



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104703999 A

(43) 申请公布日 2015. 06. 10

(21) 申请号 201380038216. 0

A61K 38/17(2006. 01)

(22) 申请日 2013. 07. 18

A61K 39/395(2006. 01)

(30) 优先权数据

C07K 19/00(2006. 01)

61/673639 2012. 07. 19 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2015. 01. 16

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2013/051097 2013. 07. 18

(87) PCT国际申请的公布数据

W02014/015148 EN 2014. 01. 23

(71) 申请人 安姆根有限公司

地址 美国加利福尼亚州

(72) 发明人 H. A. 阿内特 S. S. 埃斯科巴

R. M. 斯万森 J. L. 维尼

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司
72001

代理人 孔青 彭昶

(51) Int. Cl.

C07K 14/705(2006. 01)

权利要求书7页 说明书41页

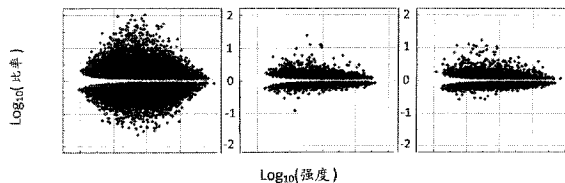
序列表25页 附图6页

(54) 发明名称

人 BTNL3 蛋白、核酸和抗体及其用途

(57) 摘要

本发明提供新型 BTNL3 蛋白,包括多聚体、片段、融合蛋白和变体。此外,本发明提供可结合 BTNL3 蛋白的抗体和编码 BTNL3 蛋白的核酸。本发明还提供使用这些核酸制备 BTNL3 蛋白的方法。本发明描述了 BTNL3 蛋白及其激动剂或拮抗剂的用途。



1. 一种分离的多聚 BTNL3 蛋白,其包含
 - (a) 包含与 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 至少 90% 相同的氨基酸序列的多肽,以及
 - (b) 包含与 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 至少 90% 相同的氨基酸序列的第二多肽,其中 (a) 和 (b) 的所述多肽的所述氨基酸序列与 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 的比对窗的长度为至少 80 个氨基酸,
其中所述 BTNL3 蛋白为至少二聚体,
其中所述 BTNL3 蛋白已由非人宿主细胞产生,并且
其中所述多聚 BTNL3 蛋白可抑制由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖。
2. 一种分离的多聚 BTNL3 蛋白,其包含
 - (a) 包含与 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 至少 90% 相同的氨基酸序列的多肽,以及
 - (b) 包含与 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 至少 90% 相同的氨基酸序列的第二多肽,其中 (a) 和 (b) 的所述多肽的所述氨基酸序列与 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 的比对窗的长度为至少 80 个氨基酸,
其中所述 BTNL3 蛋白具有的分子量为 (a) 的多肽的分子量的至少约两倍大,
其中所述 BTNL3 蛋白已由非人宿主细胞产生,并且
其中所述多聚 BTNL3 蛋白可抑制由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的多聚 BTNL3 蛋白,其中 (a) 和 (b) 的所述多肽的所述氨基酸序列与 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 至少 95% 相同。
4. 如权利要求 3 所述的多聚 BTNL3 蛋白,其中 (a) 和 (b) 的所述多肽的所述氨基酸序列与 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 至少 97% 相同。
5. 如权利要求 4 所述的多聚 BTNL3 蛋白,其中 (a) 和 (b) 的所述多肽包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 的所述氨基酸序列。
6. 如权利要求 1 至 5 中任一项所述的多聚 BTNL3 蛋白,其中 (a) 和 (b) 的所述氨基酸序列不包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸 237 至 259。
7. 如权利要求 1 至 6 中任一项所述的多聚 BTNL3 蛋白,其中 (a) 和 (b) 的所述多肽各自包含额外于与 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 至少 90% 相同的所述氨基酸序列的氨基酸序列。
8. 如权利要求 7 所述的多聚 BTNL3 蛋白,其中 (a) 和 (b) 的所述额外氨基酸序列为 Fc 多肽的氨基酸序列。
9. 如权利要求 8 所述的多聚 BTNL3 蛋白,其中
 - (i) 所述 Fc 多肽包含天然人 Fc 多肽的氨基酸序列或
 - (ii) 所述 Fc 多肽包含相对于天然人 Fc 区的所述氨基酸序列具有至多 15 个单一氨基酸的插入、缺失或取代的氨基酸序列。
10. 如权利要求 9 所述的多聚 BTNL3 蛋白,其中 (ii) 的所述 Fc 多肽的所述氨基酸序列相对于所述天然人 Fc 区的所述氨基酸序列具有至多 10 个单一氨基酸的插入、缺失或取代。
11. 如权利要求 10 所述的多聚 BTNL3 蛋白,其中 (ii) 的所述 Fc 多肽相对于所述天然人 Fc 区的所述氨基酸序列具有至多 5 个单一氨基酸的插入、缺失或取代。
12. 如权利要求 8 至 11 中任一项所述的多聚 BTNL3 蛋白,其中所述多聚 BTNL3 蛋白可

结合人新生儿 Fc 受体 (FcRn)。

13. 如权利要求 12 所述的多聚 BTNL3 蛋白,其包含所述天然人 Fc 区的所述氨基酸序列。

14. 如权利要求 9 至 13 中任一项所述的多聚 BTNL3 蛋白,其中所述天然人 Fc 区具有 IgG1 同种型。

15. 如权利要求 9 至 13 中任一项所述的多聚 BTNL3 蛋白,其中所述天然人 Fc 区具有 IgG2 同种型。

16. 如权利要求 9 至 13 中任一项所述的多聚 BTNL3 蛋白,其中所述天然人 Fc 区具有 IgG4 同种型。

17. 如权利要求 1 至 16 中任一项所述的多聚 BTNL3 蛋白,其为同三聚体或更高级同多聚体。

18. 如权利要求 17 所述的多聚 BTNL3 蛋白,其为同四聚体或更高级同多聚体。

19. 如权利要求 1 至 16 中任一项所述的多聚 BTNL3 蛋白,其为异多聚体。

20. 如权利要求 1 至 19 中任一项所述的多聚 BTNL3 蛋白,其中所述多聚 BTNL3 蛋白具有的分子量为:

约 (a) 或 (b) 的所述多肽的所述分子量的 4 倍大;

约 (a) 的所述多肽的两倍所述分子量加 (b) 的所述多肽的两倍所述分子量的总和;

约 (a) 的所述多肽的三倍所述分子量加 (b) 的所述多肽的所述分子量的总和;或

约 (a) 的所述多肽的所述分子量或 2 加 (b) 的所述多肽的三倍所述分子量的总和。

21. 一种 BTNL3 融合蛋白,其包含

(a) 包含与 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 至少 90% 相同的氨基酸序列的第一多肽,其中所述 BTNL3 融合蛋白的所述氨基酸序列与 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 的比对窗的长度为至少 80 个氨基酸,以及

(b) 氨基酸序列不同于所述第一多肽的所述氨基酸序列,并且不包含来自 SEQ ID NO:2 的氨基酸 237 至 466 的序列的长度为至少 20 个氨基酸的片段的第二多肽,

其中所述 BTNL3 融合蛋白可抑制由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖。

22. 如权利要求 21 所述的 BTNL3 融合蛋白,其中所述第二多肽为 IgG Fc 多肽。

23. 如权利要求 22 所述的 BTNL3 融合蛋白,其中所述 Fc 多肽具有相对于天然人 Fc 区的氨基酸序列含有至多 15 个单一氨基酸的插入、缺失或取代的氨基酸序列。

24. 如权利要求 23 所述的 BTNL3 融合蛋白,其中所述 Fc 多肽具有相对于所述天然人 Fc 区的所述氨基酸序列含有至多 10 个单一氨基酸的插入、缺失或取代的氨基酸序列。

25. 如权利要求 24 所述的 BTNL3 融合蛋白,其中所述 Fc 多肽具有相对于所述天然人 Fc 区的所述氨基酸序列含有至多 5 个单一氨基酸的插入、缺失或取代的氨基酸序列。

26. 如权利要求 23 至 25 中任一项所述的 BTNL3 融合蛋白,其中所述 BTNL3 融合蛋白可结合 FcRn。

27. 如权利要求 26 所述的 BTNL3 融合蛋白,其包含所述天然人 Fc 区的所述氨基酸序列。

28. 如权利要求 23 至 27 中任一项所述的 BTNL3 融合蛋白,其中所述天然人 Fc 区具有 IgG1 同种型。

29. 如权利要求 23 至 27 中任一项所述的 BTNL3 融合蛋白,其中所述天然人 Fc 区具有 IgG2 同种型。

30. 如权利要求 23 至 27 中任一项所述的 BTNL3 融合蛋白,其中所述天然人 Fc 区具有 IgG4 同种型。

31. 如权利要求 21 至 30 中任一项所述的 BTNL3 融合蛋白,其中所述第一多肽的所述氨基酸序列与 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 至少 95% 相同。

32. 如权利要求 31 所述的 BTNL3 融合蛋白,其中所述第一多肽的所述氨基酸序列包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236。

33. 如权利要求 21 至 32 中任一项所述的 BTNL3 融合蛋白,其包含大致上类似于 SEQ ID NO: 7 的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列相对于 SEQ ID NO:7 包含至多 20 个单一氨基酸的插入、缺失或取代。

34. 如权利要求 33 所述的 BTNL3 融合蛋白,其中所述氨基酸序列相对于 SEQ ID NO:7 含有至多 15 个单一氨基酸的插入、缺失或取代。

35. 如权利要求 34 所述的 BTNL3 融合蛋白,其中所述氨基酸序列相对于 SEQ ID NO:7 含有至多 10 个单一氨基酸的插入、缺失或取代。

36. 如权利要求 35 所述的 BTNL3 融合蛋白,其中所述氨基酸序列相对于 SEQ ID NO:7 含有至多 5 个单一氨基酸的插入、缺失或取代。

37. 如权利要求 36 所述的 BTNL3 融合蛋白,其中所述氨基酸序列包含 SEQ ID NO:7 的序列。

38. 如权利要求 21 至 37 中任一项所述的 BTNL3 融合蛋白,其中在非还原性条件下,所述 BTNL3 融合蛋白的分子量为所述 BTNL3 融合蛋白的单体物质的分子量的至少约四倍。

39. 如权利要求 38 所述的 BTNL3 融合蛋白,其中在非还原性条件下,所述 BTNL3 融合蛋白的所述分子量为所述 BTNL3 融合蛋白的单体物质的所述分子量的约四倍。

40. 一种分离的多聚 BTNL3 蛋白,其包含

(a) 具有与 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 至少 90% 相同的氨基酸序列的多肽,以及

(b) 具有与 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 至少 90% 相同的氨基酸序列的第二多肽,

其中 (a) 和 (b) 的所述多肽的所述氨基酸序列与 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 的比对窗的长度为至少 80 个氨基酸,

其中所述多聚 BTNL3 蛋白为至少二聚体,

其中所述多聚 BTNL3 蛋白已由非人宿主细胞产生,并且

其中所述多聚 BTNL3 蛋白可抑制由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖。

41. 一种分离的多聚 BTNL3 蛋白,其包含

(a) 具有与 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 至少 90% 相同的氨基酸序列的多肽,以及

(b) 具有与 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 至少 90% 相同的氨基酸序列的第二多肽,

其中 (a) 和 (b) 的所述多肽的所述氨基酸序列与 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 的比对窗的长度为至少 80 个氨基酸,

其中所述多聚 BTNL3 蛋白具有的分子量是 (a) 的多肽的分子量的大于约三倍大,

其中所述多聚 BTNL3 蛋白已由非人宿主细胞产生,并且

其中所述多聚 BTNL3 蛋白可抑制由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖。

42. 如权利要求 40 或 41 所述的多聚 BTNL3 蛋白,其中 (a) 和 (b) 的所述多肽的所述氨基酸序列相对于 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 含有至多 10 个单一氨基酸的插入、缺失或取代。

43. 一种由 DNA 编码的 BTNL3 融合蛋白,其中所述 DNA 包含:

(a) 编码多肽的多核苷酸,其中所述多核苷酸

(i) 由 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 52 至 708 的核苷酸序列或 SEQ ID NO:8 的核苷酸 52 至 498 的核苷酸序列组成;或

(ii) 在严格条件下与 (i) 的所述多核苷酸杂交;以及

(b) 不与由 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO:8 的序列组成的多核苷酸杂交,并且编码与由 (a) 的所述多核苷酸编码的所述多肽同框的多肽的另一个多核苷酸;

其中所述融合蛋白可抑制由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖。

44. 如权利要求 1 至 43 中任一项所述的多聚 BTNL3 蛋白或 BTNL3 融合蛋白,其包含接头序列。

45. 如权利要求 44 所述的多聚 BTNL3 蛋白或 BTNL3 融合蛋白,其中所述蛋白质的所述分子量为所述蛋白质的单体物质的所述分子量的约四倍。

46. 一种分离的变异 BTNL3 蛋白,其包含含有与 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 至少 90% 相同的氨基酸序列的多肽,

其中所述氨基酸序列与 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 的比对窗的长度为至少 80 个氨基酸,

其中所述变异 BTNL3 蛋白不包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 的氨基酸序列,并且

其中所述变异 BTNL3 蛋白可拮抗包含氨基酸序列 SEQ IN NO: 7 的 BTNL3 蛋白对由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖的抑制作用。

47. 如权利要求 46 所述的变异 BTNL3 蛋白,其中所述多肽包含与 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 至少 95% 相同的氨基酸序列。

48. 一种编码如权利要求 1 至 47 中任一项所述的多聚 BTNL3 蛋白、BTNL3 融合蛋白或变异 BTNL3 蛋白的分离的 DNA,其中所述 DNA 不包括外显子序列。

49. 一种编码包含 BTNL3 蛋白和另一种多肽的融合蛋白的分离的 DNA,其中所述 DNA 包含:

(a) 编码多肽的 DNA,其中所述 DNA

(i) 由 SEQ ID NO: 1 的核苷酸 52 至 708 的核苷酸序列或 SEQ ID NO:8 的核苷酸 52 至 498 的核苷酸序列组成;或

(ii) 在严格条件下与 (i) 的所述 DNA 杂交;以及

(b) 不与由 SEQ ID NO: 1 或 SEQ ID NO: 8 的序列组成的多核苷酸杂交,并且编码与由 (a) 的所述多核苷酸编码的所述多肽同框的多肽的另一个 DNA;

其中所述融合蛋白可抑制由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖。

50. 一种载体,其包含如权利要求 48 或 49 所述的 DNA。

51. 一种非人宿主细胞,其含有如权利要求 48 或 49 所述的 DNA 或如权利要求 50 所述的载体。

52. 一种制备 BTNL3 蛋白的方法,其包括
在适于表达所述核酸的条件下在培养基中培养如权利要求 51 所述的宿主细胞以及
从所述细胞或所述培养基回收表达的蛋白质。
53. 一种治疗患有自身免疫性或炎症性疾病的患者的方法,其包括向所述患者施用治
疗有效剂量的 BTNL3 蛋白,所述 BTNL3 蛋白包含
- (a) SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 的氨基酸序列或 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 的
氨基酸序列,
- (b) 与 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 至少 90% 相同
的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列与 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO:9 的氨
基酸 18-166 的比对窗的长度为至少 80 个氨基酸,或
- (c) 相对于 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 的序列具
有至多 20 个单一氨基酸的插入、缺失或取代的氨基酸序列,
其中所述 BTNL3 蛋白可抑制由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖。
54. 如权利要求 53 所述的方法,其中所述自身免疫性或炎症性疾病选自以下组成
的组:全身性红斑狼疮、类风湿性关节炎、炎症性肠病、移植相关病状、克罗恩氏病、溃疡性
结肠炎、牛皮癣、类肉瘤病、哮喘或纤维化疾病。
55. 如权利要求 54 所述的方法,其中所述自身免疫性或炎症性疾病为克罗恩氏病。
56. 如权利要求 54 所述的方法,其中所述自身免疫性或炎症性疾病为溃疡性结肠炎。
57. 如权利要求 54 所述的方法,其中所述自身免疫性或炎症性疾病为纤维化疾病。
58. 一种用于抑制 T 细胞增殖的方法,其包括向所述 T 细胞中添加 BTNL3 蛋白,所述
BTNL3 蛋白包含
- (a) SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 的氨基酸序列,
- (b) 与 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 至少 90% 相同
的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列与 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO:9 的氨
基酸 18-166 的比对窗的长度为至少 80 个氨基酸,或
- (c) 相对于 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 的序列具
有至多 20 个单一氨基酸的插入、缺失或取代的氨基酸序列,
其中所述 BTNL3 蛋白可抑制由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖。
59. 如权利要求 58 所述的方法,其中所述抑制在体外或离体发生。
60. 如权利要求 58 所述的方法,其中所述抑制在体内发生。
61. 一种治疗癌症患者的方法,其包括向所述患者施用治疗有效量的结合 BTNL3 蛋白
的抗体,所述 BTNL3 蛋白由 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 和 / 或 SEQ ID NO:9 的氨基酸
18-166 组成。
62. 如权利要求 61 所述的方法,其中所述抗体为拮抗性抗体。
63. 如权利要求 61 或 62 所述的方法,其中所述癌症为腺癌。
64. 一种治疗癌症患者的方法,其包括向所述患者施用治疗有效量的包含多肽的变异
BTNL3 蛋白,所述多肽包含与 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166
至少 90% 相同的氨基酸序列,
其中所述氨基酸序列与 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166

的比对窗的长度为至少 80 个氨基酸，

其中所述蛋白质不包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 的氨基酸序列，并且

其中所述蛋白质可拮抗包含氨基酸序列 SEQ IN NO: 7 的 BTNL3 蛋白对由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖的抑制作用。

65. 如权利要求 64 所述的方法，其中所述癌症为腺癌。

66. 一种治疗被病原体感染的患者的方法，其包括向所述患者施用治疗有效量的结合 BTNL3 蛋白的抗体，所述 BTNL3 蛋白由 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 和 / 或 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 组成。

67. 如权利要求 66 所述的方法，其中所述抗体为拮抗性抗体。

68. 一种治疗被病原体感染的患者的方法，其包括向所述患者施用治疗有效量的包含多肽的变异 BTNL3 蛋白，所述多肽包含与 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 至少 90% 相同的氨基酸序列，

其中所述氨基酸序列与 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 的比对窗的长度为至少 80 个氨基酸，

其中所述变异 BTNL3 蛋白不包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 的氨基酸序列，并且

其中所述变异 BTNL3 蛋白可拮抗包含氨基酸序列 SEQ IN NO: 7 的 BTNL3 蛋白对由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖的抑制作用。

69. 一种用于对患者接种针对抗原的疫苗的方法，其包括向所述患者施用所述抗原以及

(a) 结合由 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 和 / 或 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 组成的蛋白质的拮抗性抗体或

(b) 包含含有与 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO: 9 的氨基酸 18-166 至少 90% 相同的氨基酸序列的多肽的变异 BTNL3 蛋白，其中所述氨基酸序列与 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 的比对窗的长度为至少 80 个氨基酸，其中所述变异 BTNL3 蛋白不包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 的氨基酸序列，并且其中所述变异 BTNL3 蛋白可拮抗包含氨基酸序列 SEQ IN NO: 7 的 BTNL3 蛋白对由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖的抑制作用。

70. 如权利要求 69 所述的方法，其中所述抗原为癌症抗原。

71. 如权利要求 69 所述的方法，其中所述抗原可引发针对病原体的免疫反应。

72. 如权利要求 69 至 71 中任一项所述的方法，其中所述抗原可在所述拮抗性抗体之前、与其同时或之后施用。

73. 一种用于治疗患有自身免疫性或炎症性病状的患者方法，其包括以下步骤：

(a) 从所述患者移除 T 细胞；

(b) 用包含抗 CD3 抗体和 BTNL3 蛋白的蛋白质组合刺激所述 T 细胞，其中所述 BTNL3 蛋白包含

(i) SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 的氨基酸序列，

(ii) 与 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 至少 90% 相

同的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列与 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 的比对窗的长度为至少 80 个氨基酸,或

(iii) 相对于 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 的序列具有至多 20 个单一氨基酸的插入、缺失或取代的氨基酸序列,

(c) 收获所刺激的 T 细胞;以及

(d) 使所收获的 T 细胞返回至所述患者中,

其中所述 BTNL3 蛋白可抑制由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖。

74. 如权利要求 73 所述的方法,其中所述 BTNL3 蛋白为 (b) (iii) 的所述 BTNL3 蛋白,其中所述氨基酸序列相对于 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 的所述序列具有至多 10 个单一氨基酸的插入、缺失或取代。

75. 如权利要求 74 所述的方法,其中所述氨基酸序列相对于 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 的所述序列具有至多 5 个单一氨基酸的插入、缺失或取代。

76. 如权利要求 73 所述的方法,其中所述 BTNL3 蛋白为 (b) (i) 的所述 BTNL3 蛋白。

77. 如权利要求 73 至 76 中任一项所述的方法,其中所述自身免疫性或炎症性病状选自以下组成的组:全身性红斑狼疮、类风湿性关节炎、炎症性肠病、克罗恩氏病、溃疡性结肠炎、牛皮癣、类肉瘤病、哮喘、移植相关病状、1 型或 2 型糖尿病,或纤维化疾病。

人 BTNL3 蛋白、核酸和抗体及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求 2012 年 7 月 19 日提交的美国临时申请号 61/673,639 的权益,所述申请以引用的方式并入本文。

[0003] 领域

[0004] 本发明涉及一种嗜乳脂蛋白 (butyrophilin) 样蛋白质及其片段、变体和衍生物、编码所述蛋白质的核酸、结合这些蛋白质的抗体以及这些蛋白质的激动剂和拮抗剂。还涵盖含有所述分子的药物组合物以及所述分子或含有它们的组合物的用途。

[0005] 背景

[0006] 在各种治疗环境中,调节免疫或炎症性反应可为有价值的。在各种种类的自身免疫性或炎症性疾病的治疗中,可希望下调免疫或炎症性反应。增强任何免疫反应对例如扩大对特定抗原的反应而言可为有价值的,所述抗原如疫苗中含有的抗原和 / 或优先在癌细胞、介导纤维化疾病的细胞或病原体上表达的抗原。因此,能够调节免疫或炎症性反应的分子在多种病理性环境中潜在地具有治疗价值。本发明提供用以诊断和治疗特征在于炎症和 / 或免疫反应不当、不足和 / 或异常的疾病的治疗剂。这些药剂中的一些可刺激免疫反应。其它药剂可抑制炎症和 / 或免疫反应。

[0007] 概述

[0008] 本发明提供 BTNL3 蛋白及其变体、编码它们的核酸以及结合它们的抗体。更具体地说,本文所述的 BTNL3 蛋白是可为分离的蛋白质和 / 或可溶性蛋白质的多聚蛋白和 / 或融合蛋白。BTNL3 蛋白可连接至表面和 / 或在细胞表面上表达。还提供 BTNL3 蛋白的用途以及 BTNL3 的拮抗剂和激动剂,包括抗 BTNL3 抗体的用途。

[0009] 在一个实施方案中,本发明涵盖一种分离的多聚 BTNL3 蛋白,任选地为可溶性蛋白质,或连接至如微珠的表面或在细胞表面上表达的 BTNL3 蛋白,其包含 (a) 氨基酸序列与 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或与 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 至少 90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的多肽以及 (b) 氨基酸序列与 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或与 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 至少 90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的第二多肽,其中 (a) 和 (b) 的多肽的氨基酸序列与 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或与 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 的比对窗的长度为至少 50、60、70、80 或 100 个氨基酸,其中 BTNL3 蛋白为至少二聚体、三聚体或四聚体,其中 BTNL3 蛋白已由非人宿主细胞产生,并且其中多聚 BTNL3 蛋白可抑制由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖。在略微不同的实施方案中,本发明提供分离的多聚 BTNL3 蛋白,任选地为可溶性蛋白质,其包含 (a) 氨基酸序列与 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或与 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 至少 90% 相同的多肽,以及 (b) 氨基酸序列与 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或与 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 至少 90% 相同的第二多肽,其中 (a) 和 (b) 的多肽的氨基酸序列与 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或与 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 的比对窗的长度为至少 50、60、70、80 或 100 个氨基酸,其中 BTNL3 蛋白具有的分子量为 (a) 的单体多肽的分子量的至少约两倍、三倍或四倍大和 / 或为 (a) 的单体多肽的分子量的至少约五倍、六倍、七倍、八倍、九倍、

十倍、十一倍、十二倍、十三倍、十四倍、十五倍或十六倍大,其中 BTNL3 蛋白已由非人宿主细胞产生,并且其中多聚 BTNL3 蛋白可抑制由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖。或者或此外,在这些实施方案的任一个中,(a) 和 (b) 的多肽可包含相对于 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 具有至多 20、15、12、10、8 或 5 个单一氨基酸的插入、缺失或取代的序列。在一些实施方案中,多聚 BTNL3 蛋白可为 (a) 的单体多肽的至多三倍、四倍、五倍、六倍、七倍、八倍、九倍、十倍、十一倍、十二倍、十三倍、十四倍、十五倍或十六倍大。这些实施方案的任一个中的多聚 BTNL3 蛋白也可为至少二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体、十聚体和 / 或更高级多聚体,这也意味着多聚 BTNL3 蛋白可为二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体、十聚体和 / 或更高级多聚体。在一些实施方案中,多聚 BTNL3 蛋白可为至多三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体。多聚 BTNL3 蛋白可包含来自 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18、19、20、21、22 或 23 至 234、235、236、237 或 238 的氨基酸序列或来自 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18、19、20、21、22 或 23 至 164、165、166、167 或 168 的氨基酸序列。在一些实施方案中,(a) 和 (b) 的多肽的氨基酸序列不包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸 237 至 259 或 SEQ ID NO:9 的氨基酸 167 至 189,并且在一些实施方案中,这些氨基酸序列可包含为例如 Fc 多肽的氨基酸序列的另外的氨基酸序列。所述 Fc 多肽可包含 (i) 天然人 Fc 区的氨基酸序列或 (ii) 大致上与天然人 Fc 区的氨基酸序列类似的氨基酸序列,其相对于天然人 Fc 区的氨基酸序列具有至多 15、至多 10 或至多 5 个单一氨基酸的插入、缺失或取代。天然人 Fc 可具有 IgG(包括 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4)、IgA、IgD、IgM 或 IgE 同种型。多聚 BTNL3 蛋白可为同二聚体、同三聚体、同四聚体、同五聚体、同六聚体、同七聚体、同八聚体、同九聚体、同十聚体、更高级同多聚体、异多聚体或物质混合物。多聚 BTNL3 蛋白具有的分子量可为:约 (a) 或 (b) 的多肽的分子量的 4 倍大;约 (a) 的多肽的两倍分子量加 (b) 的多肽的两倍分子量的总和;约 (a) 的多肽的三倍分子量加 (b) 的多肽的分子量的总和;或约 (a) 的多肽的分子量加 (b) 的多肽的三倍分子量的总和。还提供编码所述多聚 BTNL3 蛋白的核酸以及包含这些核酸的载体和含有所述载体和 / 或所述核酸的宿主细胞。

[0010] 在另一个实施方案中,本发明提供一种 BTNL3 融合蛋白,其包含 (a) 含有与 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 或与 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 至少 90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列的第一多肽,其中 BTNL3 融合蛋白的氨基酸序列与 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 或与 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18 至 166 的比对窗的长度为至少 80 个氨基酸,以及 (b) 氨基酸序列不同于第一多肽的氨基酸序列,并且不包含来自 SEQ ID NO:2 的氨基酸 237 至 466、长度为至少 20 个氨基酸的序列的片段的第二多肽,其中 BTNL3 融合蛋白可抑制由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖。融合蛋白可为分离的蛋白质和 / 或可溶性蛋白质。第二多肽可为 Fc 多肽,其中 Fc 多肽具有与天然人 Fc 区的氨基酸序列相同或大致上类似,并且相对于天然人 Fc 区含有至多 5、10、15 或 20 个单一氨基酸的插入、缺失或取代的氨基酸序列。天然人 Fc 区可具有 IgG(包括 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4)、IgA、IgD、IgE 或 IgM 同种型。BTNL3 融合蛋白可包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166。BTNL3 融合蛋白可包含大致上类似于 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列相对于 SEQ ID NO:7 包含至多 5、10、15 或 20 个单一氨基酸的插入、缺失或取代,和 / 或 BTNL3 融合蛋白可包含 SEQ ID NO:7。BTNL3 融合蛋白可为

