(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 112153977 B
(45)授权公告日 2025.01.10

(21)申请号 201980031870.6
(22)申请日 2019.04.05
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112153977 A
(43)申请公布日 2020.12.29
(30)优先权数据
62/654,068 2018.04.06 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2020.11.10
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/026034 2019.04.05
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2019/204057 EN 2019.10.24
(73)专利权人 丹娜法伯癌症研究院
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 G·J·弗里曼 A·R·阿鲁兰南丹
(74)专利代理机构 北京市君合律师事务所 11517
专利代理师 吴瑜 黄遵玲
(51)Int.Cl.
A61K 38/00(2006.01)
C07K 14/705(2006.01)
C07K 16/28(2006.01)
C07K 16/30(2006.01)
C07K 16/44(2006.01)
(56)对比文件
US 20170081410 A1,2017.03.23
CN 106414489 A,2017.02.15
审查员 许慧娜

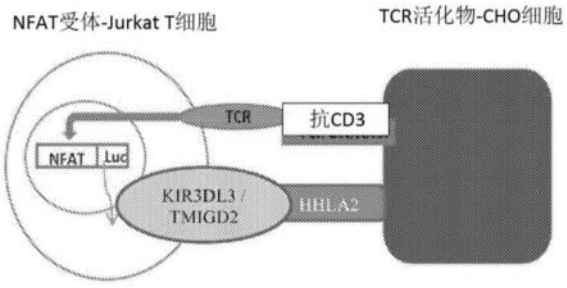
权利要求书4页 说明书193页
序列表161页 附图34页

(54)发明名称

作为HHLA2受体的KIR3DL3、抗HHLA2抗体及其用途

(57)摘要

本发明部分地基于以下发现:特异性地结合HHLA2的单克隆抗体及其抗原结合片段以及其免疫球蛋白、多肽、核酸,和使用此类抗体用于诊断性、预后性和治疗性目的的方法。



CN 112153977 B

1.一种抗HHLA2单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段包含:

a)重链可变区(VH),其中所述VH包含氨基酸序列如SEQ ID NO:206所示的VH CDR1、氨基酸序列如SEQ ID NO:210所示的VH CDR2以及氨基酸序列如SEQ ID NO:214所示的VH CDR3;和

b)轻链可变区(VL),其中所述VL包含氨基酸序列如SEQ ID NO:224所示的VL CDR1、氨基酸序列如SEQ ID NO:228所示的VL CDR2以及氨基酸序列如SEQ ID NO:232所示的VL CDR3。

2.根据权利要求1所述的抗HHLA2单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段包含:

a)VH,所述VH包含如SEQ ID NO:199所示的氨基酸序列;和

b)VL,所述VL包含如SEQ ID NO:217所示的氨基酸序列。

3.根据权利要求1所述的抗HHLA2单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体或其抗原结合片段:

i)是嵌合抗体、人源化抗体、复合型抗体或鼠抗体;

ii)是能够被检测地标记的;

iii)包含效应结构域;

iv)选自由以下组成的群组:Fv、Fav、F(ab')2、Fab'、dsFv、scFv、sc(Fv)2和双抗体片段;

v)抑制:a)HHLA2与TMIGD2的结合,b)HHLA2与KIR3DL3的结合,或c)HHLA2与TMIGD2的结合以及HHLA2与KIR3DL3的结合;或

vi)特异性地结合HHLA2。

4.一种分离的核酸分子,其在严格条件下与编码根据权利要求1所述的抗HHLA2单克隆抗体或其抗原结合片段的核酸的补体杂交或与编码根据权利要求1所述的抗HHLA2单克隆抗体或其抗原结合片段的核酸杂交。

5.一种载体,其包含根据权利要求4所述的分离的核酸。

6.一种宿主细胞,其包含根据权利要求4所述的分离的核酸。

7.一种装置或试剂盒,其包含根据权利要求1或2所述的至少一种抗HHLA2单克隆抗体或其抗原结合片段。

8.根据权利要求7所述的装置或试剂盒,其包含检测所述至少一种抗HHLA2单克隆抗体或其抗原结合片段的标记,或包含检测包含所述抗HHLA2单克隆抗体或其抗原结合片段的复合物的标记。

9.一种产生根据权利要求1或2所述的至少一种抗HHLA2单克隆抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包含以下步骤:(i)在适于允许根据权利要求1或2所述的至少一种抗HHLA2单克隆抗体或其抗原结合片段表达的条件下培养已经通过包含编码所述抗HHLA2单克隆抗体的序列的核酸转化的经转化的宿主细胞;和(ii)回收表达的抗HHLA2单克隆抗体或其抗原结合片段。

10.根据权利要求1或2所述的抗HHLA2单克隆抗体或其抗原结合片段在制备用于检测HHLA2多肽的存在或水平的装置或试剂盒中的用途,其中所述检测包含获得样品并且检测

所述样品中的所述多肽。

11.根据权利要求10所述的用途,其中所述至少一种抗HHLA2单克隆抗体或其抗原结合片段与HHLA2多肽形成复合物,并且以酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、免疫化学、蛋白质印迹法的形式或使用细胞内流式测定来检测所述复合物。

12.根据权利要求1或2所述的至少一种抗HHLA2单克隆抗体或其抗原结合片段在制备用于监测受试者的与异常HHLA2表达相关联的病症的进展的装置或试剂盒中的用途,其中所述监测包含:

a)在第一时间点处使用至少一种所述的装置或试剂盒检测受试者样品中HHLA2的水平;

b)在后续时间点处重复步骤a);以及

c)比较步骤a)和b)中检测的HHLA2的水平以监测所述受试者的所述病症的进展。

13.根据权利要求12所述的用途,其中在所述第一时间点与所述后续时间点之间,所述受试者经历治疗以改善所述病症。

14.根据权利要求1或2所述的至少一种抗HHLA2单克隆抗体或其抗原结合片段在制备用于预测罹患与异常HHLA2表达相关联的病症的受试者的临床结果的装置或试剂盒中的用途,其中所述预测包含:

a)使用所述的装置或试剂盒确定受试者样品中HHLA2的水平;

b)使用所述至少一种抗HHLA2单克隆抗体或其抗原结合片段确定来自具有良好临床结果的对照受试者的样品中HHLA2的水平;以及

c)比较所述受试者样品中和来自所述对照受试者的所述样品中HHLA2的水平;

其中与来自所述对照受试者的所述样品中的水平相比,所述受试者样品中HHLA2的显著更高的水平指示所述受试者具有较差临床结果。

15.根据权利要求14所述的用途,其中所述HHLA2的显著更高水平包含所述受试者样品中HHLA2的水平相对于来自所述对照受试者的所述样品中HHLA2的正常水平的至少20%增加。

16.根据权利要求1或2所述的至少一种抗HHLA2单克隆抗体或其抗原结合片段在制备用于评定针对受试者的与异常HHLA2表达相关联的病症的疗法的功效的装置或试剂盒中的用途,其中所述评定包含:

a)在向所述受试者提供所述疗法的至少一部分之前使用所述的装置或试剂盒确定从所述受试者获得的第一样品中HHLA2的水平;以及

b)在提供所述疗法的所述部分之后确定从所述受试者获得的第二样品中HHLA2的水平,

其中所述第二样品中HHLA2相对于所述第一样品的显著更低水平指示所述疗法对于抑制所述受试者的所述病症是有效的。

17.根据权利要求16所述的用途,其中所述HHLA2的显著更低水平包含HHLA2的水平的至少20%降低。

18.根据权利要求1或2所述的至少一种抗HHLA2单克隆抗体或其抗原结合片段在制备用于评定测试化合物用于抑制受试者的与异常HHLA2表达相关联的病症的功效的装置或试剂盒中的用途,其中所述评定包含:

a)使用所述的装置或试剂盒确定从所述受试者获得并暴露于所述测试化合物的第一样品中HHLA2的水平;以及

b)确定从所述受试者获得的第二样品中HHLA2的水平,

其中

(i)所述第二样品不暴露于所述测试化合物,并且相对于所述第二样品HHLA2的显著更低水平指示所述测试化合物对于抑制所述受试者的所述病症是有效的;和/或

(ii)所述第一样品和所述第二样品是从所述受试者获得的单个样品的部分或从所述受试者获得的汇集样品的部分。

19.根据权利要求12至18中任一项所述的用途,其中所述病症是癌症。

20.根据权利要求19所述的用途,其中所述癌症选自由以下组成的群组:肺癌、肾癌、胰腺癌、结直肠癌、急性髓细胞性白血病、头颈癌、肝癌、卵巢癌、前列腺癌、子宫癌、胶质瘤、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、乳腺癌、胰腺导管癌、胸腺瘤、白血病、B细胞淋巴瘤和浸润表达HHLA2的受体的免疫细胞的癌症。

21.根据权利要求20所述的用途,其中所述白血病是B-CLL。

22.根据权利要求10-21中任一项所述的用途,其中所述样品、受试者样品、对照受试者的样品、第一样品和/或第二样品包含细胞、血清、癌周组织和/或瘤内组织。

23.根据权利要求21所述的用途,其中所述受试者是人。

24.根据权利要求1或2所述的至少一种抗HHLA2单克隆抗体或其抗原结合片段在制备用于治疗罹患癌症的受试者的药物制剂中的用途。

25.根据权利要求24所述的用途,其中

a)所述至少一种抗HHLA2单克隆抗体或其抗原结合片段缀合至细胞毒性剂;

b)所述细胞毒性剂选自由以下组成的群组:化疗剂、生物剂、毒素和放射性同位素;

c)所述至少一种抗HHLA2单克隆抗体或其抗原结合片段减少所述癌症中增殖细胞的数量和/或降低所述癌症的肿瘤的体积或大小;

d)所述至少一种单克隆抗体或其抗原结合片段以药学上可接受的剂型施用;

e)所述受试者中的癌细胞和/或肿瘤免疫浸润细胞表达HHLA2;

f)所述癌症选自由以下组成的群组:肺癌、肾癌、胰腺癌、结直肠癌、急性髓细胞性白血病、头颈癌、肝癌、卵巢癌、前列腺癌、子宫癌、胶质瘤、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、乳腺癌、胰腺导管癌、胸腺瘤、白血病、B细胞淋巴瘤和浸润表达HHLA2的受体的免疫细胞的癌症;

g)向所述受试者施用进一步的用于治疗癌症的治疗剂或方案;

h)向所述受试者施用选自由以下组成的群组的额外疗法:免疫疗法、检查点阻断、癌症疫苗、嵌合抗原受体、化疗、放射、靶疗法和手术;和/或

i)所述受试者是癌症的动物模型。

26.根据权利要求25所述的用途,其中所述白血病是B-CLL。

27.根据权利要求25或26所述的用途,其中所述动物模型是小鼠模型。

28.根据权利要求27所述的用途,其中所述小鼠模型是人源化小鼠模型。

29.根据权利要求28所述的用途,其中所述受试者是哺乳动物。

30.根据权利要求29所述的用途,其中所述受试者是人源化小鼠或人。

31.根据权利要求1或2所述的至少一种抗HHLA2单克隆抗体或其抗原结合片段在制备

用于调控受试者的免疫应答的药物制剂中的用途,其中所述调控包含施用根据权利要求1或2所述的抗HHLA2单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述抗HHLA2单克隆抗体或其抗原结合片段抑制HHLA2与KIRDL3之间的相互作用。

32.根据权利要求31所述的用途,其中

a)阻断HHLA2与KIRDL3之间的相互作用以用于检查点阻断癌症免疫疗法;

b)使用抗HHLA2抗体抑制或阻断HHLA2与KIRDL3之间的相互作用;和/或

c)所述抗HHLA2抗体是用于癌症免疫疗法的T细胞活化的检查点抑制剂。

33.根据权利要求1或2所述的至少一种抗HHLA2单克隆抗体或其抗原结合片段在制备用于调控受试者的免疫应答的药物制剂中的用途,其中所述调控包含施用根据权利要求1或2所述的抗HHLA2单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述抗HHLA2单克隆抗体或其抗原结合片段不阻断或不显著抑制HHLA2与其结合刺激性受体TMIGD2之间的相互作用。

作为HHLA2受体的KIR3DL3、抗HHLA2抗体及其用途

[0001] 权利声明

[0002] 本发明是在政府支持下在美国国立卫生研究院授予的批准号P01 AI056299下进行的。政府享有本发明中的某些权利。

背景技术

[0003] 免疫检查点,诸如CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIR家族受体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、GITR、4-IBB、OX-40、BTLA、SIRPα(CD47)、CD48、2B4(CD244)、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、嗜乳脂蛋白(butyrophilin)和A2aR以及多种其他免疫检查点,基于多个输入之间的复杂性和组合相互作用来负向调节免疫应答进展。免疫检查点的抑制剂可以调控一些受试者的免疫应答,但是免疫检查点表达和与天然结合配偶体之间的相互作用在不同受试者之间且在受试者的不同组织内变化。因此,本领域中非常需要鉴定用于干预的新检查点。HHLA2是调控T细胞功能的新鉴定的B7家族成员。HHLA2被鉴定为TMIGD2的特异性配体,并且HHLA2/TMIGD2相互作用经由AKT依赖性信号传导级联选择性地共刺激人T细胞生长和细胞因子产生(Zhu等人(2013)《自然通讯(Nat.Comm.)》4:2043;Janakiram等人(2015)《临床癌症研究(Clin.Cancer Res.)》21:2359-2366)。若干研究表明了活化T细胞上HHLA2的第二未表征受体发挥共抑制功能(Zhao等人(2013)《美国科学院院报(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》110:9879-9884;Xiao和Freeman等人(2015)《临床癌症研究》21:2201-2203;Wang等人(2014)《免疫学杂志(J.Immunol.)》192:126.11)。HHLA2在各种人类癌症上表达,并且其共抑制功能使其成为癌症免疫疗法的候选物。

发明内容

[0004] 本发明至少部分地基于以下发现,即作为B7基因家族成员的HHLA2在各种肿瘤和抗原呈递细胞中广泛地表达,并且被视为T细胞的活化配体和抑制性配体两者。在原初T细胞中表达的TMIGD2是HHLA2的活化受体并且在T细胞抗原受体(TCR)接合之后转导共刺激性信号。TMIGD2在重复TCR刺激之后下调。HHLA2的推定抑制性受体可能在活化T细胞上上调以调控T细胞活化。本发明至少部分地基于以下发现,即HHLA2结合T细胞和NK细胞上的受体KIR3DL3,并且HHLA2:KIR3DL3相互作用的结果是T细胞活化被抑制。基于观察到HHLA2在肿瘤中高度表达并且可以充当检查点配体,生成作为候选免疫检查点抑制剂的一组抗HHLA2人单克隆抗体(mAb)。通过评估可溶性人HHLA2-mIgG2a与TMIGD2转染的300.19小鼠前B白血病细胞或与KIR3DL3转染的300.19小鼠前B白血病细胞的结合来鉴定阻断性和非阻断性抗HHLA2 mAb。T细胞测定中阻断HHLA2与TMIGD2和KIR3DL3两者的结合或更选择性地阻断与KIR3DL3的结合但不阻断与TMIGD2的结合的抗HHLA2 mAb被显示为检查点抑制剂抗体。

[0005] 一方面,提供了一种单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体包含:a)与选自由表2中列出的序列组成的群组的重链序列具有至少约95%同一性的重链序列;和/或b)与选自由表2中列出的序列组成的群组的轻链序列具有至少约95%同一性的轻链序

列。

[0006] 另一方面,提供了一种单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体包含:a)与选自由表2中列出的序列组成的群组的重链CDR序列具有至少约95%同一性的重链CDR序列;和/或b)与选自由表2中列出的序列组成的群组的轻链CDR序列具有至少约95%同一性的轻链CDR序列。

[0007] 又一方面,提供了一种单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体包含:a)选自由表2中列出的序列组成的群组的重链序列;和/或b)选自由表2中列出的序列组成的群组的轻链序列。

[0008] 再一方面,提供了一种单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述单克隆抗体包含:a)选自由表2中列出的序列组成的群组的重链CDR序列;和/或b)选自由表2中列出的序列组成的群组的轻链CDR序列。

[0009] 还提供了可以应用于本文所述的本发明的任何方面的多个实施例。例如,在一个实施例中,所述单克隆抗体或其抗原结合片段是嵌合的、人源化的、复合型的、鼠的或人的。在另一个实施例中,所述单克隆抗体或其抗原结合片段是可检测地标记的,包含效应结构域,包含Fc结构域,和/或选自由以下组成的群组:Fv、Fav、F(ab')2)、Fab'、dsFv、scFv、sc(Fv)2和双抗体片段。在又一个实施例中,所述单克隆抗体或其抗原结合片段可从在保藏登录号_____下保藏的杂交瘤_____获得。在再一个实施例中,所述单克隆抗体或其抗原结合片段抑制:a)HHLA2与TMIGD2的结合,b)HHLA2与KIR3DL3的结合,或c)HHLA2与TMIGD2的结合以及HHLA2与KIR3DL3的结合。T细胞活化测定中阻断HHLA2与KIR3DL3的结合的HHLA2 mAb被显示为检查点阻断剂。在另一个实施例中,所述单克隆抗体或其抗原结合片段特异性地结合HHLA2。

[0010] 另一方面,提供了一种免疫球蛋白重链和/或轻链,其选自由表2中列出的免疫球蛋白重链序列和轻链序列组成的群组。

[0011] 又一方面,提供了一种分离的核酸分子,其在严格条件下与编码选自由表2中列出的多肽序列组成的群组的多肽的核酸或与编码选自由表2中列出的多肽序列组成的群组的多肽的核酸具有至少约95%同源性的序列的补体杂交。

[0012] 再一方面,提供了一种包含本文所述的分离的核酸的载体。

[0013] 另一方面,提供了一种宿主细胞,其包含本文所述的分离的核酸,包含本文所述的载体,表达本文所述的抗体或其抗原结合片段,或可在保藏登录号_____下访问。

[0014] 又一方面,提供了一种装置或试剂盒,其包含本文所述的至少一种单克隆抗体或其抗原结合片段,所述装置或试剂盒任选地包含检测所述至少一种单克隆抗体或其抗原结合片段的标记,或包含所述单克隆抗体或其抗原结合片段的复合物。

[0015] 再一方面,提供了一种产生本文所述的至少一种单克隆抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包含以下步骤:(i)在适于允许根据权利要求1至9中任一项所述的至少一种单克隆抗体或其抗原结合片段表达的条件下培养已经通过包含编码所述单克隆抗体的序列的核酸转化的经转化的宿主细胞;和(ii)回收表达的单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0016] 另一方面,一种检测HHLA2多肽的存在或水平的方法,其包含获得样品并且通过使用本文所述的至少一种单克隆抗体或其抗原结合片段检测样品中的所述多肽。

[0017] 如上所述,某些实施例适用于本文所述的任何方法。例如,在一个实施例中,所述

至少一种单克隆抗体或其抗原结合片段与HHLA2多肽形成复合物,并且以酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、免疫化学、蛋白质印迹法的形式或使用细胞内流式测定来检测所述复合物。

[0018] 另一方面,提供了一种用于监测受试者的与异常HHLA2表达相关联的病症的进展的方法,所述方法包含:a)在第一时间点处使用本文所述的至少一种单克隆抗体或其抗原结合片段检测受试者样品中HHLA2的水平;b)在后续时间点处重复步骤a);和c)比较步骤a)和b)中检测的HHLA2的水平以监测所述受试者的病症的进展。

[0019] 如上所述,某些实施例适用于本文所述的任何方法。例如,在一个实施例中,在第一时间点与后续时间点之间,受试者经历治疗以改善所述病症。

[0020] 另一方面,提供了一种用于预测罹患与异常HHLA2表达相关联的病症的受试者的临床结果的方法,所述方法包含:a)使用本文所述的至少一种单克隆抗体或其抗原结合片段确定受试者样品中HHLA2的水平;b)使用所述至少一种单克隆抗体或其抗原结合片段确定来自具有良好临床结果的对照受试者的样品中HHLA2的水平;和c)比较受试者样品中和来自对照受试者的样品中HHLA2的水平;其中与来自对照受试者的样品中的水平相比,受试者样品中HHLA2的显著更高的水平指示所述受试者具有较差临床结果。

[0021] 又一方面,提供了一种评定针对受试者的与异常HHLA2表达相关联的病症的疗法的功效的方法,所述方法包含:a)在向受试者提供疗法的至少一部分之前使用本文所述的至少一种单克隆抗体或其抗原结合片段确定从受试者获得的第一样品中HHLA2的水平;和b)在提供所述疗法的所述部分之后确定从受试者获得的第二样品中HHLA2的水平,其中第二样品中HHLA2相对于第一样品的显著更低水平指示所述疗法对于抑制受试者的病症是有效的。

[0022] 再一方面,提供了一种评定测试化合物用于抑制受试者的与异常HHLA2表达相关联的病症的功效的方法,所述方法包含:a)使用本文所述的至少一种单克隆抗体或其抗原结合片段确定从受试者获得并暴露于测试化合物的第一样品中HHLA2的水平;和b)确定从受试者获得的第二样品中HHLA2的水平,其中第二样品不暴露于测试化合物,并且相对于第二样品HHLA2的显著更低水平指示所述测试化合物对于抑制受试者的病症是有效的。

[0023] 如上所述,某些实施例适用于本文所述的任何方法。例如,在一个实施例中,第一样品和第二样品是从受试者获得的单个样品的部分或从受试者获得的汇集样品的部分。在另一个实施例中,所述病症是癌症。在再一个实施例中,所述癌症选自由以下组成的群组:肺癌、肾癌、胰腺癌、结直肠癌、急性髓细胞性白血病、头颈癌、肝癌、卵巢癌、前列腺癌、子宫癌、胶质瘤、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、乳腺癌、胰腺导管癌、胸腺瘤、B-CLL、白血病、B细胞淋巴瘤和浸润表达HHLA2的受体的免疫细胞的癌症。在另一个实施例中,所述样品包含从受试者获得的细胞、血清、癌周旁组织和/或瘤内组织。在又一个实施例中,HHLA2的显著更高水平包含受试者样品中HHLA2的水平相对于来自对照受试者的样品中HHLA2的正常水平的至少20%增加。在另一个实施例中,HHLA2的显著更低水平包含HHLA2的水平的至少20%降低。在再一个实施例中,所述受试者是人。

[0024] 再一方面,提供了一种治疗罹患癌症的受试者的方法,其包含向受试者施用本文所述的至少一种单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0025] 如上所述,某些实施例适用于本文所述的任何方法。例如,在一个实施例中,所述

至少一种单克隆抗体或其抗原结合片段缀合至细胞毒性剂。在另一个实施例中,所述细胞毒性剂选自由以下组成的群组:化疗剂、生物剂、毒素和放射性同位素。在再一个实施例中,所述至少一种单克隆抗体或其抗原结合片段减少癌症中增殖细胞的数量和/或降低癌症的肿瘤的体积或大小。在另一个实施例中,所述至少一种单克隆抗体或其抗原结合片段以药学上可接受的剂型施用。在又一个实施例中,本文所述的方法进一步包含向受试者施用用于治疗癌症的治疗剂或方案。在再一个实施例中,本文所述的方法进一步包含向受试者施用选自由以下组成的群组的额外疗法:免疫疗法、检查点阻断、癌症疫苗、嵌合抗原受体、化疗、放射、靶疗法和手术。在另一个实施例中,受试者中的癌细胞和/或肿瘤免疫浸润细胞表达HHLA2。在再一个实施例中,所述癌症选自由以下组成的群组:肺癌、肾癌、胰腺癌、结直肠癌、急性髓细胞性白血病、头颈癌、肝癌、卵巢癌、前列腺癌、子宫癌、胶质瘤、胶质母细胞瘤、神经母细胞瘤、乳腺癌、胰腺导管癌、胸腺瘤、B-CLL、白血病、B细胞淋巴瘤和浸润表达HHLA2的受体的免疫细胞的癌症。在另一个实施例中,所述癌症选自由以下组成的群组:肺癌、肾癌、胰腺癌、结直肠癌、急性髓细胞性白血病(AML)、头颈癌、肝癌、卵巢癌、前列腺癌和子宫癌。在又一个实施例中,所述受试者是癌症的动物模型。在再一个实施例中,所述动物模型是小鼠模型,任选地其中所述小鼠模型是人源化小鼠模型。在另一个实施例中,所述受试者是哺乳动物。在再一个实施例中,所述哺乳动物是人源化小鼠或人。在又一个实施例中,所述哺乳动物是人。

[0026] 另一方面,提供了一种通过抑制HHLA2与其结合抑制剂受体KIRDL3之间的相互作用来调控免疫应答的方法。

[0027] 又一方面,提供了一种通过选择性地抑制HHLA2与其结合抑制剂受体KIR3DL3之间的相互作用但不阻断或显著抑制HHLA2与其结合刺激性受体TMIGD2之间的相互作用来调控免疫应答的方法。

[0028] 如上所述,某些实施例适用于本文所述的任何方法。例如,在一个实施例中,阻断HHLA2与KIRDL3之间的相互作用以用于检查点阻断癌症免疫疗法。在另一个实施例中,使用抗HHLA2抗体抑制或阻断HHLA2与KIRDL3之间的相互作用。在又一个实施例中,所述抗HHLA2抗体是用于癌症免疫疗法的T细胞活化的检查点抑制剂。

[0029] 对于示出柱状图、曲线或与图例相关联的其他数据的任何附图,针对每个指示的从左到右呈现的柱、曲线或其他数据直接且按顺序对应于图例的从上到下或从左到右的框。

附图说明

[0030] 图1A示出了通过流式细胞术获得的HHLA2转染的300.19小鼠前B细胞白血病细胞系上抗HHLA2 mAb的结合亲和力数据。

[0031] 图1B示出了通过流式细胞术获得的抗HHLA2 mAb阻断TMIGD2-人IgG与HHLA2转染的300.19小鼠前B细胞白血病细胞系的结合。

[0032] 图2示出了来自用抗HHLA2 mAb 8D2(IHC mAb)探测的9个人肿瘤细胞系的蛋白质的蛋白质印迹数据。

[0033] 图3示出了正常肾相对于肾透明细胞癌(ccRCC)中与其他检查点抑制剂相比的HHLA2 mRNA表达。

[0034] 图4描绘了来自TCGA数据库的各种癌症中的HHLA2表达。

[0035] 图5A示出了关于阴性对照细胞(300.19)、HHLA-2转染的300.19细胞(阳性细胞)、OC1-Ly1细胞(阴性肿瘤)和HDLM2(阳性霍奇金淋巴瘤细胞系)HHLA2对照细胞的HHLA2免疫组织化学(IHC)结果。

[0036] 图5B示出了正常肾中的HHLA2表达。

[0037] 图5C示出了来自微阵列(TMA)的ccRCC中HHLA2表达的代表性图像。

[0038] 图5D示出了来自肿瘤微阵列(TMA)的不同ccRCC中缺乏HHLA2表达的代表性图像。

[0039] 图6A示出了约300个质膜克隆的代表性组的一式两份筛选结果以及示出HHLA2与KIR3DL3结合的确认性筛选。筛选了总计5682个细胞表面受体膜克隆。

[0040] 图6B示出了HHLA2与KIR3DL3的选择性结合。

[0041] 图6C示出了相关生物标记物的基因ID和NCBI登录信息。

[0042] 图7示出了Jurkat NFAT受体基因测定的示意图。

[0043] 图8示出了CAR-T细胞模型。

[0044] 图9示出了可以由肿瘤表达的抑制性B7家族成员。

[0045] 图10示出了HHLA2与两种受体(刺激性和抑制性HHLA2受体)相互作用以调节T细胞功能的模型。伴随着T细胞受体(TCR)信号传导,原初T细胞上的TMIGD2与APC上的HHLA2相互作用并且经由涉及AKT磷酸化的途径共刺激T细胞增殖和细胞因子产生。在重复性T细胞活化的情况下,刺激性受体TMIGD2的表达逐渐丧失,从而允许抑制性受体KIR3DL3的表达变为显性。APC或肿瘤细胞上HHLA2可以与该第二受体相互作用并且发挥共抑制性功能。该图改编自Xiao和Freeman等人(2015)《临床癌症研究》21:2201-2203。

[0046] 图11示出了非小细胞肺癌中的HHLA2+ve(即,基于用HHLA2 mAb进行的免疫组织化学(IHC)染色表达HHLA2的肺癌组织)患者分级。基于HHLA2和PD-L1免疫染色研究计算PD-L1阳性和阴性非小细胞肺癌中HHLA2表达的百分比(Cheng等人(2018)《临床癌症研究》24:1954-1964)。

[0047] 图12A和图12B示出了转染的293T细胞上TMIGD2(图12A)或KIR3DL3(图12B)的表达。将pEF-Puro表达载体中的TMIGD2或KIR3DL3 cDNA在293T细胞中瞬时转染并且在48-72小时后分别用以下物质染色:(1)TMIGD2 mAb(安迪生物(R&D systems),目录#MAB83162;克隆#953743),接着山羊-抗小鼠IgG F(ab)$_2$-PE(安迪生物,目录F0102B);或(2)KIR3DL3-PE缀合的mAb(安迪生物,目录#FAB8919R;克隆#1136B),并且通过流式细胞术检测。

[0048] 图12C和图12D示出了HHLA2-Fc与TMIGD2(图12C)或KIR3DL3(图12D)转染的293T细胞的结合。通过流式细胞术使用PE标记的Fab$_2$山羊抗小鼠IgG2a抗体(由于与人Ig的交叉反应性而被吸收,南方生物技术(Southern Biotech),目录#1082-09)检测HHLA2-mIgG2a与用TMIGD2或KIR3DL3瞬时转染的293T细胞的结合。

[0049] 图13A和图13B示出了HHLA2 mAb与人和食蟹猴HHLA2的结合。在4℃下将不同浓度的HHLA2 mAb与人或食蟹猴HHLA2转染的300.19前B细胞一起温育30分钟。通过流式细胞术用PE标记的山羊抗小鼠IgG(H+L)检测HHLA2 mAb与转染的300.19细胞的结合。

[0050] 图14示出了TMIGD2/HHLA2 T细胞共刺激测定的示意图。用通过抗CD3 scFV或抗CD3 scFV+HHLA2转染的CHO细胞刺激TMIGD2 Jurkat T细胞NFAT-荧光素酶报告基因细胞。

[0051] 图15示出了CHO-抗CD3 scFV细胞中的HHLA2表达。通过流式细胞术用PE缀合的

6F10 HHLA2 mAb检测用抗CD3 scFV+HHLA2转染的CHO细胞(克隆#28)上的HHLA2表达。

[0052] 图16示出了Jurkat NFAT报告细胞中的TMIGD2表达。示出了TMIGD2转染的Jurkat NFAT报告细胞(克隆#62)中的TMIGD2表达。

[0053] 图17示出了TMIGD2介导的T细胞共刺激的HHLA2 mAb阻断。将HHLA2-TCR-CHO细胞在白色不透明底96孔板中在CHOK1生长培养基中以2x 10^4个细胞/孔密度接种。在37℃下以5％CO_2过夜温育之后,细胞附着到板。第二天,小心地将培养基从每个孔去除,并且添加在50μl Jurkat细胞培养基中的抗HHLA2抗体,并且将HHLA2-TCR-CHO细胞温育1小时,之后在50μl Jurkat细胞培养基中以4-5x 10^4个细胞/孔添加MIGD2 NFAT Jurkat报告细胞系。将板孔混合并温育大约3-6小时。为了使荧光素酶信号可见,根据制造商建议的方案,将100μl ONE-Step™荧光素酶测定系统(BPS生物科学(BPS Bioscience),目录#60690)添加到每个孔中。使用光度计读取发光。

[0054] 图18示出了KIR3DL3/HHLA2检查点T细胞测定的示意图。用通过抗CD3 scFV或抗CD3 scFV+HHLA2转染的CHO细胞刺激KIR3DL3 Jurkat T细胞IL-2启动子荧光素酶报告基因细胞。

[0055] 图19示出了Jurkat-IL-2报告克隆中的KIR3DL3表达。检测KIR3DL3转染的Jurkat IL-2报告细胞克隆1-6、1-7和2-12中的KIR3DL3表达。

[0056] 图20A-20C示出了KIR3DL3介导的T细胞抑制的HHLA2 mAb检查点阻断。将HHLA2-TCR-CHO细胞在白色不透明底96孔板中在CHOK1生长培养基中以2x 10^4个细胞/孔密度接种。在37℃下以5％CO_2过夜温育之后,细胞附着到板。第二天,小心地将培养基从每个孔去除,并且添加在50μl Jurkat细胞培养基中的抗HHLA2抗体,并且将HHLA2-TCR-CHO细胞温育1小时,之后在50μl Jurkat细胞培养基加2μg/mL抗CD28抗体(BPS生物科学,#100186)(最终浓度为在100μL测定混合物中1μg/mL/孔)中以4-5x 10^4个细胞/孔添加KIR3DL3_IL2_Jurkat报告细胞系。将板孔混合并温育大约5小时。为了使荧光素酶信号可见,根据建议的方案,将100μl ONE-Step™荧光素酶测定系统(BPS生物科学,目录#60690)添加到每个孔中。使用光度计读取发光。

[0057] 图21A-21C示出了Jurkat KIR3DL3抑制测定中HHLA2 mAb的滴度。使用Jurkat IL-2荧光素酶克隆1-6、1-7和2-12在Jurkat IL-2报告荧光素酶测定中评估不同浓度的HHLA2 mAb 2C4和6F10。

[0058] 图22示出了KIR3DL3-选择性HHLA2 mAb 2C4不阻断TMIGD2介导的共刺激。在Jurkat亲本NFAT报告细胞中评估30μg/ml浓度的HHLA2 mAb 2C4。将HHLA2-TCR-CHO细胞在白色不透明底96孔板中在CHOK1生长培养基中以2x 10^4个细胞/孔密度接种。在37℃下以5％CO_2过夜温育之后,细胞附着到板。第二天,小心地将培养基从每个孔去除,并且添加在50μl Jurkat细胞培养基中的抗HHLA2抗体,并且将HHLA2-TCR-CHO细胞温育1小时,之后在50μl Jurkat细胞培养基中以4-5x 10^4个细胞/孔添加Jurkat亲本_NFAT_Jurkat报告细胞系。将板孔混合并温育大约3-6小时。为了使荧光素酶信号可见,根据建议的方案,将100μl ONE-Step™荧光素酶测定系统(BPS生物科学,目录#60690)添加到每个孔中。使用光度计读取发光。

[0059] 图23A-23C示出了可以如何评估人源化SRG-15小鼠肿瘤模型(具有T细胞和NK细胞两者)中的HHLA2 mAb。向携带表达HHLA2的肿瘤细胞的人源化SRG-15小鼠施用HHLA2 mAb,

并且评估肿瘤生长抑制。附图改编自Herndler-Brandstetter D等人(2017)114:E9626-E9634。

[0060] 图24A和图24B示出了可以如何评估食蟹猴T细胞模型中的HHLA2 mAb。向食蟹猴施用HHLA2 mAb并用KLH免疫化,并且评估T细胞依赖性抗体和细胞介导的应答。离体评估NK细胞毒性。

具体实施方式

[0061] 本发明至少部分地基于以下发现,即作为B7基因家族成员的HHLA2在各种肿瘤和抗原呈递细胞中广泛地表达,并且被视为T细胞的活化配体和抑制性配体两者。在原初T细胞中表达的TMIGD2是HHLA2的活化受体并且在T细胞抗原受体(TCR)接合之后转导共刺激性信号。TMIGD2在重复TCR刺激之后下调。基于观察到HHLA2在肿瘤中高度表达并且可以充当检查点配体,生成作为候选免疫检查点抑制剂治疗剂的一组抗HHLA2人单克隆抗体(mAb)。鉴于已知B7家族成员B7-1和B7-2的相同配体结合结构域结合活化受体和抑制性受体(例如,CD28和CTLA-4)两者,所以据信阻断TMIGD2结合的抗HHLA2单克隆抗体充当用于阻断与其推定抑制性受体的结合的良好候选物。通过评估可溶性hHHLA2-mIgG2a与TMIGD2转染的300.19小鼠前B白血病细胞的结合,鉴定阻断性和非阻断性抗HHLA2 mAb两者。表2中列出的抗HHLA2 mAb(例如,6F10、4D1、4E5和2G2)阻断TMIGD2结合并且还分别以0.25、0.44和0.21ug/ml(纳摩尔范围)的相对EC50结合亲和力结合HHLA2转染的300.19细胞。表2中列出的非阻断性抗体(例如,1C8和6D10)分别以0.63和22.49ug/ml的相对结合亲和力结合HHLA2。本文描述了这些候选治疗性抗HHLA2抗体的可变区重链和轻链基因序列。

[0062] 抗HHLA2 mAb 1C8和6D10被鉴定为良好的福尔马林固定的石蜡包埋的免疫组织化学或蛋白质印迹试剂。来自TCGA数据库的原发性肿瘤中的HHLA2在肺癌、肾癌、胰腺癌和结直肠癌中和AML中显示高表达,并且在头颈癌、肝癌、卵巢癌、前列腺癌和子宫癌中显示中等水平。癌症中的HHLA2 mRNA表达高于对应的正常组织。

[0063] 用可溶性人HHLA2-mIgG2a筛选覆盖超过3,500种不同的质膜蛋白的>4500个全长克隆的细胞表面表达的人血浆蛋白文库,将KIR3DL3(杀伤细胞免疫球蛋白样受体,3个结构域,长胞质尾区,3)鉴定为HHLA2的新受体。KIR3DL3的胞质尾区含有由序列“VTYAQL”构成的ITIM基序,指示HHLA2的可以充当癌症免疫疗法的检查点受体靶的抑制性受体。证明了HHLA2与KIR3DL3的结合选择性,因为使用一组14个KIR受体(即,KIR3DL3、KIR2DL1、KIR2DL2、KIR2DL3、KIR2DL4、KIR2DL5A、KIR2DL5B、KIR2DS1、KIR2DS2、KIR2DS3、KIR2DS5、KIR3DL1、KIR3DS1和KIR3DS1)未观察到针对其他KIR受体的结合。

[0064] 因为HHLA2在多种类型的肿瘤中以高水平表达,所以抗HHLA2 mAb检查点抑制剂治疗剂可以增加对检查点抑制剂治疗产生应答的患者的池。此外,发展对PD-1疗法的抗性的患者可能表达HHLA2作为替代性免疫逃逸策略,并且HHLA2阻断可以提供克服对PD-1免疫疗法的抗性的手段。

[0065] 因此,本发明提供了特异性地结合HHLA2的单克隆抗体及其抗原结合片段以及其免疫球蛋白、多肽、核酸,和使用此类抗体用于诊断性、预后性和治疗性目的的方法。

[0066] I.定义

[0067] 冠词“一个/一种(a)”和“一个/一种(an)”在本文中用于指一个/一种或多于一个/

一种(即,至少一个/一种)所述冠词的语法宾语。以举例的方式,“一个/一种元素”意指一个/一种元素或多于一个/一种元素。

[0068] 术语标记物的“改变量”是指与对照样品中的标记物相比,样品中标记物的拷贝数增加或降低,和/或一种或多种特定标记物基因的核酸水平增加或降低。术语标记物的“改变量”还包括与正常对照样品中的标记物的蛋白质水平相比,样品中标记物的蛋白质水平增加或降低。

[0069] 术语标记物的“改变的活性”是指与正常对照样品中的标记物的活性相比,例如生物样品中标记物的活性在疾病状态中增加或降低。标记物的改变的活性可能是例如标记物的改变的表达、标记物的改变的蛋白质水平、标记物的改变的结构,或者例如与标记物相同或不同的途径中涉及的其他蛋白质的改变的相互作用或与转录活化物或抑制剂的改变的相互作用的结果。

[0070] 术语标记物的“改变的结构”是指标记物基因或标记物蛋白内存在突变或等位基因变体,例如与正常或野生型基因或蛋白质相比,影响标记物的表达或活性的突变。例如,突变包括但不限于取代、删除或添加突变。突变可以存在于标记物的编码区或非编码区。

[0071] 术语“活化受体”包括结合抗原、复合抗原(例如,在MHC多肽的情况下)或结合抗体的免疫细胞受体。此类活化受体包括T细胞受体(TCR)、B细胞受体(BCR)、细胞因子受体、LPS受体、补体受体和Fc受体。

[0072] T细胞受体存在于T细胞上并且与CD3多肽缔和。T细胞受体在MHC多肽的情况下通过抗原(以及通过多克隆T细胞活化试剂)刺激。经由TCR进行的T细胞活化产生多种变化,例如蛋白质磷酸化、膜脂质变化、离子通量、环核苷酸改变、RNA转录变化、蛋白质合成变化以及细胞体积变化。

[0073] 术语“嵌合抗原受体”或“CAR”是指具有所需抗原特异性的工程化T细胞受体(TCR)。T淋巴细胞通过T细胞受体(TCR)与由主要组织相容性复合物(MHC)I类或II类分子呈递的短肽的相互作用识别特异性抗原。对于初始活化和克隆扩增,原初T细胞依赖于提供额外的共刺激性信号的专职抗原递呈细胞(APC)。在共刺激不存在的情况下TCR活化可能导致无应答性和克隆不应答。为了避开免疫作用,已经开发了用于衍生具有嫁接识别特异性的细胞毒性效应细胞的不同方法。已经构建了由来源于天然配体或对于TCR缔和的CD3复合物的细胞表面组分具有特异性的抗体的结合结构域组成的CAR。在抗原结合时,此类嵌合抗原受体连接到效应细胞中的内源性信号传导途径,并且生成与由TCR复合物启动的那些相似的活化信号。自从关于嵌合抗原受体的第一个报告之后,该概念已经逐渐被改进,并且嵌合受体的分子设计已经被优化并且常规地使用任何数量的熟知的结合结构域,诸如scFV、Fav和本文所述的其他蛋白质结合片段。

[0074] 通常,CAR是设想用于根据本发明使用的一种类型的“细胞疗法”(例如,T细胞疗法)。虽然存在用于通过调控HHLA2途径,诸如调控HHLA2与HHLA2天然结合配偶体(诸如TMIGD2和/或KIR3DL3)之间的相互作用来调控免疫细胞活性的试剂和方法的多种代表性实施例,但是还涵盖基于免疫细胞的疗法和方法。例如,涵盖进行工程化以具有TMIGD2和/或KIR3DL3的敲除、敲低或增加表达的T细胞。类似地,还涵盖进行工程化以具有HHLA2配体(诸如TMIGD2和/或KIR3DL3)的敲除、敲低或增加表达的免疫细胞或其他细胞。

[0075] B细胞受体存在于B细胞上。B细胞抗原受体是膜Ig(mIg)与其他跨膜多肽(例如,Ig

α和Igβ)之间的复合物。mIg的信号转导功能通过由低聚或多聚抗原进行的受体多肽的交联来触发。B细胞还可以通过抗免疫球蛋白抗体活化。在BCR活化时,B细胞中发生多种变化,包括酪氨酸磷酸化。

[0076] 在多种细胞上发现参与免疫应答的Fc受体。Fc受体(FcR)是免疫球蛋白多肽(Ig)的Fc部分的细胞表面受体。到目前为止,已经鉴定的人类FcR是识别IgG(被命名为Fcγ R)、IgE(FcεR1)、IgA(Fcα)和聚合IgM/A(FcμαR)的那些。FcR存在于以下细胞类型中:FcεR I(肥大细胞)、FcεR.II(多个白细胞)、FcαR(嗜中性粒细胞)和FcμαR(腺上皮,肝细胞)(Hogg,N.(1988)《今日免疫学(Immunol.Today)》9:185-86)。广泛研究的Fcγ R是细胞免疫防御的中心,并且负责刺激自身免疫性疾病的发病机制中涉及的炎症介质和水解酶的释放(Unkeless,J.C.等人(1988)《免疫学年鉴(Annu.Rev.Immunol.)》6:251-81)。Fcγ R提供效应细胞与分泌Ig的淋巴细胞之间的关键连接,因为巨噬细胞/单核细胞、多形核白细胞和自然杀伤(NK)细胞Fcγ R赋予由IgG介导的特异性识别的元件。人白细胞具有IgG:h Fcγ RI(存在于单核细胞/巨噬细胞上)、hFcγ RII(在单核细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞、血小板、B细胞(可能)和K562细胞系上)和Fcγ III(在NK细胞、嗜中性粒细胞、嗜酸性粒细胞和巨噬细胞上)的至少三种不同受体。

[0077] 关于T细胞,共刺激性信号向T细胞的传输涉及不被环孢菌素A抑制的信号传导途径。此外,共刺激性信号可以诱导T细胞中的细胞因子分泌(例如,IL-2和/或IL-10),和/或可以防止诱导对抗原的无反应性、诱导无能或诱导T细胞中的细胞死亡(缺失)。

[0078] 在关于多肽,例如HHLA2和/或HHLA2天然结合配偶体,诸如TMIGD2和/或KIR3DL3使用时,术语“活性”包括蛋白质的结构中固有的活性。例如,关于HHLA2配体,术语“活性”包括通过调控免疫细胞中的抑制性信号(例如,通过接合免疫细胞上的天然受体)来调控免疫细胞抑制的能力。本领域技术人员将认识到,在HHLA2配体多肽的活化形式结合抑制性受体时,免疫细胞中生成抑制性信号。

[0079] 术语“抑制性信号”是指经由免疫细胞上多肽的抑制性受体(例如,HHLA2、KLRB1、CTLA4、PD-1等)传输的信号。此类信号拮抗经由活化受体(例如,经由TCR、CD3、BCR、TMIGD2或Fc多肽)产生的信号,并且可以导致例如第二信使生成的抑制;增殖的抑制;免疫细胞中效应功能的抑制,例如减少的吞噬作用、减少的抗体产生、降低的细胞毒性、免疫细胞无法产生介体(诸如细胞因子(例如,IL-2)和/或过敏反应的介体);或发展无能。

[0080] 如果受试者中生物标记物的量分别以用于评定量的测定的标准误差的量大于或小于正常或对照水平,并且优选地比该量大或小至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、150%、200%、300%、350%、400%、500%、600%、700%、800%、900%、1000%,则所述生物标记物的量“显著”高于或低于生物标记物的正常量。可替代地,如果受试者中生物标记物的量比生物标记物的正常和/或对照量分别高或低至少约两倍,并且优选地至少约5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、105%、110%、115%、120%、125%、130%、135%、140%、145%、150%、155%、160%、165%、170%、175%、180%、185%、190%、195%、两倍、三倍、四倍、五倍或更多或之间的任何范围,诸如5%-100%,则所述量可以被认为“显著”高于或低于正常和/或对照量。此类显著调控值可以应用于本文所述的任何度量,诸如改变的表达水平、改变的活性、癌细胞过度增殖性生长的变化、癌细胞死亡的变化、

生物标记物抑制的变化、测试剂结合的变化等。

[0081] 如果受试者中标记物的“量”,例如标记物或MCR的表达或拷贝数或标记物的蛋白质水平分别以用于评定量的测定的标准误差的量大于或小于正常水平,并且优选地比该量大或小至少两倍,并且更优选地三倍、四倍、五倍、十倍或更多倍,则所述生物标记物的量“显著”高于或低于标记物的正常量。可替代地,如果受试者中标记物的量比标记物的正常量分别高或低至少约两倍,并且优选地至少约三倍、四倍或五倍,则所述量可以被认为“显著”高于或低于所述正常量。

[0082] 术语标记物的“改变的表达水平”是指测试样品,例如来源于患有癌症的受试者的样品中标记物的表达水平或拷贝数,其大于或小于用于评定表达或拷贝数的测定的标准误差,并且优选地比对照样品(例如,来自未患相关疾病的健康受试者的样品)中标记物或染色体区域的表达水平或拷贝数,并且优选地若干对照样品中标记物或染色体区域的平均表达水平或拷贝数大或小至少两倍,并且更优选地三倍、四倍、五倍或十倍或更多倍。改变的表达水平大于或小于用于评定表达或拷贝数的测定的标准误差,并且优选地比对照样品(例如,来自未患相关疾病的健康受试者的样品)中标记物的表达水平或拷贝数,并且优选地若干对照样品中标记物的平均表达水平或拷贝数大或小至少两倍,并且更优选地三倍、四倍、五倍或十倍或更多倍。

[0083] 术语“免疫疗法”是指可以包含例如使用癌症疫苗和/或致敏抗原呈递细胞的靶向疗法的形式。例如,溶瘤病毒是能够感染并裂解癌细胞,同时不伤害正常细胞的病毒,从而使得它们潜在地可用于免疫调控疗法。溶瘤病毒的复制促进肿瘤细胞破坏,并且还在肿瘤位点处产生剂量扩增。它们还可以充当抗癌基因的载体,从而使得所述抗癌基因被特异性地递送到肿瘤位点。免疫疗法可以涉及宿主的短期保护的被动免疫,通过施用针对癌症抗原或疾病抗原的预形成抗体(例如,施用任选地连接到化疗剂或毒素、连接到肿瘤抗原的单克隆抗体)实现。免疫疗法还可以关注于使用癌细胞系的细胞毒性淋巴细胞识别的表位。可替代地,反义多核苷酸、核酶、RNA干扰分子、三螺旋多核苷酸等可以用于选择性地调控与肿瘤或癌症的引发、进展和/或病理学相关的生物分子。如上所述,针对免疫检查点靶(诸如HHLA2、TMIGD2、KIR3DL3等)的免疫疗法是可用的。

[0084] 除非在此另有说明,否则术语“抗体(antibody和antibodies)”广泛地涵盖抗体的天然存在形式(例如,IgG、IgA、IgM、IgE)和重组抗体,诸如单链抗体、嵌合抗体和人源化抗体和多特异性抗体,以及前述中所有的片段和衍生物,所述片段和衍生物具有至少一个抗原结合位点。抗体衍生物可以包含缀合至抗体的蛋白质或嵌合部分。“抗体”是指包含通过二硫键内连的至少两个重(H)链和两个轻(L)链的糖蛋白或其抗原结合部分。每条重链包含重链可变区(本文缩写为V_H)和重链恒定区。重链恒定区包含三个结构域,CH1、CH2和CH3。每条轻链包含轻链可变区(本文缩写为V_L)和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个结构域,CL。V_H和V_L区域可以被进一步细分为具有高变性的区域,称为互补决定区(CDR),散布有更保守的区域,称为框架区(FR)。每个V_H和V_L由三个CDR和四个FR构成,按照以下顺序从氨基末端到羧基末端排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。术语“钝化抗体”是指不诱导补体系统的抗体。

[0085] 如本文所用的术语“抗体”还包括抗体的“抗原结合部分”(或简单地“抗体部分”)。如本文所用,术语“抗原结合部分”是指保留特异性地结合抗原(例如,HHLA2多肽或其片段)

的能力的抗体的一个或多个片段。已经显示,抗体的抗原结合功能可以通过全长抗体的片段实现。术语抗体的“抗原结合部分”内涵盖的结合片段的实例包括(i)Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段;(ii)F(ab')2片段,包含在铰链区处通过二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;(iii)由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv)由抗体的单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段;(v)由VH结构域组成的dAb片段(Ward等人,(1989)《自然(Nature)》341:544-546);和(vi)分离的互补决定区(CDR)。此外,虽然Fv片段的两个结构域VL和VH由独立基因编码,但它们可以使用重组方法通过合成接头接合,所述合成接头能够使它们制成其中VL和VH区配对形成单价多肽的单一蛋白质链(称为单链Fv(scFv);参见例如Bird等人(1988)《科学(Science)》242:423-426;和Huston等人(1988)《美国科学院院报》85:5879-5883;和Osbourn等人1998,《自然生物技术(Nature Biotechnology)》16:778)。此类单链抗体还预期涵盖在术语抗体的“抗原结合部分”内。特异性scFv的任何VH和VL序列可以连接到人免疫球蛋白恒定区cDNA或基因组序列,以便生成编码完整IgG多肽或其他同种型的表达载体。VH和VL还可以用于使用蛋白质化学或重组DNA技术生成Fab、Fv或免疫球蛋白的其他片段。还涵盖单链抗体的其他形式,诸如双抗体。双抗体是二价双特异性抗体,其中VH和VL结构域在单一多肽链上表达,但是使用的接头过短而无法实现同一条链上两个结构域之间的配对,从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合位点(参见例如Holliger,P.等人(1993)《美国科学院院报》90:6444-6448;Poljak,R.J.等人(1994)《结构(Structure)》2:1121-1123)。

[0086] 再另外,抗体或其抗原结合部分可以是通过抗体或抗体部分与一个或多个其他蛋白质或肽的共价或非共价缔和形成的较大免疫粘附多肽的部分。此类免疫粘附多肽的实例包括使用链霉亲和素核心区以制备四聚体scFv多肽(Kipriyanov,S.M.等人(1995)《人类抗体与杂交瘤(Human Antibodies and Hybridomas)》6:93-101)和使用半胱氨酸残基、标记物肽和C末端聚组氨酸标签以制备二价且生物素化的scFv多肽(Kipriyanov,S.M.等人(1994)《分子免疫学(Mol.Immunol.)》31:1047-1058)。抗体部分,诸如Fab和F(ab')2片段,可以使用常规技术,诸如分别使用全抗体的木瓜蛋白酶或胃蛋白酶消化由全抗体制备。此外,抗体、抗体部分和免疫粘附多肽可以使用标准重组DNA技术来获得,如本文所述。

[0087] 抗体可以是多克隆的或单克隆的;异种的、同种异基因的或同基因的;或其修饰形式(例如,人源化的、嵌合的等)。抗体可以是完全人类的。在一个实施例中,本发明的抗体特异性地或基本上特异性地结合HHLA2多肽或其片段。如本文所用,术语“单克隆抗体”和“单克隆抗体组合物”是指仅含有能够与抗原的特定表位免疫反应的抗原结合位点的一个物种的抗体多肽的群体,而术语“多克隆抗体”和“多克隆抗体组合物”是指含有能够与特定抗原相互作用的抗原结合位点的多个物种的抗体多肽的群体。单克隆抗体组合物通常对它与之免疫反应的特定抗原显示出单一结合亲和力。

[0088] 术语“体液”是指从身体排泄或分泌的液体以及通常不是从身体排泄或分泌的液体(例如,羊水、房水、胆汁、血液和血浆、脑脊液、耵聍和耳垢、考珀液或预射精液、乳糜、食糜、大便、女性精液、组织液、细胞内液、淋巴、月经、母乳、粘液、胸膜液、脓、唾液、皮脂、精液、血清、汗液、滑液、泪液、尿液、阴道润滑液、玻璃体液、呕吐物)。

[0089] 术语“癌症”或“肿瘤”或“过度增殖性病症”是指具有致癌细胞所特有的特征的细胞的存在,所述特征为诸如非受控的增殖、永生性、转移潜力、快速生长和增殖速率和某些

特征性形态特征。癌细胞经常呈肿瘤的形式,但是此类细胞可以单独存在于动物内,或者可以是非致瘤性癌细胞,诸如白血病细胞。癌症包括但不限于B细胞癌症(例如多发性骨髓瘤)、华氏巨球蛋白血症(Waldenström's macroglobulinemia)、重链病(例如α链病、γ链病和μ链病)、良性单克隆丙种球蛋白症和免疫细胞淀粉样变性、黑素瘤、乳腺癌、肺癌、支气管癌、结直肠癌、前列腺癌、胰腺癌、胃癌、卵巢癌、膀胱癌、脑癌或中枢神经系统癌、外周神经系统癌、食道癌、宫颈癌、子宫或子宫内膜癌、口腔癌或咽癌、肝癌、肾癌、睾丸癌、胆管癌、小肠或阑尾癌、涎腺癌、甲状腺癌、肾上腺癌、骨肉瘤、软骨肉瘤、血液组织癌等。适用于本发明涵盖的方法的癌症类型的其他非限制性实例包括人肉瘤和癌,例如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、成骨肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴管肉瘤、淋巴管内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、尤文氏瘤(Ewing's tumor)、平滑肌肉瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、结直肠癌、胰腺癌、乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺癌、皮脂腺癌、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝细胞瘤(hepatoma)、胆管癌、肝癌、绒毛膜癌、精原细胞瘤、胚胎癌、韦尔姆斯瘤(Wilms'tumor)、宫颈癌、骨癌、脑瘤、睾丸癌、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、胶质瘤、星形细胞瘤、髓母细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、血管母细胞瘤、听神经瘤、少突胶质细胞瘤、脑膜瘤、黑素瘤、神经母细胞瘤、视网膜母细胞瘤;白血病,例如急性淋巴细胞白血病和急性髓细胞白血病(髓细胞、早幼粒细胞、髓单核细胞、单核细胞和红白血病);慢性白血病(慢性髓细胞(粒细胞)白血病和慢性淋巴细胞白血病);以及真性红细胞增多症、淋巴瘤(霍奇金病和非霍奇金病)、多发性骨髓瘤、华氏巨球蛋白血症和重链病。在一些实施例中,癌症本质上是上皮的并且包括但不限于膀胱癌、乳腺癌、宫颈癌、结肠癌、妇科癌、肾癌、喉癌、肺癌、口腔癌、头颈癌、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌或皮肤癌。在其他实施例中,所述癌症是乳腺癌、前列腺癌、肺癌或结肠癌。在又其他实施例中,上皮癌是非小细胞肺癌、非乳头状肾细胞癌、宫颈癌、卵巢癌(例如,卵巢浆液性囊腺癌)或乳腺癌。上皮癌可以各种其他方式表征,包括但不限于浆液性、子宫内膜样、粘液性、透明细胞、Brenner或未区分的。

[0090] 术语"CDR"及其复数"多个CDR"是指互补决定区(CDR),三个互补决定区构成轻链可变区的结合特征(CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3),并且三个互补决定区构成重链可变区的结合特征(CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3)。CDR有助于抗体分子的功能活性,并且通过包含支架区或框架区的氨基酸序列分开。精确限定的CDR边界和长度取决于不同的分类和编号系统。因此,可以通过Kabat、Chothia、接触(contact)或任何其他边界限定方法来引用CDR。尽管边界不同,但是这些系统中的每一个在构成可变序列内的所谓的"高变区"时具有一定程度的重叠。因此,根据这些系统的CDR限定可以在关于相邻框架区的长度和边界区域上有所不同。参见例如,Kabat、Chothia和/或MacCallum等人(Kabat等人,"《免疫目的的蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)》,"第5版,美国卫生与公众服务部,1992;Chothia等人(1987)《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》196,901;和MacCallum等人,《分子生物学杂志》(1996)262,732,其中的每个通过引用整体并入本文)。

[0091] 如本文所用,术语"分类"包括将样品与疾病状态"关联起来"或以疾病状态对样品"进行归类"。在某些情况下,"分类"是基于统计学证据、经验证据或两者。在某些实施例中,分类的方法和系统使用具有已知疾病状态的样品的所谓训练集。一旦建立,训练数据集就充当未知样品的特征与之进行比较的基础、模型或模板,以便对样品的未知疾病状态进行

分类。在某些情况下,对样品进行分类类似于诊断样品的疾病状态。在某些其他情况下,对样品进行分类类似于将样品的疾病状态与其他疾病状态区分开。

[0092] 如本文所用,术语“编码区”是指包含翻译为氨基酸残基的密码子的核苷酸序列的区域,而术语“非编码区”是指不翻译为氨基酸的核苷酸序列的区域(例如,5’和3’非翻译区)。

[0093] “……的补体”或“互补”是指两条核酸链的区域之间或同一条核酸链的两个区域之间的序列互补性的广泛概念。已知第一核酸区的腺嘌呤残基能够与和所述第一区反向平行的第二核酸区的残基(如果所述残基是胸腺嘧啶或尿嘧啶)形成特异性氢键(“碱基配对”)。类似地,已知第一核酸链的胞嘧啶残基能够与和所述第一链反向平行的第二核酸链的残基(如果所述残基是鸟嘌呤)进行碱基配对。如果核酸的第一区和同一核酸或不同核酸的第二区以反向平行的方式布置,所述第一区的至少一个核苷酸残基能够与第二区的残基进行碱基配对,则所述第一区与所述第二区互补。在一个实施例中,第一区包含第一部分,并且第二区包含第二部分,由此当第一部分和第二部分以反向平行的方式布置时,第一部分的核苷酸残基的至少约50%,并且优选地至少约75%、至少约90%或至少约95%能够与第二部分中的核苷酸残基进行碱基配对。在另一个实施例中,第一部分的所有核苷酸残基能够与第二部分中的核苷酸残基进行碱基配对。

[0094] 如本文所用,术语“复合型抗体”是指具有可变区的抗体,所述可变区包含来自两个或更多个非相关可变区的种系或非种系免疫球蛋白序列。另外,术语“复合型人抗体”是指具有恒定区和可变区的抗体,所述恒定区来源于人类种系或非种系免疫球蛋白序列,所述可变区包含来自两个或更多个非相关人可变区的人类种系或非种系序列。复合型人抗体可用作根据本发明的治疗剂中的有效组分,因为复合型人抗体在人体中的抗原性降低。

[0095] 术语“对照”是指适合提供与测试样品中的表达产物的比较的任何参考标准。在一个实施例中,对照包含获得“对照样品”,从中检测表达产物水平并将其与来自测试样品的表达产物水平进行比较。此类对照样品可以包含任何合适的样品,包括但不限于来自具有已知结果的对照癌症患者的样品(可以是储存样品或先前的样品测量值);从受试者(诸如正常患者或癌症患者)分离的正常组织或细胞,从受试者(诸如正常患者或癌症患者)分离的培养的原代细胞/组织,从癌症患者的相同器官或身体位置获得的相邻正常细胞/组织,从正常受试者分离的组织或细胞样品或从保藏机构获得的原代细胞/组织。在另一个优选实施例中,对照可以包含来自任何合适来源的参考标准表达产物水平,包括但不限于管家基因,来自正常组织(或其他先前分析的对照样品)的表达产物水平范围,来自一组患者的测试样品内的先前确定的表达产物水平范围,或具有某种结果(例如,存活一年、两年、三年、四年等)或正接受某种治疗(例如,标准护理癌症疗法)的一组患者。本领域技术人员将理解,此类对照样品和参考标准表达产物水平可以组合用作本发明方法中的对照。在一个实施例中,对照可以包含正常或非癌细胞/组织样品。在另一个优选实施例中,对照可以包含一组患者,诸如一种癌症患者或一组正接受某种治疗的癌症患者或一组具有一种结果相对于另一种结果的患者的表达水平。在前一种情况下,每个患者的特定表达产物水平可以被指定为百分位的表达水平,或表示为高于或低于参考标准表达水平的均值或平均值。在另一个优选实施例中,对照可以包含正常细胞、来自用组合化疗治疗的患者的细胞和来自患有良性癌症的患者的细胞。在另一个实施例中,对照还可以包含测量值,例如群体中特定

基因与相同群体中管家基因的表达水平相比的平均表达水平。此类群体可以包含正常受试者、未经历任何治疗(例如,未经治疗)的癌症患者、经历标准护理疗法的癌症患者或患有良性癌症的患者。在另一个优选实施例中,对照包含表达产物水平的比率转化,包括但不限于确定测试样品中两个基因的表达产物水平的比率并且将其与参考标准中相同两个基因的任何合适比率进行比较;确定测试样品中两个或更多个基因的表达产物水平并且确定任何合适对照中表达产物水平的差异;以及确定测试样品中两个或更多个基因的表达产物水平,将它们的表达归一化到测试样品中管家基因的表达并且与任何合适对照进行比较。在特别优选的实施例中,对照包含与测试样品具有相同谱系和/或类型的对照样品。在另一个实施例中,对照可以包含在一组患者样品(诸如全部患者患有癌症)内或基于所述组的患者样品被分组为百分位数的表达产物水平。在一个实施例中,建立对照表达产物水平,其中相对于例如特定百分位数的更高或更低的表达产物水平被用作预测结果的基础。在另一个优选实施例中,使用来自具有已知结果的癌症对照患者的表达产物水平建立对照表达产物水平,并且将来自测试样品的表达产物水平与作为预测结果的基础的对照表达产物水平进行比较。如以下数据所证明,本发明的方法不限于在将测试样品的表达产物水平与对照进行比较时使用特定切割点。

[0096] 如本文所用,术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链的C末端区,其包括天然序列Fc区和变体Fc区。虽然免疫球蛋白重链的Fc区的边界可能变化,但是人IgG重链Fc区通常限定为从在位置Cys226处的氨基酸残基或从Pro230伸长至其羧基末端。用于本发明的抗体中的合适的天然序列Fc区包括人IgG1、IgG2(IgG2A、IgG2B)、IgG3和IgG4。

[0097] 如本文所用,“Fc受体”或“FcR”描述结合抗体的Fc区的受体。优选的FcR是天然序列人FcR。此外,优选的FcR是结合IgG抗体的FcR(γ受体)并且包括FcγRI、FcγRII和FcγRIII亚类的受体,包括等位基因变体和这些受体的替代性剪接形式,FcγRII受体包括FcγRIIA(“活化受体”)和FcγRIIB(“抑制受体”),所述受体具有主要在其细胞质结构域上不同的相似氨基酸序列。活化受体FcγRIIA在其细胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)。抑制受体FcγRIIB在其细胞质结构域中含有基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)(参见M. Daëron,《免疫学年鉴》15:203-234(1997)。FcR在以下中综述:Ravetch和Kinet,《免疫学年鉴》9:457-92(1991);Capel等人,《免疫方法(Immunomethods)》4:25-34(1994);以及de Haas等人,《实验室和临床医学杂志(J.Lab.Clin.Med.)》126:330-41(1995)。本文中的术语“FcR”涵盖其他FcR,包括将来待识别的那些FcR。

[0098] 如果分子与底物共价或非共价缔和,使得底物可以用流体(例如,标准柠檬酸盐水,pH 7.4)冲洗而分子的大部分没有从底物解离,则所述分子“固定”或“附连”到所述底物。

[0099] 如本文所用,“框架”或“FR”残基是除了如本文所定义的HVR残基以外的那些可变结构域残基。

[0100] “功能保守性变体”是蛋白质或酶中的给定氨基酸残基变化而没有改变多肽的整体构象和功能,包括但不限于氨基酸被具有相似特性(例如,极性、氢键合潜力、酸性的、碱性的、疏水性的、芳族的等)的氨基酸替换的那些。除被指示为保守的那些以外的氨基酸在蛋白质中可能有所不同,使得任何两个相似功能的蛋白质之间的蛋白质或氨基酸序列相似性百分比可以为例如从70%至99%,如根据比对方案,诸如通过聚类法所确定的,其中相似

性是基于MEGALIGN算法。“功能保守性变体”还包括一种多肽,其具有如通过BLAST或FASTA算法确定的至少60％氨基酸同一性,优选地至少75％、更优选地至少85％、仍然优选地至少90％并且甚至更优选地至少95％氨基酸同一性,并且具有其与之进行比较的天然或亲本蛋白质相同或基本上相似的特性或功能。

[0101] 如本文所用,术语“异源抗体”关于产生此类抗体的转基因非人生物体进行定义。该术语是指具有对应于不由转基因非人动物组成的生物体中存在的那些,并且通常来自除转基因非人动物的物种以外的物种的氨基酸序列或编码核酸序列的抗体。

