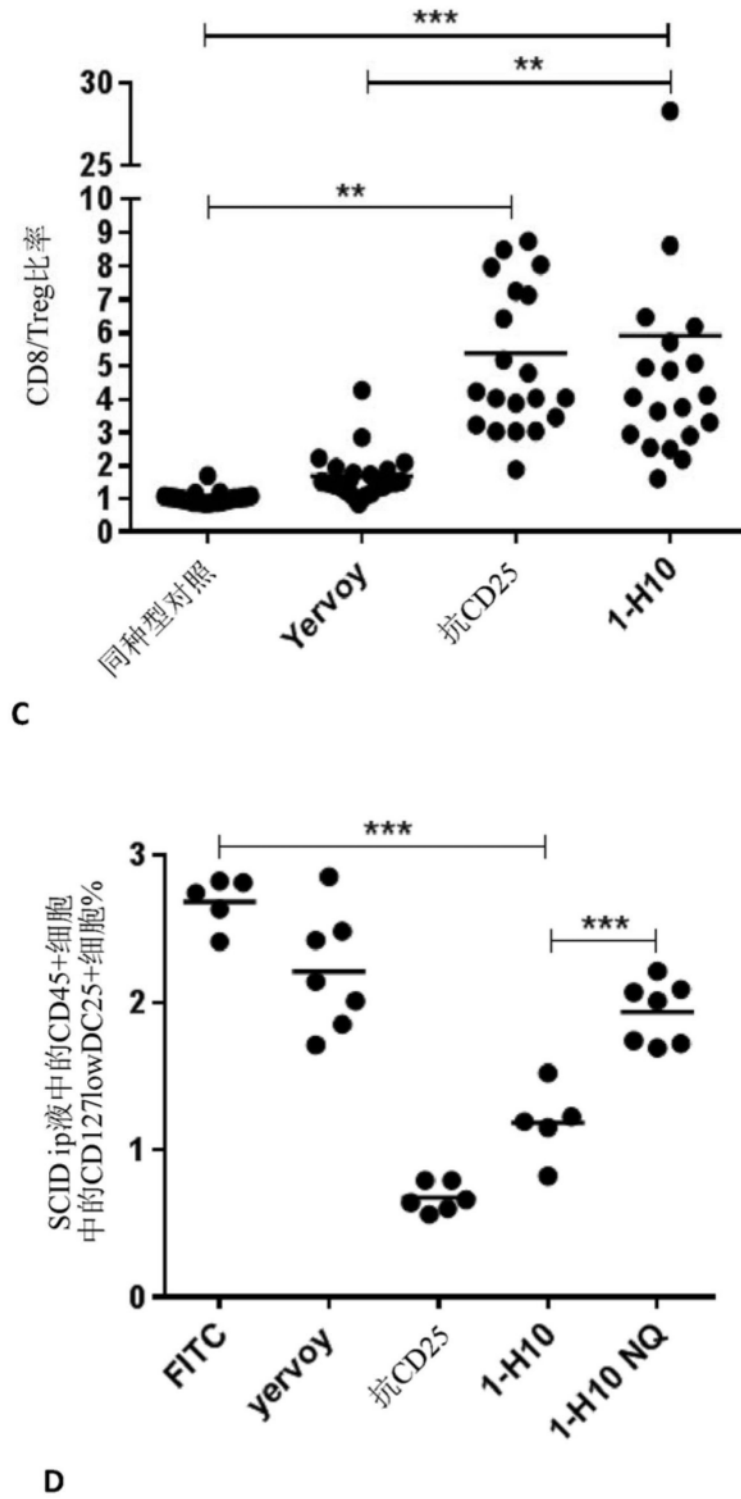


图16续