至少二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体。在一些实施方案中, BTNL3 融合蛋白可为至多二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体。BTNL3 融合蛋白可包含接头。在一些实施方案中, BTNL3 融合蛋白不包含接头。所述 BTNL3 融合蛋白可为多聚体, 其中所述多聚体具有的分子量可为单体 BTNL3 融合蛋白的分子量的至少约四倍、五倍、六倍、七倍、八倍、九倍、十倍、十一倍、十二倍、十三倍、十四倍、十五倍或十六倍大。在另一方面, 一些所述多聚体具有的分子量可为单体 BTNL3 融合蛋白的分子量的至多约四倍、五倍、六倍、七倍、八倍、九倍、十倍、十一倍、十二倍、十三倍、十四倍、十五倍或十六倍大。还提供编码所述 BTNL3 融合蛋白的核酸以及包含这些核酸的载体和含有所述载体和 / 或所述核酸的宿主细胞。

[0011] 在另一个实施方案中, 本发明提供一种 BTNL3 蛋白, 任选地为可溶性蛋白质, 或连接至如微珠的表面或在细胞表面上表达的 BTNL3 蛋白, 其包含 SEQ ID NO :2 的自 SEQ ID NO :2、6 或 9 的约位置 25 延伸至 131 的片段的氨基酸序列, 或其相对于 SEQ ID NO :2、6 或 9 的氨基酸 25-131 包含至多 5 或 10 个单一氨基酸的插入、缺失或取代的变体, 其中 BTNL3 蛋白也不包含 SEQ ID NO :2 的自 SEQ ID NO :2 的约位置 132 延伸至 236 的片段的氨基酸序列或其相对于 SEQ ID NO :2 的氨基酸 132 至 236 包含至多 20、15、10、10 或 5 个单一氨基酸的插入、缺失或取代的变体, 并且其中 BTNL3 蛋白可抑制由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖。BTNL3 蛋白可在非人或哺乳动物宿主细胞中制备。BTNL3 蛋白或连接至如微珠的表面或在细胞表面上表达的 BTNL3 蛋白相对于 SEQ ID NO :2、6 或 9 的氨基酸 25 至 131 可包含至多 5 个单一氨基酸的插入、缺失或取代。或者, 在另一方面, 可溶性 BTNL3 蛋白的氨基酸序列可与 SEQ ID NO :2 的氨基酸 25 至 131 至少 90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同。可溶性 BTNL3 蛋白或连接至如微珠的表面或在细胞表面上表达的 BTNL3 蛋白可为至少二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体。所述 BTNL3 蛋白或连接至如微珠的表面或在细胞表面上表达的 BTNL3 蛋白也可为二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体、十聚体、更高级多聚体或这些物质的混合物。在另一方面, 可溶性 BTNL3 蛋白或连接至如微珠的表面或在细胞表面上表达的 BTNL3 蛋白可为至多三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体或十聚体。所述可溶性 BTNL3 蛋白或连接至如微珠的表面或在细胞表面上表达的 BTNL3 蛋白可为多聚体, 其中所述多聚体具有的分子量为单体可溶性 BTNL3 蛋白的分子量的至少约两倍、三倍、四倍、五倍、六倍、七倍、八倍、九倍、十倍、十一倍、十二倍、十三倍、十四倍、十五倍或十六倍大。在另一方面, 所述可溶性 BTNL3 蛋白或连接至如微珠的表面或在细胞表面上表达的 BTNL3 蛋白可为多聚体, 其具有的分子量为单体可溶性 BTNL3 蛋白的分子量的至多约三倍、四倍、五倍、六倍、七倍、八倍、九倍、十倍、十一倍、十二倍、十三倍、十四倍、十五倍或十六倍大。所述可溶性 BTNL3 蛋白或连接至如微珠的表面或在细胞表面上表达的 BTNL3 蛋白还可包含另一个多肽, 例如像抗体的 Fc 片段和 / 或接头。还提供编码所述可溶性 BTNL3 蛋白的核酸以及包含这些核酸的载体和含有所述载体和 / 或所述核酸的宿主细胞。

[0012] 或者, BTNL3 蛋白, 任选地为可溶性蛋白质, 或连接至如微珠的表面或在细胞表面上表达的 BTNL3 蛋白可包含 SEQ ID NO :2 或 6 的自 SEQ ID NO :2 或 6 的约位置 132 延伸至 236 的片段的氨基酸序列或其相对于 SEQ ID NO :2 或 6 的氨基酸 132 至 236 包含至多 20、15、10 或 5 个单一氨基酸的插入、缺失或取代的变体, 其中 BTNL3 蛋白还不包含 SEQ ID

NO:2 的自 SEQ ID NO:2 或 6 的位置 25 延伸至 131 的片段的氨基酸序列或其相对于 SEQ ID NO:2 或 6 的氨基酸 25 至 131 包含至多 10 个单一氨基酸的插入、缺失或取代的变体,并且其中 BTNL3 蛋白可抑制由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖。BTNL3 蛋白可在非人或哺乳动物宿主细胞中制备。所述可溶性 BTNL3 蛋白或连接至如微珠的表面或在细胞表面上表达的所述 BTNL3 蛋白可为至少二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体、十聚体或更高级多聚体。在另一方面,可溶性 BTNL3 蛋白或连接至如微珠的表面或在细胞表面上表达的 BTNL3 蛋白可为至多二聚体、三聚体、四聚体、五聚体、六聚体、七聚体、八聚体、九聚体、十聚体。所述 BTNL3 蛋白或连接至如微珠的表面或在细胞表面上表达的所述 BTNL3 蛋白还可包含另一个多肽,例如像抗体的 Fc 片段和 / 或接头。所述可溶性 BTNL3 或连接至如微珠的表面或在细胞表面上表达的所述 BTNL3 蛋白可为多聚体,其中所述多聚体具有的分子量为单体可溶性 BTNL3 蛋白的分子量的至少约两倍、三倍、四倍、五倍、六倍、七倍、八倍、九倍、十倍、十一倍、十二倍、十三倍、十四倍、十五倍或十六倍大。此外,可溶性 BTNL3 蛋白或连接至如微珠的表面或在细胞表面上表达的 BTNL3 蛋白可为多聚体,其中所述多聚体具有的分子量为单体可溶性 BTNL3 蛋白的分子量的至多约两倍、三倍、四倍、五倍、六倍、七倍、八倍、九倍、十倍、十一倍、十二倍、十三倍、十四倍、十五倍或十六倍大。还提供编码所述 BTNL3 融合蛋白的核酸以及包含这些核酸的载体和含有所述载体和 / 或所述核酸的宿主细胞。

[0013] 在另一个实施方案中,提供一种由 DNA 编码的 BTNL3 融合蛋白,其中所述 DNA 包含以下:(a) 编码多肽的 DNA,其中所述 DNA (i) 由来自 SEQ ID NO:1 的核苷酸 52、55、58 或 61 至 696、699、702、705 或 708 或 SEQ ID NO:8 的核苷酸 52、55、58 或 61 至 486、489、492、495 或 498 的核苷酸序列组成;或 (ii) 在严格条件下与 (i) 的 DNA 杂交;以及 (b) 不与由 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:8 的序列组成的多核苷酸杂交,并且编码与由 (a) 的多核苷酸编码的多肽同框的另一个多肽的另一个 DNA;其中融合蛋白可抑制由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖。BTNL3 融合蛋白可包含接头序列,并且可为分离的蛋白质和 / 或可溶性蛋白质。所述 BTNL3 融合蛋白可为多聚体,其中所述多聚体具有的分子量为单体 BTNL3 融合蛋白的分子量的至少约两倍、三倍、四倍、五倍、六倍、七倍、八倍、九倍、十倍、十一倍、十二倍、十三倍、十四倍、十五倍或十六倍大。在另一方面,所述 BTNL3 融合蛋白可为多聚体,其中所述多聚体具有的分子量为单体 BTNL3 融合蛋白的分子量的至多约两倍、三倍、四倍、五倍、六倍、七倍、八倍、九倍、十倍、十一倍、十二倍、十三倍、十四倍、十五倍或十六倍大。还提供编码所述 BTNL3 融合蛋白的核酸以及包含这些核酸的载体和含有所述载体和 / 或所述核酸的宿主细胞。

[0014] 以上或以下论述的任何 BTNL3 蛋白都可为分离的和 / 或可溶的,并且可包括包含多个 BTNL3 蛋白分子的多聚体或聚集物质。多聚体或聚集体中含有的单体 BTNL3 蛋白物质的分子量可通过凝胶电泳在还原性条件下测量或通过还原性条件下进行的尺寸排阻色谱 (SEC) 测量。多聚或聚集物质的分子量可通过在非还原性条件下进行的凝胶电泳和 / 或 SEC 测量。在一些实施方案中,多聚体或聚集体具有的分子量为单体物质的分子量的至少约 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 或 16 倍。在一些实施方案中,多聚体或聚集体具有的分子量为单体物质的分子量的至多约 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15 或 16 倍。所述多聚体或聚集体的单体 BTNL3 蛋白包含 (a) 含有来自 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18、19、

20、21、22 或 23 至 234、235、236、237 或 238 或来自 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18、19、20、21、22 或 23 至 164、165、166、167 或 168 的氨基酸序列的多肽 ;(b) 氨基酸序列与 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 至少 90%、95%、97% 或 99% 相同的多肽, 其中 (b) 的多肽的氨基酸序列与 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 的比对窗的长度为至少 50、60、70、80、90 或 100 个氨基酸 ;或 (c) 序列如同 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 的序列, 例外之处是其相对于 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 可含有至多 20、15、10 或 5 个单一氨基酸的插入、缺失或取代的多肽。

[0015] 在另一方面, 本文描述一种分离的变异 BTNL3 蛋白, 其包含含有与 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或与 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 至少 90% 或 95% 相同的氨基酸序列的多肽, 其中所述氨基酸序列与 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 的比对窗的长度为至少 80 个氨基酸, 其中所述蛋白不包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 的氨基酸序列, 并且其中所述蛋白可拮抗包含氨基酸序列 SEQ IN NO :7 的 BTNL3 蛋白对由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖的抑制作用。

[0016] 本文还描述一种编码本文所述的任何 BTNL3 蛋白, 包括多聚、融合和变异 BTNL3 蛋白的分离的 DNA, 其中所述 DNA 不包括外显子序列。

[0017] 在另一方面, 提供一种编码包含 BTNL3 蛋白和另一种多肽的融合蛋白的 DNA, 其中所述 DNA 包含 : (a) DNA, 所述 DNA (i) 由来自 SEQ ID NO :1 的核苷酸 52、55、58 或 61 至 696、699、702、705 或 708 或 SEQ ID NO :8 的核苷酸 52、55、58 或 61 至 486、489、492、495 或 498 的 DNA 序列组成 ;或 (ii) 在严格条件下与 (i) 的 DNA 杂交 ;以及 (b) 不与由 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :8 的序列组成的 DNA 杂交, 并且编码与由 (a) 的 DNA 编码的多肽同框的另一个多肽的另一个 DNA ;其中所述融合蛋白可抑制由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖。还涵盖含有这些 DNA 的载体和含有所述载体和 / 或所述 DNA 的宿主细胞。

[0018] 本发明提供一种制备以上论述的任何 BTNL3 蛋白, 包括多聚 BTNL3 蛋白、BTNL3 融合蛋白和可溶性或变异 BTNL3 蛋白或连接至如微珠的表面或在细胞表面上表达的 BTNL3 蛋白的方法, 其包括在培养基中在适于 DNA 表达的条件下培养含有编码 BTNL3 蛋白的核酸的宿主细胞, 以及从细胞团或培养基回收表达的 BTNL3 蛋白。可将 DNA 引入宿主细胞中。

[0019] 在另一方面, 提供一种治疗患有自身免疫性或炎症性疾病的患者的方法, 其包括向患者施用治疗有效剂量的以下中的任一个 : (1) 包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 的氨基酸序列的任何 BTNL3 蛋白, (2) 其包含与 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 至少 90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列或包含相对于 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 的序列具有至多 5、10、15 或 20 个单一氨基酸的插入、缺失或取代的氨基酸序列的变体, 其中 BTNL3 变异蛋白可抑制由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖 ;或 (3) BTNL3 激动剂, 如激动性抗 BTNL3 抗体或针对抗 BTNL3 抗体的抗独特型抗体。或者, 所述治疗可离体进行。作为另一个替代方案, 可使 BTNL3 蛋白或激动剂连接至小粒子以体内或离体施用, 如在纳米粒子上进行施用。这个方法将包括使用以上和以下论述的多聚 BTNL3 蛋白、BTNL3 融合蛋白或 BTNL3 蛋白中的任一个来实践所述方法, 其中例外之处是可拮抗包含氨基酸序列 SEQ ID NO :7 的 BTNL3 蛋白对 T 细胞增殖的抑制作用的那些 BTNL3 变异蛋白。

自身免疫性或炎症性疾病可为关节炎（包括类风湿性关节炎、青少年特发性关节炎和牛皮癣性关节炎）、阿狄森氏病（Addison's disease）、哮喘、多腺内分泌病变综合征、全身性红斑狼疮、慢性活动性肝炎、甲状腺炎、淋巴细胞性腺垂体炎、卵巢功能早衰、特发性甲状旁腺功能减退（idiopathic hypoparathyroidism）、恶性贫血、肾小球性肾炎、自身免疫性嗜中性白细胞减少症、古德帕斯彻氏综合征（Goodpasture's syndrome）、重症肌无力、硬皮病、原发性休格连氏综合征（primary Sjogren's syndrome）、多肌炎、自身免疫性溶血性贫血、炎症性肠病（如克罗恩氏病（Crohn's disease）或溃疡性结肠炎）、牛皮癣、皮炎、类肉瘤病、多发性硬化症、慢性阻塞性肺病、哮喘、1型和2型糖尿病、移植相关病状（如移植排斥或移植植物抗宿主疾病）、痛风和相关炎症性晶体沉积疾病，或纤维化疾病（如动脉粥样硬化、慢性阻塞性肺病（COPD）、肝硬化、硬皮病、肾移植纤维化、肾同种异体移植植物肾病变、肺纤维化（包括特发性肺纤维化））、自身免疫性血小板减少性紫癜、寻常天疱疮、急性风湿热、混合型原发性冷球蛋白血症和温性自身免疫性溶血性贫血，以及许多其它疾病。

[0020] 在另一方面，提供一种用于抑制 T 细胞增殖的方法，其包括向 T 细胞中添加（1）包含来自 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18、19、20、21、22 或 23 至 234、235、236、237 或 238 或来自 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18、19、20、21、22 或 23 至 164、165、166、167 或 168 的氨基酸序列的任何 BTNL3 蛋白或（2）其包含与 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 至少 90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列或包含相对于 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 的序列具有至多 5、10、15 或 20 个单一氨基酸的插入、缺失或取代的氨基酸序列的变体，其中 BTNL3 蛋白可抑制由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖。这个方法涵盖使用以上和以下论述的可溶性多聚 BTNL3 蛋白、BTNL3 融合蛋白或可溶性 BTNL3 蛋白来抑制 T 细胞增殖。对 T 细胞增殖的此抑制作用可在体外、离体或在体内发生。

[0021] 在另一方面，提供一种用于扩增调控 T（“T reg”）细胞的方法，其包括向 T 细胞中添加（1）包含来自 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18、19、20、21、22 或 23 至 234、235、236、237 或 238 或来自 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18、19、20、21、22 或 23 至 164、165、166、167 或 168 的氨基酸序列的 BTNL3 蛋白或（2）其包含与 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 至少 90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同的氨基酸序列或包含相对于 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 的序列具有至多 5、10、15 或 20 个单一氨基酸的插入、缺失或取代的氨基酸序列的变体，其中 BTNL3 蛋白或变异 BTNL3 蛋白可抑制由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖。这个方法涵盖使用以上和以下论述的连接至如板或珠粒的表面或在细胞表面上表达的 BTNL3 蛋白、可为多聚的可溶性 BTNL3 蛋白、或 BTNL3 融合蛋白或可溶性 BTNL3 蛋白来扩增 T reg 细胞。T reg 细胞的这种扩增可在体外、离体或在体内发生。所述方法包括使 T 细胞群体与有效量的如本文所述的 BTNL3 蛋白、融合蛋白或激动剂接触。T reg 细胞的“扩增”是指 T reg 细胞（CD3⁺FOXP3⁺）与总体 T 细胞（CD3⁺FOXP3⁻）的比率变得更大。这个比率可通过使用用以检测细胞蛋白质的抗体进行 FACS 分析（本领域中熟知的一种方法）来测定。参见例如 Swanson 等（2013），J. Immunol. 190 :2027-2035，其相关部分以引用的方式并入本文。

[0022] 另一个实施方案包括一种用于治疗患有自身免疫性或炎症性疾病的患者的方法，其包括向患者施用治疗有效剂量的抗 BTNL3 抗体，其中抗 BTNL3 抗体激动（agonize）天然

BTNL3 蛋白对 T 细胞的增殖的抑制作用,其中抗 BTNL3 抗体结合由 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 的氨基酸序列组成的蛋白质。

[0023] 另一个实施方案包括一种用于治疗患有自身免疫性或炎症性疾病的患者的方法,其包括向患者施用治疗有效剂量的抗 BTNL3 抗体,其中抗 BTNL3 抗体可结合由 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18 至 236 的氨基酸序列组成的蛋白质。在一些实施方案中,抗 BTNL3 抗体可结合细胞表面 BTNL3 蛋白,并且诱导例如表达 BTNL3 的嗜中性白细胞中通过 BTNL3 的 B30.2 结构域达成的细胞内信号传导级联。所述细胞内信号传导可抑制表达 BTNL3 的细胞的增殖,或在一些情况下,导致细胞死亡。自身免疫性或炎症性疾病包括例如特征在于嗜中性白细胞活性过度的疾病,如充血性阻塞性肺病 (COPD)、哮喘、炎症性肠病 (包括溃疡性结肠炎和克罗恩氏病) 以及痛风和相关炎症性晶体沉积疾病。

[0024] 另一种方法包括针对癌症患者的治疗,其包括向患者施用治疗有效量的结合由 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18 至 236 组成的 BTNL3 蛋白或与 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18 至 236 至少 90% 或 95% 相同的 BTNL3 蛋白的抗体。在一些实施方案中,所述抗 BTNL3 抗体可结合如本文所述的人 BTNL3 蛋白,其中平衡解离常数 (K_D) 为至多 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 或 10^{-11} M。在一些实施方案中,所述抗 BTNL3 抗体可结合包含与 SEQ ID NO :2 和 / 或 SEQ ID NO :9 至少 90%、95%、97%、98% 或 100% 相同的氨基酸序列的 BTNL3 蛋白,其中与 SEQ ID NO :2 和 / 或 9 的比对窗的长度为至少 50、60、70、80 或 100 个氨基酸,并且任选地,其中 BTNL3 蛋白可抑制由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖。在一些实施方案中,抗 BTNL3 抗体可结合包含氨基酸序列 SEQ ID NO :2 和 / 或 9 的片段的蛋白质。此抗体可为拮抗 BTNL3 对 T 细胞增殖的遏制作用的拮抗性抗 BTNL3 抗体。或者,抗体可结合在癌细胞上表达的 BTNL3,从而向癌细胞发信号以抑制其增殖,或在一些情况下,导致细胞死亡。癌症可为例如急性或慢性白血病、淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤 (non-Hodgkin's lymphoma)、霍奇金氏病、淋巴细胞性白血病、淋巴细胞性或皮肤性淋巴瘤、癌瘤、腺癌、肉瘤、胸腺瘤、纵隔赘瘤、乳腺癌、前列腺癌、头颈癌、肺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、各种类型的皮肤癌、膀胱癌、恶性神经胶质瘤、食道癌、胃癌、胰腺癌、肝胆赘瘤、小肠癌、结肠癌或直肠癌、肾癌或输尿管癌、睾丸癌、尿道癌或阴茎癌、妇科肿瘤、卵巢癌、骨肉瘤、内分泌系统癌症、皮肤黑素瘤、眼内黑素瘤、中枢神经系统赘瘤和浆细胞赘瘤。在一些实施方案中,抗体可为激动性抗体,其结合在癌细胞上表达的 BTNL3,从而导致通过 B30.2 结构域达成细胞内信号传导。

[0025] 还提供一种治疗癌症患者的方法,其包括向患者施用治疗有效量的变异 BTNL3 蛋白,所述变异 BTNL3 蛋白包含含有与 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 至少 90% 或 95% 相同的氨基酸序列的多肽,其中所述氨基酸序列与 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 的比对窗的长度为至少 80 个氨基酸,其中变异 BTNL3 蛋白不包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 的氨基酸序列,并且其中变异 BTNL3 蛋白可拮抗包含氨基酸序列 SEQ IN NO :7 的 BTNL3 蛋白对由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖的抑制作用。癌症可为腺癌。

[0026] 在另一方面,本文提供一种治疗被病原体感染的患者的方法,其包括向患者施用治疗有效量的结合氨基酸序列由 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 和 / 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 组成的 BTNL3 蛋白或氨基酸序列由与 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 和 / 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 至少 90% 或 95% 相同的序列组成的 BTNL3 蛋白的抗体,其

中所述氨基酸序列与 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 的比对窗的长度为至少 80 个氨基酸。抗体可为拮抗性抗体,其可拮抗包含氨基酸序列 SEQ IN NO :7 的 BTNL3 蛋白对由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖的抑制作用。

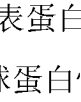
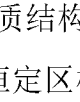
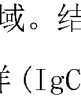
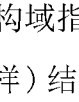
[0027] 在另一方面,本文描述一种治疗被病原体感染的患者的方法,其包括向患者施用治疗有效量的变异 BTNL3 蛋白,所述变异 BTNL3 蛋白包含含有与 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 至少 90% 或 95% 相同的氨基酸序列的多肽,其中所述氨基酸序列与 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 的比对窗的长度为至少 80 个氨基酸,其中变异 BTNL3 蛋白不包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 的氨基酸序列,并且其中变异 BTNL3 蛋白可拮抗包含氨基酸序列 SEQ IN NO :7 的 BTNL3 蛋白对由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖的抑制作用。

[0028] 在另一方面,本文描述一种用于治疗患有自身免疫性或炎症性病状的方法,其包括以下步骤:(a) 从患者移除 T 细胞;(b) 用包含抗 CD3 抗体和 BTNL3 蛋白的蛋白质组合刺激 T 细胞,其中 BTNL3 蛋白包含 (i) SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 的氨基酸序列,(ii) 与 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 至少 90% 或 95% 相同的氨基酸序列,其中所述氨基酸序列与 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 的比对窗的长度为至少 80 个氨基酸,或 (iii) 相对于 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 的序列具有至多 20 个单一氨基酸的插入、缺失或取代的氨基酸序列;(c) 收获所刺激的 T 细胞;以及 (d) 使所收集的 T 细胞返回至患者中;其中 BTNL3 蛋白可抑制由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖。BTNL3 蛋白可为 (b) (iii) 的 BTNL3 蛋白,其中氨基酸序列相对于 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 的序列具有至多 5 或 10 个单一氨基酸的插入、缺失或取代。BTNL3 蛋白可为 (b) (i) 的 BTNL3 蛋白。自身免疫性或炎症性病状可选自由以下组成的组:关节炎(包括类风湿性关节炎、青少年特发性关节炎和牛皮癣性关节炎)、阿狄森氏病、哮喘、多腺内分泌病变综合征、全身性红斑狼疮、慢性活动性肝炎、甲状腺炎、淋巴细胞性腺垂体炎、卵巢功能早衰、特发性甲状旁腺功能减退、恶性贫血、肾小球性肾炎、自身免疫性嗜中性白细胞减少症、古德帕斯彻氏综合征、重症肌无力、硬皮病、原发性休格连氏综合征、多肌炎、自身免疫性溶血性贫血、炎症性肠病(如克罗恩氏病或溃疡性结肠炎)、牛皮癣、皮炎、类肉瘤病、多发性硬化症、慢性阻塞性肺病、哮喘、1 型和 2 型糖尿病、移植相关病状(如移植排斥或移植物抗宿主疾病)、痛风和相关炎症性晶体沉积疾病,或纤维化疾病(如动脉粥样硬化、慢性阻塞性肺病(COPD)、肝硬化、硬皮病、肾移植纤维化、肾同种异体移植物肾病变、肺纤维化(包括特发性肺纤维化))、自身免疫性血小板减少性紫癜、寻常天疱疮、急性风湿热、混合型原发性冷球蛋白血症和温性自身免疫性溶血性贫血,以及许多其它疾病。

[0029] 提供一种用于对患者接种例如针对癌症或病原体的疫苗的方法,其包括向患者施用抗原和 (a) 结合以下的拮抗性抗体:(i) 氨基酸序列由 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 组成的 BTNL3 蛋白,或 (ii) 氨基酸序列由与 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 至少 90% 或 95% 相同的序列组成的 BTNL3 蛋白,其中所述氨基酸序列与 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 的比对窗的长度为至少 80 个氨基酸;或 (b) 包含含有与 SEQ ID NO :2 的氨基酸

18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 至少 90% 或 95% 相同的氨基酸序列的多肽的变异 BTNL3 蛋白, 其中所述氨基酸序列与 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 的比对窗的长度为至少 80 个氨基酸, 其中变异 BTNL3 蛋白不包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 的氨基酸序列, 并且其中变异 BTNL3 蛋白可拮抗包含氨基酸序列 SEQ IN NO :7 的 BTNL3 蛋白对由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖的抑制作用。抗原可为癌症抗原或可引发针对病原体的免疫反应的抗原。拮抗性抗体可拮抗包含氨基酸序列 SEQ IN NO :7 的 BTNL3 蛋白对由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖的抑制作用。在所述方法中, 拮抗性抗 BTNL3 抗体或变异 BTNL3 蛋白可在抗原之前、与其同时或之后施用。本文涵盖包含拮抗性抗 BTNL3 抗体或变异 BTNL3 蛋白和抗原的疫苗。

[0030] 附图简述

[0031] 图 1 : 将作为嗜乳脂蛋白样 (BTNL) 蛋白家族的一部分的人蛋白质 (BTNL2、BTNL3、BTNL8、BTNL9、ERMAP 和 MOG) 的结构域结构以及相关嗜乳脂蛋白和 B7 家族的一般性结构绘图。各椭圆形或圆形代表蛋白质结构域。结构域指示如下: , 免疫球蛋白可变区样 (IgV 样) 结构域; , 免疫球蛋白恒定区样 (IgC 样) 结构域; , 跨膜结构域; 以及 , B30.2 结构域。未用特定结构域结构识别的区域用水平线指示。

[0032] 图 2 : 此图指示源于健康供体的血液的各种初级人免疫细胞中存在的 BTNL3mRNA 的相对量。纵轴指示使用 ROSETTA RESOLVER[®] 产生的 BTNL3mRNA 的表达的强度值。所测试的各种细胞类型沿 x 轴指示如下: 1, 外周血单核细胞; 2, T 细胞; 3, CD4⁺T 细胞; 4, CD8⁺T 细胞; 5, B 细胞; 6, 单核细胞; 7, 巨噬细胞; 8, 嗜中性白细胞; 9, 嗜酸性粒细胞; 10, 自然杀伤 (NK) 细胞。道次 8 中的水平线加误差棒指示所获得的嗜中性白细胞中的 BTNL3 表达的平均强度值加标准偏差。方法详述于实施例 1 中。

[0033] 图 3 : 此图示出如通过从在 X 轴上如下识别的正常人组织提取的 RNA 的下一代 RNA 测序所测量的 BTNL3 表达量: 1, 肾上腺, 不另外指定; 2, 动脉, 主动脉; 3, 血液; 4, 骨髓, 不另外指定; 5, 脑, 前扣带; 6, 脑, 小脑; 7, 脑, 额叶皮质; 8, 脑, 不另外指定; 9, 乳房; 10, 支气管; 11, 升结肠; 12, 结肠, 不另外指定; 13, 乙状结肠; 14, 十二指肠; 15, 食道; 16, 腹部脂肪; 17, 心脏, 不另外指定; 18, 心脏, 心室; 19, 心脏, 左心室; 20, 胰岛细胞; 21, 肾, 皮质; 22, 肾, 髓质; 23, 肾, 不另外指定; 24, 肝; 25, 肺; 26, 肠系膜淋巴结; 27, 淋巴结, 不另外指定; 28, 骨骼肌, 不另外指定; 29, 视神经; 30, 卵巢; 31, 胰头; 32, 胰脏, 不另外指定; 33, 外周血单核细胞; 34, 前列腺; 35, 直肠; 36, 视网膜; 37, 皮肤, 不另外指定; 38, 小肠, 十二指肠; 39, 小肠, 回肠; 40, 小肠, 空肠; 41, 脊髓, 子宫颈; 42, 脊髓, 腰椎; 43, 脊髓, 胸; 44, 脾; 45, 胃, 主体; 46, 胃, 不另外指定; 47, 胃, 幽门; 48, 睾丸; 49, 甲状腺; 50, 舌; 以及 51, 膀胱, 逼尿肌。y 轴指示显示为每个细胞的 BTNL3 转录物数值的表达量。