[0102] 如本文所用,“同源”是指同一条核酸链的两个区域之间或两条不同核酸链的区域之间的核苷酸序列相似性。当两个区域中的核苷酸残基位置被相同核苷酸残基占据时,则所述区域在所述位置处是同源的。如果每个区域的至少一个核苷酸残基被相同残基占据,则第一区与第二区是同源的。两个区域之间的同源性以两个区域的被相同核苷酸残基占据的核苷酸残基位置的比例来表示。以举例的方式,具有核苷酸序列5’-ATTGCC-3’的区域和具有核苷酸序列5’-TATGGC-3’的区域共享50％同源性。优选地,第一区包含第一部分并且第二区包含第二部分,由此每个部分的核苷酸残基位置的至少约50％,并且优选地至少约75％、至少约90％或至少约95％被相同核苷酸残基占据。更优选地,每个部分的所有核苷酸残基位置被相同核苷酸残基占据。

[0103] 如本文所用,术语“宿主细胞”旨在是指本发明的核酸,诸如本发明的重组表达载体被引入其中的细胞。术语“宿主细胞”和“重组宿主细胞”在本文中可互换使用。应当理解,此类术语不仅是指特定受试者细胞,还是指此类细胞的子代或潜在子代。因为由于突变或环境影响,某些改变可能在后续代发生,所以此类子代可能实际上与亲本细胞不相同,但是仍然包括在如本文所用的术语的范围内。

[0104] 如本文所用,术语“人源化抗体”旨在包括由具有可变区和恒定区的非人细胞制备的抗体,所述抗体被改变而更类似于由人细胞制备的抗体。例如,通过改变非人抗体氨基酸序列以并入人类种系免疫球蛋白序列中存在的氨基酸。人源化抗体可以例如在CDR中包含不是由人类种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。如本文所用,术语“人源化抗体”还包括其中来源于另一种哺乳动物物种(诸如小鼠)的种系的CDR序列已经被嫁接到人框架序列上的抗体。

[0105] 如本文所用,人源化小鼠是携带功能化人类基因(例如,HHLA2、TMIGD2和/或KIR3DL3)、细胞、组织和/或器官的小鼠。人源化小鼠通常用作针对人类治疗剂的生物和医学研究中的小动物模型。裸小鼠和严重联合免疫缺陷(SCID)小鼠可以用于此目的。NCG小鼠、NOG小鼠和NSG小鼠可以用于比其他模型更有效地嫁接人细胞和组织。此类人源化小鼠模型可以用于模拟健康和病理情况下的人类免疫系统,并且可以实现在与人类病理相关的体内环境中评估治疗候选物。

[0106] 如本文所用,术语“高变区”、“HVR”、或“HV”是指抗体可变结构域的在序列上是高变的和/或形成结构上限定的环的区域。通常,抗体包含六个HVR;三个在VH中(H1、H2、H3),并且三个在VL中(L1、L2、L3)。在天然抗体中,H3和L3显示出六个HVR的最多的多样性,并且据信H3在将良好的特异性赋予给抗体方面尤其发挥独特的作用。参见例如,Xu等人(2000)《免疫力(Immunity)》13,37-45;Johnson和Wu在《分子生物学方法(Methods in Molecular Biology)》248,1-25(Lo编辑,Human Press,托托瓦,新泽西州,2003)中)。实际上,由重链组

成的天然存在的骆驼抗体仅在轻链不存在的情况下是功能性的和稳定的(参见例如,Hamers-Casterman等人(1993)《自然(Nature)》363:446-448(1993)和Sheriff等人(1996)《自然结构和分子生物学(Nature Struct.Biol.)》3,733-736)。

[0107] 如本文所用,术语“免疫细胞”是指在免疫应答中发挥作用的细胞。免疫细胞具有造血来源,并且包括淋巴细胞,诸如B细胞和T细胞;自然杀伤细胞;髓样细胞,诸如单核细胞、巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、肥大细胞、嗜碱性粒细胞和粒细胞。

[0108] 如本文所用,术语“免疫病症”包括免疫疾病、病状和易感包括但不限于以下疾病:癌症、慢性炎性疾病和病症(包括例如克罗恩氏病、炎性肠病、反应性关节炎和莱姆病)、胰岛素依赖性糖尿病、器官特异性自身免疫性(包括例如多发性硬化症、桥本甲状腺炎(Hashimoto’s thyroiditis)、自身免疫性葡萄膜炎和格雷夫斯病(Grave’s disease))、接触性皮炎、银屑病、移植物排斥、移植物抗宿主病、结节病、特应性病状(包括例如哮喘和过敏,包括但不限于过敏性鼻炎和胃肠道过敏诸如食物过敏)、嗜酸性粒细胞增多症、结膜炎、肾小球肾炎、系统性红斑狼疮、硬皮病、某些病原菌易感性诸如蠕虫易感性(包括例如利什曼病)和某些病毒性感染(包括例如HIV和细菌感染诸如结核病和瘤型麻风)和疟疾。

[0109] 如本文所用,术语“免疫应答”包括T细胞介导的和/或B细胞介导的免疫应答。示例性免疫应答包括T细胞应答,例如细胞因子产生和细胞毒性。此外,术语免疫应答包括通过T细胞活化(例如,抗体产生(体液反应))和细胞因子反应性细胞例如巨噬细胞的活化间接地实现的免疫应答。

[0110] 术语“免疫治疗剂”可以包括可以刺激宿主免疫系统以在受试者中生成对肿瘤或癌症的免疫应答的任何分子、肽、抗体或其他试剂。各种免疫治疗剂可用于本文所述的组合物和方法。

[0111] 术语“免疫检查点”是指CD4+和/或CD8+T细胞的细胞表面上通过下调或抑制抗肿瘤免疫应答来微调免疫应答的一组分子。免疫检查点蛋白是本领域熟知的并且包括但不限于CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIR家族受体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、GITR、4-IBB、OX-40、BTLA、SIRPα(CD47)、CD48、2B4(CD244)、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、HHLA2、嗜乳脂蛋白和A2aR(参见例如,WO 2012/177624)。所述术语进一步涵盖生物活性的蛋白质片段,以及编码全长免疫检查点蛋白及其生物活性的蛋白质片段的核酸。在一些实施例中,所述术语进一步涵盖根据本文提供的同源性描述的任何片段。

[0112] 免疫检查点及其序列是本领域熟知的,并且以下描述代表性实施例。例如,术语“PD-1”是指充当具有PD-L1和PD-L2作为已知配体的共抑制性受体的免疫球蛋白基因超家族的成员。先前使用基于减法克隆的方法鉴定PD-1,以选择在TCR诱导的活化T细胞死亡期间上调的基因。基于其结合PD-L1的能力,PD-1是CD28/CTLA-4分子家族的成员。和CTLA-4一样,PD-1响应于抗CD3在T细胞的表面上被快速诱导(Agata等人25(1996)《国际免疫学(Int.Immunol.)》8:765)。然而,相比于CTLA-4,PD-1还在B细胞的表面上被诱导(响应于抗IgM)。PD-1还在胸腺细胞和髓样细胞的子集上表达(Agata等人(1996)同上;Nishimura等人(1996)《国际免疫学》8:773)。

[0113] 如本文所用,术语“抑制”及其语法等效物是指减少、限制和/或阻断特定作用、功能或相互作用。在一个实施例中,所述术语是指将给定输出或参数的水平降低至比对应对

照中的量低至少10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、99％或更低的量(例如,背景染色、HHLA2信号传导、HHLA2免疫抑制性功能等)。给定输出或参数的降低水平不一定(虽然可能)意指输出或参数绝对不存在。本发明不需要并且不限于完全消除输出或参数的方法。给定输出或参数可以使用本领域熟知的方法来确定,包括但不限于免疫组织化学测定、分子生物学测定、细胞生物学测定、临床测定和生物化学测定,如本文和实例中所讨论的。相反术语“促进”、“增加”及其语法等效物是指增加给定输出或参数的水平,即与针对抑制或降低所述的那些相反。

[0114] 如本文所用,在参考两个分子之间的相互作用时,术语“相互作用”是指分子彼此的物理接触(例如,结合)(例如,HHLA2与TMIGD2结合或者HHLA2与KIR3DL3结合)。通常,此类相互作用产生所述分子中的一个或两个的活动(其产生生物作用)。所述活动可以是分子中的一个或两个的直接活动(例如,信号转导)。可替代地,相互作用中的一个或两个分子可以被阻止结合其配体,并且从而在配体结合活性(例如,结合其配体并触发或抑制免疫应答)方面保持失活。抑制此类相互作用导致破坏相互作用中涉及的一个或多个分子的活性。增强此类相互作用是延长或增加所述物理接触的概率,并且延长或增加所述活动的概率。

[0115] 术语“新辅助疗法”是指在初级治疗之前给予的治疗。新辅助疗法的实例可以包括化疗、放射疗法和激素疗法。

[0116] 如本文所用,术语“分离的抗体”旨在是指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如,特异性地结合HHLA2并且基本上不含不结合HHLA2的抗体的分离的抗体)。然而,特异性地结合HHLA2的分离的抗体可以与分别来自不同物种的其他B7家族蛋白具有交叉反应性。例如,在一些实施例中,抗体维持对于至少两种物种,诸如人和其他动物,诸如非啮齿类动物或其他哺乳动物或非哺乳动物物种的特异性结合亲和力。然而,在一些实施例中,抗体维持对于人HHLA2的更高或实际上特异性的亲和力和选择性。此外,分离的抗体通常基本上不含其他细胞物质和/或化学物。在本发明的一个实施例中,对于人HHLA2具有不同特异性的“分离的”单克隆抗体的组合在良好定义的组合物中组合。

[0117] 如本文所用,“分离的蛋白质”是指在从细胞分离或通过重组DNA技术产生时基本上不含其他蛋白质、细胞物质、分离介质和培养介质,或在化学合成时基本上不含化学前体或其他化学物的蛋白质。“分离的”或“纯化的”蛋白质或其生物活性部分基本上不含来自抗体、多肽、肽或融合蛋白所来源于的细胞或组织来源的细胞物质或其他污染蛋白质,或者在化学合成时基本上不含化学前体或其他化学物。语言“基本上不含细胞物质”包括靶多肽(例如,免疫球蛋白)或其片段的制品,其中蛋白质与分离或重组产生它的细胞的细胞组分分离。在一个实施例中,语言“基本上不含细胞物质”包括具有小于约30％(按干重计)的非靶蛋白(在本文中还被称为“污染蛋白质”),更优选地小于约20％的非靶蛋白,仍然更优选地小于约10％的非靶蛋白,并且最优选地小于约5％的非靶蛋白的靶蛋白或其片段的制品。当重组产生抗体、多肽、肽或融合蛋白或其片段,例如其生物活性片段时,其优选地还基本上不含培养介质,即培养介质占蛋白质制品的体积的小于约20％,更优选地小于约10％,并且最优选地小于约5％。

[0118] 如本文所用,术语“同种型”是指由重链恒定区基因编码的抗体类别(例如,IgM或IgG1)。

[0119] 如本文所用,术语“K_D”旨在是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。公开的

本发明的抗体的结合亲和力可以通过标准抗体-抗原测定,例如竞争性测定、饱和测定或标准免疫测定诸如ELISA或RIA来测量或确定。

[0120] 如本文所用,“试剂盒”是包含用于特异性检测或调控本发明的标记物的表达的至少一种试剂(例如,探针)的任何制品(例如,包装或容器)。试剂盒可以作为用于进行本发明的方法的单元促销、分配或销售。

[0121] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指对于特定表位显示出单一结合特异性和亲和力的抗体。因此,术语“人单克隆抗体”是指显示出单一结合特异性并且具有来源于人种系或非种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区的抗体。在一个实施例中,人单克隆抗体通过杂交瘤产生,所述杂交瘤包括与无限增殖化细胞融合的B细胞,所述B细胞从具有包含人重链转基因和轻链转基因的基因组的转基因非人动物,例如转基因小鼠获得。

[0122] “标记物”是一种基因,所述基因在组织或细胞中的表达水平相对于其在正常或健康组织或细胞中的表达水平的改变与疾病状态,诸如癌症相关联。“标记物核酸”是由本发明的标记物编码或对应于本发明的标记物的核酸(例如,mRNA,cDNA)。此类标记物核酸包括DNA(例如,cDNA),其包含在序列表中列出的任何核酸序列的全部或部分序列或此类序列的补体。标记物核酸还包括RNA,其包含在序列表中列出的任何核酸序列的全部或部分序列或此类序列的补体,其中所有胸苷残基被尿苷残基替换。“标记物蛋白”是由本发明的标记物编码或对应于本发明的标记物的蛋白质。标记物蛋白包含序列表中列出的任何序列的全部或部分序列。在一些实施例中,HHLA2整体被用作标记物。在其他实施例中,HHLA2的片段被用作标记物。术语“蛋白质”和“多肽”可互换使用。

[0123] 如本文所用,术语“调控”包括上调和下调,例如增强或抑制应答。

[0124] 标记物的“正常”表达水平是不受与异常标记物水平相关的疾病或病症影响的受试者(例如,人类患者)的细胞中标记物的表达水平。标记物的“过表达”或“显著更高的表达水平”是指测试样品中的表达水平,其大于用于评定表达的测定的标准误差,并且优选地比对照样品(例如,来自未患标记物相关疾病的健康受试者的样品)中标记物的表达水平,并且优选地若干对照样品中标记物的平均表达水平大至少两倍,并且更优选地三倍、四倍、五倍或十倍。标记物的“显著更低的表达水平”是指测试样品中的表达水平,其比对照样品(例如,来自未患标记物相关疾病的健康受试者的样品)中标记物的表达水平,并且优选地若干对照样品中标记物的平均表达水平低至少两倍,并且更优选地三倍、四倍、五倍或十倍。

[0125] 此类“显著”水平也可以应用于本文所述的任何其他测量参数,诸如用于表达、抑制、细胞毒性、细胞生长等。

[0126] 术语“预先确定的”生物标记物量和/或活性测量值可以是,仅以举例的方式,用于评估可以选择用于特定治疗的受试者、评估对于单独的或与一种或多种免疫疗法组合的治疗诸如HHLA2途径的一种或多种调节剂(诸如HHLA2和一种或多种天然结合配偶体(诸如TMIGD2和/或KIR3DL3)的调节剂)的应答和/或评估疾病状态的生物标记物量和/或活性测量值。预先确定的生物标记物量和/或活性测量值可以在患有或未患癌症的患者群体中确定。预先确定的生物标记物量和/或活性测量值可以是同等地适用于每个患者的单个数字,或者预先确定的生物标记物量和/或活性测量值可以根据患者的特定亚群变化。受试者的年龄、体重、身高和其他因素可以影响个体的预先确定的生物标记物量和/或活性测量值。此外,所述预先确定的生物标记物量和/或活性可以针对每个受试者单个地确定。在一个实

施例中,本文所述的方法中确定和/或比较的量是基于绝对测量值。在另一个实施例中,本文所述的方法中确定和/或比较的量是基于相对测量值,诸如比率(例如,细胞比率或归一化至管家或其他通常恒定的生物标记物的血清生物标记物)。预先确定的生物标记物量和/或活性测量值可以是任何合适的标准。例如,预先确定的生物标记物量和/或活性测量值可以从针对其评定患者选择的相同或不同人获得。在一个实施例中,预先确定的生物标记物量和/或活性测量值可以从相同患者的先前评定获得。以这种方式,可以随时间监测患者选择的过程。此外,如果受试者是人,则对照可以从另一个或多个人,例如所选组的人的评定获得。以这种方式,可以将针对其评定选择的人选择的程度与合适的其他人,例如处于与感兴趣的人相似的情况的其他人,诸如患有相似或相同病状的那些人和/或相同民族的那些人进行比较。

[0127] 术语“预测性的”包括在疗法之前、期间或之后使用生物标记物核酸和/或蛋白质状态,例如肿瘤的活性过多或不足、出现、表达、生长、缓解、复发或抗性,用于确定癌症对于免疫调控疗法,诸如HHLA2途径调节剂疗法(例如,单独的或与免疫疗法诸如免疫检查点抑制疗法组合的HHLA2与一种或多种天然结合配偶体,诸如TMIGD2和/或KIR3DL3之间的相互作用的调节剂)的应答的概率。生物标记物的此类预测性用途可以通过例如以下来确认:(1)例如,在超过约5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、100%或更多的测定人癌症类型或癌症样品中,增加的或降低的拷贝数(例如,通过FISH、FISH加SKY、单分子测序,例如在本领域中至少在《生物技术杂志(J.Biotechnol.)》,86:289-301中所述,或qPCR)、生物标记物核酸的过表达或表达不足(例如,通过ISH、Northern印迹(Northern Blot)或qPCR)、增加的或降低的生物标记物蛋白(例如,通过IHC)和/或生物标记物靶或者增加的或降低的活性;(2)来自受试者(例如,罹患癌症的人)的生物样品,例如含有组织、全血、血清、血浆、口腔刮取物、唾液、脑脊液、尿液、大便或骨髓的样品中其绝对或相对调控的存在或不存在;(3)患有癌症的患者的临床子集(例如,对特定免疫调控疗法(例如,HHLA2途径调节剂疗法(例如,单独的或与免疫疗法组合的HHLA2与一种或多种天然结合配偶体,诸如TMIGD2和/或KIR3DL3之间的相互作用的调节剂))产生应答的那些或对其发展抗性的那些)中其绝对或相对调控的存在或不存在。

[0128] 术语“预防(prevent、preventing和prevention)”、“预防性治疗(prophylactic treatment)”等是指降低未患疾病、病症或病状但是具有发展疾病、病症或病状的风险或易于发展疾病、病症或病状的受试者发展疾病、病症或病状的概率。

[0129] 术语“预后”包括预测癌症的可能病程和结果或从疾病恢复的概率。在一些实施例中,统计算法的使用提供个体中癌症的预后。例如,预后可以是手术、癌症(例如,实体瘤,诸如肺癌、黑素瘤和肾细胞癌)的临床亚型的发展、一种或多种临床因素的发展、肠癌的发展或从疾病的恢复。

[0130] 术语“对疗法(例如,HHLA2途径调节剂疗法(例如,单独的或与免疫疗法诸如免疫检查点抑制疗法组合的HHLA2与一种或多种天然结合配偶体,诸如TMIGD2和/或KIR3DL3之间的相互作用的调节剂))的应答”涉及对疗法(例如,HHLA2途径调节剂疗法(例如,单独的或与免疫疗法诸如免疫检查点抑制疗法组合的HHLA2与一种或多种天然结合配偶体,诸如TMIGD2和/或KIR3DL3之间的相互作用的调节剂))的任何应答,并且对于癌症,优选地涉及

在新辅助或辅助性化疗开始之后癌细胞数量、肿瘤质量和/或体积的变化。可以例如针对功效或在新辅助或辅助情况下评定过度增殖性病症应答，其中可以将系统性干预之后的肿瘤大小与如通过CT、PET、乳房X光片、超声或触诊测量的初始大小和尺寸进行比较。还可以通过活检或手术切除之后肿瘤的卡尺测量或病理学检查评定应答。还可以定量方式记录应答，像肿瘤体积的变化百分比，或以定性方式记录应答，像“病理完全应答(pCR)”、“临床完全缓解(cCR)”、“临床部分缓解(cPR)”、“临床稳定型疾病(cSD)”、“临床进行性疾病(cPD)”或其他定性准则。过度增殖性病症应答的评定可以在新辅助或辅助性化疗开始之后较早地进行，例如在几小时、几天、几周之后或优选地几个月之后进行。应答评定的典型终点是在新辅助性化疗结束时或在残留肿瘤细胞和/或肿瘤床被手术去除时。这通常是在新辅助疗法开始之后三个月。在一些实施例中，本文所述的治疗性治疗的临床功效可以通过测量临床受益率(CBR)确定。临床受益率通过确定在疗法结束至少6个月的时间点处处于完全缓解(CR)的患者的百分比、处于部分缓解(PR)的患者的数量和具有稳定型疾病(SD)的患者的数量的总和来测量。该式的简略表达为CBR＝6个月期间的CR+PR+SD。在一些实施例中，特定癌症治疗方案的CBR为至少25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％或更多。评估对癌症疗法的应答的额外准则与“存活期”相关，其包括以下中的全部：存活至死亡，还被称为总存活期(其中所述死亡可以与病因或相关肿瘤无关)；“无复发存活期”(其中术语复发应当包括局部和远处复发两者)；无转移存活期；无疾病存活期(其中术语疾病应当包括癌症和与其相关联的疾病)。所述存活期的长度可以通过参考定义的起始点(例如，确诊或治疗开始的时间)和终点(例如，死亡、复发或转移)来计算。此外，治疗功效的准则可以扩展至包括对化疗的应答、存活的概率、给定时间段内转移的概率和肿瘤复发的概率。例如，为了确定适当的阈值，可以向受试者群体施用特定癌症治疗方案，并且可以将结果与在施用任何免疫调控疗法之前确定的生物标记物测量值关联起来。结果测量值可以是对在新辅助环境中给予的疗法的病理学应答。可替代地，可以在免疫调控疗法之后针对其生物标记物测量值已知的受试者在一定时间段内监测结果测量值，诸如总存活期和无疾病存活期。在某些实施例中，施用的剂量是本领域已知的针对癌症治疗剂的标准剂量。监测受试者的时间段可以变化。例如，可以监测受试者至少2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45、50、55或60个月。

[0131] 术语“抗性”是指癌症样品或哺乳动物对免疫调控疗法的获得性或天然抗性(即，对治疗性治疗无应答或具有降低的或有限的应答)，诸如具有比治疗性治疗降低5％或更多，例如10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％、100％或更多至2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍或更多的应答。应答的降低可以通过与获得抗性之前同一癌症样品或哺乳动物进行比较或通过与已知对治疗性治疗没有抗性的不同癌症样品或哺乳动物进行比较来测量。典型的对化疗的获得性抗性被称为“多药抗性”。多药抗性可以由P-糖蛋白介导或可以由其他机制介导，或者它可以在哺乳动物感染多药抗性微生物或微生物的组合时发生。对治疗性治疗的抗性的确定是本领域中常见的并且在普通技术人员的技能范围之内，例如可以通过如本文所述的细胞增殖性测定和细胞死亡测定测量为“致敏的”。在一些实施例中，术语“逆转抗性”意指使用第二试剂与初级癌症疗法(例如，化疗或放射疗法)的组合能够产生与在单独的初级癌症疗法(例如，化疗或放射疗法)不能产生与未处理肿瘤的肿瘤体积相比统计上显著的肿瘤体积降

低的情况下未处理肿瘤的肿瘤体积相比时统计学显著(例如,$p<0.05$)的水平下肿瘤体积的显著降低。这通常适用于在未处理肿瘤规律地对数生长时进行的肿瘤体积测量。

[0132] 术语“应答”或“应答性”是指对疗法的应答。例如,抗癌应答包括肿瘤大小降低或抑制肿瘤生长。所述术语还可以是指改善的预后,例如通过截止复发之前的时间(这是截止将第二原发性癌症视为第一事件的第一复发之前或直至死亡而没有复发迹象的时间段)增加,或总存活期(这是从治疗到由于任何原因的死亡的时间段)增加所反映。应答或具有应答意指在暴露于刺激物时可获得有益的终点。可替代地,在暴露于刺激物时使负面或有害症状最小化、减轻或减弱。应当理解,评估肿瘤或受试者将表现出良好应答的概率等同于评估肿瘤或受试者将不表现出良好应答(即,将表现出缺乏应答或无应答)的概率。

[0133] 术语“耐受性”或“无应答性”包括细胞(诸如免疫细胞)对刺激(例如,经由活化受体或细胞因子进行的刺激)的折射性。无应答性可以例如由于暴露于免疫抑制物或暴露于高剂量抗原而发生。若干独立的方法可以诱导耐受性。一种机制被称为“无能”,其被定义为细胞在体内作为无应答细胞持续存在而不分化为具有效应功能的细胞的状态。此类折射性通常是抗原特异性的并且在暴露于耐受抗原停止之后持续存在。例如,T细胞无能的特征在于缺乏细胞因子产生,例如IL-2。当T细胞暴露于抗原并且在第二信号(共刺激性信号)不存在的情况下接收第一信号(T细胞受体或CD-3介导的信号)时,发生T细胞无能。在这些条件下,细胞再暴露于相同抗原(即使再暴露在共刺激性多肽的存在下发生)导致无法产生细胞因子,并且因此无法增殖。然而,如果与细胞因子(例如,IL-2)一起培养,则无能T细胞可以增殖。例如,T细胞无能还可以通过缺乏由T淋巴细胞进行的IL-2产生观察到,如通过ELISA或通过使用指示细胞系进行增殖测定测量。可替代地,可以使用报告基因构建体。例如,无能T细胞无法启动在5’IL-2基因增强子的控制下由异源启动子诱导或由可以在增强子内存在的AP1序列的多聚体诱导的IL-2基因转录(Kang等人(1992)《科学》257:1134)。另一种机制被称为“耗竭”。T细胞耗竭是在多种慢性感染和癌症期间出现的T细胞功能障碍的一种状态。这种功能障碍被定义为较差的效应功能、抑制受体的持续表达以及与功能效应T细胞或记忆T细胞的转录状态不同的转录状态。

[0134] 如本文所用,术语“核酸分子”旨在包括DNA分子和RNA分子。核酸分子可以是单链的或双链的,但是优选地是双链DNA。如本文所用,参考编码结合HHLA2的抗体或抗体部分(例如,V_H、V_L、CDR3)(例如,mAb 2G2、4D1、8A12、8D2、1C8、2C4、6D10、4E5和6F10和多克隆抗体)的核酸的术语“分离的核酸分子”旨在是指其中编码所述抗体或抗体部分的核苷酸序列不含编码结合除HHLA2以外的抗原的抗体或抗体部分的其他核苷酸序列的核酸分子,所述其他序列可以天然地侧接人基因组DNA中的核酸。

[0135] 核酸在放置成与另一个核酸序列呈功能性关系时是“可操作地连接”的。例如,如果启动子或增强子影响编码序列的转录,则所述启动子或增强子可操作地连接到编码序列。关于转录调控序列,可操作地连接意指连接的DNA序列是连续的,并且在需要接合两个蛋白质编码区的情况下,是连续的且在阅读框内。对于转换序列,可操作地连接指示所述序列能够实现转换重组。

[0136] 标记物的“过表达”或“显著更高的表达水平”是指测试样品中的表达水平大于用于评定表达的测定的标准误差,并且优选地比对照样品(例如,来自未患标记物相关疾病的健康受试者的样品)中标记物的表达活性或水平,并且优选地若干对照样品中标记物的平

均表达水平高至少两倍,并且更优选地高2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20倍或更多倍。标记物的“显著更低的表达水平”是指测试样品中的表达水平比对照样品(例如,来自未患标记物相关疾病的健康受试者的样品)中标记物的表达水平,并且优选地若干对照样品中标记物的平均表达水平低至少两倍,并且更优选地低2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6、2.7、2.8、2.9、3、3.5、4、4.5、5、5.5、6、6.5、7、7.5、8、8.5、9、9.5、10、10.5、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20倍或更多倍。

[0137] 本文所述的此类抗体可以用于熟知的免疫测定形式中的任一种,包括但不限于放射免疫测定、蛋白质印迹测定、免疫荧光测定、酶免疫测定、免疫沉淀测定、化学发光测定、免疫组织化学测定、斑点印迹测定或狭缝印迹测定。用于进行以上提及的各种免疫测定的一般技术和所述技术的其他变型是本领域普通技术人员已知的,所述变型为诸如原位邻位连接测定(PLA)、荧光偏振免疫测定(FPIA)、荧光免疫测定(FIA)、酶免疫测定(EIA)、散射免疫比浊抑制测定(NIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)和放射免疫测定(RIA)、ELISA等,所述变型可以单独使用,或与NMR、MALDI-TOF、LC-MS/MS组合使用,或替代其使用。

[0138] 此类试剂还可以用于监测细胞或组织(例如,白细胞或淋巴细胞)中的蛋白质水平作为临床测试程序的一部分,例如以便监测抑制剂的最佳剂量。可以通过将抗体与可检测物质偶联(例如,物理连接)来促进检测。可检测物质的实例包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料和放射性材料。合适的酶的实例包括辣根过氧化酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基复合物的实例包括链霉亲和素/生物素和抗生物素蛋白/生物素;合适的荧光材料的实例包括伞酮(umbelliferone)、荧光素、异硫氰酸荧光素、若丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红素;发光材料的实例包括鲁米诺(luminol);生物发光材料的实例包括荧光素酶、荧光素和水母素;并且合适的放射性材料的实例包括^{125}I、^{131}I、^{35}S或^{3}H。

[0139] 此类试剂还可以与任何数量的生物样品一起使用。生物样品可以从来自患者的各种来源采集,包括体液样品、细胞样品或包含核酸和/或蛋白质的组织样品。在优选实施例中,受试者和/或对照样品选自由以下组成的群组:细胞、细胞系、组织学切片、石蜡包埋组织、活检物、全血、乳头抽吸液、血清、血浆、口腔刮取物、唾液、脑脊液、尿液、大便和骨髓。在一个实施例中,样品是血清、血浆或尿液。在另一个实施例中,样品是血清。

[0140] 样品可以在一个纵向时间段内从个体重复采集(例如,每天、每周、每月、每年、每半年一次或多次等)。在一个时间段内从个体获得多个样品可以用于验证较早检测的结果和/或鉴定由于例如疾病进展、药物治疗等发生的生物模式的改变。例如,可以根据本发明每月、每两月或一月、两月或三月间隔的组合获取并监测受试者样品。此外,随时间获得的受试者的生物标记物量和/或活性测量值可以方便地与彼此以及在监测时间段期间正常对照的生物标记物量和/或活性测量值进行比较,从而提供作为用于长期监测的内部或个人对照的受试者自身的值。

[0141] 样品可以含有活细胞/组织、新鲜冷冻的细胞、新鲜组织、活检物、固定的细胞/组织、包埋在介质(诸如石蜡)中的细胞/组织、组织学切片或其任何组合。

[0142] 根据采集的样品类型和/或生物标记物测量值的分析,样品制备和分离可以涉及任何程序。仅以举例的方式,此类程序包括浓缩、稀释、pH调节、高丰度多肽(例如,白蛋白、

γ球蛋白和转铁蛋白等)去除、防腐剂和校准物添加、蛋白酶抑制剂添加、变性剂添加、样品脱盐、样品蛋白质浓缩、脂质提取和纯化。

[0143] 样品制备还可以分离与其他蛋白质(例如,载体蛋白)结合在非共价复合物中的分子。该工艺可以分离结合特异性载体蛋白(例如,白蛋白)的那些分子,或者使用更普通的工艺,诸如例如使用酸经由蛋白质变性从所有的载体蛋白释放结合的分子,接着去除载体蛋白。

[0144] 从样品去除不需要的蛋白质(例如,高丰度、无信息或不可检测的蛋白质)可以使用高亲和力试剂、高分子量过滤器、超离心和/或电渗析来实现。高亲和力试剂包括选择性地结合高丰度蛋白质的抗体或其他试剂(例如,适体)。样品制备还可以包括离子交换色谱法、金属离子亲和力色谱法、凝胶过滤、疏水色谱法、色谱聚焦、吸附色谱法、等电聚焦和相关技术。分子量过滤器包括基于大小和分子量分离分子的膜。此类过滤器可以进一步采用反渗透、纳米过滤、超滤和微滤。

[0145] 当用于参考多肽使用时,术语"多肽片段"或"片段"是指其中与参考多肽本身相比氨基酸残基缺失,但是剩余的氨基酸序列通常与参考多肽中的对应位置的多肽相同。此类缺失可以在参考多肽的氨基末端、内部或在羧基末端或可替代地在两者处发生。片段通常为至少5、6、8或10个氨基酸长,至少14个氨基酸长,至少20、30、40或50个氨基酸长,至少75个氨基酸长,或至少100、150、200、300、500或更多个氨基酸长。它们的长度可以是例如至少和/或包括10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、120、140、160、180、200、220、240、260、280、300、320、340、360、380、400、420、440、460、480、500、520、540、560、580、600、620、640、660、680、700、720、740、760、780、800、820、840、860、880、900、920、940、960、980、1000、1020、1040、1060、1080、1100、1120、1140、1160、1180、1200、1220、1240、1260、1280、1300、1320、1340或更多,只要它们的长度小于全长多肽的长度即可。可替代地,它们可以不长于和/或排除这种范围,只要它们的长度小于全长多肽的长度即可。

[0146] 术语"探针"是指能够选择性地结合特定预期的靶分子,例如由标记物编码或对应于标记物的核苷酸转录物或蛋白质的任何分子。探针可以由本领域技术人员合成,或来源于适当的生物制品。出于检测靶分子的目的,探针可以特异性地被设计成被标记的,如本文所述。可以用作探针的分子的实例包括但不限于RNA、DNA、蛋白质、抗体和有机分子。

[0147] 如本文所用,术语"重排的"是指重链或轻链免疫球蛋白基因座的构型,其中V区段在主要分别编码完整V_H和V_L结构域的构象中紧邻D-J区段或J区段定位。重排的免疫球蛋白基因座可以通过与种系DNA比较来鉴定;重排的基因座将具有至少一个重组七聚物/九聚物同源性元件。

[0148] 如本文所用,术语"重组宿主细胞"(或简单地"宿主细胞")旨在是指重组表达载体引入其中的细胞。应当理解,此类术语旨在不仅是指特定受试者细胞,还是指此类细胞的子代。因为由于突变或环境影响,某些改变可能在后续代发生,所以此类子代可能实际上与亲本细胞不相同,但是仍然包括在如本文所用的术语"宿主细胞"的范围内。

[0149] 如本文所用,术语"重组人抗体"包括通过重组手段制备、表达、产生或分离的所有人抗体,诸如(a)从针对人免疫球蛋白基因为转基因或转染色体的动物(例如,小鼠)或由其制备的杂交瘤(如下文进一步描述)分离的抗体;(b)从转化以表达抗体的宿主细胞,例如从转染瘤分离的抗体;(c)从重组组合人抗体文库分离的抗体;以及(d)通过涉及将人免疫球

蛋白基因序列剪接到其他DNA序列的任何其他手段制备、表达、产生或分离的抗体。此类重组人抗体具有来源于人种系和/或非种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而,在某些实施例中,可以将此类重组人抗体进行体外诱变(或者,当使用针对人Ig序列为转基因的动物时,体内体细胞诱变)并且因此重组抗体的V_H和V_L区的氨基酸序列是如下的序列,在来源于人种系V_H和V_L序列并与之相关时,所述序列可能不会体内天然存在于人抗体种系库中。

[0150] 如参考活化的免疫细胞所用,术语"共刺激"包括共刺激性多肽提供诱导增殖或效应功能的第二非活化受体介导的信号("共刺激性信号")的能力。例如,共刺激性信号可以导致例如接收T细胞受体介导的信号的T细胞中的细胞因子分泌。例如经由活化受体接收细胞受体介导的信号的免疫细胞在本文中被称为"活化的免疫细胞"。

[0151] 术语"共刺激性受体"包括将共刺激性信号传输到免疫细胞的受体,例如CD28。如本文所用,术语"抑制性受体"包括将负信号传输到免疫细胞的受体(例如,CTLA4、KIR3DL3或PD-1)。即使共刺激性受体(诸如CD28)不存在于免疫细胞上,通过抑制性受体转导的抑制性信号也可以发生,因此,这并不是仅仅是抑制性受体与用于结合共刺激性多肽的共刺激性受体之间的竞争的功能((Fallarino等人(1998)《实验医学杂志(J.Exp.Med.)》188:205)。抑制性信号向免疫细胞的传输可以导致免疫细胞的无应答性或无能或程序性细胞死亡。优选地,抑制性信号的传输通过不涉及细胞凋亡的机制来运行。如本文所用,术语"细胞凋亡"包括程序性细胞死亡,其可以使用本领域已知的技术来表征。细胞凋亡性细胞死亡的特征可以在于例如细胞皱缩、膜起泡和以细胞破碎结束的染色质浓缩。经历细胞凋亡的细胞还显示出核小体间DNA裂解的特征性模式。根据结合受体的多肽的形式,例如通过与HHLA2和/或KIR3DL3的活化形式竞争以结合一种或多种天然结合配偶体,信号可以被传输(例如,通过HHLA2和/或KIR3DL3多肽的多价形式),或者信号可以被抑制(例如,通过HHLA2和/或KIR3DL3的可溶性单价形式)。然而,存在可溶性多肽可以是刺激性的情况。调节剂的作用可以使用如本文所述的常规筛选测定来容易地证明。

[0152] 结合细胞生物标记物表达的术语"高"、"低"、"中间"和"负"是指相对于由一种或多种参考细胞进行的生物标记物的细胞表达而表达的生物标记物的量。生物标记物表达可以根据本文所述的任何方法确定,包括但不限于一种或多种生物标记物基因组核酸、核糖核酸和/或多肽的细胞水平、活性、结构等的分析。在一个实施例中,所述术语是指分别以最高、中间或最低水平表达生物标记物的细胞群体的定义百分比。此类百分比可以被定义为高表达或弱表达生物标记物的细胞群体的前0.1%、0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%、3.0%、3.5%、4.0%、4.5%、5.0%、5.5%、6.0%、6.5%、7.0%、7.5%、8.0%、8.5%、9.0%、9.5%、10%、11%、12%、13%、14%、15%或更多或之间的任何范围(包括端值在内)。术语"低"不包括不可检测地表达生物标记物的细胞,因为此类细胞对于生物标记物表达是"阴性的"。术语"中间"包括表达生物标记物但是以低于在"高"水平下表达生物标记物的群体的水平进行表达的细胞。在另一个实施例中,所述术语还可以是指或替代性地是指通过定性或统计绘图区域鉴定的生物标记物表达的细胞群体。例如,使用流式细胞术分选的细胞群体可以根据本领域熟知的方法通过基于可检测部分分析,诸如基于平均荧光强度等鉴定不同的图来在生物标记物表达水平的基础上来区分。此类绘图区域可以基于本领域熟知的方法根据数量、形状、重叠等针对目标生物标记物进行改进。在又一个实施例中,所述术语还可以根据额外生物标记物的表达的存在或不存在确定。

[0153] 如上所述,术语“应答”通常与例如确定临床干预对于进展、功效或结果的作用相关。在一些实施例中,应答与临床干预(例如,施用抗HHLA2单克隆抗体,诸如2G2、4D1、8A12、8D2、1C8、2C4、6D10、4E5或6F10和多克隆抗体)开始之后肿瘤质量和/或体积的变化直接相关。例如,过度增殖性病症可以根据与如通过CT、PET、乳房X光片、超声或触诊测量的初始大小和尺寸相比的系统性干预之后的肿瘤大小来评定。还可以通过活检或手术切除之后肿瘤的卡尺测量或病理学检查来评定应答。还可以定量方式记录应答,像肿瘤体积的变化百分比,或以定性方式记录应答,像“病理完全应答(pCR)”、“临床完全缓解(cCR)”、“临床部分缓解(cPR)”、“临床稳定型疾病(cSD)”、“临床进行性疾病(cPD)”或其他定性准则。评定可以在临床干预开始之后,例如在几小时、几天、几周之后或优选地几个月之后进行。应答评定的典型终点是在临床干预结束时或在残留肿瘤细胞和/或肿瘤床被手术去除时。

[0154] 如本文所用,术语“特异性结合”是指抗体与预先确定的抗原的结合。通常,在使用人HHLA2作为分析物和抗体作为配体,在BIACORE®测定仪器中通过表面等离子体共振(SPR)技术确定时,抗体以大约小于10^{-7}M,诸如大约小于10^{-8}M、10^{-9}M或10^{-10}M或甚至更低的亲和力(K_D)进行结合,并且以其结合除预先确定的抗原或紧密相关的抗原以外的非特异性抗原(例如,BSA,酪蛋白)的亲和力的至少1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0或10.0倍或更大的亲和力结合预先确定的抗原。短语“识别抗原的抗体”和“对抗原具有特异性的抗体”在本文中与术语“特异性地结合抗原的抗体”可互换使用。

[0155] 如本文所用,“受试者”是指任何健康的动物、哺乳动物或人,或罹患与异常标记物水平相关的疾病或病状的任何动物、哺乳动物或人。术语“受试者”与“患者”可互换使用。术语“非人动物”包括所有的脊椎动物,例如哺乳动物和非哺乳动物,诸如非人灵长类动物、绵羊、狗、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。

[0156] 语言“基本上不含化学前体或其他化学物”包括其中蛋白质与蛋白质的合成中涉及的化学前体或其他化学物分离的抗体、多肽、肽或融合蛋白的制品。在一个实施例中,语言“基本上不含化学前体或其他化学物”包括具有小于约30%(按干重计)的化学前体或非抗体、多肽、肽或融合蛋白化学物,更优选地小于约20%的化学前体或非抗体、多肽、肽或融合蛋白化学物,仍然更优选地小于约10%的化学前体或非抗体、多肽、肽或融合蛋白化学物,并且最优选地小于约5%的化学前体或非抗体、多肽、肽或融合蛋白化学物的抗体、多肽、肽或融合蛋白的制品。

[0157] 如本文所用,术语“存活期”包括以下中的全部:存活至死亡,还被称为总存活期(其中所述死亡可以与病因或相关肿瘤无关);“无复发存活期”(其中术语复发应当包括局部和远处复发两者);无转移存活期;无疾病存活期(其中术语疾病应当包括癌症和与其相关联的疾病)。所述存活期的长度可以通过参考定义的起始点(例如,确诊或治疗开始的时间)和终点(例如,死亡、复发或转移)来计算。此外,治疗功效的准则可以扩展至包括对化疗的应答、存活的概率、给定时间段内转移的概率和肿瘤复发的概率。

[0158] “转录的多核苷酸”或“核苷酸转录物”是一种多核苷酸(例如,mRNA、hnRNA、cDNA或此类RNA或cDNA的类似物),其与通过本发明的标记物的转录以及RNA转录物的正常转录后处理(例如,剪接,如果有的话)和RNA转录物的逆转录制备的成熟mRNA的全部或一部分互补或同源。

[0159] 如本文所用,术语“T细胞”包括CD4+T细胞和CD8+T细胞。术语T细胞还包括1型T辅助性T细胞和2型T辅助性T细胞两者。术语“抗原呈递细胞”包括专职抗原呈递细胞(例如,B淋巴细胞、单核细胞、树突细胞、朗格汉斯细胞)以及其他抗原呈递细胞(例如,角质形成细胞、内皮细胞、星形胶质细胞、成纤维细胞、少突胶质细胞)。

[0160] 常规T细胞(还被称为Tconv或Teff)具有效应功能(例如,细胞因子分泌、细胞毒性活性、抗自识别等)以通过它们的一种或多种T细胞受体的表达增加免疫应答。Tconv或Teff通常被定义为不是Treg的任何T细胞群体,并且包括例如原始T细胞、活化的T细胞、记忆T细胞、静息Tcon或已经向例如Th1或Th2谱系分化的Tcon。在一些实施例中,Teff是非Treg T细胞的子集。在一些实施例中,Teff是CD4+Teff或CD8+Teff,诸如CD4+辅助性T淋巴细胞(例如,Th0、Th1、Tfh或Th17)和CD8+细胞毒性T淋巴细胞。如本文进一步所述,细胞毒性T细胞是CD8+T淋巴细胞。“原始Tcon”是$CD4^{+}$T细胞,其在骨髓中分化并且在胸腺中成功地经历中心选择的阳性和阴性过程,但是还未通过暴露于抗原活化。原始Tcon的特征通常在于L-选择素(CD62L)的表面表达,活化标记物诸如CD25、CD44或CD69的缺失,和记忆标记物诸如CD45RO的缺失。因此据信,原始Tcon是静止性且不分裂的,需要白细胞介素-7(IL-7)和白细胞介素-15(IL-15)用于稳态存活(至少参见WO 2010/101870)。此类细胞的存在和活性在抑制免疫应答的情况下是不需要的。不同于Treg,Tcon不是无能的并且可以响应于基于抗原的T细胞受体活化来增殖(Lechler等人(2001)《皇家学会哲学汇刊,B辑:生物科学(Philos.Trans.R.Soc.Lond.Biol.Sci.356:625-637)。在肿瘤中,耗竭的细胞可以呈现无能的标志。

[0161] 如本文所用,参考V区段的术语“非重排的”或“种系构型”是指其中V区段未进行重组以便与D或J区段紧邻的构型。

[0162] 如本文所用,术语“载体”是指能够转运与它连接的另一个核酸的核酸。一种类型的载体是“质粒”,所述质粒是指可以将额外的DNA区段连接到其中的环状双链DNA环。另一种类型的载体是病毒载体,其中额外的DNA区段可以连接到病毒基因组中。某些载体能够在它们被引入到其中的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和游离型哺乳动物载体)。其他载体(例如,非游离型哺乳动物载体)在引入到宿主细胞中之后整合到宿主细胞的基因组中,并且因此与宿主基因组一起复制。此外,某些载体能够指导它们所操作性地连接到的基因的表达。此类载体在本文中称为“重组表达载体”或简单地“表达载体”。通常,在重组DNA技术中使用的表达载体经常呈质粒的形式。在本发明说明书中,“质粒”和“载体”可互换使用,因为质粒是最常使用的载体形式。然而,本发明旨在包括此类其他形式的表达载体,诸如病毒载体(例如,复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒),它们发挥等效功能。

[0163] 对于核酸,术语“实质同源性”指示两个核酸或其指定序列在最佳地比对和比较时,在适当的核苷酸插入或缺失的情况下,在至少约80%的核苷酸,通常至少约81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%或更多的核苷酸,并且更优选地至少约97%、98%、99%或更多的核苷酸中是相同的。可替代地,当区段在选择性杂交条件下与链的补体杂交时,存在实质同源性。

[0164] 两个序列之间的同一性百分比是序列共享的相同位置的数量的函数(即,同一性%=相同位置的#/总位置#x 100),考虑到为了最优比对两个序列而需要引入的缺口的

数目和每个缺口的长度。两个序列之间的序列比较和同一性百分比确定可以使用数学算法来完成,如在以下非限制实施例中所述。

[0165] 两个核苷酸序列之间的同一性百分比可以使用GCG软件包中的GAP程序(可在GCG公司网站的万维网上获得),使用NWSgapdna来确定。CMP矩阵和40、50、60、70或80的缺口权重和1、2、3、4、5或6的长度权重。两个核苷酸或氨基酸序列之间的同一性百分比可以使用E.Meyers和W.Miller(CABIOS,4:11 17(1989))的算法确定,所述算法已使用PAM120加权残基表、缺口长度罚分12和缺口罚分4并入ALIGN程序(2.0版)中。此外,两个氨基酸序列之间的同一性百分比可以使用Needleman和Wunsch《分子生物学杂志》(48):444 453(1970))算法确定,所述算法已使用Blosum 62矩阵或PAM250矩阵和16、14、12、10、8、6或4的缺口权重和1、2、3、4、5或6的长度权重并入GCG软件包中的GAP程序(可在GCG公司网站的万维网上获得)中。

[0166] 本发明的核酸和蛋白质序列可以进一步用作“查询序列”以针对公共数据库进行搜索,以便例如鉴定相关序列。此类搜索可以使用Altschul等人(1990)《分子生物学杂志》215:403 10的NBLAST和XBLAST程序(2.0版)进行。BLAST核苷酸搜索可以用NBLAST程序、得分=100、字长=12进行,以获得与本发明的核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST蛋白质搜索可以用XBLAST程序、得分=50、字长=3进行,以获得与本发明的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为获得空位比对以达到比较的目的,可以如Altschul等人,(1997)《核酸研究(Nucleic Acids Res.)》25(17):3389 3402中所述利用Gapped BLAST。当利用BLAST和Gapped BLAST程序时,可以使用相应程序(例如,XBLAST和NBLAST)的缺省参数(可在NCBI网站的万维网上获得)。

[0167] 核酸可以存在于全细胞、细胞裂解液中或呈部分纯化或基本上纯的形式。在通过标准技术与其他细胞组分或其他污染物(例如,其他细胞核酸或蛋白质)纯化分开时,核酸“被分离”或“变得基本上纯的”,所述标准技术包括碱性/SDS处理、CsCl分带、柱色谱法、琼脂糖凝胶电泳和本领域熟知的其他技术(参见,F.Ausubel等人编辑《即分子生物学实验指南(Current Protocols in Molecular Biology)》,格林出版和威利交叉科学(Greene Publishing and Wiley Interscience),纽约(1987))。

[0168] 术语“针对受试者确定合适的治疗方案”意指基于或基本上基于或至少部分地基于根据本发明的分析结果,针对受试者确定开始、修改和/或结束的治疗方案(即,用于预防和/或治疗受试者的癌症的单一疗法或不同疗法的组合)。一个实例是确定是否提供针对癌症的靶向疗法以提供免疫调控疗法(例如,HHLA2途径调节剂疗法(例如,HHLA2与一种或多种天然结合配偶体,诸如TMIGD2和/或KIR3DL3之间的相互作用的调节剂))。另一个实例是在手术之后开始辅助疗法,其目的在于降低复发的风险,另一个是改变特定化疗的剂量。除根据本发明的分析结果以外,所述确定可以是基于待治疗的受试者的个人特征。在大多数情况下,针对受试者的合适治疗方案的实际确定将由主治医师或医生进行。

[0169] II.单克隆抗体、免疫球蛋白和多肽

[0170] 本发明部分涉及针对HHLA2的分离的单克隆抗体或其片段(诸如本文列出的单克隆抗体和多克隆抗体)。此类分子的特征部分在于,它们在诊断测定(诸如免疫组织化学(IHC)、蛋白质印迹法、细胞内流式测定、ELISA等)中表现出识别HHLA2蛋白的能力。此类分子的特征部分在于,它们表现出抑制HHLA2结合受体,诸如T细胞上表达的受体(例如,

TMIGD2和KIR3DL3)的能力。

[0171] 术语“HHLA2”,还被称为人内源性逆转录病毒-H长末端重复序列相关蛋白2、HERV-H LTR相关2、B7y、B7H7、B7-H5、B7-H7,是指B7家族的成员。HHLA2蛋白在正常人类组织中具有有限的表达,但是在人类癌症中广泛地表达。HHLA2蛋白是具有三个Ig样结构域(IgV-IgC-IgV)的膜蛋白,而B7家族的其他成员通常仅具有两个Ig结构域(IgV-IgC)。正常人类组织中的HHLA2蛋白在肾、肠、胆囊和乳腺的上皮细胞以及胎盘滋养细胞中表达。在免疫系统中,HHLA2蛋白在人单核细胞/巨噬细胞上组成型地表达。HHLA2调节人T细胞功能,包括例如HHLA2抑制T细胞增殖和细胞因子产生,并且增加T细胞产生和细胞因子产生。HHLA2在广泛范围的来自结直肠、肾、肺、胰腺、卵巢和前列腺的人类癌症中以较高水平表达。HHLA2还在甲状腺、黑素瘤、肝、膀胱、结肠、肾、乳腺和食道的人类癌症中表达。

[0172] HHLA2结构和功能是本领域熟知的,如上所述(参见例如,Xiao等人(2015)《临床癌症研究》21:2201-2203,Janakiram等人(2015)《临床癌症研究》21:2359-2366,Mager等人(1999)《基因组学(Genomics)》21:2359-2366,Flajnik等人(2012)《免疫遗传学(Immunogenet.)》64:571-590,Zhao等人(2013)《美国科学院院报》110:9879-9884和Zhu等人(2013)《自然通讯(Nat.Commun.)》4:2043)。

[0173] 术语“HHLA2”旨在包括其片段、变体(例如,等位基因变体)和衍生物。代表性人HHLA2 cDNA和人HHLA2蛋白质序列是本领域熟知的,并且可从美国国家生物技术信息中心(NCBI)公开获得。人HHLA2变体包括变体1(NM_007072.3和NP_009003.1,其代表最长的转录物并且编码最长的同工型a)、变体2(NM_001282556.1和NP_001269485.1,其代表替代启动子的使用并且与变体1相比在5'UTR中不同)、变体3(NM_001282557.1和NP_001269486.1,其代表替代启动子的使用并且与变体1相比在5'UTR中不同)、变体4(NM_001282558.1和NP_001269487.1,其编码同工型b,代表替代启动子的使用,与变体1相比在5'UTR中不同并且在3'编码区中缺乏替代框内外显子,从而产生比同工型a更短的同工型)和变体5(NM_001282559.1和NP_001269488.1,其编码同工型c,代表替代启动子的使用,并且与变体2相比具有多个差异,从而产生与变体1相比不同的5'UTR并导致在替代起始密码子处的翻译起始,从而产生不同的N末端和比同工型a更短的同工型)。除人以外的生物体中的HHLA2直向同源物的核酸和多肽序列是熟知的,并且包括例如蛙HHLA2(NM_001128644.1和NP_001122116.1)。HHLA2直向同源物的代表性序列在以下表1中呈现。

[0174] 适用于检测HHLA2蛋白的抗HHLA2抗体是本领域熟知的,并且包括例如抗体目录#:ab107119和ab214327(abcam),抗体PA5-24146和PA5-6313(赛默飞世尔科技(ThermoFisher Scientific)),抗体MAB80841、AF8084、FAB80841R、FAB80841T和MAB8084(安迪生物),抗体AP52042PU-N(傲锐基因(Origene)),抗体NBP2-49187、MAB80842、H00011148-B01P和NBP2-32420(罗福斯生物制剂(Novus Biologicals)),抗体GTX51981(GeneTex),抗体HPA055478(阿特拉斯抗体(Atlas Antibodies)),抗体LS-C321945、LS-C308228、LS-C246742、LS-C246743、LS-C246744、LS-C236210和LS-C249186(莱仕邦生物科技(LifeSpan Biosiences))等。此外,用于减少HHLA2表达的多个siRNA、shRNA、CRISPR构建体可以见于以上提及的公司的商业产品列表中,诸如shRNA产品#TL312462、TF312462、TR312462、TG312462和TL312462V,来自傲锐基因技术公司(Origene Technologies)的siRNA产品#SR323358,SiRNA产品#i009616、i009616a、i009616b、i009616c、i009616d、iV009616、

iV009616a、iV009616b、iV009616c、iV009616d、iAAV00961600、iAAV00961601、iAAV00961602、iAAV00961603、iAAV00961604、iAAV00961605、iAAV00961606、iAAV00961607、iAAV00961608和iAAV00961609,CRISPR产品#K0950321、K0950301、K0950302、K0950303、K0950304、K0950305、K0950306、K0950307、K0950308和K0950311(abm),siRNA产品#sc-78498,shRNA产品#sc-78498-V和sc-78498-SH,CRISPR产品#sc-411576、sc-411576-HDR、sc-411576-NIC和sc-411576-NIC-2(圣克鲁斯生物技术(Santa Cruz Biotechnology))等。应当注意,所述术语可以进一步用于指本文中关于HHLA2分子所述的特征的任何组合。例如,序列组成、同一性百分比、序列长度、结构域结构、功能活性等的任何组合可以用于描述本发明的HHLA2分子。

[0175] 术语“HHLA2途径”包括HHLA2和HHLA2与其一种或多种天然结合配偶体,诸如TMIGD2和KIR3DL3的相互作用。

[0176] 术语“TMIGD2”是指含有2、CD28H、IGPR1和IGPR-1的跨膜和免疫球蛋白结构域,其是与CD28、CTLA-4、ICOS和PD-1具有约10%氨基酸同一性的膜蛋白。TMIGD2具有一个细胞外IgV样结构域、跨膜区和具有两个酪氨酸信号传导基序的富含脯氨酸的细胞质结构域。TMIGD2蛋白在所有的原初T细胞和大部分自然杀伤(NK)细胞上组成型地表达,但是在T调节细胞或B细胞上不表达。TMIGD2表达在T细胞的重复刺激下慢慢丧失。与此一致,TMIGD2在记忆T细胞的仅约一半上表达,并且TMIGD2阴性T细胞具有终端分化的衰老表型。还显示TMIGD2在内皮细胞和上皮细胞中表达,并且用来减少细胞迁移并在血管生成期间促进毛细血管形成。

[0177] TMIGD2结构和功能是本领域熟知的,如上所述(参见例如,Xiao等人(2015)《临床癌症研究》21:2201-2203,Janakiram等人(2015)《临床癌症研究》21:2359-2366,Zhu等人(2013)《自然通讯》4:2043,和Rahimi(2012)《细胞(Cell)》23:1646-1656)。

[0178] 术语“TMIGD2”旨在包括其片段、变体(例如,等位基因变体)和衍生物。代表性人TMIGD2 cDNA和人TMIGD2蛋白序列是本领域熟知的,并且可从美国国家生物技术信息中心(NCBI)公开获得。人TMIGD2同工型包括同工型1(NM_144615.2和NP_653216.2)、同工型2(NM_001169126.1和NP_001162597.1;与变体1相比,其在3’编码区中使用替代框内剪接位点,从而产生与同工型1相比更短的同工型)和同工型3(NM_001308232.1和NP_001295161.1,与变体1相比,其在5’编码区中缺乏替代框内外显子,从而产生与同工型1相比更短的同工型)。除人以外的生物体中的TMIGD2直向同源物的核酸和多肽序列是熟知的,并且包括例如黑猩猩TMIGD2(XM_009434393.2和XP_009432668.2,以及XM_001138228.4和XP_001138228.3)和牛TMIGD2(XM_005208980.3和XP_005209037.1,XM_005208979.3和XP_005209036.1,以及XM_002688933.5和XP_002688979.1)。TMIGD2直向同源物的代表性序列在以下表1中呈现。

[0179] 适于检测TMIGD2蛋白的抗TMIGD2抗体是本领域熟知的,并且包括例如抗体目录#MAB8316、MAB83162、FAB8316R、FAB83162R、FAB83162G、FAB83162N、FAB83162S、FAB83162T、FAB83162U和FAB83162V(安迪生物)、抗体TA326695(傲锐基因)、抗体PA5-52787和PA5-38055(赛默飞世尔科技)、抗体MAB83161和NBP1-81164(罗福斯生物制剂)等。此外,用于减少TMIGD2表达的多个siRNA、shRNA、CRISPR构建体可以见于以上提及的公司的商业产品列表,诸如来自傲锐基因技术公司的shRNA产品#TF317829、TG317829、TL317829、TR317829和

TL317829V,siRNA产品#SR314913,和CRISPR产品#KN204938、KN204938LP、KN204938RB和KN204938BN,siRNA产品#i024914、i024914a、i024914b、i024914c、i024914d、iV024914、iV024914a、iV024914b、iV024914c、iV024914d、iAAV02491400、iAAV02491401、iAAV02491402、iAAV02491403、iAAV02491404、iAAV02491405、iAAV02491406、iAAV02491407、iAAV02491408和iAAV02491409,和CRISPR产品#K2409321、K2409301、K2409302、K2409303、K2409304、K2409305、K2409306、K2409307、K2409308和K2409311(Abm),siRNA产品#sc-97757,shRNA产品#sc-97757-SH和sc-97757-V,和CRISPR产品#sc-414261、sc-414261-HDR、sc-414261-NIC和sc-414261-NIC-2(圣克鲁斯生物技术),shRNA产品#SH888208和SH874720(Vigene Biosciences)等。此外,用于增加TMIGD2表达的多个CRISPR构建体可以见于以上提及的公司的商业产品列表,诸如CRISPR产品#K2409378、K2409377、K2409376、K2409375、K2409374、K2409373、K2409372和K2409371(Abm),CRISPR产品#sc-414261-ACT、sc-414261-ACT-2、sc-414261-LAC和sc-414261-LAC-2(圣克鲁斯生物技术)等。应当注意,所述术语可以进一步用于指本文中关于TMIGD2分子所述的特征的任何组合。例如,序列组成、同一性百分比、序列长度、结构域结构、功能活性等的任何组合可以用于描述本发明的TMIGD2分子。

[0180] TMIGD2与HHLA2之间的相互作用以及它们的功能是本领域熟知的,如上所述(参见例如,Xiao等人(2015)《临床癌症研究》21:2201-2203和Janakiram等人(2015)《临床癌症研究》21:2359-2366)。

[0181] 术语“KIR3DL3”,还被称为杀伤细胞免疫球蛋白样受体3DL3、CD158Z、KIR3DL7、KIR44、KIRC1、KIR2DS2、杀伤细胞免疫球蛋白样受体,三个Ig结构域和长胞质尾区3,是指由自然杀伤细胞和T细胞的子集表达的跨膜糖蛋白家族的成员。杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)基因是多态的且高度同源的,并且它们存在于1Mb白细胞受体复合物(LRC)内染色体19q13.4上的簇中。KIR基因簇的基因含量在单倍型中变化,尽管若干“框架”基因存在于所有的单倍型中(KIR3DL3、KIR3DP1、KIR3DL4、KIR3DL2)。KIR蛋白通过细胞外免疫球蛋白结构域的数量(2D或3D)以及通过它们是否具有长(L)或短(S)细胞质结构域来分类。具有长细胞质结构域的KIR蛋白在配体结合时经由基于免疫酪氨酸的抑制基序(ITIM)转导抑制性信号,而具有短细胞质结构域的KIR蛋白缺乏ITIM基序并且相反与TYRO蛋白酪氨酸激酶结合蛋白缔和以转导活化信号。若干KIR蛋白的配体是I类HLA分子的子集;因此,认为KIR蛋白在调节免疫应答中发挥重要作用。该基因是存在于所有单倍型上的“框架”基因座之一。KIR3DL3蛋白具有N末端信号序列、3个Ig结构域、缺乏带正电荷的残基的跨膜区以及含有基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)的长胞质尾区。KIR3DL3缺乏其他KIR中存在的柄区。

[0182] KIR3DL3结构和功能是本领域熟知的,如上所述(参见例如,Hsu等人(2002)《免疫学评论(Immunol Rev.)》190:40-52,Trompeter等人(2005)《免疫学杂志》174:4135-4143,Trundley等人(2006)《免疫遗传学》57:904-916,以及Jones等人(2006)《免疫遗传学》58:614-627)。

[0183] 术语“KIR3DL3”旨在包括其片段、变体(例如,等位基因变体)和衍生物。代表性人KIR3DL3 cDNA和人KIR3DL3蛋白序列是本领域熟知的,并且可从美国国家生物技术信息中心(NCBI)公开获得。例如,至少一种人KIR3DL3同工型是已知的:人KIR3DL3(NM_153443.4)可由转录物(NP_703144.3)编码。除人以外的生物体中的KIR3DL3直向同源物的核酸和多肽

序列是熟知的,并且包括例如黑猩猩KIR3DL3(XM_003316679.3和XP_003316727.3)、恒河猴KIR3DL3(NM_001104552.2和NP_001098022.1)、小鼠KIR3DL3(NM_001310690.1和NP_001297619.1,NM_177749.4和NP_808417.2,NM_177748.2和NP_808416.1)以及大鼠KIR3DL3(NM_181479.2和NP_852144.1)。KIR3DL3直向同源物的代表性序列在以下表1中呈现。

[0184] 适于检测KIR3DL3蛋白的抗KIR3DL3抗体是本领域熟知的,并且包括例如抗体目录#:FAB8919R、MAB8919、FAB8919G、FAB8919N、FAB8919S、FAB8919T、FAB8919U和FAB8919V(安迪生物),抗体AP52374PU-N(傲锐基因),抗体PA5-26178(赛默飞世尔科技),抗体OAAB05761、OAAF08125、OAAN04122、OACA09134、OACA09135、OACD04988和OASG01190(英杰华系统生物学(Aviva Systems Biology))等。此外,用于减少KIR3DL3表达的多个siRNA、shRNA、CRISPR构建体可以见于以上提及的公司的商业产品列表,诸如来自傲锐基因技术公司的shRNA产品#TF303684、TR303684、TG303684、TL303684、TL303684V,siRNA产品#SR314516,和CRISPR产品#KN224383、KN224383BN、KN224383RB和KN224383LP,siRNA产品#i011627、i011627a、i011627b、i011627c、i011627d、iV011627、iV011627a、iV011627b、iV011627c、iV011627d、iAAV01162700、iAAV01162701、iAAV01162702、iAAV01162703、iAAV01162704、iAAV01162705、iAAV01162706、iAAV01162707、iAAV01162708和iAAV01162709,和CRISPR产品#K1151421、K1151401、K1151402、K1151403、K1151404、K1151405、K1151406、K1151407、K1151408和K1151411(Abm),siRNA产品#sc-60892,shRNA产品#sc-60892-SH和sc-60892-V,和CRISPR产品#sc-406227、sc-406227-KO-2、sc-406227-HDR-2、sc-406227-NIC和sc-406227-NIC-2(圣克鲁斯生物技术)等。应当注意,所述术语可以进一步用于指本文中关于KIR3DL3分子所述的特征的任何组合。例如,序列组成、同一性百分比、序列长度、结构域结构、功能活性等的任何组合可以用于描述本发明的KIR3DL3分子。

[0185] 术语“外周血细胞亚型”是指通常存在于外周血中的细胞类型,包括但不限于嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞、T细胞、单核细胞、NK细胞、粒细胞和B细胞。

[0186] 术语“重组人抗体”包括通过重组手段制备、表达、产生或分离的所有人抗体,诸如(a)从针对人免疫球蛋白基因为转基因或转染色体的动物(例如,小鼠)或由其制备的杂交瘤(如下文进一步描述)分离的抗体;(b)从转化以表达抗体的宿主细胞,例如从转染瘤分离的抗体;(c)从重组组合人抗体文库分离的抗体;以及(d)通过涉及将人免疫球蛋白基因序列剪接到其他DNA序列的任何其他手段制备、表达、产生或分离的抗体。此类重组人抗体具有来源于人种系和/或非种系免疫球蛋白序列的可变区和恒定区。然而,在某些实施例中,可以将此类重组人抗体进行体外诱变(或者,当使用针对人Ig序列为转基因的动物时,体内体细胞诱变)并且因此重组抗体的V_H和V_L区的氨基酸序列是如下的序列,在来源于人种系V_H和$_{VL}$序列并与之相关时,所述序列可能不会体内天然存在于人抗体种系库中。

[0187] 用于检测或确定至少一种生物标记物的存在或水平的术语“样品”通常是全血、血浆、血清、唾液、尿液、大便(例如,排泄物)、泪液和任何其他体液(例如,如上文在“体液”的定义下所述的)或组织样品(例如,活检物),诸如小肠、结肠样品或手术切除组织。在某些情况下,本发明的方法进一步包含在检测或确定样品中至少一种标记物的存在或水平之前从个体获得样品。

[0188] 如本文所用的“RNA干扰剂”被定义为通过RNA干扰(RNAi)来干扰或抑制靶生物标

记物基因的表达的任何试剂。此类RNA干扰剂包括但不限于核酸分子,包括与本发明的靶生物标记物基因同源的RNA分子或其片段、短干扰RNA(siRNA)和通过RNA干扰(RNAi)来干扰或抑制靶生物标记物核酸的表达的小分子。