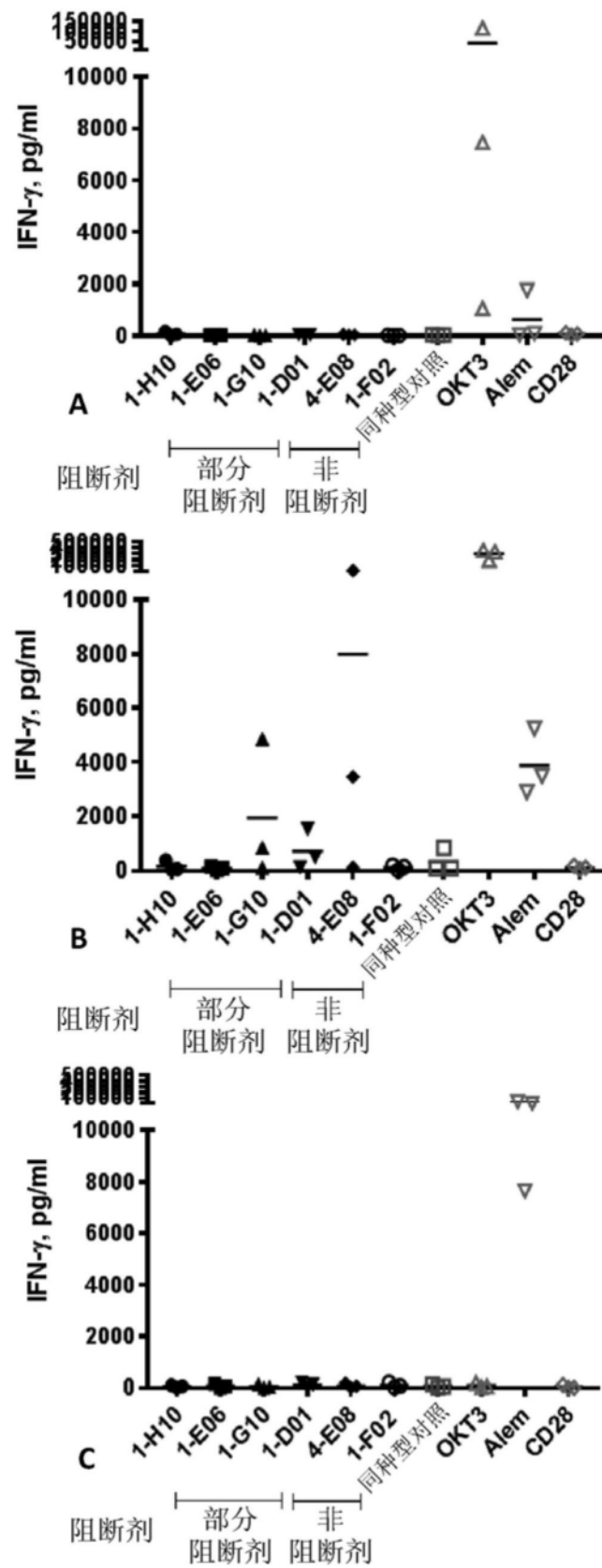


图17

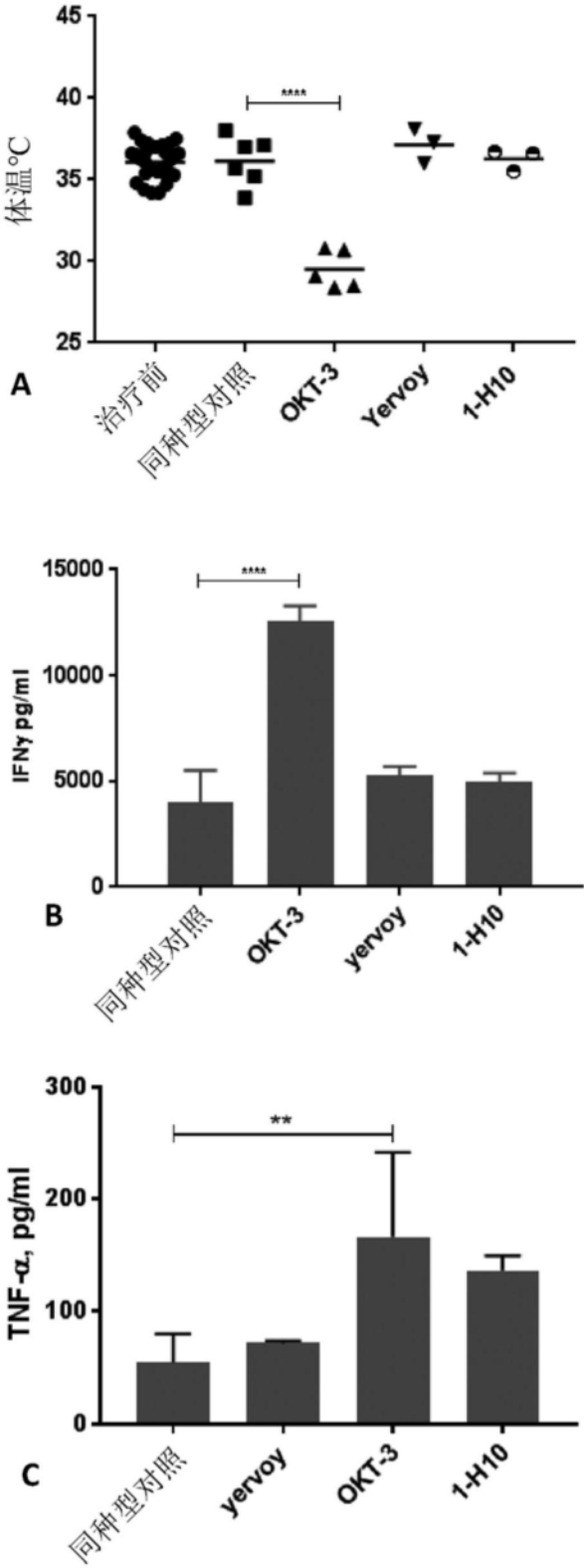