[0034] 图 4 : 此图示出如通过各种人疾病组织的样品的下一代 RNA 测序分析所测量的 BTNL3 表达量。x 轴如下指示各样品的性质: 1, 转移性腺癌; 2, 腺癌, 转移性结肠癌; 3, 腺癌, 转移性胃癌; 4, 腺癌, 中等分化; 5, 腺癌, 不另外指定; 6, 腺癌, 不良分化; 7, 小细胞癌, 不另外指定; 8, 小细胞癌, 燕麦细胞; 9, 癌瘤, 未分化; 10, II 型糖尿病样品; 11, 急性骨髓性白血病; 12, 急性骨髓性白血病; 13, 恶性黑素瘤; 以及 14, 恶性转移性黑素瘤。y 轴指示显示为

每个细胞的 BTNL3 转录物数值的表达量。

[0035] 图 5 :y 轴指示在一些情况下,有时在溶液中的各种其它蛋白质的存在下,已用固定在微量滴定盘上的蛋白质活化的小鼠 CD4⁺T 细胞的增殖水平。沿 x 轴标记的道次如下代表所处理的样品:道次 1,不使用固定的活化蛋白质或其它蛋白质;道次 2,用于活化细胞的固定的抗 CD3 抗体和包括在反应中的人 IgG;道次 3,用于活化细胞的固定的抗 CD3 抗体和包括在反应中的重组 B7-2. Fc;道次 4,用于活化细胞的固定的抗 CD3 抗体和包括在反应中的重组 BTNL2. Fc;道次 5,用于活化细胞的固定的抗 CD3 抗体和包括在反应中的重组 BTNL3. Fc;道次 6,用于活化细胞的固定的人 IgG 和包括在反应中的重组 BTNL2. Fc;以及道次 7,用于活化细胞的固定的人 IgG 和包括在反应中的重组 BTNL3. Fc。

[0036] 图 6 :在此图中,各黑点反映关于鼠类 CD4⁺T 细胞中的特定序列的 RNA 表达的数据,其中所述序列的表达由细胞经受的刺激物显著上调或下调。表达不受刺激物影响的序列未表示在图中。x 轴指示在阵列分析中检测到的各特定序列的未刺激与刺激的信号强度平均值的 \log_{10} 。y 轴指示在刺激 24 小时之后的表达相较于培养 24 小时的未刺激细胞中的相同序列的表达的比率的 \log_{10} 。所用刺激如下:左侧,仅用抗 CD3 抗体刺激;中间,用抗 CD3 抗体加鼠类 BTNL2. Fc 融合蛋白刺激;以及右侧,用抗 CD3 抗体加人 BTNL3. Fc 融合蛋白刺激。

[0037] 序列表简述

[0038] SEQ ID NO :1 :编码人 BTNL3 编码区域的核苷酸序列。

[0039] SEQ ID NO :2 :人 BTNL3 的氨基酸序列。

[0040] SEQ ID NO :3 :IgK 信号序列的氨基酸序列。

[0041] SEQ ID NO :4 :人生长激素的信号序列的氨基酸序列。

[0042] SED ID NO :5 :编码人 BTNL3. Fc 融合蛋白的全长核苷酸序列。

[0043] SEQ ID NO :6 :人 BTNL3 融合蛋白的全长氨基酸序列。

[0044] SEQ ID NO :7 :成熟 BTNL3. Fc 的氨基酸序列(无信号序列)。

[0045] SEQ ID NO :8 :编码 BTNL3 的剪接变体的核苷酸序列。

[0046] SEQ ID NO :9 :由 SEQ ID NO :8 编码的氨基酸序列。

[0047] SEQ ID NO :10 :肽接头。

[0048] SEQ ID NO :11 :肽接头。

[0049] SEQ ID NO :12 :肽接头。

[0050] SEQ ID NO :13 :肽接头。

[0051] SEQ ID NO :14 :肽接头。

[0052] SEQ ID NO :15 :肽接头。

[0053] SEQ ID NO :16 :肽接头。

[0054] SEQ ID NO :17 :肽接头。

[0055] SEQ ID NO :18 :肽接头。

[0056] 详述

[0057] 本发明提供 BTNL3 蛋白或 BTNL3 蛋白的拮抗剂或激动剂(如抗 BTNL3 抗体)和/或 BTNL3 蛋白的变异形式的用途。本发明提供 BTNL3 蛋白(包括其多聚体、融合蛋白和变体)和所述蛋白的用途以及编码所有以上物质的核酸。BTNL3 蛋白可通过减弱 T 细胞活化、增殖和细胞因子产生来改变 T 细胞功能。所述作用可导致对 T 细胞介导的自身免疫性或炎

症性疾病,如炎症性肠病和纤维化病症以及许多其它疾病的有效治疗。BTNL3的拮抗剂可起到阻止或拮抗BTNL3抑制T细胞活化、增殖和细胞因子分泌,由此导致T细胞活化总体增加的作用。所述作用可适用于治疗如癌症的疾病或增强疫苗的效力。此外,BTNL3的激动剂可能例如通过群集BTNL3蛋白而不阻断其功能来改变免疫细胞功能。所述激动剂可介导细胞内通过B30.2结构域向表达BTNL3的细胞进行信号传导,所述信号传导可例如通过增加或降低增殖和/或细胞因子分泌来调节所述细胞的活性。因为BTNL3在嗜中性白细胞和一些种类的癌细胞上表达,所以所述细胞内信号传导可调节由所述细胞介导的疾病过程。

[0058] 定义

[0059] 可“拮抗包含氨基酸序列SEQ ID NO:7的BTNL3蛋白对由固定的抗CD3抗体刺激的T细胞的增殖的抑制作用”的BTNL3拮抗剂的生物活性可通过以下方式测定:如实施例4中所述进行T细胞增殖测定并且以控制方式将拮抗剂添加到一些样品中以确定拮抗剂是否影响包含氨基酸序列SEQ ID NO:7的BTNL3蛋白的活性。通过类似测试,可测定使由T细胞达成的T细胞增殖的抑制作用增加的激动性抗体的活性。

[0060] 如本文所指的“抗体”包含免疫球蛋白的重链可变区和/或免疫球蛋白的轻链可变区。抗体可为包含轻链可变区(V_L)、轻链恒定区(C_L)、重链可变区(V_H)、第一重链恒定区(C_H1)、铰链区、第二重链恒定区(C_H2)和第三重链恒定区(C_H3)的全长四聚抗体,如IgG、IgA、IgD、IgM或IgE抗体。或者,抗体可为片段,如Fab片段或任选地重组片段,如scFv片段。包含单一可变区 V_H 区或 V_L 区的单结构域抗体也是如本文所指的抗体。单结构域抗体在美国专利申请公布US 2006/0062784中有所描述,所述公布描述单结构域抗体的各部分据此以引用的方式并入。此外,各种形式的单价分子(包括单链抗体,如scFv、Fab、scFv-Fc、结构域抗体以及例如在国际申请WO 2009/089004和美国专利5,837,821中所述的各种形式,所述申请和专利的描述性部分以引用的方式并入本文)和多价分子(如 $F(ab)_2$ 和例如在国际申请WO 2009/089004和美国专利5,837,821中所述的那些,所述申请和专利的描述性部分以引用的方式并入本文)涵盖在“抗体”的含义内。

[0061] 在本文中多处称蛋白质的多聚物质具有的分子量是所述蛋白质的单体物质的分子量的“至少约”两倍、三倍、四倍、五倍、六倍、七倍、八倍、九倍、十倍、十一倍、十二倍、十三倍、十四倍、十五倍或十六倍。尽管其含义是普通的,但这个短语明确意图包括比单体大约四倍、五倍、六倍等的物质而非仅包括所述物质与较大物质的组合或仅包括较大物质。类似地,在多处称多聚体为“至少”二聚体、三聚体、四聚体等。这个短语明确意图包括为二聚体、三聚体、四聚体等的物质而非仅包括所述物质与较大物质的组合或仅包括较大物质。此外,在本文中多处称多聚物质具有的分子量为蛋白质的单体物质的分子量的“至多”两倍、三倍、四倍、五倍、六倍、七倍、八倍、九倍、十倍、十一倍、十二倍、十三倍、十四倍、十五倍或十六倍。尽管其含义是普通的,但这个短语明确意图包括比单体大约四倍、五倍、六倍等的物质而非仅包括所述物质与较小物质的组合或仅包括较小物质。类似地,在多处称多聚体为“至多”二聚体、三聚体、四聚体等。这个短语明确意图包括为二聚体、三聚体、四聚体等的物质而非仅包括所述物质与较小物质的组合或仅包括较小物质。

[0062] 如本文所指的“BTNL3蛋白”包括全长人BTNL3蛋白及其片段和/或变体,其包括由BTNL3基因的天然存在的等位基因变体编码的蛋白质以及作为在如非人或哺乳动物宿主细胞的宿主细胞中产生的蛋白质的重组产生的BTNL3蛋白,其相对于天然存在的BTNL3蛋白

可含有一些序列变化。明确涵盖包含全长人 BTNL3 蛋白的可溶性片段的蛋白质,所述可溶性片段包括大部分或整个细胞外区域,并且不包括跨膜区域。所述蛋白质可连接至如珠粒或微量滴定板的表面。

[0063] 当患者在大体相同时间段期间,任选地在正好相同时间接受两种或更多种分子时,患者接受用两种或更多种分子进行的“同时”治疗,所述分子可为例如治疗剂或疫苗的组分。例如,如果患者用一种分子每日持续给药,并且还用另一种分子一个月一次持续给药,那么患者将同时接受这两种分子。类似地,用各自每两周,但不在同一天施用的两种不同分子给药的患者将接受用所述两种分子进行的同时治疗。此外,每周一次持续接受一种分子,并且每天一次仅持续三天接受另一种分子的患者将接受用这两种分子进行的短时期同时治疗。

[0064] “scFv”是包含重链可变区 (V_H) 和轻链可变区 (V_L) 并且不包含抗体的恒定区的单链抗体。在一些实施方案中,scFv 也可在重链可变区与轻链可变区之间包含长度可变的接头。尽管 scFv 可融合于其它氨基酸序列,但蛋白质的被称为 scFv 的部分优选不包含任何实质量的不同于 V_H 区、 V_L 区,以及任选地,接合这些序列的接头的氨基酸序列。

[0065] 如本文所指的“Fc 多肽”是抗体重链的包含 C_H2 和 C_H3 结构域和全部或部分铰链区的片段或所述片段的变体。Fc 多肽不包含 C_H1 结构域或 V_H 结构域。参见例如 Kuby, Immunology, 第二版,第 110-11 页, W. H. Freeman and Co., New York (1994)。Fc 多肽可具有 IgA、IgD、IgE、IgG 或 IgA 同种型,包括 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4 或其它亚型。Fc 多肽可为多聚的,在一些情况下可为二聚的。所述多聚 Fc 多肽在本文中称为“Fc 区”。一些 Fc 多肽,例如 IgM 或 IgA Fc 多肽可形成更高级多聚体。多聚 Fc 区内的单一多肽链称为“Fc 多肽”。如本文所指的 Fc 多肽的变体相对于天然存在的 Fc 多肽可包含 1 至 30 个(明确包括至多 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10 个等)单一氨基酸的插入、缺失或取代。天然存在的 Fc 多肽或“天然”Fc 多肽具有在自然界中存在于活生物体中的序列,例如人或小鼠 Fc 多肽。因此,“天然人”Fc 多肽具有见于天然存在的人 Fc 多肽中的氨基酸序列。关于何处可耐受变化而不影响功能的指导可见于本领域中。例如,相关部分以引用的方式并入本文的美国专利 5,807,706 和国际申请 WO 2009/089004 中鉴定的氨基酸残基的改变可用于相较于同二聚体形成来促进异二聚体形成。类似地,对 Fc 多肽进行的不阻止新生儿 Fc 受体 FcRn 的结合的改变涵盖在可发生在如本文所指的 Fc 变体中的改变内。可使用如 Biacore 3000 的 Biacore 仪器在约 pH 6 下确定 Fc 多肽与 FcRn 的结合。可使用标准化学使人 FcRn 偶联于 CM5 芯片。含有 Fc 的蛋白质可为流动相的一部分,并且可用共振单位量度反应。Fc 多肽的改变描述于例如国际专利申请公布 WO 97/34631 中,所述公布的相关部分以引用的方式并入本文。或者,在物种内和物种之间比较例如 IgG 序列可定位高度保守的氨基酸,这将向本领域技术人员表明改变那些氨基酸可影响结构和/或功能。铰链区、 C_H2 区和 C_H3 区(其一起形成 Fc 区)的众多序列比对可在例如 Kabat 等, Sequences of Immunological Interest, National Institutes of Health, 出版号 91-3242, 1991 中获得,所述出版物的相关部分以引用的方式并入本文。另一方面,在各种 IgG 之间变化的氨基酸是在其处变化可能被耐受而对功能无影响的位点。类似地,具有如增加或降低的效应物功能的其它所需性质的 Fc 变体涵盖在 Fc 变体所指的含义内,所述效应物功能包括抗体依赖性细胞毒性和/或导致补体固定的 C1q 结合。

[0066] 术语“全长抗体”是指在结构方面类似于大多数天然存在的抗体（例如 IgG 抗体），也就是说含有两个完整重链和两个完整轻链的分子。对于天然存在的抗体的结构的论述，参见例如 Kabat 等（同上）或 Kuby, Immunology, 第二版, 第 109-32 页, W. H. Freeman and Co., New York(1994)。这些参考文献的描述全长抗体的结构的部分以引用的方式并入本文。在“全长抗体”中还包括在结构方面类似于天然存在的仅含有两个完整重链（常具有异常长的 CDR3 区）而不含有轻链的单峰驼抗体的抗体。Muldermans 等 (2001), J. Biotechnol. 74 :277-302 ;Desmyter 等 (2001), J. Biol. Chem. 276 :26285-26290。这些参考文献的描述这些单峰驼抗体的结构的部分以引用的方式并入本文。

[0067] 如多聚 BTNL3 蛋白的“多聚”蛋白是包含不止一个多肽链的蛋白质。术语“多聚体”涵盖如“二聚体”、“三聚体”或“四聚体”的术语，所述术语指定多聚体含有多少个多肽链。“同多聚体”由相同多肽链的两个或更多个拷贝组成，并且不含有任何不同的多肽链。类似地，“同二聚体”由相同多肽链的两个拷贝组成，“同三聚体”由相同多肽链的三个拷贝组成，等。“异多聚体”含有至少两个不同的多肽链。如果异多聚体具有三个或更多个多肽链，那么它们中的一些可彼此相同，只要至少一个多肽链不同于其它多肽链即可。当称蛋白质为“至少三聚体”时，是指所述蛋白质为三聚体或更高级多聚体。类似含义将归于“至少四聚体”、“至少五聚体”等。类似地，为“至多”三聚体的多聚蛋白是三聚体或二聚体。

[0068] “Fab 片段”是包含轻链和一部分重链的抗体片段，所述轻链包含 V_L 区和 C_{L1} 区，所述一部分重链包含 V_H 区和 C_{H1} 区。Fab 片段不包含 C_{H2} 区或 C_{H3} 区。对于 Fab 片段是什么的论述，参见例如 Kuby, Immunology, 第二版, 第 110-11 页 W. H. Freeman and Co., New York(1994)。不同种类的 Fab 片段可不含有铰链区，含有一部分铰链区或整个铰链区。

[0069] 如本文所用的“scFv-Fc”是作为 scFv 与 Fc 多肽的融合物的重组蛋白。参见 Li 等 (2000), Cancer Immunol. Immunother. 49 :243-252 ;Powers 等 (2001), J. Immunol. Methods 251 :123-135 ;Gilliland 等 (1996), Tissue Antigens 47 :1-20。scFv-Fc 可为二聚的。

[0070] 如本文所指，“非还原性条件”是蛋白质内的二硫桥键将不被还原以使桥键将被破坏所处的条件。

[0071] “重组”蛋白或抗体是由遗传工程改造的过程得到的蛋白质或抗体。术语“遗传工程改造”是指用于产生以升高水平或降低水平表达基因或表达所述基因的突变形式的细胞的重组 DNA 或 RNA 方法。换句话说，细胞已用重组多核苷酸分子转染、转化或转导，并且由此被改变以导致细胞改变所需多肽的表达。

[0072] 可溶性分泌蛋白质和在细胞表面上表达的蛋白质常包含 N 末端“信号序列”，其为在真核细胞中介导蛋白质插入穿过限界内质网 (ER) 的膜的疏水性序列。I 型跨膜蛋白质也包含信号序列。如本文所指的“信号序列”是氨基末端疏水性序列，其通常在蛋白质的部分或全部穿过 ER 膜进入 ER 腔中之后被酶促移除。因此，本领域中已知的是，信号序列可作为分泌或跨膜蛋白的前体形式的一部分存在，但在蛋白质的成熟形式中通常将不存在。当称蛋白质包含信号序列时，应了解，尽管蛋白质的前体形式的确含有信号序列，但是蛋白质的成熟形式将可能不含有信号序列。信号序列含有邻近于裂解位点，并且恰好在裂解位点上游 (-1 位置) 的一个残基和在 -3 位置处的另一个残基，所述残基对此酶促裂解来说是重要的。Nielsen 等 (1997), Protein Eng. 10(1) :1-6 ;von Heijne(1983), Eur. J. Biochem. 133 :

17-21 ;von Heijne(1985), J. Mol. Biol. 184 :99-105, 所述文献的描述信号序列和如何鉴定它们的部分以引用的方式并入本文。可如由 Nielsen 等(同上)所述鉴定信号序列。在哺乳动物宿主细胞中具有功能的信号肽或信号序列的实例包括以下:美国专利 4,965,195 中所述的白细胞介素-7(IL-7)的信号序列;Cosman 等((1984), Nature 312 :768)中所述的白细胞介素-2 受体的信号序列;EP 专利 0 367 566 中所述的白细胞介素-4 受体信号肽;美国专利 4,968,607 中所述的 I 型白细胞介素-1 受体信号序列;EP 专利 0 460846 中所述的 II 型白细胞介素-1 受体信号肽;人 IgK 的信号序列(其为 METDTLLLWVLLWVPGSTG ;SEQ ID NO :3);以及人生长激素的信号序列(MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEGSA ;SEQ ID NO :4)。这些参考文献的相关部分以引用的方式并入本文。许多其它信号序列在本领域中是已知的。

[0073] 如本文所指的“免疫球蛋白样”(Ig 样)结构域主要通过其三级结构来区分。参见例如 Bork 等(1994), J. Mol. Biol. 242 :309-20;Hunkapiller 和 Hood(1989), Adv. Immunol. 44 :1-63;Williams 和 Barclay(1988), Ann. Rev. Immunol. 6 :381-405。然而,可变和恒定免疫球蛋白样结构域在其一级氨基酸序列内的确含有存在于保守位置处的少数高度保守的氨基酸。参见例如 Kabat 等(1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, U. S. Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, NIH 出版号 91-3242。可变区以及 C_H1 和 C_H2 恒定区中的所述保守氨基酸详细论述于例如 Harpaz 和 Chothia(1994), J. Mol. Biol. 238 :528-39 以及 Williams 和 Barclay(1988), Ann. Rev. Immunol. 6 :381-405 中。这些参考文献的论述所述保守残基的部分以引用的方式并入本文。以适当间隔出现的所述高度保守氨基酸或其保守性变体的存在可指示 IgC 样或 IgV 样结构域的存在。

[0074] 可通过使用计算机程序 GAP, 即遗传学计算机组(GCG ;Madison, WI)威斯康星(Wisconsin)程序包 10.0 版程序 GAP(Devereux 等(1984), Nucleic Acids Res. 12 :387-95)比较序列信息来测定两个氨基酸序列或两个核酸序列的同一性百分比。GAP 程序的优选缺省参数包括:(1)用于核苷酸的一元比较矩阵(含有针对同一性的值 1 和针对非同一性的值 0)和 Gribskov 和 Burgess((1986)Nucleic Acids Res. 14 :6745)的加权氨基酸比较矩阵(如 Atlas of Polypeptide Sequence and Structure, Schwartz 和 Dayhoff 编, National Biomedical Research Foundation, 第 353-358 页(1979)中所述)或其它类似比较矩阵的 GCG 执行程序;(2)用于氨基酸序列的针对每个空位的罚分 8 和针对各空位中的每个符号的另一个罚分 2, 或用于核苷酸序列的针对每个空位的罚分 50 和针对各空位中的每个符号的另一个罚分 3;(3)针对末端空位的无罚分;以及(4)针对长空位无最大罚分。

[0075] 关于比较以测定多核苷酸或多肽的序列同一性,由“比对窗”所指的是通过使用本文所述的参数的计算机程序 GAP(Devereux 等(1984), Nucleic Acids Res. 12 :387-95),多核苷酸或多肽的与另一个多核苷酸或多肽部分或完全匹配的部分。例如,当使具有 20 个氨基酸的多肽与显著较长的蛋白质比对,并且前 10 个氨基酸完全匹配所述较长蛋白质,而后 10 个氨基酸完全不匹配所述较长蛋白质时,比对窗为 10 个氨基酸。另一方面,如果 20 个氨基酸的多肽的第一个氨基酸和最后一个氨基酸匹配较长蛋白质,并且八个其它氨基酸匹配散布在之间,那么比对窗的长度为 20 个氨基酸。然而,任一比对链中具有至少例如 25 个氨基酸或 75 个核苷酸的无相同或保守取代的氨基酸或相同核苷酸的长链段构成如本文所指的比对窗的终点。用于序列比较的比对窗的长度可为至少约 25、50、60、75、80、90、100、150、

200、225、300、400、450、500 或 600 个氨基酸或核苷酸。

[0076] 当如使用如上所述的 GAP 程序所确定,两个多肽或核苷酸序列是至少 90% 相同的,并且具有类似生物活性时,它们被视为“大致上类似的”。在如本文所述的 BTNL3 蛋白或其变体的情况下,待在确定两个序列是否大致上类似时测试的生物活性可为抑制由固定的抗 CD3 抗体活化的 T 细胞的增殖的能力,或对于某些拮抗性 BTNL3 变异蛋白来说可为拮抗所述抑制作用的能力。

[0077] BTNL 家族

[0078] BTNL3 已基于其结构域结构而被置于嗜乳脂蛋白样 (BTNL) 蛋白质家族内。参见例如 Arnett 等 (2008), *Current Immunology Reviews* 4:43-52 以及 Arnett 等 (2009), *Cytokine* 46:370-75。BTNL 家族中的人蛋白质包括 BTNL2、BTNL3、BTNL8、BTNL9、ERMAP 和 MOG,并且这些蛋白质的结构域结构示意性地示出于图 1 中。如由图 1 显而易见的,BTNL2 是家族中在其细胞外区域中具有四个免疫球蛋白样 (Ig 样) 结构域 (两个 IgV 样结构域和两个 IgC 样结构域) 的唯一成员。MOG 和 ERMAP 各自仅具有一个 Ig 样结构域。BTNL3、BTNL8 和 BTNL9 也具有一个明确为 IgV 样或 Ig 样结构域的细胞外结构域和具有与 Ig 样结构域类似的许多特征的另一个结构域,但这些结构域实际上不被分类为 Ig 样。所有 BTNL 家族成员都具有跨膜结构域。BTNL2 和 MOG 具有较短细胞内区域,而 BTNL3、BTNL8、BTNL9 和 ERMAP 具有含有 B30.2 结构域的较长细胞内区域。细胞内 B30.2 的功能是未知的,但已将一些蛋白质的 B30.2 结构域中的突变与某些疾病相关联。参见 Henry 等 (1998), *Mol. Biol. Evol.* 15:1696-1705,其相关公开以引用的方式并入本文。此外,已鉴定一些 B30.2 结构域的结合搭档 (binding partner),具体来说是结合 BTN1A1 B30.2 结构域的黄嘌呤氧化还原酶 (XOR)。参见例如 Jeong 等 (2009), *J. Biol. Chem.* 284:22444-22456。如由 Jeong 等所假设,XOR 和 BTN1A1 的相互作用可通过在 BTN1A1 与受体或细菌表面接合之后产生具有抗细菌特性的反应性氧和氮物质来在先天性免疫系统中起作用。同前,在第 11 页。反应性氧和氮物质也可作用于下游靶标,并且调控基因表达。同前。此外,BTN3A1 的 B30.2 结构域已被假设通过其对 BTN3A1 的细胞外结构域的三级结构的影响来在 γ δ T 细胞活化中起作用。Palakodeti 等 (2012), *J. Biol. Chem.* 287:32780-32790。此外,激动性抗 BTN3 抗体使由表达 BNT3 的淋巴细胞达成的增殖和细胞因子产生降低,所述作用与 BTN3A 的磷酸化相关。这些结果表明观察到的对淋巴细胞的作用归因于可能涉及 B30.2 结构域的细胞内信号传导。Yamashiro 等 (2010), *J. Leuk. Biol.* 88:757-767。

[0079] 以下示出人 BTNL3 与 BTNL 家族的其它人成员所共有的序列同一性程度。

[0080] 表 1:BTNL 蛋白质家族的人成员之间的同一性百分比

[0081]

	BTNL2	BTNL8	BTNL9	ERMAP	MOG
BTNL3	35%	74%	43%	41%	32%

[0082] 如图 1 中所示,BTNL3、BTNL8 和 BTNL9 具有类似的结构域结构。BTNL3 的氨基酸序列比其它 BTNL 蛋白的氨基酸序列更类似于 BTNL8 的氨基酸序列。

[0083] 除了序列同一性水平之外,如以下表 2 中所示,BTNL 蛋白家族内的某些位点高度保守,以下表 2 是所有六个人 BTNL 样蛋白的比对。比对下方是共有序列 (标记为“ALL”)。

169 216

BTNL3 GPOGQDLSSD SPANA.DGYS LYDVEISITIV QENA.GSILC SIHLAEQSHE

BTNL8 GPOGQDLSTD SRTNR.DMEG LFDVEISLTV QENA.GSISC SMRHAHLSRE

BTNL9 DHQGQCLPFE FEAIWDAQD LFSLETSVVV RAGALSNVSV SIONLLLSQK

ERMAPVA LAVILPVLVL LIMVCLCLIW KORRAKBKLL

MOGLV LLAVLPVLLL QITVGLVFLC LOYRLRGKLR

BTNL2 DMEGKYIPSS SQALTQGSHG LFHVQTLIRV TNISAVDVTC SISIPFLGEE

ALL LF V L V A I
L L V L V V
Y I I L
A F

217 254

BTNL3 VESKVLIGET FFQ.PSPWR. .LASILLGL LCGALCGVVMGM

BTNL8 VESRVQIGDT FFE.PISWH. .LATKVLGI LCCGLFFGIVGL

BTNL9 KELVVQIADV FVPGASAWKS AFVATLPLLL VLAALALGVL RKORRSREKL

ERMAP YEHVTEVDNL L..... SDHAKE....