[0189] “RNA干扰(RNAi)”是进化上保守的过程,由此与靶生物标记物核酸相同或高度相似的序列的RNA的表达或引入导致由该靶向基因转录的信使RNA(mRNA)的序列特异性降解或特异性转录后基因沉默(PTGS)(参见Coburn,G.和Cullen,B.(2002)《病毒学杂志(J.of Virology)》76(18):9225),从而抑制靶生物标记物核酸的表达。在一个实施例中,所述RNA是双链RNA(dsRNA)。该过程已经在植物、无脊椎动物和哺乳动物细胞中描述。在自然界中,RNAi通过dsRNA特异性核酸内切酶Dicer启动,所述酶促进长dsRNA被切割成被称为siRNA的双链片段。siRNA被并入到识别并切割靶mRNA的蛋白质复合物中。RNAi还可以通过引入核酸分子,例如合成siRNA、shRNA或其他RNA干扰剂来启动,以抑制或沉默靶生物标记物核酸的表达。如本文所用,“靶生物标记物核酸表达的抑制”或“标记物基因表达的抑制”包括靶生物标记物核酸或由靶生物标记物核酸编码的蛋白质的表达或蛋白质活性或水平的任何降低。所述降低可以是与未被RNA干扰剂靶向的靶生物标记物核酸的表达或由靶生物标记物核酸编码的蛋白质的活性或水平相比至少30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或99%或更多降低。

[0190] 除RNAi以外,基因组编辑可以用于调控目标生物标记物的拷贝数或基因序列,诸如目标生物标记物(诸如HHLA2途径组分,像HHLA2、TMIGD2和/或KIR3DL3)的组成型或诱导型敲除或突变。例如,CRISPR-Cas系统可以用于基因组核酸的精确编辑(例如,用于产生非功能性或无效突变)。在此类实施例中,CRISPR指导RNA和/或Cas酶可以被表达。例如,可以向对于Cas9酶转基因的动物或细胞施用仅含有指导RNA的载体。可以使用相似的策略(例如,设计锌指、转录活化剂样效应子(TALE)或归巢大范围核酸酶)。此类系统是本领域熟知的(参见例如,美国专利第8,697,359号;Sander和Joung(2014)《自然生物技术》32:347-355;Hale等人(2009)《细胞》139:945-956;Karginov和Hannon(2010)《分子细胞(Mol.Cell)》37:7;美国专利公布2014/0087426和2012/0178169;Boch等人(2011)《自然生物技术》29:135-136;Boch等人(2009)《科学》326:1509-1512;Moscou和Bogdanove(2009)《科学》326:1501;Weber等人(2011)《公共科学图书馆期刊(PLoS One)》6:e19722;Li等人(2011)《核酸研究(Nucl.Acids Res.)》39:6315-6325;Zhang等人(2011)《自然生物技术》29:149-153;Miller等人(2011)《自然生物技术》29:143-148;Lin等人(2014)《核酸研究》42:e47)。根据本领域熟知的方法,此类基因策略可以使用组成型表达系统或诱导型表达系统。

[0191] “Piwi相互作用RNA(piRNA)”是最大类别的小非编码RNA分子。piRNA通过与piwi蛋白相互作用形成RNA-蛋白质复合物。这些piRNA复合物与种系细胞中的逆转录转座子和其他遗传元件(特别是精子形成中的那些)的表观遗传和转录后基因沉默两者相关。它们在大小(26-31nt而不是21-24nt)、缺乏序列保守和增加的复杂性方面与微小RNA(miRNA)不同。然而,与其他小RNA一样,piRNA被认为参与基因沉默,特别是转座子的沉默。piRNA的大部分对于转座子序列是反义的,表明转座子是piRNA靶。在哺乳动物中,似乎piRNA在转座子沉默中的活性在胚胎发育期间是最重要的,并且在秀丽隐杆线虫(C.elegans)和人类两者中,piRNA是精子形成所必需的。piRNA经由RNA诱导的沉默复合物(RISC)的形成在RNA沉默中发

挥作用。

[0192] “适体”是结合特异性靶分子的寡核苷酸或肽分子。“核酸适体”是核酸物种,其通过重复轮次的体外选择或等效的SELEX(通过指数富集进行的配体的系统性进化)进行工程化以结合各种分子靶,诸如小分子、蛋白质、核酸以及甚至细胞、组织和生物体。“肽适体”是被选择或工程化以结合特异性靶分子的人工蛋白质。这些蛋白质由通过蛋白质支架展示的可变序列的一个或多个肽环组成。它们通常从组合文库分离并且经常随后通过定向突变或多轮次的可变区诱变和选择进行改进。“亲和性多聚体蛋白”(肽适体的进化物)是进行工程化以展示肽环的小的高度稳定的蛋白质,所述肽环提供对于特定靶蛋白的高亲和力结合表面。它是来源于胱抑素的半胱氨酸蛋白酶抑制剂家族的低分子量12-14kDa的蛋白质。适体可用于生物技术和治疗性应用,因为它们提供比得上常用的生物分子、抗体的分子识别特性。除它们的区分识别以外,适体还提供优于抗体的优点,因为它们可以在测试管中完全工程化,易于通过化学合成产生,拥有期望的储存特性,并且在治疗性应用中引起很少或不引起免疫原性。

[0193] “短干扰RNA”(siRNA),在本文中还被称为“小干扰RNA”,被定义为用来例如通过RNAi抑制靶生物标记物核酸的表达的试剂。siRNA可以化学合成,可以通过体外转录产生,或者可以在宿主细胞内产生。在一个实施例中,siRNA是双链RNA(dsRNA)分子,其长度为约15至约40个核苷酸,优选地为约15至约28个核苷酸,更优选地长度为约19至约25个核苷酸,并且更优选地长度为约19、20、21或22个核苷酸,并且在每条链上可以含有具有约0、1、2、3、4或5个核苷酸长度的3’和/或5’突出端。两条链之间的突出端的长度是独立的,即一条链上的突出端的长度不依赖于第二条链上的突出端的长度。优选地,siRNA能够通过靶信使RNA(mRNA)的降解或特异性转录后基因沉默(PTGS)来促进RNA干扰。

[0194] 在另一个实施例中,siRNA是小发夹(还被称为茎环)RNA(shRNA)。在一个实施例中,这些shRNA由短(例如,19-25个核苷酸)反义链、接着5-9个核苷酸环和类似有义链构成。可替代地,有义链可以在核苷酸环结构之前,并且反义链可以在其后面。这些shRNA可以含在质粒、逆转录病毒和慢病毒中,并且例如由pol III U6启动子或另一个启动子表达(参见例如,Stewart等人(2003)RNA Apr;9(4):493-501,其通过引用并入本文)。

[0195] 可以向患有癌症或具有患癌症风险的受试者施用RNA干扰剂,例如siRNA分子,以抑制在癌症中过表达的生物标记物基因的表达,并且从而治疗、预防或抑制受试者的癌症。

[0196] 术语“小分子”是本领域的术语,并且包括小于约1000分子量或小于约500分子量的分子。在一个实施例中,小分子不排外地包含肽键。在另一个实施例中,小分子不是寡聚的。可以针对活性筛选的示例性小分子化合物包括但不限于肽、模拟肽、核酸、碳水化合物、小有机分子(例如,聚酮)(Cane等人1998.《科学》282:63)和天然产物提取文库。在另一个实施例中,所述化合物是小的有机非肽化合物。在另一个实施例中,小分子不是生物合成的。

[0197] 如应用于生物活性剂的术语“选择性调节剂”或“选择性调控”是指所述试剂的与脱靶细胞群体、信号传导活性等相比经由与靶的直接或相互的相互作用调控靶(诸如细胞群体、信号传导活性等)的能力。例如,相比于HHLA2与另一种结合配偶体之间的另一个相互作用,选择性地抑制HHLA2与一种或多种天然结合配偶体(诸如TMIGD2和KIR3DL3)之间的相互作用和/或对于目标细胞群体的此类相互作用的试剂可以具有针对HHLA2途径调节剂疗法的活性(例如,HHLA2与一种或多种天然结合配偶体(诸如TMIGD2和KIR3DL3)之间的相互

作用的调节剂,相互作用是所述试剂针对至少另一种结合配偶体的活性的至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、110%、120%、130%、140%、150%、160%、170%、180%、190%、2x(倍)或更多(例如,至少约3x、4x、5x、6x、7x、8x、9x、10x、15x、20x、25x、30x、35x、40x、45x、50x、55x、60x、65x、70x、75x、80x、85x、90x、95x、100x、105x、110x、120x、125x、150x、200x、250x、300x、350x、400x、450x、500x、600x、700x、800x、900x、1000x、1500x、2000x、2500x、3000x、3500x、4000x、4500x、5000x、5500x、6000x、6500x、7000x、7500x、8000x、8500x、9000x、9500x、10000x或更大或之间的任何范围,包括端值)。此类度量通常关于使相互作用/活性降低一半所需的试剂的相对量来表示。

[0198] 更通常,术语"选择性的"是指优先的作用或功能。术语"选择性的"可以关于相对于其他靶在目标特定靶中的优先作用来定量。例如,测量的变量(例如,Treg/Breg相对于其他细胞,诸如像Tcon的其他免疫细胞的调控)在目标靶中相对于非预期或不需要的靶可以是10%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、1倍、1.5倍、2倍、2.5倍、3倍、3.5倍、4倍、4.5倍、5倍、5.5倍、6倍、6.5倍、7倍、7.5倍、8倍、8.5倍、9倍、9.5倍、10倍、11倍、12倍、13倍、14倍、15倍、16倍、17倍、18倍、19倍、20倍、25倍、30倍、35倍、40倍、45倍、50倍、55倍、60倍、70倍、80倍、90倍、100倍或更大或之间的任何范围(包括端值,例如50%至16倍)不同。相同倍数分析可以用于确认给定组织、细胞群体中作用的幅值、测量的变量、测量的作用等,诸如Treg:Tcon比率、Breg:Tcon比率、过度增殖性细胞生长速率或体积、Treg/Breg增殖速率或数量等。

[0199] 相比之下,术语"特异性的"是指排外性的作用或功能。例如,HHLA2-TMIGD2和HHLA2-KIR3DL3相互作用的特异性调控分别是指HHLA2/TMIDG2和HHLA2/KIR3DL3相互作用的排他性调控但不包括HHLA2与另一种配体的相互作用的调控。在另一个实例中,抗体与预先确定的抗原的特异性结合是指抗体结合目标抗原而不结合其他抗原的能力。通常,在使用目标抗原作为分析物和抗体作为配体,在BIACORE®测定仪器中通过表面等离子体共振(SPR)技术确定时,抗体以大约小于1x 10^{-7}M,诸如大约小于10^{-8}M、10^{-9}M、10^{-10}M、10^{-11}M或甚至更低的亲和力(K_D)进行结合,并且以其结合除预先确定的抗原或紧密相关的抗原以外的非特异性抗原(例如,BSA,酪蛋白)的亲和力的至少1.1、1.2、1.3、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5、5.0、6.0、7.0、8.0、9.0或10.0倍或更大的亲和力结合预先确定的抗原。此外,K_D是K_A的倒数。短语"识别抗原的抗体"和"对抗原具有特异性的抗体"在本文中与术语"特异性地结合抗原的抗体"可互换使用。

[0200] 术语"致敏"意指以允许用疗法(例如,单独的或与免疫疗法诸如免疫检查点抑制疗法组合的HHLA2途径调节剂疗法(例如,HHLA2与一种或多种天然结合配偶体,诸如TMIGD2和KIR3DL3之间的相互作用的调节剂))进行更有效治疗的方式改变细胞,诸如癌细胞或肿瘤细胞。在一些实施例中,正常细胞未被影响至导致正常细胞被疗法(例如,单独的或与免疫疗法诸如免疫检查点抑制疗法组合的HHLA2途径调节剂疗法(例如,HHLA2与一种或多种天然结合配偶体,诸如TMIGD2和KIR3DL3之间的相互作用的调节剂))过度损害的程度。对于治疗性治疗的增加的敏感性或降低的敏感性针对以下本文所述的特定治疗和方法根据本领域已知的方法进行测量,所述已知的方法包括但不限于细胞增殖性测定(Tanigawa N,Kern D H,Kikasa Y,Morton D L,《癌症研究(Cancer Res)》1982;42:2159-2164)、细胞死

亡测定(Weisenthal L M,Shoemaker R H,Marsden J A,Dill P L,Baker J A,Moran E M,《癌症研究》1984;94:161-173;Weisenthal L M,Lippman M E,《癌症治疗报告(Cancer Treat Rep)》1985;69:615-632;Weisenthal L M,In:Kaspers G J L,Pieters R,Twentyman P R,Weisenthal L M,Veerman AJ P编辑《白血病和淋巴瘤中的药物抗性(Drug Resistance in Leukemia and Lymphoma.)》,Langhorne,P A:Harwood Academic Publishers,1993:415-432;Weisenthal L M,《对妇产科的贡献(Contrib Gynecol Obstet)》1994;19:82-90)。敏感性或抗性还可以在动物中通过在一定时间段内(例如,对于人类来说为6个月并且对于小鼠来说为4-6周)测量肿瘤大小减小来测量。如果与不存在此类组合物或方法的情况下的治疗敏感性或抗性相比,治疗敏感性增加或抗性降低为5%或更多,例如10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%或更多至2倍、3倍、4倍、5倍、10倍、15倍、20倍或更多,则该组合物或方法使对治疗性治疗的应答敏感。对治疗性治疗的敏感性或抗性的确定是本领域中常见的并且在普通技术临床医生的技能范围之内。应当理解,本文所述的用于增强免疫调控的功效的任何方法可以等效地应用于使过度增殖性或其他癌性细胞(例如,抗性细胞)对于疗法敏感的方法。

[0201] 术语“协同作用”是指两种或更多种治疗剂(诸如两种或更多种HHLA2途径调节剂,HHLA2途径调节剂和免疫疗法,单独的或与免疫疗法诸如免疫检查点抑制疗法组合的HHLA2途径调节剂等)的组合作用可以大于单独的抗癌剂的单独作用的总和。

[0202] 术语“受试者”是指任何健康的动物、哺乳动物或人,或罹患目标病状(例如,癌症)的任何动物、哺乳动物或人。术语“受试者”与“患者”可互换使用。

[0203] 术语“存活期”包括以下中的全部:存活至死亡,还被称为总存活期(其中所述死亡可以与病因或相关肿瘤无关);“无复发存活期”(其中术语复发应当包括局部和远处复发两者);无转移存活期;无疾病存活期(其中术语疾病应当包括癌症和与其相关联的疾病)。所述存活期的长度可以通过参考定义的起始点(例如,确诊或治疗开始的时间)和终点(例如,死亡、复发或转移)来计算。此外,治疗功效的准则可以扩展至包括对化疗的应答、存活的概率、给定时间段内转移的概率和肿瘤复发的概率。

[0204] 术语“治疗性作用”是指在动物、特别是哺乳动物并且更特别是人中由药理活性物质导致的局部或系统性作用。因此,该术语意指意图在人或动物中在疾病的诊断、治愈、减轻、治疗或预防中或在期望的身体或心理发展和情况的增强中使用的任何物质。短语“治疗有效量”意指在可应用于任何治疗的合理的利益/风险比下产生一定的所需局部或系统性作用的此类物质的量。在某些实施例中,化合物的治疗有效量将取决于其治疗指数、溶解性等。例如,通过本发明的方法发现的某些化合物可以足以产生可应用于此类治疗的合理的利益/风险比的量施用。

[0205] 如本文所用,术语“治疗有效量”和“有效量”意指包含本发明的化合物的化合物、材料或组合物在可应用于任何医疗治疗的合理的利益/风险比下在动物中的细胞的至少一个亚群中有效产生一定所需的治疗性作用的量。主题化合物的毒性和治疗性功效可以在细胞培养物或实验动物中通过标准药学程序确定,例如用于确定LD_{50}和ED_{50}。优选表现出较大治疗指数的组合物。在一些实施例中,可以测量所述试剂的LD_{50}(致死剂量),并且相对于没有施用所述试剂,其可以降低至少10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、

100％、200％、300％、400％、500％、600％、700％、800％、900％、1000％或更多。相似地，可以测量所述试剂的ED_{50}(即，实现症状的半数最大抑制的浓度)，并且相对于没有施用所述试剂，其可以增加至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％、200％、300％、400％、500％、600％、700％、800％、900％、1000％或更多。另外，相似地，可以测量所述试剂的IC_{50}(即，实现对于癌细胞的半数最大细胞毒性或细胞抑制作用的浓度)，并且相对于没有施用所述试剂，其可以增加至少10％、20％、30％、40％、50％、60％、70％、80％、90％、100％、200％、300％、400％、500％、600％、700％、800％、900％、1000％或更多。在一些实施例中，测定中的癌细胞生长可以以至少约10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或甚至100％被抑制。癌细胞生长可以以至少约10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或甚至100％被促进。在另一个实施例中，可以实现癌细胞数量和/或实体恶性肿瘤的至少约10％、15％、20％、25％、30％、35％、40％、45％、50％、55％、60％、65％、70％、75％、80％、85％、90％、95％或甚至100％的降低。

[0206] 术语“基本上不含化学前体或其他化学物”包括其中蛋白质与蛋白质的合成中涉及的化学前体或其他化学物分离的抗体、多肽、肽或融合蛋白的制品。在一个实施例中，语言“基本上不含化学前体或其他化学物”包括具有小于约30％(按干重计)的化学前体或非抗体、多肽、肽或融合蛋白化学物，更优选地小于约20％的化学前体或非抗体、多肽、肽或融合蛋白化学物，仍然更优选地小于约10％的化学前体或非抗体、多肽、肽或融合蛋白化学物，并且最优选地小于约5％的化学前体或非抗体、多肽、肽或融合蛋白化学物的抗体、多肽、肽或融合蛋白的制品。

[0207] “转录的多核苷酸”或“核苷酸转录物”是一种多核苷酸(例如，mRNA、hnRNA、cDNA、成熟miRNA、pre-miRNA、pri-miRNA、miRNA*、抗miRNA或miRNA结合位点或其变体或此类RNA或cDNA的类似物)，其与通过本发明的标记物的转录以及RNA转录物的正常转录后处理(例如，剪接，如果有的话)和RNA转录物的逆转录制备的成熟mRNA的全部或一部分互补或同源。

[0208] 术语“载体”是指能够转运与它连接的另一个核酸的核酸。一种类型的载体是“质粒”，所述质粒是指可以将额外的DNA区段连接到其中的环状双链DNA环。另一种类型的载体是病毒载体，其中额外的DNA区段可以连接到病毒基因组中。某些载体能够在它们被引入到其中的宿主细胞中自主复制(例如，具有细菌复制起点的细菌载体和游离型哺乳动物载体)。其他载体(例如，非游离型哺乳动物载体)在引入到宿主细胞中之后整合到宿主细胞的基因组中，并且因此与宿主基因组一起复制。此外，某些载体能够指导它们所操作性地连接到的基因的表达。此类载体在本文中称为“重组表达载体”或简单地“表达载体”。通常，在重组DNA技术中使用的表达载体经常呈质粒的形式。在本发明说明书中，“质粒”和“载体”可以互换使用，因为质粒是最常使用的载体形式。然而，本发明旨在包括此类其他形式的表达载体，诸如病毒载体(例如，复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)，它们发挥等效功能。

[0209] 特定蛋白质的氨基酸序列与可以编码所述蛋白质的核苷酸序列之间存在已知且确定的对应性，如由遗传密码(下文示出)所定义。同样地，特定核酸的核苷酸序列与由该核酸编码的氨基酸序列之间存在已知且确定的对应性，如由遗传密码所定义。

[0210] 遗传密码

[0211]

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

[0212] 终止信号（结束） TAA, TAG, TGA

[0213] 遗传密码的重要且已知的特征是其冗余性，由此对于大多数用于制备蛋白质的氨基酸而言，可以采用多于一个编码核苷酸三联体（上文示出）。因此，多个不同的核苷酸序列可以编码给定的氨基酸序列。此类核苷酸序列被认为是功能上等效的，因为它们在所有生物体中导致产生相同的氨基酸序列（虽然某些生物体可以比其他更有效地翻译一些序列）。此外，偶尔地，嘌呤或嘧啶的甲基化变体可以存在于给定核苷酸序列中。此类甲基化不影响三核苷酸密码子与对应的氨基酸之间的编码关系。

[0214] 鉴于上述情况，使用将DNA或RNA翻译为氨基酸序列的遗传密码，编码生物标记物核酸（或其任何部分）的DNA或RNA的核苷酸序列可以用于获得多肽氨基酸序列。同样地，对于多肽氨基酸序列，可以由遗传密码来推断可以编码多肽的对应核苷酸序列（由于其冗余性，所述遗传密码将为任何给定氨基酸序列产生多个核酸序列）。因此，本文中关于编码多肽的核苷酸序列的描述和/或公开内容应当被认为也包括由核苷酸序列编码的氨基酸序列的描述和/或公开内容。类似地，本文中关于多肽氨基酸序列的描述和/或公开内容应当被

认为也包括可以编码氨基酸序列的所有可能的核苷酸序列的描述和/或公开内容。

[0215] 最后,可用于本发明的核酸和多肽分子的核酸和氨基酸序列信息是本领域熟知的并且可从公开可用的数据库(诸如美国国家生物技术信息中心(NCBI))上容易地获得。例如,来源于公开可用的序列数据库的示例性核酸和氨基酸序列在以下表1中提供。

[0216] 表1

[0217] SEQ ID NO:1人HHLA2变体1cDNA序列(NM_007072.3,来自位置415-1659的CDS区)

```
    1 agttctcttc aagtcatgta atcgactttt ttgaattagt tttcagtttc
atttttgttt
   61 ccctaattca agttgggaac acttcatttt ccccaattca agttgggaac
acttccttgg
```

[0218]

```
  121 tatttccttg ctacatggac tttagcaaat gctactttac tctccttcca
gctactcagg
  181 aggctgaggc aggagaatcg cttgaacccg ggaggcggag gttacagtga
gccttttcct
```

241 agttttactg ttggaagcct aactcacagg agagattatg caatacagtc ctgaagtcaa

301 gggaggagag catgtaggag aatactaacc ctgcacagat tgtgatggtg atgtggaata

361 tactaaagcc tagaacgcac ctcctctgca tgactaatat gttctgcaca agacatgaag

421 gcacagacag cactgtcttt cttcctcatt ctcataacat ctctgagtgg atctcaaggc

481 atattccctt tggctttctt catttatgtt cctatgaatg aacaaatcgt cattggaaga

541 cttgatgaag atataattct cccttcttca tttgagaggg gatccgaagt cgtaatacac

601 tggaagtatc aagatagcta taaggttcac agttactaca aaggcagtga ccatttggaa

[0219]

661 agccaagatc ccagatatgc aaacaggaca tccctttttct ataatgagat tcaaaatggg

721 aatgcgtcgc tatttttcag aagagtaagc cttctggacg aaggaattta cacctgctat

781 gtaggaacag caattcaagt gattacaaac aaagtggtgc taaaggtggg agtttttctc

841 acacccgtga tgaagtatga aaagaggaac acaaacagct tcttaatatg cagcgtgtta

901 agtgtttatc ctcgtccaat tatcacgtgg aaaatggaca acacacctat ctctgaaaac

961 aacatggaag aaacagggtc tttggattct ttttctatta acagcccact gaatattaca

1021 ggatcaaatt catcttatga atgtacaatt gaaaattcac tgctgaagca aacatggaca

1081 gggcgctgga cgatgaaaga tggccttcat aaaatgcaaa gtgaacacgt ttcactctca

1141 tgtcaacctg taaatgatta tttttcacca aaccaagact tcaaagttac ttggtccaga

1201 atgaaaagtg ggactttctc tgtcctggct tactatctga gctcctcaca aaatacaatt

1261 atcaatgaat cccgattctc atggaacaaa gagctgataa accagagtga cttctctatg

1321 aatttgatgg atcttaatct ttcagacagt ggggaatatt tatgcaatat ttcttcggat

1381 gaatatactt tacttaccat ccacacagtg catgtagaac cgagccaaga aacagcttcc

1441 cataacaaag gcttatggat tttggtgccc tctgcgattt tggcagcttt tctgctgatt

1501 tggagcgtaa aatgttgcag agcccagcta gaagccagga ggagcagaca ccctgctgat

[0220] 1561 ggagcccaac aagaaagatg ttgtgtccct cctggtgagc gctgtcccag tgcacccgat

1621 aatggcgaag aaaatgtgcc tctttcagga aaagtatagg aaatgagaga agactgtgac

1681 aactcatgac ctgcatcctt aatatccagt gacttcatct ccccttttctt caccacaatt

1741 ccaggcaatg gcctgtcgga gcagacaatt ctaccactgc aaagagttgt aaccattttc

1801 tggtatcaca tttatttttc aagacatact tttcaagaca tcattcactg acccactacc

1861 tgcattgagt ataaatgcct ggatgttaag gattccaatt taactttgaa aagaactgtc

1921 tcattcattt acatttctgt tacagtcagc ccaggaggtt acagtgagct ctccactaag

1981 aatctggaag aaatgcatca ctaggggttg attcccaatc tgatcaactg ataatgggtg

2041 agagagcagg taagagccaa agtcacctta gtggaaaggt taaaaaccag agcctggaaa

2101 ccaagatgat tgatttgaca aggtatttta gtctagtttt atatgaacgg ttgtatcagg

2161 gtaaccaact cgatttggga tgaatcttag ggcaccaaag actaagacag tatctttaag

2221 attgctaggg aaaagggccc tatgtgtcag gcctctgagc ccaagccaag catcgcatcc

2281 cctgtgattt gcacgtatac atccagatgg cctaaagtaa ctgaagatcc acaaaagaag

[0221] 2341 taaaaatagc cttaactgat gacattccac cattgtgatt tgttcctgcc ccaccctaac

2401 tgatcaatgt actttgtaat ctcccccacc cttaagaagg tactttgtaa tcttccccac

2461 ccttaagaag gttctttgta attctcccca cccttgagaa tgtactttgt gagatccacc

2521 ctgcccacaa aacattgctc ttaacttcac cgcctaaccc aaaacctata agaactaatg

2581 ataatccatc acccttcgct gactctcttt tcggactcag cccacctgca cccaggtgaa

2641 ataaacagct ttattgctca cacaaaaaaa aaaaaaaaa

[0222] SEQ ID NO:2人HHLA2变体1氨基酸序列(NP_009003.1)

1 MKAQTALSFF LILITSLSGS QGIFPLAFFI YVPMNEQIVI GRLDEDIILP SSFERGSEVV

61 IHWKYQDSYK VHSYYKGSDH LESQDPRYAN RTSLFYNEIQ NGNASLFFRR

[0223] VSLLDEGIYT

121 CYVGTAIQVI TNKVVLKVGV FLTPVMKYEK RNTNSFLICS VLSVYPRPII TWKMDNTPIS

181 ENNMEETGSL DSFSINSPLN ITGSNSSYEC TIENSLLKQT WTGRWTMKDG

LHKMQSEHVS

241 LSCQPVNDYF SPNQDFKVTW SRMKSGTFSV LAYYLSSSQN TIINESRFSW NKELINQSDF

[0224]

301 SMNLMDLNLS DSGEYLCNIS SDEYTLLTIH TVHVEPSQET ASHNKGLWIL VPSAILAAFL

361 LIWSVKCCRA QLEARRSRHP ADGAQQERCC VPPGERCPSA PDNGEENVPL SGKV

[0225] SEQ ID NO:3人HHLA2变体2cDNA序列(NM_001282556.1,来自位置224-1468的CDS区)

1 aaatcaaacg taccttggac tttactctct gagaaactca tagctgaatt caatgtttat

61 tcttatggac tacttagcat ttgactagac ggtatgaatt tctaagtaag cacatataga

121 actggatgcc cttgtggtac atctcaaggc tgatttgaaa gcttgagaga ccatcaagaa

181 ttggatttgg ggaagagcat gactaatatg ttctgcacaa gacatgaagg cacagacagc

241 actgtctttc ttcctcattc tcataacatc tctgagtgga tctcaaggca tattcccttt

[0226]

301 ggctttcttc atttatgttc ctatgaatga acaaatcgtc attggaagac ttgatgaaga

361 tataattctc ccttcttcat ttgagagggg atccgaagtc gtaatacact ggaagtatca

421 agatagctat aaggttcaca gttactacaa aggcagtgac catttggaaa gccaagatcc

481 cagatatgca aacaggacat ccctttttcta taatgagatt caaaatggga atgcgtcgct

541 atttttcaga agagtaagcc ttctggacga aggaatttac acctgctatg taggaacagc

601 aattcaagtg attacaaaca aagtggtgct aaaggtggga gtttttctca

cacccgtgat

661 gaagtatgaa aagaggaaca caaacagctt cttaatatgc agcgtgttaa gtgtttatcc

721 tcgtccaatt atcacgtgga aaatggacaa cacacctatc tctgaaaaca acatggaaga

781 aacagggtct ttggattctt tttctattaa cagcccactg aatattacag gatcaaattc

841 atcttatgaa tgtacaattg aaaattcact gctgaagcaa acatggacag ggcgctggac

901 gatgaaagat ggccttcata aaatgcaaag tgaacacgtt tcactctcat gtcaacctgt

961 aaatgattat ttttcaccaa accaagactt caaagttact tggtccagaa tgaaaagtgg

1021 gactttctct gtcctggctt actatctgag ctcctcacaa aatacaatta tcaatgaatc

[0227]

1081 ccgattctca tggaacaaag agctgataaa ccagagtgac ttctctatga atttgatgga

1141 tcttaatctt tcagacagtg gggaatattt atgcaatatt tcttcggatg aatatacttt

1201 acttaccatc cacacagtgc atgtagaacc gagccaagaa acagcttccc ataacaaagg

1261 cttatggatt ttggtgccct ctgcgatttt ggcagctttt ctgctgattt ggagcgtaaa

1321 atgttgcaga gcccagctag aagccaggag gagcagacac cctgctgatg gagcccaaca

1381 agaaagatgt tgtgtccctc ctggtgagcg ctgtcccagt gcacccgata atggcgaaga

1441 aaatgtgcct ctttcaggaa aagtatagga aatgagagaa gactgtgaca actcatgacc

1501 tgcatcctta atatccagtg acttcatctc ccctttcttc accacaattc

caggcaatgg

1561 cctgtcggag cagacaattc taccactgca aagagttgta accattttct ggtatcacat

1621 ttatttttca agacatactt ttcaagacat cattcactga cccactacct gcattgagta

1681 taaatgcctg gatgttaagg attccaattt aactttgaaa agaactgtct cattcattta

1741 catttctgtt acagtcagcc caggaggtta cagtgagctc tccactaaga atctggaaga

1801 aatgcatcac taggggttga ttcccaatct gatcaactga taatgggtga gagagcaggt

1861 aagagccaaa gtcaccttag tggaaaggtt aaaaaccaga gcctggaaac caagatgatt

1921 gatttgacaa ggtattttag tctagtttta tatgaacggt tgtatcaggg taaccaactc

[0228]

1981 gatttgggat gaatcttagg gcaccaaaga ctaagacagt atctttaaga ttgctaggga

2041 aaagggccct atgtgtcagg cctctgagcc caagccaagc atcgcatccc ctgtgatttg

2101 cacgtataca tccagatggc ctaaagtaac tgaagatcca caaaagaagt aaaaatagcc

2161 ttaactgatg acattccacc attgtgattt gttcctgccc caccctaact gatcaatgta

2221 ctttgtaatc tcccccaccc ttaagaaggt actttgtaat cttccccacc cttaagaagg

2281 ttctttgtaa ttctccccac ccttgagaat gtactttgtg agatccaccc tgcccacaaa

2341 acattgctct taacttcacc gcctaaccca aaacctataa gaactaatga taatccatca

2401 cccttcgctg actctctttt cggactcagc ccacctgcac ccaggtgaaa taaacagctt

[0229]

2461 tattgctcac acaaaaaaaa aaaaaaaa

[0230] SEQ ID NO:4人HHLA2变体2氨基酸序列(NP_001269485.1)

1 MKAQTALSFF LILITSLSGS QGIFPLAFFI YVPMNEQIVI GRLDEDIILP SSFERGSEVV

61 IHWKYQDSYK VHSYYKGSDH LESQDPRYAN RTSLFYNEIQ NGNASLFFRR VSLLDEGIYT

121 CYVGTAIQVI TNKVVLKVGV FLTPVMKYEK RNTNSFLICS VLSVYPRPII TWKMDNTPIS

[0231] 181 ENNMEETGSL DSFSINSPLN ITGSNSSYEC TIENSLLKQT WTGRWTMKDG LHKMQSEHVS

241 LSCQPVNDYF SPNQDFKVTW SRMKSGTFSV LAYYLSSSQN TIINESRFSW NKELINQSDF

301 SMNLMDLNLS DSGEYLCNIS SDEYTLLTIH TVHVEPSQET ASHNKGLWIL VPSAILAAFL

361 LIWSVKCCRA QLEARRSRHP ADGAQQERCC VPPGERCPSA PDNGEENVPL SGKV

[0232] SEQ ID NO:5人HHLA2变体3 cDNA序列(NM_001282557.1,来自位置155-1399的CDS区)

1 agtttactct acatcatagc agagaaaatg gacaaaacac agctgttttg catgtaggag

61 aatactaacc ctgcacagat tgtgatggtg atgtggaata tactaaagcc tagaacgcac

[0233] 121 ctcctctgca tgactaatat gttctgcaca agacatgaag gcacagacag cactgtcttt

181 cttcctcatt ctcataacat ctctgagtgg atctcaaggc atattccctt tggctttctt

241 catttatgtt cctatgaatg aacaaatcgt cattggaaga cttgatgaag atataattct

301 cccttcttca tttgagaggg gatccgaagt cgtaatacac tggaagtatc aagatagcta

361 taaggttcac agttactaca aaggcagtga ccatttggaa agccaagatc ccagatatgc

421 aaacaggaca tccctttttct ataatgagat tcaaaatggg aatgcgtcgc tatttttcag

481 aagagtaagc cttctggacg aaggaattta cacctgctat gtaggaacag caattcaagt

541 gattacaaac aaagtggtgc taaaggtggg agtttttctc acacccgtga tgaagtatga

601 aaagaggaac acaaacagct tcttaatatg cagcgtgtta agtgtttatc ctcgtccaat

661 tatcacgtgg aaaatggaca acacacctat ctctgaaaac aacatggaag aaacagggtc

[0234] 721 tttggattct ttttctatta acagcccact gaatattaca ggatcaaatt catcttatga

781 atgtacaatt gaaaattcac tgctgaagca aacatggaca gggcgctgga cgatgaaaga

841 tggccttcat aaaatgcaaa gtgaacacgt ttcactctca tgtcaacctg taaatgatta

901 tttttcacca aaccaagact tcaaagttac ttggtccaga atgaaaagtg ggactttctc

961 tgtcctggct tactatctga gctcctcaca aaatacaatt atcaatgaat cccgattctc

1021 atggaacaaa gagctgataa accagagtga cttctctatg aatttgatgg atcttaatct

1081 ttcagacagt ggggaatatt tatgcaatat ttcttcggat gaatatactt tacttaccat

1141 ccacacagtg catgtagaac cgagccaaga aacagcttcc cataacaaag gcttatggat

[0235]

1201 tttggtgccc tctgcgattt tggcagcttt tctgctgatt tggagcgtaa aatgttgcag

1261 agcccagcta gaagccagga ggagcagaca ccctgctgat ggagcccaac aagaaagatg

1321 ttgtgtccct cctggtgagc gctgtcccag tgcacccgat aatggcgaag aaaatgtgcc

1381 tctttcagga aaagtatagg aaatgagaga agactgtgac aactcatgac ctgcatcctt

1441 aatatccagt gacttcatct ccccttttctt caccacaatt ccaggcaatg gcctgtcgga

1501 gcagacaatt ctaccactgc aaagagttgt aaccattttc tggtatcaca tttatttttc

1561 aagacatact tttcaagaca tcattcactg acccactacc tgcattgagt ataaatgcct

1621 ggatgttaag gattccaatt taactttgaa aagaactgtc tcattcattt acatttctgt

1681 tacagtcagc ccaggaggtt acagtgagct ctccactaag aatctggaag aaatgcatca

1741 ctaggggttg attcccaatc tgatcaactg ataatgggtg agagagcagg taagagccaa

1801 agtcacctta gtggaaaggt taaaaaccag agcctggaaa ccaagatgat tgatttgaca

1861 aggtatttta gtctagtttt atatgaacgg ttgtatcagg gtaaccaact cgatttggga

1921 tgaatcttag ggcaccaaag actaagacag tatctttaag attgctaggg aaaagggccc

1981 tatgtgtcag gcctctgagc ccaagccaag catcgcatcc cctgtgattt gcacgtatac

2041 atccagatgg cctaaagtaa ctgaagatcc acaaaagaag taaaaatagc cttaactgat

2101 gacattccac cattgtgatt tgttcctgcc ccaccctaac tgatcaatgt actttgtaat

2161 ctccccccacc cttaagaagg tactttgtaa tcttccccac ccttaagaag gttctttgta

2221 attctcccca cccttgagaa tgtactttgt gagatccacc ctgcccacaa

[0236] aacattgctc

2281 ttaacttcac cgcctaaccc aaaacctata agaactaatg ataatccatc acccttcgct

2341 gactctcttt tcggactcag cccacctgca cccaggtgaa ataaacagct ttattgctca

2401 cacaaaaaaa aaaaaaaaa

[0237] SEQ ID NO:6人HHLA2变体3氨基酸序列(NP_001269486.1)

1 MKAQTALSFF LILITSLSGS QGIFPLAFFI YVPMNEQIVI GRLDEDIILP SSFERGSEVV

61 IHWKYQDSYK VHSYYKGSDH LESQDPRYAN RTSLFYNEIQ NGNASLFFRR VSLLDEGIYT

121 CYVGTAIQVI TNKVVLKVGV FLTPVMKYEK RNTNSFLICS VLSVYPRPII TWKMDNTPIS

[0238] 181 ENNMEETGSL DSFSINSPLN ITGSNSSYEC TIENSLLKQT WTGRWTMKDG LHKMQSEHVS

241 LSCQPVNDYF SPNQDFKVTW SRMKSGTFSV LAYYLSSSQN TIINESRFSW NKELINQSDF

301 SMNLMDLNLS DSGEYLCNIS SDEYTLLTIH TVHVEPSQET ASHNKGLWIL VPSAILAAFL

361 LIWSVKCCRA QLEARRSRHP ADGAQQERCC VPPGERCPSA PDNGEENVPL SGKV

[0239] SEQ ID NO:7人HHLA2变体4 cDNA序列(NM_001282558.1,来自位置302-1495的CDS区)

[0240] 1 aaatcaaacg taccttggac tttactctct gagaaactca tagctgaatt

caatgtttat

61 tcttatggac tacttagcat ttgactagac ggtatgaatt tctaagtaag cacatataga

121 actggatgcc cttgtggtac atctcaaggc tgatttgaaa gcttgagaga ccatcaagaa

181 ttggatttgg ggaagagcat gtaggagaat actaaccctg cacagattgt gatggtgatg

241 tggaatatac taaagcctag aacgcacctc ctctgcatga ctaatatgtt ctgcacaaga

301 catgaaggca cagacagcac tgtctttctt cctcattctc ataacatctc tgagtggatc

361 tcaaggcata ttccctttgg ctttcttcat ttatgttcct atgaatgaac aaatcgtcat

421 tggaagactt gatgaagata taattctccc ttcttcattt gagaggggat ccgaagtcgt

[0241]

481 aatacactgg aagtatcaag atagctataa ggttcacagt tactacaaag gcagtgacca

541 tttggaaagc caagatccca gatatgcaaa caggacatcc cttttctata atgagattca

601 aaatgggaat gcgtcgctat ttttcagaag agtaagcctt ctggacgaag gaatttacac

661 ctgctatgta ggaacagcaa ttcaagtgat tacaaacaaa gtggtgctaa aggtgggagt

721 ttttctcaca cccgtgatga agtatgaaaa gaggaacaca aacagcttct taatatgcag

781 cgtgttaagt gtttatcctc gtccaattat cacgtggaaa atggacaaca cacctatctc

841 tgaaaacaac atggaagaaa cagggtcttt ggattctttt tctattaaca gcccactgaa

901 tattacagga tcaaattcat cttatgaatg tacaattgaa aattcactgc

tgaagcaaac

961 atggacaggg cgctggacga tgaaagatgg ccttcataaa atgcaaagtg aacacgtttc

1021 actctcatgt caacctgtaa atgattattt ttcaccaaac caagacttca aagttacttg

1081 gtccagaatg aaaagtggga ctttctctgt cctggcttac tatctgagct cctcacaaaa

1141 tacaattatc aatgaatccc gattctcatg gaacaaagag ctgataaacc agagtgactt

1201 ctctatgaat ttgatggatc ttaatctttc agacagtggg gaatatttat gcaatatttc

1261 ttcggatgaa tatactttac ttaccatcca cacagtgcat gtagaaccga gccaagaaac

1321 agcttcccat aacaaaggct tatggatttt ggtgccctct gcgattttgg cagcttttct

[0242]

1381 gctgatttgg agcgtaaaat gttgcagaga aagatgttgt gtccctcctg gtgagcgctg

1441 tcccagtgca cccgataatg gcgaagaaaa tgtgcctctt tcaggaaaag tataggaaat

1501 gagagaagac tgtgacaact catgacctgc atccttaata tccagtgact tcatctcccc

1561 tttcttcacc acaattccag gcaatggcct gtcggagcag acaattctac cactgcaaag

1621 agttgtaacc attttctggt atcacattta tttttcaaga catactttc aagacatcat

1681 tcactgaccc actacctgca ttgagtataa atgcctggat gttaaggatt ccaatttaac

1741 tttgaaaaga actgtctcat tcatttacat ttctgttaca gtcagcccag gaggttacag

1801 tgagctctcc actaagaatc tggaagaaat gcatcactag gggttgattc

ccaatctgat

1861 caactgataa tgggtgagag agcaggtaag agccaaagtc accttagtgg aaaggttaaa

1921 aaccagagcc tggaaaccaa gatgattgat ttgacaaggt attttagtct agttttatat

1981 gaacggttgt atcagggtaa ccaactcgat ttgggatgaa tcttagggca ccaaagacta

2041 agacagtatc tttaagattg ctagggaaaa gggccctatg tgtcaggcct ctgagcccaa

2101 gccaagcatc gcatcccctg tgatttgcac gtatacatcc agatggccta aagtaactga

[0243]

2161 agatccacaa aagaagtaaa aatagcctta actgatgaca ttccaccatt gtgatttgtt

2221 cctgccccac cctaactgat caatgtactt tgtaatctcc cccacccttа agaaggtact

2281 ttgtaatctt ccccaccctt aagaaggttc tttgtaattc tccccaccct tgagaatgta

2341 ctttgtgaga tccaccctgc ccacaaaaca ttgctcttaa cttcaccgcc taacccaaaa

2401 cctataagaa ctaatgataa tccatcaccc ttcgctgact ctcttttcgg actcagccca

2461 cctgcaccca ggtgaaataa acagctttat tgctcacaca aaaaaaaaaa aaaaa

[0244] SEQ ID NO:8人HHLA2变体4氨基酸序列(NP_001269487.1)

1 MKAQTALSFF LILITSLSGS QGIFPLAFFI YVPMNEQIVI GRLDEDIILP SSFERGSEVV

[0245]

61 IHWKYQDSYK VHSYYKGSDH LESQDPRYAN RTSLFYNEIQ NGNASLFFRR VSLLDEGIYT

121 CYVGTAIQVI TNKVVLKVGV FLTPVMKYEK RNTNSFLICS VLSVYPRPII TWKMDNTPIS

181 ENNMEETGSL DSFSINSPLN ITGSNSSYEC TIENSLLKQT WTGRWTMKDG LHKMQSEHVS

241 LSCQPVNDYF SPNQDFKVTW SRMKSGTFSV LAYYLSSSQN TIINESRFSW

[0246] NKELINQSDF

301 SMNLMDLNLS DSGEYLCNIS SDEYTLLTIH TVHVEPSQET ASHNKGLWIL VPSAILAAFL

361 LIWSVKCCRE RCCVPPGERC PSAPDNGEEN VPLSGKV

[0247] SEQ ID NO:9人HHLA2变体5 cDNA序列(NM_001282559.1,来自位置232-1284的CDS区)

1 aaatcaaacg taccttggac tttactctct gagaaactca tagctgaatt caatgtttat

61 tcttatggac tacttagcat ttgactagac ggtatgaatt tctaagtaag cacatataga

121 actggatgcc cttgtggtac atctcaaggc tgatttgaaa gcttgagaga ccatcaagaa

181 ttggatttgg ggaagagcat gtaggagaat actaaccctg cacagattgt gatggtgatg

241 tggaatatac taaagcctag aacgcacctc ctctgcatga ctaatatgtt ctgcacaaga

[0248]

301 catgaaggca cagacagcac tgtctttctt cctcattctc ataacatctc tgagtggatc

361 tcaagaagag taagccttct ggacgaagga atttacacct gctatgtagg aacagcaatt

421 caagtgatta caaacaaagt ggtgctaaag gtgggagttt ttctcacacc cgtgatgaag

481 tatgaaaaga ggaacacaaa cagcttctta atatgcagcg tgttaagtgt ttatcctcgt

541 ccaattatca cgtggaaaat ggacaacaca cctatctctg aaaacaacat ggaagaaaca

601 gggtctttgg attctttttc tattaacagc ccactgaata ttacaggatc aaattcatct

661 tatgaatgta caattgaaaa ttcactgctg aagcaaacat ggacagggcg ctggacgatg

721 aaagatggcc ttcataaaat gcaaagtgaa cacgtttcac tctcatgtca acctgtaaat

781 gattattttt caccaaacca agacttcaaa gttacttggt ccagaatgaa aagtgggact

841 ttctctgtcc tggcttacta tctgagctcc tcacaaaata caattatcaa tgaatcccga

901 ttctcatgga acaaagagct gataaaccag agtgacttct ctatgaattt gatggatctt

961 aatctttcag acagtgggga atatttatgc aatatttctt cggatgaata tactttactt

[0249]

1021 accatccaca cagtgcatgt agaaccgagc caagaaacag cttcccataa caaaggctta

1081 tggattttgg tgccctctgc gattttggca gcttttctgc tgatttggag cgtaaaatgt

1141 tgcagagccc agctagaagc caggaggagc agacaccctg ctgatggagc ccaacaagaa

1201 agatgttgtg tccctcctgg tgagcgctgt cccagtgcac ccgataatgg cgaagaaaat

1261 gtgcctcttt caggaaaagt ataggaaatg agagaagact gtgacaactc atgacctgca

1321 tccttaatat ccagtgactt catctccccc ttcttcacca caattccagg caatggcctg

1381 tcggagcaga caattctacc actgcaaaga gttgtaacca ttttctggta tcacatttat

1441 ttttcaagac atacttttca agacatcatt cactgaccca ctacctgcat tgagtataaa

1501 tgcctggatg ttaaggattc caatttaact ttgaaaagaa ctgtctcatt catttacatt

1561 tctgttacag tcagcccagg aggttacagt gagctctcca ctaagaatct ggaagaaatg

1621 catcactagg ggttgattcc caatctgatc aactgataat gggtgagaga gcaggtaaga

1681 gccaaagtca ccttagtgga aaggttaaaa accagagcct ggaaaccaag atgattgatt

1741 tgacaaggta ttttagtcta gttttatatg aacggttgta tcagggtaac caactcgatt

1801 tgggatgaat cttagggcac caaagactaa gacagtatct ttaagattgc tagggaaaag

1861 ggccctatgt gtcaggcctc tgagcccaag ccaagcatcg catcccctgt

[0250] gatttgcacg

1921 tatacatcca gatggcctaa agtaactgaa gatccacaaa agaagtaaaa atagccttaa

1981 ctgatgacat tccaccattg tgatttgttc ctgccccacc ctaactgatc aatgtacttt

2041 gtaatctccc ccacccttaa gaaggtactt tgtaatcttc cccacccttа agaaggttct

2101 ttgtaattct ccccacccttt gagaatgtac tttgtgagat ccaccctgcc cacaaaacat

2161 tgctcttaac ttcaccgcct aacccaaaac ctataagaac taatgataat ccatcaccct

2221 tcgctgactc tcttttcgga ctcagcccac ctgcacccag gtgaaataaa cagctttatt

2281 gctcacacaa aaaaaaaaaa aaaa

[0251] SEQ ID NO:10人HHLA2变体5氨基酸序列(NP_001269488.1)

[0252] 1 MVMWNILKPR THLLCMTNMF CTRHEGTDST VFLPHSHNIS EWISRRVSLL

DEGIYTCYVG

61 TAIQVITNKV VLKVGVFLTP VMKYEKRNTN SFLICSVLSV YPRPIITWKM DNTPISENNM

121 EETGSLDSFS INSPLNITGS NSSYECTIEN SLLKQTWTGR WTMKDGLHKM QSEHVSLSCQ

[0253]

181 PVNDYFSPNQ DFKVTWSRMK SGTFSVLAYY LSSSQNTIIN ESRFSWNKEL INQSDFSMNL

241 MDLNLSDSGE YLCNISSDEY TLLTIHTVHV EPSQETASHN KGLWILVPSA ILAAFLLIWS

301 VKCCRAQLEA RRSRHPADGA QQERCCVPPG ERCPSAPDNG EENVPLSGKV

[0254] SEQ ID NO:11人TMIGD2同工型1cDNA序列(NM_144615.2,来自位置47-895的CDS区)

1 ggaagtctgt caactgggag ggggagaggg gggtgatggg ccaggaatgg ggtccccggg

61 catggtgctg ggcctcctgg tgcagatctg ggccctgcaa gaagcctcaa gcctgagcgt

121 gcagcagggg cccaacttgc tgcaggtgag gcagggcagt caggcgaccc tggtctgcca

181 ggtggaccag gccacagcct gggaacggct ccgtgttaag tggacaaagg atggggccat

[0255]

241 cctgtgtcaa ccgtacatca ccaacggcag cctcagcctg ggggtctgcg ggccccaggg

301 acggctctcc tggcaggcac ccagccatct caccctgcag ctggaccctg tgagcctcaa

361 ccacagcggg gcgtacgtgt gctgggcggc cgtagagatt cctgagttgg aggaggctga

421 gggcaacata acaaggctct ttgtggaccc agatgacccc acacagaaca gaaaccggat

481 cgcaagcttc ccaggattcc tcttcgtgct gctgggggtg ggaagcatgg

gtgtggctgc

541 gatcgtgtgg ggtgcctggt tctggggccg ccgcagctgc cagcaaaggg actcaggtaa

601 cagcccagga aatgcattct acagcaacgt cctataccgg ccccgggggg ccccaaagaa

661 gagtgaggac tgctctggag aggggaagga ccagaggggc cagagcattt attcaacctc

721 cttcccgcaa ccggcccccc gccagccgca cctggcgtca agaccctgcc ccagcccgag

781 accctgcccc agccccaggc ccggccaccc cgtctctatg gtcagggtct ctcctagacc

841 aagccccacc cagcagccga ggccaaaagg gttccccaaa gtgggagagg agtgagagat

[0256]

901 cccaggagac ctcaacagga ccccacccat aggtacacac aaaaaagggg ggatcgaggc

961 cagacacggt ggctcacgcc tgtaatccca gcagtttggg aagccgaggc gggtggaaca

1021 cttgaggtca ggggtttgag accagcctgg cttgaacctg ggaggcggag gttgcagtga

1081 gccgagattg cgccactgca ctccagcctg ggcgacagag tgagactccg tctcaaaaaa

1141 aacaaaaagc aggaggattg ggagcctgtc agccccatcc tgagaccccg tcctcatttc

1201 tgtaatgatg gatctcgctc ccactttccc ccaagaacct aataaaggct tgtgaagaaa

1261 aagcaaaaaa aaaaaaaaaa aa

[0257] SEQ ID NO:12人TMIGD2同工型1氨基酸序列(NP_653216.2)

[0258]

1 MGSPGMVLGL LVQIWALQEA SSLSVQQGPN LLQVRQGSQA TLVCQVDQAT AWERLRVKWT

61 KDGAILCQPY ITNGSLSLGV CGPQGRLSWQ APSHLTLQLD PVSLNHSGAY VCWAAVEIPE

121 LEEAEGNITR LFVDPDDPTQ NRNRIASFPG FLFVLLGVGS MGVAAIVWGA WFWGRRSCQQ

[0259]

181 RDSGNSPGNA FYSNVLYRPR GAPKKSEDCS GEGKDQRGQS IYSTSFPQPA PRQPHLASRP

241 CPSPRPCPSP RPGHPVSMVR VSPRPSPTQQ PRPKGFPKVG EE

[0260] SEQ ID NO:13人TMIGD2同工型2 cDNA序列(NM_001169126.1,来自位置47-883的CDS区)

1 ggaagtctgt caactgggag ggggagaggg gggtgatggg ccaggaatgg ggtccccggg

61 catggtgctg ggcctcctgg tgcagatctg ggccctgcaa gaagcctcaa gcctgagcgt

121 gcagcagggg cccaacttgc tgcaggtgag gcagggcagt caggcgaccc tggtctgcca

181 ggtggaccag gccacagcct gggaacggct ccgtgttaag tggacaaagg atggggccat

241 cctgtgtcaa ccgtacatca ccaacggcag cctcagcctg ggggtctgcg ggccccaggg

[0261]

301 acggctctcc tggcaggcac ccagccatct caccctgcag ctggaccctg tgagcctcaa

361 ccacagcggg gcgtacgtgt gctgggcggc cgtagagatt cctgagttgg aggaggctga

421 gggcaacata acaaggctct ttgtggaccc agatgacccc acacagaaca gaaaccggat

481 cgcaagcttc ccaggattcc tcttcgtgct gctgggggtg ggaagcatgg gtgtggctgc

541 gatcgtgtgg ggtgcctggt tctggggccg ccgcagctgc cagcaaaggg actcaggaaa

601 tgcattctac agcaacgtcc tataccggcc ccgggggcc ccaaagaaga gtgaggactg

661 ctctggagag gggaaggacc agaggggcca gagcatttat tcaacctcct tcccgcaacc

721 ggcccccgc cagccgcacc tggcgtcaag accctgcccc agcccgagac cctgccccag

781 ccccaggccc ggccaccccg tctctatggt cagggtctct cctagaccaa gccccaccca

841 gcagccgagg ccaaaagggt tccccaaagt gggagaggag tgagagatcc caggagacct

901 caacaggacc ccacccatag gtacacacaa aaaaggggg atcgaggcca

[0262] gacacggtgg

961 ctcacgcctg taatcccagc agtttgggaa gccgaggcgg gtggaacact tgaggtcagg

1021 ggtttgagac cagcctggct tgaacctggg aggcggaggt tgcagtgagc cgagattgcg

1081 ccactgcact ccagcctggg cgacagagtg agactccgtc tcaaaaaaaa caaaaagcag

1141 gaggattggg agcctgtcag ccccatcctg agaccccgtc ctcatttctg taatgatgga

1201 tctcgctccc actttccccc aagaacctaa taaaggcttg tgaagaaaaa gcaaaaaaaa

1261 aaaaaaaaaa

[0263] SEQ ID NO:14人TMIGD2同工型2氨基酸序列(NP_001162597.1)

1 MGSPGMVLGL LVQIWALQEA SSLSVQQGPN LLQVRQGSQA TLVCQVDQAT AWERLRVKWT

[0264] 61 KDGAILCQPY ITNGSLSLGV CGPQGRLSWQ APSHLTLQLD PVSLNHSGAY VCWAAVEIPE

121 LEEAEGNITR LFVDPDDPTQ NRNRIASFPG FLFVLLGVGS MGVAAIVWGA WFWGRRSCQQ

181 RDSGNAFYSN VLYRPRGAPK KSEDCSGEGK DQRGQSIYST SFPQPAPRQP

[0265] HLASRPCPSP

241 RPCPSPRPGH PVSMVRVSPR PSPTQQPRPK GFPKVGEE

[0266] SEQ ID NO:15人TMIGD2同工型3cDNA序列(NM_001308232.1,来自位置47-535的

CDS区)

1 ggaagtctgt caactgggag ggggagaggg gggtgatggg ccaggaatgg ggtccccggg

61 catggtgctg ggcctcctgg tgcagatctg ggatgacccc acacagaaca gaaaccggat

121 cgcaagcttc ccaggattcc tcttcgtgct gctgggggtg ggaagcatgg gtgtggctgc

181 gatcgtgtgg ggtgcctggt tctggggccg ccgcagctgc cagcaaaggg actcaggtaa

241 cagcccagga aatgcattct acagcaacgt cctataccgg ccccgggggg ccccaaagaa

301 gagtgaggac tgctctggag aggggaagga ccagaggggc cagagcattt

[0267] attcaacctc

361 cttcccgcaa ccggcccccc gccagccgca cctggcgtca agaccctgcc ccagcccgag

421 accctgcccc agccccaggc ccggccaccc cgtctctatg gtcagggtct ctcctagacc

481 aagccccacc cagcagccga ggccaaaagg gttccccaaa gtgggagagg agtgagagat

541 cccaggagac ctcaacagga ccccacccat aggtacacac aaaaaagggg ggatcgaggc

601 cagacacggt ggctcacgcc tgtaatccca gcagtttggg aagccgaggc gggtggaaca

661 cttgaggtca ggggtttgag accagcctgg cttgaacctg ggaggcggag gttgcagtga

721 gccgagattg cgccactgca ctccagcctg ggcgacagag tgagactccg tctcaaaaaa

781 aacaaaaagc aggaggattg ggagcctgtc agccccatcc tgagaccccg

[0268] tcctcatttc

841 tgtaatgatg gatctcgctc ccactttccc ccaagaacct aataaaggct tgtgaagaaa

901 aagcaaaaaa aaaaaaaa

[0269] SEQ ID NO:16人TMIGD2同工型3氨基酸序列(NP_001295161.1)

1 MGSPGMVLGL LVQIWDDPTQ NRNRIASFPG FLFVLLGVGS MGVAAIVWGA WFWGRRSCQQ

[0270] 61 RDSGNSPGNA FYSNVLYRPR GAPKKSEDCS GEGKDQRGQS IYSTSFPQPA PRQPHLASRP

121 CPSPRPCPSP RPGHPVSMVR VSPRPSPTQQ PRPKGFPKVG EE

[0271] SEQ ID NO:17人KIR3DL3 cDNA序列(NM_153443.4,来自位置51-1283的CDS区)

1 tgctgctgaa ctgagctggg gcgcagccgc ctgtctgcac cggcagcacc atgtcgctca

61 tggtcgtcag catggcgtgt gttgggttct tcttgctgga ggggccctgg ccacatgtgg

121 gtggtcagga caagcccttc ctctctgcct ggcccggcac tgtggtgtct gaaggacaac

[0272] 181 atgtgactct tcagtgtcgc tctcgtcttg ggtttaatga attcagtctg tccaaagaag

241 acgggatgcc tgtccctgag ctctacaaca gaatattccg gaacagcttt ctcatgggcc

301 ctgtgacccc agcacatgca gggacctaca gatgttgcag ttcacaccca cactccccca

361 ctgggtggtc ggcacccagc aaccctgtgg tgatcatggt cacaggagtc

cacagaaaac

421 cttccctcct ggcccaccca ggtcccctgg tgaaatcagg agagacggtc atcctgcaat

481 gttggtcaga tgtcaggttt gagcgcttcc ttctgcacag agaggggatc actgaggacc

541 ccttgcgcct cgttggacag ctccacgatg cgggttccca ggtcaactat tccatgggtc

601 ccatgacacc tgcccttgca gggacctaca gatgctttgg ttctgtcact cacttaccct

661 atgagttgtc ggctcccagt gaccctctgg acatcgtggt cgtaggtcta tatgggaaac

721 cttctctctc agcccagccg ggccccacgg ttcaggcagg agagaatgtg accttgtcct

781 gcagctcccg gagcttgttt gacatttacc atctatccag ggaggcggag gccggtgaac

[0273]

841 ttaggctcac tgcagtgctg agggtcaatg gaacattcca ggccaacttc cctctgggcc

901 ctgtgaccca cggagggaac tacagatgct tcggctcttt ccgtgccctg ccccatgcgt

961 ggtcagaccc gagtgaccca ctgcccgttt ctgtcacagg taactccaga aacctgcacg

1021 ttctgattgg gacctcagtg gtcatcatcc cctttgctat cctcctcttc tttctccttc

1081 atcgctggtg tgccaacaaa aagaatgctg ttgtaatgga ccaagagcct gcagggaaca

1141 gaacagtgaa cagggaggac tctgatgaac aagaccctca ggaggtgaca tacgcacagt

1201 tgaatcactg cgttttcaca cagagaaaaa tcactcgccc ttctcagagg cccaagacac

1261 ccccaacaga taccagcgtg taacacggaa cttccaaatg ctgagcgcag

atccaaagtt

1321 gtcttctgtc cactagcacc acagtcaggc cttgatggga tcttctaggg agacaatagc

1381 cctgtctcaa aaccgggttg ccagctccca tgtaccagca gctggactct gaaggcgtga

1441 gtctgcatct tagggcatcg ctcttcctca caccacgaat ctgaacatgc ctctctcttg

[0274] 1501 cttacaaatg tctaaggtcc ccactgcctg ctggagagaa aacacacttg cttagcccac

1561 aattctccat ttcacttgac ccctgcccac ctctccaacc taactggctt acttcctagt

1621 ctacttgagg ctgcgatcac actgaggaac tcacaattcc aaacatataa gaggctccct

1681 cttaacacgg cacttagata cgtgctattc cacctttcct cag

[0275] SEQ ID NO:18人KIR3DL3氨基酸序列(NP_703144.3)

1 MSLMVVSMAC VGFFLLEGPW PHVGGQDKPF LSAWPGTVVS EGQHVTLQCR SRLGFNEFSL

61 SKEDGMPVPE LYNRIFRNSF LMGPVTPAHA GTYRCCSSHP HSPTGWSAPS NPVVIMVTGV

121 HRKPSLLAHP GPLVKSGETV ILQCWSDVRF ERFLLHREGI TEDPLRLVGQ LHDAGSQVNY

[0276] 181 SMGPMTPALA GTYRCFGSVT HLPYELSAPS DPLDIVVVGL YGKPSLSAQP GPTVQAGENV

241 TLSCSSRSLF DIYHLSREAE AGELRLTAVL RVNGTFQANF PLGPVTHGGN YRCFGSFRAL

301 PHAWSDPSDP LPVSVTGNSR NLHVLIGTSV VIIPFAILLF FLLHRWCANK KNAVVMDQEP

361 AGNRTVNRED SDEQDPQEVT YAQLNHCVFT QRKITRPSQR PKTPPTDTSV

[0277] *表1中包括RNA核酸分子(例如,胸腺嘧啶被尿苷替换)、编码所编码的蛋白质的直向同源物的核酸分子以及包含跨其全长与表1中列出的任何SEQ ID NO的核酸序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或更多同一性的核酸序列的DNA或RNA核酸序列或其部分。此类核酸分子可以具有如本文进一步所述的全长核酸的功能。*表1中包括蛋白质的直向同源物以及包含跨其全长与表1中列出的任何SEQ ID NO的氨基酸序列具有至少80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、

96％、97％、98％、99％、99.5％或更多同一性的氨基酸序列的多肽分子或其部分。此类多肽可以具有如本文进一步所述的全长多肽的功能。

[0278] *表1中包括其他已知的HHLA2、TMIGD2和KIR3DL3核酸和氨基酸序列。

[0279] 除作为刺激性受体(即,向免疫细胞传输共刺激性信号)以外,HHLA2多肽还是抑制性受体,其能够向免疫细胞传输抑制性信号,从而抑制免疫细胞效应功能,或者能够例如在结合抑制性受体或刺激性受体时促进免疫细胞的共刺激。HHLA2结合T细胞上的一种或多种受体,例如TMIGD2、KIR3DL3和/或其他多肽。

[0280] 术语“HHLA2活性”包括HHLA2多肽例如通过接合T细胞上的天然HHLA2配体来调控活化的免疫细胞中的抑制性信号的能力。免疫细胞中抑制性信号的调控导致免疫细胞的增殖和/或由免疫细胞进行的细胞因子分泌的调控。因此,术语“HHLA2活性”包括HHLA2多肽结合其天然配体的能力、调控免疫细胞共刺激性或抑制性信号的能力和调控免疫应答的能力。

[0281] 在一些实施例中,病状诸如癌症对单独的HHLA2阻断具有应答性。在其他实施例中,病状诸如癌症对单独的HHLA2阻断具有应答性,但是在用HHLA2阻断和其他疗法组合治疗时具有更显著或协同的应答性。对单独的或组合的HHLA2阻断具有应答性的多种病状包括但不限于黑素瘤(例如,晚期或转移性黑素瘤)、肺癌(例如,非小细胞肺癌和小细胞肺癌)、乳腺癌(例如,HER-2阴性乳腺癌、雌激素受体+/HER-2-乳腺癌和三阴性乳腺癌)、胰腺癌(例如,胰腺腺癌)和霍奇金淋巴瘤以及膀胱癌、胃癌、头颈癌、肾癌、前列腺癌、妇科癌、结直肠癌、卵巢癌和血液癌。

[0282] 优选的B7多肽能向免疫细胞提供共刺激性或抑制性信号,从而促进或抑制免疫细胞应答。例如,结合共刺激性受体的B7家族成员增加T细胞活化和增殖,而结合抑制性受体的B7家族成员减少共刺激。此外,相同的B7家族成员可以增加或减少T细胞共刺激。例如,在结合共刺激性受体时,HHLA2可以诱导免疫细胞的共刺激,或者在结合抑制性受体时,HHLA2可以抑制免疫细胞。在结合抑制性受体时,HHLA2可以向免疫细胞传输抑制性信号。优选的B7家族成员包括HHLA2、B7-1、B7-2、B7h、PD-L1或PD-L2及其可溶性片段或衍生物。在一个实施例中,B7家族成员结合免疫细胞上的一种或多种受体,例如TMIGD2、KIR3DL3、CTLA4、CD28、ICOS、PD-1和/或其他受体,并且根据所述受体,具有向免疫细胞,优选地T细胞传输抑制性信号或共刺激性信号的能力。

[0283] 共刺激性信号的调控导致免疫细胞的效应功能的调控。因此,术语“HHLA2配体活性”包括HHLA2配体多肽结合其天然受体(例如,HHLA2)的能力、调控免疫细胞共刺激性或抑制性信号的能力和调控免疫应答的能力。

[0284] 在本文中证明了,HHLA2途径是免疫功能的负调节剂或正调节剂,使得调控HHLA2与一种或多种天然结合配偶体(诸如TMIGD2和/或KIR3DL3)之间的相互作用可以调控免疫功能。HHLA2与TMIGD2的结合可以是免疫功能的正调节剂。HHLA2与抑制性受体的结合是免疫功能的负调节剂。据信HHLA2与TMIGD2的结合类似于HHLA2与抑制性受体的结合。因此,抑制HHLA2与TMIGD2的结合被认为是抑制HHLA2与抑制性受体的结合。因此,作为HHLA2途径调节剂(例如,HHLA2与一种或多种天然结合配偶体,诸如TMIGD2和/或KIR3DL3之间的相互作用的调节剂)的本文所述的本发明的试剂直接地或间接地调控HHLA2与一种或多种天然结合配偶体之间的相互作用,可以上调或下调免疫系统并且从而上调或下调免疫应答。调控