图18

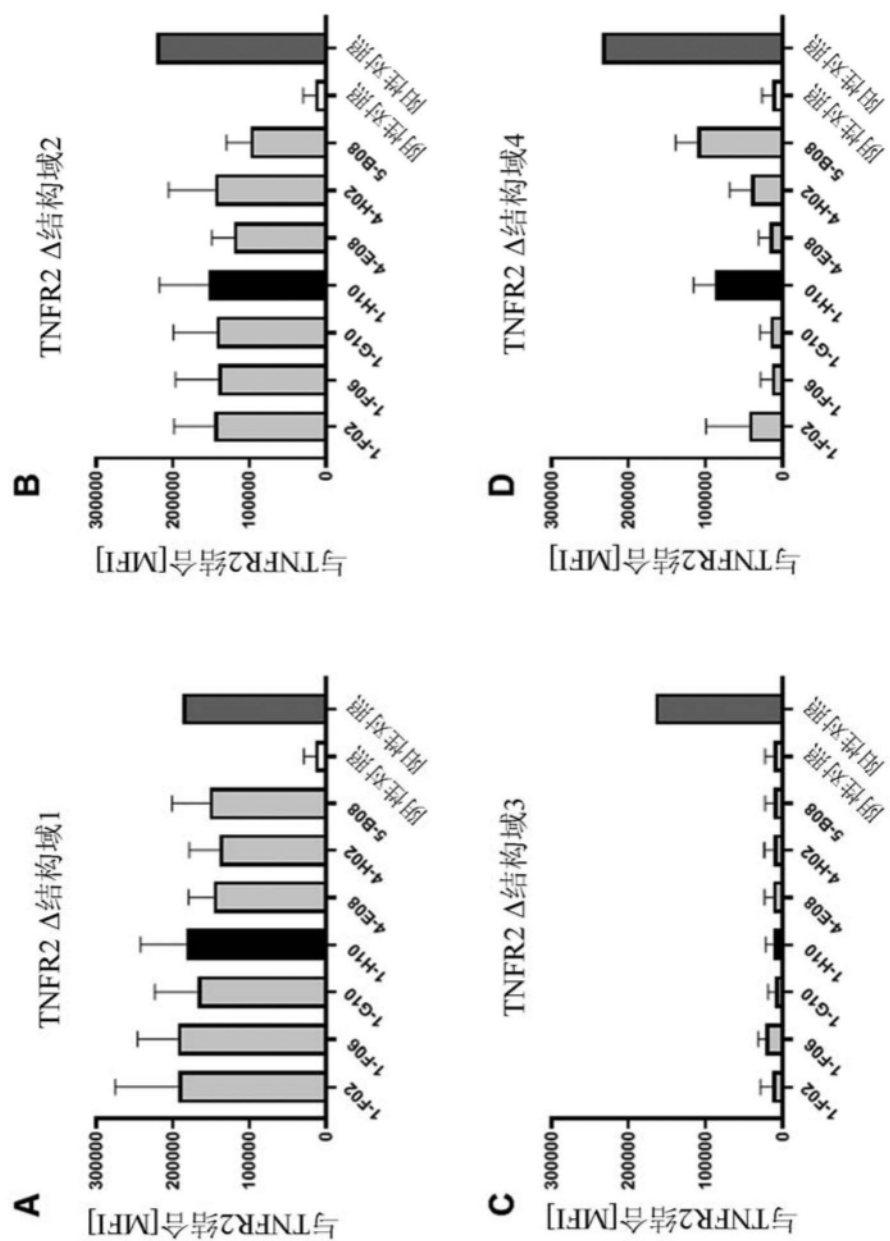


图19