MOG AE.IENLHRT F..... DPHFLRVPCW

BTNL2 KIATFSLSES .,RMTFLWKT LLVWGLLLAV AVGLPRKRS~ ~~~~~

ALL E I
V
L

255 297

BTNL3 IIVFFKSK..GKIQA ELDWRRKHGQ AELRDARKHA VEVTLDPETA

BTNL8 KIFFSKFQ..WKIQA ELDWRRKHGQ AELRDARKHA VEVTLDPETA

BTNL9 RKQAEKROEK LTAELEKLOT ELDWRAEGQ AEWRAAQKYA VDVTLDPASA

ERMAP KGKLRKAVKK LRSELK.... ...LKRAAAN SGWRRARLHF VAVTLDPDTA

MOG KITLEVIVPV LGPLVALIIC YNWLHRRLAG QFLEELLEPHL EALSG~~~~~

BTNL2 ~~~~~

ALL K F RR GQ R AR HA V VTLDPETA
R L K AN LQ L LS DS
A H F

298 344

BTNL3 HPKLCVS.DL KTVTHRKAPO .EVPHSEKRF TRKSVVAS.Q GFQAGKHYWE

BTNL8 HPKLCVS.DL KTVTHRKAPO .EVPHSEKRF TRKSVVAS.Q SFQAGKHYWE

BTNL9 HPSLEVSEDG KSVSSRGAPP GPAPGHPQRF SEQTCALSLE RFSAGRHYWE

ERMAP HPKLILSEDQ RCV.RLGDRR QPVPDNPQRF DFVVSILGSE YFTTGCHYWE

MOG ~~~~~

BTNL2 ~~~~~

ALL HPKL VS D KTV HR APQ VP KRF T KS VAS F AGKHYWE
L S R R A Q S QT AL R
I

345 394

BTNL3 VDVGQNVGWY VGVCRDDVDR GKNNVTLSPN NGYWVLRILT EHLYFTFNPH

BTNL8 VDGGHNRWR VGVCRDDVDR RKEYVTLSPD HGYWVLRING EHLYFTLNPR

BTNL9 VHVGRSRWF LGACLAAPR A.GPARLSPA AGYWVLRGLWN GCEYFVLAPH

ERMAP VYVGDKTKWI LGVCSESVSR .RGKVTASPA NGHWLLRQSR GNEYEALTSF

MOG ~~~~~

BTNL2 ~~~~~

ALL V VGQN RW VGVC D V R K VTLSP NGYWVLR L H LF L PH
HR K L A E A A H N F R
RK

[0087]

	395					444
BTNL3	FISLPPSTFP	TRVGVFLDYE	GGTISFFNTN	DQSLIYTLLE	COFEGLLRPY	
BTNL8	FISVFPRTFP	TKIGVFLDYE	CGTISFFNIN	DQSLIYT.LT	CRFEGLLRPY	
BTNL9	RVALTLRVFP	RRLGVFLDYE	AGELSHFFNVS	DGSHIFTEHD	.TFSGALCAY	
ERMAP	QTSFRLKEFP	RCVGFELDYE	AGVISFYNVV	NKSHIFTF.T	HNFSGPLRPF	
MOG	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
BTNL2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
ALL	SL R PP	RVGVFLDYE	G ISFFN	DQS IYT T	QF G LRPY	
	V K	KI I	L Y	K F	N F	
	F	L			R	
	445		466			
BTNL3	IQRAMYD.EE	KGTFIFICPV	SWG~~~~~	~~~~~	~~~~~	
BTNL8	IEYPSYN.EQ	NGTFIVICPV	TQESEKEASW	QRASAIPTS	NSESSSQATT	
BTNL9	FRPRAHDGGE	HPDPLTICPL	P.....	VRGTGVPEEN	DSDTWLQPYE	
ERMAP	FEPCLHDGGK	NTAPLVICSE	LHKSEESTVP	RPEGKGHANG	DVSLKVNSSL	
MOG	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
BTNL2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
ALL	I M D	K PIFICPV	E	R SAIPPE	DSES QAT	
	F A	N LV L		TGV	DT NPS	
	L	H		G		
BTNL3	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
BTNL8	PFLPRGEM	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
BTNL9	PADPALDWW	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
ERMAP	LPPKAPKLD	IILSLPPDLG	PALQELKAPS	F		
MOG	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
BTNL2	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	~~~~~	
ALL	PF PA EM					
	A DL					

[0088] 本领域技术人员将了解,这些蛋白质之间的共有序列反映可对这些蛋白质的结构或功能而言重要的特征。鉴于其表达模式不同,这些蛋白质可能并不具有相同功能,并且因此,对各蛋白质的功能而言重要的所有氨基酸在家族内不可能都是保守的。然而,许多保守氨基酸可对维持适当结构而言是重要的,其当然为功能所必需。在许多位点处,为彼此的保守性变化形式的两个或更多个氨基酸中的一个存在于 BTNL 家族的所有或大多数成员中。本领域技术人员将了解, BTNL3 中的所述保守性变化形式将可能不不利影响功能。例如,在 SEQ ID NO :2 的位置 36 处(其具有与以上表 2 的比对相同的编号), BTNL 家族的各个成员具有三个不同疏水性氨基酸中的一个,即丙氨酸(BTNL3、BTNL8 和 ERMAP)、异亮氨酸(BTNL2)或缬氨酸(BTNL3 和 MOG)。本领域技术人员将了解,在 BTNL3 氨基酸序列的这个位置处从缬氨酸变化成丙氨酸或异亮氨酸将不可能影响功能。类似考虑将应用在家族内存在保守性变化形式所处的所有位点处。因此,如本文所指的 BTNL3 蛋白包括包含 SEQ ID NO :2 的蛋白质或其片段,其中序列可在 BTNL 家族的成员之中存在保守性变化形式所处的位点处通过保守性变化形式改变,并且其中所述蛋白质可抑制 T 细胞的增殖,如通过以下实施例中所述的方法所测量。所述位点包括例如 SEQ ID NO :2 的位置 3、16、20、28、30、32、34、35、36、38、42、48、53、55、63、64、66、67、68、69、72、79、81、82、87、88、89、91、97、98、100、101、104、112、116、128、165、189、191、195、197、201、204、223、255、258、272、276、277、283、284、287、290、291、303、308、311、316、318、323、326、328、329、331、332、340、349、350、352、355、357、360、369、371、375、386、391、394、398、401、406、407、409、418、421、426、430、436 和 444。此外,在 BTNL3 内其它位点处的变异也可被耐受而不影响功能。例如,非保守位置处的保守性取代将不可能影响功能。

[0089] 因此,如本文所指的 BTNL3 蛋白包括以下蛋白质:(1) 具有天然存在的多态性或重组引入的氨基酸变化,(2) 与 SEQ ID NO:2 和 / 或与 SEQ ID NO:2 的氨基酸 18-236 和 / 或与 SEQ ID NO:9 的氨基酸 18-166 至少 90%、95%、96%、97%、98% 或 99% 相同,以及 (3) 如通过本文所述的方法所测量,保留减弱 T 细胞增殖的能力,或充当天然 BTNL3 的抑制剂。一些所述多态性可增强 BTNL3 蛋白抑制 T 细胞增殖的能力和 / 或可使得 BTNL3 蛋白较易于在商业生产过程中产生。其它所述多态性可产生天然 BTNL3 的抑制剂。这些多态性可存在于 BTNL3 内的不保守位点处,例如像位置 22、25、26、27、29、37、39、4143、45、46、47 和在表 2 中显示为非保守的任何其它位点。

[0090] 已在一定程度上在一些情况下,但未在其它情况下探究了 BTNL 蛋白的表达模式和生物功能。ERMAP 在红血细胞的表面上表达,并且尚未被指定特定生物功能。MOG 是髓鞘的组分。ERMAP 和 MOG 均不被认为在免疫系统中起作用,尽管常在患有多发性硬化症的患者中检测到针对 MOG 的抗体。BTN1 与 MOG 同源,并且 BTN1 发现于牛奶中。已假设人消耗牛奶可导致产生针对 BTN1 的与人 MOG 交叉反应的抗体,由此导致自身免疫性疾病,如多发性硬化症。参见 Guggenmos 等 (2004), J. Immunol. 172 :61-68。BTNL2 已显示出抑制 T 细胞增殖和细胞因子分泌,但不抑制 B 细胞增殖。因此,BTNL2 被认为充当 T 细胞介导的事件的负辅调节因子 (negative co-regulator)。参见例如美国专利 7, 244, 822, 其相关部分以引用的方式并入本文。已将 BTNL2 中的多态性与类肉瘤病明确关联,从而表明 BTNL2 可在引发或介导或促进此疾病或此疾病做出反应方面起作用。Valentonyte 等 (2005), Nature Genetics 37(4) :357-64。已描绘各种 BTNL2 多态性与溃疡性结肠炎、类风湿性关节炎、自发性包涵体肌炎、全身性红斑狼疮、I 型糖尿病、结核样麻风和抗原特异性 IgE 反应性之间的更具试探性关联。Arnett 等 (2009), Cytokine 46 :370-75。

[0091] 已报道在各种细胞类型和组织中编码各种 BTNL 蛋白的 RNA 的水平。BTNL3 在回肠、小肠、结肠、肝、肺、骨髓和脾中表达。Arnett 等 (2009), Cytokine 46 :370-375。在与免疫功能相关的已测试 BTNL3 表达的各种细胞类型之中,BTNL3RNA 主要在嗜中性白细胞中表达。Arnett 等 (2009), Cytokine 46 :370-75。BTNL3RNA 在免疫功能中涉及的细胞中的表达表明 BTNL3 可通过驱动炎症性反应或在爆发 (flare) 之后减弱反应来在免疫功能中起作用。

[0092] BTNL3 蛋白

[0093] 本发明涵盖分泌的可溶性形式的 BTNL3,其可任选通过连接至如纳米粒子、珠粒或微量滴定板的表面来固定;以及可在细胞表面上表达的包含跨膜结构域的形式。所述 BTNL3 蛋白可抑制由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖。一些变异 BTNL3 蛋白也具有这种活性,但也涵盖拮抗此抑制作用的变体。所述蛋白质可为分离的,也就是说为纯化蛋白质制剂的一部分,其中 BTNL3 蛋白构成制剂中存在的蛋白质的至少 80% 或至少 90%。本发明还包括由下述 BTNL3 核酸编码的 BTNL3 蛋白。如本文所指的 BTNL3 蛋白涵盖包含氨基酸序列 SEQ ID NO:2、6、7 或 9 的蛋白质及其片段、衍生物和变体,包括融合蛋白和多聚体,如以上和以下所论述。氨基酸序列 SEQ ID NO:2、6 和 9 包括在位置 1 处起始,并且在从约位置 15 至约位置 20 的位置处,任选地在位置 17 处结束的信号序列。因此,成熟 BTNL3 的氨基酸序列在从 SEQ ID NO:2、6 或 9 的约 16 至约位置 21 的位置处开始。任选地,BTNL3 的成熟氨基酸序列在 SEQ ID NO:2、6 或 9 的位置 18 处开始。

[0094] 接着BTNL3的信号序列的是从SEQ ID NO:2、6或9的约位置25延伸至约位置131的Ig样结构域。从SEQ ID NO:2或6的约位置132至约位置236的随后区域与BTNL2中的IgC样结构域对准,但缺乏通常见于IgC1样结构域中的一些特征性序列特征。参见例如Williams和Barclay(1988), *Ann. Rev. Immunol.* 6:381-405;Peach等(1995), *J. Biol. Chem.* 270(36):21181-21187。在为由BTNL3的剪接变体编码的氨基酸序列的氨基酸序列SEQ ID NO:9中,这个结构域大致上缩短。BTNL3的跨膜结构域在SEQ ID NO:2的约位置237或SEQ ID NO:9的约位置167处开始,并且在SEQ ID NO:2的约位置259或SEQ ID NO:9的约位置189处结束。BTNL3的细胞内部分在SEQ ID NO:2的约位置260处开始,并且在位置466处结束,或在SEQ ID NO:9的约位置190处开始,并且在位置432处结束。细胞内区域含有从SEQ ID NO:2的约位置288延伸至约位置445,或从SEQ ID NO:9的约位置254延伸至位置411的B30.2结构域。B30.2结构域是具有约170个氨基酸的球形结构域。Henry等(同上)较详细地论述B30.2结构域,并且提供许多B30.2结构域的比对和由比对获得的共有序列。Henry等(1998), *Mol. Biol. Evol.* 15(12):1696-1705的显示(通过序列比较)和说明B30.2结构域是什么的部分以引用的方式并入本文。B30.2结构域也见于BTNL9、BTNL8和ERMAP中,它们全部都是如本文论述的嗜乳脂蛋白样蛋白质家族的成员。以上表2中从约位置288至445的BTNL蛋白的比对展现出高度同源性,确定地高于在由Henry等(同上)比对的更迥异集合的含有B30.2结构域的蛋白质之间观察到的同源性。

[0095] 类似地,具有氨基酸序列SEQ ID NO:9的蛋白质包括在位置1处起始,并且在从约位置15至约位置20的位置处,任选地在位置17处结束的信号序列。因此,成熟蛋白质的氨基酸序列在从SEQ ID NO:2的约16至约位置21的位置处开始。任选地,成熟氨基酸序列在SEQ ID NO:9的位置18处开始。这接着是从SEQ ID NO:9的约25延伸至131的IgV样结构域。在SEQ ID NO:9中,存在于SEQ ID NO:2中的大部分随后结构域是缺失的。跨膜结构域在SEQ ID NO:9的约位置167处开始,并且延伸至SEQ ID NO:9的约位置189。在超出跨膜结构域约10个氨基酸处开始,SEQ ID NO:9包括未见于SEQ ID NO:2中的36个氨基酸的链段。B30.2结构域在SEQ ID NO:9的约位置254处开始,并且在SEQ ID NO:9的约位置411处结束。

[0096] 如本文所指的BTNL3蛋白包括包含至少两个BTNL3蛋白的异多聚体和同多聚体。在一些实施方案中,生物活性多聚体可为同多聚体。所述同多聚体的大小可通过聚丙烯酰胺凝胶电泳在非还原性条件下,或通过尺寸排阻色谱来测定。所述多聚体中含有的单体BTNL3蛋白的大小可通过多聚体在还原性条件下的聚丙烯酰胺凝胶电泳来测定。预期所述条件会破坏二硫桥键,并且干扰非共价相互作用,如氢键或电荷相互作用。因此,预期通过二硫键或非共价相互作用保持在一起的多聚体会在还原性条件下被还原成单体。在一些实施方案中,生物活性BTNL3同多聚体的大小可为单体BTNL3蛋白的大小的至少约两倍、三倍、四倍、五倍、六倍、七倍、八倍、九倍、十倍、十一倍、十二倍、十三倍、十四倍、十五倍或十六倍。在一些实施方案中,所述同多聚体的大小可为单体BTNL3蛋白的大小的至多约两倍、三倍、四倍、五倍、六倍、七倍、八倍、九倍、十倍、十一倍、十二倍、十三倍、十四倍、十五倍或十六倍。

[0097] 如本文所指的BTNL3蛋白也包括由全长BTNL3mRNA的剪接变体编码的蛋白质。BTNL3的cDNA编码序列从SEQ ID NO:1的位置1延伸至1401,其中最后三个核苷酸为终止

密码子。编码序列在第一外显子内起始。最常见的剪接变体含有八个外显子：外显子 1，编码 SEQ ID NO :2 的氨基酸 1-16；外显子 2，编码 SEQ ID NO :2 的氨基酸 17-132；外显子 3，编码 SEQ ID NO :2 的氨基酸 133-224；外显子 4，编码 SEQ ID NO :2 的氨基酸 225-262；外显子 5，编码 SEQ ID NO :2 的氨基酸 263-269；外显子 6，编码 SEQ ID NO :2 的氨基酸 270-278；外显子 7，编码 SEQ ID NO :2 的氨基酸 279-287；以及外显子 8，编码氨基酸 288-466。然而，可变剪接可产生包括不同外显子的不同信息。这些信息中的一个由 Shibui 和同事克隆。Shibui 等 (1999), *J. Hum. Genet.* 44 :249-252。Shibui 等中报道的来自克隆 Co1F4100 的氨基酸序列以引用的方式并入本文。来自 GenBank 登记号 AB020625 的编码此氨基酸序列的 cDNA 序列也以引用的方式并入本文。由此剪接变体编码的蛋白质缺乏 SEQ ID NO :2 的由第三和第四外显子编码的部分。因此，所编码的蛋白质缺失成熟 BTNL3 蛋白的大部分第二 Ig 样结构域。比较 SEQ ID NO :2 与 SEQ ID NO :9。此外，SEQ ID NO :9 的细胞内区域包括未见于 SEQ ID NO :2 中的序列 (SEQ ID NO :9 的残基 200-235)。此剪接变体中的额外氨基酸的插入和缺失均是使用非典型剪接位点的结果。类似于 SEQ ID NO :2，SEQ ID NO :9 含有在从 SEQ ID NO :9 的 16 至 21 的残基处，任选地在残基 17 处结束的信号序列。

[0098] 可能形成其它剪接变体。例如，涵盖缺失外显子 2 或 3 中的任一个的剪接变体，所述外显子 2 或 3 为编码两个细胞外结构域中的任一个的外显子中的一个。类似地，涵盖缺失外显子 5、6、7 或 8 中的任一个的剪接变体。如本文所指的 BTNL3 蛋白可由缺失各种外显子的剪接变体编码。此外，剪接变体可使用隐蔽剪接位点。

[0099] 在一些实施方案中，BTNL3 蛋白可为包含 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :9 的全长跨膜蛋白质的可溶性片段或其变体。在一些实施方案中，BTNL3 蛋白包含 BTNL3 的包含免疫球蛋白样结构域的片段，所述结构域从 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :9 的残基 12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 延伸至 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :9 的残基 120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139 或 140。所述实施方案可或不包括从 SEQ ID NO :2 的残基 121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139 或 140 延伸至 SEQ ID NO :2 的残基 230、231、232、233、234、235、236、237 或 238 的所有随后结构域。例如，SEQ ID NO :9 缺乏存在于 SEQ ID NO :2 的位置 158 至 227 处的氨基酸。还涵盖缺乏此结构域的其他部分的变体。在其它实施方案中，BTNL3 蛋白可包含从 SEQ ID NO :2 的残基 121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139 或 140 延伸至 SEQ ID NO :2 的残基 220、221、222、223、234、235、236、237、238、239、230、231、232、233、234、235、236、237 或 238 的片段。所述实施方案可或不包括从 SEQ ID NO :2 的残基 12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 延伸至 SEQ ID NO :2 的残基 120、121、122、123、124、125、126、127、128、129、130、131、132、133、134、135、136、137、138、139 或 140 的先前结构域。BTNL3 蛋白可包含包括 BTNL3 的大部分或全部细胞外区域的片段。所述蛋白质可包含从 SEQ ID NO :2 的残基 12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 延伸至 SEQ ID NO :2 的残基 220、221、222、223、234、235、236、237、238、239、230、231、232、233、234、235、236、237 或 238，任选地从 SEQ ID NO :2 的约残基 18 延伸至约残基 236 的氨基酸序列。或者，可溶性 BTNL3 蛋白可包含包括大部分或全部细胞外区域的片段，所述细胞外区域从 SEQ ID NO :9 的残基 12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、

22、23、24、25、26、27、28、29 或 30 延伸至 SEQ ID NO :9 的残基 155、156、157、158、159、160、161、162、163、164、165、166、167、168、169、170。所有这些片段相对于 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :9 都可含有变化,并且相对于 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :9 可含有限定数目的单一氨基酸的取代、插入或缺失,如下所述。这些实施方案可抑制由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖。不包含 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 的氨基酸序列的一些 BTNL3 蛋白变体可拮抗对由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖的抑制作用。

[0100] 本发明涵盖 BTNL3 蛋白的适用于产生抗体的表位,其在本文中称为免疫原性片段。免疫原性片段优选为至少 10 个氨基酸长,并且可包含来自 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :9 的连续氨基酸。所述表位可跨越 BTNL3 蛋白的由剪接点编码的区域,这可具有特异性结合由特定剪接变体编码的蛋白质的优势。在一些实施方案中,表位位于 BTNL3 的细胞外区域内,所述细胞外区域从 SEQ ID NO :2 的约氨基酸位置 18 延伸至约位置 236,或从 SEQ ID NO :9 的约残基 18 延伸至约残基 166。表位可部分或完全在第一免疫球蛋白可变区样结构域内,所述结构域从 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :9 的约氨基酸位置 25 延伸至位置 131。或者,表位可部分或完全在从 SEQ ID NO :2 的约氨基酸位置 132 延伸至 236 的随后结构域内。在 SEQ ID NO :9 中,大致上缩短的这个结构域从 SEQ ID NO :9 的约位置 132 延伸至 166。这个缩短的结构域还可含有抗体所结合的表位的一部分或全部。

[0101] 如本文所指的 BTNL3 蛋白相对于 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :9 或相对于以上论述的 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :9 的一个片段或部分可含有一个或多个单一氨基酸的插入、缺失或取代。在一些实施方案中, BTNL3 蛋白相对于 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :9 或相对于以上论述的 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :9 的一个片段含有至多 20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2 或 1 个单一氨基酸的取代、插入或缺失。在本发明的范围内的所述 BTNL3 蛋白变体可保留减弱 T 细胞增殖的能力,或可充当未改变的 BTNL3 蛋白对 T 细胞增殖的这种减弱作用的抑制剂或拮抗剂,如通过本文所述的方法所测定。

[0102] 在一些实施方案中,取代可为保守性氨基酸取代。不可能影响生物活性的保守性氨基酸取代的实例包括以下:丙氨酸取代丝氨酸、缬氨酸取代异亮氨酸、天冬氨酸取代谷氨酸、苏氨酸取代丝氨酸、丙氨酸取代甘氨酸、丙氨酸取代苏氨酸、丝氨酸取代天冬酰胺、丙氨酸取代缬氨酸、丝氨酸取代甘氨酸、酪氨酸取代苯丙氨酸、丙氨酸取代脯氨酸、赖氨酸取代精氨酸、天冬氨酸取代天冬酰胺、亮氨酸取代异亮氨酸、亮氨酸取代缬氨酸、丙氨酸取代谷氨酸、天冬氨酸取代甘氨酸,以及这些变化的逆转。参见例如 Neurath 等, *The Proteins*, Academic Press, New York (1979), 其相关部分以引用的方式并入本文。此外,一组内的一个氨基酸交换成同一组内的另一个氨基酸是保守性取代,其中所述组为以下:(1) 丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、甲硫氨酸、正亮氨酸和苯丙氨酸;(2) 组氨酸、精氨酸、赖氨酸、谷氨酰胺和天冬酰胺;(3) 天冬氨酸和谷氨酸;(4) 丝氨酸、苏氨酸、丙氨酸、酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和半胱氨酸;以及(5) 甘氨酸、脯氨酸和丙氨酸。如上所述,当比对 BTNL 家族成员时(如表 2 中),存在保守性取代的位点是保守性取代尤其不可能影响功能的位点。类似地,高度保守残基,例如 SEQ ID NO :2 的残基 2、40、57 和 65 以及许多其它残基可能具有较小取代耐受性。

[0103] BTNL3 蛋白或其变体可与 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :9 至少 85%、90%、95%、

96%、97%、98%或99%相同,其中比对窗的长度为至少50、60、75、80、90或100个氨基酸,并且其中BTNL3蛋白可抑制用固定的抗CD3抗体活化的T细胞的增殖。如上所论述,序列与其它人BTNL家族成员不匹配可指导本领域技术人员在SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:9的序列何处可进行修饰而不影响功能。在一些实施方案中,插入、缺失或取代可存在于或邻近于在人BTNL家族成员之间不保守的残基处。参见表2。在一些实施方案中,这些改变存在于(在缺失或取代的情况下)或邻近于(在插入的情况下)SEQ ID NO:2的一个或多个以下非保守残基处:22、25-27、29、37、39、41、43、45-47、49、50、56、58-62、71、73-76、80、86、93、94、96、102、103、105-107、109、111、113、115、117-123、126、127、130、132-137、139-158、160-162、164、166-187、190、192-194、196、198-200、202-203、205-217、219-222、和/或224-236。还涵盖在其中存在所述类似位点的SEQ ID NO:9中的类似位点处的改变。或者,BTNL3蛋白相对于SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:9可含有至多1、2、3、4、5、6、8、10、15、20、25或30个氨基酸取代、缺失或插入。上述蛋白质是如本文所指的BTNL3蛋白或其变体,只要它们可抑制由固定的抗CD3抗体活化的T细胞的增殖或拮抗由包含氨基酸序列SEQ ID NO:7的BTNL3蛋白达成的所述抑制作用即可。

[0104] BTNL3蛋白可在不同程度上被糖基化或不被糖基化。作为说明,除了已见于包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:9的蛋白质中的糖基化位点之外,BTNL3蛋白还可包含一个或多个N-连接或O-连接的糖基化位点。SEQ ID NO:2在位置103和368处含有两个潜在的N-连接的糖基化位点。SEQ ID NO:9在位置103和334处含有潜在的N-连接的糖基化位点。SEQ ID NO:2或9的位置103处的潜在的N-连接的糖基化位点还在与BTNL3最密切相关的BTNL蛋白BTNL8中存在。因此,这个糖基化位点可在BTNL3功能或结构中起作用。本领域技术人员将了解,作为序列Asn Xxx Ser/Thr(其中Xxx是除脯氨酸之外的任何氨基酸)的一部分的天冬酰胺残基可充当添加N-聚糖的位点。此外,存在可充当O-连接的糖基化位点的许多丝氨酸和苏氨酸残基。糖基化可增加体内半衰期或改变生物活性。BTNL3蛋白的变体也包括包含的N-连接和/或O-连接的糖基化位点比SEQ ID NO:2中存在的糖基化位点多一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个或十个的蛋白质,只要所得蛋白质可抑制T细胞的增殖即可。变异BTNL3蛋白也包括具有的N-连接和/或O-连接的糖基化位点比SEQ ID NO:2中存在的糖基化位点少一个、两个、三个、四个或五个的蛋白质,只要所述蛋白质可抑制用固定的抗CD3抗体活化的T细胞的增殖或可抑制未突变形式的BTNL3蛋白这样做的能力即可。

[0105] 如本文所指的BTNL3蛋白可为包含至少一个BTNL3多肽和至少一个其它部分的融合蛋白,所述多肽可包含为SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:9的变体和/或片段(如上所说明)的氨基酸序列。其它部分可为不同于BTNL3蛋白的多肽。其它部分也可为非蛋白质部分,例如像聚乙二醇(PEG)部分或细胞毒性、细胞抑制性、发光性和/或放射性部分。

[0106] 已显示连接PEG会增加至少一些蛋白质的体内半衰期。此外,出于诊断或治疗目的,已使细胞毒性、细胞抑制性、发光性和/或放射性部分融合于抗体,例如以定位所述抗体可结合的细胞,抑制所述细胞的增殖,或杀死所述细胞。类似地,融合于所述部分的BTNL3蛋白可用于定位BTNL3可结合的细胞,抑制所述细胞的增殖,或杀死所述细胞,所述细胞例如免疫反应中涉及的细胞。在所述细胞毒性、细胞抑制性、发光性和/或放射性部分之中的是例如美登素(maytansine)衍生物(如DM1)、肠毒素(如葡萄球菌肠毒素

(Staphylococcal enterotoxin))、碘同位素(如碘-125)、锝同位素(如 Tc-99m)、花青(cyanine) 荧光染料(如 Cy5. 5. 18)、核糖体失活蛋白(如三角梅毒蛋白(bouganin)、白树毒素(gelonin) 或皂素-S6(saporin-S6)) 以及为在商标 MYLOTARG™(Wyeth-Ayerst) 下销售的产品的一部分的细胞毒性物质卡奇霉素(calicheamicin)。

[0107] 不同于 BTNL3 的多种多肽可出于多种目的融合于 BTNL3 多肽, 所述目的例如像增加蛋白质的体内半衰期, 有助于鉴定、分离和 / 或纯化蛋白质, 增加蛋白质的活性, 以及促进蛋白质的寡聚化。

[0108] 许多多肽可有助于鉴定和 / 或纯化它们是其中一部分的重组融合蛋白。实例包括聚精氨酸、聚组氨酸或 HAT™(Clontech), 所述 HAT™为对固定的金属离子具有高亲和力的非邻近组氨酸残基的天然存在的序列。包含这些多肽的 BTNL3 蛋白可例如通过亲和色谱, 使用固定的镍或 TALON™树脂(Clontech) 来纯化, 所述 TALON™树脂包含固定的钴离子。参见例如 Knol 等(1996), J. Biol. Chem. 27(26):15358-15366。包含聚精氨酸的多肽允许通过离子交换色谱进行有效的纯化。其它适用多肽包括例如美国专利 5,011,912 和 Hopp 等(1988), Bio/Technology 6:1204 中所述的抗原鉴定肽。一种所述肽为 FLAG®肽, 其具有高度抗原性, 并且提供由特定单克隆抗体可逆结合, 从而使得能够快速测定和容易纯化所表达的重组融合蛋白的表位。称为 4E11 的鼠类杂交瘤产生在某些二价金属阳离子存在下结合 FLAG®肽的单克隆抗体, 如美国专利 5,011,912 中所述。4E11 杂交瘤细胞系已在登记号 HB 9259 下寄存在美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)。结合 FLAG®肽的单克隆抗体可用作用以回收包含 FLAG®肽的多肽纯化试剂的亲和试剂。其它合适的蛋白质标签和亲和试剂为: 1) GST-Bind™系统(Novagen) 中所述的那些, 所述系统利用谷胱甘肽-S-转移酶融合蛋白对固定的谷胱甘肽的亲和力; 2) T7-TAG®亲和纯化试剂盒(Novagen) 中所述的那些, 所述试剂盒利用 T7 基因 10 蛋白质的氨基末端 11 个氨基酸对单克隆抗体的亲和力; 或 3) STREP-TAG®系统(Novagen) 中所述的那些, 所述系统利用工程改造形式的抗生蛋白链菌素(streptavidin) 对蛋白质标签的亲和力。一些以上提及的蛋白质标签以及其它标签描述于 Sassenfeld(1990), TIBTECH 8:88-93; Brewer 等, Purification and Analysis of Recombinant Proteins, 第 239-266 页, Seetharam 和 Sharma(编), Marcel Dekker, Inc. (1991); 以及 Brewer 和 Sassenfeld, Protein Purification Applications, 第 91-111 页, Harris 和 Angal(编), Press, Inc., Oxford England(1990) 中。这些参考文献的描述蛋白质标签的部分以引用的方式并入本文。此外, 可使两个或更多个上述标签的融合物, 例如像 FLAG 标签和聚组氨酸标签的融合物, 融合于本发明的 BTNL3 蛋白。