此类相互作用的试剂可以直接地或间接地这样做。

[0285] HHLA2与一种或多种HHLA2天然结合配偶体(诸如TMIGD2和/或KIR3DL3)之间的相互作用导致共刺激性或共抑制性免疫信号的递送。因此,在一个实施例中,直接地阻断此类相互作用的试剂(例如,抗HHLA2、抗TMIGD2和/或抗KIR3DL3阻断性抗体)可以阻止抑制性或刺激性信号传导并且上调或下调免疫应答。可替代地,间接地阻断相互作用的试剂可以阻止抑制性信号传导并上调免疫应答。用于上调免疫应答的示例性试剂包括针对HHLA2或KIR3DL3的阻断HHLA2与KIR3DL3之间的相互作用的抗体;阻断HHLA2与KIR3DL3之间的相互作用的HHLA2或KIR3DL3(例如,显性负性多肽)小分子或肽的非活化形式;分别结合HHLA2或KIR3DL3并且抑制HHLA2与KIR3DL3之间的相互作用的融合蛋白(例如,与抗体或免疫球蛋白的Fc部分融合的HHLA2或KIR3DL3的细胞外部分);阻断HHLA2和/或KIR3DL3转录或翻译的核酸分子和/或基因修饰;天然HHLA2配体的非活化形式以及天然KIR3DL3配体的可溶性形式。

[0286] 在其他示例性实施例中,促进HHLA2多肽与一种或多种天然结合配偶体(诸如KIR3DL3多肽)的结合的试剂促进向免疫细胞的抑制性信号。调控此类相互作用的试剂可以直接地或间接地这样做。因此,在一个实施例中,直接地增强HHLA2与KIR3DL3之间的相互作用的试剂(HHLA2激动剂和/或KIR3DL3激动剂)可以促进抑制性信号传导并下调免疫应答。可替代地,阻断KIR3DL3与其他靶的结合的试剂增加可用于结合HHLA2的KIR3DL3的有效浓度。用于下调免疫应答的示例性试剂包括针对HHLA2或KIR3DL3的活化或促进HHLA2与KIR3DL3之间的相互作用的抗体;活化或促进HHLA2与KIR3DL3之间的相互作用的小分子或肽;以及分别结合除HHLA2和KIR3DL3以外的HHLA2和KIR3DL3的天然结合配偶体的阻断性抗体。这些关系还适用于HHLA2和TMIGD2的相互作用。

[0287] 可用于本发明的方法的额外的试剂包括抗体、小分子、肽、模拟肽、天然配体和天然配体的衍生物,其可以结合和/或活化或抑制本发明的蛋白质生物标记物(包括表1中列出的生物标记物)或其片段;RNA干扰、反义、核酸适体等,其可以下调本发明的生物标记物(包括表1中列出的生物标记物)或其片段的表达和/或活性。

[0288] 提供针对HHLA2的分离的单克隆抗体或其片段。在一些实施例中,通过杂交瘤产生的mAb已经根据布达佩斯条约于_____在保藏号_____下保藏在美国典型培养物保藏中心(ATCC)。

[0289] 因为本领域熟知的是,抗体重链和轻链CDR3结构域在抗体对于抗原的结合特异性/亲和力中发挥特别重要的作用,所以如上所述制备的本发明的重组单克隆抗体包含本发明的可变区的重链和轻链CDR3(例如,包括表2的序列或其部分)。所述抗体进一步可以包含本发明的可变区的CDR2(例如,包括表2的序列或其部分)。所述抗体进一步可以包含本发明的可变区的CDR1(例如,包括表2的序列或其部分)。在其他实施例中,所述抗体可以包含CDR的任何组合。

[0290] 以上所述的工程化的抗体的CDR1、CDR2和/或CDR3区可以包含与本文公开的本发明的可变区的氨基酸序列完全一样的氨基酸序列(例如,包括表2的序列或其部分)。然而,普通技术人员将理解,来自完全一样的CDR序列的一些变型可以是可能的,同时仍然保留抗体有效结合HHLA2的能力(例如,保守序列修饰)。因此,在另一个实施例中,工程化的抗体可以由与本发明的一个或多个CDR具有例如50%、60%、70%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.5%同一性的一个或多个CDR构成(例如,包括

表2的序列或其部分)。

[0291] 已知的非人或人抗体(例如,小鼠或非啮齿类动物抗人HHLA2抗体)的结构特征可以用于产生保留本发明的抗体的至少一种功能特性(诸如HHLA2的结合)的结构上相关的人抗人HHLA2抗体(诸如mAb 8A12和多克隆抗体1.2和2.2)。另一种功能特性包括在竞争ELISA测定中抑制原始的已知非人或人抗体的结合。

[0292] 在一些实施例中,提供了能够结合人HHLA2的单克隆抗体(诸如mAb 8A12和多克隆抗体1.2和2.2),其包含重链,其中可变结构域包含至少一个CDR,所述CDR具有与表2中呈现的重链可变结构域CDR的组具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的序列。

[0293] 类似地,还提供了能够结合人HHLA2的单克隆抗体(诸如mAb 8A12和多克隆抗体1.2和2.2),其包含轻链,其中可变结构域包含至少一个CDR,所述CDR具有与表2中呈现的轻链可变结构域CDR的组具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的序列。

[0294] 还提供了能够结合人HHLA2的单克隆抗体(诸如mAb 8A12和多克隆抗体1.2和2.2),其包含重链,其中可变结构域包含至少一个CDR,所述CDR具有与表2中呈现的重链可变结构域CDR的组具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的序列;并且包含轻链,其中可变结构域包含至少一个CDR,所述CDR具有与表2中呈现的轻链可变结构域CDR的组具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的序列。

[0295] 技术人员应当注意,此类百分比同源性等同于在给定CDR内引入1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个保守氨基酸取代并且可以通过所述引入来实现。

[0296] 本发明的单克隆抗体可以包含重链,其中可变结构域包含至少一个CDR,所述CDR具有选自由表2中呈现的重链可变结构域CDR组成的群组的序列;和轻链,其中可变结构域包含至少一个CDR,所述CDR具有选自由表2中呈现的轻链可变结构域CDR组成的群组的序列。

[0297] 此类单克隆抗体可以包含轻链,其中可变结构域包含至少一个CDR,所述CDR具有选自由如本文所述的CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3组成的群组的序列;和/或重链,其中可变结构域包含至少一个CDR,所述CDR具有选自由如本文所述的CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3组成的群组的序列。在一些实施例中,能够结合人HHLA2的单克隆抗体包含如本文所述的CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3或者由其组成。

[0298] 本发明的单克隆抗体的重链可变结构域可以包含表2中列出的vH氨基酸序列或者由其组成,并且/或者本发明的单克隆抗体的轻链可变结构域可以包含表2中列出的vκ氨基酸序列或者由其组成。

[0299] 本发明的单克隆抗体可以通过本领域熟知的任何技术产生和修饰。例如,此类单克隆抗体可以是鼠或非啮齿类动物抗体,诸如可从于_____作为保藏物_____保藏在ATCC的杂交瘤获得的那些。类似地,此类单克隆抗体可以是嵌合的,优选地嵌合小鼠/人抗体。在一些实施例中,单克隆抗体是人源化抗体,使得可变结构域包含人受体框架区和任选地人恒定区(如果存在的话)和非人供体CDR,诸如以上定义的小鼠或非啮齿类动物CDR。

[0300] 本发明进一步提供了所述单克隆抗体的片段,其包括但不限于Fv、Fab、F(ab')2、

Fab'、dsFv、scFv、sc(Fv)2和双抗体;以及由抗体片段形成的多特异性抗体。例如,免疫抑制分子的成员,诸如HHLA2、PD-L2、PD-L1、CTLA-4、KIR3DL3等可以双特异性或多特异性方式检测,以便有效地表征此类分子的表达。

[0301] 还设想了本发明的单克隆抗体的其他片段。例如,提供了个体免疫球蛋白重链和/或轻链,其中其可变结构域包含表2中呈现的至少一个CDR。在一个实施例中,免疫球蛋白重链包含至少一个CDR,所述CDR具有与表2中呈现的重链或轻链可变结构域CDR的组具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的序列。在另一个实施例中,免疫球蛋白轻链包含至少一个CDR,所述CDR具有与本文所述的轻链或重链可变结构域CDR的组(例如,表2中呈现的)具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的序列。

[0302] 在一些实施例中,免疫球蛋白重链和/或轻链包含可变结构域,所述可变结构域包含本文所述的CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2或CDR-H3中的至少一个。此类免疫球蛋白重链可以包含CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3中的至少一个或者由其组成。此类免疫球蛋白轻链可以包含CDR-L1、CDR-L2和CDR-L3中的至少一个或者由其组成。

[0303] 在其他实施例中,根据本发明的免疫球蛋白重链和/或轻链分别包含表2中提供的vH或vκ可变结构域序列或者由其组成。

[0304] 本发明进一步提供了多肽,其具有选自由vH可变结构域、vκ可变结构域、本文所述的CDR-L1、CDR-L2、CDR-L3、CDR-H1、CDR-H2和CDR-H3序列组成的群组的序列。

[0305] 本发明的抗体、免疫球蛋白和多肽可以呈分离的(例如,纯化的)形式使用或含在载体,诸如膜或脂质囊泡(例如,脂质体)中。

[0306] 表2:包括mAb 8A12、6D10、6F10、8D2、2G2、2C4、4D1、1C8和4E5的抗HHLA2单克隆抗体的前导序列和可变区的鉴定和测序

[0307] 8A12重链可变(vH)DNA和氨基酸序列*

[0308] MHC2554HC.1;M13 499.5.8A12.11.10.5

[0309] CDR分析

[0310] GFTFNTNV....___IRTKTNNYAT___VGAMDY

[0311] 呈FASTA形式的氨基酸序列(MHC2554HC.1\;M13F)

[0312] >MHC2554HC.1\;M13F

基因座 8A12_vH 402 bp DNA 线性

特征 位置/限定符

J_区段 370..402

/标记=FWR4

V_区段 358..369

/标记=CDR3

V_区 235..357

/标记=FWR3

[0313] V_区段 211..234

/标记=CDR2

V_区 154..210

/标记=FWR2

V_区段 133..153

/标记=CDR1

V_区 58..132

/标记=FWR1

信号_肽 1..57

/标记=LS

CDS 1..402

/标记=8A12_vH

[0314] 8A12_vH

/翻译

="MLLGLKWIFFVVFYQGVHCEVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTNVMNWVRQAPG KGLEWVGRIRTKTNNYATYYADSVKGRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTATYFCVGAMDYW GQGTSVTVSS" (SEQ ID NO: 19)

[0315] 呈FASTA形式的核苷酸序列(MHC2554HC.1\;M13F)

[0316] >MHC2554HC.1\;M13F.499.5.8A12.11.10.5

[0317] 起点

1 ATGCTGTTGG GGCTGAAGTG GATTTTCTTT GTTGTTTTTT ATCAAGGTGT GCATTGTGAG

61 GTGCAACTTG TTGAGACTGG TGGAGGATTG GTGCAGCCTA AAGGGTCATT GAAACTCTCA

121 TGTGCAGCCT CTGGATTCAC CTTCAACACC AATGTCATGA ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA

[0318] 181 GGAAAGGGTT TGGAATGGGT TGGTCGCATA AGAACTAAAA CTAATAATTA TGCAACATAT

241 TATGCCGATT CAGTGAAAGG CAGGTTCACC ATCTCCAGAG ATGATTCACA AAGTATGCTC

301 TATCTGCAAA TGAACAACTT GAAAACTGAG GACACAGCCA CGTATTTCTG TGTGGGAGCT

361 ATGGACTACT GGGGTCAAGG AACCTCAGTC ACCGTCTCCT CA (SEQ ID NO: 20)

[0319] 信号肽(碱基对1-57)：

[0320] 1ATGCTGTTGG GGCTGAAGTG GATTTTCTTT GTTGTTTTTT ATCAAGGTGT GCATTGT

[0321] 57(SEQ ID NO:21)

[0322] /翻译＝“MLLGLKWIFFVVFYQGVHC”(SEQ ID NO:22)

[0323] 框架1(碱基对58-132)：

[0324] 58GAG GTGCAACTTG TTGAGACTGG TGGAGGATTG GTGCAGCCTA AAGGGTCATT GAAACTCTCA TGTGCAGCCT CT 132(SEQ ID NO:23)

[0325] /翻译＝“EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAAS”(SEQ ID NO:24)

[0326] CDR-H1(碱基对133-153)：

[0327] 133GGATTCAC CTTCAACACC AAT 153(SEQ ID NO:25)

[0328] /翻译＝“GFTFNTN”(SEQ ID NO:26)

[0329] 框架2(碱基对154-210)：

[0330] 154GTCATGA ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGAAAGGGTT TGGAATGGGT TGGTCGCATA

[0331] 210(SEQ ID NO:27)

[0332] /翻译＝“VMNWVRQAPGKGLEWVGRI”(SEQ ID NO:28)

[0333] CDR-H2(碱基对211-234)：

[0334] 211AGAACTAAAA CTAATAATTA TGCA 234(SEQ ID NO:29)

[0335] /翻译＝“RTKTNNYA”(SEQ ID NO:30)

[0336] 框架3(碱基对235-357)：

[0337] 235ACATAT TATGCCGATT CAGTGAAAGG CAGGTTCACC ATCTCCAGAG ATGATTCACA AAGTATGCTC TATCTGCAAA TGAACAACTT GAAAACTGAG GACACAGCCA CGTATTTCTG TGTGGGA 357 (SEQ ID NO:31)

[0338] /翻译＝“TYYADSVKGRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTATYFCVG”(SEQ ID NO:32)

[0339] CDR-H3(碱基对358-369)：

[0340] 358GCT ATGGACTAC 369(SEQ ID NO:33)

[0341] /翻译＝“AMDY”(SEQ ID NO:34)

[0342] 框架4(碱基对370-402)：

[0343] 370T GGGGTCAAGG AACCTCAGTC ACCGTCTCCT CA 402(SEQ ID NO:35)

[0344] /翻译＝“WGQGTSVTVSS”(SEQ ID NO:36)

[0345] MHC2554HC.1 499.5.8A12.11.10.5

[0346]

区域	序列片段	残基	长度
前导序列	MLLGLKWIFFVVFYQGVHC	1 -19	19
HFR1	EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAAS	20 - 44	25
CDR-H1	GFTFNTN	45 - 51	7
HFR2	VMNWVRQAPGKGLEWVGRI	52 - 70	19
CDR-H2	RTKTNNYA	71 - 78	8
HFR3	TYYADSVKGRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTATYFCVG	79 - 119	41
CDR-H3	AMDY	120 - 123	4
HFR4	WGQGTSVTVSS	124 - 134	11

[0347] 8A12轻链可变(vL)DNA和氨基酸序列*

[0348] MHC2554LC.2;M13.499.5.8A12.11.10.5

[0349] CDR分析

[0350] ESVDNSGINF..___RAS....._____QQSYKDPPT

[0351] 呈FASTA形式的氨基酸序列(MHC2554LC.2\;M13F)

[0352] >MHC2554LC.2\;M13F

[0353]

基因座 8A12_vL 393 bp DNA 线性

特征 位置/限定符

J_区段 364..393

/标记=FWR4

V_区段 337..363

/标记=CDR3

V_区 241..336
/标记=FWR3
V_区段 220..240
/标记=CDR2
V_区 175..219
/标记=FWR2
V_区段 130..174
/标记=CDR1
V_区 61..129
/标记=FWR1

[0354]

信号_肽 1..60
/标记=LS
CDS 1..393
/标记=8A12_vL

8A12_vL
/翻译
="METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATVSCRASESVDNSGINFIHWYQQKPGQSPKLLLYRASNLKSGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVETGDVATYYCQQSYKDPPTFGTGTKLELK" (SEQ ID NO: 37)

[0355] 呈FASTA形式的核苷酸序列(MHC2554LC.2\;M13F)

[0356] >MHC2554LC.2\;M13F.499.5.8A12.11.10.5

[0357] 起点

[0358]
1 ATGGAGACAG ACACACTCCT GCTATGGGTG CTGCTGCTCT GGGTTCCAGG TTCCACAGGT
61 GACATTGTGC TGACCCAATC TCCAGCTTCT TTGGCTGTGT CTCTGGGGCA GAGGGCCACC 121 GTCTCCTGCA GAGCCAGCGA AAGTGTTGAT AATTCTGGCA TAAATTTTAT ACACTGGTAC
181 CAGCAGAAAC CAGGACAGTC ACCCAAACTC CTCCTCTATC GTGCATCCAA

CCTAAAATCT

241 GGGATCCCTG CCAGGTTCAG TGGCAGTGGG TCTAGGACAG ACTTCACCCT CACCATTAAT

[0359] 301 CCTGTGGAGA CTGGTGATGT TGCAACCTAT TACTGTCAGC AAAGTTATAA GGATCCTCCT

361 ACGTTCGGTA CTGGGACCAA GCTGGAGCTG AAG (SEQ ID NO: 38)

[0360] 信号肽(碱基对1-60)：

[0361] 1ATGGAGACAG ACACACTCCT GCTATGGGTG CTGCTGCTCT GGGTTCCAGG TTCCACAGGT

[0362] 60(SEQ ID NO:39)

[0363] /翻译＝“METDTLLLWVLLLWVPGSTG”(SEQ ID NO:40)

[0364] 框架1(碱基对61-129)：

[0365] 61GACATTGTGC TGACCCAATC TCCAGCTTCT TTGGCTGTGT CTCTGGGGCA GAGGGCCACC GTCTCCTGC 129(SEQ ID NO:41)

[0366] /翻译＝“DIVLTQSPASLAVSLGQRATVSC”(SEQ ID NO:42)

[0367] CDR-L1(碱基对130-174)：

[0368] 130A GAGCCAGCGA AAGTGTTGAT AATTCTGGCA TAAATTTTAT ACAC 174(SEQ ID NO:43)

[0369] /翻译＝“RASESVDNSGINFIH”(SEQ ID NO:44)

[0370] 框架2(碱基对175-219)：

[0371] 175TGGTAC CAGCAGAAAC CAGGACAGTC ACCCAAACTC CTCCTCTAT 219(SEQ ID NO:45)

[0372] /翻译＝“WYQQKPGQSPKLLLY”(SEQ ID NO:46)

[0373] CDR-L2(碱基对220-240)：

[0374] 220C GTGCATCCAA CCTAAAATCT 240(SEQ ID NO:47)

[0375] /翻译＝“RASNLKS”(SEQ ID NO:48)

[0376] 框架3(碱基对241-336)：

[0377] 241GGGATCCCTG CCAGGTTCAG TGGCAGTGGG TCTAGGACAG ACTTCACCCT CACCATTAAT CCTGTGGAGA CTGGTGATGT TGCAACCTAT TACTGT 336(SEQ ID NO:49)

[0378] /翻译＝“GIPARFSGSGSRTDFTLTINPVETGDVATYYC”(SEQ ID NO:50)

[0379] CDR-L3(碱基对337-363)：

[0380] 337CAGC AAAGTTATAA GGATCCTCCT ACG 363(SEQ ID NO:51)

[0381] /翻译＝“QQSYKDPPT”(SEQ ID NO:52)

[0382] 框架4(碱基对364-393)：

[0383] 364TTCGGTA CTGGGACCAA GCTGGAGCTG AAG 393(SEQ ID NO:53)

[0384] /翻译＝“FGTGTKLELK”(SEQ ID NO:54)

[0385] MHC2554LC.2.499.5.8A12.11.10.5

[0386]

区域	序列片段	残基	长度
前导序列	METDTLLLWVLLLWVPGSTG	1-20	20

LFR1	DIVLTQSPASLAVSLGQRATVSC	21-43	23
CDR-L1	RASESVDNSGINFIH	44-58	15
LFR2	WYQQKPGQSPKLLLY	59-73	15
CDR-L2	RASNLKS	74-80	7
LFR3	GIPARFSGSGSRTDFTLTINPVETGDVATYYC	81-112	32
CDR-L3	QQSYKDPPT	113-121	9
LFR4	FGTGTKLELK	122-131	10

[0387] 6D10重链可变(vH)DNA和氨基酸序列*

[0388] MHC2555HC.1;M13.499.5.6D10.11.11.7

[0389] CDR分析

GFTFNTNV....___IRTKTNNYAT___VGAMDY

[0390] 呈FASTA形式的氨基酸序列（MHC2555HC.1\;M13F）

> MHC2555HC.1\;M13F 499.5.6D10.11.11.7

[0391]

基因座 6D10_vH 402 bp DNA 线性

特征 位置/限定符

J_区段 370..402
/标记=FWR4

V_区段 358..369
/标记=CDR3

V_区 235..357
/标记=FWR3

V_区段 211..234
/标记=CDR2

V_区 154..210
/标记=FWR2

V_区段 133..153
/标记=CDR1

V_区 58..132
/标记=FWR1

信号_肽 1..57
/标记=LS

CDS 1..402
/标记=6D10_vH

6D10_vH

/翻译

="MLLGLKWIFFVVFYQGVHCEVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTNVMNWVRQAPG
KGLEWVARIRTKTNNYATYYADSVKDRFTIFRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVGAMDYW
GQGTSVTVSS”（SEQ ID NO: 55）

呈FASTA形式的核苷酸序列（MHC2555HC.1\;M13F）

[0392] > MHC2555HC.1\;M13F. 499.5.6D10.11.11.7

起点

1 ATGCTGTTGG GGCTGAAGTG GATTTTCTTT GTTGTTTTTT ATCAAGGTGT GCATTGTGAG

61 GTGCAGCTTG TTGAGACTGG TGGAGGATTG GTGCAGCCTA AAGGGTCATT GAAACTCTCA

121 TGTGCAGCCT CTGGATTCAC CTTCAATACC AATGTCATGA ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA

[0393] 181 GGAAAGGGTT TGGAATGGGT TGCTCGCATA AGAACTAAAA CTAATAATTA TGCAACATAT

241 TATGCCGATT CAGTGAAAGA CAGGTTCACC ATCTTCAGAG ATGATTCACA AAGCATTCTC

301 TATCTGCAAA TGAACAACTT GAAAACTGAG GACACAGCCA TGTATTACTG TGTGGGAGCT

361 ATGGACTACT GGGGTCAAGG AACCTCAGTC ACCGTCTCCT CA(SEQ ID NO: 56)

[0394] 信号肽(碱基对1-57)：

[0395] 1ATGCTGTTGG GGCTGAAGTG GATTTTCTTT GTTGTTTTTT ATCAAGGTGT GCATTGT

[0396] 57(SEQ ID NO:57)

[0397] /翻译＝“MLLGLKWIFFVVFYQGVHC”(SEQ ID NO:58)

[0398] 框架1(碱基对58-132)：

[0399] 58GAG GTGCAGCTTG TTGAGACTGG TGGAGGATTG GTGCAGCCTA AAGGGTCATT GAAACTCTCA TGTGCAGCCT CT 132(SEQ ID NO:59)

[0400] /翻译＝“EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAAS”(SEQ ID NO:60)

[0401] CDR-H1(碱基对133-153)：

[0402] 133GGATTCAC CTTCAATACC AAT 153(SEQ ID NO:61)

[0403] /翻译＝“GFTFNTN”(SEQ ID NO:62)

[0404] 框架2(碱基对154-210)：

[0405] 154GTCATGA ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGAAAGGGTT TGGAATGGGT TGCTCGCATA

[0406] 210(SEQ ID NO:63)

[0407] /翻译＝“VMNWVRQAPGKGLEWVARI”(SEQ ID NO:64)

[0408] CDR-H2(碱基对211-234)：

[0409] 211AGAACTAAAA CTAATAATTA TGCA 234(SEQ ID NO:65)

[0410] /翻译＝“RTKTNNYA”(SEQ ID NO:66)

[0411] 框架3(碱基对235-357)：

[0412] 235ACATAT TATGCCGATT CAGTGAAAGA CAGGTTCACC ATCTTCAGAG ATGATTCACA AAGCATTCTC TATCTGCAAA TGAACAACTT GAAAACTGAG GACACAGCCA TGTATTACTG TGTGGGA 357 (SEQ ID NO:67)

[0413] /翻译＝“TYYADSVKDRFTIFRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVG”(SEQ ID NO:68)

[0414] CDR-H3(碱基对358-369)：

[0415] 358GCT ATGGACTAC 369(SEQ ID NO:69)

[0416] /翻译＝“AMDY”(SEQ ID NO:70)

[0417] 框架4(碱基对370-402)：

[0418] 370T GGGGTCAAGG AACCTCAGTC ACCGTCTCCT CA 402(SEQ ID NO:71)

[0419] /翻译＝“WGQGTSVTVSS”(SEQ ID NO:72)

[0420] MHC2555HC.1;M13.499.5.6D10.11.11.7

[0421]

区域	序列片段	残基	长度
前导序列	MLLGLKWIFFVVFYQGVHC	1 - 19	19
HFR1	EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAAS	20 - 44	25
CDR-H1	GFTFNTN	45 - 51	7
HFR2	VMNWVRQAPGKGLEWVARI	52 - 70	19
CDR-H2	RTKTNNYA	71 - 78	8
HFR3	TYYADSVKDRFTIFRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYYC VG	79 - 119	41
CDR-H3	AMDY	120 - 123	4
HFR4	WGQGTSVTVSS	124 - 134	11

[0422]

[0423] 6D10轻链可变(vL)DNA和氨基酸序列*

[0424] MHC2555LC.1;M13.499.5.6D10.11.11.7

[0425] CDR分析

[0426] ESVDNYGISF..___RAS....._____QQSSKDPPT

[0427] 呈FASTA形式的氨基酸序列(MHC2555LC.1\;M13F)

[0428] >MHC2555LC.1\;M13F.499.5.6D10.11.11.7

基因座 6D10_vL 393 bp DNA 线性

特征 位置/限定符

J_区段 364..393

/标记=FWR4

V_区段 337..363

/标记=CDR3

V_区 241..336

[0429] /标记=FWR3

V_区段 220..240

/标记=CDR2

V_区 175..219

/标记=FWR2

V_区段 130..174

/标记=CDR1

V_区 61..129

/标记=FWR1

信号_肽 1..60

/标记=LS

CDS 1..393

/标记=6D10_vL

[0430]

6D10_vL

/ 翻 译 ="

METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGISFMHWYQQK

PGQPPKLLIYRASNLKSGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVETGDVATYYCQQSSKDPPTFGTGT

KLELK”（SEQ ID NO: 73）

[0431] 呈FASTA形式的核苷酸序列(MHC2555LC.1\;M13F)

[0432] >MHC2555LC.1\;M13F.499.5.6D10.11.11.7

[0433] 起点

1 ATGGAGACAG ACACACTCCT GCTATGGGTG CTGCTGCTCT GGGTTCCAGG TTCCACAGGT

61 GACATTGTGC TGACCCAATC TCCAGCTTCT TTGGCTGTGT CTCTAGGGCA GAGGGCCACC

121 ATCTCCTGCA GAGCCAGCGA GAGTGTTGAT AATTATGGCA TTAGTTTTAT GCACTGGTAC

[0434] 181 CAGCAGAAAC CAGGACAGCC ACCCAAACTC CTCATCTATC GTGCATCCAA CCTAAAATCT

241 GGGATCCCTG CCAGGTTCAG TGGCAGTGGG TCTAGGACAG ACTTCACCCT CACCATTAAT

301 CCTGTGGAGA CTGGTGATGT TGCTACCTAT TACTGTCAGC AAAGTAGTAA GGATCCTCCT

361 ACGTTCGGTA CTGGGACCAA GCTAGAGCTG AAA (SEQ ID NO: 74)

[0435] 信号肽(碱基对1-60)：

[0436] 1ATGGAGACAG ACACACTCCT GCTATGGGTG CTGCTGCTCT GGGTTCCAGG TTCCACAGGT

[0437] 60(SEQ ID NO:75)

[0438] /翻译＝“METDTLLLWVLLLWVPGSTG”(SEQ ID NO:76)

[0439] 框架1(碱基对61-129)：

[0440] 61GACATTGTGC TGACCCAATC TCCAGCTTCT TTGGCTGTGT CTCTAGGGCA GAGGGCCACC ATCTCCTGC 129(SEQ ID NO:77)

[0441] /翻译＝“DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC”(SEQ ID NO:78)

[0442] CDR-L1(碱基对130-174)：

[0443] 130A GAGCCAGCGA GAGTGTTGAT AATTATGGCA TTAGTTTTAT GCAC 174(SEQ ID NO:79)

[0444] /翻译＝“RASESVDNYGISFMH”(SEQ ID NO:80)

[0445] 框架2(碱基对175-219)：

[0446] 175TGGTAC CAGCAGAAAC CAGGACAGCC ACCCAAACTC CTCATCTAT 219(SEQ ID NO:81)

[0447] /翻译＝“WYQQKPGQPPKLLIY”(SEQ ID NO:82)

[0448] CDR-L2(碱基对220-240)：

[0449] 220C GTGCATCCAA CCTAAAATCT 240(SEQ ID NO:83)

[0450] /翻译＝“RASNLKS”(SEQ ID NO:84)

[0451] 框架3(碱基对241-336)：

[0452] 241GGGATCCCTG CCAGGTTCAG TGGCAGTGGG TCTAGGACAG ACTTCACCCT CACCATTAAT CCTGTGGAGA CTGGTGATGT TGCTACCTAT TACTGT 336(SEQ ID NO:85)

[0453] /翻译＝“GIPARFSGSGSRTDFTLTINPVETGDVATYYC”(SEQ ID NO:86)

[0454] CDR-L3(碱基对337-363)：

[0455] 337CAGC AAAGTAGTAA GGATCCTCCT ACG 363(SEQ ID NO:87)

[0456] /翻译＝“QQSSKDPPT”(SEQ ID NO:88)

[0457] 框架4(碱基对364-393)：

[0458] 364TTCGGTA CTGGGACCAA GCTAGAGCTG AAA 393(SEQ ID NO:89)

[0459] /翻译＝“FGTGTKLELK”(SEQ ID NO:90)

[0460] MHC2555LC.1 499.5.6D10.11.11.7

[0461]

区域	序列片段	残基	长度
前导序列	METDTLLLWVLLLWVPGSTG	1-20	20
LFR1	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISC	21-43	23
CDR-L1	RASESVDNYGISFMH	44-58	15
LFR2	WYQQKPGQPPKLLIY	59-73	15
CDR-L2	RASNLKS	74-80	7
LFR3	GIPARFSGSGSRTDFTLTINPVETGDVATYYC	81-112	32
CDR-L3	QQSSKDPPT	113-121	9
LFR4	FGTGTKLELK	122-131	10

[0462] 6F10重链可变(vH)DNA和氨基酸序列*

[0463] MHC2557HC0.1;M13.499.5.6F10.A4.10

[0464] CDR分析

[0465] GYTFTTYT....___INPSSGYT..___ARHPWDSDY

[0466] 呈FASTA形式的氨基酸序列(MHC2557HC0.1\;M13F)

[0467] >MHC2557HC0.1\;M13F.499.5.6F10.A4.10

[0468]

基因座 6F10_vH 405 bp DNA 线性

特征 位置/限定符

J_区段 373..405

/标记=FWR4

[0469]

V_区段 352..372
/标记=CDR3
V_区 229..351
/标记=FWR3
V_区段 211..228
/标记=CDR2
V_区 154..210
/标记=FWR2
V_区段 133..153
/标记=CDR1
V_区 58..132
/标记=FWR1
信号_肽 1..57
/标记=LS
CDS 1..405
/标记=6F10_vH

6F10_vH
/翻译
="MERHWIFLFLLSVTAGVHSQVHLQQSAAELARPGASVKMSCKASGYTFTTYTMHWVKQRPG
QGLEWIGHINPSSGYTDYNQKFKDKTTLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARHPWDSDY
WGQGTTLTVSS" (SEQ ID NO: 91)

[0470] 呈FASTA形式的核苷酸序列(MHC2557HCO.1\;M13F)

[0471] >MHC2557HCO.1\;M13F.499.5.6F10.A4.10

[0472] 起点

[0473]
1 ATGGAAAGGC ACTGGATCTT TCTCTTCCTG TTGTCAGTAA CTGCAGGTGT
CCACTCCCAG
61 GTCCACCTGC AGCAGTCTGC AGCTGAACTG GCAAGACCTG GGGCCTCAGT
GAAGATGTCC

[0474] 121 TGCAAGGCTT CTGGCTACAC CTTTACTACC TACACGATGC ACTGGGTAAA ACAGAGGCCT

181 GGACAGGGTC TGGAATGGAT TGGACACATT AATCCTAGCA GTGGATATAC TGATTACAAT

241 CAGAAATTCA AGGACAAGAC CACATTGACT GCAGACAAAT CCTCCAGTAC AGCCTACATG

301 CAACTGAACA GCCTGACATC TGAGGACTCT GCGGTCTATT ACTGTGCAAG ACACCCCTGG

361 GACTCGGACT ACTGGGGCCA AGGCACCACT CTCACAGTCT CCTCA (SEQ ID NO: 92)

[0475] 信号肽(碱基对1-57)：

[0476] 1ATGGAAAGGC ACTGGATCTT TCTCTTCCTG TTGTCAGTAA CTGCAGGTGT CCACTCC

[0477] 57(SEQ ID NO:93)

[0478] /翻译＝“MERHWIFLFLLSVTAGVHS”(SEQ ID NO:94)

[0479] 框架1(碱基对58-132)：

[0480] 58CAG GTCCACCTGC AGCAGTCTGC AGCTGAACTG GCAAGACCTG GGGCCTCAGT GAAGATGTCC TGCAAGGCTT CT 132(SEQ ID NO:95)

[0481] /翻译＝“QVHLQQSAAELARPGASVKMSCKAS”(SEQ ID NO:96)

[0482] CDR-H1(碱基对133-153)：

[0483] 133GGCTACAC CTTTACTACC TAC 153(SEQ ID NO:97)

[0484] /翻译＝“GYTFTTY”(SEQ ID NO:98)

[0485] 框架2(碱基对154-210)：

[0486] 154ACGATGC ACTGGGTAAA ACAGAGGCCT

[0487] 181GGACAGGGTC TGGAATGGAT TGGACACATT 210(SEQ ID NO:99)

[0488] /翻译＝“TMHWVKQRPGQGLEWIGHI”(SEQ ID NO:100)

[0489] CDR-H2(碱基对211-228)：

[0490] 211AATCCTAGCA GTGGATAT 228(SEQ ID NO:101)

[0491] /翻译＝“NPSSGY”(SEQ ID NO:102)

[0492] 框架3(碱基对229-351)：

[0493] 229AC TGATTACAAT CAGAAATTCA AGGACAAGAC CACATTGACT GCAGACAAAT CCTCCAGTAC AGCCTACATG CAACTGAACA GCCTGACATC TGAGGACTCT GCGGTCTATT ACTGTGCAAG A 351(SEQ ID NO:103)

[0494] /翻译＝“TDYNQKFKDKTTLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCAR”(SEQ ID NO:104)

[0495] CDR-H3(碱基对352-372)：

[0496] 352CACCCCTGG GACTCGGACT AC 372(SEQ ID NO:105)

[0497] /翻译＝“HPWDSDY”(SEQ ID NO:106)

[0498] 框架4(碱基对373-405)：

[0499] 373TGGGGCCA AGGCACCACT CTCACAGTCT CCTCA 405(SEQ ID NO:107)

[0500] /翻译＝“WGQGTTLTVSS”(SEQ ID NO:108)

[0501] MHC2557HC0.1 499.5.6F10.A4.10

[0502]

区域	序列片段	残基	长度
前导序列	MERHWIFLFLLSVTAGVHS	1 - 19	19
HFR1	QVHLQQSAAELARPGASVKMSCKAS	20 - 44	25
CDR-H1	GYTFTTY	45 - 51	7
HFR2	TMHWVKQRPGQGLEWIGHI	52 - 70	19
CDR-H2	NPSSGY	71 - 76	6
HFR3	TDYNQKFKDKTTLTADKSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCAR	77 - 117	41
CDR-H3	HPWDSDY	118 - 124	7
HFR4	WGQGTTLTVSS	125 - 135	11

[0503] 6F10轻链可变(vL)DNA和氨基酸序列*

[0504] MHC2557LC.1;M13.

[0505] CDR分析

[0506] ENIDSY.....___AAT.....___QHYYITPFT

[0507] 呈FASTA形式的氨基酸序列(MHC2557LC.1\;M13F)

[0508] >MHC2557LC.1\;M13F.499.5.6F10.A4.10

[0509]

基因座 6F10_vL 381 bp DNA 线性

特征 位置/限定符

J_区段 352..381
/标记=FWR4

V_区段 325..351
/标记=CDR3

V_区 229..324
/标记=FWR3

V_区段 208..228
/标记=CDR2

V_区 163..207
/标记=FWR2

V_区段 130..162
/标记=CDR1

V_区 61..129
/标记=FWR1

信号_肽 1..60
/标记=LS

CDS 1..381
/标记=6F10_vL

[0510]

6F10_vL
/翻译
="MSVPTQLLGLLLLWLTDARCDIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIDSYLAWYQQKQG
RSPQLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTQFSLQINRLQSEDVARYYCQHYYITPFTFGSGTKL
EIA" (SEQ ID NO: 109)

[0511] 呈FASTA形式的核苷酸序列(MHC2557LC.1\;M13F)

[0512] >MHC2557LC.1\;M13F.499.5.6F10.A4.10

[0513] 起点

1 ATGAGTGTGC CCACTCAGCT CCTGGGGTTG CTGCTGCTGT GGCTTACAGA TGCCAGATGT

61 GACATCCAGA TGACTCAGTC TCCAGCTTCC CTGTCTGCAT CTGTGGGAGA AACTGTCACC

121 ATCACATGTC GAGCAAGTGA GAATATTGAC AGTTATTTAG CATGGTATCA GCAGAAACAG

[0514] 181 GGAAGATCTC CTCAGCTCCT GGTCTATGCT GCAACAAACT TAGCAGATGG TGTGCCATCA

241 AGGTTCAGTG GCAGTGGATC AGGCACACAG TTTTCTCTCC AGATCAACCG CCTGCAGTCT

301 GAAGATGTTG CGAGATATTA CTGTCAACAT TATTATATTA CTCCATTCAC GTTCGGCTCG

361 GGGACAAAAT TGGAAATAGC A (SEQ ID NO: 110)

[0515] 信号肽(碱基对1-60)：

[0516] 1ATGAGTGTGC CCACTCAGCT CCTGGGGTTG CTGCTGCTGT GGCTTACAGA TGCCAGATGT

[0517] 60(SEQ ID NO:111)

[0518] /翻译＝“MSVPTQLLGLLLLWLTDARC”(SEQ ID NO:112)

[0519] 框架1(碱基对61-129)：

[0520] 61GACATCCAGA TGACTCAGTC TCCAGCTTCC CTGTCTGCAT CTGTGGGAGA AACTGTCACC ATCACATGT 129(SEQ ID NO:113)

[0521] /翻译＝“DIQMTQSPASLSASVGETVTITC”(SEQ ID NO:114)

[0522] CDR-L1(碱基对130-162)：

[0523] 130C GAGCAAGTGA GAATATTGAC AGTTATTTAG CA 162(SEQ ID NO:115)

[0524] /翻译＝“RASENIDSYLA”(SEQ ID NO:116)

[0525] 框架2(碱基对163-207)：

[0526] 163TGGTATCA GCAGAAACAG GGAAGATCTC CTCAGCTCCT GGTCTAT 207(SEQ ID NO:117)

[0527] /翻译＝“WYQQKQGRSPQLLVY”(SEQ ID NO:118)

[0528] CDR-L2(碱基对208-228)：

[0529] 208GCT GCAACAAACT TAGCAGAT 228(SEQ ID NO:119)

[0530] /翻译＝“AATNLAD”(SEQ ID NO:120)

[0531] 框架3(碱基对229-324)：

[0532] 229GG TGTGCCATCA AGGTTCAGTG GCAGTGGATC AGGCACACAG TTTTCTCTCC AGATCAACCG CCTGCAGTCT GAAGATGTTG CGAGATATTA CTGT 324(SEQ ID NO:121)

[0533] /翻译＝“GVPSRFSGSGSGTQFSLQINRLQSEDVARYYC”(SEQ ID NO:122)

[0534] CDR-L3(碱基对325-351)：

[0535] 325CAACAT TATTATATTA CTCCATTCAC G 351(SEQ ID NO:123)

[0536] /翻译＝“QHYYITPFT”(SEQ ID NO:124)

[0537] 框架4(碱基对352-381):

[0538] 352TTCGGCTCG GGGACAAAAT TGGAAATAGC A 381(SEQ ID NO:125)

[0539] /翻译＝“FGSGTKLEIA”(SEQ ID NO:126)

[0540] MHC2557LC.1 499.5.6F10.A4.10

[0541]

区域	序列片段	残基	长度
前导序列	MSVPTQLLGLLLLWLTDARC	1-20	20
LFR1	DIQMTQSPASLSASVGETVTITC	21-43	23
CDR-L1	RASENIDSYLA	44-54	11
LFR2	WYQQKQGRSPQLLVY	55-69	15
CDR-L2	AATNLAD	70-76	7
LFR3	GVPSRFSGSGSGTQFSLQINRLQSEDVARYYC	77-108	32
CDR-L3	QHYYITPFT	109-117	9
LFR4	FGSGTKLEIA	118-127	10

[0542] 8D2重链可变(vH)DNA和氨基酸序列*

[0543] MHC2558HC.1;M13.499.8D2.6.8

[0544] CDR分析

[0545] GFTFNTNV....___IRTKTNNYAT___VGAMDY

[0546] 呈FASTA形式的氨基酸序列(MHC2558HC.1\;M13F)

[0547] >MHC2558HC.1\;M13F.499.8D2.6.8

[0548]
```
基因座        8D2_vH          402 bp    DNA     线性
特征                位置/限定符
     J_区段          370..402
                       /标记=FWR4
     V_区段          358..369
                       /标记=CDR3
     V_区           235..357
                       /标记=FWR3
     V_区段          211..234
                       /标记=CDR2
     V_区           154..210
```

/标记=FWR2

V_区段 133..153

/标记=CDR1

V_区 58..132

/标记=FWR1

信号_肽 1..57

/标记=LS

[0549] CDS 1..402

/标记=8D2_vH

8D2_vH

/翻译

="MLLGLKWIFFVVFYQGVHCEVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAASGFTFNTNVMNWVRQAPG KGLEWVGRIRTKTNNYATYYADSVKGRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTATYFCVGAMDYW GQGTSVTVSS”（SEQ ID NO: 127）

[0550] 呈FASTA形式的核苷酸序列(MHC2558HC.1\;M13F)

[0551] >MHC2558HC.1\;M13F.499.8D2.6.8

[0552] 起点

1 ATGCTGTTGG GGCTGAAGTG GATTTTCTTT GTTGTTTTTT ATCAAGGTGT GCATTGTGAG

61 GTGCAACTTG TTGAGACTGG TGGAGGATTG GTGCAGCCTA AAGGGTCATT GAAACTCTCA

121 TGTGCAGCCT CTGGATTCAC CTTCAACACC AATGTCATGA ACTGGGTCCG

[0553] CCAGGCTCCA

181 GGAAAGGGTT TGGAATGGGT TGGTCGCATA AGAACTAAAA CTAATAATTA TGCAACATAT

241 TATGCCGATT CAGTGAAAGG CAGGTTCACC ATCTCCAGAG ATGATTCACA AAGTATGCTC

301 TATCTGCAAA TGAACAACTT GAAAACTGAG GACACAGCCA CGTATTTCTG TGTGGGAGCT

[0554] 361 ATGGACTACT GGGGTCAAGG AACCTCAGTC ACCGTCTCCT CA （SEQ ID NO: 128）

[0555] 信号肽(碱基对1-57)：

[0556] 1ATGCTGTTGG GGCTGAAGTG GATTTTCTTT GTTGTTTTTT ATCAAGGTGT GCATTGT

[0557] 57(SEQ ID NO:129)

[0558] /翻译＝“MLLGLKWIFFVVFYQGVHC”(SEQ ID NO:130)

[0559] 框架1(碱基对58-132)：

[0560] 58GAG GTGCAACTTG TTGAGACTGG TGGAGGATTG GTGCAGCCTA AAGGGTCATT GAAACTCTCA TGTGCAGCCT CT 132(SEQ ID NO:131)

[0561] /翻译＝“EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAAS”(SEQ ID NO:132)

[0562] CDR-H1(碱基对133-153)：

[0563] 133GGATTCAC CTTCAACACC AAT 153(SEQ ID NO:133)

[0564] /翻译＝“GFTFNTN”(SEQ ID NO:134)

[0565] 框架2(碱基对154-210)：

[0566] 154GTCATGA ACTGGGTCCG CCAGGCTCCA GGAAAGGGTT TGGAATGGGT TGGTCGCATA

[0567] 210(SEQ ID NO:135)

[0568] /翻译＝“VMNWVRQAPGKGLEWVGRI”(SEQ ID NO:136)

[0569] CDR-H2(碱基对211-234)：

[0570] 211AGAACTAAAA CTAATAATTA TGCA 234(SEQ ID NO:137)

[0571] /翻译＝“RTKTNNYA”(SEQ ID NO:138)

[0572] 框架3(碱基对235-357)：

[0573] 235ACATAT TATGCCGATT CAGTGAAAGG CAGGTTCACC ATCTCCAGAG ATGATTCACA AAGTATGCTC TATCTGCAAA TGAACAACTT GAAAACTGAG GACACAGCCA CGTATTTCTG TGTGGGA 357 (SEQ ID NO:139)

[0574] /翻译＝“TYYADSVKGRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTATYFCVG”(SEQ ID NO:140)

[0575] CDR-H3(碱基对358-369)：

[0576] 358GCT ATGGACTAC 369(SEQ ID NO:141)

[0577] /翻译＝“AMDY”(SEQ ID NO:142)

[0578] 框架4(碱基对370-402)：

[0579] 370T GGGGTCAAGG AACCTCAGTC ACCGTCTCCT CA 402(SEQ ID NO:143)

[0580] /翻译＝“WGQGTSVTVSS”(SEQ ID NO:144)

[0581] MHC2558HC.1 499.8D2.6.8

[0582]

区域	序列片段	残基	长度
前导序列	MLLGLKWIFFVVFYQGVHC	1 - 19	19
HFR1	EVQLVETGGGLVQPKGSLKLSCAAS	20 - 44	25
CDR-H1	GFTFNTN	45 - 51	7
HFR2	VMNWVRQAPGKGLEWVGRI	52 - 70	19
CDR-H2	RTKTNNYA	71 - 78	8
HFR3	TYYADSVKGRFTISRDDSQSMLYLQMNNLKTEDTATYFCVG	79 - 119	41
CDR-H3	AMDY	120 - 123	4
HFR4	WGQGTSVTVSS	124 - 134	11

[0583] 8D2轻链可变(vL)DNA和氨基酸序列*

[0584] MHC2558LC.2;M13.499.8D2.6.8

[0585] CDR分析

[0586] ESVDNSGINF..___RAS....._____QQSYKDPPT

[0587] 呈FASTA形式的氨基酸序列(MHC2558LC.2\;M13F)

[0588] >MHC2558LC.2\;M13F.499.8D2.6.8

[0589]

```
基因座        8D2_vL        393 bp    DNA     线性
特征              位置/限定符
     J_区段       364..393
                     /标记=FWR4
     V_区段       337..363
                     /标记=CDR3
     V_区        241..336
                     /标记=FWR3
     V_区段       220..240
                     /标记=CDR2
     V_区        175..219
                     /标记=FWR2
     V_区段       130..174
                     /标记=CDR1
     V_区        61..129
                     /标记=FWR1
     信号_肽      1..60
                     /标记=LS
     CDS             1..393
                     /标记=8D2_vL

8D2_vL
/                                翻                                译
="METDTLLLWVLLLWVPGSTGDIVLTQSPASLAVSLGQRATVSCRASESVDNSGINFIHWYQ
QKPGQSPKLLLYRASNLKSGIPARFSGSGSRTDFTLTINPVETGDVATYYCQQSYKDPPTFGT
GTKLELK" (SEQ ID NO: 145)
```

[0590] 呈FASTA形式的核苷酸序列(MHC2558LC.2\;M13F)

[0591] >MHC2558LC.2\;M13F.499.8D2.6.8

[0592] 起点

1 ATGGAGACAG ACACACTCCT GCTATGGGTG CTGCTGCTCT GGGTTCCAGG TTCCACAGGT

61 GACATTGTGC TGACCCAATC TCCAGCTTCT TTGGCTGTGT CTCTGGGGCA GAGGGCCACC

121 GTCTCCTGCA GAGCCAGCGA AAGTGTTGAT AATTCTGGCA TAAATTTTAT ACACTGGTAC

[0593] 181 CAGCAGAAAC CAGGACAGTC ACCCAAACTC CTCCTCTATC GTGCATCCAA CCTAAAATCT

241 GGGATCCCTG CCAGGTTCAG TGGCAGTGGG TCTAGGACAG ACTTCACCCT CACCATTAAT

301 CCTGTGGAGA CTGGTGATGT TGCAACCTAT TACTGTCAGC AAAGTTATAA GGATCCTCCT

361 ACGTTCGGTA CTGGGACCAA GCTGGAGCTG AAG (SEQ ID NO: 146)

[0594] 信号肽(碱基对1-60)：

[0595] 1ATGGAGACAG ACACACTCCT GCTATGGGTG CTGCTGCTCT GGGTTCCAGG TTCCACAGGT

[0596] 60(SEQ ID NO:147)

[0597] /翻译＝“METDTLLLWVLLLWVPGSTG”(SEQ ID NO:148)

[0598] 框架1(碱基对61-129)：

[0599] 61GACATTGTGC TGACCCAATC TCCAGCTTCT TTGGCTGTGT CTCTGGGGCA GAGGGCCACC GTCTCCTGC 129(SEQ ID NO:149)

[0600] /翻译＝“DIVLTQSPASLAVSLGQRATVSC”(SEQ ID NO:150)

[0601] CDR-L1(碱基对130-174)：

[0602] 130A GAGCCAGCGA AAGTGTTGAT AATTCTGGCA TAAATTTTAT ACAC 174(SEQ ID NO:151)

[0603] /翻译＝“RASESVDNSGINFIH”(SEQ ID NO:152)

[0604] 框架2(碱基对175-219)：

[0605] 175CTGGTAC CAGCAGAAAC CAGGACAGTC ACCCAAACTC CTCCTCTAT 219(SEQ ID NO:153)

[0606] /翻译＝“WYQQKPGQSPKLLLY”(SEQ ID NO:154)

[0607] CDR-L2(碱基对220-240)：

[0608] 220C GTGCATCCAA CCTAAAATCT 240(SEQ ID NO:155)

[0609] /翻译＝“RASNLKS”(SEQ ID NO:156)

[0610] 框架3(碱基对241-336)：

[0611] 241GGGATCCCTG CCAGGTTCAG TGGCAGTGGG TCTAGGACAG ACTTCACCCT CACCATTAAT CCTGTGGAGA CTGGTGATGT TGCAACCTAT TACTGT 336(SEQ ID NO:157)

[0612] /翻译＝“GIPARFSGSGSRTDFTLTINPVETGDVATYYC”(SEQ ID NO:158)

[0613] CDR-L3(碱基对337-363)：

[0614] 337CAGC AAAGTTATAA GGATCCTCCT ACG 363(SEQ ID NO:159)

[0615] /翻译＝“QQSYKDPPT”(SEQ ID NO:160)

[0616] 框架4(碱基对364-393)：

[0617] 364TTCGGTA CTGGGACCAA GCTGGAGCTG AAG 393(SEQ ID NO:161)

[0618] /翻译＝“FGTGTKLELK”(SEQ ID NO:162)

[0619] MHC2558LC.2 499.8D2.6.8

[0620]

区域	序列片段	残基	长度
前导序列	METDTLLLWVLLLWVPGSTG	1 - 20	20
LFR1	DIVLTQSPASLAVSLGQRATVSC	21 - 43	23
CDR-L1	RASESVDNSGINFIH	44 - 58	15
LFR2	WYQQKPGQSPKLLLY	59 - 73	15
CDR-L2	RASNLKS	74 - 80	7

[0621]

LFR3	GIPARFSGSGSRTDFTLTINPVETGDVATYYC	81 - 112	32
CDR-L3	QQSYKDPPT	113 - 121	9
LFR4	FGTGTKLELK	122 - 131	10

[0622] 2G2重链可变(vH)DNA和氨基酸序列*

[0623] MHC2561HC.1;M13.499.5.2G2.13.3.10

[0624] CDR分析

[0625] GLTFSSYA....___ISSGGSHT..___TRLGRAFDY

[0626] 呈FASTA形式的氨基酸序列(MHC2561HC.1\;M13F)

[0627] >MHC2561HC.1\;M13F.499.5.2G2.13.3.10

基因座 2G2_vH 405 bp DNA 线性

特征 位置/限定符

J_区段 373..405

/标记=FWR4

V_区段 352..372

/标记=CDR3

V_区 229..351

/标记=FWR3

[0628]

V_区段 211..228

/标记=CDR2

V_区 154..210

/标记=FWR2

V_区段 133..153

/标记=CDR1

V_区 58..132

/标记=FWR1

信号_肽 1..57

/标记=LS

CDS 1..405

/标记=2G2_vH

[0629]

2G2_vH

/翻译

="MNFGLSLIFLVLVLKGVQCEVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAVSGLTFSSYAMSWVRQTPE

KRLEWVATISSGGSHTYYPDSVKGRFIISRDNAKNTLYLQMNSLRSEDTAMYYCTRLGRAFDY

WGQGTTLTVSS" (SEQ ID NO: 163)

[0630] 呈FASTA形式的核苷酸序列(MHC2561HC.1\;M13F)

[0631] >MHC2561HC.1\;M13F.499.5.2G2.13.3.10

[0632] 起点

1 ATGAACTTCG GGCTCAGCTT GATTTTCCTT GTCCTTGTTT TAAAAGGTGT CCAGTGTGAA

61 GTGATGCTGG TGGAGTCAGG GGGAGGCTTA GTGAAGCCTG GAGGATCCCT GAAACTCTCC

121 TGTGCAGTCT CTGGATTAAC TTTTAGTAGT TATGCCATGT CTTGGGTTCG CCAGACTCCG

[0633] 181 GAGAAGAGGC TGGAGTGGGT CGCAACCATT AGTAGTGGTG GTAGTCACAC CTACTATCCA

241 GACAGTGTGA AGGGGCGATT CATCATTTCT AGAGACAATG CCAAGAACAC CCTGTACCTG

301 CAAATGAACA GTCTGAGGTC TGAGGACACG GCCATGTATT ACTGTACAAG ACTGGGACGG

361 GCCTTTGACT ACTGGGGCCA AGGCACCACT CTCACAGTCT CCTCA (SEQ ID NO: 164)

[0634] 信号肽(碱基对1-57)：

[0635] 1ATGAACTTCG GGCTCAGCTT GATTTTCCTT GTCCTTGTTT TAAAAGGTGT CCAGTGT

[0636] 57(SEQ ID NO:165)

[0637] /翻译＝“MNFGLSLIFLVLVLKGVQC”(SEQ ID NO:166)

[0638] 框架1(碱基对58-132)：

[0639] 58GAA GTGATGCTGG TGGAGTCAGG GGGAGGCTTA GTGAAGCCTG GAGGATCCCT GAAACTCTCC TGTGCAGTCT CT 132(SEQ ID NO:167)

[0640] /翻译＝“EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAVS”(SEQ ID NO:168)

[0641] CDR-H1(碱基对133-153)：

[0642] 133GGATTAAC TTTTAGTAGT TAT 153(SEQ ID NO:169)

[0643] /翻译＝“GLTFSSY”(SEQ ID NO:170)

[0644] 框架2(碱基对154-210)：

[0645] 154GCCATGT CTTGGGTTCG CCAGACTCCG GAGAAGAGGC TGGAGTGGGT CGCAACCATT

[0646] 210(SEQ ID NO:171)

[0647] /翻译＝“AMSWVRQTPEKRLEWVATI”(SEQ ID NO:172)

[0648] CDR-H2(碱基对211-228)：

[0649] 211AGTAGTGGTG GTAGTCAC 228(SEQ ID NO:173)

[0650] /翻译＝“SSGGSH”(SEQ ID NO:174)

[0651] 框架3(碱基对229-351)：

[0652] 229AC CTACTATCCA GACAGTGTGA AGGGGCGATT CATCATTTCT AGAGACAATG CCAAGAACAC CCTGTACCTG CAAATGAACA GTCTGAGGTC TGAGGACACG GCCATGTATT ACTGTACAAG A 351(SEQ ID NO:175)

[0653] /翻译＝“TYYPDSVKGRFIISRDNAKNTLYLQMNSLRSEDTAMYYCTR”(SEQ ID NO:176)

[0654] CDR-H3(碱基对352-372)：

[0655] 352CTGGGACGG GCCTTTGACT AC 372(SEQ ID NO:177)

[0656] /翻译＝“LGRAFDY”(SEQ ID NO:178)

[0657] 框架4(碱基对373-405)：

[0658] 373TGGGGCCA AGGCACCACT CTCACAGTCT CCTCA 405(SEQ ID NO:179)

[0659] /翻译＝“WGQGTTLTVSS”(SEQ ID NO:180)

[0660] MHC2561HC.1 499.5.2G2.13.3.10

[0661]

区域	序列片段	残基	长度
前导序列	MNFGLSLIFLVLVLKGVQC	1 - 19	19
HFR1	EVMLVESGGGLVKPGGSLKLSCAVS	20 - 44	25
CDR-H1	GLTFSSY	45 - 51	7
HFR2	AMSWVRQTPEKRLEWVATI	52 - 70	19
CDR-H2	SSGGSH	71 - 76	6
HFR3	TYYPDSVKGRFIISRDNAKNTLYLQMNSLRSEDTAMYY CTR	77 - 117	41
CDR-H3	LGRAFDY	118 - 124	7
HFR4	WGQGTTLTVSS	125 - 135	11

[0662] 2G2轻链可变(vL)DNA和氨基酸序列*

[0663] MHC2561LC.1;M13.499.5.2G2.13.3.10

[0664] CDR分析

[0665] QDVSTA....___WAS....___QQDYSTPWT

[0666] 呈FASTA形式的氨基酸序列(MHC2561LC.1\;M13F)

[0667] >MHC2561LC.1\;M13F.499.5.2G2.13.3.10

[0668]

基因座 2G2_vL 381 bp DNA 线性

特征 位置/限定符

J_区段 352..381

/标记=FWR4

[0669]

```
V_区段      325..351
                /标记=CDR3
V_区        229..324
                /标记=FWR3
V_区段      208..228
                /标记=CDR2
V_区        163..207
                /标记=FWR2
V_区段      130..162
                /标记=CDR1
V_区        61..129
                /标记=FWR1
信号_肽     1..60
                /标记=LS
CDS             1..381
                /标记=2G2_vL
```

2G2_vL

/ 翻 译

="MESQIQVFVFVFLWLSGVDGDIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSTAVAWYQQKPG QSPKVLIYWASTRHTGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLALYYCQQDYSTPWTFGGGTKL EIK”（SEQ ID NO: 181）

[0670] 呈FASTA形式的核苷酸序列(MHC2561LC.1\;M13F)

[0671] >MHC2561LC.1\;M13F.499.5.2G2.13.3.10

[0672] 起点

[0673]

```
  1  ATGGAGTCAC  AGATTCAGGT  CTTTGTATTC  GTGTTTCTCT  GGTTGTCTGG
TGTTGACGGA
 61  GACATTGTGA  TGACCCAGTC  TCACAAATTC  ATGTCCACAT  CAGTAGGAGA
CAGGGTCAGC
```

121 ATCACCTGCA AGGCCAGTCA GGATGTGAGT ACTGCTGTAG CCTGGTATCA ACAAAAGCCA

181 GGGCAATCTC CTAAAGTTCT GATTTACTGG GCATCCACCC GGCACACTGG AGTCCCTGAT

[0674] 241 CGCTTCACAG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTTACTCTCA CCATCAGCAG TGTGCAGGCT

301 GAAGACCTGG CACTTTATTA CTGTCAGCAA GATTATAGCA CTCCGTGGAC GTTCGGTGGA

361 GGCACCAAGC TGGAAATCAA A (SEQ ID NO: 182)

[0675] 信号肽(碱基对1-60)：

[0676] 1ATGGAGTCAC AGATTCAGGT CTTTGTATTC GTGTTTCTCT GGTTGTCTGG TGTTGACGGA

[0677] 60(SEQ ID NO:183)

[0678] /翻译＝“MESQIQVFVFVFLWLSGVDG”(SEQ ID NO:184)

[0679] 框架1(碱基对61-129)：

[0680] 61GACATTGTGA TGACCCAGTC TCACAAATTC ATGTCCACAT CAGTAGGAGA CAGGGTCAGC ATCACCTGC 129(SEQ ID NO:185)

[0681] /翻译＝“DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC”(SEQ ID NO:186)

[0682] CDR-L1(碱基对130-162)：

[0683] 130A AGGCCAGTCA GGATGTGAGT ACTGCTGTAG CC 162(SEQ ID NO:187)

[0684] /翻译＝“KASQDVSTAVA”(SEQ ID NO:188)

[0685] 框架2(碱基对163-207)：

[0686] 163TGGTATCA ACAAAAGCCA GGGCAATCTC CTAAAGTTCT GATTTAC 207(SEQ ID NO:189)

[0687] /翻译＝“WYQQKPGQSPKVLIY”(SEQ ID NO:190)

[0688] CDR-L2(碱基对208-228)：

[0689] 208TGG GCATCCACCC GGCACACT 228(SEQ ID NO:191)

[0690] /翻译＝“WASTRHT”(SEQ ID NO:192)

[0691] 框架3(碱基对229-324)：

[0692] 229GG AGTCCCTGAT CGCTTCACAG GCAGTGGATC TGGGACAGAT TTTACTCTCA CCATCAGCAG TGTGCAGGCT GAAGACCTGG CACTTTATTA CTGT 324(SEQ ID NO:193)

[0693] /翻译＝“GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLALYYC”(SEQ ID NO:194)

[0694] CDR-L3(碱基对325-351)：

[0695] 325CAGCAA GATTATAGCA CTCCGTGGAC G 351(SEQ ID NO:195)

[0696] /翻译＝“QQDYSTPWT”(SEQ ID NO:196)

[0697] 框架4(碱基对352-381)：

[0698] 352TTCGGTGGA GGCACCAAGC TGGAAATCAA A 381(SEQ ID NO:197)

[0699] /翻译＝“FGGGTKLEIK”(SEQ ID NO:198)

[0700] MHC2561LC.1 499.5.2G2.13.3.10

[0701]

区域	序列片段	残基	长度
前导序列	MESQIQVFVFVFLWLSGVDG	1-20	20
LFR1	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITC	21-43	23
CDR-L1	KASQDVSTAVA	44-54	11
LFR2	WYQQKPGQSPKVLIY	55-69	15
CDR-L2	WASTRHT	70-76	7
LFR3	GVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQAEDLALYYC	77-108	32
CDR-L3	QQDYSTPWT	109-117	9
LFR4	FGGGTKLEIK	118-127	10

[0702] 2C4重链可变(vH)DNA和氨基酸序列*

[0703] MHC2562HC.1;M13.499.5.2C4.E6.6.8.1

[0704] CDR分析

[0705] GFSFTDYN....___IDPYYGRI..___ATGAYTSGYSWFAY

[0706] 呈FASTA形式的氨基酸序列(MHC2562HC.1\;M13F)

[0707] >MHC2562HC.1\;M13F.499.5.2C4.E6.6.8.1

[0708]

基因座 2C4_vH 420 bp DNA 线性

特征 位置/限定符

J_区段 388..420
/标记=FWR4

V_区段 352..387
/标记=CDR3

V_区 229..351
/标记=FWR3

V_区段 211..228
/标记=CDR2

V_区 154..210
/标记=FWR2

V_区段 133..153
/标记=CDR1

V_区 58..132
/标记=FWR1

信号_肽 1..57
/标记=LS

CDS 1..420
/标记=2C4_vH

[0709]

2C4_vH

/翻译

="MGWTWIFILILSVTTGVHSEVHLQQSGPELEKPGVSVKISCKASGFSFTDYNMNWVKQSSG
KSLEWIGNIDPYYGRINYNQKFKGKATLSVDKSSSTAYMHLKSLTSEDSAVYYCATGAYTSGY
SWFAYWGQGTLVTVSA" (SEQ ID NO: 199)

[0710] 呈FASTA形式的核苷酸序列(MHC2562HC.1\;M13F)

[0711] >MHC2562HC.1\;M13F.499.5.2C4.E6.6.8.1

[0712] 起点

[0713] 1 ATGGGATGGA CCTGGATCTT TATTTTAATC CTGTCAGTAA CTACAGGTGT CCACTCTGAG

61 GTCCACCTGC AGCAGTCTGG ACCTGAGCTG GAGAAGCCTG GCGTTTCAGT GAAGATATCC

121 TGCAAGGCTT CTGGTTTCTC ATTCACTGAC TACAACATGA ACTGGGTGAA ACAGAGCAGT

181 GGAAAGAGCC TTGAGTGGAT TGGAAATATT GATCCTTACT ATGGACGTAT TAACTATAAC

241 CAGAAATTCA AGGGCAAGGC CACATTGAGT GTAGACAAAT CCTCCAGCAC AGCCTACATG

301 CACCTCAAGA GCCTGACATC TGAGGACTCT GCAGTCTATT ACTGTGCAAC TGGGGCCTAC

361 ACCTCGGGCT ACTCCTGGTT TGCTTACTGG GGCCAAGGGA CTCTGGTCAC TGTCTCTGCA (SEQ ID NO: 200)

[0714] 信号肽(碱基对1-57)：

[0715] 1ATGGGATGGA CCTGGATCTT TATTTTAATC CTGTCAGTAA CTACAGGTGT CCACTCT

[0716] 57(SEQ ID NO:201)

[0717] /翻译＝“MGWTWIFILILSVTTGVHS”(SEQ ID NO:202)

[0718] 框架1(碱基对58-132)：

[0719] 58GAG GTCCACCTGC AGCAGTCTGG ACCTGAGCTG GAGAAGCCTG GCGTTTCAGT GAAGATATCC TGCAAGGCTT CT 132(SEQ ID NO:203)

[0720] /翻译＝“EVHLQQSGPELEKPGVSVKISCKAS”(SEQ ID NO:204)

[0721] CDR-H1(碱基对133-153)：

[0722] 133GGTTTCTC ATTCACTGAC TAC 153(SEQ ID NO:205)

[0723] /翻译＝“GFSFTDY”(SEQ ID NO:206)

[0724] 框架2(碱基对154-210)：

[0725] 154AACATGA ACTGGGTGAA ACAGAGCAGT GGAAAGAGCC TTGAGTGGAT TGGAAATATT

[0726] 210(SEQ ID NO:207)

[0727] /翻译＝“NMNWVKQSSGKSLEWIGNI”(SEQ ID NO:208)

[0728] CDR-H2(碱基对211-228)：

[0729] 211GATCCTTACT ATGGACGT 228(SEQ ID NO:209)

[0730] /翻译＝“DPYYGR”(SEQ ID NO:210)