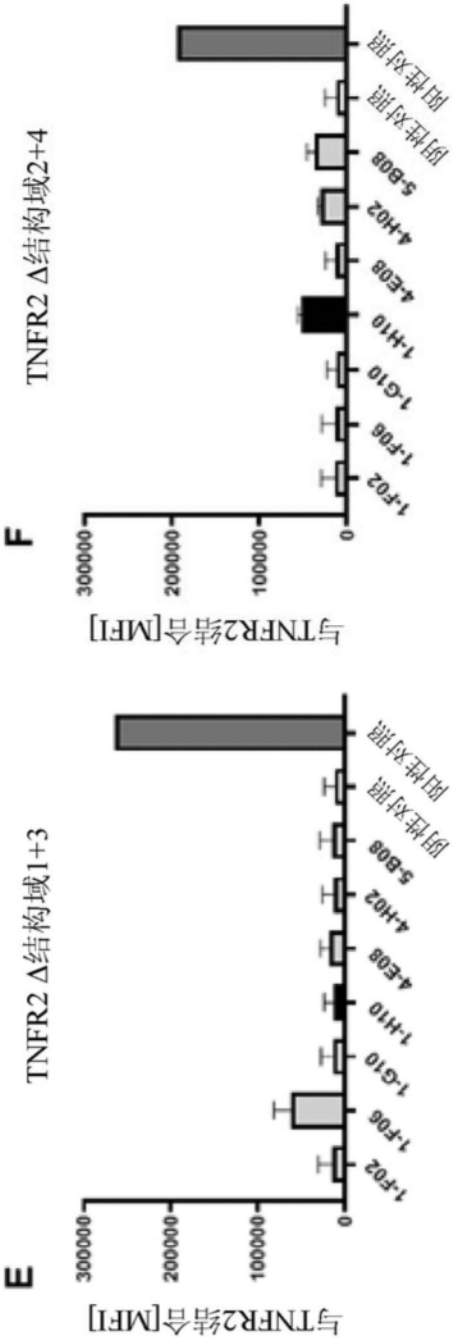


图19续

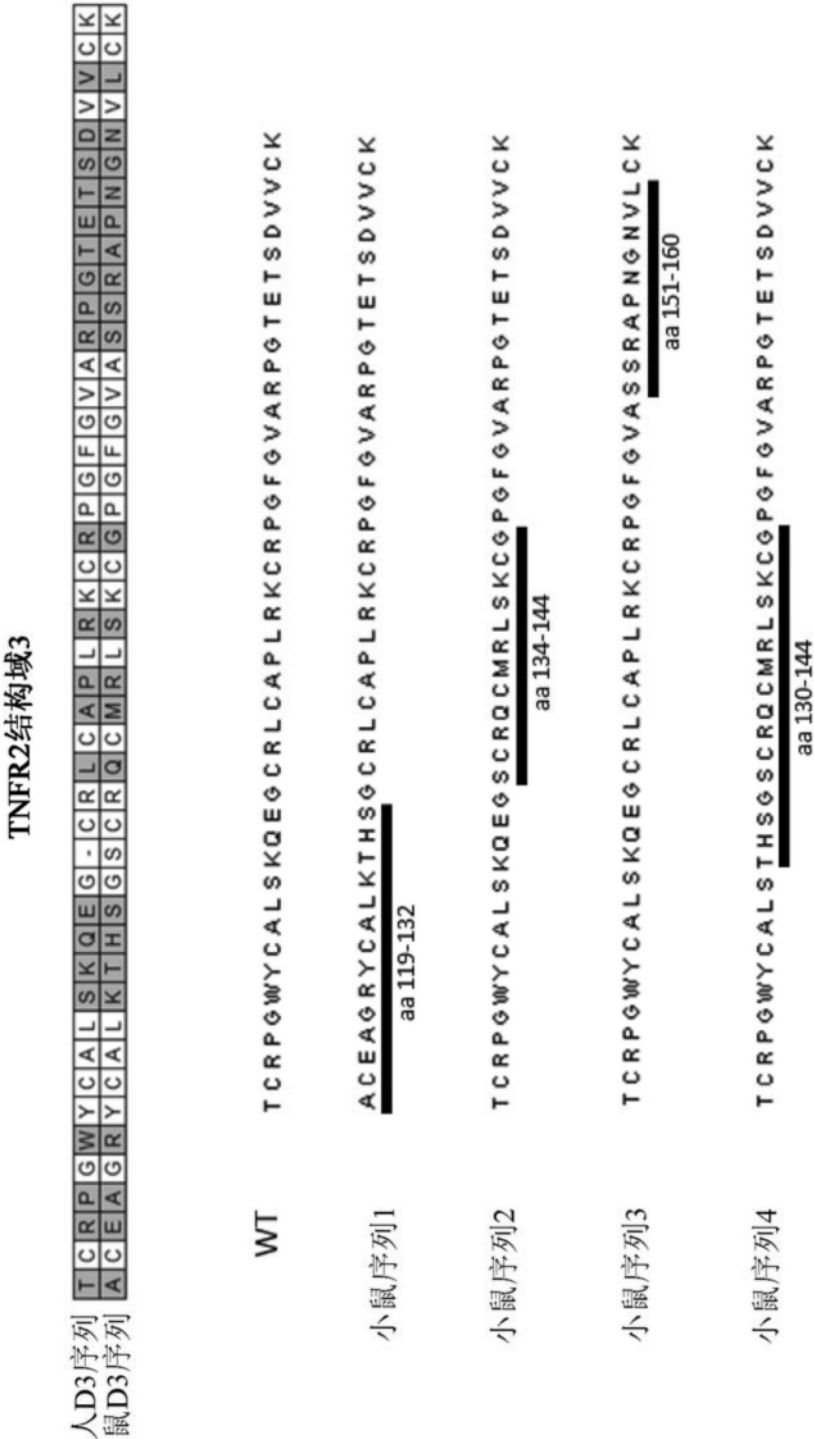