[0109] 包含不同于 BTNL3 的多肽的重组融合蛋白可具有其它种类的独特优势, 例如像倾向于形成二聚体、三聚体或更高级多聚体, 体内半衰期增加和 / 或生物活性增加。当与例如“二聚体”连起来使用时, “更高级多聚体”是指含有两个以上多肽链的多聚体。当在如“三聚体或更高级多聚体”的短语中使用时, 更高级多聚体含有三个以上多肽链。因此, 更高级多聚体是具有的多肽链多于与其相比的多聚体的多聚体。用于制备融合蛋白的技术是已知的, 并且描述于例如国际申请 WO 99/31241 和 Cosman 等((2001). Immunity 14:123-133) 中。

[0110] 作为说明,可使包含任选地为 IgG 抗体的抗体的 Fc 区的多肽或大致上类似蛋白质融合于 BTNL3 多肽或其片段。抗体的 Fc 区是包含来自抗体的大部分或全部铰链加 C_H2 和 C_H3 结构域或大致上类似于这些结构域的免疫球蛋白结构域的多肽。对于论述,参见 Hasemann 和 Capra, *Immunoglobulins: Structure and Function*, William E. Paul 编, *Fundamental Immunology*, 第二版, 212-213 (1989)。Fc 片段可为人 IgG Fc, 如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 Fc。Fc 片段可为天然人或动物 Fc 片段。也可使用 Fc 区的促进二聚化的截短形式,即缺失铰链、C_H2 和 / 或 C_H3 结构域的某一部分的形式。可使用抗体的其它部分和其它免疫球蛋白同种型。包含抗体的 Fc 区的重组融合蛋白有可能形成二聚体或更高级多聚体。包含抗体衍生蛋白质的各种部分的融合蛋白已由 Ashkenazi 等 ((1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 :10535-39)、Byrn 等 ((1990), *Nature* 344 :677-70)、Hollenbaugh 和 Aruffo (*Current Protocols in Immunology*, 增刊 4, 第 10. 19. 1-10. 19. 11 页 (1992))、Baum 等 ((1994), *EMBO J.* 13 :3992-4001) 以及在美国专利 5, 457, 035 和国际申请 WO 93/10151 中描述,所述文献、专利和申请的相关部分以引用的方式并入本文。在一些实施方案中,改变的 Fc 区可具有相较于野生型 Fc 区,对 Fc 受体的亲和力较低的优势。这可为一种优势,因为这可使所述重组融合蛋白通过免疫效应细胞结合的细胞的溶解减少。对 Fc 区的所述改变描述于美国专利 5, 457, 035 和国际专利申请 WO 93/10151 中,所述专利和申请的相关部分以引用的方式并入本文。以下实施例 2 描述含有人 BTNL3 的细胞外区域和人 IgG1 抗体的 Fc 区的融合蛋白的产生。

[0111] 或者, BTNL3 融合蛋白可包含如本文所述的 BTNL3 多肽的全部或一部分加具有增加融合蛋白的半衰期的作用的非 Fc 多肽,例如像血清白蛋白(任选地为人蛋白质)或其片段或结合血清白蛋白或其片段的蛋白质。在一些实施方案中,此额外多肽可为任选地为人蛋白质的纤连蛋白的全部或一部分。

[0112] 包含 BTNL3 蛋白的重组融合蛋白可包含含有亮氨酸拉链的多肽。在已知亮氨酸拉链序列之中的是促进二聚化的序列和促进三聚化的序列。参见例如 Landschulz 等 (1988), *Science* 240 :1759-64, 其相关部分以引用的方式并入本文。亮氨酸拉链包含重复性七氨基酸重复肽,常为散布有其它氨基酸的四个或五个亮氨酸残基。使用和制备亮氨酸拉链在本领域中是熟知的。BTNL3 融合蛋白可包含一个或多个肽接头。通常,肽接头是用于连接多个多肽以形成多聚体,并且提供为蛋白质的连接部分的期望功能所需的可挠性或刚性的氨基酸链段。通常,肽接头的长度在约 1 个与 30 个氨基酸之间。肽接头的实例包括但不限于 --Gly-Gly--、GGGGS (SEQ ID NO :10)、(GGGGS)_n (SEQ ID NO :11)、GKSSGSGSESKS (SEQ ID NO :12)、GSTSGSGKSSEGKG (SEQ ID NO :13)、GSTSGSGKSSEGSSTKG (SEQ ID NO :14)、GSTSGSGKSSEGKG (SEQ ID NO :15)、GSTSGSGKPGSGEGSTKG (SEQ ID NO :16)、EGKSSGSGSESKEF (SEQ ID NO :17) 和 GGGSGGGGS GGGGS (SEQ ID NO :18)。连接部分描述于例如 Huston, J. S. 等, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85 :5879-83 (1988); Whitlow, M. 等, *Protein Engineering* 6 :989-95 (1993); Newton, D. L. 等, *Biochemistry* 35 :545-53 (1996); 以及美国专利 4, 751, 180 和 4, 935, 233 中。这些参考文献的相关部分,即描述接头的部分,以引用的方式并入本文。

[0113] 或者,本文描述 BTNL3 变异蛋白,其可拮抗包含氨基酸序列 SEQ ID NO :7 的 BTNL3 蛋白对由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖的抑制作用。所述 BTNL3 变体可包含与

SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 至少约 90%、95% 或 98% 相同的氨基酸序列和 / 或可包含相对于 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 含有至多 20、15、10、8 或 5 个单一氨基酸的插入、缺失或取代的氨基酸序列。所述变体不含有与 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18-236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18-166 相同的氨基酸序列。

[0114] 重组 BTNL3 融合蛋白可包含缺乏其正常信号序列, 并且替代地具有替代所述正常信号序列的不同信号序列的 BTNL3 蛋白。对信号序列的选择取决于待在其中产生重组蛋白的宿主细胞的类型, 并且不同的信号序列可替代天然信号序列。在哺乳动物宿主细胞中具有功能的信号序列的实例包括以下: 美国专利 4, 965, 195 中所述的白细胞介素 -7 (IL-7) 的信号序列; 人 IgK 的信号序列 (其为 METDTLLLWVLLL WVPGSTG ;SEQ ID NO :3) ;人生长激素的信号序列 (其为 MATGSR TSLLLAFGLLCLPWLQEGSA ;SEQ ID NO :4) ;Cosman 等 ((1984), Nature 312 :768) 中所述的白细胞介素 -2 受体的信号序列 ;EP 专利 0 367 566 中所述的白细胞介素 -4 受体信号肽 ;美国专利 4, 968, 607 中所述的 I 型白细胞介素 -1 受体信号肽 ;以及 EP 专利 0 460 846 中所述的 II 型白细胞介素 -1 受体信号肽。这些参考文献的描述这些信号序列的部分以引用的方式并入本文。

[0115] BTNL3 核酸

[0116] 本发明涵盖分离的核酸, 包括例如编码本文所述的 BTNL3 蛋白的 DNA 和 RNA, 所述 BTNL3 蛋白包括包含氨基酸序列 SEQ ID NO :2 或 SEQ ID NO :9 的蛋白质及其片段和 / 或变体。所述核酸包括不包括外显子序列的 DNA。这些核酸尤其适用于产生重组蛋白和检测 BTNL3 核酸在组织样品中的存在性来例如供诊断使用。所述核酸可为基因组 DNA 或 cDNA。如本领域中所知, cDNA 序列不包括可存在于基因组 DNA 中的外显子序列。核酸可包含不间断的编码 BTNL3 蛋白的开放阅读框。本发明的核酸分子包括呈单链形式和双链形式的 DNA 和 RNA 以及相应的互补序列。在从天然存在的来源分离核酸的情况下, “分离的核酸” 是已与自其分离核酸的生物体的基因组中存在的邻近遗传序列分离的核酸。在化学合成核酸 (如寡核苷酸) 或由模板酶促合成核酸 (如聚合酶链式反应 (PCR) 产物或 cDNA) 的情况下, 应了解, 由所述方法得到的核酸是分离的核酸。分离的核酸分子是指呈单独片段形式或呈较大核酸构建体 (如载体) 的组分形式的核酸分子。

[0117] 此外, 本发明涵盖编码 BTNL3 蛋白的核酸的片段, 其可充当 (1) 用于通过本领域中熟知的许多方法, 例如 DNA 和 RNA 印迹、点印迹、菌落杂交、与芯片杂交等来检测 BTNL3 核酸的探针, (2) 用以扩增 BTNL3 核酸的聚合酶链式反应 (PCR) 引物, 或 (3) 用以例如通过用反义核酸 (包括肽核酸)、核酶、三螺旋形成分子或干扰 RNA 抑制表达来调控 BTNL3 核酸的表达的手段。编码这些 RNA 中的任一个的 DNA 也是如本文所指的 BTNL3 核酸。除了 BTNL3 核酸序列之外, PCR 引物可包含有助于使用所扩增的核酸的其它序列, 如限制酶裂解位点。PCR 描述于例如以下参考文献中 :Saiki 等 (1988), Science 239 :487-91 ; PCR Technology, Erlich 编, Stockton Press, (1989)。如以下所说明, PCR 可适用于检测 BTNL3mRNA 的过表达或欠表达, 并且 PCR 引物可取自 BNTL3 基因的各种部分并也可被选择来区分不同的剪接变体。反义 RNA (和编码它们的 DNA)、DNA 或合成核苷酸以及它们调控表达的用途在本领域中是熟知的, 并且描述于例如 Izant 和 Weintraub (1984), Cell 36 (4) :1007-15 ;Izant 和 Weintraub (1985), Science 229 (4711) :345-52 ;Harel-Bellan

等 (1988), J. Exp. Med. 168(6) :2309-18 ;Sarin 等 (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85(20) :7448-51 ;Zon(1988), Pharm. Res. 5(9) :539-49 ;Harel-Bellan 等 (1988), J. Immunol. 140(7) :2431-35 ;Marcus-Sekura 等 (1987), Nucleic Acids Res. 15(14) :5749-63 ;Gambari(2001), Curr. Pharm. Des. 7(17) :1839-62 ;以及 Lemaitre 等 (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84(3) :648-52。这些参考文献的描述使用核酸调节基因表达的技术的部分以引用的方式并入本文。类似地,干扰 RNA(和编码它们的 DNA) 以及其抑制所选基因的表达的用途在本领域中是熟知的,并且描述于例如 Fjose 等 (2001), Biotechnol. Ann. Rev. 7 :31-57 ;Bosher 和 Labouesse(2000), Nature Cell Biol. 2 :E31-E36 中。这些参考文献的相关部分以引用的方式并入本文。此外,可靶向核酶或 DNA 酶来裂解特定 RNA,并且由此用于抑制基因表达,如例如以下中所述 :Lewin 和 Hauswirth(2001), Trends Mol. Med. 7(5) :221-28 ;Menke 和 Hobom(1997), Mol. Biotechnol. 8(1) :17-33 ;Norris 等 (2000), Adv. Exp. Med. Biol. 465 :293-301 ;Sioud(2001), Curr. Mol. Med. 1(5) :575-88 ;以及 Santiago 和 Khachigian(2001), J. Mol. Med. 79(12) :695-706。这些参考文献的描述调节基因表达的这些方法的部分以引用的方式并入本文。可调控 BTNL3 表达的所述核酸可适用于对 BTNL3 功能的体内或体外研究或适用作治疗剂,任选地适用作基因疗法药剂。

[0118] 本发明还包括包含 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :8 的序列的核酸 (例如 DNA) 或其片段,或在中等严格条件下以及任选地高度严格条件杂交于包含核苷酸序列 SEQ ID NO :1 或 SEQ ID NO :8 的作为 BTNL3cDNA 的核酸的核酸,其中所述核酸编码可抑制用固定的抗 CD3 抗体活化的 T 细胞的增殖的蛋白质。杂交技术在本领域中是熟知的,并且由 Sambrook, J., E. F. Fritsch 和 T. Maniatis (Molecular Cloning :A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y., 第 9 和 11 章, (1989)) 以及 Current Protocols in Molecular Biology (F. M. Ausubel 等编, John Wiley & Sons, Inc., 第 2.10 和 6.3-6.4 节 (1995)) 描述,所述参考书目的相关部分以引用的方式并入本文。通常,用于过滤杂交的中等严格条件包括在约 42°C 至 55°C 的温度下,在约 50% 甲酰胺、6x SSC 中杂交,以及在约 60°C 下,在 0.5x SSC、0.1% SDS 中洗涤。通常,高度严格条件定义为如上的杂交条件,但在约 68°C 下,在 0.2x SSC、0.1% SDS 中洗涤。在杂交和洗涤缓冲液中, SSPE (1xSSPE 为 0.15M NaCl、10mM NaH₂PO₄ 和 1.26mM EDTA, pH 7.4) 可替代 SSC (1xSSC 为 0.15M NaCl 和 15mM 柠檬酸钠) ;在杂交完成之后进行洗涤,任选地至少两次洗涤,持续 15 分钟。

[0119] 应了解,必要时可通过应用如本领域技术人员所知并且以下进一步描述的支配杂交反应和双链体稳定性的基本原则来调整洗涤温度和洗涤盐浓度,以实现所需严格程度 (参见例如 Sambrook 等,同上)。当使序列已知的核酸杂交时,杂交物长度可通过比对核酸序列 (例如使用 GAP) 以及鉴定具有最优序列互补性的一个或多个区域来确定。对于具有相对较短长度的杂交物,可应用稍微不同于上述条件的条件。预期长度小于 50 个碱基对的杂交物的杂交温度应比杂交物的解链温度 (T_m) 小 5°C 至 10°C,其中 T_m 根据以下等式确定。对于长度小于 18 个碱基对的杂交物, T_m(°C) = 2(A+T 碱基数) + 4(G+C 碱基数)。对于长度超过 18 个碱基对的杂交物, T_m(°C) = 81.5 + 16.6(log₁₀[Na⁺]) + 0.41(% G+C) - (600/N), 其中 N 为杂交物中的碱基数,并且 [Na⁺] 为杂交缓冲液中的钠离子浓度。各所述杂交核酸可具有的长度为至少 15 个核苷酸,或至少 18 个核苷酸,或至少 20 个核苷酸,或至少 25 个核苷酸,或至少 30 个核苷酸,或至少 40 个核苷酸,或至少 50 个核苷酸,或至少 100 个核苷酸。

Sambrook 等 (同上)。

[0120] 如 cDNA 的 BTNL3 核酸包括包含以下多核苷酸的核酸:(1) SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:8 的全部或片段,其中所述片段编码可抑制 T 细胞的增殖的 BTNL3 蛋白;(2) 包括与 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:8 至少 80%、85%、90%、95%、97%、98%、99%、99.5% 或 99.7% 相同的核苷酸序列的多核苷酸,其中比对窗的长度为至少 100、125、150、175、200、225、250、300、400、500、600、800、1000 或 1200 个核苷酸,并且其中所述序列编码可抑制用固定的抗 CD3 抗体活化的 T 细胞的增殖或可拮抗所述抑制作用的 BTNL3 蛋白;(3) 适用于检测或扩增编码本发明的 BTNL3 蛋白的核酸或调控 BTNL3 mRNA 和 / 或蛋白质的表达的 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:8 的片段或大致上类似的序列;(4) 相对于 SEQ ID NO:1 或 SEQ ID NO:8 包含至多 1、2、3、4、6、8、10、15、20、25 或 30 个单一核苷酸的改变的多核苷酸,其中改变可为单一核苷酸的插入、缺失或取代,并且其中所述多核苷酸编码可抑制用固定的抗 CD3 抗体活化的 T 细胞的增殖或可充当所述抑制作用的拮抗剂的 BTNL3 蛋白;以及 (5) 编码如本文所述的 BTNL3 蛋白的多核苷酸,所述 BTNL3 蛋白包括人 BTNL3 蛋白的片段、衍生物和变体。

[0121] 制备 BTNL3 蛋白和抗 BTNL3 抗体的方法

[0122] 可如下制备 BTNL3 蛋白,包括多聚 BTNL3 蛋白或变异 BTNL3 蛋白或抗 BTNL3 抗体 (或抗独特型抗体)。可将编码如本文所述的 BTNL3 蛋白或抗 BTNL3 抗体的核酸 (例如 DNA) 引入载体中,所述载体可被引入宿主细胞,例如可为哺乳动物细胞的非人宿主细胞中。本发明涵盖包含编码 BTNL3 蛋白或抗 BTNL3 抗体的核酸 (如 DNA) 的载体和宿主细胞。可在使得 BTNL3 蛋白或抗 BTNL3 抗体可被表达的条件下培养含有编码 BTNL3 蛋白或抗 BTNL3 抗体的核酸的宿主细胞。可接着从所培养的细胞所处的培养基或从细胞获得表达的 BTNL3 蛋白或抗 BTNL3 抗体,并且通过本领域中已知的许多适当手段中的任一个加以纯化。此外,用于产生 BTNL3 蛋白的遗传工程改造方法包括根据已知方法在无细胞表达系统、细胞宿主、组织和动物模型中表达多核苷酸分子。

[0123] 载体可包括选择标记和复制起点用于在宿主中的增殖。载体还可包括可操作地连接于编码 BTNL3 蛋白或抗 BTNL3 抗体的核酸的合适的转录或翻译调控序列,如源于哺乳动物、微生物、病毒或昆虫基因的那些。所述调控序列的实例包括转录启动子、操纵子或增强子、mRNA 核糖体结合位点以及控制转录和翻译的适当序列。当调控序列在功能上与编码靶蛋白的 DNA 相关时,核苷酸序列被可操作地连接。因此,如果启动子核苷酸序列指导抗 BTNL3 抗体编码序列或 BTNL3 蛋白编码序列的转录,那么所述启动子核苷酸序列被可操作地连接于核酸序列。如果 BTNL3 蛋白为融合蛋白,那么编码融合蛋白的一部分 (例如信号序列) 的核酸序列可为载体的一部分,并且可将编码抗 BTNL3 抗体或 BTNL3 蛋白的核酸插入载体中,以使载体编码包含所添加的信号序列加抗 BTNL3 抗体或 BTNL3 蛋白的蛋白质。

[0124] 适于表达 BTNL3 蛋白或抗 BTNL3 抗体的宿主细胞包括人和非人细胞,包括原核细胞 (如细菌)、酵母细胞、植物细胞、昆虫细胞和高等真核细胞,包括哺乳动物细胞。将选择载体中的调控序列以使它们在宿主细胞中是可操作的。合适的原核宿主细胞包括埃希氏菌属 (*Escherichia*)、杆菌属 (*Bacillus*) 和沙门氏菌属 (*Salmonella*) 的细菌,以及假单胞菌属 (*Pseudomonas*)、链霉菌属 (*Streptomyces*) 和葡萄球菌属 (*Staphylococcus*) 的成员。对于在原核细胞中,例如在大肠杆菌中的表达,编码 BTNL3 蛋白或抗 BTNL3 抗体的多核苷酸分子优选包括 N 末端甲硫氨酸残基,以有助于重组多肽的表达。N 末端甲硫氨酸可

任选地从所表达的多肽裂解。合适的酵母宿主细胞包括来自包括酵母属、毕赤酵母属和克鲁维酵母属 (*Kluyveromyces*) 包括如酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 和毕赤酵母 (*P. pastoris*) 的种的细胞。适于在昆虫宿主细胞中表达的系统描述于例如 Luckow 和 Summers((1988), *BioTechnology* 6 :47) 的综述中,所述文献的相关部分以引用的方式并入本文。合适的哺乳动物宿主细胞包括猴肾细胞的 COS-7 株系 (Gluzman 等 (1981), *Cell* 23 :175-182)、幼小仓鼠肾 (BHK) 细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞 (Puck 等 (1958), *PNAS USA* 60 :1275-1281)、CV-1 (Fischer 等 (1970), *Int. J. Cancer* 5 :21-27)、来自人肾的 293 细胞 (美国典型培养物保藏中心(ATCC[®])目录号 CRL-10852[™]) 和人宫颈癌细胞 (HELA) (ATCC[®] CCL2)。这个段落中提及的参考文献的相关部分以引用的方式并入本文。

[0125] 用于细胞宿主中的表达载体通常包含一个或多个表型选择标记基因。所述基因编码例如赋予抗生素抗性 or 提供营养缺陷需求的蛋白质。广泛多种所述载体可易于从商业来源获得。实例包括 pGEM[®] 载体 (Promega)、pSPORT[™] 载体和 pPROEX[™] 载体 (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA)、Bluescript 载体 (Stratagene) 和 pQE 载体 (Qiagen)。酵母载体将常含有来自 2 μ 酵母质粒的复制起点序列、自主复制序列 (ARS)、启动子区域、聚腺苷酸化序列、转录终止序列和选择标记基因。也可使用在酵母和大肠杆菌中均可复制的载体 (称为穿梭载体)。除了以上提及的酵母载体的特征之外,穿梭载体还将包括用于在大肠杆菌中复制和选择的序列。可通过在 BTNL3 编码核苷酸序列或抗体编码核苷酸序列的 5' 末端处包括编码酵母 α 因子前导序列的核苷酸序列来达成在酵母宿主中表达的靶多肽的直接分泌。Brake (1989), *Biotechnology* 13 :269-280。

[0126] 适用于哺乳动物宿主细胞中的表达载体的实例包括 pcDNA3.1/Hygro⁺ (Invitrogen)、pDC409 (McMahan 等 (1991), *EMBO J.* 10 :2821-2832) 和 pSVL (Pharmacia Biotech)。用于哺乳动物宿主细胞中的表达载体可包括源于病毒基因组的转录和翻译控制序列。通常使用的可用于表达 BTNL3RNA 的启动子序列和增强子序列包括但不限于源于人巨细胞病毒 (CMV)、腺病毒 2、多瘤病毒和猿猴病毒 40 (SV40) 的那些。用于构建哺乳动物表达载体的方法公开于例如 Okayama 和 Berg ((1982) *Mol. Cell. Biol.* 2 :161-170); Cosman 等 ((1986) *Mol. Immunol.* 23 :935-941); Cosman 等 ((1984) *Nature* 312 :768-771); EP-A-0367566 以及 WO 91/18982 中。这些参考文献的相关部分以引用的方式并入本文。

[0127] 抗 BTNL3 抗体

[0128] 本文描述特异性结合本文所述的 BTNL3 蛋白的抗体、结合抗 BTNL3 抗体的抗独特型抗体以及这些抗体的用途。抗 BTNL3 抗体可结合多肽,其中多肽的氨基酸序列由 SEQ ID NO :2 的氨基酸 18 至 236 或 SEQ ID NO :9 的氨基酸 18 至 166 组成。如本文所用,由第一抗体特异性结合 BTNL3 蛋白上的表位是指第一抗体可被与第一抗体竞争的另一个抗体,而不是被不与第一抗体竞争结合的其它抗 BTNL3 抗体从 BTNL3 蛋白替换。众多竞争性结合测定在本领域中是已知的。

[0129] 通常,可通过荧光活化的细胞拣选 (FACS) 测定来评估抗体关于结合的竞争。目标抗体可被生物素化。使生物素化的抗体与已知表达所述抗体所结合的抗原的细胞组合。如果生物素化的抗体如所预期地结合细胞,那么使用由缀合至荧光染料的抗生物素蛋白链菌素组

成的二级抗体,应观察到荧光强度的变化。将细胞用未标记形式的相同抗体预孵育应完全消除观察到的荧光变化。用不同的未标记抗体预孵育可完全或部分消除荧光变化或不具有影响。在后一种情况下,将推断未标记抗体不与标记的抗体竞争。在前一种情况下,抗体则竞争结合,并且如本文所指,将推断表位是完全或部分重叠的。或者,未标记抗体可通过改变由标记的抗体结合的表位的构象来竞争。在涵盖的抗体之中的是完全或部分与任何明确提供的抗 BTNL3 抗体竞争的那些。

[0130] 在一些实施方案中,抗 BTNL3 抗体可以至多 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 或 10^{-11} M 的平衡解离常数 (K_D) 结合人 BTNL3 蛋白。 K_D 通常通过使用可利用表面等离子体共振实时检测蛋白质之间的相互作用的专门仪器,如由 Biacore Life Sciences, Piscataway, New Jersey 销售的仪器来测定。在一些实施方案中,抗 BTNL3 抗体可结合包含与 SEQ ID NO :2 和 / 或 SEQ ID NO :9 至少 90%、95%、97%、98% 或 100% 相同的氨基酸序列的 BTNL3 蛋白,其中与 SEQ ID NO :2 和 / 或 9 的比对窗的长度为至少 50、60、70、80 或 100 个氨基酸,并且任选地其中 BTNL3 蛋白可抑制由固定的抗 CD3 抗体刺激的 T 细胞的增殖,或可拮抗包含氨基酸序列 SEQ ID NO :7 的 BTNL3 蛋白达成的所述抑制作用。在一些实施方案中,抗 BTNL3 抗体可结合包含氨基酸序列 SEQ ID NO :2 和 / 或 9 的片段的蛋白质。

[0131] 此外,在存在或不存在 BTNL3 蛋白下,抗 BTNL3 抗体对抗 CD3 活化的 T 细胞的活化的影响可提供关于抗体的功能性质的另外有用的信息。具体来说,涵盖阻止或抑制 BTNL3 施加其抑制抗 CD3 活化的 T 细胞的增殖的通常作用的抗体。或者,涵盖激动或增强 BTNL3 对抗 CD3 活化的 T 细胞的增殖的抑制作用的抗体。因此,抗体可为 BTNL3 的拮抗剂或激动剂。因为 BTNL3 含有细胞内 B30.2 结构域,所以当其细胞外结构域由如天然存在的配体或激动性抗体的激动剂接合时,所述 BTNL3 可将信号转导至它在其上表达的细胞中。这个种类的激动性抗体可不同于增强对 T 细胞的增殖的抑制作用的抗体。本发明包括各自结合 BTNL3 的特定表位的单克隆抗体以及与这些单克隆抗体竞争结合的单克隆抗体。抗体可为人抗体、人源化抗体或嵌合抗体,并且可呈各种形式。

[0132] BTNL3 蛋白上的表位可包含连续氨基酸,并且还可包含非连续氨基酸。可通过本领域中已知的方法,包括使用蛋白质片段或肽文库、丙氨酸扫描、表位提取、表位切除或 X 射线结晶学来鉴定表位。参见例如 Leinonen 等 (2002), Clin. Chem. 48 (12) :2208-16 ;Kroger 等 (2002), Biosens. Bioelectron. 17 (11-12) :937-44 ;Zhu 等 (2001), Biochem. Biophys. Res. Commun. 282 (4) :921-27 ;Obungu 等 (2009), Biochemistry 48 :7251-60。这些参考文献的相关部分,即描述表位作图的方法的部分,以引用的方式并入本文。此外,尤其鉴于 BTNL3 包括具有熟知三级结构的一些结构域,如 IgV 样结构域的事实,通过类似于已知三级结构产生的 BTNL3 的三级结构可用作确定表位的辅助手段。

[0133] 抗体可为多克隆或单克隆抗体,并且可通过本领域中熟知的方法来产生。参见例如 Monoclonal Antibodies, Hybridomas :A New Dimension in Biological Analyses, Kennet 等 (编), Plenum Press, New York (1980) ;以及 Antibodies :A Laboratory Manual, Harlow 和 Land (编), Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, (1988) ;Kohler 和 Milstein (1980) Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 77 :2197 ;Kozbor 等 (1984), J. Immunol. 133 :3001-3005 (描述人 B 细胞杂交瘤技术) ;Cole 等, Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy, Alan R. Liss, Inc., 第 77-96 页 (1985) (其描述 EBV 杂交

瘤技术);Kuby, Immunology, 第二版, 第162-64页, W. H. Freeman and Co., New York(1994); 这些参考文献的相关部分以引用的方式并入本文。本文还涵盖产生特异于如本文所述的 BTNL3 蛋白的单克隆抗体的杂交瘤细胞系。可通过常规技术产生和鉴定所述杂交瘤株系。可在体外或在体内培养产生抗 BTNL3 抗体的杂交瘤。此外, 抗 BTNL3 抗体可在其它培养细胞中产生, 包括例如中国仓鼠卵巢 (CHO)、HeLa、VERO、BHK、Cos、MDCK、293、3T3、骨髓瘤 (例如 NS0、NSI) 或 WI38 细胞、酵母细胞、昆虫细胞和细菌细胞, 包括例如大肠杆菌。所述抗体可通过将编码抗体的核酸 (如 DNA) 加使得能够表达这些核酸的核酸引入所需宿主细胞中来产生。可接着通过培养其中已引入这些核酸的细胞来产生抗体。单克隆抗体可为任何免疫球蛋白类别, 包括 IgG、IgM、IgE、IgA、IgD 以及其任何子类, 例如像 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。