[0731] 框架3(碱基对229-351)：

[0732] 229AT TAACTATAAC CAGAAATTCA AGGGCAAGGC CACATTGAGT GTAGACAAAT CCTCCAGCAC AGCCTACATG CACCTCAAGA GCCTGACATC TGAGGACTCT GCAGTCTATT ACTGTGCAAC T 351(SEQ ID NO:211)

[0733] /翻译＝“INYNQKFKGKATLSVDKSSSTAYMHLKSLTSEDSAVYYCAT”(SEQ ID NO:212)

[0734] CDR-H3(碱基对352-387)：

[0735] 352GGGGCCTAC ACCTCGGGCT ACTCCTGGTT TGCTTAC 387(SEQ ID NO:213)

[0736] /翻译＝“GAYTSGYSWFAY”(SEQ ID NO:214)

[0737] 框架4(碱基对388-420)：

[0738] 388TGG GGCCAAGGGA CTCTGGTCAC TGTCTCTGCA 420(SEQ ID NO:215)

[0739] /翻译＝“WGQGTLVTVSA”(SEQ ID NO:216)

[0740] MHC2562HC.1 499.5.2C4.E6.6.8.1

[0741]

区域	序列片段	残基	长度
前导序列	MGWTWIFILILSVTTGVHS	1 - 19	19
HFR1	EVHLQQSGPELEKPGVSVKISCKAS	20 - 44	25
CDR-H1	GFSFTDY	45 - 51	7
HFR2	NMNWVKQSSGKSLEWIGNI	52 - 70	19
CDR-H2	DPYYGR	71 - 76	6
HFR3	INYNQKFKGKATLSVDKSSSTAYMHLKSLTSEDSAVYY CAT	77 - 117	41
CDR-H3	GAYTSGYSWFAY	118 - 129	12
HFR4	WGQGTLVTVSA	130 - 140	11

[0743] 2C4轻链可变(vL)DNA和氨基酸序列*

[0744] MHC2562LC.2;M13.499.5.2C4.E6.6.8.1

[0745] CDR分析

[0746] SSVSSSY.....___RTS.....___QQWSGYPFT

[0747] 呈FASTA形式的氨基酸序列(MHC2562LC.2\;M13F)

[0748] >MHC2562LC.2\;M13F.499.5.2C4.E6.6.8.1

基因座 2C4_vL 390 bp DNA 线性

特征 位置/限定符

J_区段 361..390
/标记=FWR4

V_区段 334..360
/标记=CDR3

[0749]

V_区 238..333
/标记=FWR3

V_区段 217..237
/标记=CDR2

V_区 172..216
/标记=FWR2

V_区段 136..171
/标记=CDR1

V_区 67..135
/标记=FWR1

信号_肽 1..66
/标记=LS

CDS 1..390

[0750]

/标记=2C4_vL

2C4_vL

/翻译

="MGLQVQVISFLLISVTVIMSRGENVLTQSPGIMAASLGEKVTMTCSASSSVSSSYLHWYQQ
RSGASPKPLIHRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSVEAEDDATYYCQQWSGYPFTFGSG
TKLEIK" (SEQ ID NO: 217)

[0751] 呈FASTA形式的核苷酸序列(MHC2562LC.2\;M13F)

[0752] >MHC2562LC.2\;M13F.499.5.2C4.E6.6.8.1

[0753] 起点

[0754]
1 ATGGGTTTAC AGGTGCAGGT TATCAGCTTC CTGTTAATCA GTGTCACAGT CATAATGTCC

61 AGAGGAGAAA ATGTGCTCAC CCAGTCTCCA GGAATAATGG CTGCCTCTCT GGGGGAGAAG

121 GTCACCATGA CCTGCAGTGC CAGCTCAAGT GTAAGTTCCA GTTACTTGCA CTGGTACCAG

181 CAGAGGTCAG GCGCTTCCCC CAAACCCTTG ATTCATAGGA CATCCAACCT GGCTTCTGGT

241 GTCCCAGCTC GCTTCAGTGG CAGTGGGTCT GGGACCTCTT ACTCTCTCAC AATCAGCAGC

301 GTGGAGGCTG AAGATGATGC AACTTATTAC TGCCAGCAGT GGAGTGGTTA CCCATTCACG

[0755] 361 TTCGGCTCGG GGACAAAGTT GGAAATAAAA (SEQ ID NO: 218)

[0756] 信号肽(碱基对1-66)：

[0757] 1ATGGGTTTAC AGGTGCAGGT TATCAGCTTC CTGTTAATCA GTGTCACAGT CATAATGTCC AGAGGA 66(SEQ ID NO:219)

[0758] /翻译＝“MGLQVQVISFLLISVTVIMSRG”(SEQ ID NO:220)

[0759] 框架1(碱基对67-135)：

[0760] 67GAAA ATGTGCTCAC CCAGTCTCCA GGAATAATGG CTGCCTCTCT GGGGGAGAAG GTCACCATGA CCTGC 135(SEQ ID NO:221)

[0761] /翻译＝“ENVLTQSPGIMAASLGEKVTMTC”(SEQ ID NO:222)

[0762] CDR-L1(碱基对136-171)：

[0763] 136AGTGC CAGCTCAAGT GTAAGTTCCA GTTACTTGCA C 171(SEQ ID NO:223)

[0764] /翻译＝“SASSSVSSSYLH”(SEQ ID NO:224)

[0765] 框架2(碱基对172-216)：

[0766] 172TGGTACCAG CAGAGGTCAG GCGCTTCCCC CAAACCCTTG ATTCAT 216(SEQ ID NO:225)

[0767] /翻译＝“WYQQRSGASPKPLIH”(SEQ ID NO:226)

[0768] CDR-L2(碱基对217-237)：

[0769] 217AGGA CATCCAACCT GGCTTCT 237(SEQ ID NO:227)

[0770] /翻译＝“RTSNLAS”(SEQ ID NO:228)

[0771] 框架3(碱基对238-333)：

[0772] 238GGT GTCCCAGCTC GCTTCAGTGG CAGTGGGTCT GGGACCTCTT ACTCTCTCAC AATCAGCAGC GTGGAGGCTG AAGATGATGC AACTTATTAC TGC 333(SEQ ID NO:229)

[0773] /翻译＝“GVPARFSGSGSGTSYSLTISSVEAEDDATYYC”(SEQ ID NO:230)

[0774] CDR-L3(碱基对334-360)：

[0775] 334CAGCAGT GGAGTGGTTA CCCATTCACG 360(SEQ ID NO:231)

[0776] /翻译＝“QQWSGYPFT”(SEQ ID NO:232)

[0777] 框架4(碱基对361-390):

[0778] 361TTCGGCTCGG GGACAAAGTT GGAAATAAAA 390(SEQ ID NO:233)

[0779] /翻译＝“FGSGTKLEIK”(SEQ ID NO:234)

[0780] MHC2562LC.2 499.5.2C4.E6.6.8.1

[0781]

区域	序列片段	残基	长度
前导序列	MGLQVQVISFLLISVTVIMSRG	1-22	22
LFR1	ENVLTQSPGIMAASLGEKVTMTC	23-45	23
CDR-L1	SASSSVSSSYLH	46-57	12
LFR2	WYQQRSGASPKPLIH	58-72	15
CDR-L2	RTSNLAS	73-79	7
LFR3	GVPARFSGSGSGTSYSLTISSVEAEDDATYYC	80-111	32
CDR-L3	QQWSGYPFT	112-120	9
LFR4	FGSGTKLEIK	121-130	10

[0782] 4D1重链可变(vH)DNA和氨基酸序列*

[0783] MHC2563HC.1;M13.499.5.4D1.5.16

[0784] CDR分析

[0785] GYTFTDYA....___ISTYYGDT..___ARGNYDDWYFNV

[0786] 呈FASTA形式的氨基酸序列(MHC2563HC.1\;M13F)

[0787] >MHC2563HC.1\;M13F.499.5.4D1.5.16

基因座 4D1_vH 414 bp DNA 线性

[0788] 特征 位置/限定符

J_区段 382..414

/标记=FWR4

V_区段 352..381

/标记=CDR3

V_区 229..351

/标记=FWR3

V_区段 211..228

/标记=CDR2

V_区 154..210

/标记=FWR2

V_区段 133..153

/标记=CDR1

[0789] V_区 58..132

/标记=FWR1

信号_肽 1..57

/标记=LS

CDS 1..414

/标记=4D1_vH

4D1_vH

/翻译

="MDWSCIIFFLVATATGVHSQVQLQQSGAELVRPGVSVKISCKGSGYTFTDYAMHWVKQSHA KSLEWIGSISTYYGDTNYNQKFKGKATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAIYYCARGNYDDWY FNVWGAGTTVTVSS” (SEQ ID NO: 235)

[0790] 呈FASTA形式的核苷酸序列(MHC2563HC.1\;M13F)

[0791] >MHC2563HC.1\;M13F.499.5.4D1.5.16

[0792] 起点

1 ATGGATTGGA GCTGTATCAT CTTCTTTCTG GTAGCAACAG CTACAGGTGT

[0793] GCACTCCCAG

61 GTCCAGCTGC AGCAGTCTGG GGCTGAACTG GTGAGGCCTG GGGTCTCAGT

GAAGATTTCC

121 TGCAAGGGTT CTGGCTACAC ATTCACTGAT TATGCTATGC ACTGGGTGAA GCAGAGTCAT

181 GCAAAGAGTC TAGAGTGGAT TGGAAGTATT AGTACTTACT ATGGTGATAC TAATTACAAC

[0794] 241 CAGAAATTCA AGGGCAAGGC CACAATGACT GTAGACAAAT CCTCCAGCAC AGCCTATATG

301 GAACTTGCCA GACTGACATC TGAGGATTCT GCCATCTATT ACTGTGCAAG AGGTAATTAC

361 GACGACTGGT ACTTCAATGT CTGGGGCGCA GGGACCACGG TCACCGTCTC CTCA (SEQ ID NO: 236)

[0795] 信号肽(碱基对1-57)：

[0796] 1ATGGATTGGA GCTGTATCAT CTTCTTTCTG GTAGCAACAG CTACAGGTGT GCACTCC57(SEQ ID NO:237)

[0797] /翻译＝“MDWSCIIFFLVATATGVHS”(SEQ ID NO:238)

[0798] 框架1(碱基对58-132)：

[0799] 58CAG GTCCAGCTGC AGCAGTCTGG GGCTGAACTG GTGAGGCCTG GGGTCTCAGT GAAGATTTCC TGCAAGGGTT CT 132(SEQ ID NO:239)

[0800] /翻译＝“QVQLQQSGAELVRPGVSVKISCKGS”(SEQ ID NO:240)

[0801] CDR-H1(碱基对133-153)：

[0802] 133GGCTACAC ATTCACTGAT TAT 153(SEQ ID NO:241)

[0803] /翻译＝“GYTFTDY”(SEQ ID NO:242)

[0804] 框架2(碱基对154-210)：

[0805] 154GCTATGC ACTGGGTGAA GCAGAGTCAT GCAAAGAGTC TAGAGTGGAT TGGAAGTATT

[0806] 210(SEQ ID NO:243)

[0807] /翻译＝“AMHWVKQSHAKSLEWIGSI”(SEQ ID NO:244)

[0808] CDR-H2(碱基对211-228)：

[0809] 211AGTACTTACT ATGGTGAT 228(SEQ ID NO:245)

[0810] /翻译＝“STYYGD”(SEQ ID NO:246)

[0811] 框架3(碱基对229-351)：

[0812] 229AC TAATTACAAC CAGAAATTCA AGGGCAAGGC CACAATGACT GTAGACAAAT CCTCCAGCAC AGCCTATATG GAACTTGCCA GACTGACATC TGAGGATTCT GCCATCTATT ACTGTGCAAG A 351(SEQ ID NO:247)

[0813] /翻译＝“TNYNQKFKGKATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAIYYCAR”(SEQ ID NO:248)

[0814] CDR-H3(碱基对352-381)：

[0815] 352GGTAATTAC GACGACTGGT ACTTCAATGT C 381(SEQ ID NO:249)

[0816] /翻译＝“GNYDDWYFNV”(SEQ ID NO:250)

[0817] 框架4(碱基对382-414):

[0818] 382TGGGGCGCA GGGACCACGG TCACCGTCTC CTCA 414(SEQ ID NO:251)

[0819] /翻译＝“WGAGTTVTVSS”(SEQ ID NO:252)

[0820] MHC2563HC.1 499.5.4D1.5.16

[0821]

区域	序列片段	残基	长度
前导序列	MDWSCIIFFLVATATGVHS	1 - 19	19
HFR1	QVQLQQSGAELVRPGVSVKISCKGS	20 - 44	25
CDR-H1	GYTFTDY	45 - 51	7
HFR2	AMHWVKQSHAKSLEWIGSI	52 - 70	19
CDR-H2	STYYGD	71 - 76	6
HFR3	TNYNQKFKGKATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAIYYCAR	77 - 117	41
CDR-H3	GNYDDWYFNV	118 - 127	10
HFR4	WGAGTTVTVSS	128 - 138	11

[0822] 4D1轻链可变(vL)DNA和氨基酸序列*

[0823] MHC2563LC.1;M13.499.5.4D1.5.16

[0824] CDR分析

[0825] QDISGY.....___STS.....___LQYASSPYT

[0826] 呈FASTA形式的氨基酸序列(MHC2563LC.1\;M13F)

[0827] >MHC2563LC.1\;M13F.499.5.4D1.5.16

基因座 4D1_vL 381 bp DNA 线性

特征 位置/限定符

J_区段 352..381
/标记=FWR4

V_区段 325..351
/标记=CDR3

V_区 229..324
/标记=FWR3

V_区段 208..228
/标记=CDR2

[0828]

V_区 163..207
/标记=FWR2

V_区段 130..162
/标记=CDR1

V_区 61..129
/标记=FWR1

信号_肽 1..60
/标记=LS

CDS 1..381
/标记=4D1_vL

4D1_vL

/ 翻 译

[0829] ="MRIPAHVFGFLLLWFPGARCDIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDISGYLSWLQQKPD GTIKRLIYSTSTLDSGVPKRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDFADYYCLQYASSPYTFGGGAKL EIKR" (SEQ ID NO: 253)

[0830] 呈FASTA形式的核苷酸序列(MHC2563LC.1\;M13F)

[0831] >MHC2563LC.1\;M13F.499.5.4D1.5.16

[0832] 起点

1 ATGAGGATTC CTGCTCACGT TTTTGGCTTC TTGTTGCTCT GGTTTCCAGG TGCCAGATGT

61 GACATCCAAA TGACCCAGTC TCCATCTTCC TTATCTGCCT CTCTGGGAGA AAGAGTCAGT

121 CTCACTTGTC GGGCAAGTCA GGATATTAGT GGTTACTTAA GCTGGCTTCA GCAGAAACCA

[0833] 181 GATGGAACTA TTAAACGTCT GATTTATAGC ACATCCACTT TAGATTCTGG TGTCCCAAAA

241 AGGTTCAGTG GCAGTAGGTC TGGGTCAGAT TATTCTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGTCT

301 GAAGATTTTG CAGACTATTA CTGTCTACAA TATGCTAGTT CTCCGTACAC GTTCGGAGGG

361 GGGGCCAAGC TGGAAATAAA A (SEQ ID NO: 254)

[0834] 信号肽(碱基对1-60)：

[0835] 1ATGAGGATTC CTGCTCACGT TTTTGGCTTC TTGTTGCTCT GGTTTCCAGG TGCCAGATGT

[0836] 60(SEQ ID NO:255)

[0837] /翻译＝“MRIPAHVFGFLLLWFPGARC”(SEQ ID NO:256)

[0838] 框架1(碱基对61-129)：

[0839] 61GACATCCAAA TGACCCAGTC TCCATCTTCC TTATCTGCCT CTCTGGGAGA AAGAGTCAGT CTCACTTGT 129(SEQ ID NO:257)

[0840] /翻译＝“DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTC”(SEQ ID NO:258)

[0841] CDR-L1(碱基对130-162)：

[0842] 130C GGGCAAGTCA GGATATTAGT GGTTACTTAA GC 162(SEQ ID NO:259)

[0843] /翻译＝“RASQDISGYLS”(SEQ ID NO:260)

[0844] 框架2(碱基对163-207)：

[0845] 163TGGCTTCA GCAGAAACCA GATGGAACTA TTAAACGTCT GATTTAT 207(SEQ ID NO:261)

[0846] /翻译＝“WLQQKPDGTIKRLIY”(SEQ ID NO:262)

[0847] CDR-L2(碱基对208-228)：

[0848] 208AGC ACATCCACTT TAGATTCT 228(SEQ ID NO:263)

[0849] /翻译＝“STSTLDS”(SEQ ID NO:264)

[0850] 框架3(碱基对229-324)：

[0851] 229GG TGTCCCAAAA AGGTTCAGTG GCAGTAGGTC TGGGTCAGAT TATTCTCTCA CCATCAGCAG CCTAGAGTCT GAAGATTTTG CAGACTATTA CTGT 324(SEQ ID NO:265)

[0852] /翻译＝“GVPKRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDFADYYC”(SEQ ID NO:266)

[0853] CDR-L3(碱基对325-351)：

[0854] 325CTACAA TATGCTAGTT CTCCGTACAC G 351(SEQ ID NO:267)

[0855] /翻译＝“LQYASSPYT”(SEQ ID NO:268)

[0856] 框架4(碱基对352-381):

[0857] 352TTCGGAGGG GGGGCCAAGC TGGAAATAAA A 381(SEQ ID NO:269)

[0858] /翻译＝“FGGGAKLEIK”(SEQ ID NO:270)

[0859] MHC2563LC.1 499.5.4D1.5.16

[0860]

区域	序列片段	残基	长度
前导序列	MRIPAHVFGFLLLWFPGARC	1-20	20
LFR1	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTC	21-43	23
CDR-L1	RASQDISGYLS	44-54	11
LFR2	WLQQKPDGTIKRLIY	55-69	15
CDR-L2	STSTLDS	70-76	7
LFR3	GVPKRFSGSRSGSDYSLTISSLESEDFADYYC	77-108	32
CDR-L3	LQYASSPYT	109-117	9
LFR4	FGGGAKLEIK	118-127	10

[0861] 1C8重链可变(vH)DNA和氨基酸序列*

[0862] MHC2564HC.1;M13.499.5.1C8.9.12.2

[0863] CDR分析

[0864] GFNIKDTY....___IDPANGKT..___AWLLPYYFDY

[0865] 呈FASTA形式的氨基酸序列(MHC2564HC.1\;M13F)

[0866] >MHC2564HC.1\;M13F.499.5.1C8.9.12.2

[0867]
```
基因座        1C8_vH          408 bp    DNA     线性
特征                位置/限定符
     J_区段          376..408
                       /标记=FWR4
     V_区段          352..375
                       /标记=CDR3
     V_区          229..351
                       /标记=FWR3
     V_区段          211..228
                       /标记=CDR2
     V_区          154..210
```

/标记=FWR2

V_区段 133..153

/标记=CDR1

V_区 58..132

/标记=FWR1

信号_肽 1..57

/标记=LS

[0868] CDS 1..408

/标记=1C8_vH

1C8_vH

/翻译

="MKCSWIIFFLMAVVTGVNSEVQLQQSGAELVQPGASVKLSCTASGFNIKDTYMHWVKQRPE QGLEWIGRIDPANGKTIFDPKFQVKATITADTSSNTVYLHLSSLTSEDTAIYYCAWLLPYYFD YWGQGTTLTVSS" (SEQ ID NO: 271)

[0869] 呈FASTA形式的核苷酸序列(MHC2564HC.1\;M13F)

[0870] >MHC2564HC.1\;M13F.499.5.1C8.9.12.2

[0871] 起点

1 ATGAAATGCA GCTGGATTAT CTTCTTCCTG ATGGCTGTGG TTACAGGGGT CAATTCAGAG

61 GTTCAGCTGC AGCAGTCTGG GGCAGAACTT GTGCAGCCAG GGGCCTCAGT CAAGTTGTCC

121 TGTACAGCTT CTGGCTTCAA TATTAAAGAC ACCTATATGC ACTGGGTAAA

[0872] ACAGAGGCCT

181 GAACAGGGCC TGGAGTGGAT TGGAAGGATT GATCCTGCGA ATGGTAAAAC TATTTTTGAC

241 CCGAAGTTCC AGGTCAAGGC CACTATAACT GCCGACACAT CCTCCAACAC AGTCTACCTG

301 CATCTCAGCA GCCTGACATC TGAGGACACT GCCATCTATT ACTGTGCTTG GTTACTTCCT

[0873] 361 TACTACTTTG ACTACTGGGG CCAAGGCACC ACTCTCACAG TCTCCTCA (SEQ ID NO: 272)

[0874] 信号肽(碱基对1-57):

[0875] 1ATGAAATGCA GCTGGATTAT CTTCTTCCTG ATGGCTGTGG TTACAGGGGT CAATTCA57(SEQ

ID NO:273)

[0876] /翻译＝“MKCSWIIFFLMAVVTGVNS”(SEQ ID NO:274)

[0877] 框架1(碱基对58-132)：

[0878] 58GAG GTTCAGCTGC AGCAGTCTGG GGCAGAACTT GTGCAGCCAG GGGCCTCAGT CAAGTTGTCC TGTACAGCTT CT 132(SEQ ID NO:275)

[0879] /翻译＝“EVQLQQSGAELVQPGASVKLSCTAS”(SEQ ID NO:276)

[0880] CDR-H1(碱基对133-153)：

[0881] 133GGCTTCAA TATTAAAGAC ACC 153(SEQ ID NO:277)

[0882] /翻译＝“GFNIKDT”(SEQ ID NO:278)

[0883] 框架2(碱基对154-210)：

[0884] 154TATATGC ACTGGGTAAA ACAGAGGCCT GAACAGGGCC TGGAGTGGAT TGGAAGGATT

[0885] 210(SEQ ID NO:279)

[0886] /翻译＝“YMHWVKQRPEQGLEWIGRI”(SEQ ID NO:280)

[0887] CDR-H2(碱基对211-228)：

[0888] 211GATCCTGCGA ATGGTAAA 228(SEQ ID NO:281)

[0889] /翻译＝“DPANGK”(SEQ ID NO:282)

[0890] 框架3(碱基对229-351)：

[0891] 229AC TATTTTTGAC CCGAAGTTCC AGGTCAAGGC CACTATAACT GCCGACACAT CCTCCAACAC AGTCTACCTG CATCTCAGCA GCCTGACATC TGAGGACACT GCCATCTATT ACTGTGCTTG G 351(SEQ ID NO:283)

[0892] /翻译＝“TIFDPKFQVKATITADTSSNTVYLHLSSLTSEDTAIYYCAW”(SEQ ID NO:284)

[0893] CDR-H3(碱基对352-375)：

[0894] 352TTACTTCCT TACTACTTTG ACTAC 375(SEQ ID NO:285)

[0895] /翻译＝“LLPYYFDY”(SEQ ID NO:286)

[0896] 框架4(碱基对376-408)：

[0897] 376TGGGG CCAAGGCACC ACTCTCACAG TCTCCTCA 408(SEQ ID NO:287)

[0898] /翻译＝“WGQGTTLTVSS”(SEQ ID NO:288)

[0899] MHC2564HC.1 499.5.1C8.9.12.2

[0900]

区域	序列片段	残基	长度
前导序列	MKCSWIIFFLMAVVTGVNS	1 - 19	19
HFR1	EVQLQQSGAELVQPGASVKLSCTAS	20 - 44	25
CDR-H1	GFNIKDT	45 - 51	7
HFR2	YMHWVKQRPEQGLEWIGRI	52 - 70	19
CDR-H2	DPANGK	71 - 76	6
HFR3	TIFDPKFQVKATITADTSSNTVYLHLSSLTSEDTAIYYC AW	77 - 117	41
CDR-H3	LLPYYFDY	118 - 125	8
HFR4	WGQGTTLTVSS	126 - 136	11

[0901] 1C8轻链可变(vL)DNA和氨基酸序列*

[0902] MHC2564LCB.4;M13.499.5.1C8.9.12.2

[0903] CDR分析

[0904] SSISSSN.....___GTS.....___QKWSHYPLT

[0905] 呈FASTA形式的氨基酸序列(MHC2564LCB.4\;M13F)

[0906] >MHC2564LCB.4\;M13F.499.5.1C8.9.12.2

[0907]

基因座	1C8_vL	390 bp	DNA	线性
特征	位置/限定符			
J_区段	361..390			
	/标记=FWR4			
V_区段	334..360			
	/标记=CDR3			
V_区	238..333			
	/标记=FWR3			
V_区段	217..237			
	/标记=CDR2			
V_区	172..216			
	/标记=FWR2			
V_区段	136..171			
	/标记=CDR1			
V_区	67..135			
	/标记=FWR1			
信号_肽	1..66			
	/标记=LS			
CDS	1..390			
	/标记=1C8_vL			

1C8_vL

/ 翻 译

="MDFHVQIFSFMLISVTVMLSSGEIVLTQSPAVMAASPGEKVTITCSVSSSISSSNLHWYQQ KSGTSPKLWIYGTSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQKWSHYPLTFGAG TKLELK" (SEQ ID NO: 289)

[0908] 呈FASTA形式的核苷酸序列(MHC2564LCB.4\;M13F)

[0909] >MHC2564LCB.4\;M13F.499.5.1C8.9.12.2

[0910] 起点

1 ATGGATTTTC ATGTGCAGAT TTTCAGCTTC ATGCTAATCA GTGTCACAGT CATGTTGTCC

61 AGTGGGGAAA TTGTACTCAC CCAGTCTCCA GCAGTCATGG CTGCATCTCC AGGGGAGAAG

121 GTCACCATCA CCTGCAGCGT CAGTTCAAGT ATAAGTTCCA GCAACTTGCA CTGGTACCAG

[0911] 181 CAGAAGTCAG GAACCTCGCC CAAACTCTGG ATTTATGGCA CATCCAACCT GGCTTCTGGA

241 GTCCCTGTTC GCTTCAGTGG CAGTGGATCT GGGACCTCTT ATTCTCTCAC AATCAGCAGC

301 ATGGAGGCTG AAGATGCTGC CACTTATTAC TGTCAAAAGT GGAGTCATTA CCCGCTCACG

361 TTCGGTGCTG GGACCAAGCT GGAGCTGAAA (SEQ ID NO: 290)

[0912] 信号肽(碱基对1-66)：

[0913] 1ATGGATTTTC ATGTGCAGAT TTTCAGCTTC ATGCTAATCA GTGTCACAGT CATGTTGTCC AGTGGG 66(SEQ ID NO:291)

[0914] /翻译＝“MDFHVQIFSFMLISVTVMLSSG”(SEQ ID NO:292)

[0915] 框架1(碱基对67-135)：

[0916] 67GAAA TTGTACTCAC CCAGTCTCCA GCAGTCATGG CTGCATCTCC AGGGGAGAAG GTCACCATCA CCTGC 135(SEQ ID NO:293)

[0917] /翻译＝“EIVLTQSPAVMAASPGEKVTITC”(SEQ ID NO:294)

[0918] CDR-L1(碱基对136-171)：

[0919] 136AGCGT CAGTTCAAGT ATAAGTTCCA GCAACTTGCA C 171(SEQ ID NO:295)

[0920] /翻译＝“SVSSSISSSNLH”(SEQ ID NO:296)

[0921] 框架2(碱基对172-216)：

[0922] 172TGGTACCAG CAGAAGTCAG GAACCTCGCC CAAACTCTGG ATTTAT 216(SEQ ID NO:297)

[0923] /翻译＝“WYQQKSGTSPKLWIY”(SEQ ID NO:298)

[0924] CDR-L2(碱基对217-237)：

[0925] 217GGCA CATCCAACCT GGCTTCT 237(SEQ ID NO:299)

[0926] /翻译＝“GTSNLAS”(SEQ ID NO:300)

[0927] 框架3(碱基对238-333)：

[0928] 238GGA GTCCCTGTTC GCTTCAGTGG CAGTGGATCT GGGACCTCTT ATTCTCTCAC AATCAGCAGC ATGGAGGCTG AAGATGCTGC CACTTATTAC TGT 333(SEQ ID NO:301)

[0929] /翻译＝“GVPVRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC”(SEQ ID NO:302)

[0930] CDR-L3(碱基对334-360)：

[0931] 334CAAAAGT GGAGTCATTA CCCGCTCACG 360(SEQ ID NO:303)

[0932] /翻译＝“QKWSHYPLT”(SEQ ID NO:304)

[0933] 框架4(碱基对361-390):

[0934] 361TTCGGTGCTG GGACCAAGCT GGAGCTGAAA 390(SEQ ID NO:305)

[0935] /翻译＝“FGAGTKLELK”(SEQ ID NO:306)

[0936] MHC2564LCB.4 499.5.1C8.9.12.2

[0937]

区域	序列片段	残基	长度
前导序列	MDFHVQIFSFMLISVTVMLSSG	1 - 22	22
LFR1	EIVLTQSPAVMAASPGEKVTITC	23 - 45	23
CDR-L1	SVSSSISSSNLH	46 - 57	12
LFR2	WYQQKSGTSPKLWIY	58 - 72	15
CDR-L2	GTSNLAS	73 - 79	7
LFR3	GVPVRFSGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYC	80 - 111	32
CDR-L3	QKWSHYPLT	112 - 120	9
LFR4	FGAGTKLELK	121 - 130	10

[0938]

[0939] 4E5重链可变(vH)DNA和氨基酸序列*

[0940] MHC2556HCN.1;M13.499.5.4E5.20.22

[0941] CDR分析

[0942] GYTFTTYT....___INPSSGYT..___ARHPWDSNY

[0943] 呈FASTA形式的氨基酸序列(MHC2556HCN.1\;M13F)

[0944] >MHC2556HCN.1\;M13F

[0945]

基因座	4E5_vH	405 bp	DNA	线性
特征	位置/限定符			
J_区段	373..405			
	/标记=FWR4			
V_区段	352..372			
	/标记=CDR3			
V_区	229..351			
	/标记=FWR3			
V_区段	211..228			
	/标记=CDR2			
V_区	154..210			
	/标记=FWR2			
V_区段	133..153			
	/标记=CDR1			
V_区	58..132			
	/标记=FWR1			
信号_肽	1..57			
	/标记=LS			
CDS	1..405			
	/标记=4E5_vH			

[0946] 4E5_vH

/ 翻 译

="MERHWIFLFLLSVTAGVHSQVQLQQSAAELARPGASVKMSCKASGYTFTTYTMHWVKQRPG

QGLEWIGHINPSSGYTEYNQKFKDKTTLTADKSSSTAHMQLSSLTSEDSAVYYCARHPWDSNY

WGQGTTLTVSS” (SEQ ID NO: 307)

[0947] 呈FASTA形式的核苷酸序列(MHC2556HCN.1\;M13F)

[0948] >MHC2556HCN.1\;M13F

[0949] 起点

[0950] 1 ATGGAAAGGC ACTGGATCTT TCTCTTCCTG TTGTCAGTAA CTGCAGGTGT CCACTCCCAG

61 GTCCAGCTGC AGCAGTCTGC AGCTGAACTG GCAAGACCTG GGGCCTCAGT GAAGATGTCC

121 TGCAAGGCTT CTGGCTACAC CTTTACTACC TACACGATGC ACTGGGTAAA ACAGAGGCCT

181 GGACAGGGTC TGGAGTGGAT TGGACACATT AATCCTAGCA GTGGATATAC TGAGTACAAT

241 CAGAAATTCA AGGACAAGAC CACACTGACT GCAGACAAAT CCTCCAGCAC AGCCCACATG

301 CAACTGAGCA GCCTAACATC TGAGGACTCT GCGGTCTATT ACTGTGCAAG ACACCCCTGG

361 GACTCGAACT ACTGGGGCCA AGGCACCACT CTCACAGTCT CCTCA (SEQ ID NO: 308)

[0951] 信号肽(碱基对1-57)：

[0952] 1ATGGAAAGGC ACTGGATCTT TCTCTTCCTG TTGTCAGTAA CTGCAGGTGT CCACTCC

[0953] 57(SEQ ID NO:309)

[0954] /翻译＝“MERHWIFLFLLSVTAGVHS”(SEQ ID NO:310)

[0955] 框架1(碱基对58-132)：

[0956] 58CAG GTCCAGCTGC AGCAGTCTGC AGCTGAACTG GCAAGACCTG GGGCCTCAGT GAAGATGTCC TGCAAGGCTT CT 132(SEQ ID NO:311)

[0957] /翻译＝“QVQLQQSAAELARPGASVKMSCKAS”(SEQ ID NO:312)

[0958] CDR-H1(碱基对133-153)：

[0959] 133GGCTACAC CTTTACTACC TAC 153(SEQ ID NO:313)

[0960] /翻译＝“GYTFTTY”(SEQ ID NO:314)

[0961] 框架2(碱基对154-210)：

[0962] 154ACGATGC ACTGGGTAAA ACAGAGGCCT GGACAGGGTC TGGAGTGGAT TGGACACATT

[0963] 210(SEQ ID NO:315)

[0964] /翻译＝“TMHWVKQRPGQGLEWIGHI”(SEQ ID NO:316)

[0965] CDR-H2(碱基对211-228)：

[0966] 211AATCCTAGCA GTGGATAT 228(SEQ ID NO:317)

[0967] /翻译＝“NPSSGY”(SEQ ID NO:318)

[0968] 框架3(碱基对229-351)：

[0969] 229AC TGAGTACAAT CAGAAATTCA AGGACAAGAC CACACTGACT GCAGACAAAT CCTCCAGCAC AGCCCACATG CAACTGAGCA GCCTAACATC TGAGGACTCT GCGGTCTATT ACTGTGCAAG A 351(SEQ ID NO:319)

[0970] /翻译＝“TEYNQKFKDKTTLTADKSSSTAHMQLSSLTSEDSAVYYCAR”(SEQ ID NO:320)

[0971] CDR-H3(碱基对352-372)：

[0972] 352CACCCCTGG GACTCGAACT AC 372(SEQ ID NO:321)

[0973] /翻译＝“HPWDSNY”(SEQ ID NO:322)

[0974] 框架4(碱基对373-405)：

[0975] 373TGGGGCCA AGGCACCACT CTCACAGTCT CCTCA 405(SEQ ID NO:323)

[0976] /翻译＝“WGQGTTLTVSS”(SEQ ID NO:324)

[0977] MHC2556HCN.1 499.5.4E5.20.22

[0978]

区域	序列片段	残基	长度
前导序列	MERHWIFLFLLSVTAGVHS	1 - 19	19
HFR1	QVQLQQSAAELARPGASVKMSCKAS	20 - 44	25
CDR-H1	GYTFTTY	45 - 51	7
HFR2	TMHWVKQRPGQGLEWIGHI	52 - 70	19
CDR-H2	NPSSGY	71 - 76	6
HFR3	TEYNQKFKDKTTLTADKSSSTAHMQLSSLTSEDSAVYY CAR	77 - 117	41
CDR-H3	HPWDSNY	118 - 124	7
HFR4	WGQGTTLTVSS	125 - 135	11

[0979] 4E5轻链可变(vL)DNA和氨基酸序列*

[0980] MHC2556LCN.2;M13.499.5.4E5.20.22

[0981] CDR分析

[0982] ENIDSY......___AAT.......___QHYYITPFT

[0983] 呈FASTA形式的氨基酸序列(MHC2556LCN.2\;M13F)

[0984] >MHC2556LCN.2\;M13F

[0985]

基因座 4E5_vL 381 bp DNA 线性

特征 位置/限定符

J_区段 352..381

/标记=FWR4

V_区段 325..351

/标记=CDR3

V_区 229..324
/标记=FWR3
V_区段 208..229
/标记=CDR2
V_区 163..207
/标记=FWR2
V_区段 130..162
/标记=CDR1
V_区 61..129
/标记=FWR1

[0986]

信号_肽 1..60
/标记=LS
CDS 1..381
/标记=4E5_vL

4E5_vL
/翻译
="MSVPTQLLGLLLLWLTDARCDIQMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIDSYLAWYQQKQG
RSPQLLVYAATNLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDVARYYCQHYYITPFTFGSGTKL
EIK" (SEQ ID NO: 325)

[0987] 呈FASTA形式的核苷酸序列(MHC2556LCN.2\;M13F)

[0988] >MHC2556LCN.2\;M13F

[0989] 起点

1 ATGAGTGTGC CCACTCAGCT CCTGGGGTTG CTGCTGCTGT GGCTTACAGA
TGCCAGATGT

61 GACATCCAGA TGACTCAGTC TCCAGCTTCC CTGTCTGCAT CTGTGGGAGA
AACTGTCACC

[0990]

121 ATCACATGTC GAGCAAGTGA GAATATTGAC AGTTATTTAG CATGGTATCA
GCAGAAACAG

181 GGAAGATCTC CTCAGCTCCT GGTCTATGCT GCAACAAACT TAGCAGATGG TGTGCCATCA

241 AGGTTCAGTG GCAGTGGATC AGGCACACAG TATTCTCTCA AGATCAACAG

[0991] CCTGCAGTCT

301 GAAGATGTTG CGAGATATTA CTGTCAACAT TATTATATTA CTCCATTCAC GTTCGGCTCG

361 GGGACAAAGT TGGAAATAAA A (SEQ ID NO: 326)

[0992] 信号肽(碱基对1-60)：

[0993] 1ATGAGTGTGC CCACTCAGCT CCTGGGGTTG CTGCTGCTGT GGCTTACAGA TGCCAGATGT

[0994] 60(SEQ ID NO:327)

[0995] /翻译＝“MSVPTQLLGLLLLWLTDARC”(SEQ ID NO:328)

[0996] 框架1(碱基对61-129)：

[0997] 61GACATCCAGA TGACTCAGTC TCCAGCTTCC CTGTCTGCAT CTGTGGGAGA AACTGTCACC ATCACATGT 129(SEQ ID NO:329)

[0998] /翻译＝“DIQMTQSPASLSASVGETVTITC”(SEQ ID NO:330)

[0999] CDR-L1(碱基对130-162)：

[1000] 130C GAGCAAGTGA GAATATTGAC AGTTATTTAG CA 162(SEQ ID NO:331)

[1001] /翻译＝“RASENIDSYLA”(SEQ ID NO:332)

[1002] 框架2(碱基对163-207)：

[1003] 163TGGTATCA GCAGAAACAG GGAAGATCTC CTCAGCTCCT GGTCTAT 207(SEQ ID NO:333)

[1004] /翻译＝“WYQQKQGRSPQLLVY”(SEQ ID NO:334)

[1005] CDR-L2(碱基对208-228)：

[1006] 208GCT GCAACAAACT TAGCAGAT 228(SEQ ID NO:335)

[1007] /翻译＝“AATNLAD”(SEQ ID NO:336)

[1008] 框架3(碱基对229-324)：

[1009] 229GG TGTGCCATCA AGGTTCAGTG GCAGTGGATC AGGCACACAG TATTCTCTCA AGATCAACAG CCTGCAGTCT GAAGATGTTG CGAGATATTA CTGT 324(SEQ ID NO:337)

[1010] /翻译＝“GVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDVARYYC”(SEQ ID NO:338)

[1011] CDR-L3(碱基对325-351)：

[1012] 325CAACAT TATTATATTA CTCCATTCAC G 351(SEQ ID NO:339)

[1013] /翻译＝“QHYYITPFT”(SEQ ID NO:340)

[1014] 框架4(碱基对352-381)：

[1015] 352TTCGGCTCG GGGACAAAGT TGGAAATAAA A 381(SEQ ID NO:341)

[1016] /翻译＝“FGSGTKLEIK”(SEQ ID NO:342)

[1017] MHC2556LCN.2 499.5.4E5.20.22

[1018]

区域	序列片段	残基	长度
前导序列	MSVPTQLLGLLLLWLTDARC	1-20	20

LFR1	DIQMTQSPASLSASVGETVTITC	21-43	23
CDR-L1	RASENIDSYLA	44-54	11
LFR2	WYQQKQGRSPQLLVY	55-69	15
CDR-L2	AATNLAD	70-76	7
LFR3	GVPSRFSGSGSGTQYSLKINSLQSEDVARYYC	77-108	32
CDR-L3	QHYYITPFT	109-117	9
LFR4	FGSGTKLEIK	118-127	10

[1019] *根据Kabat的CDR定义和蛋白质序列编号。CDR氨基酸序列分别以CDR1、CDR2和CDR3的顺序加下划线。

[1020] 表3:抗HHLA2 mAb结合和配体阻断特征的总结

[1021]

HHLA2 mAb（同种型）	8A12 (IgG2a)	6D10 (IgG1)	6F10 (IgG1)	8D2 (IgG2a)	2G2 (IgG1)	2C4 (IgG1)	4D1 (IgG1)	1C8 (IgG2a)	4E5 (IgG1)

[1022]

[1]结合EC50（ug/ml）	[3]nd	22.49	0.25	[3]nd	0.21	0.24	0.44	0.63	[3]nd
[2]功能	IHC, WB	无阻断剂	阻断剂	IHC, WB	弱阻断剂	加强结合	阻断剂	无阻断剂	阻断剂

[1023] [1]:通过流式细胞术确定的与HHLA2转染的300.19小鼠前B白血病细胞的结合

[1024] [2]:通过流式细胞术确定的HHLA2-mIgG2a与TMIGD2转染的300.19小鼠前B白血病细胞的结合的阻断

[1025] [3]:未确定:8A12-由于低结合而不可测量;4E5-培养物上清液

[1026] III.核酸、载体和重组宿主细胞

[1027] 本发明的另一个目标涉及编码本发明的单克隆抗体及其片段、免疫球蛋白和多肽的核酸序列。

[1028] 例如,在具体实施例中,本发明部分地涉及一种编码mAb 8A12的vH结构域或mAb 8A12的vL结构域的核酸序列。在另一个具体实施例中,本发明部分地涉及一种编码从多克隆抗体1.2和/或2.2分离的至少一种有效抗HHLA2 mAb的vH结构域或vL结构域的核酸序列。

[1029] 通常,所述核酸是DNA或RNA分子,其可以包括在任何合适的载体,诸如质粒、粘粒、附加体(episome)、人工染色体、噬菌体或病毒载体中。

[1030] 术语“载体”、“克隆载体”和“表达载体”意指通过其可以将DNA或RNA序列(例如,外源基因)引入到宿主细胞中以便转化宿主并促进引入的序列的表达(例如,转录和翻译)的媒介物。因此,本发明的另一个目标涉及一种包含本发明的核酸的载体。

[1031] 此类载体可以包含调节元件,诸如启动子、增强子、终止子等,以在向受试者施用时引发或指导所述多肽的表达。在动物细胞的表达载体中使用的启动子和增强子的实例包括SV40的早期启动子和增强子(Mizukami T.等人1987)、莫洛尼小鼠白血病病毒的LTR启动子和增强子(Kuwana Y等人1987)、免疫球蛋白H链的启动子(Mason J O等人1985)和增强子

(Gillies S D等人1983)等。

[1032] 可以使用动物细胞的任何表达载体。合适的载体的实例包括pAGE107(Miyaji H等人1990)、pAGE103(Mizukami T等人1987)、pHSG274(Brady G等人1984)、pKCR(O'Hare K等人1981)、pSG1βd2-4-(Miyaji H等人1990)等。质粒的其他代表性实例包括包含复制起点的复制质粒,或整合质粒,例如像pUC、pcDNA、pBR等。病毒载体的代表性实例包括腺病毒载体、逆转录病毒载体、疱疹病毒载体和AAV载体。此类重组病毒可以通过本领域已知的技术产生,诸如通过转染包装细胞或者通过用辅助质粒或病毒瞬时转染来产生。病毒包装细胞的典型实例包括PA317细胞、PsiCRIP细胞、GPenv阳性细胞、293细胞等。用于产生此类复制缺陷重组病毒的详细方案可以见于例如WO 95/14785、WO 96/22378、美国专利第5,882,877号、美国专利第6,013,516号、美国专利第4,861,719号、美国专利第5,278,056号和WO 94/19478。

[1033] 本发明的另一个目标涉及一种通过根据本发明的核酸和/或载体转染、感染或转化的细胞。术语"转化"意指将"外源"(即,外在的或细胞外的)基因、DNA或RNA序列引入到宿主细胞中,使得宿主细胞表达引入的基因或序列以产生所需物质,通常是通过引入的基因或序列编码的蛋白质或酶。接收并表达引入的DNA或RNA的宿主细胞被"转染"。

[1034] 本发明的核酸可以用于在合适的表达系统中产生本发明的重组多肽。术语"表达系统"意指在合适的条件下例如用于表达由通过载体携带并引入到宿主细胞中的外源DNA编码的蛋白质的宿主细胞和相容的载体。

[1035] 常见的表达系统包括大肠杆菌(E.coli)宿主细胞和质粒载体、昆虫宿主细胞和杆状病毒载体以及哺乳动物宿主细胞和载体。宿主细胞的其他实例包括但不限于原核细胞(诸如细菌)和真核细胞(诸如酵母细胞、哺乳动物细胞、昆虫细胞、植物细胞等)。具体实例包括大肠杆菌、克鲁维酵母(Kluyveromyces)或酵母属(Saccharomyces)酵母、哺乳动物细胞系(例如,Vero细胞、CHO细胞、3T3细胞、COS细胞等)以及原代或建立的哺乳动物细胞培养物(例如,由淋巴母细胞、成纤维细胞、胚胎细胞、上皮细胞、神经细胞、脂肪细胞等产生)。实例还包括小鼠SP2/0-Ag14细胞(ATCC CRL1581)、小鼠P3X63-Ag8.653细胞(ATCC CRL1580)、其中二氢叶酸还原酶基因(在下文中被称为"DHFR"基因)有缺陷的CHO细胞(Urlaub G等人;1980)、大鼠YB2/3HL.P2.G11.16Ag.20细胞(ATCC CRL 1662,在下文中被称为"YB2/0细胞")等。YB2/0细胞是优选的,因为嵌合或人源化抗体的ADCC活性在该细胞中表达时被增强。

[1036] 本发明还涉及一种产生根据本发明的表达本发明的抗体或多肽的重组宿主细胞的方法,所述方法包含由以下组成的步骤:(i)将如上所述的重组核酸或载体在体外或离体引入到感受态宿主细胞中,(ii)在体外或离体培养获得的重组宿主细胞,以及(iii)任选地选择表达和/或分泌所述抗体或多肽的细胞。此类重组宿主细胞可以用于产生本发明的抗体和多肽。

[1037] 另一方面,本发明提供了在选择性杂交条件下与本文公开的多核苷酸杂交的分离的核酸。因此,本实施例的多核苷酸可以用于分离、检测和/或定量包含此类多核苷酸的核酸。例如,本发明的多核苷酸可以用于鉴定、分离或扩增保藏文库中的部分或全长克隆。在一些实施例中,所述多核苷酸是从人或哺乳动物核酸文库分离的或另外与来自人或哺乳动物核酸文库的cDNA互补的基因组序列或cDNA序列。优选地,cDNA文库包含至少80%全长序列,优选地至少85%或90%全长序列,并且最优选地至少95%全长序列。cDNA文库可以归一

化以增加稀有序列的表示。低或中等严格性杂交条件通常但不完全地与相对于互补序列具有降低的序列同一性的序列一起使用。中等和高严格性条件可以任选地用于更大同一性的序列。低严格性条件允许具有约70％序列同一性的序列的选择性杂交,并且可以用于鉴定直向同源或旁系同源序列。任选地,本发明的多核苷酸编码由本文所述的多核苷酸编码的抗体的至少一部分。本发明的多核苷酸包含可以用于与编码本发明的抗体的多核苷酸选择性杂交的核酸序列。参见例如,Ausubel,同上;Colligan,同上,各自通过引用整体并入本文。

[1038] IV.产生抗体的方法

[1039] 本发明的抗体及其片段、免疫球蛋白和多肽可以通过本领域已知的任何技术产生,所述技术诸如但不限于单独的或组合的任何化学、生物、遗传或酶促技术。

[1040] 已知所需序列的氨基酸序列,本领域技术人员可以容易地通过用于产生多肽的标准技术产生所述抗体或多肽。例如,它们可以使用熟知的固相方法,优选地使用可商购获得的肽合成装置(诸如由应用生物系统公司(Applied Biosystems),福斯特城,加利福尼亚州制造)并且遵循制造商的说明书来合成。可替代地,本发明的抗体和其他多肽可以通过如本领域熟知的重组DNA技术合成。例如,这些片段可以在将编码所需(多)肽的DNA序列并入到表达载体中并且将此类载体引入到表达所需多肽、可以随后使用熟知的技术将它们从其分离的合适的真核或原核宿主中之后作为DNA表达产物获得。

[1041] 具体地,本发明进一步涉及一种产生本发明的抗体或多肽的方法,所述方法包含由以下组成的步骤:(i)在适于允许所述抗体或多肽表达的条件下培养根据本发明的转化的宿主细胞;以及(ii)回收表达的抗体或多肽。

[1042] 本发明的抗体和其他多肽适于通过常规免疫球蛋白纯化程序从培养基分离,所述免疫球蛋白纯化程序为例如像琼脂糖蛋白A、羟基磷灰石色谱法、凝胶电泳、渗析、亲和色谱法、硫酸铵或乙醇沉淀、酸萃取、阴离子或阳离子交换色谱法、磷酸纤维素色谱法、疏水性相互作用色谱法、羟基磷灰石色谱法和凝集素色谱法。高效液相色谱法("HPLC")也可以用于纯化。参见例如,Colligan,《即免疫学实验指南(Current Protocols in Immunology)》,或《即蛋白科学实验指南(Current Protocols in Protein Science)》,约翰威利父子(John Wiley&Sons),纽约,纽约州,(1997-2001),例如第1、4、6、8、9、10章,各自通过引用整体并入本文。

[1043] 本发明的嵌合抗体(例如,小鼠-人嵌合体或者非啮齿类动物-人嵌合体)可以通过以下产生:获得如先前所述的编码VL和VH结构域的核酸序列;通过将它们插入到动物细胞的具有编码人抗体CH和人抗体CL的基因的表达载体中来构建人嵌合抗体表达载体;以及通过将表达载体引入到动物细胞中来表达编码序列。人嵌合抗体的CH结构域可以是属于人免疫球蛋白,诸如IgG类或其亚类,诸如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的任何区域。类似地,人嵌合抗体的CL可以是属于Ig,诸如κ类或λ类的任何区域。包含人和非人部分的嵌合和人源化单克隆抗体(其可以使用标准重组DNA技术制备)属于本发明的范围。此类嵌合和人源化单克隆抗体可以通过本领域已知的重组DNA技术,例如使用以下中所述的方法来产生:Robinson等人国际专利公布PCT/US86/02269;Akira等人欧洲专利申请184,187;Taniguchi,M.欧洲专利申请171,496;Morrison等人欧洲专利申请173,494;Neuberger等人PCT申请WO 86/01533;Cabilly等人美国专利第4,816,567号;Cabilly等人欧洲专利申请125,023;Better

等人(1988)《科学》240:1041-1043;Liu等人(1987)《美国科学院院报》84:3439-3443;Liu等人(1987)《免疫学杂志》139:3521-3526;Sun等人(1987)《美国科学院院报》84:214-218;Nishimura等人(1987)《癌症研究》47:999-1005;Wood等人(1985)《自然》314:446-449;Shaw等人(1988)《美国国立癌症研究所杂志(J.Natl.Cancer Inst.)》80:1553-1559);Morrison,S.L.(1985)《科学》229:1202-1207;Oi等人(1986)《生物技术(Biotechniques)》4:214;Winter美国专利5,225,539;Jones等人(1986)《自然》321:552-525;Verhoeyan等人(1988)《科学》239:1534;以及Beidler等人(1988)《免疫学杂志》141:4053-4060。

[1044] 此外,人源化抗体可以根据标准方案,如美国专利5,565,332中公开的那些来制备。在另一个实施例中,抗体链或特异性结合对成员可以通过包含编码特异性结合对成员的多肽链和可复制通用展示包(replicable generic display package)的组分的融合体的核酸分子的载体与含有编码单一结合对成员的第二多肽链的核酸分子的载体之间的重组,使用本领域已知的技术(例如,如美国专利5,565,332、5,871,907或5,733,743中所述)来产生。本发明的人源化抗体可以通过以下产生:获得如先前所述的编码CDR结构域的核酸序列;通过将它们插入到动物细胞的具有编码(i)与人抗体的重链恒定区相同的重链恒定区和(ii)与人抗体的轻链恒定区相同的轻链恒定区的基因的表达载体中来构建人源化抗体表达载体;以及通过将表达载体引入到动物细胞中来表达基因。人源化抗体表达载体可以是其中编码抗体重链的基因和编码抗体轻链的基因存在于单独载体上的类型或者是其中两个基因存在于同一载体上的类型(串联型)。

[1045] 用于基于常规重组DNA和基因转染技术产生人源化抗体的方法是本领域熟知的(参见例如,Riechmann L.等人1988;Neuberger M S.等人1985)。抗体可以使用本领域已知的各种技术来人源化,所述各种技术包括例如CDR-移植(EP 239,400;PCT公布WO91/09967;美国专利第5,225,539号;第5,530,101号;和第5,585,089号)、镶面或表面重整(EP 592,106;EP 519,596;Padlan EA(1991);Studnicka G M等人(1994);Roguska M A.等人(1994))和链改组(美国专利第5,565,332号)。用于制备此类抗体的一般重组DNA技术也是已知的(参见欧洲专利申请EP 125023和国际专利申请公布WO 96/02576)。

[1046] 类似地,本文所述的双特异性或多特异性抗体可以根据标准程序制备。例如,三源杂交瘤和杂交体杂交瘤是可以分泌双特异性或多特异性抗体的细胞系的两个实例。通过杂交体杂交瘤或三源杂交瘤产生的双特异性和多特异性抗体的实例在美国专利4,474,893中公开。此类抗体还可以通过化学手段(Staerz等人(1985)《自然》314:628,以及Perez等人(1985)《自然》316:354)和杂交瘤技术(Staerz和Bevan(1986)《美国科学院院报》,83:1453,以及Staerz和Bevan(1986)《现代免疫学(Immunol.Today)》7:241)来构建。可替代地,此类抗体还可以通过以下来生成:通过融合杂交瘤或制备不同抗体的其他细胞来制备异种杂交瘤,接着鉴定产生并共组装所需抗体的克隆。它们还可以通过完整免疫球蛋白链或其部分诸如Fab和Fv序列的化学或基因缀合来生成。抗体组分可以结合本发明的一种或多种生物标记物(包括本文所述的一种或多种免疫抑制性生物标记物)的多肽或其片段。

[1047] 此外,用于产生抗体片段的方法是熟知的。例如,本发明的Fab片段可以通过用蛋白酶诸如木瓜蛋白酶处理与人HHLA2特异性地反应的抗体(诸如mAb 8A12和多克隆抗体1.2和2.2)来获得。另外,Fab可以通过以下来产生:将编码抗体的Fab的DNA插入到原核表达系统或真核表达系统的载体中,以及将载体引入到原核生物或真核生物(在适当的情况下)中

来表达Fab。

[1048] 类似地,本发明的F(ab')2片段可以通过用蛋白酶,胃蛋白酶处理与HHLA2特异性地反应的抗体来获得。另外,F(ab')2片段可以通过经由硫醚键或二硫键结合以下所述的Fab'来产生。

[1049] 本发明的Fab'片段可以通过用还原剂,二硫苏糖醇处理与HHLA2特异性地反应的F(ab')2来获得。另外,Fab'片段可以通过以下来产生:将编码抗体的Fab'片段的DNA插入到原核生物的表达载体或真核生物的表达载体中,以及将载体引入到原核生物或真核生物(在适当的情况下)中以进行其表达。

[1050] 此外,本发明的scFv可以通过以下来产生:获得编码如先前所述的VH和VL结构域的cDNA;构建编码scFv的DNA;将DNA插入到原核生物的表达载体或真核生物的表达载体中;以及然后将表达载体引入到原核生物或真核生物(在适当的情况下)中以表达scFv。为了生成人源化的scFv片段,可以使用被称为CDR移植的熟知技术,其涉及从供体scFv片段选择互补决定区(CDR),以及将它们移植到已知的三维结构的人scFv片段框架上(参见例如,WO98/45322;WO 87/02671;美国专利第5,859,205号;美国专利第5,585,089号;美国专利第4,816,567号;EP0173494)。

[1051] V.抗体、免疫球蛋白和多肽的修饰

[1052] 设想本文所述的抗体的氨基酸序列修饰。例如,可能希望改善抗体的结合亲和力和/或其他生物特性。已知当通过简单地将来源于非人动物的抗体的仅VH和VL中的CDR移植到人抗体的VH和VL的FR中来产生人源化抗体时,与来源于非人动物的原始抗体的抗原结合活性相比,抗原结合活性降低。认为非人抗体的VH和VL的不仅CDR中并且FR中的若干氨基酸残基直接地或间接地与抗原结合活性相关联。因此,用来源于人抗体的VH和VL的FR的不同氨基酸残基取代这些氨基酸残基将降低结合活性,并且可以通过用来源于非人动物的原始抗体的氨基酸残基替换氨基酸来校正。

[1053] 修饰和变化可以在本发明的抗体的结构中并且在编码它们的DNA序列中进行,并且仍然获得编码具有期望的特征的抗体和多肽的功能性分子。例如,某些氨基酸可以被蛋白质结构中的其他氨基酸取代而没有大量的活性丧失。因为蛋白质的相互作用性能力和性质限定蛋白质的生物功能活性,所以可以在蛋白质序列中并且当然在其DNA编码序列中进行某些氨基酸取代,同时仍然获得具有相似特性的蛋白质。因此设想可以在本发明的抗体序列或编码所述多肽的对应DNA序列中进行各种变化而不会造成其生物活性的大量丧失。

[1054] 在一个实施例中,氨基酸变化可以通过改变DNA序列中的密码子以基于遗传密码的保守性编码保守性取代来实现。具体地,特定蛋白质的氨基酸序列与可以编码所述蛋白质的核苷酸序列之间存在已知且确定的对应性,如由遗传密码(下文示出)所限定。同样地,特定核酸的核苷酸序列与由该核酸编码的氨基酸序列之间存在已知且确定的对应性,如由遗传密码(参见以上的遗传密码图)所限定。

[1055] 如上所述,遗传密码的重要且已知的特征是其冗余性,由此对于大多数用于制备蛋白质的氨基酸而言,可以采用多于一个编码核苷酸三联体(上文示出)。因此,多个不同的核苷酸序列可以编码给定的氨基酸序列。此类核苷酸序列被认为是功能上等效的,因为它们在所有生物体中导致产生相同的氨基酸序列(虽然某些生物体可以比其他更有效地翻译一些序列)。此外,偶尔地,嘌呤或嘧啶的甲基化变体可以存在于给定核苷酸序列中。此类甲

基化不影响三核苷酸密码子与对应的氨基酸之间的编码关系。

[1056] 在进行多肽的氨基序列的变化时,可以考虑氨基酸的亲水指数。亲水氨基酸指数在为蛋白质赋予相互作用性生物功能中的重要性在本领域中大体上被了解。认为氨基酸的相对亲水特征有助于所得蛋白质的二级结构,这进而限定了蛋白质与其他分子(例如,酶、底物、受体、DNA、抗体、抗原等)的相互作用。基于其疏水性和电荷特征,每个氨基酸被分配了亲水指数,这些是:异亮氨酸(+4.5);缬氨酸(+4.2);亮氨酸(+3.8);苯丙氨酸(+2.8);半胱氨酸/胱氨酸(+2.5);蛋氨酸(+1.9);丙氨酸(+1.8);甘氨酸(-0.4);苏氨酸(-0.7);丝氨酸(-0.8);色氨酸(-0.9);酪氨酸(-1.3);脯氨酸(-1.6);组氨酸(-3.2);谷氨酸(-3.5);谷氨酰胺(-3.5);天冬氨酸(<RTI 3.5);天冬酰胺(-3.5);赖氨酸(-3.9);和精氨酸(-4.5)。

[1057] 本领域已知某些氨基酸可以被具有相似亲水指数或分数的其他氨基酸取代,并且仍然产生具有相似生物活性的蛋白质,即仍然获得生物功能上等效的蛋白质。

[1058] 如上所示,因此氨基酸取代通常是基于氨基酸侧链取代基的相对相似性,例如其疏水性、亲水性、电荷、大小等。将前述各种特征考虑在内的示例性取代是本领域技术人员熟知的,并且包括:精氨酸和赖氨酸;谷氨酸和天冬氨酸;丝氨酸和苏氨酸;谷氨酰胺和天冬酰胺;以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸。

[1059] 本发明的抗体的另一种类型的氨基酸修饰可以用于改变抗体的原始糖基化模式以例如增加稳定性。“改变”意指使抗体中存在的一个或多个碳水化合物部分缺失、和/或添加抗体中不存在的一个或多个糖基化位点。抗体的糖基化通常是N-连接的。“N-连接”是指碳水化合物部分与天冬酰胺残基的侧链连接。其中X是除了脯氨酸之外的任何氨基酸的三肽序列天冬酰胺-X-丝氨酸和天冬酰胺-X-苏氨酸是碳水化合物部分酶促连接到天冬酰胺侧链的识别序列。因此,在多肽中存在这些三肽序列中的任一个均产生潜在的糖基化位点。向抗体添加糖基化位点通过改变氨基酸序列、使得其包含以上所述的三肽序列中的一个或多个来便利地实现(针对N连接的糖基化位点)。另一种类型的共价修饰涉及将糖苷化学或酶促地偶联至抗体。这些程序是有利的,因为它们不需要在宿主细胞中产生具有针对N-连接的或O-连接的糖基化的糖基化能力的抗体。根据所使用的偶联模式,糖可以附接到(a)精氨酸和组氨酸,(b)游离羧基基团,(c)游离巯基基团,诸如半胱氨酸的那些,(d)游离羟基基团,诸如丝氨酸、苏氨酸或羟脯氨酸的那些,(e)芳族残基,诸如苯丙氨酸、酪氨酸或色氨酸的那些,或(f)谷氨酰胺的酰胺基团。例如,此类方法在WO87/05330中描述。

[1060] 类似地,去除抗体上存在的任何碳水化合物部分可以化学地或酶促地实现。化学去糖基化需要将抗体暴露于化合物三氟甲烷磺酸或等效化合物。该处理导致除了连接糖(N-乙酰葡糖胺或N-乙酰半乳糖胺)之外大部分或所有糖的裂解,同时保持抗体完整。化学去糖基化由Sojahr H.等人(1987)和Edge,A S.等人(1981)描述。抗体上碳水化合物部分的酶促裂解可以通过使用各种内切糖苷酶和外切糖苷酶来实现,如由Thotakura,N R.等人(1987)描述。

[1061] 其他修饰可以涉及免疫缀合物的形成。例如,在一种类型的共价修饰中,抗体或蛋白质按以下专利中所列出的方式共价连接至各种非蛋白质聚合物(例如,聚乙二醇、聚丙二醇或聚氧化烯)中的一种:美国专利第4,640,835;4,496,689;4,301,144;4,670,417;4,791,192或4,179,337号。

[1062] 本发明的抗体或其他蛋白质与异源剂的缀合可以使用各种双官能蛋白偶联剂来

制备,所述双官能蛋白偶联剂包括但不限于N-琥珀酰亚胺基(2-吡啶基二硫醇)丙酸酯(SPDP)、琥珀酰亚胺基(N-马来酰亚胺基甲基)环己烷-1-羧酸酯、亚氨基硫烷(IT)、亚氨酸酯的双官能衍生物(诸如二亚胺代己二酸二甲酯HCL)、活性酯(诸如辛二酸二琥珀酰亚胺基酯)、醛(诸如戊二醛)、双-迭氮基化合物(诸如双(对迭氮基苯甲酰基)己二胺)、双-重氮衍生物(诸如双-(对重氮苯甲酰基)-乙二胺)、二异氰酸酯(诸如甲苯2,6二异氰酸酯)和双-活性氟化合物(诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯)。例如,碳标记的1-异硫氰酸酯基苄基甲基二亚乙基三胺五乙酸(MX-DTPA)是用于使放射性核苷酸缀合到抗体的示例性螯合剂(WO 94/11026)。

[1063] 另一方面,本发明的特征在于特异性地结合HHLA2的缀合至治疗性部分,诸如细胞毒素、药物和/或放射性同位素的抗体。当缀合物至细胞毒素时,这些抗体缀合物被称为“免疫毒素”。细胞毒素或细胞毒性剂包括对于细胞有害(例如,杀伤细胞)的任何试剂。实例包括紫杉醇、细胞松弛素B、短杆菌肽D、溴化乙锭、依米丁、丝裂霉素、依托泊苷、替尼泊苷、长春新碱、长春碱、秋水仙素、阿霉素、柔红霉素、二羟基蒽二酮(dihydroxy anthracin dione)、米托蒽醌、光辉霉素、放线菌素D、1-去氢睾丸素、糖皮质激素、普鲁卡因、丁卡因、利多卡因、普萘洛尔和嘌呤霉素及其类似物或同源物。治疗剂包括但不限于抗代谢物(例如,甲氨蝶呤、6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、5-氟尿嘧啶达卡巴嗪)、烷基化剂(例如,氮芥、塞替派苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BSNU)和洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲佐菌素、丝裂霉素C和顺-二氯二胺合铂(II)(DDP)顺铂)、蒽环类药物(例如,柔红霉素(之前为道诺霉素)和阿霉素)、抗菌素(例如,放线菌素D(之前为放线菌素)、博来霉素、光辉霉素和安曲霉素(AMC))和抗有丝分裂剂(例如,长春新碱和长春碱)。本发明的抗体可以缀合至放射性同位素,例如放射性碘,以生成用于治疗相关病症,诸如癌症的细胞毒性放射性药物。

[1064] 缀合的抗HHLA2抗体可以诊断性地或预后性地用于监测组织中的多肽水平作为临床测试程序的一部分,例如以确定给定治疗方案的功效或选择最可能对免疫疗法产生应答的患者。例如,可以在流式细胞术测定中对细胞进行透化处理以允许结合HHLA2的抗体(诸如mAb 8A12和多克隆抗体1.2和2.2)靶向其识别的细胞内表位,并且允许通过分析由缀合的分子发射的信号来检测结合。可以通过将抗体与可检测物质偶联(即,物理连接)来促进检测。可检测物质的实例包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料和放射性材料。合适的酶的实例包括辣根过氧化酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基复合物的实例包括链霉亲和素/生物素和抗生物素蛋白/生物素;合适的荧光材料的实例包括伞酮、荧光素、异硫氰酸荧光素(FITC)、若丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红素(PE);发光材料的实例包括鲁米诺(luminol);生物发光材料的实例包括荧光素酶、荧光素和水母素;并且合适的放射性材料的实例包括^{125}I、^{131}I、^{35}S或^{3}H。如本文所用,关于抗体的术语“标记的”旨在涵盖通过将可检测物质(诸如放射活性剂或荧光团(例如,异硫氰酸荧光素(FITC)或藻红素(PE)或吲哚(Cy5)))偶联(即,物理连接)至抗体来直接标记抗体以及通过与可检测物质的反应性来间接标记抗体。