图20

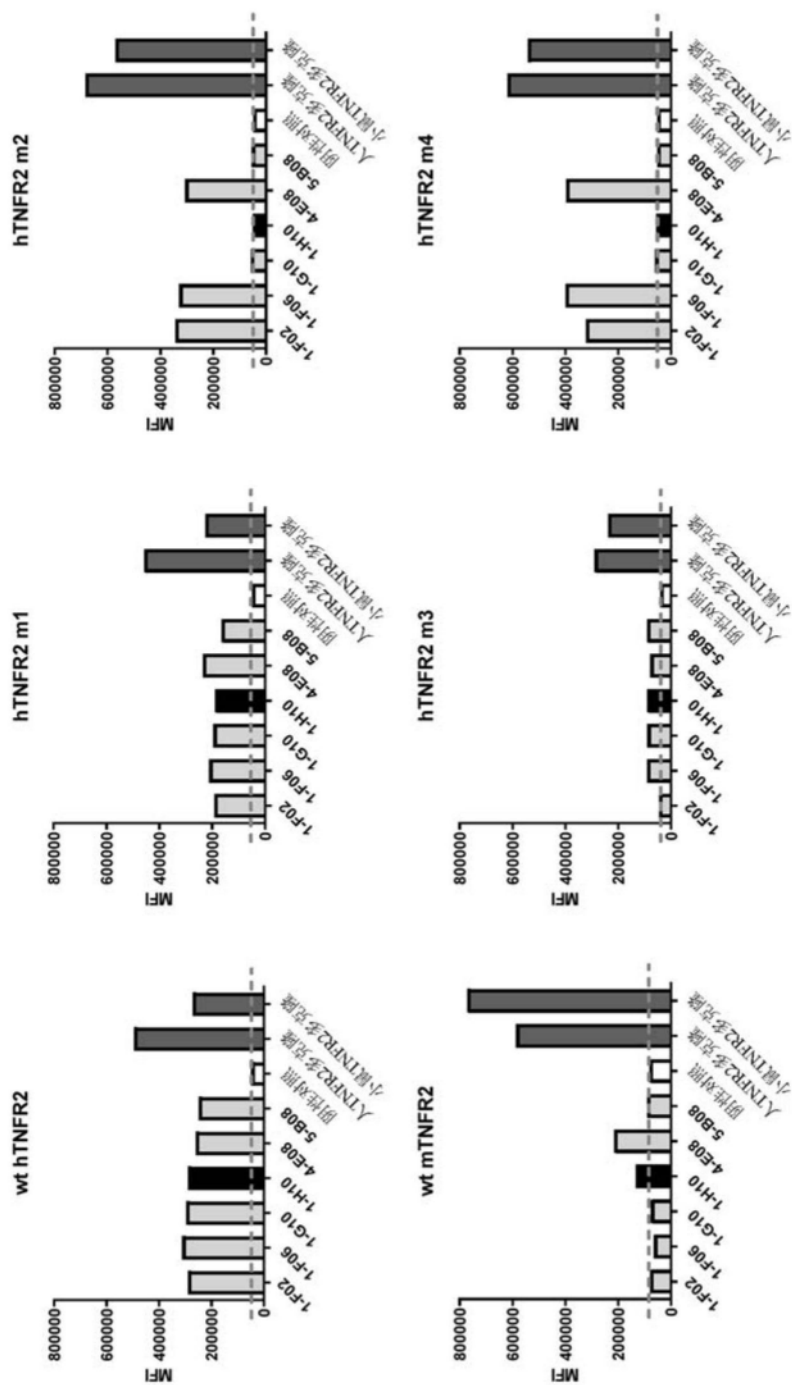


图21