[0134] 抗 BTNL3 抗体可为包含两个重链和两个轻链的全长四聚抗体, 如见于大多数哺乳动物物种中的抗体。所述全长抗体可具有 IgA、IgD、IgG、IgM 或 IgE 同种型。如果所述抗体为 IgG 抗体, 那么它可为 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 抗体。或者, 抗 BTNL3 抗体可为包含重链和轻链可变区以及任选地一个或多个恒定区样结构域的单链抗体 (美国专利 4, 946, 778; Bird 等 (1988), Science 242 :423-26; Huston 等 (1988), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85 :5879-83)、二聚或多价抗体 (参见例如 Lantto 等 (2002), J. Gen. Virol. 83 :2001-05; Hudson 和 Souriau (2001), Expert Opin. Biol. Ther. 1(5) :845-55)、四聚抗体 (参见例如 Janeway 等, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease, 第五版, 第 II 部分, 第 3 章, Garland Publishing (2001))、嵌合抗体 (Hudson 和 Souriau, 同上; Boulianne 等 (1984), Nature 312 :643-46; Morrison 等 (1984), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 :6851-55; Takeda 等 (1985), Nature 314 :452-54; Neuberger 等 (1985), Nature 314 :268-70)、在非人转基因哺乳动物中 (描述于例如美国专利 6, 150, 584 中) 或通过体外选择 (美国专利申请 2002/0058033) 产生的完全人抗体, 或人源化抗体 (Morrison 等, 同上; Takeda 等, 同上; Boulianne 等, 同上文)。此外, 可通过体外选择流程使抗体“成熟”以产生性质改变, 例如像对其所结合的表位的亲和力较高的抗体。参见例如 Jackson 等 (1995), J. Immunol. 154(7) :3310-19; Pini 和 Bracci (2000), Curr. Protein Pept. Sci. 1(2) :155-69; Ellmark 等 (2002), Mol. Immunol. 39(5-6) :349; 0'Connell 等 (2002), J. Mol. Biol. 321(1) :49-56; Huls 等 (2001), Cancer Immunol. Immunother. 50 :163-71; Hudson 和 Souriau, 同上; Adams 和 Schier (1999), J. Immunol. Methods 231(1-2) :249-60; Schmitz 等 (2000), Placenta 21 增刊 A :S106-12。或者, 抗体的可特异性结合本发明的 BTNL3 蛋白的片段, 例如像 Fab 片段、F(ab')₂ 片段或单链 Fv 片段 (scFv) 也由在本文中意指为抗 BTNL3 抗体的抗体涵盖。对于 Fab 和 Fv 片段的论述, 参见 Kuby, 同上, 第 109-112 页以及 Janeway 等, 同上。本发明还涵盖特异性结合特异性结合 BTNL3 蛋白的抗体, 并且模拟 BTNL3 蛋白的作用的抗独特型抗体。所述抗独特型抗体同样适用作 BTNL3 蛋白。用于产生抗独特型抗体的方法在本领域中是熟知的。参见例如 Kuby 等, 同上, 在 371-72 页。还涵盖各种种类的可特异性结合本发明的 BTNL3 蛋白和另一种蛋白质的重组和非重组双特异性抗体。各种种类的双特异性抗体和用于制备它们的方法描述于例如美国专利 4, 474, 893、6, 060, 285 和 6, 106, 833 中。

[0135] 抗 BTNL3 抗体可为多聚抗体, 包括含有两个完整重链和两个完整轻链的全长四聚

双特异性抗体或含有例如重链加轻链加 Fc 区的多聚单价抗体。所述多聚抗体可在其 Fc 区中含有有助于形成异二聚体的某些突变。所述抗体和突变描述于国际专利公布号国际申请 WO 2009/089004 和美国申请 2007/0105199 中,所述公布和申请的描述所述抗体和突变的部分以引用的方式并入本文。所述抗体中的 Fc 区可具有天然人序列或为其它物种所天然具有的序列。或者或此外,所述抗体的 Fc 区可在其 Fc 区中含有通过增加或降低各种 Fc 受体对 Fc 区的亲和力来增加或降低效应物功能的突变。一些所述 Fc 改变论述于美国专利号 5,457,035 和国际专利申请公布号 WO 93/10151 中,所述专利和公布的相关部分以引用的方式并入本文。

[0136] 抗 BTNL3 抗体也可缀合于部分,可用于定位抗体可结合的细胞,抑制所述细胞的增殖,或杀死所述细胞。在所述细胞毒性、细胞抑制性、发光性和 / 或放射性部分之中的是例如美登素衍生物(如 DM1)、肠毒素(如葡萄球菌肠毒素)、碘同位素(如碘-125)、镓同位素(如 Tc-99m)、花青荧光染料(如 Cy5.5.18)、核糖体失活蛋白(如三角梅毒蛋白、白树毒素或皂素-S6)以及为在商标 MYLOTARG™(Wyeth-Ayerst) 下销售的产品的一部分的细胞毒性物质卡奇霉素。

[0137] 如美国专利申请 2004/058820 中所述,抗体可仅含有任选地融合于抗体的另一部分的单一重链或轻链可变区,所述申请的描述这些单一结构域抗体的部分以引用的方式并入本文。

[0138] 已见于骆驼和美洲驼中的一些天然存在的抗体是由两个重链组成的二聚体,并且不包括轻链。Muldermans 等,2001, *J. Biotechnol.* 74:277-302 ;Desmyter 等,2001, *J. Biol. Chem.* 276:26285-90,其描述这些抗体的结构的部分以引用的方式并入本文。具有这种结构的抗 BTNL3 抗体在本发明的抗 BTNL3 抗体之中。

[0139] 抗 BTNL3 抗体可具有多种活性和用途。抗 BTNL3 抗体可为拮抗性抗体,其例如通过阻断或拮抗 T 细胞增殖的 BTNL3 依赖性抑制作用来阻断或抑制 BTNL3 的生物功能,所述阻断或拮抗可通过本文实施例中所述的方法来测定。抗体也可为激动性抗体。在一些实施方案中,激动性抗体可结合 BTNL3 相反结构,并且模拟 BTNL3 结合以抑制 T 细胞活化或增殖。激动性抗体也可为结合抗 BTNL3 抗体和 / 或也结合 BTNL3 相反结构,并且模拟 BTNL3 的活性的抗独特型抗体,也就是说它们抑制如本文所述的 T 细胞的增殖。所述激动性抗 BTNL3 抗体与 BTNL3 蛋白可用于相同用途。抗 BTNL3 抗体可例如通过稳定或破坏可能与细胞表面上的其它蛋白组合的 BTNL3 蛋白而具有激动性或拮抗性。例如,激动性抗体可通过稳定跨膜形式的 BTNL3,或通过稳定 BTNL3 蛋白与其它 BTNL3 蛋白或细胞表面上的不同蛋白质的相互作用或群集细胞表面上的 BTNL3 蛋白来增强 BTNL3 的活性。此外,拮抗性抗体可通过使跨膜形式的 BTNL3 去稳定,或通过使多个 BTNL3 分子间的相互作用或 BTNL3 与细胞表面上的其它蛋白质的相互作用去稳定来抑制 BTNL3 活性。激动性抗 BTNL3 抗体也可结合跨膜形式的 BTNL3,从而导致它将生物信号转导至它在其上表达的细胞中。所述信号可例如降低或增加表达 BTNL3 的免疫细胞(例如嗜中性白细胞)的免疫功能。在一些实施方案中,激动性抗 BTNL3 抗体可导致表达 BTNL3 的细胞(如癌细胞或嗜中性白细胞)的增殖降低或细胞死亡。拮抗性抗 BTNL3 抗体可用于增强免疫反应。因此,拮抗性抗 BTNL3 抗体可例如适用于治疗癌症或适用于疫苗中,例如适用于用以诱导对癌症特异性抗原的反应的疫苗中。

[0140] 抗 BTNL3 抗体可缀合于细胞毒性、细胞抑制性、发光性和 / 或放射性部分。所述

抗体可用于定位表达 BTNL3 的细胞,抑制所述细胞的增殖,或杀死所述细胞。因为一些癌细胞表达 BTNL3,所以所述抗体缀合物可用于治疗所述癌症。类似地,因为嗜中性白细胞表达 BTNL3,所以所述抗体缀合物可用于治疗特征在于嗜中性白细胞的数目过多或嗜中性白细胞活性过度的病状,例如哮喘、炎症性肠病(包括克罗恩氏病和溃疡性结肠炎)、COPD 以及痛风和相关炎症性晶体沉积疾病。在所述细胞毒性、细胞抑制性、发光性和 / 或放射性部分之中的是例如美登素衍生物(如 DM1)、肠毒素(如葡萄球菌肠毒素)、碘同位素(如碘-125)、锝同位素(如 Tc-99m)、花青荧光染料(如 Cy5.5.18)、核糖体失活蛋白(如三角梅毒蛋白、白树毒素或皂素-S6)以及为在商标 MYLOTARG™(Wyeth-Ayerst)下销售的产品的一部分的细胞毒性物质卡奇霉素。

[0141] 本发明的抗体还可用于用以在体外或在体内检测本发明的 BTNL3 蛋白的存在性的测定中。抗体还可用于通过免疫亲和色谱纯化本发明的 BTNL3 蛋白。

[0142] BTNL3 多肽的激动剂和拮抗剂

[0143] 除了拮抗性或激动性抗体之外,本发明还涵盖可特异性结合 BTNL3 蛋白的其它抗体相关分子,如亲和体(Rönmark 等(2002), J. Immunol. Methods 261(1-2):199-211,其描述亲和体的部分以引用的方式并入本文);和国际申请 WO 00/24782(其描述这些肽的部分以引用的方式并入本文)中所述的可特异性结合 BTNL3,并且抑制 BTNL3 蛋白的生物活性的生物活性肽。此外,BTNL3 拮抗剂包括适用于调节 BTNL3 蛋白和 / 或 mRNA 的表达的上述核酸,例如像干扰 RNA(或编码它们的 DNA)或反义 RNA 或 DNA。

[0144] 拮抗剂还包括包含在体外被选择来结合 BTNL3 或其受体的氨基酸序列,并且可任选地干扰 BTNL3 和其受体的相互作用的蛋白质。在一些实施方案中,所述蛋白质可为 BTNL3 的缺乏正常 BTNL3 活性,并且基本上充当诱饵的变异形式。或者,所述蛋白质可为促进或模拟 BTNL3 的生物功能的 BTNL3 激动剂。可筛选能够干扰 BTNL3 与其受体的相互作用的结合 BTNL3 或其受体的蛋白质,或者,可选地,选择可被设计来直接获得所述蛋白质。或者,BTNL3 拮抗剂可为干扰野生型 BTNL3 蛋白的生物活性的变异 BTNL3 蛋白,例如阻断野生型 BTNL3 与其受体的相互作用的可溶性生物非活性 BTNL3 变体。

[0145] 蛋白质可通过许多方法,例如像噬菌体展示或细菌表面展示来选择。参见例如 Parmley and Smith(1989), Adv. Exp. Med. Biol. 251:215-218;Luzzago 等(1995), Biotechnol. Annu. Rev. 1:149-83;Lu 等(1995), Biotechnology(NY) 13(4):366-372。在这些方法中,可将结合结构域文库的各成员展示在个别噬菌体粒子或细菌细胞上,并且可选择在所选条件下结合目标蛋白质的细菌或噬菌体。编码所选结合结构域的核酸可通过使所选噬菌体或细菌生长并且从其分离核酸来获得。

[0146] 或者,可完全在体外选择蛋白质。例如,可使潜在结合结构域文库中的各个别多肽连接至编码它的核酸,并且可选择在所选条件下结合目标蛋白质的那些核酸。因为多肽连接至编码它们的核酸,所以如扩增、克隆或测序编码有效结合结构域的核酸的随后操作变得容易。用于所述选择的各种流程在本领域中是已知的,包括抗体-核糖体-mRNA 粒子、核糖体展示、共价 RNA-肽融合或共价 DNA-RNA-肽融合。He 和 Taussig(1997), Nucleic Acids. Res. 25(24):5132-5134;Hanes 和 Pluckthun(1997), Proc. Natl. Acad. Sci. 94:4937-4942;Roberts 和 Szostak(1997), Proc. Natl. Acad. Sci. 94:12297-12302;Lohse 和 Wright(2001), Curr. Opin. Drug Discov. Devel. 4(2):198-204;Kurz 等(2000),

Nucleic Acids Res. 28(18) :E83 ;Liu 等 (2000), Methods Enzymol. 318 :268-93 ;Nemoto 等 (1997), FEBS Lett. 414(2) :405-08 ;美国专利 6, 261, 804 ;国际申请 WO 00/32823 ;以及 WO 00/34784。这些公布的描述可如何进行所述选择的部分以引用的方式并入本文。所述蛋白质可被选择为拮抗剂或激动剂。

[0147] 治疗用途

[0148] 本文显示 BTNL3. Fc 融合蛋白可抑制活化的 T 细胞的增殖。参见实施例 4 ;图 5。BTNL3 也使 CD4⁺T 细胞反应于固定的抗 CD3 抗体的活化状态降低, 如反映在基因表达谱发生变化方面。参见实施例 5 ;图 6。此外, 本文显示 BTNL3 在嗜中性白细胞和一些种类的癌细胞上相对高度表达。图 2 和 4。在一些情况下, 在嗜中性白细胞上表达的多态性形式的 BTNL3 有可能改变免疫稳态。因此, BTNL3 或能够激动 BTNL3 途径的分子可适用作用以治疗由 T 细胞或嗜中性白细胞介导的自身免疫性或炎症性疾病的治疗剂。这些疾病包括例如关节炎 (包括类风湿性关节炎、青少年特发性关节炎和牛皮癣性关节炎)、阿狄森氏病、哮喘、多腺内分泌病变综合征、全身性红斑狼疮、慢性活动性肝炎、甲状腺炎、淋巴细胞性腺垂体炎、卵巢功能早衰、特发性甲状旁腺功能减退、恶性贫血、肾小球性肾炎、自身免疫性嗜中性白细胞减少症、古德帕斯彻氏综合征、重症肌无力、硬皮病、原发性休格连氏综合征、多肌炎、自身免疫性溶血性贫血、炎症性肠病 (如克罗恩氏病或溃疡性结肠炎)、牛皮癣、皮炎、类肉瘤病、多发性硬化症、慢性阻塞性肺病、哮喘、1 型和 2 型糖尿病、移植相关病状 (如移植排斥或移植物抗宿主疾病)、痛风和相关炎症性晶体沉积疾病, 或纤维化疾病 (如动脉粥样硬化、慢性阻塞性肺病 (COPD)、肝硬化、硬皮病、肾移植纤维化、肾同种异体移植物肾病变、肺纤维化 (包括特发性肺纤维化))、自身免疫性血小板减少性紫癜、寻常天疱疮、急性风湿热、混合型原发性冷球蛋白血症和温性自身免疫性溶血性贫血, 以及许多其它疾病。

[0149] 阻断或抑制 BTNL3 途径的 BTNL3 拮抗剂可适用于肿瘤学环境中。如上所说明, BTNL3 拮抗剂可包括例如干扰在细胞膜上表达的内源性 BTNL3 蛋白及其受体的结合的抗 BTNL3 抗体或变异形式的 BTNL3 蛋白。如下所示, BTNL3 在某些癌细胞中相对高度表达。实施例 3 ;图 4。这表明 BTNL3 抑制 T 细胞的活化的能力可能在癌细胞能够避免被免疫系统消除中起作用。

[0150] 结合 BTNL3 或其受体, 并且可阻断或抑制这些分子之间的相互作用的抗体可用作用以治疗癌症的治疗剂。也可使用上述其它 BTNL3 拮抗剂。可能用 BTNL3 途径阻断剂治疗的各种癌症中的一些包括急性或慢性白血病、淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、霍奇金氏病、淋巴细胞性白血病、淋巴细胞性或皮肤性淋巴瘤、癌瘤、腺癌、肉瘤、胸腺瘤、纵隔赘瘤、乳腺癌、前列腺癌、头颈癌、肺癌、非小细胞肺癌、小细胞肺癌、各种种类的皮肤癌、膀胱癌、恶性神经胶质瘤、胃肠系统癌症 (包括食道癌、胃癌、小肠癌、结肠癌或直肠癌)、胰脏癌、腺癌、肝胆赘瘤、肾癌或输尿管癌、睾丸癌、尿道癌或阴茎癌、妇科肿瘤、卵巢癌、骨肉瘤、内分泌系统癌症、皮肤黑素瘤、眼内黑素瘤、中枢神经系统赘瘤和浆细胞赘瘤以及许多其它癌症。

[0151] 类似地, 包括抗 BTNL3 抗体的 BTNL3 拮抗剂可用作用以治疗由广泛多种病原体引起的感染的治疗剂。当病原体可遏制 T 细胞反应时, 这可为特别重要的。可用 BTNL3 拮抗剂治疗的病原性感染不加限制地包括由以下引起的感染: 病毒、细菌、真菌和各种真核病原体, 包括疟疾, 即疟原虫属、利什曼原虫属、线虫和蠕虫 (例如疥虫属) 的成员以及许多其它病原体。在一些实施方案中, BTNL3 拮抗剂可在施用抗原之前、与其同时或之后施用, 所述

抗原为病原体的全部或某一部分或足够类似于病原体的全部或某一部分,使得其可引发对病原体的免疫反应。

[0152] BTNL3 拮抗剂也可适用作使疫苗更有效的药剂。BTNL3 可与疫苗一起用于诱导针对任何抗原的反应。在这些抗原之中的是在癌细胞,如来自以上提及的癌症的细胞上高度表达的抗原。在这些癌症抗原之中的是以下人蛋白质:WT1、MUC1、LMP2、EGFRvIII、HER-2/neu、MAGE-A3、NY-ESO-1、PSMA、GM2/GD2 合成酶、CEA、MLANA/MART1、gp100、存活素(survivin)、前列腺特异性抗原(PSA)、端粒酶逆转录酶(hTERT)、肉瘤易位断点、EPHA2、前列腺酸性磷酸酶(PAP)、黑素瘤细胞凋亡抑制剂(ML-IAP)、 α -胎蛋白(AFP)、上皮细胞粘着分子(EpCAM)、ERG、NA17. A2 肽(VLPDVFIRC)、成对框 3(PAX3)、间变性淋巴瘤激酶(ALK)、雄激素受体、细胞周期蛋白 B1、聚唾液酸、rho 相关 GTP 结合蛋白 RhoC、v-myc 骨髓细胞瘤病毒相关致癌基因(MYCIN)、TRP-2、GD3 神经节苷脂、海藻糖基 GM1、间皮素(mesothelin)、前列腺干细胞抗原(PSCA)、MAGE-A1、CYP1B1、PLAC1、GM3、BORIS、四连接素(TN)、ETV6-AML1(尤其包括断点的肽)、NY-BR-1、RGS5、SART3、STn、碳酸酐酶 IX、PAX5、前顶体蛋白(proacrosin)结合蛋白 sp32 前体(OY-TES-1)、精子蛋白 17(Sp17)、LCK、高分子量黑素瘤相关抗原(HMWMAA,也称为黑素瘤硫酸软骨素蛋白多糖)、AKAP-4、SSX2、XAGE-1、B7H3(也称为 CD276)、豆荚蛋白(legumain)、TIE2、前列腺相关基因 4 蛋白(PAGE-4)、血管内皮生长因子受体 2(VEGFR2)、鱼精蛋白 2(也称为 MAD-CT-1)、肾小球蛋白(也称为 FAP)、PDGFR- β 、SSX2、SSX5、Fos 相关抗原 1、CD20、整合素 α v β 3、5T4 癌胚抗原、CAIX、CD5、CD19、CD22(也称为 Siglec-2)、CD30(也称为 TNFRSF1)、CD33(也称为 Siglec-3)、CD40、CD44V6、CD55、CD56(也称为 NCAM)、CTLA-4(也称为 CD152)、EGFR、GD2、HER2、HLA-DR10(MHC II)、IGF1R、IL-6、唾液酰基路易斯 Y(sialyl Lewis Y)、TAG-72、TAL6、TRAILR2、VEGF、CD52(也称为 CAMPATH-1)、CD4、CD73、CA125(也称为 MUC16)、CD66e、CD80(也称为 B7-1)、PDGFR β 、前列腺特异性膜抗原(PSMA,也称为谷氨酸羧肽酶 2,以及许多其它名称)。癌症抗原还包括人疱疹病毒 4 蛋白 LMP2、人乳头状瘤病毒蛋白 E6 和 E7 以及甘神经酰胺 globo H(如 Gilewski 等(2001), Proc. Natl. Acad. Sci. 98(6):3270-3275 中所述,所述文献的描述 globo H 的部分以引用的方式并入本文)、 α 4 β 1 和 α 4 β 7 整合素的 α 4 亚单位、 α 4 β 7 整合素、BAFF、APRIL、CD2、CD3、CD20、CD52、CD73、CD80、CD86、C₅补体蛋白、IgE、IL-1 β 、IL-5、IL-6R、IL-12、IL-23 以及肿瘤坏死因子 α (TNF α)。

[0153] 当用于使疫苗更有效时,例如抗 BTNL3 抗体的 BTNL3 拮抗剂可在抗原之前、与其同时或之后施用。抗原可为如上所述的癌症抗原的一部分或全部。抗原还可为病原体的一部分或全部,或类似于病原体的一部分或全部的分子、在介导疾病的任何细胞的表面上特异性表达的分子的一部分或全部、由细胞分泌的可溶性抗原,或可引发对病原体的免疫反应的分子。

[0154] 使通过 BTNL3 达成的细胞内信号传导激动的分子可充当对其中癌细胞表达 BTNL3 的癌症的治疗剂。类似地,由表达 BTNL3 的免疫细胞,例如嗜中性白细胞介导的炎症性疾病可用使通过 BTNL3 达成的细胞内信号传导激动的分子治疗。所述激动剂可为抗 BTNL3 抗体,并且细胞内信号传导可通过 BTNL3 的 B30. 2 结构域来介导。

[0155] 因此,可结合在嗜中性白细胞上表达的 BTNL3,由此下调或抑制嗜中性白细胞的增殖的分子可为适用于其中存在过量嗜中性白细胞或过度嗜中性白细胞活性的病状中,例如

充血性阻塞性肺病 (COPD)、哮喘、炎症性肠病 (包括溃疡性结肠炎和克罗恩氏病) 以及痛风和相关炎症性晶体沉积疾病中的治疗剂。所述分子可包括抗 BTNL3 抗体。

[0156] 另一方面, 促进嗜中性白细胞增殖的分子可适用于易受感染的患有嗜中性白细胞减少症的患者。所述患者包括已接受针对癌症的化学疗法或放射的患者、已暴露于有毒化学品或药物的患者, 或患有某些自身免疫性疾病的患者。以阻止细胞内下调或抑制增殖的信号的方式结合嗜中性白细胞表面上的 BTNL3 的分子可为适用于所述患者的治疗剂。所述分子可包括抗 BTNL3 抗体。此外, 充当诱饵, 由此阻止在嗜中性白细胞上表达的 BTNL3 与通常结合 BTNL3 的配体的相互作用, 从而下调或抑制其上表达 BTNL3 的嗜中性白细胞的增殖的分子可为针对所述病状的治疗剂。所述分子可包括 BTNL3 蛋白或其变体。

[0157] 此外, 缀合于如上所述的细胞毒性、细胞抑制性、发光性和 / 或放射性部分的抗体可用于治疗其中癌细胞表达 BTNL3 的癌症, 或可用于治疗特征在于嗜中性白细胞的数目增加的炎症性或自身免疫性疾病, 例如哮喘、COPD、炎症性肠病 (包括溃疡性结肠炎和克罗恩氏病) 以及痛风和相关炎症性晶体沉积疾病。

[0158] 本文提及的任何疾病的“治疗”涵盖减轻疾病的至少一种症状、降低疾病的严重性, 或延迟或防止疾病进展成可在一些情况下伴随疾病或导致至少一种其它疾病的更严重的症状。治疗并不一定意味着疾病被完全治愈。适用治疗剂仅需降低疾病的严重性、降低一种或多种与疾病或其治疗相关的症状的严重性, 或延迟可在治疗的病状之后以一定频率发生的更严重症状或更严重疾病的发作。例如, 如果疾病是炎症性肠病, 那么治疗剂可降低肠管中不同炎症部位的数目、肠管的总的受影响程度; 减轻疼痛和 / 或肿胀; 减轻症状, 如腹泻、便秘或呕吐; 和 / 或防止肠管穿孔。患者的病状可通过在钡灌肠或灌肠、内窥镜检查、结肠镜检查 and / 或生检之后执行的标准技术, 如 x 射线来评估。合适的程序根据患者的病状和症状而变化。

[0159] 用于治疗疾病的药物的“治疗有效量”为可降低疾病的严重性, 降低一种或多种与疾病或其治疗相关的症状的严重性, 或延迟可在治疗的病状之后以一定频率发生的更严重症状或更严重疾病的发作的量。

[0160] 本发明涵盖一种治疗炎症性疾病的方法, 所述疾病如关节炎 (包括类风湿性关节炎、青少年特发性关节炎和牛皮癣性关节炎)、阿狄森氏病、哮喘、多腺内分泌病变综合征、全身性红斑狼疮、慢性活动性肝炎、甲状腺炎、淋巴细胞性腺垂体炎、卵巢功能早衰、特发性甲状旁腺功能减退、恶性贫血、肾小球性肾炎、自身免疫性嗜中性白细胞减少症、古德帕斯彻氏综合征、重症肌无力、硬皮病、原发性休格连氏综合征、多肌炎、自身免疫性溶血性贫血、炎症性肠病 (如克罗恩氏病或溃疡性结肠炎)、牛皮癣、皮炎、类肉瘤病、多发性硬化症、慢性阻塞性肺病、哮喘、1 型和 2 型糖尿病、移植相关病状 (如移植排斥或移植物抗宿主疾病)、痛风和相关炎症性晶体沉积疾病, 或纤维化疾病 (如动脉粥样硬化、慢性阻塞性肺病 (COPD)、肝硬化、硬皮病、肾移植纤维化、肾同种异体移植物肾病变、肺纤维化 (包括特发性肺纤维化))、自身免疫性血小板减少性紫癜、寻常天疱疮、急性风湿热、混合型原发性冷球蛋白血症和温性自身免疫性溶血性贫血, 以及许多其它疾病。

[0161] 所述治疗涉及持续一定时间使用治疗有效量的 BTNL3 蛋白或结合 BTNL3 或其受体的激动性抗体, 所述时间足以诱导反映特定病症的严重性或由所述病症引起的症状的严重性的指标超过基线持续改良, 或足以延迟或防止在一些或所有情况下在治疗的病状之后的

更严重疾病的发作。本发明的治疗剂可在通常使用的针对所述病症的其它治疗剂之前、之后、或期间使用，或它们可在无其它治疗剂下使用。例如，克罗恩氏病和溃疡性结肠炎通常用硫氮磺胺吡啶、5-氨基水杨酸或皮质类固醇治疗。这些治疗剂可在使用 BTNL3 蛋白或其激动剂或拮抗剂进行治疗之前、期间或之后使用。