[1065] 本发明的抗体缀合物可以用于修改给定生物应答。治疗性部分不被认为局限于经典的化学治疗剂。例如,药物部分可以是具有所需生物活性的蛋白质或多肽。此类蛋白质可以包括例如酶促活性毒素或其活性片段,诸如相思豆毒素、蓖麻毒素A、绿脓杆菌外毒素或

白喉毒素;蛋白质,诸如肿瘤坏死因子或干扰素-γ;或生物应答调节剂,例如像淋巴因子、白细胞介素-1(“IL-1”)、白细胞介素-2(“IL-2”)、白细胞介素-6(“IL-6”)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(“GM-CSF”)、粒细胞集落刺激因子(“G-CSF”)或其他细胞因子或生长因子。

[1066] 用于将此类治疗性部分缀合至抗体的技术是熟知的,参见例如Arnon等人,“癌症疗法中用于药物的免疫靶向的单克隆抗体(Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy)”,《单克隆抗体和癌症疗法(Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy)》,Reisfeld等人(编辑),第243 56页(Alan R.Liss,Inc.1985);Hellstrom等人,“用于药物递送的抗体(Antibodies For Drug Delivery)”,《受控药物递送(Controlled Drug Delivery)》(第2版),Robinson等人(编辑),第623 53页(Marcel Dekker,Inc.1987);Thorpe,“癌症疗法中细胞毒性剂的抗体载体:综述(Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy:A Review)”,《单克隆抗体’84:生物和临床应用(Monoclonal Antibodies’84:Biological And Clinical Applications)》,Pinchera等人(编辑),第475 506页(1985);“癌症疗法中放射标记的抗体的治疗性用途的分析、结果和未来前景(Analysis,Results,And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy)”,《用于癌症检测和疗法的单克隆抗体(Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy)》,Baldwin等人(编辑),第303 16页(Academic Press 1985),以及Thorpe等人,“抗体-毒素缀合物的制备和细胞毒性特性(The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates)”,《免疫学综述(Immunol.Rev.)》,62:119 58(1982)。

[1067] 在一些实施例中,缀合可以使用有利于细胞中细胞毒性剂或生长抑制剂的释放的“可裂解接头”来进行。例如,可以使用酸不稳定型接头、肽酶敏感型接头、光不稳定型接头、二甲基接头或含二硫键的接头(参见例如,美国专利第5,208,020号)。可替代地,可以通过重组技术或肽合成来制备包含抗体和细胞毒性剂或生长抑制剂的融合蛋白。DNA的长度可以包含编码缀合物的彼此相邻或被编码接头肽的区域分开的两个部分的相应区域,所述接头肽不破坏缀合物的所需特性。

[1068] VI.本发明的用途和方法

[1069] 本文所述的本发明的抗HHLA2抗体、免疫球蛋白、多肽和核酸可以基于HHLA2水平的检测用于多种预测性医学测定(例如,诊断性测定、预后性测定和监测临床试验),并且在一些实施例中,可以单独地或在缀合至毒性化合物或其他治疗剂时用于治疗性目的(例如,治疗性和预防性)。如本文所用,术语“检测”包括参考或不参考对照的定性和/或定量检测(测量水平)。如本文所用,本发明的HHLA2多肽或其片段具有以下活性中的一种或多种:1)结合其一种或多种天然结合配偶体(诸如TMIGD2和/或KIR3DL3)和/或调控所述天然结合配偶体的活性;2)调控细胞内或细胞间信号传导,诸如共免疫抑制性信号传导;3)调控淋巴细胞的活化和/或增殖;4)调控生物体(例如,哺乳动物生物体,诸如小鼠、非啮齿类动物或人)的免疫应答;以及5)调控免疫细胞无能。

[1070] 因此,本发明的一方面涉及用于确定生物样品(例如,血液、血清、细胞或组织)的环境中的HHLA2多肽水平,从而确定样品中HHLA2多肽的水平,确定个体是否罹患病症和/或确定通过此类HHLA2水平指示的此类病症的状态的诊断性测定。例如,本发明的抗体可用于对与HHLA2相关联的癌症疾病进行分期。

[1071] 本发明还提供了用于确定个体是否具有发展此类病症的风险的预后性(或预测性)测定。本发明的另一方面涉及在临床试验中监测试剂(例如,药物、化合物)对于HHLA2的表达或活性的影响。

[1072] 本发明还提供了HHLA2的检测作为鉴定转导HHLA2信号的试剂的手段。转导HHLA2信号的试剂减弱免疫应答并且可以用于自身免疫性疾病、哮喘并且用于建立耐受性。

[1073] 在本文所述的任何方法中,可以检测单独的或与其他分子(诸如其他免疫检查点和/或共刺激性分子)的表达组合的HHLA2。若干分子的组合检测(例如,顺序地或同时地)可以提供关于病症亚型的治疗性干预和/或个性化的更高分辨率诊断的协同作用的有用信息。在一些实施例中,HHLA2用一种多种标记物组合检测。

[1074] 1.诊断性测定

[1075] 本发明部分地提供了用于对生物样品是否表达细胞限制性HHLA2和/或细胞限制性HHLA2的水平是否被调控(例如,上调或下调)进行准确地分类,从而指示目标病症(诸如癌症)的状态的方法、系统和密码。在一些实施例中,本发明可用于使用统计算法和/或经验数据(例如,HHLA2的存在、不存在或水平)对与由HHLA2介导的癌症或其亚型相关联或者有所述癌症或其亚型的风险的样品(例如,来自受试者)进行分类。

[1076] 用于检测HHLA2或其片段的水平并且因此可用于对样品是否与由HHLA2或其临床亚型的异常表达(例如,上调或下调)介导的疾病或病症相关联的示例性方法涉及从测试受试者获得生物样品并且将生物样品与本发明的能够检测HHLA2的抗体或其抗原结合片段接触,使得在生物样品中检测HHLA2的水平。在一些实施例中,使用至少一种抗体或其抗原结合片段,其中两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种、九种、十种或更多种此类抗体或抗体片段可以组合(例如,在夹心ELISA中)或串联使用。在某些情况下,统计算法是单一学习统计分类器系统。例如,单一学习统计分类器系统可以用于基于HHLA2的预测或概率值和存在或水平将样品分类为HHLA2样品。单一学习统计分类器系统的使用通常以至少约75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的敏感性、特异性、正预测值、负预测值和/或总体准确性将样品分类为HHLA2样品。

[1077] 其他合适的统计算法是本领域技术人员熟知的。例如,学习统计分类器系统包括能够适应复杂数据组(例如,目标标记物的组)并且基于此类数据组做出决定的机器学习算法技术。在一些实施例中,使用单一的学习统计分类器系统,诸如分类树(例如,随机森林)。在其他实施例中,优选地串联使用2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个学习统计分类器系统的组合。学习统计分类器系统的实例包括但不限于使用以下的那些:归纳学习(例如,决策/分类树诸如随机森林、分类和回归树(C&RT)、增强树等)、可能近似正确(PAC)学习、连接学习(例如,神经网络(NN)、人工神经网络(ANN)、模糊神经网络(NFN)、网络结构、感知器诸如多层感知器、多层前馈网络、神经网络的应用、信任网络中的贝叶斯学习等)、强化学习(例如,已知环境中的被动学习诸如朴素学习、自适应动态学习和时序差分学习,未知环境中的被动学习,未知环境中的主动学习,学习-动作值函数,强化学习的应用等)以及遗传算法和进化规划。其他学习统计分类器系统包括支持向量机(例如,核方法),多元自适应回归样条(MARS),莱文伯格-马夸特算法(Levenberg-Marquardt algorithm),高斯-牛顿算法(Gauss-Newton algorithm),高斯算法、梯度下降算法和学习向量量化(LVQ)的混合。在某

些实施例中,本发明的方法进一步包含将HLA2样品分类结果发送给临床医生,例如组织病理学家或肿瘤学家。

[1078] 在另一个实施例中,本发明的方法进一步提供了呈个体患有与HHLA2相关联的病状或病症的概率的形式的诊断。例如,个体可以具有患有所述病状或病症的约0%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更大的概率。在再一个实施例中,本发明的方法进一步提供了个体的病状或病症的预后。在一些情况下,将样品分类为HHLA2样品的方法进一步基于从其获得样品的个体的症状(例如,临床因素)。症状或症状的组可以是例如淋巴细胞计数、白细胞计数、红细胞沉降速率、腹泻、腹痛、痉挛、发烧、贫血、体重减轻、焦虑、抑郁及其组合。在一些实施例中,将个体诊断为患有与HHLA2相关联的病状或病症之后,向个体施用治疗有效量的可用于治疗与病状或病症相关联的一种或多种症状的药物(例如,化疗剂)。

[1079] 在一个实施例中,所述方法进一步涉及获得对照生物样品(例如,来自未患由HHLA2介导的病状或病症的受试者的生物样品)、在缓解期间或在发展由HHLA2介导的病状或病症之前从受试者获得的生物样品或在针对发展由HHLA2介导的病状或病症进行治疗期间从受试者获得生物样品。

[1080] 用于检测HHLA2多肽或其片段的存在或不存在的示例性方法是能够结合HHLA2多肽的本发明的抗体或其片段,优选地具有可检测标记的抗体。抗体可以是多克隆的,或更优选地单克隆的。此类试剂可以被标记。关于抗体的术语“标记的”旨在涵盖通过将可检测物质偶联(即,物理连接)至探针或抗体来直接标记探针或抗体以及通过与直接标记的另一种试剂的反应性来间接标记探针或抗体。间接标记的实例包括使用荧光标记的二级抗体检测初级抗体。术语“生物样品”旨在包括从受试者分离的组织、细胞和生物液体,诸如血清,以及受试者体内存在的组织、细胞和液体。即,本发明的检测方法可以用于在体外以及体内生物样品中检测HHLA2或其片段。用于检测HHLA2多肽的体外技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、蛋白质印迹法、免疫沉淀、免疫组织化学(IHC)、细胞内流式细胞术和相关技术以及免疫荧光。此外,用于检测HHLA2多肽或其片段的体内技术包括将标记的抗HHLA2抗体引入受试者中。例如,抗体可以用以下物质标记:放射活性、发光、荧光或其在受试者中的存在和位置可以通过标准成像技术检测的其他相似标记物,其可以单独地使用或与其他分子的成像,诸如细胞类型的标记物(例如,CD8+T细胞标记物)组合使用。

[1081] 在一个实施例中,生物样品含有来自测试受试者的多肽分子。优选的生物样品是通过常规手段从受试者分离的血清、肿瘤微环境、癌周物质或瘤内物质。

[1082] 在另一个实施例中,所述方法进一步涉及从对照受试者获得对照生物样品;使对照样品与能够检测HHLA2多肽或其片段的化合物或试剂接触,使得在生物样品中检测HHLA2多肽或其片段的存在;以及将对照样品中HHLA2多肽或其片段的存在与测试样品中HHLA2多肽或其片段的存在进行比较。

[1083] 在又其他实施例中,抗体可以与ELISA或RIA中用于抗体的部件或装置缔和。非限制性实例包括抗体固定在用于这些测定的固体表面上(例如,基于如上所述的光或辐射发射连接和/或缀合至可检测标记)。在其他实施例中,通过使用免疫色谱或免疫化学测定,诸如在“夹心”或竞争性测定、免疫组织化学、免疫荧光显微镜等中,将抗体与用于检测HHLA2的装置或条缔和。此类装置或条的额外实例是针对家庭测试或快速即时测试设计的那些。

另外的实例包括针对单个样品中多个分析物的同时分析设计的那些。例如,可以施加本发明的未标记的抗体以“捕获”生物样品中的HHLA2多肽,并且捕获的(或固定的)HHLA2多肽可以结合用于检测的本发明的抗HHLA2抗体的标记形式。免疫测定的其他标准实施例是本领域技术人员熟知的,包括基于例如免疫扩散、免疫电泳、免疫组织病理学、免疫组织化学和组织病理学的测定。

[1084] 2.预后性测定

[1085] 本文所述的诊断性方法可以进一步用于鉴定患有与HHLA2相关联的病症或具有发展所述病症的风险的受试者。如本文所用,术语“异常的”包括偏离正常HHLA2水平的HHLA2上调或下调。异常表达或活性包括增加的或降低的表达或活性,以及不遵循正常表达发展模式或亚细胞表达模式的表达或活性。例如,异常HHLA2水平旨在包括其中HHLA2基因或调控序列的突变或其染色体HHLA2基因的扩增导致HHLA2的上调或下调的情况。如本文所用,术语“不想要的”包括生物应答诸如免疫细胞活化中涉及的不想要的现象。例如,术语不想要的包括受试者中不期望的HHLA2。

[1086] 多种与HHLA2相关联的病症是本领域技术人员已知的,如在实例中进一步解释的。HHLA2由多种肿瘤类型表达,包括选择淋巴恶性肿瘤、病毒诱导的癌症和多种实体瘤。通常,HHLA2是不良的预后性标记物,因为它活化抑制针对有需要的病状的强免疫应答的免疫检查点调节剂。然而,免疫抑制是治疗多种病症(诸如自身免疫性疾病、炎性疾病等)中下调免疫应答所需的。

[1087] 本文所述的测定(诸如前面的诊断性测定或后面的测定)可以用于鉴定患有与HHLA2活化的失调相关联的病症或具有发展所述病症的风险的受试者。因此,本发明提供了一种用于鉴定与异常或不想要的HHLA2活化相关联的病症的方法,其中从受试者获得测试样品并且检测HHLA2,其中HHLA2多肽的存在对于患有与异常或不想要的HHLA2活性相关联的病症或具有发展所述病症的风险的受试者是诊断性的。如本文所用,“测试样品”是指从目标受试者获得的生物样品。例如,测试样品可以是生物液体(例如,脑脊液或血清)、细胞样品或组织,诸如肿瘤微环境、癌周区域和/或瘤内区域的组织病理学切片。在优选实施例中,样品包含表达成熟膜结合的HHLA2和/或HHLA2片段的细胞。

[1088] 此外,本文所述的预后性测定可以用于确定是否可以向受试者施用试剂(例如,激动剂、拮抗剂、模拟肽、多肽、肽、核酸、小分子或其他药物候选物)以治疗与异常或不想要的HHLA2活性相关联的此类病症。例如,此类方法可以用于确定是否可以用一种试剂或试剂的组合有效地治疗受试者。因此,本发明提供了用于确定是否可以用一种或多种用于治疗与异常或不想要的HHLA2活化相关联的病症的试剂有效地治疗受试者的方法,其中获得测试样品并且检测HHLA2(例如,其中HHLA2多肽的丰度对于可以施用试剂以治疗与异常或不想要的HHLA2活化相关联的病症的受试者是诊断性的)。

[1089] 本文所述的方法可以例如通过利用包含至少一种本文所述的抗体试剂的预包装的诊断试剂盒来进行,所述诊断试剂盒可以例如在临床环境中方便地使用来诊断表现出涉及HHLA2的疾病或病情的症状或家族史的患者。

[1090] 此外,其中表达HHLA2的任何细胞类型或组织可以用于本文所述的诊断性测定。

[1091] 本发明的另一方面包括本文所述的组合物和方法用于关联和/或分层分析的用途,其中分析来自患有与异常HHLA2活化相关联的病症的个体的生物样品中的HHLA2,并且

将信息与优选地具有相似年龄和种族的对照(例如,未患所述病症的个体;对照还可以被称为“健康”或“正常”个体或在给定时移研究的较早时间点处)的信息进行比较。患者和对照的适当选择对于关联和/或分层研究的成功具有重要性。因此,非常需要具有良好表征的表型的个体的池。本文描述了疾病诊断、疾病易感性筛选、疾病预后、确定药物应答性(药物基因组学)、药物毒性筛选等的准则。

[1092] 不同的研究设计可以用于遗传关联和/或分层研究(《现代流行病学(Modern Epidemiology)》,威尔金斯出版公司(Lippincott Williams&Wilkins)(1998),609-622)。观察研究是最常进行的,其中不干扰患者的应答。第一种类型的观察研究鉴定其中存在疾病的疑似病因的人的一种样品和其中疑似病因不存在的人的另一种样品,并且然后比较两种样品中疾病发展的频率。这些采样群体被称为群组,并且所述研究是前瞻性研究。另一种类型的观察研究是病例对照或回顾性研究。在典型的病例对照研究中,从具有目标表型(病例)(诸如疾病的某些表现)的个体并且从由其得出结论的群体(靶群体)中没有所述表型的个体(对照)采集样品。然后回顾性地研究疾病的可能病因。因为在病例对照研究采集样品的时间和成本明显小于前瞻性研究的那些,所以病例对照研究是遗传关联研究中最常用的研究设计,至少在探索与发现阶段期间如此。

[1093] 在获得所有的相关表型和/或基因型信息之后,进行统计分析以确定等位基因或基因型的存在与个体的表型特征之间是否存在任何显著的关联。优选地,在进行遗传关联的统计测试之前,首先进行数据检查和清理。可以通过本领域熟知的表和图的描述性统计总结样品的流行病学和临床数据。优选地进行数据验证以检查数据完成、不一致的条目和异常值。然后可以使用卡方检验和t检验(如果分布不正常,则使用Wilcoxon秩和检验)来分别检查离散和连续变量的病例与对照之间的显著差异。

[1094] 进行遗传关联测试的重要决定是确定显著水平,在所述水平下,当检验的p值达到该水平时,可以宣称显著关联。在后续确认性测试中追踪到阳性命中的探索性分析中,未调整的p值<0.2(宽松侧上的显著水平)例如可以用于生成HHLA2水平与疾病的某些表型特征的显著关联的假设。优选实现p值<0.05(本领域中传统上使用的显著水平),以使所述水平被认为与疾病具有关联。当在相同来源的更多样品中或在不同来源的不同样品中在确认性测试中追踪到命中时,对多个测试进行调整以便避免过多数量的命中,同时将实验误差率维持在0.05。虽然存在不同的方法来对多个测试进行调整以控制不同种类的误差率,但是常用且保守的方法是Bonferroni校正以控制实验或总体误差率(《多重比较和多个测试(Multiple comparisons and multiple tests)》,Westfall等人,赛仕软件研究所(SAS Institute)(1999))。控制伪发现率FDR的置换检验可能是更强力的(Benjamini和Hochberg,《皇家统计学会杂志(Journal of the Royal Statistical Society)》,B 57系列,1289-1300,1995,《基于重采样的多重测试(Resampling-based Multiple Testing)》,Westfall和Young,威利(1993))。当测试是依赖性的并且控制伪发现率相对于控制实验误差率是足够的,则用此类方法控制多重性是优选的。

[1095] 一旦发现对疾病易感性的个体风险因素(遗传的或非遗传的),就可以设定分类/预测方案以根据其表型和/或基因型和其他非遗传风险因素来预测个体所处于的类别(例如,疾病或非疾病)。离散性状的逻辑回归和连续性状的线性回归是此类任务的标准技术(《应用回归分析(Applied Regression Analysis)》,Draper和Smith,威利(1998))。此外,

其他技术也可以用于设定分类。此类技术包括但不限于MART、CART、神经网络和适用于比较不同方法的性能的判别分析(《统计学习精要(The Elements of Statistical Learning)》,Hastie,Tibshirani&Friedman,Springer(2002))。

[1096] 3.在临床试验期间监测作用

[1097] 监测试剂(例如,化合物、药物或小分子)对于HHLA2多肽或其片段的影响(例如,细胞增殖和/或迁移的调控)不仅可以应用于基础药物筛选,也可以应用于临床试验。例如,通过如本文所述的筛选测定确定的试剂降低HHLA2基因表达、多肽水平或下调HHLA2活性的有效性可以在表现出降低的HHLA2基因表达、多肽水平或下调的HHLA2活性的受试者的临床试验中监测,或者可以在表现出可通过本文所述的抗HHLA2抗体或片段检测的降低的HHLA2表达的受试者的临床试验中监测。在此类临床试验中,目标病症的HHLA2基因和/或症状或标记物的表达或活性可以用作特定细胞、组织或系统的表型的"读出"或标记物。类似地,通过如本文所述的筛选测定确定的试剂增加HHLA2基因表达、多肽水平或增加HHLA2活性的有效性可以在表现出增加的HHLA2基因表达、多肽水平或增加的HHLA2活性的受试者的临床试验中监测,或者可以在表现出可通过本文所述的抗HHLA2抗体或片段检测的增加的HHLA2的受试者的临床试验中监测。在此类临床试验中,目标病症的HHLA2基因和/或症状或标记物的表达或活性可以用作特定细胞、组织或系统的表型的"读出"或标记物,诸如针对自身免疫性病症。

[1098] 例如并且不受限制地,可以鉴定细胞中通过用调控HHLA2活性(例如,在如本文所述的筛选测定中鉴定)的试剂(例如,化合物、药物或小分子)进行的治疗调控的基因,包括HHLA2。因此,为了例如在临床试验中研究试剂对于与异常HHLA2活化相关联的病症的作用,可以分离细胞,制备核酸和/或蛋白质并且分析与异常HHLA2活化相关联的病症中牵涉的HHLA2和/或其他基因的水平。通过使用本文所述的方法中的一种测量产生的多肽的量或通过测量HHLA2或其他基因的水平来分析基因表达的水平(例如,基因表达模式)。以这种方式,基因表达模式可以充当指示细胞对试剂的生理应答的标记物。因此,该应答状态可以在用试剂治疗个体之前和在所述治疗期间的不同点处确定。

[1099] 在优选实施例中,本发明提供了一种用于监测用试剂(例如,通过本文所述的筛选测定鉴定的激动剂、拮抗剂、模拟肽、多肽、肽、核酸、小分子或其他药物候选物)治疗受试者的有效性的方法,其包括以下步骤:(i)在施用所述试剂之前从受试者获得施用前样品;(ii)检测施用前样品中HHLA2多肽或其片段的水平;(iii)从受试者获得一个或多个施用后样品;(iv)检测施用后样品中HHLA2多肽或其片段的水平;(v)将施用前样品中HHLA2多肽或其片段的水平与一个或多个施用后样品中HHLA2多肽的水平进行比较;以及(vi)相应地改变对受试者的试剂施用。例如,可能希望增加的试剂施用以使HHLA2降低至低于所检测的水平,即增加试剂的有效性。根据此类实施例,HHLA2可以用作试剂的有效性的指示物,甚至在可观察到的表型应答不存在的情况下也是如此。类似地,诸如通过免疫组织化学(IHC)进行的HHLA2分析也可以用于选择接受HHLA2免疫疗法以抑制一个或多个免疫检查点的患者。如本文所述,具有HHLA2活化的肿瘤的患者更可能对HHLA2 mAb免疫疗法产生应答。免疫疗法初始地导致免疫活化,并且活化的T细胞将表达IFN-γ,其进而上调HHLA2活化。通常,这将导致HHLA2接合和免疫应答的下调,但是因为HHLA2可能被如本文所述的抗HHLA2 mAb阻断,所以继续免疫应答,直至消除所需的病状,诸如肿瘤。相比之下,通过HHLA2主动发出信号的

mAb直接下调免疫应答。

[1100] 4.治疗性方法和用途

[1101] 在一些实施例中,本发明的抗体、片段或免疫缀合物(例如,单独的抗HHLA2抗体或缀合至治疗性部分)可用于治疗与异常或不期望的HHLA2活化相关联的任何病症(例如,癌症)。在某些实施例中,所述治疗是针对哺乳动物,诸如人。本发明的此类抗体可以单独使用或与治疗目标病症的任何合适的试剂或适当疗法组合使用。例如,据信当治疗包含HHLA2或另一种免疫检查点或共刺激性分子的细胞时,治疗性协同作用显现出来。

[1102] 熟知的是,治疗性单克隆抗体可以导致细胞外携带特异性地被抗体识别的抗原的细胞的缺失。该缺失可以通过至少三种机制介导:抗体介导的细胞毒性(ADCC),补体依赖性裂解,和通过经由被抗体靶向的抗原给出的信号对肿瘤生长进行的直接抗肿瘤抑制。

[1103] "补体依赖性细胞毒性"或"CDC"是指在补体存在的情况下对靶细胞的裂解。经典补体途径的活化通过补体系统的第一组分与结合其同源抗原的抗体的结合启动。为了评定补体活化,可以进行CDC测定,例如,如Gazzano-Santoro等人(1997)所述。

[1104] "抗体依赖性细胞介导的细胞毒性"或"ADCC"是指一种形式的细胞毒性,其中结合到存在于某些细胞毒性细胞(例如,自然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)上的Fc受体(FcR)上的分泌型抗体使得这些细胞毒性效应细胞能够特异性地结合携带抗原的靶细胞并且随后杀伤靶细胞。为了评定目标分子的ADCC活性,可以进行体外ADCC测定,诸如美国专利第5,500,362或5,821,337号中所述。如本领域熟知的,Fc部分可以进行工程化以实现与Fc受体的所需相互作用或其缺乏。

[1105] 对于细胞内靶的抗体介导的结合、中和和/或调控,应当进行某些修饰。如本文所述,某些抗体形式(诸如sFv和Fab)适用于抗体样分子的细胞内表达。制备和使用此类适应性抗体样分子以用于在其中它们以特异性途径抵抗抗原或分子的细胞的不同区室(包括核、ER、细胞质、高尔基体、质膜、线粒体)中的靶向表达的方法是熟知的(参见,至少美国专利公布2008-0233110和2003-0104402;Marasco等人(1993)《美国科学院院报》90:7889-7893;Chen等人(1994)《人基因疗法(Human Gene Therapy)》5:595-601;Chen等人(1994)《美国科学院院报》91:5932-5936;Mhashilkar等人(1995)《欧洲分子生物学学会会刊(EMBO J.)》14:1542-1551;Marasco等人(1997)《基因疗法(Gene Therapy)》4:11-15;Richardson等人(1995)《美国科学院院报》92:3137-3141;以及Duan等人(1994)《人基因疗法》5:1315-1324)。

[1106] 如本文所用,术语"细胞内免疫球蛋白分子"是完整免疫球蛋白,其与天然存在的分泌性免疫球蛋白相同,但是在合成之后保留在细胞内。"细胞内免疫球蛋白片段"是指任何片段,包括细胞内免疫球蛋白分子的单链片段。因此,细胞内免疫球蛋白分子或其片段不在细胞的外表面上分泌或表达。单链细胞内免疫球蛋白片段在本文中被称为"单链免疫球蛋白"。如本文所用,术语"细胞内免疫球蛋白分子或其片段"被理解为涵盖"细胞内免疫球蛋白"、"单链细胞内免疫球蛋白"(或其片段)、"细胞内免疫球蛋白片段"、"细胞内抗体"(或其片段)和"胞内抗体"(或其片段)。由此,术语"细胞内免疫球蛋白"、"细胞内Ig"、"细胞内抗体"和"胞内抗体"可以在本文中互换使用,并且全部涵盖在"细胞内免疫球蛋白分子或其片段"的基因定义内。在一些实施例中,本发明的细胞内免疫球蛋白分子或其片段可以包含两个或更多个亚基多肽,例如"第一细胞内免疫球蛋白亚基多肽"和"第二细胞内免疫球蛋

白亚基多肽”。然而,在其他实施例中,细胞内免疫球蛋白可以是仅包含单个多肽的“单链细胞内免疫球蛋白”。如本文所用,“单链细胞内免疫球蛋白”被定义为具有所需活性,例如与抗原细胞内结合的任何一元片段。因此,单链细胞内免疫球蛋白涵盖包含一起用来结合抗原的重链和轻链可变区两者的那些以及仅具有单个结合抗原的可变区(例如,如本文所述的“驼源化”重链可变区)的单链细胞内免疫球蛋白。细胞内免疫球蛋白或Ig片段可以在细胞内基本上任何地方表达,诸如在细胞质中,在细胞膜的内表面上,或在亚细胞区室(还被称为细胞亚区室或细胞区室)中,诸如核、高尔基体、内质网、核内体、线粒体等。额外的细胞亚区室包括本文所述且本领域熟知的那些。

[1107] 此类细胞内免疫球蛋白在含有待靶向的抗原的受体细胞或宿主细胞中表达。本发明的宿主细胞优选是真核细胞或细胞系,优选地是植物、动物、脊椎动物、哺乳动物、啮齿类动物、小鼠、灵长类动物或人细胞或细胞系。

[1108] 不受理论限制,据信本文所述的免疫球蛋白多肽的细胞内表达实现对HHLA2的细胞内靶向和结合,从而例如通过调控分子在通过结合抑制性受体而活化时传播信号传导的能力等来在空间上调控其进行信号传导的能力,和/或在增加多种HHLA2分子的局部有效浓度时调控信号传导。

[1109] 在一些实施例中,本发明的抗体可以缀合至治疗性部分,诸如如先前所述的生长抑制剂、细胞毒性剂或前药活化酶。本发明的抗体可以用于将所述生长抑制剂、细胞毒性剂或前药靶向到表达不足或过表达所需量的HHLA2的细胞。

[1110] 因此,本发明的目标涉及一种用于治疗与异常HHLA2活化相关联的病症的方法,其包含向有需要的受试者施用治疗有效量的本发明的抗体、片段或免疫缀合物。

[1111] 可替代地,在一些实施例中,除关于上调免疫应答的诊断性、预后性和预防应用以外,本发明的抗体或抗原结合片段可用于治疗性应用。上调免疫应答可以呈增强现有免疫应答或引发初始免疫应答的形式。例如,使用主题组合物和方法增强免疫应答可用于改善针对癌症和微生物感染(例如,细菌、病毒或寄生虫)的免疫防御的情况。例如,如本文所述,上调或增强免疫应答功能可用于诱导肿瘤免疫性。

[1112] 在另一个实施例中,免疫应答可以通过本文所述的方法来刺激,使得先前存在的耐受性、克隆缺失和/或耗竭(例如,T细胞耗竭)被克服。例如,可以通过施用本文所述的上调免疫应答的合适试剂来诱导针对受试者无法对其进行显著免疫应答(例如,针对自体抗原,诸如肿瘤特异性抗原)的抗原的免疫应答。在一个实施例中,可以共施用自体抗原,诸如肿瘤特异性抗原。在另一个实施例中,可以针对抗原(例如,自体抗原)刺激免疫应答以治疗神经障碍。在另一个实施例中,主题试剂可以用作佐剂以在主动免疫的过程中加强对外源抗原的应答。

[1113] 在某些情况下,可能期望进一步施用上调免疫应答的其他试剂,例如其他B7家族成员的经由共刺激性受体转导信号的形式,以便进一步加强免疫应答。另外,上调免疫应答的试剂可以在针对各种多肽(例如,来源于病原体的多肽)的疫苗中预防性地使用。针对病原体(例如,病毒)的免疫性可以通过接种病毒蛋白以及呈适当的佐剂形式的上调免疫应答的试剂来诱导。

[1114] 可替代地,在一些实施例中,除诊断性、预后性和预防应用以外,本发明的抗体和抗原结合片段可用于治疗性应用(诸如治疗疾病并延迟疾病的发作或进展),以抑制上调免

疫反应的疾病,例如哮喘、自身免疫性疾病(肾小球肾炎、关节炎、扩张型心肌病样疾病、溃疡性结肠炎、斯耶格伦综合征(Sjogren syndrome)、克罗恩病、全身性红斑、慢性类风湿性关节炎、多发性硬化症、银屑病、过敏性接触性皮炎、多发性肌炎、皮肥厚、结节性动脉外膜炎、风湿热、寻常型白癜风、胰岛素依赖型糖尿病、白塞病、桥本氏病、艾迪生病(Addison disease)、皮肌炎、重症肌无力、赖特综合征、格雷夫斯病(Graves'disease)、恶性贫血、肺出血肾炎综合征、不育症、慢性活动性肝炎、天疱疮、自身免疫性血小板减少性紫癜和自身免疫性溶血性贫血、活动性慢性肝炎、艾迪生病、抗磷脂综合征、特应性过敏、自身免疫性萎缩性胃炎、自身免疫性胃酸缺乏(achlorhydra autoimmune)、乳糜泻、库欣综合征(Cushing's syndrome)、皮肌炎、盘状红斑狼疮、古德帕斯彻综合征(Goodpasture's syndrome)、桥本甲状腺炎、特发性肾上腺萎缩、特发性血小板减少、胰岛素依赖性糖尿病、肌无力综合征(Lambert-Eaton syndrome)、狼疮性肝炎、淋巴细胞减少的一些病例、混合性结缔组织病、类天疱疮、寻常型天疱疮、恶性贫血、晶状体源性葡萄膜炎、结节性多动脉炎、多内分泌腺自身综合症、原发性胆汁性肝硬化、原发性硬化性胆管炎、雷诺综合征(Raynaud's syndrome)、复发性多软骨炎、施密特氏综合征(Schmidt's syndrome)、局限性硬皮病(或crest综合征)、交感性眼炎、系统性红斑狼疮、大动脉炎(Takayasu's arteritis)、颞动脉炎、甲状腺毒、b型胰岛素抵抗、溃疡性结肠炎和韦格纳肉芽肿(Wegener's granulomatosis))。

[1115] 类似地,除诊断性、预后性和预防应用以外,本发明的抗体和抗原结合片段可用于针对以下的治疗性应用(诸如治疗疾病并延迟疾病的发作或进展):持续感染性疾病(例如,病毒感染性疾病,包括HPV、HBV、丙型肝炎病毒(HCV),逆转录病毒诸如人免疫缺陷病毒(HIV-1和HIV-2),疱疹病毒诸如Epstein Barr病毒(EBV)、巨细胞病毒(CMV)、HSV-1和HSV-2以及流感病毒)。与病原体相关联的可以如本文所述使用的其他抗原是各种寄生虫的抗原,包括疟疾,优选基于NANP的重复序列的疟疾肽。此外,包括细菌、真菌和其他病原体疾病,诸如曲霉属、布鲁格氏丝虫属(Brugia)、念珠菌属、衣原体、球虫、隐球菌属、恶丝虫属、淋球菌、组织胞浆菌属、利什曼原虫、分支杆菌属、支原体、草履虫属、百日咳、疟原虫属、肺炎球菌属、肺囊虫属、立克次氏体属、沙门氏菌、志贺氏菌属、葡萄球菌属、链球菌属、弓形虫和霍乱弧菌。示例性物种包括淋病双球菌、结核分枝杆菌、白色念珠菌、热带念珠菌、阴道毛滴虫、阴道嗜血杆菌、B群链球菌种、人型支原体、杜克雷氏嗜血杆菌、腹股沟肉芽肿、腹股沟淋巴肉芽肿、梅毒螺旋体、流产布鲁氏菌、山羊布鲁氏菌、猪布鲁氏菌、犬布鲁氏菌、胎儿弯曲杆菌、胎儿肠弯曲杆菌、波蒙纳钩端螺旋体、单核细胞增生李斯特氏菌、绵羊布鲁氏菌、鹦鹉热衣原体、牛毛滴虫、刚地弓形虫、大肠杆菌、马驹放线杆菌、羊流产沙门氏菌、马流产沙门氏菌、铜绿假单胞菌、马棒状杆菌、化脓棒状杆菌、精液放线杆菌、牛生殖道支原体、烟曲霉、分枝犁头霉、马媾疫锥虫、弩巴贝虫、破伤风梭菌、肉毒杆菌;或真菌,例如像巴西芽生菌;或其他病原体,例如恶性疟原虫。还包括美国国家过敏与传染病研究所(NIAID)优先级病原体。这些包括A类别试剂,诸如重型天花(天花)、炭疽杆菌(炭疽)、鼠疫耶尔森菌(瘟疫)、肉毒梭菌毒素(肉毒中毒)、土拉弗朗西斯菌(土拉菌病)、丝状病毒(埃博拉出血热、马尔堡出血热)、沙粒病毒(拉沙病毒(拉沙热)、胡宁病毒(阿根廷出血热)和相关病毒);B类别试剂,诸如立克次体(Q热)、布鲁氏菌种(布鲁氏菌病)、鼻疽伯克霍尔德氏菌(鼻疽病)、甲病毒(委内瑞拉马脑脊髓炎、东方型和西方型马脑脊髓炎病毒)、来自蓖麻的蓖麻毒素(蓖麻籽)、产

气荚膜梭菌的ε毒素;葡萄球菌肠毒素B、沙门氏菌种、痢疾志贺氏菌、大肠杆菌菌株O157:H7、霍乱弧菌、微小隐孢子虫;C类别试剂,诸如立百病毒、汉坦病毒、蜱传性出血热病毒、蜱传性脑炎病毒、黄热病和耐多药结核病;蠕虫,诸如血吸虫和带绦虫;以及原生动物,诸如利什曼原虫(例如,墨西哥利什曼原虫)和疟原虫。

[1116] 在又一个实施例中,除诊断性、预后性和预防应用以外,本发明的抗体或抗原结合片段可用于关于以下的治疗性应用:免疫耐受性的诱导、器官移植排斥反应、移植物抗宿主病(GVHD)、过敏性疾病和通过由HHLA2介导的免疫反应的减弱导致的疾病。

[1117] 在本发明的上下文中,如本文所用,术语"治疗(treating或treatment)"意指逆转、减轻、抑制此类术语所适用的病症或病状的进展或此类病症或病状的一种或多种症状,或预防所述进展或所述一种或多种症状。如本文所用,术语"治疗癌症"意指对癌细胞的生长和/或增殖的抑制。优选地,此类治疗还导致肿瘤生长的退化(即,可测量的肿瘤的大小减小)。更优选地,此类治疗导致肿瘤的完全退化。

[1118] 在一些实施例中,术语"患者"或"有需要的患者"意指受到或可能受到与HHLA2的异常活化相关联的癌症影响的人或非人哺乳动物。

[1119] 本发明的多肽的"治疗有效量"意指抗体的足以在可应用于任何医疗治疗的合理的利益/风险比下治疗目标病症(诸如癌症)的量。然而,应当理解,本发明的抗体和组合物的总每日用量将由主治医师在合理医学判断范围内决定。对任何具体患者的特定治疗有效剂量水平将取决于各种因素,所述因素包括所治疗的病症和病症的严重性;所采用的特定抗体的活性;所采用的特定组合物;患者的年龄、体重、一般健康状况、性别和饮食;所采用的特定抗体的施用时间、施用途径和排泄速率;治疗持续时间;与所采用的特定多肽组合或同步使用的药物;以及医学领域中熟知的类似因素。例如,本领域技术人员熟知的是,在比实现所需治疗性作用所需的水平低的水平下开始化合物的剂量,并且逐渐增加剂量,直至实现所需作用。

[1120] 通过将具有所需纯度的抗体与任选的生理学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂(《雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》第16版,Osol,A.编辑(1980))混合、呈冻干制剂或水溶液形式来制备储存包含本发明的一种或多种抗体的治疗性制剂。抗体组合物将以符合优良医学规范的方式配制、给药和施用。在此情形下的考虑因素包括所治疗的具体病症、所治疗的具体哺乳动物、个体患者的临床病状、病症的病因、试剂递送部位、施用方法、施用时程以及医学从业者已知的其他因素。

[1121] 治疗性剂量可以是至少约0.01μg/kg体重、至少约0.05μg/kg体重;至少约0.1μg/kg体重、至少约0.5μg/kg体重、至少约1μg/kg体重、至少约2.5μg/kg体重、至少约5μg/kg体重且不多于约100μg/kg体重。本领域技术人员应理解,例如在抗体片段的使用中或在抗体缀合物的使用中,此类指南将针对活性剂的分子量来调整。剂量也可以针对局部施用(例如,鼻内、吸入等)或针对系统性施用(例如,i.m.、i.p.、i.v.等)来改变。

[1122] 组合物不需要但是任选地用一种或多种增强活性或另外增加治疗性作用的试剂配制。这些通常以与上文所用的相同剂量和施用途径或上文采用的剂量的约1%至99%的剂量使用。

[1123] 可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所用剂量和浓度下对受体无毒,并且包括缓冲液,诸如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和蛋氨酸;防腐剂(诸如

氯化十八烷基二甲基苯甲基铵;氯化六烃季铵;苯扎氯铵,苄索氯铵;苯酚、丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;以及间甲酚);低分子量(小于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖,诸如蔗糖、甘露糖醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子,诸如钠;金属配合物(例如,Zn-蛋白质复合物);和/或非离子表面活性剂,诸如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。待用于体内施用的制剂必须是无菌的。这易于通过无菌过滤膜过滤来实现。

[1124] 活性成分还可以包埋在例如通过凝聚技术或通过界面聚合所制备的微囊中,例如分别在胶态药物递送系统(例如脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米粒子及纳米胶囊)中或在巨乳液中的羟甲基纤维素或明胶-微囊及聚-(甲基丙烯酸甲酯)微囊。此类技术在《雷明顿药物科学》第16版,Osol,A.编辑(1980)中公开。

[1125] 本文所述的组合物可以通过任何合适的手段施用,包括肠胃外、皮下、腹腔内、肺内和鼻内。肠胃外输注包括肌肉内、静脉内、动脉内、腹腔内或皮下施用。此外,组合物可以适合地通过脉冲输注,特别是以降低剂量的抗体施用。

[1126] 对于预防或治疗疾病,抗体的适当剂量将取决于如上定义的待治疗的疾病的类型、疾病的严重性和病程、施用抗体是否是出于预防目的、先前疗法、患者的临床病史和对抗体的应答以及主治医师的判断。抗体合适地以一次或经一系列治疗向患者施用。

[1127] 本发明的治疗剂可以单独使用,或者可以以与例如化疗剂、激素、抗血管生长素(antiangiogens)、放射标记的化合物或与手术、冷冻疗法和/或放射疗法组合的疗法施用。前面的治疗方法可以结合其他形式的常规疗法(例如,本领域技术人员熟知的癌症的标准护理治疗),与常规疗法连续地、在常规疗法之前或之后施用。例如,本发明的试剂可以与治疗有效剂量的化疗剂一起施用。在另一个实施例中,本发明的试剂结合化疗施用以增强化疗剂的活性和功效。医生案头参考(PDR)公开了用于治疗各种癌症的化疗剂的剂量。这些前述化疗药物的治疗有效的给药方案和剂量将取决于所治疗的具体癌症、疾病的程度和本领域医师熟悉的其他因素,并且可以由医师决定。

[1128] 癌症疫苗还可以与靶向疗法(例如,免疫疗法)组合施用。术语“靶向疗法”是指施用选择性地与所选的生物分子相互作用的试剂,从而治疗癌症。例如,关于抑制免疫检查点抑制剂的靶向疗法可用于与本发明的方法组合。术语“免疫检查点抑制剂”意指CD4+和/或CD8+T细胞的细胞表面上通过下调或抑制抗肿瘤免疫应答来微调免疫应答的一组分子。免疫检查点蛋白是本领域熟知的并且包括但不限于CTLA-4、PD-1、VISTA、B7-H2、B7-H3、PD-L1、B7-H4、B7-H6、2B4、ICOS、HVEM、PD-L2、CD160、gp49B、PIR-B、KIR家族受体、TIM-1、TIM-3、TIM-4、LAG-3、BTLA、SIRPα(CD47)、CD48、2B4(CD244)、B7.1、B7.2、ILT-2、ILT-4、TIGIT、HHLA2、TMIDG2、KIR3DL3和A2aR(参见例如,WO 2012/177624)。一种或多种免疫检查点抑制剂的抑制可以阻断或以其他方式中和抑制性信号传导,从而上调免疫应答以便更有效地治疗癌症。在一些实施例中,癌症疫苗与免疫检查点的一种或多种抑制剂(诸如PD1、PD-L1和/或CD47抑制剂)组合施用。

[1129] 免疫疗法是可以包含例如使用额外的癌症疫苗和/或致敏抗原呈递细胞的靶向疗

法的一种形式。例如,溶瘤病毒是能够感染并裂解癌细胞,同时不伤害正常细胞的病毒,从而使得它们潜在地可用于癌症疗法。溶瘤病毒的复制促进肿瘤细胞破坏,并且还在肿瘤位点处产生剂量扩增。它们还可以充当抗癌基因的载体,从而使得所述抗癌基因被特异性地递送到肿瘤位点。免疫疗法可以涉及宿主的短期保护的被动免疫,这通过施用针对癌症抗原或疾病抗原的预形成抗体(例如,施用任选地连接到化疗剂或毒素、连接到肿瘤抗原的单克隆抗体)实现。例如,已知抗VEGF和mTOR抑制剂对治疗肾细胞癌有效。免疫疗法还可以关注于使用癌细胞系的细胞毒性淋巴细胞识别的表位。可替代地,反义多核苷酸、核酶、RNA干扰分子、三螺旋多核苷酸等可以用于选择性地调控与肿瘤或癌症的启动、进展和/或病理学相关的生物分子。

[1130] 术语“非靶向疗法”是指施用不选择性地与所选的生物分子相互作用但仍治疗癌症的试剂。非靶向疗法的代表性实例包括但不限于化疗、基因疗法和放射疗法。

[1131] 在一个实施例中,使用化疗。化疗包括施用化疗剂。此类化疗剂可以是但不限于选自以下组的化合物的那些:铂化合物、细胞毒性抗生素、抗代谢物、抗有丝分裂剂、烷基化剂、砷化合物、DNA拓扑异构酶抑制剂、紫杉烷、核苷类似物、植物生物碱和毒素;以及其合成衍生物。示例性化合物包括但不限于,烷基化剂:顺铂、曲奥舒凡和曲磷胺;植物生物碱:长春碱、紫杉醇、多西他赛;DNA拓扑异构酶抑制剂:替尼泊苷、克雷斯托和丝裂霉素;抗叶酸剂:甲氨蝶呤、霉酚酸和羟基脲;嘧啶类似物:5-氟尿嘧啶、去氧氟尿苷和胞嘧啶阿拉伯糖苷;嘌呤类似物:巯基嘌呤和硫鸟嘌呤;DNA抗代谢物:2’-脱氧-5-氟尿苷、甘氨酸阿非迪霉素(aphidicolin glycinate)和吡唑并咪唑;以及抗有丝分裂剂:软海绵素、秋水仙碱和根霉菌素。还可以使用包含一种或多种化疗剂(例如,FLAG、CHOP)的组合物。FLAG包含氟达拉滨、胞嘧啶阿拉伯糖苷(Ara-C)和G-CSF。CHOP包含环磷酰胺、长春新碱、阿霉素和强的松。化疗剂的前述实例是示例性的并且不旨在是限制性的。

[1132] 在另一个实施例中,使用放射疗法。放射疗法中使用的放射可以是电离放射。放射疗法还可以是γ射线、X-射线或质子束。放射疗法的实例包括但不限于外线束放射疗法,放射性同位素(I-125、钯、铱)、放射性同位素诸如锶-89的组织间植入,胸部放射疗法,腹腔内P-32放射疗法和/或总腹盆腔放射疗法。对于放射疗法的一般概述,参见Hellman,第16章:《癌症管理的原理:放射疗法(Principles of Cancer Management:Radiation Therapy)》,第6版,2001,DeVita等人编辑,J.B.Lippencott公司,费城。放射疗法可以作为外线束放射或远距放射疗法施用,其中放射从远程源引导。放射治疗还可以作为内部疗法或近距放射疗法施用,其中放射源放置在体内接近癌细胞或肿瘤块处。还涵盖使用光动力学疗法,其包含施用光敏剂诸如血卟啉及其衍生物、苯并卟啉衍生物单酸(BPD-MA)、酞青类、光敏剂Pc4、去甲氧基-竹红菌甲素A;以及2BA-2-DMHA。

[1133] 在另一个实施例中,使用激素疗法。激素治疗性治疗可以包含例如激素激动剂、激素拮抗剂(例如,氟他胺、比卡鲁胺、他莫昔芬、雷洛昔芬、醋酸亮丙瑞林(LUPRON)、LH-RH拮抗剂)、激素生物合成和处理的抑制剂和类固醇(例如,地塞米松、类维生素A、三角肌、倍他米松、皮质醇、可的松、强的松、去氢睾丸素、糖皮质激素、盐皮质激素、雌激素、睾丸素、孕激素)、维生素A衍生物(例如,全反式维甲酸(ATRA));维生素D3类似物;抗促孕激素(例如,美服培酮、奥那斯酮)或抗雄激素(例如,醋酸环丙孕酮)。

[1134] 5.测定和筛选方法

[1135] 本发明的另一方面涉及筛选测定,包括基于非细胞的测定和异种移植物动物模型测定。在一个实施例中,所述测定提供一种用于诸如在人或动物模型测定中鉴定调控HHLA2信号传导的试剂,以便鉴定减少HHLA2信号传导、从而增加免疫应答的试剂和/或鉴定增加HHLA2信号传导、从而减少免疫应答的试剂的方法。

[1136] 在一个实施例中,本发明涉及用于筛选结合本文所述(例如,在表、附图、实例或另外在说明书中)的至少一种生物标记物诸如HHLA2、TMIGD2和KIR3DL3或调控本文所述的至少一种生物标记物的生物活性的测试剂的测定。在一个实施例中,一种用于鉴定此类试剂的方法涉及确定所述试剂调控(例如,抑制)本文所述的至少一种生物标记物的能力。

[1137] 在一个实施例中,测定是无细胞的或基于细胞的测定,其包含使本文所述的至少一种生物标记物与测试剂接触,以及诸如通过测量底物的直接结合或通过测量如下所述的间接参数来确定测试剂调控(例如,抑制)生物标记物的酶促活性的能力。

[1138] 例如,在直接结合测定中,生物标记物蛋白(或其相应的靶多肽或分子)可以与放射性同位素或酶促标记偶联,使得可以通过检测复合物中标记的蛋白质或分子来确定结合。例如,可以直接地或间接地用^{125}I、^{35}S、^{14}C或^{3}H标记靶,并且通过无线发射的直接计数或通过闪烁计数来检测放射性同位素。可替代地,可以用例如辣根过氧化酶、碱性磷酸酶或荧光素酶来酶促地标记靶,并且通过确定适当的底物向产物的转化来检测酶促标记。确定生物标记物与底物之间的相互作用还可以使用标准结合或酶促分析测定来实现。在以上所述的测定方法的一个或多个实施例中,可能期望固定多肽或分子以促进蛋白质或分子中的一者或两者的复合形式与非复合形式分离,以及适应测定的自动化。

[1139] 测试剂与靶的结合可以在适于容纳反应物的任何容器中实现。此类容器的非限制性实例包括微滴定板、测试管和微离心管。本文所述的抗体的固定形式还可以包括结合固相的抗体,所述固相为例如多孔、微孔(具有小于约1微米的平均孔直径)或大孔(具有大于约10微米的平均孔直径)材料,诸如膜、纤维素、硝化纤维素或玻璃纤维;珠,诸如由琼脂糖、聚丙烯酰胺或乳胶制备的珠;或皿、板或孔的表面,诸如由聚苯乙烯制备的那些。

[1140] 在替代性实施例中,确定所述试剂调控生物标记物与底物或者生物标记物与其天然结合配偶体之间的相互作用的能力可以通过确定测试剂调控多肽或其在信号传导途径(例如,反馈环)内的位置的下游或上游起作用的其他产物的活性的能力来实现。此类反馈环是本领域熟知的(参见例如,Chen和Guillemin(2009)《国际色氨酸研究杂志(Int.J.Tryptophan Res.)》2:1-19)。

[1141] HHLA2状态可以使用本文所述的抗HHLA2抗体测量。HHLA2表达减少指示所述试剂抑制HHLA2活性/信号传导,并且将试剂鉴定为可用于抑制HHLA2活性/信号传导并用于增加免疫应答。HHLA2与TMIGD2、KIR3DL3和/或抑制性受体的结合减少指示所述试剂抑制HHLA2活性/信号传导,并且将试剂鉴定为可用于抑制HHLA2活性/信号传导并用于增加免疫应答。与之相比,HHLA2表达增加指示所述试剂促进HHLA2活性/信号传导,并且将试剂鉴定为可用于促进HHLA2活性/信号传导并用于减少免疫应答。HHLA2与TMIGD2、KIR3DL3和/或抑制性受体的结合增加指示所述试剂促进HHLA2活性/信号传导,并且将试剂鉴定为可用于促进HHLA2活性/信号传导并用于减少免疫应答。

[1142] 本发明进一步涉及通过以上所述的筛选测定鉴定的新型试剂。因此,诸如在适当的动物模型中进一步使用如本文所述鉴定的试剂在本发明的范围内。例如,可以在动物模

型中使用如本文所述鉴定的试剂,以确定使用此类试剂进行的治疗的功效、毒性或副作用。可替代地,可以在动物模型中使用如本文所述鉴定的抗体,以确定此类试剂的作用机制。

[1143] 本发明的一方面涉及筛选测定,包括基于非细胞的测定和异种移植物动物模型测定。在一个实施例中,所述测定提供一种用于诸如在人中通过使用异种移植物动物模型测定来鉴定癌症是否可能对抗HHLA2抗体疗法产生应答,和/或试剂是否可以抑制可能不对抗HHLA2抗体疗法产生应答的癌细胞的生长或杀伤所述癌细胞的方法。

[1144] 6.预防性方法

[1145] 一方面,本发明提供了一种用于预防受试者的与不想要的或不太期望的免疫应答相关联的疾病或病状的方法。具有患有将受益于用要求保护的试剂或方法进行的治疗的疾病的风险的受试者可以例如通过本领域已知的诊断性或预后性测定中的任一种或组合鉴定。施用预防性剂可以在与不想要的或不太希望的免疫应答相关联的症状显现之前发生。用于治疗的适当的试剂(例如,抗体、肽、融合蛋白或小分子)可以基于临床适应症确定,并且可以例如使用本文所述的筛选测定鉴定。

[1146] VII.药物组合物

[1147] 调控(例如,抑制或促进)HHLA2与一种或多种天然结合配偶体(诸如TMIGD2和/或KIR3DL3)之间的相互作用的试剂(包括例如阻断性抗体、肽、融合蛋白或小分子)可以掺入适于向受试者施用的药物组合物中。此类组合物通常包含抗体、肽、融合蛋白或小分子和药学上可接受的载体。如本文所用,语言"药学上可接受的载体"旨在包括与药物组合物相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。此类介质和试剂用于药物活性物质的用途是本领域熟知的。除非任何常规介质或试剂都与活性化合物不相容,否则考虑其在组合物中的用途。补充活性化合物也可以掺入所述组合物中。

[1148] 本发明的药物组合物被配制成与其预期施用途径相容。施用途径的实例包括肠胃外例如静脉内、皮内、皮下、口服(例如,吸入)、经皮(局部)、经粘膜和直肠施用。用于肠胃外、皮内或皮下施用的溶液或悬浮液可以包括以下组分:无菌稀释剂,诸如注射用水、盐水溶液、固定油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗细菌剂,诸如苄醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,诸如乙二胺四乙酸;缓冲液,诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐以及用于调整张力的试剂,诸如氯化钠或右旋糖。pH可以用酸或碱诸如盐酸或氢氧化钠调整。肠胃外制剂可以封装在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。

[1149] 适用于可注射用途的药物组合物包括无菌水性溶液(其中水可溶)或分散体和用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。对于静脉内施用,合适的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™(BASF,帕西帕尼,新泽西州)或磷酸缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,组合物应当是无菌的并且应当为流体,以达到存在容易可注射性的程度。组合物在制造和储存的条件下必须是稳定的,并且应当防止微生物(诸如细菌和真菌)的污染作用。载体可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。可以例如通过使用诸如卵磷脂的包衣、通过在分散体的情况下维持所需粒径以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。微生物作用的预防可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等来实现。在多种情况下,优选在组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇(诸如甘露醇、山梨醇)或氯化

钠。可注射组合物的延长吸收可以通过在组合物中包括延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶来实现。

[1150] 无菌可注射溶液可以通过将在适当溶剂中的所需量的活性化合物与以上列举的成分中的一种或组合(根据需要)合并,随后进行过滤灭菌来制备。通常,分散体是通过将活性化合物掺入含有基础分散介质和来自以上列举的那些的所需其他成分的无菌媒介物中来制备。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,其产生活性成分加来自其前述无菌过滤溶液的任何额外所需成分的粉末。

[1151] 口服组合物通常包括惰性稀释剂或可食用载体。它们可以封装在明胶胶囊中或压缩成片剂。出于口服治疗性施用的目的,活化化合物可以与赋形剂合并,并且以片剂、药片或胶囊的形式使用。口服组合物还可以使用用作漱口水的流体载体来制备,其中流体载体中的化合物口服施用并荡洗并且吐出或吞咽。药学上相容的结合剂和/或佐剂材料可以作为组合物的一部分包括在内。片剂、丸剂、胶囊、药片等可以含有以下成分中的任一种或相似性质的化合物:粘合剂,诸如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂,诸如淀粉或乳糖,崩解剂诸如海藻酸、初凝胶(Primogel)或玉米淀粉;润滑剂,诸如硬脂酸镁或Sterotes;助流剂,诸如胶体二氧化硅;甜味剂,诸如蔗糖或糖精;或调味剂,诸如薄荷、水杨酸甲酯或橙香精。

[1152] 对于通过吸入进行的施用,化合物以气溶胶喷雾的形式从加压容器或分配器递送,所述加压容器或分配器含有合适的推进剂,例如气体诸如二氧化碳或雾化器。

[1153] 系统性施用还可以通过经粘膜或经皮手段进行。对于经粘膜或经皮施用,在配制品中使用适合于待渗透屏障的渗透剂。此类渗透剂通常是本领域中已知的,并且对于经粘膜施用包括例如洗涤剂、胆汁酸盐和夫西地酸衍生物。经粘膜施用可以通过使用鼻喷雾或栓剂来实现。对于经皮施用,将活性化合物配制为如本领域通常已知的软膏、药膏、凝胶或霜膏。

[1154] 化合物还可以呈栓剂(例如,具有常规栓剂基质,诸如可可脂和其他甘油酯)或用于直肠递送的保留灌肠剂的形式来制备。

[1155] 在一个实施例中,调控剂可以用将防止化合物从体内快速消除的载体来制备,所述载体为诸如受控释放制剂,包括植入物和微囊化递送系统。可以使用生物可降解、生物相容的聚合物,诸如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原、聚原酸酯和聚乳酸。制备此类制剂的方法对于本领域技术人员应当是明显的。所述材料还可以从阿尔扎公司(Alza Corporation)和新星制药公司(Nova Pharmaceuticals Inc.)商购获得。脂质体悬浮液(包括以针对病毒抗原的单克隆抗体靶向到感染细胞的脂质体)也可以用作药学上可接受的载体。这些可以根据本领域技术人员已知,例如美国专利第4,522,811号中所述的方法来制备。

[1156] 为了便于施用和实现剂量均匀性,以剂量单位形式配制口服或肠胃外组合物是特别有利的。如本文所用的剂量单位形式是指适合作为用于待治疗的受试者的单一剂量的物理上离散单位;每个单位含有预先确定量的活性化合物,其经计算与需要的药物载体缔合产生所需治疗性作用。本发明的剂量单位形式的规范由活性化合物的独特特征、待实现的具体治疗性作用以及配混用于个体治疗的此类活性化合物的领域中固有的限制决定并且直接取决于所述独特特征、治疗性作用和限制。

[1157] 可以通过标准药物程序在细胞培养物或实验动物中确定此类化合物的毒性和治

疗功效,例如,用于确定LD50(对50%的群体致命的剂量)和ED50(在50%的群体中治疗上有效的剂量)。毒性作用与治疗性作用之间的剂量比为治疗指数,并且其可以表示为比率LD50/ED50。优选表现出较大治疗指数的化合物。虽然可以使用表现出毒性副作用的化合物,但是应当注意设计一种递送系统,其将此类化合物靶向到受影响组织的部位,以便最小化对未受影响的细胞的潜在损害,从而减少副作用。

[1158] 可以在配制用于人的剂量范围中使用由细胞培养物测定和动物研究获得的数据。此类化合物的剂量优选地在包括ED50而几乎没有或没有毒性的一系列循环浓度内。剂量可以根据所采用的剂型和所利用的施用途径而在该范围内变化。对于本发明的方法中使用的任何化合物,治疗有效剂量最初可以由细胞培养物测定来估计。可以在动物模型中配制剂量以实现包括如在细胞培养物中确定的IC50(即,实现症状的半数最大抑制的测试化合物的浓度)的循环血浆浓度范围。此类信息可以用于更准确地确定人中可用的剂量。可以例如通过高效液相色谱法测量血浆中的水平。

[1159] 以上所述的调控剂可以呈编码所述试剂的可表达核酸的形式施用。本发明涵盖此类核酸及包含其的组合物。例如,本发明的核酸分子可以插入到载体中并且用作基因疗法载体。基因疗法载体可以通过例如静脉内注射、局部施用(参见美国专利5,328,470)或通过立体定向注射(参见例如,Chen等人(1994)《美国科学院院报》91:3054-3057)来递送到受试者。基因疗法载体的药物制剂可以包括在可接受稀释剂中的基因疗法载体,或者可以包含基因递送媒介物包埋在其中的缓慢释放基质。可替代地,在完整基因递送载体可以由重组细胞完整产生的情况下(例如,逆转录病毒载体),药物制剂可以包括产生基因递送系统的一种或多种细胞。

[1160] 药物组合物可以与施用说明书一起包括在容器、包装或分配器中。

[1161] VIII.试剂的施用

[1162] 向受试者施用呈适用于体内药物施用的生物相容形式的本发明的免疫调控剂,以增强或抑制免疫细胞介导的免疫应答。“适用于体内施用的生物相容形式”意指待施用的蛋白质的形式,其中任何毒性作用超过蛋白质的治疗性作用。术语“受试者”旨在包括可以在其中引发免疫应答的活生物体(例如,哺乳动物)。受试者的实例包括人、狗、猫、小鼠、大鼠及其转基因物种。施用如本文所述的试剂可以呈任何药理学形式,包括单独的或与药学上可接受的载体组合的治疗活性量的试剂。

[1163] 施用治疗活性量的本发明的治疗组合物被定义为在实现所需结果所必需的剂量和时间段下的有效的量。例如,试剂的治疗活性量可以根据以下因素而变化:诸如个体的疾病状态、年龄、性别和体重、以及肽在个体中引发所需应答的能力。可以调整剂量方案以提供最佳的治疗性应答。例如,可以每日施用若干分次剂量或者可以如治疗情况的紧急程度所指示按比例减少所述剂量。

[1164] 本文所述的本发明的试剂可以方便的方式施用,诸如通过注射(皮下、静脉内等)、口服施用、吸入、经皮施用或直肠施用。根据施用途径,活性化合物可以涂布在材料中,以防止化合物免受酶、酸和可能使化合物失活的其他天然条件的作用。例如,对于试剂的通过除了肠胃外施用以外的施用,可能希望用防止其失活的材料对所述试剂进行涂布,或将所述试剂与所述材料共施用。

[1165] 可以向个体施用在适当的载体、稀释剂或佐剂中、与酶抑制剂共施用或在适当的

载体诸如脂质体中的试剂。药学上可接受的稀释剂包括盐水和水性缓冲溶液。佐剂以其最广泛的意义使用并且包括任何免疫刺激性化合物诸如干扰素。本文设想的佐剂包括间苯二酚、非离子型表面活性剂诸如聚氧乙烯油基醚和正十六烷基聚乙烯醚。酶抑制剂包括胰蛋白酶抑制剂、氟磷酸二异丙酯(DEEP)和抑肽酶。脂质体包括水包油包水乳液以及常规脂质体(Sterna等人(1984)《神经免疫学杂志(J.Neuroimmunol.)》7:27)。

[1166] 所述试剂可以肠胃外或腹腔内施用。分散体也可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物中以及油中制备。在普通的储存和使用条件下,这些制剂可以含有防腐剂以防止微生物的生长。

[1167] 适用于可注射用途的试剂的药物组合物包含无菌水性溶液(其中水可溶)或分散体和用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。在所有情况下,组合物优选是无菌的并且必须为流体,以达到存在容易可注射性的程度。组合物在制造和储存的条件下优选是稳定的,并且防止微生物(诸如细菌和真菌)的污染作用。载体可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。可以例如通过使用诸如卵磷脂的包衣、通过在分散体的情况下维持所需粒径以及通过使用表面活性剂来维持适当的流动性。微生物作用的预防可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等来实现。在多种情况下,优选在组合物中包含等渗剂,例如糖、多元醇(诸如甘露醇、山梨醇)或氯化钠。可注射组合物的延长吸收可以通过在组合物中包括延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶来实现。

[1168] 无菌可注射溶液可以通过将在适当溶剂中的所需量的本发明的试剂(例如,抗体、肽、融合蛋白或小分子)与以上列举的成分中的一种或组合(根据需要)合并,随后进行过滤灭菌来制备。通常,分散体是通过将活性化合物掺入含有基础分散介质和来自以上列举的那些的所需其他成分的无菌媒介物中来制备。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥,其产生试剂加来自其前述无菌过滤溶液的任何额外所需成分的粉末。

[1169] 当所述试剂如上所述被合适地保护时,蛋白质可以例如与惰性稀释剂或可同化可食用载体一起口服施用。如本文所用,“药学上可接受的载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。此类介质和试剂用于药物活性物质的用途是本领域熟知的。除非任何常规介质或试剂都与活性化合物不相容,否则考虑其在治疗组合物中的用途。补充活性化合物也可以掺入所述组合物中。

[1170] 为了便于施用和实现剂量均匀性,以剂量单位形式配制肠胃外组合物是特别有利的。如本文所用,“剂量单位形式”是指适合作为用于待治疗的哺乳动物受试者的单一剂量的物理上离散单位;每个单位含有预先确定量的活性化合物,其经计算与需要的药物载体缔合产生所需治疗性作用。本发明的剂量单位形式的规范由(a)活性化合物的独特特征和待实现的具体治疗性作用以及(b)配混用于个体的敏感性治疗的此类活性化合物的领域中固有的限制决定并且直接取决于所述独特特征和治疗性作用以及限制。

[1171] 在一个实施例中,本发明的试剂是抗体。如本文所定义,抗体的治疗有效量(即,有效剂量)的范围是约0.001至30mg/kg体重,优选地约0.01至25mg/kg体重,更优选地约0.1至20mg/kg体重,并且甚至更优选地约1至10mg/kg、2至9mg/kg、3至8mg/kg、4至7mg/kg或5至6mg/kg体重。本领域技术人员将理解,某些因素可能影响有效地治疗受试者所需的剂量,包

括但不限于疾病或病症的严重性、先前的治疗、受试者的一般健康状况和/或年龄和其他存在的疾病。此外,用治疗有效量的抗体治疗受试者可以包括单一治疗,或者优选地可以包括一系列治疗。在优选的实例中,用范围为约0.1至20mg/kg体重之间的抗体,每周一次治疗受试者,持续约1至10周,优选地2至8周,更优选地约3至7周,并且甚至更优选地约4、5或6周的时间。还将理解,用于治疗的抗体的有效剂量可以随具体治疗过程增加或降低。剂量变化可以由诊断性测定的结果产生。

[1172] 如上所述,在一些实施例中,用于施用的试剂是基于细胞的。基于细胞的试剂与受试者宿主具有免疫相容性关系,并且设想任何此类关系用于根据本发明的用途。例如,细胞,诸如过继性T细胞,可以是同基因的。术语"同基因的"可以是指来源于、起源于同一物种或是同一物种的成员的状态,所述同一物种是遗传上相同的,特别是关于抗原或免疫反应相同的。这些包括具有匹配的MHC类型的同卵双胞胎。因此,"同基因移植物"是指将来自供体的细胞转移至受体,所述受体与供体遗传上相同或免疫上足够相容以便允许在没有不期望的不良免疫应答(例如,诸如违背本文所述的免疫筛选结果的解释的那些)的情况下进行移植。