[0162] 类似地，癌症常用化学治疗剂治疗，并且所述药剂可连同本文所述的 BTNL3 拮抗剂治疗剂，如抗 BTNL3 抗体一起使用。在一些实施方案中，BTNL3 拮抗剂可在化学治疗剂之前、与其同时或之后施用。化学治疗剂包括例如以下治疗剂：烷基化剂（例如白消安 (busulfan)、替莫唑胺 (temozolomide)、环磷酰胺 (cyclophosphamide)、洛莫司汀 (lomustine) (CCNU)、甲基洛莫司汀、链脲佐菌素 (streptozotocin)、顺式-二胺二氯铂、氮丙啶基苯并-醌和噻替派 (thiotepa)；无机离子（例如顺铂 (cisplatin) 和卡铂 (carboplatin)）；氮芥（例如美法仑盐酸盐 (melphalan hydrochloride)、异环磷酰胺 (ifosfamide)、苯丁酸氮芥 (chlorambucil) 和二氯甲基二乙胺盐酸盐）；亚硝基脲（例如卡莫司汀 (carmustine) (BCNU)）；抗赘生抗生素（例如阿霉素 (adriamycin)（多柔比星 (doxorubicin)）、道诺霉素 (daunomycin)、丝裂霉素 C (mitomycin C)、柔红霉素 (daunorubicin)、伊达比星 (idarubicin)、光神霉素 (mithramycin) 和博莱霉素 (bleomycin)）；植物衍生物（例如长春新碱 (vincristine)、长春花碱 (vinblastine)、长春瑞滨 (vinorelbine)、紫杉醇 (paclitaxel)、多西他赛 (docetaxel)、长春地辛 (vindesine)、VP-16 和 VM-26)；抗代谢物（例如，与或不与甲酰四氢叶酸 (leucovorin) 一起的甲氨蝶呤 (methotrexate)、与或不与甲酰四氢叶酸一起的 5-氟尿嘧啶、5-氟脱氧尿苷、6-巯基嘌呤、6-巯鸟嘌呤、阿糖胞苷 (cytarabine)、5-氮杂胞苷、羟基脲、脱氧助间型霉素 (deoxycofomycin)、吉西他滨 (gemcitabine) 和氟达拉滨 (fludarabine)）；鬼臼毒素 (podophyllotoxin)（例如依托泊苷 (etoposide)、伊立替康 (irinotecan) 和拓扑替康 (topotecan)）；以及放线菌素 D (actinomycin D)、达卡巴嗪 (dacarbazine) (DTIC)、mAMSA、丙卡巴肼 (procarbazine)、六甲蜜胺 (hexamethylmelamine)、五甲蜜胺 (pentamethylmelamine)、L-天冬酰胺酶和米托蒽醌 (mitoxantrone) 以及本领域中已知的许多治疗剂。参见例如 Cancer: Principles and Practice of Oncology, 第 4 版, DeVita 等编, J. B. Lippincott Co., Philadelphia, PA (1993), 其相关部分以引用的方式并入本文。

[0163] 癌症也通常通过多种方法，用多种形式的放射来治疗。本文涵盖向癌症患者施用 BTNL3 拮抗剂可发生在放射治疗或任何其它抗赘生治疗之前、与其同时或之后。

[0164] 对于自身免疫性或炎症性病状，T 细胞可例如通过单采血液成分术，并且使用 BTNL3，任选地加上其它蛋白质离体刺激，以使 T 细胞获得调控或抑制表型来从患者移除。可接着将 T 细胞转移回患者中。为刺激 T 细胞获得调控或抑制表型，可在用人 T 细胞激动性抗 CD3 抗体、rBTNL3. Fc 以及 rB7-1. Fc 或 rB7-2. Fc 涂布的表面存在下，例如与珠粒一起或在微量滴定板孔中，在 TGF- β 和 IL-2 存在下孵育它们。或者，表面可用包括 rBTNL3 或 BTNL3. Fc 加激动性抗 CD3 抗体的蛋白质组合或仅包括这些蛋白质的组合涂布。在一个实施方案中，激动性抗 CD3 抗体、rBTNL3. Fc 和 rB7-1. Fc 或 rB7-2. Fc 可例如处于 2:10:2.5 的分子量比率下。TGF- β 和 IL-2 可在适当浓度下，例如像约 0.05ng/ml 至 5ng/ml（对于 TGF- β ）和约 0.5ng/ml 至 10ng/ml（对于 IL-2）。这可使 T 细胞程序化以变成抑制性或调控性，从而导致调控性 T（“T reg”）细胞的“扩增”。T reg 细胞的“扩增”是指 T reg 细胞

(CD3⁺FOXP3⁺) 与总体 T 细胞 (CD3⁺FOXP3⁻) 的比率变得更大。这个比率可通过使用用以检测细胞蛋白质的抗体进行 FACS 分析 (本领域中熟知的一种方法) 来测定。参见例如 Swanson 等 (2013), *J. Immunol.* 190 :2027-2035, 其相关部分以引用的方式并入本文。可在所述环境中孵育 T 细胞例如三至七天, 并且接着收获并递送回同一患者中。任选地, 可孵育 T 细胞约三天、四天、五天、六天或七天。在一些实施方案中, 也可使 T 细胞静息, 即在例如 IL-2 存在下而无 T 细胞受体或共刺激刺激物下培养, 并且接着如上所说明再刺激一至四次。可用所述方案治疗的自身免疫性或炎症性病状包括例如关节炎 (包括类风湿性关节炎、青少年特发性关节炎和牛皮癣性关节炎)、阿狄森氏病、哮喘、多腺内分泌病变综合征、全身性红斑狼疮、慢性活动性肝炎、甲状腺炎、淋巴细胞性腺垂体炎、卵巢功能早衰、特发性甲状旁腺功能减退、恶性贫血、肾小球性肾炎、自身免疫性嗜中性白细胞减少症、古德帕斯彻氏综合征、重症肌无力、硬皮病、原发性休格连氏综合征、多肌炎、自身免疫性溶血性贫血、炎症性肠病 (如克罗恩氏病或溃疡性结肠炎)、牛皮癣、皮炎、类肉瘤病、多发性硬化症、慢性阻塞性肺病、哮喘、1 型和 2 型糖尿病、移植相关病状 (如移植排斥或移植物抗宿主疾病)、痛风和相关炎症性晶体沉积疾病, 或纤维化疾病 (如动脉粥样硬化、慢性阻塞性肺病 (COPD)、肝硬化、硬皮病、肾移植纤维化、肾同种异体移植物肾病变、肺纤维化 (包括特发性肺纤维化))、自身免疫性血小板减少性紫癜、寻常天疱疮、急性风湿热、混合型原发性冷球蛋白血症和温性自身免疫性溶血性贫血, 以及许多其它疾病。

[0165] 任何上述治疗剂都可以组合物形式, 也就是说与一种或多种另外组分, 如生理可接受的载体、赋形剂或稀释剂一起施用。例如, 组合物可包含如本文所述的可溶性 BTNL3 蛋白、抗 BTNL3 抗体或 BTNL3 激动剂或拮抗剂加缓冲剂、抗氧化剂 (如抗坏血酸)、低分子量多肽 (如小于 10 个氨基酸的那些)、蛋白质、氨基酸、碳水化合物 (如葡萄糖、蔗糖或糊精)、螯合剂 (如 EDTA)、谷胱甘肽和 / 或其它稳定剂、赋形剂和 / 或防腐剂。组合物可被配制成液体或冻干物。可用于药物制剂中的组分的另外实例呈现于 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 16 版, Mack Publishing Company, Easton, Pa., (1980) 中, 所述参考书目的相关部分以引用的方式并入本文。

[0166] 包含上述治疗分子的组合物可通过任何适当手段来施用, 包括但不限于胃肠外、局部、经口、经鼻、经阴道、经直肠或经肺 (通过吸入) 施用。如果注射, 那么组合物可通过团式注射或连续输注来关节内、静脉内、动脉内、肌肉内、腹膜内或皮下施用。涵盖局部化施用, 即在疾病部位处施用, 如从植入物、皮肤贴片或栓剂经皮递送和持续释放。通过吸入递送包括例如经鼻或经口吸入、使用喷雾器、以气雾剂形式吸入等。通过插入体腔中的栓剂施用可例如通过在所选体腔中插入固体形式的组合物并且使其溶解来达成。其它替代方案包括滴眼剂、经口制剂 (如丸剂、锭剂、糖浆和口香糖) 和局部制剂 (如洗剂、凝胶剂、喷雾剂和软膏剂)。在大多数情况下, 为多肽的治疗分子可局部施用或通过注射或吸入来施用。

[0167] 上述治疗分子可在可有效治疗所治疗的病状的任何剂量、频率和持续时间下施用。剂量取决于治疗分子的分子性质和所治疗的病症的性质。只要为实现期望结果所必需, 治疗即可继续。在整个治疗持续时间期间, 治疗周期可为或可不为恒定的。例如, 治疗可最初在每周间隔下进行, 而稍后每隔一周进行。本发明涵盖持续时间为数天、数周、数月或数年的治疗。治疗可中断, 并且接着重新开始。在初始治疗之后可施用维持剂量。

[0168] 剂量可测量为每千克体重的毫克数 (mg/kg) 或每平方米皮肤表面的毫克数 (mg/

m²) 或不考虑身高或体重的固定剂量。这些是本领域中的标准剂量单位。人的皮肤表面积使用标准公式由她的身高和体重来计算。例如,治疗性 BTNL3 蛋白或结合 BTNL3 或其受体的抗体可在约 0.05mg/kg 至约 10mg/kg 或约 0.1mg/kg 至约 1.0mg/kg 的剂量下施用。或者,可施用约 1mg 至约 500mg 的剂量。或者,可施用约 5mg、10mg、15mg、20mg、25mg、30mg、35mg、40mg、45mg、50mg、55mg、60mg、100mg、200mg 或 300mg 的剂量。

[0169] 以下参照特定实施例描述本发明。这些实施例不意图以任何方式限制本发明。出于本公开的目的,应了解,可对本发明进行完全在本发明的范围内的各种变化和修改。可进行将易于为本领域技术人员所联想到,并且涵盖在本文公开并如随附权利要求中限定的本发明的精神中的众多其它变化。

实施例

[0170] 实施例 1:编码人 BTNL3 蛋白的 mRNA 在人免疫细胞中的表达

[0171] 进行以下实验以搜集关于编码人 BTNL3 的 mRNA 在初级人免疫细胞中的表达的信息。

[0172] 从全血或 leukopaks 中通过各种可从 Stem Cell Sciences (Palo Alto, California) 或 Miltenyi Biotech (Germany) 商购获得的选择方法分离初级免疫细胞。例如,使用 EASYSEP[®] 人 T 细胞富集试剂盒和/或 CD4⁺T 细胞富集试剂盒(均来自 Stem Cell Sciences) 分离 CD4⁺T 细胞,而使用 Miltenyi 单核细胞分离试剂盒 II 分离单核细胞。使用所述可商购获得的试剂进行的所述细胞分离在本领域中是常规的。通过使负性选择的单核细胞离体成熟七天来获得巨噬细胞。通过荧光活化的细胞拣选 (FACS) 分析各分离的细胞群体以确定所分离的细胞群体是否表达预期细胞表面蛋白。分离 RNA 并通过 Affymetrix 阵列 (Affymetrix GENECHIP[™] HG-U1333Plus 2.0) 进行评估。使用 ROSETTA RESOLVER[®] 软件 (Rosetta Biosoftware, Cambridge, MA, USA) 进行人 BTNL3 转录物检测的数据标准化和分析。

[0173] 这些分析的结果在图 2 中示出。测试的细胞类型包括外周血单核细胞、T 细胞、CD4⁺T 细胞、CD8⁺T 细胞、B 细胞、单核细胞、巨噬细胞、嗜中性白细胞、嗜酸性粒细胞和 NK 细胞。在测试的细胞类型之中,嗜中性白细胞(图 2 中的道次 8) 表达最高量的 BTNL3。

[0174] 实施例 2:制备人 BTNL3. Fc

[0175] 以下描述如何制备含有人 BTNL3 的细胞外区域、接头和人 IgG1 抗体的 Fc 部分的融合蛋白。构建含 cDNA 的适当载体,其编码融合于接头加人 IgG1Fc 片段的人 BTNL3 的细胞外结构域(其为 SEQ ID NO:2 的氨基酸 1 至 236)。SEQ ID NO:5 提供这个 cDNA 的序列,并且 SEQ ID NO:6 提供由这个 cDNA 编码的 BTNL3. Fc 蛋白的包括信号序列的氨基酸序列。缺乏信号序列的成熟 BTNL3. Fc 蛋白序列提供于 SEQ ID NO:7 中。使用 LIPOFECT AMINE[™] 2000 (Invitrogen), 用 BTNL3. Fc 哺乳动物表达构建体转染 Cos PKB 细胞,并且在具有 0.5% 低 Ig 血清的完全杜贝卡氏改良依格培养基 (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) 中培养。这些方法由 Ettehadieh 等, OVEREXPRESSION OF PROTEIN KINASE B α ENHANCES RECOMBINANT PROTEIN EXPRESSION IN TRANSIENT SYSTEMS, Animal Cell Technology: From Target to Market: Proceedings of the 17th ESACT Meeting,

Tylösand, Sweden, 6月10日-14日, 2001, 第1卷, Lindner-Olsson 等编, 第31-35页, Springer, 2001 详述。这个参考文献的描述如何制备重组蛋白的部分以引用的方式并入本文。在转染后七天, 收获上清液, 并且通过蛋白质 A 柱色谱 (MABSELECT™ S uRe 柱, GE Healthcare) 纯化 BTNL3. Fc 蛋白。

[0176] 通过凝胶电泳和尺寸排阻色谱 (SEC) 测定所得蛋白质的大小。预期蛋白质将由于存在 Fc 区而为二聚的, 所述 Fc 区由于 C_H3 区之间的非共价相互作用和在铰链区之间形成的二硫键而导致二聚化。如果蛋白质为二聚体, 那么其预期分子量将由于可变糖基化而可能超过约 120kD。类似地, 在其中将预期其为单体的还原性条件下, 其预期分子量将为至少约 60kD。在还原性凝胶上, 观察到许多条带, 其中大多数在约 50kD 与 64kD 之间。通过非还原性条件下的 SEC 观察到的主峰分子量为约 140kD, 但也观察到较高分子量物质和较低分子量物质。这些数据指示蛋白质在非还原性条件下是至少二聚的, 并且它也可能形成更高级多聚体。

[0177] 实施例 3 :BTNL3 在人正常组织和肿瘤组织中的表达

[0178] 为测定 BTNL3 在 RNA 水平上在人正常组织和肿瘤组织中的表达水平, 分离 RNA 并通过下一代测序分析来评估。具体来说, TruSeq[®] (Illumina, Inc., San Diego, California) 试剂用于制备在 HiSeq[®] 2000 (Illumina, Inc., San Diego, California) 测序系统中处理的样品和反应液。分析数据以对每个细胞的 BTNL3RNA 数值进行定量。对正常人组织的这种分析的结果在图 3 中示出。在大多数组织中检测到少许或未检测到 BTNL3 表达, 但在来自结肠和小肠的样品中检测到较高表达水平。因此, 类似于 BTNL2, BTNL3 主要在肠管中表达。

[0179] 类似方法用于测定各种人肿瘤组织样品中的 BTNL3RNA 表达水平。这些结果在图 4 中示出。在若干不同腺癌样品中, 而不是在所有肿瘤组织中检测到中等 BTNL3 表达水平。此外, 在来自 II 型糖尿病患者的一些样品中检测到中等和高度 BTNL3 表达水平, 表明 BTNL3 可在一些情况下, 在介导这种疾病或对这种疾病做出反应方面起作用。

[0180] 实施例 4 :对鼠类 CD4⁺T 细胞增殖的体外分析

[0181] 进行以下实验以确定人 BTNL3 :Fc 融合蛋白对体外小鼠 CD4⁺T 细胞增殖的作用。

[0182] 从收获自每个实验至少五只雌性 C57BL/6 小鼠的脾制备的单细胞脾细胞混悬液用于用小鼠 EASYSEP™ CD4⁺ 阴性选择试剂盒 (Stem Cell Sciences) 纯化 CD4⁺T 细胞。如通过 FACS 分析所评估, CD4⁺T 细胞的纯度大于 90%。组织培养物处理的微量滴定板用在图 5 的简要描述中指示的可变浓度的抗小鼠 CD3 单克隆抗体 (克隆 2C11, BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) 和 Fc 融合蛋白涂布。使用人 IgG (Sigma) 平衡各孔的总蛋白质含量。所有涂布 / 稀释都在 PBS 中进行。将平板孵育过夜。接着用 PBS 洗涤孔, 并且接着添加 1-2x 10⁵ 个纯化 CD4⁺ 脾细胞 / 孔。通过在 72 小时培养的最后 6 小时期间掺入 ³H- 胸苷 (1 μCi / 孔) 来测定 CD4⁺T 细胞的增殖。人 IgG 用作阴性对照。作为阳性对照, 也包括先前已显示出抑制 T 细胞的增殖的小鼠 BTNL2. Fc 和 T 细胞的已知正性共刺激物人 B7-2-Fc (R&D Biosystems)。

[0183] 结果在图 5 中示出。图 5 中的道次 1 代表不含有固定的蛋白质和另外蛋白质的阴性对照测定。道次 2 和 3 示出来自含有固定的抗小鼠 CD3 抗体加人 IgG (道次 2) 或人

B7-2-Fc 蛋白的阳性对照测定的结果。道次 4 示出来自含有固定的抗小鼠 CD3 抗体加负性共刺激分子小鼠 BTNL2. Fc 的测定的结果。道次 5 示出含有固定的抗小鼠 CD3 抗体加人 BTNL3. Fc 的测定的结果。道次 6 和 7 示出来自使用固定的人 IgG 加小鼠 BTNL2. Fc (道次 6) 或人 BTNL3. Fc (道次 7) 的测定的结果。这些数据证实人 B7-2-Fc 对小鼠 T 细胞增殖的刺激作用以及小鼠 BTNL2. Fc 对小鼠 T 细胞增殖的抑制作用, 并且指示人 BTNL3. Fc 可抑制小鼠 T 细胞增殖。这些数据表明人 BTNL3. Fc 融合蛋白对鼠类 T 细胞的作用可类似于使用鼠类 BNTL2. Fc 融合蛋白观察到的作用。此外, 这些数据表明尽管尚未分离人 BTNL3 的密切鼠类同源物, 但人 BTNL3 可与鼠类 T 细胞上的受体相互作用。

[0184] 实施例 5 :BTNL3. Fc 对小鼠 CD4⁺T 细胞的基因表达的作用

[0185] 在标准抗 CD3 增殖测定中, 如上所述分离小鼠 CD4⁺T 细胞, 并且用不加另外蛋白质的固定的抗 CD3 抗体、固定的小鼠 BTNL2. Fc 或固定的人 BTNL3. Fc 刺激。通过 ³H- 胸苷掺入来测量增殖。在刺激 24 小时之后, 从细胞分离 RNA, 并且通过 Affymetrix cDNA 芯片加以分析以测定多种序列的表达水平。结果在图 6 和下表 4 中示出。如所预期, 用固定的抗 CD3 抗体刺激鼠类 CD4⁺ 细胞使许多免疫调控性和炎症性基因的表达上调。包括鼠类 BTNL2. Fc 或人 BTNL3. Fc 使这种反应减弱。

[0186] 在图 6 中, 黑点代表在刺激的细胞中观察到的特定序列相较于未刺激细胞的相对表达量。在刺激的细胞与未刺激细胞之间无显著表达差异的序列未表示在图 6 中。在图 6 中, 左侧图示出来自仅用抗 CD3 抗体刺激的细胞的数据, 中间图示出来自用抗 CD3 抗体加鼠类 BTNL2. Fc 融合蛋白刺激的细胞的数据, 并且右侧图示出来自用抗 CD3 抗体加人 BTNL3. Fc 融合蛋白刺激的细胞的数据。这些数据显示通过用抗 CD3 抗体刺激 24 小时, 许多基因的表达得以显著上调或下调。然而, 添加鼠类 BTNL2. Fc 或人 BTNL3. Fc 大致上降低这个基因数目。这些数据证实 BTNL2. Fc 为负性共刺激物, 并且指示 BTNL3. Fc 也是负性共刺激物。因此, 这些结果指示两种分子均抑制抗 CD3 抗体对鼠类 CD4⁺T 细胞的活化。

[0187] 下表 4 提供来自这个实验的另外的数值数据。在测定的 45,060 个序列中, 许多 (26,530) 序列的表达未因仅用抗 CD3 抗体刺激而以统计显著方式变化。然而, 在仅用抗 CD3 抗体刺激后, 8,631 和 9,899 个序列的表达分别被显著上调或下调。当添加鼠类 BTNL2. Fc 或人 BTNL3. Fc 时, 这些数目被大致上降低。因此, BTNL2 和 BTNL3 均抑制 T 细胞的活化。

[0188] 表 4 :BTNL3 对抗 CD3 抗体的基因表达特征的作用

[0189]

生长条件	数据点数目			数据点总 数目
	未变	上调 ($p \leq 0.01$)	下调 ($p \leq 0.01$)	
抗 CD3 24 小时/无刺激 24 小时	26,530	8,631	9,899	45,060
抗 CD3+rBTNL2 Fc 24 小时/无刺激 24 小时	40,752	2,056	2,252	45,060
抗 CD3+rBTNL3 Fc 24 小时/无刺激 24 小时	39,161	2,831	3,068	45,060

[0001]

序列表

- <110> Amgen Inc.
Arnett, Heather A.
Escobar, Sabine S.
Swanson, Ryan M.
Viney, Joanne L.
- <120> 人 BTNL3 蛋白、核酸和抗体及其用途
- <130> A-1722-WO-PCT
- <140> 待指定
- <141> 2013-07-18
- <150> US 61/673,639
- <151> 2012-07-19
- <160> 18
- <170> PatentIn 3.5 版
- <210> 1
- <211> 1401
- <212> DNA
- <213> 智人
- <220>
- <221> CDS
- <222> (1)..(1401)
- <400> 1
- | | |
|--|-----|
| atg gct ttt gtg ctc att ttg gtt ctc agt ttc tac gag ctg gtg tca | 48 |
| Met Ala Phe Val Leu Ile Leu Val Leu Ser Phe Tyr Glu Leu Val Ser | |
| 1 5 10 15 | |
| gga cag tgg caa gtc act gga cgg ggc aag ttt gtc cag gcc ttg gtg | 96 |
| Gly Gln Trp Gln Val Thr Gly Pro Gly Lys Phe Val Gln Ala Leu Val | |
| 20 25 30 | |
| ggg gag gac gcc gtg ttc tcc tgc tcc ctc ttt cct gag acc agt gca | 144 |
| Gly Glu Asp Ala Val Phe Ser Cys Ser Leu Phe Pro Glu Thr Ser Ala | |
| 35 40 45 | |

[0002]

gag gct atg gaa gtg cgg ttc ttc agg aat cag ttc cat gct gtg gtc Glu Ala Met Glu Val Arg Phe Phe Arg Asn Gln Phe His Ala Val Val 50 55 60	192
cac ctc tac aga gat ggg gaa gac tgg gaa tct aag cag atg cca cag His Leu Tyr Arg Asp Gly Glu Asp Trp Glu Ser Lys Gln Met Pro Gln 65 70 75 80	240
tat cga ggg aga act gag ttt gtg aag gac tcc att gea ggg ggg cgt Tyr Arg Gly Arg Thr Glu Phe Val Lys Asp Ser Ile Ala Gly Gly Arg 85 90 95	288
gtc tct cta agg cta aaa aac atc act ccc tgg gac atc ggc ctg tat Val Ser Leu Arg Leu Lys Asn Ile Thr Pro Ser Asp Ile Gly Leu Tyr 100 105 110	336
ggg tgc tgg ttc agt tcc cag att tac gat gag gag gcc acc tgg gag Gly Cys Trp Phe Ser Ser Gln Ile Tyr Asp Glu Glu Ala Thr Trp Glu 115 120 125	384
ctg egg gtg gca gca ctg ggc tca ctt cct ctc att tcc atc gtg gga Leu Arg Val Ala Ala Leu Gly Ser Leu Pro Leu Ile Ser Ile Val Gly 130 135 140	432
tat gtt gac gga ggt atc cag tta ctc tgc ctg tcc tca ggc tgg ttc Tyr Val Asp Gly Gly Ile Gln Leu Leu Cys Leu Ser Ser Gly Trp Phe 145 150 155 160	480
ccc cag ccc aca gcc aag tgg aaa ggt cca caa gga cag gat ttg tct Pro Gln Pro Thr Ala Lys Trp Lys Gly Pro Gln Gly Gln Asp Leu Ser 165 170 175	528
tca gac tcc aga gea aat gea gat ggg tac age ctg tat gat gtg gag Ser Asp Ser Arg Ala Asn Ala Asp Gly Tyr Ser Leu Tyr Asp Val Glu 180 185 190	576
atc tcc att ata gtc cag gaa aat get ggg agc ata ttg tgt tcc atc Ile Ser Ile Ile Val Gln Glu Asn Ala Gly Ser Ile Leu Cys Ser Ile 195 200 205	624
cac ctt gct gag cag agt cat gag gtg gaa tcc aag gta ttg ata gga His Leu Ala Glu Gln Ser His Glu Val Glu Ser Lys Val Leu Ile Gly 210 215 220	672

[0003]

agc acc cct cct aca cga gta ggg gtc ttc ctg gac tat gag ggt ggg 1248
 Ser Thr Pro Pro Thr Arg Val Gly Val Phe Leu Asp Tyr Glu Gly Gly
 405 410 415

acc atc tcc ttc ttc aat aca aat gac cag tcc ctt att tat acc ctg 1296
 Thr Ile Ser Phe Phe Asn Thr Asn Asp Gln Ser Leu Ile Tyr Thr Leu
 420 425 430

ctg aca tgt cag ttt gaa ggc ttg ttg aga ccc tat atc cag cat gcg 1344
 Leu Thr Cys Gln Phe Glu Gly Leu Leu Arg Pro Tyr Ile Gln His Ala
 435 440 445

atg tat gac gag gaa aag ggg act ccc ata ttc ata tgt cca gtg tcc 1392
 Met Tyr Asp Glu Glu Lys Gly Thr Pro Ile Phe Ile Cys Pro Val Ser
 450 455 460

tgg gga tga 1401
 Trp Gly
 465

<210> 2

<211> 466

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Met Ala Phe Val Leu Ile Leu Val Leu Ser Phe Tyr Glu Leu Val Ser
 1 5 10 15

Gly Gln Trp Gln Val Thr Gly Pro Gly Lys Phe Val Gln Ala Leu Val
 20 25 30

Gly Glu Asp Ala Val Phe Ser Cys Ser Leu Phe Pro Glu Thr Ser Ala
 35 40 45

Glu Ala Met Glu Val Arg Phe Phe Arg Asn Gln Phe His Ala Val Val
 50 55 60

[0005]

Gly Leu Leu Cys Gly Ala Leu Cys Gly Val Val Met Gly Met Ile Ile
 245 250 255

Val Phe Phe Lys Ser Lys Gly Lys Ile Gln Ala Glu Leu Asp Trp Arg
 260 265 270

Arg Lys His Gly Gln Ala Glu Leu Arg Asp Ala Arg Lys His Ala Val
 275 280 285

Glu Val Thr Leu Asp Pro Glu Thr Ala His Pro Lys Leu Cys Val Ser
 290 295 300

Asp Leu Lys Thr Val Thr His Arg Lys Ala Pro Gln Glu Val Pro His
 305 310 315 320

Ser Glu Lys Arg Phe Thr Arg Lys Ser Val Val Ala Ser Gln Gly Phe
 325 330 335

Gln Ala Gly Lys His Tyr Trp Glu Val Asp Val Gly Gln Asn Val Gly
 340 345 350

Trp Tyr Val Gly Val Cys Arg Asp Asp Val Asp Arg Gly Lys Asn Asn
 355 360 365

Val Thr Leu Ser Pro Asn Asn Gly Tyr Trp Val Leu Arg Leu Thr Thr
 370 375 380

Glu His Leu Tyr Phe Thr Phe Asn Pro His Phe Ile Ser Leu Pro Pro
 385 390 395 400

Ser Thr Pro Pro Thr Arg Val Gly Val Phe Leu Asp Tyr Glu Gly Gly
 405 410 415

[0007]

Thr Ile Ser Phe Phe Asn Thr Asn Asp Gln Ser Leu Ile Tyr Thr Leu
 420 425 430

Leu Thr Cys Gln Phe Glu Gly Leu Leu Arg Pro Tyr Ile Gln His Ala
 435 440 445

Met Tyr Asp Glu Glu Lys Gly Thr Pro Ile Phe Ile Cys Pro Val Ser
 450 455 460

Trp Gly
 465

<210> 3
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 3

Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
 1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly
 20

<210> 4
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 4

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
 1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Gly Ser Ala

[0008]

ggg tgc tgg ttc agt tcc cag att tac gat gag gag gcc acc tgg gag Gly Cys Trp Phe Ser Ser Gln Ile Tyr Asp Glu Glu Ala Thr Trp Glu 115 120 125	384
ctg egg gtg gca gca ctg ggc tca ctt cct ctc att tcc atc gtg gga Leu Arg Val Ala Ala Leu Gly Ser Leu Pro Leu Ile Ser Ile Val Gly 130 135 140	432
tat gtt gac gga ggt atc cag tta ctc tgc ctg tcc tca ggc tgg ttc Tyr Val Asp Gly Gly Ile Gln Leu Leu Cys Leu Ser Ser Gly Trp Phe 145 150 155 160	480
ccc cag ccc aca gcc aag tgg aaa ggt cca caa gga cag gat ttg tct Pro Gln Pro Thr Ala Lys Trp Lys Gly Pro Gln Gly Gln Asp Leu Ser 165 170 175	528
tea gac tcc aga gca aat gca gat ggg tac agc ctg tat gat gtg gag Ser Asp Ser Arg Ala Asn Ala Asp Gly Tyr Ser Leu Tyr Asp Val Glu 180 185 190	576
atc tcc att ata gtc cag gaa aat gct ggg agc ata ttg tgt tcc atc Ile Ser Ile Ile Val Gln Glu Asn Ala Gly Ser Ile Leu Cys Ser Ile 195 200 205	624
cac ctt gct gag cag agt cat gag gtg gaa tcc aag gta ttg ata gga His Leu Ala Glu Gln Ser His Glu Val Glu Ser Lys Val Leu Ile Gly 210 215 220	672
gag acg ttt ttc cag ccc tea cct tgg cgc ctg gct gga ggt gga ggc Glu Thr Phe Phe Gln Pro Ser Pro Trp Arg Leu Ala Gly Gly Gly Gly 225 230 235 240	720
tcc gga ggt gga ggt tcc ggt gga ggt gga tcc gac aaa act cac aca Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr 245 250 255	768
tgt cca ccg tgc cca gca cct gaa ctc ctg ggg gga ccg tca gtt ttc Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe 260 265 270	816
ctc ttc ccc cca aaa ccc aag gac acc ctc atg atc tcc cgg acc cct Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro 275 280 285	864

[0010]

gag gtc aca tgc gtg gtg gac gtg agc cac gaa gac cct gag gtc Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val 290 295 300	912
aag ttc aac tgg tac gtg gac ggc gtg gag gtg cat aat gcc aag aca Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr 305 310 315 320	960
aag ccg cgg gag gag cag tac aac age acg tac cgt gtg gtc agc gtc Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val 325 330 335	1008
ctc acc gtc ctg cac cag gac tgg ctg aat ggc aag gag tac aag tgc Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys 340 345 350	1056
aag gtc tcc aac aaa gcc etc cca gcc ccc atc gag aaa acc atc tcc Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser 355 360 365	1104
aaa gcc aaa ggg cag ccc cga gaa cca cag gtg tac acc ctg ccc cca Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro 370 375 380	1152
tcc egg gat gag ctg acc aag aac cag gtc age ctg acc tgc ctg gtc Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val 385 390 395 400	1200
aaa ggc ttc tat ccc age gac atc gcc gtg gag tgg gag age aat ggg Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly 405 410 415	1248
cag ccg gag aac aac tac aag acc acg cct ccc gtg ctg gac tcc gac Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp 420 425 430	1296
ggc tcc ttc ttc etc tac age aag etc acc gtg gac aag age agg tgg Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp 435 440 445	1344
cag cag ggg aac gtc ttc tca tgc tcc gtg atg cat gag gct ctg cac Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His 450 455 460	1392

[0011]

aac cac tac acg cag aag agc ctc tcc ctg tet ccc ggt aaa tga 1437
 Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 465 470 475

<210> 6
 <211> 478
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成构建体

<400> 6

Met Ala Phe Val Leu Ile Leu Val Leu Ser Phe Tyr Glu Leu Val Ser
 1 5 10 15

Gly Gln Trp Gln Val Thr Gly Pro Gly Lys Phe Val Gln Ala Leu Val
 20 25 30

Gly Glu Asp Ala Val Phe Ser Cys Ser Leu Phe Pro Glu Thr Ser Ala
 35 40 45

Glu Ala Met Glu Val Arg Phe Phe Arg Asn Gln Phe His Ala Val Val
 50 55 60

His Leu Tyr Arg Asp Gly Glu Asp Trp Glu Ser Lys Gln Met Pro Gln
 65 70 75 80

Tyr Arg Gly Arg Thr Glu Phe Val Lys Asp Ser Ile Ala Gly Gly Arg
 85 90 95

Val Ser Leu Arg Leu Lys Asn Ile Thr Pro Ser Asp Ile Gly Leu Tyr
 100 105 110

[0012]

Gly Cys Trp Phe Ser Ser Gln Ile Tyr Asp Glu Glu Ala Thr Trp Glu
 115 120 125

Leu Arg Val Ala Ala Leu Gly Ser Leu Pro Leu Ile Ser Ile Val Gly
 130 135 140

Tyr Val Asp Gly Gly Ile Gln Leu Leu Cys Leu Ser Ser Gly Trp Phe
 145 150 155 160

Pro Gln Pro Thr Ala Lys Trp Lys Gly Pro Gln Gly Gln Asp Leu Ser
 165 170 175

Ser Asp Ser Arg Ala Asn Ala Asp Gly Tyr Ser Leu Tyr Asp Val Glu
 180 185 190

Ile Ser Ile Ile Val Gln Glu Asn Ala Gly Ser Ile Leu Cys Ser Ile
 195 200 205

His Leu Ala Glu Gln Ser His Glu Val Glu Ser Lys Val Leu Ile Gly
 210 215 220

Glu Thr Phe Phe Gln Pro Ser Pro Trp Arg Leu Ala Gly Gly Gly Gly
 225 230 235 240

Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr
 245 250 255

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe
 260 265 270

Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
 275 280 285

[0013]

Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
290 295 300

Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
305 310 315 320

Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
325 330 335

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
340 345 350

Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
355 360 365

Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
370 375 380

Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val
385 390 395 400

Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
405 410 415

Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
420 425 430

Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
435 440 445

Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
450 455 460

[0014]

Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
465 470 475

<210> 7
<211> 461
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 融合蛋白

<400> 7

Gln Trp Gln Val Thr Gly Pro Gly Lys Phe Val Gln Ala Leu Val Gly
1 5 10 15

Glu Asp Ala Val Phe Ser Cys Ser Leu Phe Pro Glu Thr Ser Ala Glu
20 25 30

Ala Met Glu Val Arg Phe Phe Arg Asn Gln Phe His Ala Val Val His
35 40 45

Leu Tyr Arg Asp Gly Glu Asp Trp Glu Ser Lys Gln Met Pro Gln Tyr
50 55 60

Arg Gly Arg Thr Glu Phe Val Lys Asp Ser Ile Ala Gly Gly Arg Val
65 70 75 80

Ser Leu Arg Leu Lys Asn Ile Thr Pro Ser Asp Ile Gly Leu Tyr Gly
85 90 95

Cys Trp Phe Ser Ser Gln Ile Tyr Asp Glu Glu Ala Thr Trp Glu Leu
100 105 110

Arg Val Ala Ala Leu Gly Ser Leu Pro Leu Ile Ser Ile Val Gly Tyr
115 120 125

[0015]

Val Asp Gly Gly Ile Gln Leu Leu Cys Leu Ser Ser Gly Trp Phe Pro
 130 135 140

Gln Pro Thr Ala Lys Trp Lys Gly Pro Gln Gly Gln Asp Leu Ser Ser
 145 150 155 160

Asp Ser Arg Ala Asn Ala Asp Gly Tyr Ser Leu Tyr Asp Val Glu Ile
 165 170 175

Ser Ile Ile Val Gln Glu Asn Ala Gly Ser Ile Leu Cys Ser Ile His
 180 185 190

Leu Ala Glu Gln Ser His Glu Val Glu Ser Lys Val Leu Ile Gly Glu
 195 200 205

Thr Phe Phe Gln Pro Ser Pro Trp Arg Leu Ala Gly Gly Gly Gly Ser
 210 215 220

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Lys Thr His Thr Cys
 225 230 235 240

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
 245 250 255

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
 260 265 270

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
 275 280 285

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
 290 295 300

[0016]

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
305 310 315 320

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
325 330 335

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
340 345 350

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
355 360 365

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
370 375 380

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
385 390 395 400

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
405 410 415

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
420 425 430

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
435 440 445

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450 455 460

<210> 8

<211> 1299

[0017]

<212>	DNA	
<213>	智人	
<220>		
<221>	CDS	
<222>	(1)..(1299)	
<400>	8	
atg get ttt gtg etc att ttg gtt etc agt ttc tac gag ctg gtg tea		48
Met Ala Phe Val Leu Ile Leu Val Leu Ser Phe Tyr Glu Leu Val Ser		
1 5 10 15		
gga cag tgg caa gtc act gga ccg ggc aag ttt gtc cag gcc ttg gtg		96
Gly Gln Trp Gln Val Thr Gly Pro Gly Lys Phe Val Gln Ala Leu Val		
20 25 30		
ggg gag gac gcc gtg ttc tcc tgc tcc etc ttt cct gag acc agt gea		144
Gly Glu Asp Ala Val Phe Ser Cys Ser Leu Phe Pro Glu Thr Ser Ala		
35 40 45		
gag get atg gaa gtg cgg ttc ttc agg aat cag ttc cat get gtg gtc		192
Glu Ala Met Glu Val Arg Phe Phe Arg Asn Gln Phe His Ala Val Val		
50 55 60		
caac etc tac aga gat ggg gaa gac tgg gaa tct aag cag atg cca cag		240
His Leu Tyr Arg Asp Gly Glu Asp Trp Glu Ser Lys Gln Met Pro Gln		
65 70 75 80		
tat cga ggg aga act gag ttt gtg aag gac tcc att gca ggg ggg cgt		288
Tyr Arg Gly Arg Thr Glu Phe Val Lys Asp Ser Ile Ala Gly Gly Arg		
85 90 95		
gtc tct cta agg cta aaa aac atc act ccc teg gac atc ggc ctg tat		336
Val Ser Leu Arg Leu Lys Asn Ile Thr Pro Ser Asp Ile Gly Leu Tyr		
100 105 110		
ggg tgc tgg ttc agt tcc cag att tac gat gag gag gcc acc tgg gag		384
Gly Cys Trp Phe Ser Ser Gln Ile Tyr Asp Glu Glu Ala Thr Trp Glu		
115 120 125		
ctg egg gtg gca gca ctg ggc tea ett cct etc att tcc atc gtg gga		432
Leu Arg Val Ala Ala Leu Gly Ser Leu Pro Leu Ile Ser Ile Val Gly		
130 135 140		

[0018]

tat gtt gac gga ggt atc cag tta ctc tgc ctg tcc tca ttc cag ccc Tyr Val Asp Gly Gly Ile Gln Leu Leu Cys Leu Ser Ser Phe Gln Pro 145 150 155 160	480
tea cct tgg cgc ctg gct tct att tta ctc ggg tta ctc tgt ggt gcc Ser Pro Trp Arg Leu Ala Ser Ile Leu Leu Gly Leu Leu Cys Gly Ala 165 170 175	528
ctg tgt ggt gtt gtc atg ggg atg ata att gtt ttc ttc aaa tcc aaa Leu Cys Gly Val Val Met Gly Met Ile Ile Val Phe Phe Lys Ser Lys 180 185 190	576
ggg aaa atc cag gcg gaa ctg ggt atg tgt cat gtc ctg agc ctc cca Gly Lys Ile Gln Ala Glu Leu Gly Met Cys His Val Leu Ser Leu Pro 195 200 205	624
cac atg gtt ctc ccg ggt ccc tcc ctg atc cac agt ttg agc ctc tgg His Met Val Leu Pro Gly Pro Ser Leu Ile His Ser Leu Ser Leu Trp 210 215 220	672
acg acc ctg gct gca ggc tgg aca gga agc acc gac tgg aga aga aag Thr Thr Leu Ala Ala Gly Trp Thr Gly Ser Thr Asp Trp Arg Arg Lys 225 230 235 240	720
cac gga cag gca gaa ttg aga gac gcc cgg aaa cac gca gtg gag gtg His Gly Gln Ala Glu Leu Arg Asp Ala Arg Lys His Ala Val Glu Val 245 250 255	768
act ctg gat cca gag acg gct cac ccg aag ctc tgc gtt tet gat ctg Thr Leu Asp Pro Glu Thr Ala His Pro Lys Leu Cys Val Ser Asp Leu 260 265 270	816
aaa act gta acc cat aga aaa gct ccc cag gag gtg cct cac tet gag Lys Thr Val Thr His Arg Lys Ala Pro Gln Glu Val Pro His Ser Glu 275 280 285	864
aag aga ttt aca agg aag agt gtg gtg gct tet cag ggt ttc caa gca Lys Arg Phe Thr Arg Lys Ser Val Val Ala Ser Gln Gly Phe Gln Ala 290 295 300	912
ggg aaa cat tac tgg gag gtg gac gtg gga caa aat gta ggg tgg tat Gly Lys His Tyr Trp Glu Val Asp Val Gly Gln Asn Val Gly Trp Tyr 305 310 315 320	960

[0019]

gtg gga gtg tgt cgg gat gac gta gac agg ggg aag aac aat gtg act	1008
Val Gly Val Cys Arg Asp Asp Val Asp Arg Gly Lys Asn Asn Val Thr	
325 330 335	
ttg tet ccc aac aat ggg tat tgg gtc ctc aga ctg aca aca gaa cat	1056
Leu Ser Pro Asn Asn Gly Tyr Trp Val Leu Arg Leu Thr Thr Glu His	
340 345 350	
ttg tat ttc aca ttc aat ccc cat ttt atc agc etc ccc ccc agc acc	1104
Leu Tyr Phe Thr Phe Asn Pro His Phe Ile Ser Leu Pro Pro Ser Thr	
355 360 365	
ccg cct aca cga gta ggg gtc ttc ctg gac tat gag ggt ggg acc atc	1152
Pro Pro Thr Arg Val Gly Val Phe Leu Asp Tyr Glu Gly Gly Thr Ile	
370 375 380	
tcc ttc ttc aat aca aat gac cag tcc ctt att tat acc ctg ctg aca	1200
Ser Phe Phe Asn Thr Asn Asp Gln Ser Leu Ile Tyr Thr Leu Leu Thr	
385 390 395 400	
tgt cag ttt gaa ggc ttg ttg aga ccc tat atc cag cat gcg atg tat	1248
Cys Gln Phe Glu Gly Leu Leu Arg Pro Tyr Ile Gln His Ala Met Tyr	
405 410 415	
gac gag gaa aag ggg act ccc ata ttc ata tgt cca gtg tcc tgg gga	1296
Asp Glu Glu Lys Gly Thr Pro Ile Phe Ile Cys Pro Val Ser Trp Gly	
420 425 430	
tga	1299
<210> 9	
<211> 432	
<212> PRT	
<213> 智人	
<400> 9	
Met Ala Phe Val Leu Ile Leu Val Leu Ser Phe Tyr Glu Leu Val Ser	
1 5 10 15	
Gly Gln Trp Gln Val Thr Gly Pro Gly Lys Phe Val Gln Ala Leu Val	

[0020]

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

[0021]

370	375	380
Ser Phe Phe Asn Thr Asn Asp Gln Ser Leu Ile Tyr Thr Leu Leu Thr		
385	390	395 400
Cys Gln Phe Glu Gly Leu Leu Arg Pro Tyr Ile Gln His Ala Met Tyr		
	405	410 415
Asp Glu Glu Lys Gly Thr Pro Ile Phe Ile Cys Pro Val Ser Trp Gly		
	420	425 430
<210> 10		
<211> 5		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 接头		
<400> 10		
Gly Gly Gly Gly Ser		
1	5	
<210> 11		
<211> 6		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 接头		
<400> 11		
Gly Gly Gly Gly Ser Asn		
1	5	
<210> 12		

[0023]

1 5 10

<210> 18
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 接头

<400> 18

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

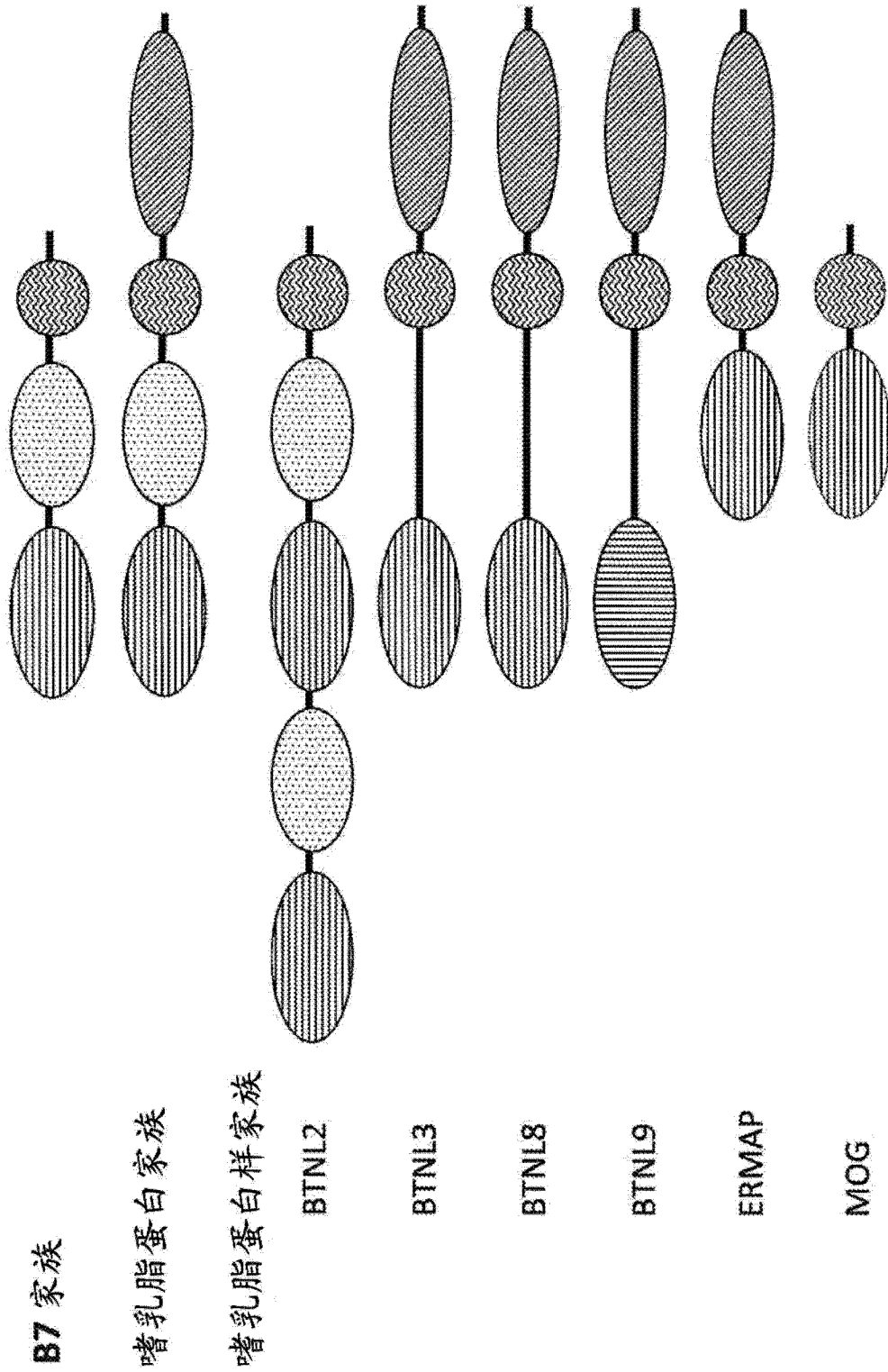


图 1

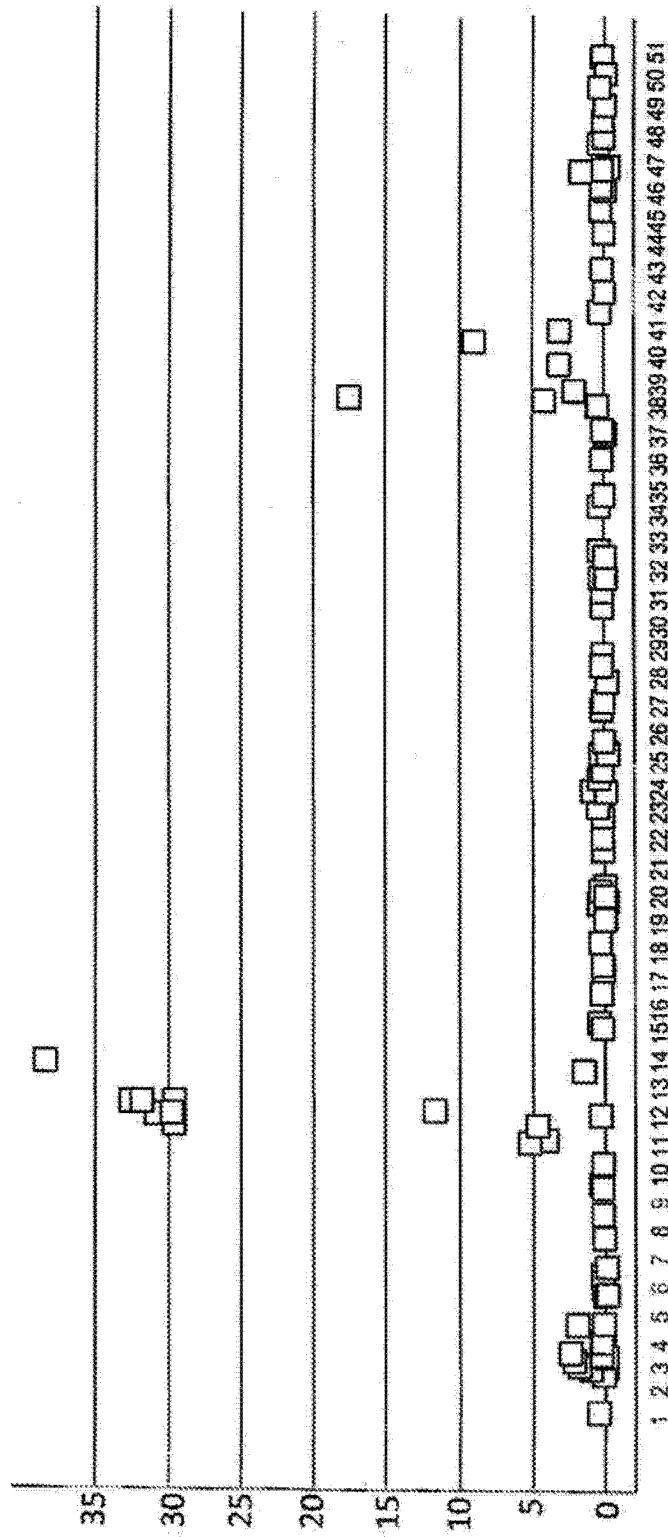


图 3

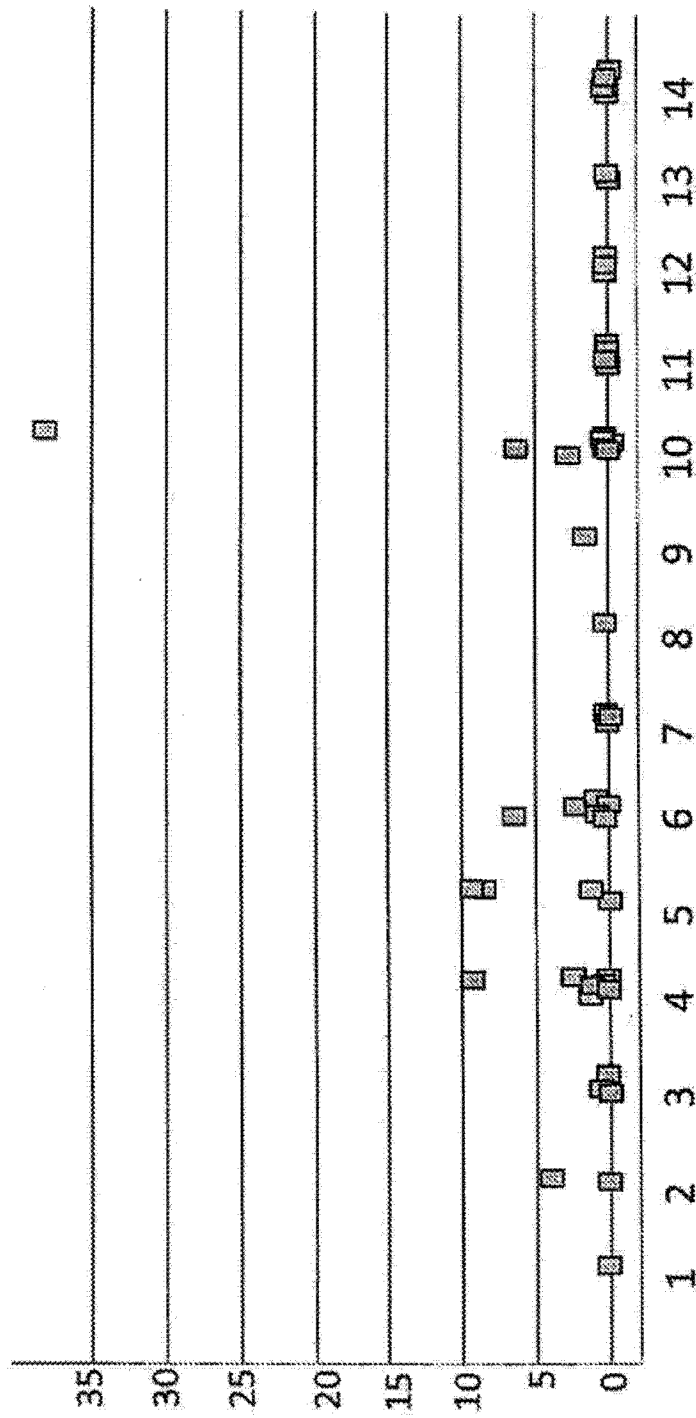


图 4

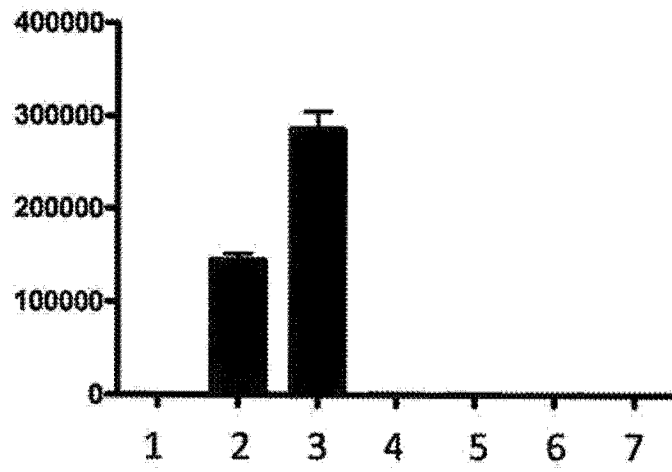


图 5

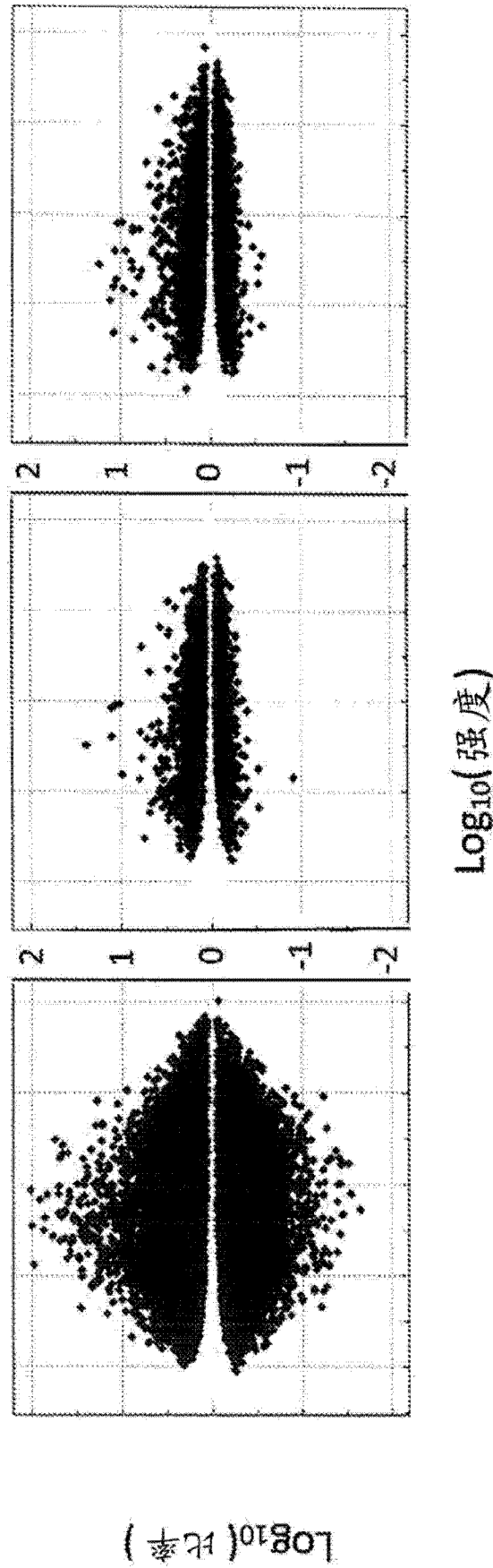


图 6