[1173] 如果转移的细胞来自并移植到同一受试者,则同基因移植物可以是"自体的"。"自体移植物"是指受试者自身的细胞或器官的收获和再输入或移植。自体细胞的排外性或补充性使用可以消除或减少将细胞施用回到宿主的多种不良作用,特别是移植物抗宿主反应。

[1174] 如果转移的细胞来自并同一物种的不同成员,但是仍然具有足够匹配的主要组织相容性复合物(MHC)抗原以避免不良免疫应答,则同基因移植物可以是"匹配同种异基因的"。确定MHC错配程度可以根据本领域已知且使用的标准测试来实现。例如,人类中存在至少六个主要类别的MHC基因,在移植生物学中被鉴定为重要的。HLA-A、HLA-B、HLA-C编码HLA I类蛋白,而HLA-DR、HLA-DQ和HLA-DP编码HLA II类蛋白。这些组中的每一个内的基因是高度多态的,如在人群体中发现的多种HLA等位基因或变体中所反映的,并且个体之间这些组中的差异与针对移植细胞的免疫应答的强度相关联。用于确定MHC匹配度的标准方法检查HLA-B和HLA-DR或HLA-A、HLA-B和HLA-DR组内的等位基因。因此,在两个或三个HLA组内分别对至少4且甚至5或6种MHC抗原进行测试。在血清学MHC测试中,针对每种HLA抗原类型的抗体与来自一个受试者(例如,供体)的细胞反应,以确定与抗体反应的某些MHC抗原的存在或不存在。将此与其他受试者(例如,受体)的反应性谱进行比较。抗体与MHC抗原的反应通常通过将抗体与细胞一起温育,并且然后添加补体以诱导细胞裂解(即,淋巴细胞毒性测试)来确定。检查反应并且根据反应中裂解的细胞量来评级(参见例如,Mickelson和Petersdorf(1999)《造血细胞移植(Hematopoietic Cell Transplantation)》,Thomas,E.D.等人编辑,第28-37页,布莱克韦尔科学(Blackwell Scientific),马尔登,马萨诸塞州)。其他基于细胞的测定包括使用标记的抗体的流式细胞术或酶联免疫测定(ELISA)。用于确定MHC类型的分子方法是熟知的,并且通常采用合成探针和/或引物来检测编码HLA蛋白的特定基因序列。合成寡核苷酸可以用作杂交探针来检测与特定HLA类型相关联的限制性片断长度多态性(Vaughn(2002)《MHC方案的分子生物学方法(Method.Mol.Biol.MHC Protocol.)》210:45-60)。可替代地,引物可以用于扩增HLA序列(例如,通过聚合酶链式反应或连接链反应),其产物可以进一步通过直接DNA测序、限制性片段多态性分析(RFLP)或

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

[1175] 如果转移的细胞和受试者的细胞通常通过近交在定义的基因座,诸如单基因座中有所不同,则同基因移植物可以是"同类系的"。术语"同类系的"是指来源于、起源于同一物种或是同一物种的成员,其中除小基因区,通常为单基因基因座(即,单基因)之外,所述成员是遗传上相同。"同类系移植物"是指将来自供体的细胞或器官转移到受体,其中除单基因基因座之外,受体与供体是遗传上相同的。例如,CD45以各种等位基因形式存在,并且存在同类系小鼠系,其中小鼠系在表达CD45.1或CD45.2等位基因形式方面有所不同。

[1176] 与之相比,"错配同种异基因的"是指来源于、起源于同一物种或是同一物种的成员,所述同一物种具有通常通过本领域所用的标准测定(诸如定义数量的MHC抗原的血清学或分子分析)确定的足以引发不良免疫应答的非相同的主要组织相容性复合物(MHC)抗原(即,蛋白质)。"部分错配"是指成员之间,通常供体与受体之间测试的MHC抗原的部分匹配。如,"半错配"是指50%的MHC抗原被测试为在两个成员之间显示不同MHC抗原类型。"完全"或"完整"错配是指所有的MHC抗原被测试为在两个成员之间是不同的。

[1177] 相似地,与之相比,"异种的"是指来源于、起源于不同物种或是不同物种的成员,例如人和啮齿类动物、人和猪、人和黑猩猩等。"异种移植物"是指将来自供体的细胞或器官转移到受体,其中受体是不同于供体的物种。

[1178] 此外,细胞可以从单一来源或多个来源(例如,单一受试者或多个受试者)获得。多个是指至少两个(例如,多于一个)。在又一个实施例中,非人动物是小鼠。由其获得目标细胞类型的动物可以是成人、新生儿(例如,年龄小于48小时)、未成熟或在子宫内的。目标细胞类型可以是原代癌细胞、癌干细胞、建立的癌细胞系、永生化的原代癌细胞等。在某些实施例中,宿主受试者的免疫系统可以进行工程化或以其他方式被选择为与移植的癌细胞免疫相容。例如,在一个实施例中,受试者可以是"人源化的"以便与人癌细胞相容。术语"免疫系统人源化"是指包含人HSC谱系细胞和人获得性和先天性免疫细胞的动物,诸如小鼠,所述细胞可以存活而不被宿主动物排斥,从而允许人造血以及获得性和先天性免疫在宿主动物中恢复。获得性免疫细胞包括T细胞和B细胞。先天性免疫细胞包括巨噬细胞、粒细胞(嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞)、DC、NK细胞和肥大细胞。代表性的非限制性实例包括SCID-hu、Hu-PBL-SCID、Hu-SRC-SCID、NSG(NOD-SCID IL2r-γ(无效),缺乏先天性免疫系统、B细胞、T细胞和细胞因子信号传导)、NOG((NOD-SCID IL2r-γ(截短))、BRG(BALB/c-Rag2(无效)IL2r-γ(无效))和H2dRG(Stock-H2d-Rag2(无效)IL2r-γ(无效))小鼠(参见例如,Shultz等人(2007)《自然免疫学综述(Nat.Rev.Immunol.)》7:118;Pearson等人(2008)《即免疫学实验指南》15:21;Brehm等人(2010)《临床免疫学(Clin.Immunol.)》135:84-98;McCune等人(1988)《科学》241:1632-1639,美国专利7,960,175和美国专利公布2006/0161996)以及免疫相关基因的相关无效突变体,像Rag1(缺乏B细胞和T细胞)、Rag2(缺乏B细胞和T细胞)、TCRα(缺乏T细胞)、穿孔素(cD8+T细胞,缺乏细胞毒性功能)、FoxP3(缺乏功能性CD4+T调节细胞)、IL2rg或Prf1以及HHLA2、KIR3DL3、TMIGD2、PD-1、PD-L1、Tim3和/或2B4敲除的突变体,允许在免疫低下动物像小鼠的区室特异性模型中人免疫细胞的有效植入和/或提供所述模型(参见例如,PCT公布WO2013/062134)。此外,NSG-CD34+(NOD-

SCID IL2r-γ(无效)CD34+)人源化小鼠可用于在动物模型像小鼠中研究人基因和肿瘤活性。

[1179] 如本文所用,从生物材料来源"获得"意指从供体收获或分割生物材料的来源的任何常规方法。例如,生物材料可以从实体瘤、血液样品(诸如外周血或脐带血样品)获得,或者从另一种体液(诸如骨髓或羊水)收获。获得此类样品的方法是本领域熟知的。在本发明中,样品可以是新鲜的(即,从供体获得而不冷冻)。此外,可以进一步操纵样品以在扩增之前去除无关的或不需要的组分。样品还可以从保存的储备物获得。例如,在细胞系或流体(诸如外周血或脐带血)的情况下,样品可以从此类细胞系或流体的低温或以其他方式保存的库获取。此类样品可以从任何合适的供体获得。

[1180] 所获得的细胞群体可以直接使用或冷冻备用。各种介质和低温保存方案是本领域已知的。通常,冷冻介质包含约5%-10%的DMSO、10%-90%血清白蛋白和50%-90%培养介质。可用于保存细胞的其他添加剂以举例的方式包括但不限于二糖诸如海藻糖(Scheinkonig等人(2004)《骨髓移植(Bone Marrow Transplant.)》34:531-536)或血浆容量扩增剂诸如羟乙基淀粉(即,羟基乙基淀粉)。在一些实施例中,可以使用等渗缓冲溶液,诸如磷酸盐缓冲盐水。示例性低温保存组合物具有细胞培养介质,其具有4%HSA、7.5%二甲基亚砜(DMSO)和2%羟乙基淀粉。低温保存的其他组合物和方法是熟知的并在本领域中描述(参见例如,Broxmeyer等人(2003)《美国科学院院报》100:645-650)。细胞在小于约-135℃的最终温度下保存。

[1181] 细胞可以0.1x 10^6、0.2x 10^6、0.3x 10^6、0.4x 10^6、0.5x 10^6、0.6x 10^6、0.7x 10^6、0.8x 10^6、0.9x 10^6、1.0x 10^6、5.0x 10^6、1.0x 10^7、5.0x 10^7、1.0x 10^8、5.0x 10^8细胞/千克受试者体重或更多或之间的任何范围或之间的任何值施用。移植的细胞数量可以基于给定量的时间内所需的植入水平来调整。通常,根据需要,可以移植1x 10^5至约1x 10^9个细胞/kg体重,约1x 10^6至约1x 10^8个细胞/kg体重或约1x 10^7个细胞/kg体重或更多个细胞。在一些实施例中,相对于平均大小的小鼠移植至少约总计0.1x 10^6、0.5x 10^6、1.0x 10^6、2.0x 10^6、3.0x 10^6、4.0x 10^6或5.0x 10^6个细胞是有效的。

[1182] 细胞可以如本文所述的任何合适的途径(诸如通过输注)施用。细胞还可以在其他抗癌剂之前、与其同时或之后施用。

[1183] 施用可以使用本领域通常已知的方法实现。试剂(包括细胞)可以通过直接注射或通过本领域使用的任何其他手段被引入到所需位点中,所述任何其他手段包括但不限于血管内、脑内、肠胃外、腹腔内、静脉内、硬膜外、脊椎内、胸骨内、关节内、滑膜内、鞘内、动脉内、心内或肌肉内施用。例如,可以通过各种途径为目标受试者植入移植细胞。此类途径包括但不限于静脉内施用、皮下施用、施用到特定组织(例如,局灶性移植)、注射到股骨骨髓腔中、注射到脾脏中、在胎肝的肾小囊下施用等。在某些实施例中,将本发明的癌症疫苗瘤内或皮下注射给受试者。细胞可以在一次输注中施用,或者在足以产生所需作用的定义时间段内通过连续输注施用。移植的示例性方法、植入评定和移植细胞的标记物表型分型分析是本领域熟知的(参见例如,Pearson等人(2008)《即免疫学实验指南》81:15.21.1-15.21.21;Ito等人(2002)《血液》100:3175-3182;Traggiai等人(2004)《科学》304:104-107;Ishikawa等人《血液》(2005)106:1565-1573;Shultz等人(2005)《免疫学杂志(J.Immunol.)》174:6477-6489;以及Holyoake等人(1999)《实验血液学(Exp.Hematol.)》

27:1418-1427)。

[1184] 可以将两种或更多种细胞类型组合并施用,诸如基于细胞的疗法和干细胞的过继性细胞转移、癌症疫苗和基于细胞的疗法等。例如,基于过继性细胞的免疫疗法可以与本发明的基于细胞的疗法组合。熟知的基于过继性细胞的免疫治疗性模式包括但不限于辐射的自体或同种异基因肿瘤细胞、肿瘤裂解液或细胞凋亡肿瘤细胞、基于抗原呈递细胞的免疫疗法、基于树突细胞的免疫疗法、过继性T细胞转移、过继性CAR T细胞疗法、自体免疫增强疗法(AIET)、癌症疫苗和/或抗原呈递细胞。此类基于细胞的免疫疗法可以进一步进行修改以表达一种或多种基因产物,以进一步调控免疫应答,诸如表达细胞因子像GM-CSF和/或表达肿瘤相关抗原(TAA)抗原,诸如Mage-1、gp-100等。本文所述的癌症疫苗中癌细胞与其他细胞类型的比率可以为1:1,但是可以任何所需的量调整(例如,1:1、1.1:1、1.2:1、1.3:1、1.4:1、1.5:1、2:1、2.5:1、3:1、3.5:1、4:1、4.5:1、5:1、5.5:1、6:1、6.5:1、7:1、7.5:1、8:1、8.5:1、9:1、9.5:1、10:1或更大)。

[1185] 移植细胞的植入可以通过各种方法中的任一种评定,诸如但不限于肿瘤体积、细胞因子水平、施用时间、移植之后在一个或多个时间点处从受试者获得的目标细胞的流式细胞术分析等。例如,等待1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28天的基于时间的分析,或者可以发信号指示肿瘤收获的时间。任何此类度量是可以根据熟知的参数进行调整以便确定变量对于针对抗癌免疫疗法的应答的作用的变量。此外,移植细胞可以与其他试剂(诸如细胞因子、细胞外基质、细胞培养支持物等)共移植。

[1186] 本发明进一步通过以下不应当被解释为限制性的实例来说明。在整个本申请中引述的所有参考文献、专利和公布的专利申请的内容以及附图通过引用并入本文。

[1187] IX.受试者

[1188] 在一个实施例中,针对其确定HHLA2抗体疗法的功效的预测概率的受试者是哺乳动物(例如,小鼠、人源化小鼠、大鼠、灵长类动物、非人哺乳动物、家养动物,诸如狗、猫、牛、马等),并且优选地是人。在另一个实施例中,所述受试者是癌症的动物模型。例如,动物模型可以是人来源的癌症的原位异种移植物动物模型。

[1189] 在本发明的模型的另一个实施例中,受试者未经历治疗,诸如化疗、放射疗法、靶向疗法和/或抗免疫检查点疗法。在又一个实施例中,受试者已经经历治疗,诸如化疗、放射疗法、靶向疗法和/或抗免疫检查点疗法。

[1190] 在某些实施例中,受试者已经经历手术以去除癌性或癌前组织。在其他实施例中,未去除癌性组织,例如癌性组织可以位于身体的不可手术区中,诸如在对于生命而言重要的组织中,或在手术程序将对患者造成相当大的伤害风险的区域中。

[1191] 本发明的方法可以用于确定受试者(诸如本文所述的那些)中多种不同癌症对HHLA2抑制剂疗法的应答性。

[1192] X.样品采集、制备和分离

[1193] 在一些实施例中,将来自受试者的样品中的生物标记物量和/或活性测量值与预先确定的对照(标准)样品进行比较。来自受试者的样品通常来自患病组织,诸如癌细胞或组织。对照样品可以来自同一受试者或来自不同受试者。对照样品通常是正常的非患病样品。然而,在一些实施例中,诸如对于疾病的分期或对于评估治疗的功效,对照样品可以来

自患病组织。对照样品可以是来自若干不同受试者的样品的组合。在一些实施例中,将来自受试者的生物标记物量和/或活性测量值与预先确定的水平进行比较。该预先确定的水平通常由正常样品获得。如本文所述,“预先确定的”生物标记物量和/或活性测量值可以是仅以举例的方式用于评估可以被选择用于治疗的受试者(例如,基于基因组突变的数量和/或DNA修复基因的导致非功能蛋白质的基因组突变的数量)、评估对于抗HHLA2抗体疗法的应答和/或评估对于抗HHLA2抗体疗法以及一种或多种额外的抗癌疗法的应答的生物标记物量和/或活性测量值。预先确定的生物标记物量和/或活性测量值可以在患有或未患癌症的患者群体中确定。预先确定的生物标记物量和/或活性测量值可以是同等地适用于每个患者的单个数字,或者预先确定的生物标记物量和/或活性测量值可以根据患者的特定亚群变化。受试者的年龄、体重、身高和其他因素可以影响个体的预先确定的生物标记物量和/或活性测量值。此外,所述预先确定的生物标记物量和/或活性可以针对每个受试者单个地确定。在一个实施例中,本文所述的方法中确定和/或比较的量是基于绝对测量值。

[1194] 在另一个实施例中,本文所述的方法中确定和/或比较的量是基于相对测量值,诸如比率(例如,治疗之前相对于治疗之后的生物标记物拷贝数、水平和/或活性,此类生物标记物测量值相对于加标或人造对照,此类生物标记物测量值相对于管家基因的表达等)。例如,相对分析可以是基于治疗前生物标记物测量值与治疗后生物标记物测量值相比的比率。治疗前生物标记物测量可以在开始抗癌疗法之前的任何时间处进行。治疗后生物标记物测量可以在开始抗癌疗法之后的任何时间处进行。在一些实施例中,治疗后生物标记物测量在开始抗癌疗法之后1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20周或更多周进行,以及甚至更久至无限期地进行,以用于继续监测。治疗可以包含抗癌疗法,诸如包含单独的或与其他抗癌剂,诸如与免疫检查点抑制剂组合的一种或多种抗HHLA2抗体的治疗性方案。

[1195] 预先确定的生物标记物量和/或活性测量值可以是任何合适的标准。例如,预先确定的生物标记物量和/或活性测量值可以从针对其评定患者选择的相同或不同人获得。在一个实施例中,预先确定的生物标记物量和/或活性测量值可以从相同患者的先前评定获得。以这种方式,可以随时间监测患者选择的过程。此外,如果受试者是人,则对照可以从另一个或多个人,例如所选组的人的评定获得。以这种方式,可以将针对其评定选择的人选择的程度与合适的其他人,例如处于与目标人相似的情况的其他人,诸如患有一种或多种相似或相同病状的那些人和/或相同民族的那些人进行比较。

[1196] 在本发明的一些实施例中,生物标记物量和/或活性测量值相对于预先确定的水平的变化是约0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3.5、4.0、4.5或5.0倍或更大或之间的任何范围(包括端值)。当测量值是基于相对变化,诸如基于治疗前生物标记物测量值与治疗后生物标记物测量值相比的比率时,此类截止值同等适用。

[1197] 生物样品可以从来自患者的各种来源,包括体液样品、细胞样品或包含核酸和/或蛋白质的组织样品采集。“体液”是指从身体排泄或分泌的液体以及通常不是从身体排泄或分泌的液体(例如,羊水、房水、胆汁、血液和血浆、脑脊液、耵聍和耳垢、考珀液或预射精液、乳糜、食糜、大便、女性精液、组织液、细胞内液、淋巴、月经、母乳、粘液、胸膜液、脓、唾液、皮脂、精液、血清、汗液、滑液、泪液、尿液、阴道润滑液、玻璃体液、呕吐物)。在优选实施例中,受试者和/或对照样品选自由以下组成的群组:细胞、细胞系、组织学切片、石蜡包埋的组

织、活检物、全血、乳头抽吸液、血清、血浆、口腔刮取物、唾液、脑脊液、尿液、大便和骨髓。在一个实施例中,样品是血清、血浆或尿液。在另一个实施例中,样品是血清。

[1198] 样品可以在一个纵向时间段内从个体重复采集(例如,每天、每周、每月、每年、每半年一次或多次等)。在一个时间段内从个体获得多个样品可以用于验证较早检测的结果和/或鉴定由于例如疾病进展、药物治疗等发生的生物模式的改变。例如,可以根据本发明每月、每两月或一月、两月或三月间隔的组合获取并监测受试者样品。此外,随时间获得的受试者的生物标记物量和/或活性测量值可以方便地与彼此以及在监测时间段期间正常对照的生物标记物量和/或活性测量值进行比较,从而提供作为用于长期监测的内部或个人对照的受试者自身的值。

[1199] 根据采集的样品类型和/或生物标记物测量值的分析,样品制备和分离可以涉及任何程序。仅以举例的方式,此类程序包括浓缩、稀释、pH调节、高丰度多肽(例如,白蛋白、γ球蛋白和转铁蛋白等)去除、防腐剂和校准物添加、蛋白酶抑制剂添加、变性剂添加、样品脱盐、以及样品蛋白质浓缩、脂质提取和纯化。

[1200] 样品制备还可以分离与其他蛋白质(例如,载体蛋白)结合在非共价复合物中的分子。该工艺分离结合特异性载体蛋白(例如,白蛋白)的那些分子,或者使用更普通的工艺,诸如例如使用酸经由蛋白质变性从所有的载体蛋白释放结合的分子,接着去除载体蛋白。

[1201] 从样品去除不需要的蛋白质(例如,高丰度、无信息或不可检测的蛋白质)可以使用高亲和力试剂、高分子量过滤器、超离心和/或电渗析来实现。高亲和力试剂包括选择性地结合高丰度蛋白质的抗体或其他试剂(例如,适体)。样品制备还可以包括离子交换色谱法、金属离子亲和力色谱法、凝胶过滤、疏水色谱法、色谱聚焦、吸附色谱法、等电聚焦和相关技术。分子量过滤器包括基于大小和分子量分离分子的膜。此类过滤器可以进一步采用反渗透、纳米过滤、超滤和微滤。

[1202] 超离心是用于从样品去除不需要的多肽的方法。超离心是在约15,000-60,000rpm下对样品进行离心,同时用光学系统监测颗粒的沉降(或其缺乏)。电渗析是在其中离子在电势梯度的影响下从一个溶液转运通过半透膜到另一个溶液的过程中使用电膜或半透膜的程序。因为电渗析中使用的膜可以具有选择性地转运具有正电荷或负电荷的离子,排斥相反电荷的离子,或基于大小和电荷允许物种迁移通过半透膜的能力,所以它使得电渗析可用于电解质的浓缩、去除或分离。

[1203] 本发明中的分离和纯化可以包括本领域已知的任何程序,诸如毛细管电泳(例如,在毛细管中或在芯片上)或色谱法(例如,在毛细管、柱中或在芯片上)。电泳是可以用于在电场的影响下分离离子型分子的方法。电泳可以在凝胶、毛细管中或在芯片上的微通道中进行。用于电泳的凝胶的实例包括淀粉、丙烯酰胺、聚氧化乙烯、琼脂糖或其组合。凝胶可以通过其交联、添加洗涤剂或变性剂、酶或抗体(亲和电泳)或底物(酶谱法)的固定以及结合pH梯度来改性。用于电泳的毛细管的实例包括干扰电喷雾的毛细管。

[1204] 毛细管电泳(CE)对于分离复合亲水性分子和高电荷态溶质是优选的。CE技术也可以在微流体芯片上实施。根据所使用的毛细管和缓冲液的类型,CE可以进一步分为分离技术,诸如毛细管区带电泳(CZE)、毛细管等电聚焦(CIEF)、毛细管等速电泳(cITP)和毛细管电色谱法(CEC)。将CE技术与电喷雾电离结合的实施例涉及使用挥发性溶液,例如含有挥发性酸和/或碱和有机物诸如醇或乙腈的水性混合物。

[1205] 毛细管等速电泳(cITP)是其中分析物在恒定速度下移动通过毛细管,但是通过其各自的迁移率分离的技术。毛细管区带电泳(CZE),还被称为自由溶液CE(FSCE),是基于通过分子上的电荷确定的物种的电泳迁移率以及在迁移期间分子所遇到的经常与分子的大小成正比的摩擦阻力的差异。毛细管等电聚焦(CIEF)允许可弱电离的两性分子通过在pH梯度中的电泳分离。CEC是传统高效液相色谱法(HPLC)与CE之间的混合技术。

[1206] 本发明中使用的分离和纯化技术包括本领域已知的任何色谱法程序。色谱法可以是基于某些分析物的差异吸附和洗脱或分析物在流动相与固定相之间的分配。色谱法的不同实例包括但不限于液相色谱法(LC)、气相色谱法(GC)、高效液相色谱法(HPLC)等。

[1207] XI.生物标记物多肽

[1208] 本发明的另一方面涉及生物标记物蛋白及其生物活性部分的用途。在一个实施例中,对应于标记物的天然多肽可以通过适当的纯化方案,使用标准蛋白质纯化技术从细胞或组织源分离。在另一个实施例中,对应于本发明的标记物的多肽通过重组DNA技术产生。作为重组表达的替代方案,对应于本发明的标记物的多肽可以使用标准肽合成技术化学地合成。

[1209] 生物标记物多肽的生物活性部分包括包含与本文所述的生物标记物蛋白氨基酸序列具有足够的同一性或来源于本文所述的生物标记物蛋白氨基酸序列的氨基酸序列,但是包括比全长蛋白更少的氨基酸,并且表现出对应的全长蛋白的至少一种活性的多肽。通常,生物活性部分包含具有对应的蛋白质的至少一种活性的结构域或基序。本发明的蛋白质的生物活性部分可以是长度为例如10、25、50、100或更多氨基酸的多肽。此外,其中蛋白质的其他区域缺失的其他生物活性部分可以通过重组技术制备,并且针对本发明的多肽的天然形式的一种或多种功能活性进行评估。

[1210] 优选的多肽具有由本文所述的核酸分子编码的生物标记物蛋白的氨基酸序列。其他可用的蛋白质与这些序列中的一个具有基本同一性(例如,至少约40%,优选地50%、60%、70%、75%、80%、83%、85%、88%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%),并且保留对应的天然存在的蛋白质的蛋白质功能活性,但是由于天然等位基因变异或诱变而在氨基酸序列中有所不同。

[1211] 为了确定两个氨基酸序列或两个核酸的同一性百分比,出于最佳比较目的,将序列进行比对(例如,可以在第一氨基酸或核酸序列的序列中引入缺口,以用于与第二氨基酸或核酸序列进行最佳比对)。然后比较在对应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置被与第二序列中的对应位置相同的氨基酸残基或核苷酸占据时,那么在该位置的分子是相同的。两个序列之间的同一性百分比是序列共享的相同位置的数量的函数(即,同一性%=相同位置的#/总位置的#(例如,重叠位置)x 100)。在一个实施例中,两个序列的长度相同。

[1212] 两个序列之间的同一性百分比确定可以使用数学算法来完成。用于两个序列的比较的数学算法的优选的非限制性实例是以下的算法:Karlin和Altschul(1990)《美国科学院院报》87:2264-2268,在Karlin和Altschul(1993)《美国科学院院报》90:5873-5877中修改。此类算法被并入到Altschul等人(1990)《分子生物学杂志》215:403-410的NBLAST和XBLAST程序中。BLAST核苷酸搜索可以用NBLAST程序、得分=100、字长=12进行,以获得与本发明的核酸分子同源的核苷酸序列。BLAST蛋白质搜索可以用XBLAST程序、得分=50、字

长＝3进行,以获得与本发明的蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了获得用于比较目的的空位比对,可以利用空位BLAST,如Altschul等人(1997)《核酸研究》25:3389-3402中所述。可替代地,PSI-Blast可以用于执行迭代搜索,其检测分子之间的距离关系。当利用BLAST、空位BLAST和PSI-Blast程序时,可以使用相应程序(例如,XBLAST和NBLAST)的缺省参数。参见http://www.ncbi.nlm.nih.gov。用于序列比较的数学算法的另一个优选的非限制性实例是Myers和Miller,(1988)《计算机在生物科学中的应用(Comput Appl Biosci)》,4:11-7的算法。此类算法被并入到ALIGN程序(2.0版)中,所述程序是GCG序列比对软件包的一部分。当利用ALIGN程序来比较氨基酸序列时,可以使用PAM120权重残基表、缺口长度罚分12和缺口罚分4。用于鉴定局部序列相似性和比对的区域的另一种可用算法是FASTA算法,如Pearson和Lipman(1988)《美国科学院院报》85:2444-2448中所述。当使用FASTA算法用于比较核苷酸或氨基酸序列时,可以例如使用PAM120权重残基表,其中k-元组值为2。

[1213] 两个序列之间的同一性百分比可以使用与以上所述的那些相似的技术确定,允许或不允许缺口。在计算同一性百分比时,仅计算准确匹配。

[1214] 本发明还提供了对应于生物标记物蛋白的嵌合蛋白或融合蛋白。如本文所用,“嵌合蛋白”或“融合蛋白”包含对应于本发明的标记物的多肽的可操作地连接到异源多肽(即,除了对应于标记物的多肽以外的多肽)的全部或一部分(优选地生物活性部分)。在融合蛋白内,术语“可操作地连接”旨在指示本发明的多肽和异源多肽彼此框内融合。异源多肽可以与本发明的多肽的氨基末端或羧基末端融合。

[1215] 一种可用的融合蛋白是GST融合蛋白,其中对应于本发明的标记物的多肽与GST序列的羧基末端融合。此类融合蛋白可以促进本发明的重组多肽的纯化。

[1216] 在另一个实施例中,融合蛋白含有异源信号序列、免疫球蛋白融合蛋白、毒素或其他可用的蛋白质序列。本发明的嵌合蛋白和融合蛋白可以通过标准重组DNA技术产生。在另一个实施例中,融合基因可以通过常规技术(包括自动化DNA合成仪)合成。可替代地,基因片段的PCR扩增可以使用锚定引物进行,所述锚定引物在两个连续基因片段之间产生互补突出端,其随后可以退火并重新扩增以产生嵌合基因序列(参见例如,Ausubel等人,同上)。此外,已经编码融合部分(例如,GST多肽)的多种表达载体是可商购获得的。编码本发明的多肽的核酸可以克隆到这种表达载体中,使得融合部分与本发明的多肽框内连接。

[1217] 信号序列可以用于促进分泌的蛋白质或其他目标蛋白质的分泌和分离。信号序列的特征通常在于疏水性氨基酸的核心,所述疏水性氨基酸通常在一个或多个裂解事件中在分泌期间从成熟蛋白裂解。此类信号肽含有处理位点,其允许信号序列在成熟蛋白穿过分泌途径时从成熟蛋白裂解。因此,本发明涉及所描述的具有信号序列的多肽,以及信号序列从其蛋白水解裂解的多肽(即,裂解产物)。在一个实施例中,编码信号序列的核酸序列可以在表达载体中可操作地连接到目标蛋白质,诸如通常不被分泌或另外难以分离的蛋白质。信号序列指导蛋白质诸如从表达载体转化到其中的真核宿主的分泌,并且信号序列随后或同时裂解。蛋白质然后可以容易地通过本领域鉴定的方法从细胞外介质纯化。可替代地,信号序列可以使用促进纯化的序列,诸如用GST结构域连接到目标蛋白质。

[1218] 本发明还涉及本文所述的生物标记物多肽的变体。此类变体具有改变的氨基酸序列,其可以充当激动剂(模拟物)或拮抗剂。变体可以通过诱变,例如离散点突变或截短来生成。激动剂可以保留天然存在形式的蛋白质的基本上相同的生物活性或生物活性的子集。

蛋白质的拮抗剂可以例如通过竞争性地结合包括目标蛋白质的细胞信号传导级联的下游或上游成员来抑制天然存在形式的蛋白质的一种或多种活性。因此,特异性生物作用可以通过用有限功能的变体进行的治疗来引发。相对于用天然存在形式的蛋白质进行的治疗,用具有天然存在形式的蛋白质的生物活性的子集的变体对受试者进行的治疗可以在受试者中具有更少的副作用。

[1219] 充当激动剂(模拟物)或拮抗剂的生物标记物蛋白的变体可以通过针对激动剂或拮抗剂活性筛选本发明的蛋白质的突变体(例如,截短突变体)的组合文库来鉴定。在一个实施例中,变体的多样化文库通过在核酸水平下的组合诱变生成,并且由多样化基因文库编码。变体的多样化文库可以通过例如以下产生:将合成寡核苷酸的混合物酶促地连接到基因序列中,使得潜在蛋白质序列的简并组可作为个体多肽表达,或可替代地作为较大融合蛋白的组表达(例如,用于噬菌体展示)。存在可以用于由简并寡核苷酸序列产生本发明的多肽的潜在变体的文库的多种方法。用于合成简并寡核苷酸的方法是本领域已知的(参见例如,Narang,1983,《四面体(Tetrahedron)》39:3;Itakura等人,1984,《生物化学年鉴(Annu.Rev.Biochem.)》53:323;Itakura等人,1984,《科学》198:1056;Ike等人,1983《核酸研究》11:477)。

[1220] 此外,对应于本发明的标记物的多肽的编码序列的片段的文库可以用于生成用于筛选并随后选择变体的多肽的多样化群体。例如,编码序列片段的文库可以通过以下生成:在每个分子仅发生约一次切刻的条件下用核酸酶处理目标编码序列的双链PCR片段,使双链DNA变性,使DNA复性以形成可以包括来自不同切刻产物的有义/反义对的双链DNA,通过用S1核酸酶进行处理来从重新形成的双链体去除单链部分,并且将所得的片段文库连接到表达载体中。通过该方法,可以衍生表达文库,其编码不同大小的目标蛋白质的氨基末端和内部片段。

[1221] 若干技术是本领域已知的,其用于筛选通过点突变或截短制备的组合文库的基因产物,以及用于筛选具有所选特性的基因产物的cDNA文库。适用于高通量分析的用于筛选大基因文库的最广泛使用的技术通常包括将基因文库克隆到可复制的表达载体中,用所得的载体文库转化适当的细胞,并且在一定条件下表达组合基因,在所述条件中,所需活性的检测促进编码检测其产物的基因的载体的分离。循环总体诱变(REM),一种增强文库中功能性突变体的频率的技术,可以用于与筛选测定组合以鉴定本发明的蛋白质的突变体(Arkin和Yourvan,1992,《美国科学院院报》89:7811-7815;Delgrave等人,1993,《蛋白质工程化(Protein Engineering)》6(3):327-331)。

[1222] 对应于本发明的一种或多种生物标记物(包括表1中列出的生物标记物)或其片段的分离的多肽或其片段(或编码此类多肽的核酸)可以用作免疫原,以使用根据本领域熟知的方法用于多克隆和单克隆抗体制备的标准技术生成结合所述免疫原的抗体。抗原肽包含至少8个氨基酸残基,并且涵盖在相应的全长分子中存在的表位,使得针对肽产生的抗体与相应的全长分子形成特异性免疫复合物。优选地,抗原肽包含至少10个氨基酸残基。在一个实施例中,此类表位对于来自一个物种(诸如小鼠或人)的给定多肽分子可以具有特异性(即,跨越多肽分子的跨物种非保守的区域的抗原肽被用作免疫原;此类非保守残基可以使用比对(诸如本文提供的比对)来确定)。

[1223] 在一个实施例中,抗体基本上特异性地结合HHLA2,并且诸如通过中断其与HHLA2

受体(例如,TMIGD2和/或KIR3DL3)的相互作用来抑制或阻断其功能。在另一个实施例中,抗体基本上特异性地结合一种或多种HHLA2受体,并且诸如通过中断其与HHLA2和其受体中的至少一种的相互作用来抑制或阻断其功能。

[1224] 例如,多肽免疫原通常用于通过用免疫原对合适的受试者(例如,兔、山羊、小鼠、人源化小鼠或其他哺乳动物)进行免疫化来制备抗体。合适的免疫原制剂可以含有例如针对其生成免疫应答的重组表达的或化学合成的分子或其片段。制剂可以进一步包括佐剂,诸如弗氏完全或不完全佐剂或相似的免疫刺激性剂。用免疫原制剂对合适的受试者进行免疫化将诱导对其中所含的抗原肽的多克隆抗体应答。

[1225] 多克隆抗体可以如上所述通过用多肽免疫原对合适的受试者进行免疫化来制备。免疫化受试者中的多肽抗体滴度可以通过标准技术,诸如使用固定多肽的酶联免疫吸附测定(ELISA)来随时间进行监测。如果需要的话,可以从哺乳动物(例如,从血液)分离针对抗原的抗体,并且通过熟知的技术,诸如蛋白质A色谱法进一步纯化以获得IgG部分。在免疫化之后的适当时间处,例如当抗体滴度最高时,可以从受试者获得抗体产生细胞,并且用于通过标准技术,诸如杂交瘤技术(最初由Kohler和Milstein(1975)《自然》256:495-497描述)(还参见Brown等人(1981)《免疫学杂志》127:539-46;Brown等人(1980)《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》255:4980-83;Yeh等人(1976)《美国科学院院报》76:2927-31;Yeh等人(1982)《国际癌症杂志(Int.J.Cancer)》29:269-75)、最近的人B细胞杂交瘤技术(Kozbor等人(1983)《现代免疫学》4:72)、EBV-杂交瘤技术(Cole等人(1985)《单克隆抗体和癌症疗法(Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy)》,Alan R.Liss,Inc.,第77-96页)或三源杂交瘤技术制备单克隆抗体。用于产生单克隆抗体杂交瘤的技术是熟知的(通常参见Kenneth,R.H.在《单克隆抗体:生物分析中的新维度(Monoclonal Antibodies:A New Dimension In Biological Analyses)》中,全会出版公司(Plenum Publishing Corp.),纽约,纽约州(1980);Lerner,E.A.(1981)《耶鲁大学生物和医学杂志(Yale J.Biol.Med.)》54:387-402;Gefter,M.L.等人(1977)《体细胞遗传学(Somatic Cell Genet.)》3:231-36)。简而言之,将永生细胞系(通常为骨髓瘤)与来自用如上所述的免疫原免疫化的哺乳动物的淋巴细胞(通常为脾细胞)融合,并且筛选所得的杂交瘤细胞的培养物上清液以鉴定产生优选地特异性地结合多肽抗原的单克隆抗体的杂交瘤。在一些实施例中,在敲除目标靶抗原(例如,在免疫化之后不产生抗原)的细胞或动物宿主中进行免疫化。

[1226] 用于融合淋巴细胞和永生化细胞系的多种熟知的方案中的任一种可以用于针对本发明的一种或多种生物标记物(包括表1中列出的生物标记物)或其片段生成单克隆抗体的目的(参见例如,Galfre,G.等人(1977)《自然》266:55052;Gefter等人(1977)同上;Lerner(1981)同上;Kenneth(1980)同上)。此外,普通技术人员将理解,存在此类方法的也可用的多种变型。通常,永生细胞系(例如,骨髓瘤细胞系)来源于与淋巴细胞相同的哺乳动物物种。例如,鼠杂交瘤可以通过将来自用本发明的免疫原制剂免疫化的小鼠的淋巴细胞与永生化的小鼠细胞系融合来制备。优选的永生细胞系是对含有次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷的培养基("HAT培养基")敏感的小鼠骨髓瘤细胞系。多种骨髓瘤细胞系中的任一种可以用作根据标准技术的融合配偶体,例如P3-NS1/1-Ag4-1、P3-x63-Ag8.653或Sp2/O-Ag14骨髓瘤系。这些骨髓瘤系可从马里兰州罗克维尔的美国典型培养物保藏中心(ATCC)获得。通常,使用聚乙二醇("PEG")将HAT敏感性小鼠骨髓瘤细胞与小鼠脾细胞融合。然后使用HAT培

养基选择由融合产生的杂交瘤细胞,所述培养基杀伤未融合和非生产性融合的骨髓瘤细胞(未融合的脾细胞若干天后死亡,因为它们未被转化)。产生本发明的单克隆抗体的杂交瘤细胞通过例如使用标准ELISA测定筛选结合给定多肽的抗体的杂交瘤培养物上清液来检测。

[1227] 作为制备分泌单克隆抗体的杂交瘤的替代方案,可以通过用适当的多肽筛选重组组合免疫球蛋白文库(例如,抗体噬菌体展示文库),从而分离结合多肽的免疫球蛋白文库成员来鉴定和分离对于以上所述的多肽中的一种具有特异性的单克隆。用于生成和筛选噬菌体展示文库的试剂盒是可商购获得的(例如,Pharmacia重组噬菌体抗体系统(Recombinant Phage Antibody System),目录号27-9400-01;和Stratagene SurfZAPTM噬菌体展示试剂盒(SurfZAPTM Phage Display Kit),目录号240612)。另外,特别适用于生成和筛选抗体展示文库的方法和试剂的实例可以见于例如Ladner等人美国专利第5,223,409号;Kang等人国际公布第WO 92/18619号;Dower等人国际公布第WO 91/17271号;Winter等人国际公布WO 92/20791;Markland等人国际公布第WO 92/15679号;Breitling等人国际公布WO 93/01288;McCafferty等人国际公布第WO 92/01047号;Garrard等人国际公布第WO 92/09690号;Ladner等人国际公布第WO 90/02809号;Fuchs等人(1991)《生物技术(纽约)(Biotechnology(NY))》9:1369-1372;Hay等人(1992)《人抗体杂交瘤(Hum.Antibod.Hybridomas)》3:81-85;Huse等人(1989)《科学》246:1275-1281;Griffiths等人(1993)《欧洲分子生物学学会会刊》12:725-734;Hawkins等人(1992)《分子生物学杂志》226:889-896;Clarkson等人(1991)《自然》352:624-628;Gram等人(1992)《美国科学院院报》89:3576-3580;Garrard等人(1991)《生物技术(纽约)》9:1373-1377;Hoogenboom等人(1991)《核酸研究》19:4133-4137;Barbas等人(1991)《美国科学院院报》88:7978-7982;以及McCafferty等人(1990)《自然》348:552-554。

[1228] 非人或人抗体(例如,大鼠抗小鼠/抗人抗体)的结构特征可以用于产生保留本发明的抗体的至少一种功能特性(诸如与HHLA2、HHLA2受体、TMIGD2和/或KIR3DL3中的一种或多种的结合)的结构上相关的人抗体。另一种功能特性包括在竞争ELISA测定中抑制原始的已知非人或人抗体的结合。

[1229] 在一些实施例中,提供了能够结合和抑制/阻断HHLA2、HHLA2受体、TMIGD2和/或KIR3DL3中的一种或多种的单克隆抗体,其包含重链,其中可变结构域包含至少一个CDR,所述CDR具有与本文呈现的或以其他方式可公开获得的重链可变结构域CDR的组具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的序列。

[1230] 类似地,还提供了结合和抑制/阻断HHLA2、HHLA2受体、TMIGD2和/或KIR3DL3中的一种或多种的单克隆抗体,其包含轻链,其中可变结构域包含至少一个CDR,所述CDR具有与本文呈现的或以其他方式可公开获得的轻链可变结构域CDR的组具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的序列。

[1231] 还提供了能够结合和抑制/阻断HHLA2、HHLA2受体、TMIGD2和/或KIR3DL3中的一种或多种的单克隆抗体,其包含重链,其中可变结构域包含至少一个CDR,所述CDR具有与本文呈现的或以其他方式可公开获得的重链可变结构域CDR的组具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的序列;并且包

含轻链,其中可变结构域包含至少一个CDR,所述CDR具有与本文呈现的或以其他方式可公开获得的轻链可变结构域CDR的组具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的序列。

[1232] 技术人员应当注意,此类同源性百分比等同于在给定CDR内引入1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或更多个保守氨基酸取代并且可以通过所述引入来实现。

[1233] 另外,完全人抗体可以针对本发明的生物标记物(包括表1中列出的生物标记物)或其片段制备。完全人抗体可以在对于人免疫球蛋白基因转基因的小鼠中制备,例如,根据Hogan等人,"小鼠胚胎操作:实验手册(Manipulating the Mouse Embryo:A Laboratory Manuel),"冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory)。简而言之,用纯化的免疫原对转基因小鼠进行免疫化。收获脾细胞并且与骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤。基于其产生结合免疫原的抗体的能力选择杂交瘤。完全人抗体将降低此类抗体在人中的免疫原性。

[1234] 在一个实施例中,用于本发明的抗体是双特异性或多特异性抗体。双特异性抗体具有针对单一抗体多肽内的两个不同抗原的结合位点。抗原结合可以是同时的或依序的。三源杂交瘤和杂交体杂交瘤是可以分泌双特异性抗体的细胞系的两个实例。通过杂交体杂交瘤或三源杂交瘤产生的双特异性抗体的实例在美国专利4,474,893中公开。双特异性抗体通过化学手段(Staerz等人(1985)《自然》314:628,以及Perez等人(1985)《自然》316:354)和杂交瘤技术(Staerz和Bevan(1986)《美国科学院院报》,83:1453,以及Staerz和Bevan(1986)《现代免疫学》7:241)来构建。双特异性抗体还在美国专利5,959,084中进行描述。双特异性抗体的片段在美国专利5,798,229中进行描述。

[1235] 双特异性试剂还可以通过以下来生成:通过融合杂交瘤或制备不同抗体的其他细胞来制备异种杂交瘤,接着鉴定产生并共组装两个抗体的克隆。它们还可以通过完整免疫球蛋白链或其部分诸如Fab和Fv序列的化学或基因缀合来生成。抗体组分可以结合本发明的一种或多种生物标记物(包括表1中列出的一种或多种生物标记物)或其片段的多肽或其片段。在一个实施例中,双特异性抗体可以特异性地结合多肽或其片段以及其天然结合配偶体或其片段两者。

[1236] 在本发明的另一方面,肽或肽模拟物可以用于拮抗本发明的一种或多种生物标记物(包括表1中列出的一种或多种生物标记物)或其片段的活性。在一个实施例中,充当相应全长蛋白的调控剂的表1中列出的一种或多种生物标记物的变体可以通过针对拮抗剂活性筛选突变体(例如,截短突变体)的组合文库来鉴定。在一个实施例中,变体的多样化文库通过在核酸水平下的组合诱变生成,并且由多样化的基因文库编码。变体的多样化文库可以例如通过以下产生:将合成寡核苷酸的混合物酶促地连接到基因序列中,使得潜在多肽序列的简并组可作为其中含有多肽序列组的个体多肽表达。存在可以用于由简并寡核苷酸序列产生多肽变体文库的多种方法。简并基因序列的化学合成可以在自动DNA合成仪中进行,并且然后将合成基因连接到适当的表达载体中。使用简并基因组允许在一个混合物中提供编码所需的潜在多肽序列组的全部序列。用于合成简并寡核苷酸的方法是本领域已知的(参见例如,Narang,S.A.(1983)《四面体》39:3;Itakura等人(1984)《生物化学年鉴》53:323;Itakura等人(1984)《科学》198:1056;Ike等人(1983)《核酸研究》11:477。

[1237] 此外,多肽编码序列的片段的文库可以用于生成用于筛选并随后选择给定多肽的变体的多肽片段的多样化群体。在一个实施例中,编码序列片段的文库可以通过以下生成:

在每个多肽仅发生约一次切刻的条件下用核酸酶处理多肽编码序列的双链PCR片段,使双链DNA变性,使DNA复性以形成可以包括来自不同切刻产物的有义/反义对的双链DNA,通过用S1核酸酶进行处理来从重新形成的双链体去除单链部分,并且将所得的片段文库连接到表达载体中。通过该方法,可以衍生表达文库,其编码不同大小的多肽的N-末端、C-末端和内部片段。

[1238] 若干技术是本领域已知的,其用于筛选通过点突变或截短制备的组合文库的基因产物,以及用于筛选具有所选特性的基因产物的cDNA文库。此类技术可适用于通过多肽的组合诱变生成的基因文库的快速筛选。适用于高通量分析的用于筛选大基因文库的最广泛使用的技术通常包括将基因文库克隆到可复制的表达载体中,用所得的载体文库转化适当的细胞,并且在一定条件下表达组合基因,在所述条件中,所需活性的检测促进编码检测其产物的基因的载体的分离。循环总体诱变(REM),一种增强文库中功能性突变体的频率的技术,可以与筛选测定组合使用以鉴定目标变体(Arkin和Youvan(1992)《美国科学院院报》89:7811-7815;Delagrave等人(1993)《蛋白质工程化(Protein Eng.)》6(3):327-331)。在一个实施例中,可以利用基于细胞的测定来分析多样化的多肽文库。例如,可以将表达载体文库转染到细胞系中,所述细胞系通常合成本发明的一种或多种生物标记物(包括表1中列出的一种或多种生物标记物)或其片段。然后培养转染的细胞,使得产生全长多肽和特定突变体多肽,并且可以例如通过多种功能测定中的任一种检测突变体的表达对于细胞上清液中全长多肽活性的影响。然后可以从细胞回收质粒DNA,针对全长多肽活性的抑制或可替代地强化对其进行评分,并且进一步表征个体克隆。

[1239] 用相同类型的D-氨基酸系统性取代多肽氨基酸序列的一个或多个氨基酸(例如,D-赖氨酸代替L-赖氨酸)可以用于生成更稳定的肽。此外,包含目标多肽氨基酸序列或基本上相同的序列变异的约束性肽可以通过本领域已知的方法生成(Rizo和Gierasch(1992)《生物化学年鉴》61:387,通过引用并入本文);例如,通过添加能够形成使肽环化的分子内二硫桥的内部半胱氨酸残基。

[1240] 本文公开的氨基酸序列使本领域技术人员能够生产对应肽序列及其序列变体的多肽。此类多肽,经常作为大多肽的一部分,可以通过编码肽序列的多核苷酸的表达来在原核或真核宿主细胞中产生。可替代地,此类肽可以通过化学方法合成。用于在重组宿主中表达异源蛋白、多肽的化学合成和体外翻译的方法是本领域熟知的,并且进一步描述于Maniatis等人《分子克隆:实验室手册(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)》(1989),第2版,冷泉港实验室,纽约;Berger和Kimmel,《酶学方法(Methods in Enzymology)》,第152册,《分子克隆技术指南(Guide to Molecular Cloning Techniques)》(1987),学术出版公司(Academic Press,Inc.),圣地亚哥,加利福尼亚州;Merrifield,J.(1969)《美国化学会志(J.Am.Chem.Soc.)》91:501;Chaiken I.M.(1981)《CRC生物化学评论(CRC Crit.Rev.Biochem.)》11:255;Kaiser等人(1989)《科学》243:187;Merrifield,B.(1986)《科学》232:342;Kent,S.B.H.(1988)《生物化学年鉴》57:957;以及Offord,R.E.(1980)《半合成蛋白质(Semisynthetic Proteins)》,威利出版(Wiley Publishing),其通过引用并入本文)。

[1241] 肽通常可以通过直接化学合成来产生。肽可以作为修饰的肽产生,其中非肽部分通过共价连接附接到N末端和/或C末端。在某些优选实施例中,羧基末端或氨基末端或两者

是化学修饰的。末端氨基和羧基基团的最常见修饰分别是乙酰化和酰胺化。氨基末端修饰诸如酰化(例如,乙酰化)或烷基化(例如,甲基化)和羧基末端修饰诸如酰胺化以及其他末端修饰(包括环化)可以并入本发明的各种实施例中。某些氨基末端和/或羧基末端修饰和/或肽延伸至核心序列可以提供有利的物理、化学、生物化学和药理学特性,诸如:增强的稳定性、增加的效力和/或功效、对血清蛋白酶的抗性、期望的药代动力学特性等。本文公开的肽可以治疗性地用于例如通过改变患者的共刺激来治疗疾病。

[1242] 模拟肽(Fauchere(1986)《药物研究进展(Adv.Drug Res.)》15:29;Veber和Freidinger(1985)TINS第392页;以及Evans等人(1987)《医药化学杂志(J.Med.Chem.)》30:1229,通过引用并入本文)通常在计算机化分子建模的帮助下来开发。在结构上与治疗上可用的肽相似的肽模拟物可以用于产生等效的治疗性或预防性作用。通常,模拟肽在结构上与范式多肽(即,具有生物或药理学活性的多肽)相似,但是具有任选地被选自由以下组成的群组的键替换的一个或多个肽键:-CH2NH-、-CH2S-、-CH2-CH2-、-CH=CH-(顺式和反式)、-COCH2-、-CH(OH)CH2-和-CH2SO-,通过本领域已知并且还在以下参考文献中描述的方法进行所述替换:Spatola,A.F.在"《氨基酸、肽和蛋白质的化学和生物化学(Chemistry and Biochemistry of Amino Acids,Peptides,and Proteins)》"Weinstein,B.编辑,马塞尔·德克尔出版社(Marcel Dekker),纽约,第267页(1983);Spatola,A.F.,Vega Data(1983年3月),第1卷,第3期,"《肽主链修饰(Peptide Backbone Modifications)》"(综述);Morley,J.S.(1980)《药理科学趋势(Trends Pharm.Sci.)》第463-468页(综述);Hudson,D.等人(1979)《国际肽和蛋白质研究杂志(Int.J.Pept.Prot.Res.)》14:177-185(-CH2NH-,CH2CH2-);Spatola,A.F.等人(1986)《生命科学(Life Sci.)》38:1243-1249(-CH2-S);Hann,M.M.(1982)《化学学会杂志珀金翻译I(J.Chem.Soc.Perkin Trans.I.)》307-314(-CH-CH-,顺式和反式);Almquist,R.G.等人(190)《医药化学杂志》23:1392-1398(-COCH2-);Jennings-White,C.等人(1982)《四面体快报(Tetrahedron Lett.)》23:2533(-COCH2-);Szelke,M.等人《欧洲应用(European Appln.)》EP 45665(1982)CA:97:39405(1982)(-CH(OH)CH2-);Holladay,M.W.等人(1983)《四面体快报》(1983)24:4401-4404(-C(OH)CH2-);以及Hruby,V.J.(1982)《生命科学》(1982)31:189-199(-CH2-S-);其中的每一个通过引用并入本文。特别优选的非肽键是-CH2NH-。此类肽模拟物可以具有相对于多肽实施例的显著优点,包括例如:更经济的生产、更大的化学稳定性、增强的药理学特性(半衰期、吸收、效力、功效等)、改变的特异性(例如,宽普生物活性)、降低的抗原性等。模拟肽的标记通常涉及直接地或通过间隔子(例如,酰胺基团)将一个或多个标记共价附接到模拟肽上的通过定量结构活性数据和/或分子建模预测的非干扰位置。此类非干扰位置通常是不与模拟肽所结合以产生治疗性作用的大多肽形成直接接触的位置。模拟肽的衍生化(例如,标记)应当基本上不干扰模拟肽的所需生物或药理学活性。

[1243] 本发明还涵盖小分子,其可以调控(增强或抑制)例如本文所述或表1中列出的生物标记物与其天然结合配偶体之间的相互作用。本发明的小分子可以使用本领域已知的组合文库方法中的多种方法中的任一种来获得,包括:可空间寻址的平行固相或液相文库;需要卷积的合成文库方法;'一珠一化合物'文库方法;以及使用亲和色谱法选择的合成文库方法。(Lam,K.S.(1997)《抗癌药物研究(Anticancer Drug Des.)》12:145)。

[1244] 用于合成分子文库的方法的实例可以在本领域中见于例如:DeWitt等人(1993)

《美国科学院院报》90:6909;Erb等人(1994)《美国科学院院报》91:11422;Zuckermann等人(1994)《医药化学杂志》37:2678;Cho等人(1993)《科学》261:1303;Carrell等人(1994)《德国应用化学(Angew.Chem.Int.Ed.Engl.)》33:2059;Carell等人(1994)《德国应用化学》33:2061;Gallop等人(1994)《医药化学杂志》37:1233。

[1245] 化合物的文库可以在溶液(例如,Houghten(1992)《生物技术》13:412-421)中呈现,或在珠(Lam(1991)《自然》354:82-84)、芯片(Fodor(1993)《自然》364:555-556)、细菌(Ladner USP 5,223,409)、孢子(Ladner USP‘409)、质粒(Cull等人(1992)《美国科学院院报》89:1865-1869)上呈现或在噬菌体(Scott和Smith(1990)《科学》249:386-390);(Devlin(1990)《科学》249:404-406);(Cwirla等人(1990)《美国科学院院报》87:6378-6382);(Felici(1991)《分子生物学杂志》222:301-310);(Ladner同上)上呈现。化合物可以在基于细胞或基于非细胞的测定中筛选。化合物可以在池中(例如,每个测试样品中多个化合物)或作为个体化合物筛选。

[1246] 本发明还涉及本发明的生物标记物(包括表1中列出的生物标记物)或其片段的嵌合蛋白或融合蛋白。如本文所用,“嵌合蛋白”或“融合蛋白”包含本发明的一种或多种生物标记物(包括表1中列出的一种或多种生物标记物)或其片段,其操作性地连接到具有对应于与相应生物标记物基本上不同源的蛋白质的氨基酸序列的另一个多肽。在优选实施例中,融合蛋白包含本发明的一种或多种生物标记物(包括表1中列出的一种或多种生物标记物)或其片段的至少一个生物活性部分。在融合蛋白内,术语“操作性地连接”旨在指示生物标记物序列和非生物标记物序列以一种方式彼此框内融合,以便保留当独立于融合体表达时表现出的功能。“另一个”序列可以分别与生物标记物序列的N末端或C末端融合。

[1247] 此类融合蛋白可以通过编码第一肽的核苷酸序列和编码第二肽的核苷酸序列的重组表达产生。第二肽可以任选地对应于改变第一肽的溶解性、亲和力、稳定性或效价的部分,例如免疫球蛋白恒定区。在另一个优选实施例中,第一肽由生物活性分子的部分(例如,多肽的细胞外部分或配体结合部分)组成。第二肽可以包括免疫球蛋白恒定区,例如人Cγ1结构域或Cγ 4结构域(例如,人IgCγ 1或人IgCγ 4的铰链区、CH2区和CH3区,参见例如,Capon等人美国专利5,116,964;5,580,756;5,844,095等,通过引用并入本文)。此类恒定区可以保留介导效应功能(例如,Fc受体结合)的区域,或者可以被改变以减少效应功能。所得的融合蛋白可以具有与独立表达的第一肽相比改变的溶解性、结合亲和力、稳定性和/或效价(即,每个多肽可用的结合位点的数量),并且可以增加蛋白质纯化的效率。通过重组技术产生的融合蛋白和肽可以从细胞和含有蛋白质或肽的培养基的混合物分泌和分离。可替代地,蛋白质或肽可以保留在细胞质中,并且收获、裂解细胞,并且分离蛋白质。细胞培养物通常包括宿主细胞、培养基和其他副产物。用于细胞培养的合适的培养基是本领域熟知的。蛋白质和肽可以使用本领域已知的用于纯化蛋白质和肽的技术从细胞培养基、宿主细胞或两者分离。用于转染宿主细胞和纯化蛋白质和肽的技术是本领域已知的。

[1248] 优选地,本发明的融合蛋白通过标准重组DNA技术产生。例如,根据常规技术将编码不同多肽序列的DNA片段框内连接在一起,所述常规技术例如采用平末端或交错末端用于连接、限制性酶消化以提供适当的末端、粘性末端的填充(根据需要)、碱性磷酸酶处理以避免不期望的接合以及酶促连接。在另一个实施例中,融合基因可以通过常规技术(包括自动化DNA合成仪)合成。可替代地,基因片段的PCR扩增可以使用锚定引物进行,所述锚定引

物在两个连续基因片段之间产生互补突出端,其随后可以退火并重新扩增以产生嵌合基因序列(参见例如,《即分子生物学实验指南》,Ausubel等人编辑,约翰威利父子:1992)。

[1249] 特别优选的Ig融合蛋白包括与免疫球蛋白恒定区(例如,Fc区)偶联的表1中列出的一种或多种生物标记物的细胞外结构域部分或可变区样结构域。免疫球蛋白恒定区可以含有基因修饰,其减少或消除免疫球蛋白结构中固有的效应活性。例如,编码目标多肽的细胞外部分的DNA可以接合至通过定点诱变修饰的编码人IgGγγ1和/或IgGγγ4的铰链区、CH2区和CH3区的DNA,如WO 97/28267中所教导的。

[1250] 在另一个实施例中,融合蛋白在其N末端含有异源信号序列。在某些宿主细胞(例如,哺乳动物宿主细胞)中,多肽的表达和/或分泌可以通过使用异源信号序列来增加。

[1251] 本发明的融合蛋白可以用作免疫原以在受试者中产生抗体。此类抗体可以用于纯化由其生成融合蛋白的相应天然多肽,或者在筛选测定中鉴定抑制一种或多种生物标记物多肽或其片段与其天然结合配偶体或其片段之间的相互作用的多肽。

[1252] 本文所述的调控剂(例如,抗体、小分子、肽、融合蛋白或小核酸)可以掺入药物组合物中并向受试者体内施用。所述组合物可以含有本文所述的单一此类分子或试剂或试剂的任何组合。根据本文提供的方法和组合物,本文所述的“单一活性剂”可以与本领域已知的其他药理学活性化合物(“第二活性剂”)组合。

[1253] 本文所述的生物标记物核酸和/或生物标记物多肽分子的产生和使用可以通过使用标准重组技术来促进。在一些实施例中,此类技术使用载体,优选地表达载体,其含有编码此类多肽的生物标记物多肽或部分的核酸。如本文所用,术语“载体”是指能够转运与它连接的另一个核酸的核酸分子。一种类型的载体是“质粒”,所述质粒是指可以将额外的DNA区段连接到其中的环状双链DNA环。另一种类型的载体是病毒载体,其中额外的DNA区段可以连接到病毒基因组中。某些载体能够在它们被引入到其中的宿主细胞中自主复制(例如,具有细菌复制起点的细菌载体和游离型哺乳动物载体)。其他载体(例如,非游离型哺乳动物载体)在引入到宿主细胞中之后整合到宿主细胞的基因组中,并且因此与宿主基因组一起复制。此外,某些载体(即,表达载体)能够指导它们可操作地连接到的基因的表达。通常,在重组DNA技术中使用的表达载体经常呈质粒(载体)的形式然而,本发明旨在包括此类其他形式的表达载体,诸如病毒载体(例如,复制缺陷型逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒),它们发挥等效功能。

[1254] 本发明的重组表达载体包含呈适用于宿主细胞中核酸的表达的形式的本发明的核酸。这意味着,重组表达载体包括基于用于表达的宿主细胞选择的一个或多个调控序列,所述调控序列可操作地连接到待表达的核酸序列。在重组表达载体内,“可操作地连接”旨在意指目标核苷酸序列以允许核苷酸序列表达(例如,在体外转录/翻译系统中,或当载体被引入到宿主细胞中时在宿主细胞中)的方式连接到调控序列。术语“调控序列”旨在包括启动子、增强子和其他表达控制元件(例如,聚腺苷酸化信号)。此类调控序列描述于例如Goeddel,《酶学方法:基因表达技术(Methods in Enzymology:Gene Expression Technology)》第185卷,学术出版,圣地亚哥,加利福尼亚州(1991)。调控序列包括指导核苷酸序列在多种类型的宿主细胞中的组成型表达的那些以及指导核苷酸序列仅在某些宿主细胞中的表达的那些(例如,组织特异性调控序列)。本领域技术人员将理解,表达载体的设计可以取决于诸如以下的因素:待转化的宿主细胞的选择、所需蛋白质的表达水平等。本发

明的表达载体可以被引入到宿主细胞中,从而产生由如本文所述的核酸编码的蛋白质或肽,包括融合蛋白或肽。

[1255] 用于本发明的重组表达载体可以被设计用于对应于本发明的标记物的多肽在原核细胞(例如,大肠杆菌)或真核细胞(例如,昆虫细胞{使用杆状病毒表达载体}、酵母细胞或哺乳动物细胞)中的表达。合适的宿主细胞进一步在Goeddel,同上中讨论。可替代地,重组表达载体可以例如使用T7启动子调控序列和T7聚合酶来体外转录和翻译。

[1256] 原核生物中的蛋白质表达最常用含有指导融合蛋白或非融合蛋白的表达的组成型或诱导型启动子的载体在大肠杆菌中进行。融合载体向其中编码的蛋白质,通常向重组蛋白的氨基末端添加多个氨基酸。此类融合载体通常服务于三个目的:1)增加重组蛋白的表达;2)增加重组蛋白的溶解性;以及3)通过充当亲和纯化中的配体来帮助重组蛋白的纯化。在融合表达载体中,蛋白水解裂解位点经常被引入在融合部分和重组蛋白的接合点处,以实现重组蛋白与随后进行融合蛋白的纯化的融合部分的分离。此类酶及其同源识别序列包括Xa因子、凝血酶和肠激酶。典型的融合表达载体包括pGEX(法玛西亚生物科技有限公司(Pharmacia Biotech Inc);Smith和Johnson,1988,《基因(Gene)》67:31-40)、pMAL(新英格兰实验室(New England Biolabs),贝弗利,马萨诸塞州)和pRIT5(法玛西亚,皮斯卡塔韦,新泽西州),其分别将谷胱甘肽S-转移酶(GST)、麦芽糖E结合蛋白或蛋白质A与靶重组蛋白融合。

[1257] 合适的诱导型非融合大肠杆菌表达载体的实例包括pTrc(Amann等人,1988,《基因》69:301-315)和pET 11d(Studier等人,第60-89页,在《基因表达技术:酶学方法(Gene Expression Technology:Methods in Enzymology)》中第185卷,学术出版,圣地亚哥,加利福尼亚州,1991)。来自pTrc载体的靶生物标记物核酸表达依赖于来自杂交trp-lac融合启动子的宿主RNA聚合酶转录。来自pET 11d载体的靶生物标记物核酸表达依赖于通过共表达的病毒RNA聚合酶(T7 gn1)介导的来自T7 gn10-lac融合启动子的转录。该病毒聚合酶在lacUV 5启动子的转录控制下由来自携带T7 gn1基因的驻留型原噬菌体的宿主菌株BL21(DE3)或HMS174(DE3)提供。

[1258] 使在大肠杆菌中的重组蛋白表达最大化的一种策略是在蛋白水解裂解重组蛋白的能力受损的宿主细菌中表达蛋白质(Gottesman,第119-128页,在《基因表达技术:酶学方法》中第185卷,学术出版,圣地亚哥,加利福尼亚州,1990。另一种策略是改变待插入到表达载体中的核酸的核酸序列,使得每个氨基酸的个体密码子是大肠杆菌中优先使用的那些(Wada等人,1992,《核酸研究》20:2111-2118)。本发明的核酸序列的此类改变可以通过标准DNA合成技术来进行。

[1259] 在另一个实施例中,表达载体是酵母表达载体。用于在酵母酿酒酵母中表达的载体的实例包括pYepSec1(Baldari等人,1987,《欧洲分子生物学学会会刊》6:229-234)、pMFa(Kurjan和Herskowitz,1982,《细胞》30:933-943)、pJRY88(Schultz等人,1987,《基因》54:113-123)、pYES2(英杰公司(Invitrogen Corporation),圣地亚哥,加利福尼亚州)和pPicZ(英杰公司,圣地亚哥,加利福尼亚州)。

[1260] 可替代地,表达载体是杆状病毒表达载体。可用于在培养的昆虫细胞(例如,Sf 9细胞)中表达蛋白质的杆状病毒载体包括pAc系列(Smith等人,1983,《分子与细胞生物学(Mol.Cell Biol.)》3:2156-2165)和pVL系列(Lucklow和Summers,1989,《病毒学

(Virology)》170:31-39)。

[1261] 在再一个实施例中,本发明的核酸使用哺乳动物表达载体在哺乳动物细胞中表达。哺乳动物表达载体的实例包括pCDM8(Seed,1987,《自然》329:840)和pMT2PC(Kaufman等人,1987,《欧洲分子生物学学会会刊》6:187-195)。当在哺乳动物细胞中使用时,表达载体的控制功能经常由病毒调控元件提供。例如,常用的启动子来源于多瘤病毒、腺病毒2、巨细胞病毒和猿猴病毒40。对于原核细胞和真核细胞两者的其他合适的表达系统,参见Sambrook等人,同上的第16和17章。

[1262] 在另一个实施例中,重组哺乳动物表达载体能够指导特定细胞类型中优先进行的核酸表达(例如,组织特异性调控元件用于表达核酸)。组织特异性调控元件是本领域已知的。合适的组织特异性启动子的非限制性实例包括白蛋白启动子(肝特异性;Pinkert等人,1987,《基因与发展(Genes Dev.)》1:268-277)、淋巴特异性启动子(Calame和Eaton,1988,《免疫学前沿(Adv.Immunol.)》43:235-275)、特别是T细胞受体(Winoto和Baltimore,1989,《欧洲分子生物学学会会刊》8:729-733)和免疫球蛋白(Banerji等人,1983,《细胞》33:729-740;Queen和Baltimore,1983,《细胞》33:741-748)的启动子、神经元特异性启动子(例如,神经丝启动子;Byrne和Ruddle,1989,《美国科学院院报》86:5473-5477)、胰腺特异性启动子(Edlund等人,1985,《科学》230:912-916)和乳腺特异性启动子(例如,乳清启动子;美国专利第4,873,316号和欧洲申请公布第264,166号)。还涵盖发育调控启动子,例如鼠hox启动子(Kessel和Gruss,1990,《科学》249:374-379)和-甲胎蛋白启动子(Camper和Tilghman,1989,《基因与发展》3:537-546)。

[1263] 本发明进一步提供了一种重组表达载体,其包含以反义取向克隆到表达载体中的DNA分子。即,DNA分子以允许表达对于编码本发明的多肽的mRNA反义的RNA分子(通过DNA分子的转录)的方式可操作地连接到调控序列。可以选择可操作地连接到以反义取向克隆的核酸的调控序列,其指导各种细胞类型中反义RNA分子的持续表达,例如病毒启动子和/或增强子,或者可以选择指导反义RNA的组成型组织特异性或细胞类型特异性表达的调控序列。反义表达载体可以呈重组质粒、噬菌粒或减毒病毒的形式,其中反义核酸在高效率调控区的控制下产生,其活性可以通过病毒引入到其中的细胞类型确定。对于使用反义基因调控基因表达的讨论(参见Weintraub等人,1986,《遗传学进展(Trends in Genetics)》,第1(1)卷)。

[1264] 本发明的另一方面涉及本发明的重组表达载体引入到其中的宿主细胞。术语“宿主细胞”和“重组宿主细胞”在本文中可互换使用。应当理解,此类术语不仅是指特定受试者细胞,还是指此类细胞的子代或潜在子代。因为由于突变或环境影响,某些改变可能在后续代发生,所以此类子代可能实际上与亲本细胞不相同,但是仍然包括在如本文所用的术语的范围内。

[1265] 宿主细胞可以是任何原核细胞(例如,大肠杆菌)或真核细胞(例如,昆虫细胞、酵母或哺乳动物细胞)。

[1266] 可以经由常规转化或转染技术将载体DNA引入到原核细胞或真核细胞中。如本文所用,术语“转化”和“转染”旨在是指用于将外源核酸引入到宿主细胞中的多种本领域公认的技术,包括磷酸钙或氯化钙共沉淀、DEAE-葡聚糖介导的转染、脂转染或电穿孔。用于转化或转染宿主细胞的合适的方法可以见于Sambrook等人(同上)和其他实验室手册。

[1267] 对于哺乳动物细胞的稳定转染,已知根据所使用的表达载体和转染技术,仅小部分的细胞可以将外源DNA整合到其基因组中。为了鉴定并选择这些整合体,通常将编码可选择标记物(例如,对抗生素的抗性)的基因与目标基因一起引入到宿主细胞中。优选的可选择标记物包括赋予对于药物的抗性的那些,诸如G418、潮霉素和甲氨蝶呤。用引入的核酸稳定转染的细胞可以通过药物选择来鉴定(例如,并入可选择标记物基因的细胞将存活,而其他细胞将死亡)。

[1268] XII.分析生物标记物核酸和多肽

[1269] 可以根据本文所述的方法和本领域技术人员已知的技术分析生物标记物核酸和/或生物标记物多肽,以鉴定可用于本发明的此类基因或表达改变,包括但不限于:1)生物标记物转录物或多肽的水平的改变,2)从生物标记物基因删除或添加一个或多个核苷酸,4)生物标记物基因的一个或多个核苷酸的取代,5)生物标记物基因诸如表达调控区的异常修饰等。

[1270] a.用于检测拷贝数的方法

[1271] 评估生物标记物核酸的拷贝数的方法是本领域技术人员熟知的。染色体获得或缺失的存在或不存在可以简单地通过确定本文鉴定的区域或标记物的拷贝数来评估。

[1272] 在一个实施例中,针对含有基因组标记物的基因组基因座中拷贝数变化的存在测试生物样品。至少3、4、5、6、7、8、9或10个拷贝数预测抗HHLA2抗体疗法的较差结果。

[1273] 评估生物标记物基因座的拷贝数的方法包括但不限于基于杂交的测定。基于杂交的测定包括但不限于传统“直接探针”方法,诸如Southern印迹、原位杂交(例如,FISH和FISH加SKY)方法,和“比较探针”方法,诸如比较基因组杂交(CGH),例如基于cDNA或基于寡核苷酸的CGH。所述方法可以各种各样的形式使用,包括但不限于底物(例如,膜或玻璃)结合方法或基于阵列的方法。

[1274] 在一个实施例中,评估样品中的生物标记物基因拷贝数涉及Southern印迹。在Southern印迹中,将基因组DNA(通常为片段化的并且在电泳凝胶上分离)与对于靶区域具有特异性的探针杂交。将来自靶区域的探针的杂交信号强度与来自正常基因组DNA(例如,相同或相关细胞、组织、器官等的非扩增部分)的分析的对照探针信号进行比较可以提供靶核酸的相对拷贝数的估计。可替代地,Northern印迹可以用于评估样品中编码核酸的拷贝数。在Northern印迹中,mRNA与对于靶区域具有特异性的探针杂交。将来自靶区域的探针的杂交信号强度与来自正常RNA(例如,相同或相关细胞、组织、器官等的非扩增部分)的分析的对照探针信号进行比较可以提供靶核酸的相对拷贝数的估计。可替代地,可以使用本领域熟知的检测RNA的其他方法,使得相对于适当对照(例如,相同或相关细胞组织、器官等的非扩增部分)的更高或更低表达提供靶核酸的相对拷贝数的估计。

[1275] 用于确定基因组拷贝数的替代性手段是原位杂交(例如,Angerer(1987)《酶学方法(Meth.Enzymol)》152:649)。通常,原位杂交包含以下步骤:(1)固定待分析的组织或生物结构;(2)对生物结构进行预杂交处理以增加靶DNA的可及性,并且减少非特异性结合;(3)将核酸的混合物与生物结构或组织中的核酸杂交;(4)进行杂交后洗涤以去除杂交中未结合的核酸片段,以及(5)检测杂交的核酸片段。这些步骤中的每一个中使用的试剂和使用的条件根据具体应用而变化。在典型的原位杂交测定中,将细胞固定到固体支撑物,通常是玻璃载玻片。如果探测核酸,则通常将细胞用热或碱变性。然后将细胞在中等温度下与杂交溶

液接触,以允许对编码蛋白质的核酸序列具有特异性的标记探针退火。然后通常将靶(例如,细胞)在预先确定的严格性下或在增加的严格性下洗涤,直至获得适当的信噪比。通常用例如放射性同位素或荧光报告子标记探针。在一个实施例中,探针足够长,以便在严格条件下与靶核酸特异性地杂交。探针的长度通常为约200个碱基至约1000个碱基。在一些应用中,需要阻断重复序列的杂交能力。因此,在一些实施例中,使用tRNA、人基因组DNA或Cot-I DNA来阻断非特异性杂交。

[1276] 用于确定基因组拷贝数的替代性手段是比较基因组杂交。通常,从正常参考细胞以及从测试细胞(例如,肿瘤细胞)分离基因组DNA,并且扩增(如果需要的话)。将两个核酸不同地标记,并且然后与参考细胞的中期染色体进行原位杂交。去除参考和测试DNA两者中的重复序列,或者通过某一手段降低其杂交能力,例如通过与适当的阻断性核酸进行预杂交,和/或在所述杂交期间包括针对所述重复序列的此类阻断性核酸序列。如果需要,然后将结合的标记的DNA序列以可视化的形式呈现。可以通过检测来自两个DNA的信号的比率改变的区域来鉴定拷贝数增加或降低的测试细胞中的染色体区域。例如,与基因组的其他区域相比,测试细胞中拷贝数降低的那些区域显示比参考相对更低的来自测试DNA的信号。测试细胞中拷贝数增加的区域显示相对更高的来自测试DNA的信号。在存在染色体缺失或倍增的情况下,检测来自两个标记的信号的比率的差异,并且所述比率将提供拷贝数的量度。在CGH的另一个实施例阵列CGH(aCGH)中,用阵列上固体支撑物结合的靶核酸的集合替换固定的染色体元件,从而允许大部分或所有的基因组在固体支撑物结合的靶的集合中表征。靶核酸可以包含cDNA、基因组DNA、寡核苷酸(例如,检测单核苷酸多态性)等。还可以用单色标记进行基于阵列的CGH(相对于用两种不同的染料标记对照和可能的肿瘤样品,并且在杂交之前将它们混合,由于阵列上探针的竞争性杂交,这将产生一个比率)。在单色CGH中,标记对照并与一个阵列杂交,并且读取绝对信号,并且标记可能的肿瘤样品并与第二阵列(具有相同的内容物)杂交,并且读取绝对信号。基于来自两个阵列的绝对信号计算拷贝数差异。制备固定的染色体或阵列并且进行比较基因组杂交的方法是本领域熟知的(参见例如,美国专利:第6,335,167号;第6,197,501号;第5,830,645号;和第5,665,549号以及Albertson(1984)《欧洲分子生物学学会会刊》3:1227-1234;Pinkel(1988)《美国科学院院报》85:9138-9142;EPO公布第430,402号;《分子生物学方法(Methods in Molecular Biology)》,第33卷:“原位杂交方案(In situ Hybridization Protocols)”,Choo编辑,胡玛纳出版社(Humana Press),托托瓦,新泽西州(1994)等)。在另一个实施例中,使用Pinkel等人(1998)《自然遗传学(Nature Genetics)》20:207-211或Kallioniemi(1992)《美国科学院院报》89:5321-5325(1992)的杂交方案。

[1277] 在又一个实施例中,可以使用基于扩增的测定来测量拷贝数。在此类基于扩增的测定中,核酸序列充当扩增反应(例如,聚合酶链式反应(PCR))中的模板。在定量扩增中,扩增产物的量与原始样品中模板的量成比例。与适当对照(例如,健康组织)的比较可以提供拷贝数的量度。

[1278] “定量”扩增的方法是本领域技术人员熟知的。例如,定量PCR涉及使用相同的引物同时共扩增已知量的对照序列。这提供可以用于校准PCR反应的内部标准。定量PCR的详细方案在Innis等人(1990)《PCR方案:方法和应用指南(PCR Protocols,A Guide to Methods and Applications)》,学术出版公司,纽约)中提供。使用定量PCR分析测量微卫星基因座处

的DNA拷贝数描述于Ginzonger等人(2000)《癌症研究》60:5405-5409。基因的已知核酸序列足以使本领域技术人员能够常规地选择引物来扩增基因的任何部分。荧光定量PCR还可以用于本发明的方法。在荧光定量PCR中,定量是基于荧光信号(例如,TaqMan和SYBR绿)的量。

[1279] 其他合适的扩增方法包括但不限于连接酶链反应(LCR)(参见Wu和Wallace(1989)《遗传学(Genomics)》4:560,Landegren等人(1988)《科学》241:1077以及Barringer等人(1990)《基因》89:117)、转录扩增(Kwoh等人(1989)《美国科学院院报》86:1173)、自主序列复制(Guatelli等人(1990)《美国科学院院报》87:1874)、斑点PCR(dot PCR)和接头衔接子PCR等。

[1280] 杂合性缺失(LOH)和主拷贝比例(MCP)映射(Wang,Z.C.等人(2004)《癌症研究》64(1):64-71;Seymour,A.B.等人(1994)《癌症研究》54,2761-4;Hahn,S.A.等人(1995)《癌症研究》55,4670-5;Kimura,M.等人(1996)《基因染色体癌症(Genes Chromosomes Cancer)》17,88-93;Li等人,(2008)《MBC生物信息学(MBC Bioinform.)》9,204-219)也可以用于鉴定扩增或缺失的区域。

[1281] b.用于检测生物标记物核酸表达的方法

[1282] 生物标记物表达可以通过各种各样的用于检测转录的分子或蛋白质的表达的熟知方法中的任一种来评定。此类方法的非限制性实例包括用于检测分泌的细胞表面、细胞质或核蛋白的免疫学方法、蛋白质纯化方法、蛋白质功能或活性测定、核酸杂交方法、核酸逆转录方法和核酸扩增方法。

[1283] 在优选实施例中,特定基因的活性通过基因转录物(例如,mRNA)的量度、翻译的蛋白质的量的量度或基因产物活性的量度来表征。标记物表达可以各种方式监测,包括通过检测mRNA水平、蛋白质水平或蛋白质活性,其中的任一个可以使用标准技术来测量。检测可以涉及基因表达(例如,基因组DNA、cDNA、mRNA、蛋白质或酶活性)的水平的定量,或者可替代地,可以是基因表达的水平的定性评定,具体地与对照水平进行比较。检测的水平类型在上下文中是清楚的。

[1284] 在另一个实施例中,检测或确定生物标记物及其功能上相似的同源物(包括其片段或遗传改变)(例如,在其调控区或启动子区中)的表达水平包含检测或确定目标标记物的RNA水平。在一个实施例中,获得来自待测试的受试者的一个或多个细胞,并且从细胞分离RNA。在优选实施例中,从受试者获得乳腺组织细胞的样品。

[1285] 在一个实施例中,从单个细胞获得RNA。例如,可以通过激光捕获显微切割(LCM)从组织样品分离细胞。使用该技术,可以从组织切片(包括染色的组织切片)分离细胞,从而确保分离了所需的细胞(参见例如,Bonner等人(1997)《科学》278:1481;Emmert-Buck等人(1996)《科学》274:998;Fend等人(1999)《美国病理学杂志(Am.J.Path.)》154:61以及Murakami等人(2000)《国际肾脏杂志(Kidney Int.)》58:1346)。例如,Murakami等人,同上,描述了从先前免疫染色的组织切片分离细胞。

[1286] 还可以从受试者获得细胞并且体外培养细胞,以便获得可以从其提取RNA的较大细胞群体。用于建立未转化细胞的培养物(即,原代细胞培养物)的方法是本领域已知的。

[1287] 当从组织样品分离RNA或从个体分离细胞时,在从受试者取出组织或细胞之后防止基因表达的任何进一步变化可能是重要的。已知表达水平的变化在扰动(例如,热休克或用脂多糖(LPS)或其他试剂活化)之后快速变化。此外,组织和细胞中的RNA可能快速降解。

因此,在优选实施例中,从受试者获得的组织或细胞应尽快快速冷冻。

[1288] 可以通过各种方法,例如硫氰酸胍裂解之后进行CsCl离心(Chirgwin等人,1979,《生物化学(Biochemistry)》18:5294-5299)来从组织样品提取RNA。可以如在用于由单细胞制备cDNA文库的方法中所述获得来自单细胞的RNA,诸如Dulac,C.(1998)《发育生物学的当前主题(Curr.Top.Dev.Biol.》36,245和Jena等人(1996)《免疫学方法杂志(J.Immunol.Methods)》190:199中描述的那些。必须注意例如通过包含RNAsin来避免RNA降解。

[1289] 然后RNA样品可以在特定物种中富集。在一个实施例中,从RNA样品分离poly(A)+RNA。通常,此类纯化利用mRNA上的poly-A尾的优势。具体地并且如上所述,可以将poly-T寡核苷酸固定在固体支撑物上以充当mRNA的亲和配体。用于此目的的试剂盒是可商购获得的,例如MessageMaker试剂盒(生命技术公司(Life Technologies),中央格兰德岛,纽约州)。

[1290] 在优选实施例中,RNA群体富集在标记物序列中。可以例如通过引物特异性cDNA合成或基于cDNA合成的多轮线性扩增和模板指导的体外转录来进行富集(参见例如,Wang等人(1989)《美国科学院院报》86,9717;Dulac等人,同上以及Jena等人,同上)。

[1291] 可以进一步扩增在特定物种或序列中富集或未富集的RNA群体。如本文所定义,"扩增过程"被设计来增强、增加或强化RNA内的分子。例如,在RNA是mRNA的情况下,扩增过程诸如RT-PCR可以用于扩增mRNA,使得信号可检测或检测增强。此类扩增过程是有益的,尤其是当生物、组织或肿瘤样品的大小或体积较小时。

[1292] 可以使用各种扩增和检测方法。例如,以下包括在本发明的范围内:将mRNA逆转录为cDNA,接着进行聚合酶链式反应(RT-PCR);或使用单一酶用于这两个步骤,如美国专利第5,322,770号中所述,或将mRNA逆转录为cDNA,接着进行对称缺口连接酶链反应(RT-AGLCR),如由R.L.Marshall等人,《PCR方法和应用》4:80-84(1994)所述。还可以使用实时PCR。

[1293] 可以在本文中使用的其他已知的扩增方法包括但不限于所谓的"NASBA"或"3SR"技术,在《美国科学院院报》87:1874-1878(1990)中描述并且还在《自然》350(第6313号):91-92(1991)中描述;Q-β扩增,如公布的欧洲专利申请(EPA)第4544610号中所述;链置换扩增(如G.T.Walker等人,《临床化学(Clin.Chem.)》42:9-13(1996)和欧洲专利申请第684315号中所述);靶介导的扩增,如由PCT公布WO9322461所述;PCR;连接酶链反应(LCR)(参见例如,Wu和Wallace,《遗传学(Genomics)》4,560(1989),Landegren等人,《科学》241,1077(1988));自主序列复制(SSR)(参见例如,Guatelli等人,《美国科学院院报》,87,1874(1990));以及转录扩增(参见例如,Kwoh等人,《美国科学院院报》86,1173(1989))。

[1294] 现有技术中已知多种用于确定基因表达的绝对和相对水平的技术,适用于本发明的常用技术包括Northern分析、RNA酶保护测定(RPA)、基于微阵列和PCR的技术,诸如定量PCR和差异显示PCR。例如,Northern印迹涉及在变性琼脂糖凝胶上运行RNA制剂,并且将其转移到合适的支撑物,诸如活化纤维素、硝化纤维素或玻璃或尼龙膜。然后将放射标记的cDNA或RNA与制剂杂交,洗涤并通过放射自显影分析。

[1295] 还可以采用原位杂交可视化,其中将放射活性标记的反义RNA探针与活检样品的薄切片杂交,洗涤,用RNA酶裂解并暴露于感光乳剂以用于放射自显影。可以将样品用苏木

精染色以显示出样品的组织学组成,并且用合适的滤光器进行的暗场成像显示显影乳剂。还可以使用非放射活性标记,诸如地高辛。

[1296] 可替代地,可以在DNA阵列、芯片或微阵列上检测mRNA表达。可以将从受试者获得的测试样品的标记的核酸与包含生物标记物DNA的固体表面杂交。用含有生物标记物转录物的样品获得了阳性杂交信号。制备DNA阵列的方法及其用途是本领域熟知的(参见例如,美国专利:第6,618,6796号;第6,379,897号;第6,664,377号;第6,451,536号;第548,257号;U.S.20030157485和Schena等人(1995)《科学》20,467-470;Gerhold等人(1999)《生物化学趋势(Trends In Biochem.Sci.)》24,168-173;以及Lennon等人(2000)《今日药物发现(Drug Discovery Today)》5,59-65,通过引用整体并入本文)。还可以进行基因表达系列分析(SAGE)(参见例如,美国专利申请20030215858)。

[1297] 为了监测mRNA水平,例如,从待测试的生物样品提取mRNA,逆转录,并且生成荧光标记的cDNA探针。然后用标记的cDNA探针探测能够与标记物cDNA杂交的微阵列,扫描载玻片并且测量荧光强度。该强度与杂交强度和表达水平相关。

[1298] 可以用于本文所述的方法的探针类型包括cDNA、核糖探针、合成寡核苷酸和基因组探针。使用的探针类型通常由具体情况决定,例如核糖探针用于原位杂交,而cDNA用于Northern印迹。在一个实施例中,探针是针对对于RNA独特的核苷酸区域。探针可以如差异地识别标记物mRNA转录物所需的那样短,并且可以短至例如15个碱基;然而,可以使用至少17、18、19或20或更多个碱基的探针。在一个实施例中,引物和探针在严格条件下与具有对应于标记物的核苷酸序列的DNA片段特异性地杂交。如本文所用,术语“严格条件”意指杂交仅在核苷酸序列中存在至少95%同一性的情况下发生。在另一个实施例中,当序列之间存在至少97%同一性时,发生在“严格条件”下的杂交。

[1299] 标记探针的形式可以是适当的任何形式,诸如使用放射性同位素,例如^{32}P和^{35}S。可以通过使用合适标记的碱基来实现用放射性同位素进行的标记,无论探针是化学合成的还是生物合成的。

[1300] 在一个实施例中,生物样品含有来自测试受试者的多肽分子。可替代地,生物样品可以含有来自测试受试者的mRNA分子或来自测试受试者的基因组DNA分子。

[1301] 在另一个实施例中,所述方法进一步涉及从对照受试者获得对照生物样品;使对照样品与能够检测标记物多肽、mRNA、基因组DNA或其片段的化合物或试剂接触,使得在生物样品中检测标记物多肽、mRNA、基因组DNA或其片段的存在;以及将对照样品中标记物多肽、mRNA、基因组DNA或其片段的存在与测试样品中标记物多肽、mRNA、基因组DNA或其片段的存在进行比较。

[1302] c.用于检测生物标记物蛋白表达的方法

[1303] 可以通过检测或定量表达的多肽来检测和/或定量生物标记物蛋白的活性或水平。可以通过本领域技术人员熟知的多种手段中的任一种来检测和定量多肽。由生物标记物核酸及其功能上相似的同源物(包括其片段或遗传改变)编码的多肽(例如,在其调控区或启动子区中)的多肽表达的异常水平与癌症对于抗HHLA2抗体疗法的应答的可能性相关联。可以使用本领域已知的用于检测多肽的任何方法。此类方法包括但不限于免疫扩散、免疫电泳、放射免疫测定(RIA)、酶联免疫吸附测定(ELISA)、免疫荧光测定、蛋白质印迹法、粘合剂-配体测定、免疫组织化学技术、凝集、补体测定、高效液相色谱法(HPLC)、薄层色谱法

(TLC)、超扩散色谱法等(例如,《基础和临床免疫学(Basic and Clinical Immunology)》,Sites和Terr编辑,Appleton和Lange,诺瓦克,康涅狄格州,第217-262页,1991,通过引用并入)。粘合剂-配体免疫测定方法是优选的,其包括使抗体与一个或多个表位反应,并且竞争性地置换标记的多肽或其衍生物。在某些实施例中,使用表2中列出的抗体来检测和/或定量表1中列出的生物标记物。

[1304] 例如,可以执行ELISA和RIA程序,使得标记所需的生物标记物蛋白标准物(用放射性同位素,诸如^{125}I或^{35}S,或可测定的酶,诸如辣根过氧化酶或碱性磷酸酶),并且与未标记的样品一起与对应的抗体接触,在其上使用第二抗体结合第一抗体,并且测定放射活性或固定的酶(竞争性测定)。可替代地,使样品中的生物标记物蛋白与对应的固定抗体反应,使放射性同位素或酶标记的抗生物标记物蛋白抗体与系统反应,并且测定放射活性或酶(ELISA-夹心测定)。还可以采用合适的其他常规方法。

[1305] 以上技术基本上可以作为“一步”或“两步”测定执行。“一步”测定涉及使抗原与固定的抗体接触,并且在不洗涤的情况下使混合物与标记的抗体接触。“两步”测定涉及洗涤,之后使混合物与标记的抗体接触。还可以采用合适的其他常规方法。

[1306] 在一个实施例中,用于测量生物标记物蛋白水平的方法包含以下步骤:使生物样本与选择性地结合生物标记物蛋白的抗体或其变体(例如,片段)接触,以及检测所述抗体或其变体是否结合所述样品,并且从而测量生物标记物蛋白的水平。

[1307] 生物标记物蛋白和/或抗体的酶促和放射标记可以通过常规手段实现。此类手段通常包括诸如通过戊二醛将酶与所讨论的抗原或抗体特异性地共价连接,以便不会不利地影响酶的活性,这意味着酶仍然必须能够与其底物相互作用,但是不需要所有的酶有活性,前提是足够的酶保持活性来允许实现测定。实际上,用于结合酶的一些技术是非特异性的(诸如使用甲醛),并且仅产生一部分活性酶。

[1308] 通常希望将测定系统的一个组分固定在支撑物上,从而允许系统的其他组分与所述组分接触,并且在不费力且不费时的劳动的情况下容易地去除。可以将第二相远离第一相固定,但是一个相通常是足够的。

[1309] 可以将酶本身固定在支撑物上,但是如果需要固相酶,则这通常通过结合抗体并将固体附连到本领域熟知的支撑物、模型和系统来最好地实现。简单的聚乙烯可以提供合适的支撑物。

[1310] 可用于标记的酶不受具体限制,而是可以选自例如氧化酶组的成员。这些通过与其底物反应来催化过氧化氢的产生,并且葡萄糖氧化酶经常由于其良好的稳定性、易于获得性和便宜性以及其底物(葡萄糖)的随时可用性而被使用。氧化酶的活性可以通过测量在本领域熟知的受控条件下酶标记的抗体与底物反应之后形成的过氧化氢的浓度来测定。

[1311] 基于本公开并根据从业者的偏好,可以使用其他技术来检测生物标记物蛋白。一个此类技术是蛋白质印迹法(Towbin等人,《美国科学院院报》76:4350(1979)),其中将适当处理的样品在SDS-PAGE凝胶上运行,之后转移到固体支撑物,诸如硝化纤维素过滤器。然后将抗生物标记物蛋白抗体(未标记)与支撑物接触,并且通过第二免疫试剂,诸如标记的蛋白质A或抗免疫球蛋白(合适的标记,包括^{125}I、辣根过氧化酶和碱性磷酸酶)测定。还可以使用色谱检测。

[1312] 可以使用免疫组织化学来检测例如活检样品中的生物标记物蛋白的表达。将合适

的抗体与例如薄层的细胞接触,洗涤,并且然后与第二标记的抗体接触。标记可以是荧光标记物、酶(诸如过氧化酶)、亲和素或放射标记。使用显微镜来对测定进行视觉评分。

[1313] 抗生物标记物蛋白抗体(例如,在表2中列出)(诸如胞内抗体)还可以用于成像目的,例如以检测受试者的细胞或组织中生物标记物蛋白的存在。合适的标记包括放射性同位素碘(^{125}I,^{121}I)、碳(^{14}C)、硫(^{35}S)、氚(^{3}H)、铟(^{112}In)和锝(^{99}mTc),荧光标记诸如荧光素和罗丹明,和生物素。

[1314] 对于体内成像目的,抗体本身从体外不可检测,因此必须被标记或以其他方式修改以允许检测。用于该目的的标记物可以是基本上不干扰抗体结合,但是允许外部检测的任何标记物。合适的标记物可以包括可以通过X射线照相、NMR或MRI来检测的那些。对于X射线照相技术,合适的标记物包括发射可检测辐射,但是对受试者并不明显有害的任何放射性同位素,例如像钡或铯。NMR和MRI的合适的标记物通常包括具有可检测的特征性旋转的那些,诸如氘,其可以通过针对例如相关杂交瘤的营养物的合适标记来并入到体内。

[1315] 受试者的大小和所使用的成像系统将确定产生诊断性图像所需的成像部分的量。在放射性同位素部分的情况下,对于人受试者,注射的放射活性的量的范围通常是约5至20毫居里的锝-99。标记的抗体或抗体片段然后优先地在含有生物标记物蛋白的细胞的位置处积累。然后可以使用已知的技术来检测标记的抗体或抗体片段。

[1316] 可以用于检测生物标记物蛋白的抗体包括足够强地且特异性地结合待检测的生物标记物蛋白的任何抗体(例如,在表2中列出),无论是天然的或合成的,全长的或其片段,单克隆的或多克隆的。抗体可以具有至多约10^{-6}M、10^{-7}M、10^{-8}M、10^{-9}M、10^{-10}M、10^{-11}M、10^{-12}M的K_d。短语“特异性地结合”是指例如抗体与表位或抗原或抗原决定簇以一种方式结合,使得所述结合可以用相同或相似表位、抗原或抗原决定簇的第二制剂置换或与其竞争。抗体可以相对于其他蛋白质(诸如相关蛋白)优先结合生物标记物蛋白。

[1317] 抗体是可商购获得的,或者可以根据本领域已知的方法制备。

[1318] 可以使用的抗体及其衍生物涵盖多克隆或单克隆抗体、嵌合抗体、人抗体、人源化抗体、灵长类动物化(CDR植入的)抗体、镶面抗体或单链抗体以及抗体的功能片段,即生物标记物蛋白结合片段。例如,可以使用能够结合生物标记物蛋白或其部分的抗体片段,包括但不限于Fv、Fab、Fab’和F(ab’)2片段。此类片段可以通过酶促裂解或通过重组技术产生。例如,木瓜蛋白酶或胃蛋白酶裂解可以分别生成Fab或F(ab’)2片段。具有必需的底物特异性的其他蛋白酶也可以用于生成Fab或F(ab’)2片段。抗体还可以使用抗体基因以各种截短形式产生,在所述抗体基因中,一个或多个终止密码子被引入在天然终止位点的上游。例如,编码F(ab’)2重链部分的嵌合基因可以被设计成包括编码重链的CH、结构域和铰链区的DNA序列。

[1319] 合成和工程化抗体描述于例如Cabilly等人,美国专利第4,816,567号;Cabilly等人,欧洲专利第0,125,023 B1号;Boss等人,美国专利第4,816,397号;Boss等人,欧洲专利第0,120,694 B1号;Neuberger,M.S.等人,WO 86/01533;Neuberger,M.S.等人,欧洲专利第0,194,276 B1号;Winter,美国专利第5,225,539号;Winter,欧洲专利四0,239,400 B1号;Queen等人,欧洲专利第0451216 B1号;以及Padlan,E.A.等人,EP 0519596 A1。还参见Newman,R.等人,《生物技术》,10:1455-1460(1992),关于灵长类动物化抗体;以及Ladner等人,美国专利第4,946,778号和Bird,R.E.等人,《科学》,242:423-426(1988),关于单链抗

体。还可以使用由文库,例如噬菌体展示文库产生的抗体。

[1320] 在一些实施例中,使用特异性地结合除了抗体以外的生物标记物蛋白的试剂,诸如肽。特异性地结合生物标记物蛋白的肽可以通过本领域已知的任何手段鉴定。例如,生物标记物蛋白的特异性肽结合物可以使用肽噬菌体展示文库来筛选。

[1321] d.用于检测生物标记物结构改变的方法

[1322] 以下示例性方法可以用于鉴定生物标记物核酸和/或生物标记物多肽分子中结构改变的存在,以便例如鉴定过表达、功能过度等的HHLA2、TMIGD2、KIR3DL3。

[1323] 在某些实施例中,改变的检测涉及在以下中使用探针/引物:聚合酶链式反应(PCR)(参见例如,美国专利第4,683,195和4,683,202号),诸如锚定PCR或RACE PCR,或者可替代地,连接链反应(LCR)(参见例如,Landegran等人(1988)《科学》241:1077-1080;以及Nakazawa等人(1994)《美国科学院院报》91:360-364),后者尤其可以用于检测生物标记物核酸(诸如生物标记物基因)中的点突变(参见Abravaya等人(1995)《核酸研究》23:675-682)。改方法可以包括以下步骤:从受试者采集细胞样品;从样品的细胞分离核酸(例如,基因组、mRNA或两者);在一定条件下使核酸样品与一个或多个与生物标记物基因特异性地杂交的引物接触,使得发生生物标记物基因(如果存在的话)的杂交和扩增;以及检测扩增产物的存在或不存在,或者检测扩增产物的大小并与对照样品比较长度。预期可能希望将PCR和/或LCR用作初级扩增步骤,与用于检测本文所述的突变的任何技术结合使用。

[1324] 替代性扩增方法包括:自主序列复制(Guatelli,J.C.等人(1990)《美国科学院院报》87:1874-1878)、转录扩增系统(Kwoh,D.Y.等人(1989)《美国科学院院报》86:1173-1177)、Q-β复制酶(Lizardi,P.M.等人(1988)《生物技术》6:1197),或任何其他核酸扩增方法,接着使用本领域技术人员熟知的技术检测扩增的分子。在核酸分子以非常低的量存在时,这些检测方案尤其可用于检测核酸分子。

[1325] 在替代性实施例中,来自样品细胞的生物标记物核酸中的突变可以通过限制性酶切割模式的改变来鉴定。例如,分离样品和对照DNA,扩增(任选地),用一种或多种限制性内切酶消化,并且通过凝胶电泳确定片段长度大小并进行比较。样品与对照DNA之间片段长度大小的差异指示样品DNA中的突变。此外,使用序列特异性核酶(参见例如,美国专利第5,498,531号)可以用于通过产生或失去核酶切割位点针对特异性突变的存在进行评分。

[1326] 在其他实施例中,生物标记物核酸中的基因突变可以通过使样品和对照核酸(例如,DNA或RNA)与含有成百上千的寡核苷酸探针的高密度阵列杂交来鉴定(Cronin,M.T.等人(1996)《人类突变(Hum.Mutat.)》7:244-255;Kozal,M.J.等人(1996)《自然医学(Nat.Med.)》2:753-759)。例如,可以在含有光生成的DNA探针的二维阵列中鉴定生物标记物基因突变,如在Cronin等人(1996)同上中所述。简而言之,探针的第一杂交阵列可以用于扫描样品和对照中的长段DNA,以通过制备顺序重叠探针的线性阵列来鉴定序列之间的碱基变化。该步骤允许鉴定点突变。该步骤之后进行第二杂交阵列,其允许通过使用与检测的所有变体或突变互补的更小专用探针阵列来表征特定突变。每个突变阵列由平行探针组构成,一个与野生型基因互补而另一个与突变体基因互补。此类生物标记物基因突变可以在各种情况中鉴定,包括例如种系和体细胞突变。

[1327] 在再一个实施例中,可以使用本领域已知的各种测序反应中的任一种来对生物标记物基因进行直接测序,并且通过将样品生物标记物的序列与对应的野生型(对照)序列比

较来检测突变。测序反应的实例包括基于由以下开发的技术的那些:Maxam和Gilbert(1977)《美国科学院院报》74:560或Sanger(1977)《美国科学院院报》74:5463。还设想,在进行诊断性测定(Naeve(1995)《生物技术》19:448-53),包括通过质谱法进行的测序(参见例如,PCT国际公布第WO 94/16101号;Cohen等人(1996)《色谱法的发展(Adv.Chromatogr.)》36:127-162;以及Griffin等人(1993)《应用生物化学与生物技术(Appl.Biochem.Biotechnol.)》38:147-159)时,可以利用各种自动测序程序中的任一种。

[1328] 用于检测生物标记物基因中的突变的其他方法包括其中防止受裂解剂影响用于检测RNA/RNA或RNA/DNA异源双链体中的错配碱基的方法(Myers等人(1985)《科学》230:1242)。通常,“错配裂解”的本领域技术通过提供由使含有野生型生物标记物序列的(标记的)RNA或DNA与从组织样品获得的潜在突变体RNA或DNA杂交形成的异源双链体开始。将双链双链体用裂解双链体的单链区的试剂处理,所述双链体为诸如由于对照与样品链之间的碱基对错配而存在的双链体。例如,可以将RNA/DNA双链体用RNA酶处理,并且将DNA/DNA杂交体用SI核酸酶处理以酶促地消化错配区。在其他实施例中,可以将DNA/DNA或RNA/DNA双链体用羟胺或四氧化锇并且用哌啶处理,以便消化错配区。在错配区消化之后,将所得的材料在变性聚丙烯酰胺凝胶上根据大小分离,以确定突变位点。参见例如,Cotton等人(1988)《美国科学院院报》85:4397以及Saleeba等人(1992)《酶学方法》217:286-295。在优选实施例中,可以标记对照DNA或RNA以用于检测。

[1329] 在又一个实施例中,错配裂解反应采用在定义的系统中识别双链DNA中的错配碱基对的一种或多种蛋白质(所谓的“DNA错配修复”酶),以用于检测并映射从细胞样品获得的生物标记物cDNA中的点突变。例如,大肠杆菌的mutY酶裂解G/A错配处的A,并且来自HeLa细胞的胸苷DNA糖基化酶裂解G/T错配处的T(Hsu等人(1994)《癌变(Carcinogenesis)》15:1657-1662)。根据示例性实施例,基于生物标记物序列,例如用DNA错配修复酶处理的野生型生物标记物和裂解产物(如果有的话)的探针可以通过电泳方案等检测(例如,美国专利第5,459,039号。)

[1330] 在其他实施例中,电泳迁移率的变化可以用于鉴定生物标记物基因中的突变。例如,单链构象多态性(SSCP)可以用于检测突变体与野生型核酸之间的电泳迁移率的差异(Orita等人(1989)《美国科学院院报》86:2766;还参见Cotton(1993)《突变研究(Mutat.Res.)》285:125-144以及Hayashi(1992)《遗传分析、技术和应用(Genet.Anal.Tech.Appl.)》9:73-79)。样品和对照生物标记物核酸的单链DNA片段将变性并使其复性。单链核酸的二级结构根据序列变化,所得的电泳迁移率的变化使得能够检测甚至单碱基变化。可以用标记的探针标记或检测DNA片段。测定的敏感性可以通过使用RNA(而不是DNA)来增强,其中二级结构对于序列的变化更敏感。在优选实施例中,主题方法利用异源双链体分析来基于电泳迁移率的变化分离双链异源双链体分子(Keen等人(1991)《遗传学进展》7:5)。

[1331] 在再一个实施例中,使用变性梯度凝胶电泳(DGGE)来测定含有梯度变性剂的聚丙烯酰胺凝胶中突变体或野生型片段的移动(Myers等人(1985)《自然》313:495)。当使用DGGE作为分析方法时,例如通过由PCR添加大约40bp的高熔点的富含GC的DNA的GC封条来对DNA进行修饰以确保它不完全变性。在另一个实施例中,使用温度梯度替换变性梯度,以鉴定对照和样品DNA的迁移率的差异(Rosenbaum和Reissner(1987)《生物物理化学

(Biophys.Chem.)》265:12753)。

[1332] 其他用于检测点突变的技术的实例包括但不限于选择性寡核苷酸杂交、选择性扩增或选择性引物延伸。例如,可以制备其中已知突变位于中心的寡核苷酸引物,并且然后在仅发现完全匹配的情况下才允许杂交的条件下与靶DNA杂交(Saiki等人(1986)《自然》324:163;Saiki等人(1989)《美国科学院院报》86:6230)。在寡核苷酸附接到杂交膜并与标记的靶DNA杂交时,使此类等位基因特异性寡核苷酸与PCR扩增的靶DNA或多个不同的突变杂交。

[1333] 可替代地,依赖于选择性PCR扩增的等位基因特异性扩增技术可以与本发明结合使用。用作特异性扩增的引物的寡核苷酸可以在分子的中心携带目标突变(使得扩增依赖于差异杂交)(Gibbs等人(1989)《核酸研究》17:2437-2448),或者在一个引物的最3'末端处携带目标突变,其中在适当条件下,错配可以防止或减少聚合酶延伸(Prossner(1993)《生物技术趋势(Tibtech)》11:238)。此外,可能希望在突变区中引入新型限制性位点以产生基于裂解的检测(Gasparini等人(1992)《分子和细胞探针(Mol.Cell Probes)》6:1)。预期在某些实施例中,还可以使用用于扩增的Taq连接酶来进行扩增(Barany(1991)《美国科学院院报》88:189)。在此类情况下,仅在5'序列的3'末端处存在完全匹配的情况下才发生连接,从而使得可能通过查找扩增的存在或不存在来检测特定位点处已知突变的存在。

[1334] 抗癌疗法

[1335] 根据本文所述的方法,根据受试者中与癌症相关联的生物标记物量和/或活性来预测抗HHLA2抗体疗法的功效。在一个实施例中,可以施用此类抗HHLA2抗体疗法或疗法的组合(例如,与一种或多种额外的抗癌疗法,诸如另一种免疫检查点抑制剂组合的一种或多种抗HHLA2抗体疗法),尤其是在受试者首先被指示为对于抗HHLA2抗体疗法的可能应答者的情况下。在另一个实施例中,一旦受试者被指示为不是抗HHLA2抗体疗法的可能应答者,可以避免此类抗HHLA2抗体疗法,并且可以施用替代性治疗方案,诸如靶向和/或非靶向抗癌疗法。还设想组合疗法,其可以包含例如一种或多种化疗剂和辐射、一种或多种化疗剂和免疫疗法或者一种或多种化疗剂、辐射和化疗,其中的每一个可以与抗免疫检查点疗法组合。此外,调控特定靶的试剂的任何代表性实施例可以由本领域普通技术人员用于本文和以下所述的任何其他靶(例如,本文所述的直接和间接HHLA2抑制剂可以应用于其他免疫检查点抑制剂和/或HHLA2,诸如单特异性抗体、双特异性抗体、非活化形式、小分子、肽、干扰核酸等)。

[1336] 术语"靶向疗法"是指施用选择性地与所选的生物分子相互作用的试剂,从而治疗癌症。一个实例包括免疫检查点抑制剂,其是本领域熟知的。例如,抗CTLA-4途径剂(诸如治疗性单克隆阻断性抗体,其是本领域熟知的并在上文描述)可以用于靶向肿瘤微环境和CTLA-4途径诸如CTLA-4配体(例如,CD80和CD86)的表达不想要的组分的细胞。

[1337] 例如,术语"CTLA-4途径"是指CTLA-4受体及其配体,例如CD80和CD86。"CTLA-4途径抑制剂"阻断或以其他方式减少CTLA-4与其配体中的一者或两者之间的相互作用,使得由相互作用以其他方式生成的免疫抑制性信号传导被阻断或以其他方式减少。抗免疫检查点抑制剂可以是直接的或间接的。直接抗免疫检查点抑制剂阻断或以其他方式减少免疫检查点与其配体中的至少一者之间的相互作用。例如,CTLA-4抑制剂可以阻断CTLA-4与其配体中的一者或两者的结合。直接CTLA-4组合抑制剂是本领域熟知的,尤其是自从CTLA-4的天然结合配偶体(例如,CD80和CD86)已知之后。

[1338] 例如,直接阻断CTLA-4与一种或多种CTLA-4配体和/或结合配偶体之间的相互作用的试剂(诸如双特异性抗体)可以阻止抑制性信号传导并上调免疫应答(即,作为CTLA-4途径抑制剂)。可替代地,间接地阻断CTLA-4与其配体中的一者或两者之间的相互作用的试剂可以阻止抑制性信号传导并上调免疫应答。例如,B7-1或其可溶性形式通过结合CTLA-4多肽间接减少可用于结合CTLA-4的PD-L1多肽的有效浓度。示例性试剂包括针对CTLA-4和一种或多种CTLA-4配体和/或结合配偶体的单特异性或双特异性阻断性抗体,其阻断受体与配体之间的相互作用;非活化形式的CTLA-4和一种或多种CTLA-4配体和/或结合配偶体(例如,显性负性或可溶性多肽)、小分子或肽,其阻断CTLA-4与一种或多种CTLA-4配体和/或结合配偶体之间的相互作用;融合蛋白(例如,CTLA-4和一种或多种CTLA-4配体和/或结合配偶体的细胞外部分,与抗体或免疫球蛋白的Fc部分融合),其结合CTLA-4和一种或多种CTLA-4配体和/或结合配偶体并抑制受体与配体之间的相互作用;非活化形式的天然CTLA-4和一种或多种CTLA-4配体和/或结合配偶体,以及可溶性形式的天然CTLA-4和一种或多种CTLA-4配体和/或结合配偶体。

[1339] 间接抗免疫检查点抑制剂阻断或以其他方式减少由免疫检查点与其配体中的至少一者之间的相互作用生成的免疫抑制性信号传导。例如,抑制剂可以阻断CTLA-4与其配体中的一者或两者之间的相互作用而不必须直接阻断CTLA-4与其配体中的一者或两者之间的相互作用。例如,间接抑制剂包括胞内抗体,其结合CTLA-4和/或一种或多种CTLA-4配体和/或结合配偶体的进行信号传导以阻断或以其他方式减少免疫抑制性信号传导所需的细胞内部分。类似地,减少CTLA-4和/或一种或多种CTLA-4配体和/或结合配偶体的表达的核酸可以通过去除用于相互作用的组分的可用性来间接抑制CTLA-4与其配体中的一者或两者之间的相互作用。此类核酸分子可以阻断CTLA-4和/或一种或多种CTLA-4配体和/或结合配偶体转录或翻译。

[1340] 类似地,直接阻断HHLA2与HHLA2受体/共受体之间的相互作用的试剂,诸如抗HHLA2抗体、识别一种或多种HHLA2受体/共受体的抗体、抗HHLA2/抗免疫检查点双特异性抗体等,可以阻止HHLA2和/或其受体/共受体信号传导及其下游免疫应答。可替代地,间接阻断HHLA2和/或其受体/共受体之间的相互作用的试剂可以阻止HHLA2和/或其受体/共受体信号传导及其下游免疫应答。例如,可溶性形式HHLA2,诸如HHLA2的细胞外结构域通过结合其受体/共受体间接减少可用于结合细胞表面上的HHLA2的其受体/共受体的有效浓度。示例性试剂包括针对HHLA2和/或其受体/共受体的单特异性或双特异性阻断性抗体,其阻断受体与配体之间的相互作用;非活化形式的HHLA2和/或其受体/共受体(例如,显性负性或可溶性多肽)、小分子或肽,其阻断HHLA2和/或其受体/共受体之间的相互作用;融合蛋白(例如,HHLA2和/或其受体/共受体的细胞外部分,与抗体或免疫球蛋白的Fc部分融合),其结合HHLA2和/或其受体/共受体并抑制受体与配体之间的相互作用;非活化形式的天然HHLA2和/或其受体/共受体,以及可溶性形式的天然HHLA2和/或其受体/共受体。

[1341] 被设计成用于引发或扩增免疫应答的免疫疗法被称为“活化免疫疗法”。被设计成用于减少或抑制免疫应答的免疫疗法被称为“抑制免疫疗法”。可以测定据信对于基因修饰的移植癌细胞具有免疫系统作用的任何试剂,以确定所述试剂是否是免疫疗法以及给定基因修饰对于免疫应答的调控的作用。在一些实施例中,免疫疗法是癌细胞特异性的。在一些实施例中,免疫疗法可以是“非靶向的”,其是指施用不选择性地与免疫系统细胞相互作用

但调控免疫系统功能的试剂。非靶向疗法的代表性实例包括但不限于化疗、基因疗法和放射疗法。

[1342] 免疫疗法可以涉及宿主的短期保护的被动免疫,通过施用针对癌症抗原或疾病抗原的预形成抗体(例如,施用任选地连接到化疗剂或毒素、连接到肿瘤抗原的单克隆抗体)实现。免疫疗法还可以关注于使用癌细胞系的细胞毒性淋巴细胞识别的表位。可替代地,反义多核苷酸、核酶、RNA干扰分子、三螺旋多核苷酸等可以用于选择性地调控与肿瘤或癌症的启动、进展和/或病理学相关的生物分子。

[1343] 在一个实施例中,免疫疗法包含基于过继性细胞的免疫疗法。熟知的基于过继性细胞的免疫治疗性模式包括但不限于辐射的自体或同种异基因肿瘤细胞、细胞裂解液或细胞凋亡肿瘤细胞、基于抗原呈递细胞的免疫疗法、基于树突细胞的免疫疗法、过继性T细胞转移、过继性CAR T细胞疗法、自体免疫增强疗法(AIET)、癌症疫苗和/或抗原呈递细胞。此类基于细胞的免疫疗法可以进一步进行修改以表达一种或多种基因产物,以进一步调控免疫应答,诸如表达像GM-CSF的细胞因子和/或表达肿瘤相关抗原(TAA)抗原,诸如Mage-1、gp-100、患者特异性新抗原疫苗等。

[1344] 在另一个实施例中,免疫疗法包含基于非细胞的免疫疗法。在一个实施例中,使用包含抗原、有或没有疫苗增强佐剂的组合物。此类组合物以多种熟知的形式存在,诸如肽组合物、溶瘤病毒、包含重组抗原的融合蛋白等。在又一个实施例中,使用免疫调控白细胞介素,诸如IL-2、IL-6、IL-7、IL-12、IL-17、IL-23等,以及其调控剂(例如,阻断性抗体或更有效或更持久的形式)。在再一个实施例中,使用免疫调控细胞因子,诸如干扰素、G-CSF、咪喹莫特、TNFα等,以及其调控剂(例如,阻断性抗体或更有效或更持久的形式)。在另一个实施例中,使用免疫调控趋化因子,诸如CCL3、CCL26和CXCL7等,以及其调控剂(例如,阻断性抗体或更有效或更持久的形式)。在另一个实施例中,使用靶向免疫抑制的免疫调控分子,诸如STAT3信号传导调节剂、NFκB信号传导调节剂和免疫检查点调节剂。术语“免疫检查点”和“抗免疫检查点疗法”在上文描述。

[1345] 在又一个实施例中,使用免疫调控药物,诸如免疫细胞抑制性药物、糖皮质激素、细胞抑制剂、亲免蛋白及其调节剂(例如,雷帕霉素、钙神经素抑制剂、他克莫司、环孢素(环孢菌素)、吡美莫司、阿贝莫司、胍立莫司、地磷莫司、依维莫司、西罗莫司、佐他莫司等)、氢化可的松(皮质醇)、乙酸可的松、强的松、泼尼松龙、甲泼尼龙、地塞米松、倍他米松、曲安奈德、倍氯米松、醋酸氟氢可的松、醋酸脱氧皮质酮(doca)醛固酮、非糖皮质激素类固醇、嘧啶合成抑制剂、来氟米特、特立氟胺、叶酸类似物、甲氨蝶呤、抗胸腺细胞球蛋白、抗淋巴细胞球蛋白、沙利度胺、来那度胺、已酮可可碱、安非他酮、姜黄素、儿茶素、阿片、IMPDH抑制剂、霉酚酸、多球壳菌素、芬戈莫德、NF-xB抑制剂、雷洛昔芬、阿法曲霉菌素(drotrecogin alfa)、地诺单抗、NF-xB信号传导级联抑制剂、双硫仑、奥美沙坦、二硫代甲酸盐、蛋白酶体抑制剂、硼替佐米、MG132、泌乳素(Prol)、NPI-0052、姜黄素、染料木素、白藜芦醇、小白菊内酯、沙利度胺、来那度胺、夫拉平度、非类固醇抗炎药(NSAID)、三氧化二砷、脱羟基甲基环氧醌霉素(dehydroxymethylepoxyquinomycin,DHMEQ)、I3C(吲哚-3-甲醇)/DIM(二吲哚甲烷)(13C/DIM)、Bay 11-7082、木犀草素、细胞可渗透肽SN-50、IKBa.-超抑制剂过表达、NFKB诱骗寡脱氧核苷酸(ODN)或其任何衍生物或类似物。在再一个实施例中,使用免疫调控抗体或蛋白质。例如,结合CD40、Toll样受体(TLR)、OX40、GITR、CD27或4-1BB的抗体、T细胞双特异

性抗体、抗IL-2受体抗体、抗CD3抗体、OKT3(莫罗莫那)、奥昔珠单抗(otelixizumab)、特普利珠单抗(teplizumab)、维西珠单抗(visilizumab)、抗CD4抗体、克立昔单抗(clenoliximab)、keliximab、扎诺利木单抗(zanolimumab)、抗CD11抗体、依法利珠单抗(efalizumab)、抗CD18抗体、厄立珠珠单抗(erlizumab)、罗维珠单抗(rovelizumab)、抗CD20抗体、阿夫土珠单抗(afutuzumab)、奥瑞利珠单抗(ocrelizumab)、奥伐单抗(ofatumumab)、帕考珠单抗(pascolizumab)、利妥昔单抗(rituximab)、抗CD23抗体、鲁昔单抗(lumiliximab)、抗CD40抗体、特奈利昔单抗(teneliximab)、托雷利珠单抗(toralizumab)、抗CD40L抗体、鲁利单抗(ruplizumab)、抗CD62L抗体、阿塞珠单抗(aselizumab)、抗CD80抗体、加利昔单抗(galiximab)、抗CD147抗体、加维莫单抗(gavilimomab)、B淋巴细胞刺激因子(BLyS)抑制抗体、贝利木单抗(belimumab)、CTLA4-Ig融合蛋白、(abatacept)、贝拉西普(belatacept)、抗CTLA4抗体、伊匹单抗(ipilimumab)、曲美利木单抗(tremelimumab)、抗嗜酸性粒细胞趋化因子1抗体、柏替木单抗(bertilimumab)、抗a4-整合蛋白抗体、那他珠单抗(natalizumab)、抗IL-6R抗体、托珠单抗(tocilizumab)、抗LFA-1抗体、奥度莫单抗(odulimomab)、抗CD25抗体、巴利昔单抗(basiliximab)、达克珠单抗(daclizumab)、伊诺莫单抗(inolimomab)、抗CD5抗体、阿佐莫单抗(zolimomab)、抗CD2抗体、西利珠单抗(siplizumab)、英利昔单抗(nerelimomab)、faralimomab、阿特立单抗(atlizumab)、阿托木单抗(atorolimumab)、cedelizumab、阿托度单抗(dorlimomab aritox)、dorlixizumab、芳托利珠单抗(fontolizumab)、冈特奈卢单抗(gantenerumab)、戈利昔单抗(gomiliximab)、利伯珠单抗(lebrilizumab)、马司莫单抗(maslimomab)、莫罗木单抗(morolimumab)、培塞利珠单抗(pexelizumab)、瑞司利珠单抗(reslizumab)、洛维利珠单抗(rovelizumab)、他利珠单抗(talizumab)、阿替莫单抗(telimomab aritox)、伐利昔单抗(vapaliximab)、维帕莫单抗(vepalimomab)、阿帕西普(aflibercept)、阿法西普(alefacept)、利纳西普(rilonacept)、IL-1受体拮抗剂、阿那白滞素、抗IL-5抗体、美泊利单抗(mepolizumab)、IgE抑制剂、奥马珠单抗(omalizumab)、他利珠单抗(talizumab)、IL12抑制剂、IL23抑制剂、乌司奴单抗(ustekinumab)。

[1346] 增强免疫应答的营养补充剂(诸如维生素A、维生素E、维生素C等)是本领域熟知的(参见例如,美国专利第4,981,844号和第5,230,902号以及PCT公布第WO 2004/004483号)可以用于本文所述的方法。

[1347] 类似地,除了免疫疗法以外或与其组合的试剂和疗法可以与抗HHLA2抗体组合使用以刺激免疫应答,从而治疗从其受益的病状。例如,化疗、辐射、表观遗传修饰剂(例如,组蛋白去乙酰化酶(HDAC)修饰剂、甲基化修饰剂、磷酸化修饰剂等)、靶向疗法等是本领域熟知的。

[1348] 术语“非靶向疗法”是指施用不选择性地与所选的生物分子相互作用但仍治疗癌症的试剂。非靶向疗法的代表性实例包括但不限于化疗、基因疗法和放射疗法。

[1349] 在一个实施例中,使用化疗。化疗包括施用化疗剂。此类化疗剂可以是但不限于选自以下组的化合物的那些:铂化合物、细胞毒性抗生素、抗代谢物、抗有丝分裂剂、烷基化剂、砷化合物、DNA拓扑异构酶抑制剂、紫杉烷、核苷类似物、植物生物碱和毒素;以及其合成衍生物。示例性化合物包括但不限于,烷基化剂:顺铂、曲奥舒凡和曲磷胺;植物生物碱:长春碱、紫杉醇、多西他赛;DNA拓扑异构酶抑制剂:替尼泊苷、克雷斯托和丝裂霉素;抗叶酸

剂:甲氨蝶呤、霉酚酸和羟基脲;嘧啶类似物:5-氟尿嘧啶、去氧氟尿苷和胞嘧啶阿拉伯糖苷;嘌呤类似物:巯基嘌呤和硫鸟嘌呤;DNA抗代谢物:2'-脱氧-5-氟尿苷、甘氨酸阿非迪霉素(aphidicolin glycinate)和吡唑并咪唑;以及抗有丝分裂剂:软海绵素、秋水仙碱和根霉菌素。还可以使用包含一种或多种化疗剂(例如,FLAG、CHOP)的组合物。FLAG包含氟达拉滨、胞嘧啶阿拉伯糖苷(Ara-C)和G-CSF。CHOP包含环磷酰胺、长春新碱、阿霉素和强的松。在另一个实施例中,使用PARP(例如,PARP-1和/或PARP-2)抑制剂,并且此类抑制剂是本领域熟知的(例如,奥拉帕尼(Olaparib)、ABT-888、BSI-201、BGP-15(N基因研究实验室公司(N-Gene Research Laboratories,Inc.)));INO-1001(伊诺泰克制药有限公司(Inotek Pharmaceuticals Inc.));PJ34(Soriano等人,2001;Pacher等人,2002b);3-氨基苯甲酰胺(Trevigen);4-氨基-1,8-萘酰亚胺(Trevigen);6(5H)-菲啶酮(Trevigen);苯甲酰胺(美国专利参考36,397);以及NU1025(Bowman等人)。作用机制通常与PARP抑制剂结合PARP并降低其活性的能力相关。PARP催化.β.-烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD+)转化为烟酰胺和聚-ADP-核糖(PAR)。聚(ADP-核糖)和PARP与转录调节、细胞增殖、基因组稳定性和癌变相关(Bouchard V.J.等人《实验血液学》,第31卷,第6号,2003年6月,第446-454页(9);Herceg Z.;Wang Z.-Q.《突变研究/诱变的基本和分子机制(Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis)》,第477卷,第1号,2001年6月2日,第97-110页(14))。聚(ADP-核糖)聚合酶1(PARP1)是DNA单链断裂(SSB)修复的关键分子(de Murcia J.等人1997.《美国科学院院报》94:7303-7307;Schreiber V,Dantzer F,Ame J C,de Murcia G(2006)《自然分子细胞生物学述评(Nat Rev Mol Cell Biol)》7:517-528;Wang Z Q等人(1997)《基因与发展》11:2347-2358)。通过抑制PARP1功能进行的SSB修复的敲除诱导DNA双链断裂(DSB),其在具有缺陷同源性指导的DSB修复的细胞中触发合成致死性(Bryant H E等人(2005)《自然》434:913-917;Farmer H等人(2005)《自然》434:917-921)。化疗剂的前述实例是示例性的并且不旨在是限制性的。

[1350] 在另一个实施例中,使用放射疗法。放射疗法中使用的放射可以是电离放射。放射疗法还可以是γ射线、X-射线或质子束。放射疗法的实例包括但不限于外线束放射疗法,放射性同位素(I-125、钯、铱)、放射性同位素诸如锶-89的组织间植入,胸部放射疗法,腹腔内P-32放射疗法和/或总腹盆腔放射疗法。对于放射疗法的一般概述,参见Hellman,第16章:《癌症管理的原理:放射疗法》,第6版,2001,DeVita等人编辑,J.B.Lippencott公司,费城。放射疗法可以作为外线束放射或远距放射疗法施用,其中放射从远程源引导。放射治疗还可以作为内部疗法或近距放射疗法施用,其中放射源放置在体内接近癌细胞或肿瘤块处。还涵盖使用光动力学疗法,其包含施用光敏剂诸如血卟啉及其衍生物、苯并卟啉衍生物单酸(BPD-MA)、酞青类、光敏剂Pc4、去甲氧基-竹红菌甲素A;以及2BA-2-DMHA。

[1351] 在另一个实施例中,可以进行手术干预以物理地去除癌细胞和/或组织。

[1352] 在又一个实施例中,使用激素疗法。激素治疗性治疗可以包含例如激素激动剂、激素拮抗剂(例如,氟他胺、比卡鲁胺、他莫昔芬、雷洛昔芬、醋酸亮丙瑞林(LUPRON)、LH-RH拮抗剂)、激素生物合成和处理的抑制剂和类固醇(例如,地塞米松、类维生素A、三角肌、倍他米松、皮质醇、可的松、强的松、去氢睾丸素、糖皮质激素、盐皮质激素、雌激素、睾丸素、孕激素)、维生素A衍生物(例如,全反式维甲酸(ATRA));维生素D3类似物;抗促孕激素(例如,美服培酮、奥那斯酮)或抗雄激素(例如,醋酸环丙孕酮)。

[1353] 在再一个实施例中,使用热疗,一种将身体组织暴露于高温(高达106°F)的程序。热可以通过损伤细胞或剥除它们存活所需的物质来使肿瘤缩小。热疗可以是局部、区域性和全身热疗,使用外部和内部加热装置。热疗几乎总是与其他形式的疗法(例如,放射疗法、化疗和生物疗法)一起使用来试图增加其有效性。局部热疗是指将热施加到非常小的区域,诸如肿瘤。所述区域可以用来自体外的装置的瞄准肿瘤的高频波来外部加热。为了实现内部加热,可以使用若干类型的无菌探针中的一种,包括细加热线或填充有热水的中空管;植入的微波天线;以及射频电极。在区域性热疗中,加热器官或肢体。将产生高能量的磁体和装置置于待加热的区域上。在另一种称为灌注的方法中,去除患者的一些血液,加热,并且然后泵送(灌注)到待内部加热的区域中。全身加热用于治疗扩散到整个身体的转移性癌症。它可以使用温水毯、热蜡、感应线圈(像电热毯中的那些)或热腔室(类似于大恒温箱)来实现。热疗不导致辐射副作用或并发症的任何明显增加。然而,直接将热施加至皮肤可能在约一半的治疗的患者中导致不适或甚至显著的局部疼痛。它还可能导致通常快速愈合的水泡。

[1354] 在又一个实施例中,使用光动力学疗法(还被称为PDT、光辐射疗法、光疗或光化疗)用于治疗一些类型的癌症。它是基于以下发现,即当单细胞生物体暴露于特定类型的光时,某些被称为光敏剂的化学物可以杀伤所述生物体。PDT通过使用固定频率激光以及光敏剂来破坏癌细胞。在PDT中,将光敏剂注射到血流中并被全身的细胞吸收。所述试剂在癌细胞比在正常细胞中保留更长的时间。当治疗的癌细胞暴露于激光时,光敏剂吸收光并产生破坏所治疗的癌细胞的活性形式的氧。光暴露必须精确定时,使得它在大部分光敏剂离开健康细胞但仍存在于癌细胞中时发生。用于PDT的激光可以通过光纤(非常细的玻璃束)引导。将光纤放置在癌症附近以递送适当量的光。光纤可以通过支气管镜定向到肺中以用于治疗肺癌,或者通过内窥镜定向到食道中以用于治疗食管癌。PDT的优点在于它对健康组织产生微小损害。然而,因为当前使用的激光无法穿过超过约3厘米的组织(1.8英寸多一点),所以PDT主要用于治疗皮肤上或正好在皮肤下面或在内部器官的内衬上的肿瘤。光动力学疗法使皮肤和眼睛在治疗之后6周或更长时间内对光敏感。建议患者在至少6周内避免阳光直射和明亮的室内光。如果患者必须出门,他们需要穿戴保护性衣物,包括太阳眼镜。PDT的其他暂时性副作用与特定区域的治疗相关,并且可以包括咳嗽、吞咽困难、腹痛和呼吸痛或气短。在1995年12月,美国食品和药物管理局(FDA)批准被称为卟吩姆钠或Photofrin®的光敏剂来缓解导致堵塞的食管癌和仅通过激光不能进行令人满意的治疗的食管癌的症状。在1998年1月,FDA批准卟吩姆钠用于在普通的肺癌治疗对于其不适用的患者中治疗早期非小细胞肺癌。美国国家癌症研究所和其他机构支持临床试验(研究性研究)来评估光动力学疗法对于若干类型的癌症的用途,所述癌症包括膀胱癌、脑癌、喉癌和口腔癌。

[1355] 在再一个实施例中,使用激光疗法来利用高强度光破坏癌细胞。该技术经常用于缓解癌症的症状,诸如出血或堵塞,尤其是当癌症不能通过其他治疗治愈时。它还可以用于通过缩小或破坏肿瘤来治疗癌症。术语“激光”代表通过辐射的受激发射进行的光放大。普通光,诸如来自灯泡的光,具有多种波长并且在所有方向上发散。另一方面,激光具有特定波长并且集中在窄光束中。该类型的高强度光具有大量能量。激光非常强力,并且可以用于切断钢或塑造钻石。激光还可以用于非常精确的手术工作,诸如修复眼睛中的受损视网膜或切开组织(代替手术刀)。虽然存在若干不同类型的激光,但是仅三种在医学中广泛使用:

二氧化碳(CO_2)激光--这种类型的激光可以从皮肤表面去除薄层而不穿透更深的层。该技术尤其可用于治疗不深入扩散到皮肤中的肿瘤和某些癌前病状。作为传统手术刀手术的替代方案,CO_2激光还能够切割皮肤。以这种方式使用激光来去除皮肤癌症。钕:钇-铝-石榴石(Nd:YAG)激光--来自这种激光的光可以比来自其他类型的激光更深地穿透到组织中,并且它可以致使血液快速凝固。它可以通过光纤携带至身体的较不可及部分。该类型的激光有时用于治疗喉癌。氩激光--这种激光可以仅穿过组织的表层,并且因此可用于皮肤病学和眼部手术。它还可以与光敏染料一起用于被称为光动力学疗法(PDT)的程序。激光相对于标准手术工具具有若干优点,包括:激光比手术刀更精确。切口附近的组织得以被保护,因为与周围皮肤或其他组织的接触很少。通过激光产生的热为手术部位消毒,从而减少感染的风险。可能需要更少的操作时间,因为激光的精确性允许切口更小。愈合时间经常被缩短;因为激光热密封血管,所以出血、肿胀或结疤更少。激光手术的复杂性更低。例如,通过使用光纤,可以将激光引导至身体的各部分而不造成较大切口。更多程序可以在门诊的基础上完成。激光可以两种方式用于治疗癌症:通过用热缩小或破坏肿瘤,或者通过活化被称为光敏剂的化学物,其破坏癌细胞。在PDT中,光敏剂保留在癌细胞中,并且可以通过光刺激来产生杀伤癌细胞的反应。CO_2和Nd:YAG激光用于缩小或破坏肿瘤。它们可以与内窥镜一起使用,所述内窥镜是允许医师看到身体的某些区域,诸如膀胱的管。来自一些激光的光可以通过装配有光纤的柔性内窥镜来传输。这允许医师看到身体的除通过手术以外的其他方式不可触及的部分并在其中工作,并且因此实现激光束的非常精确的瞄准。激光还可以与低倍显微镜一起使用,从而让医生清楚地看到治疗的部位。通过与其他仪器一起使用,激光系统可以产生直径小至200微米(小于非常细的线的宽度)的切割区。激光用于治疗多种类型的癌症。激光手术是针对某些阶段的声门(声带)癌、宫颈癌、皮肤癌、肺癌、阴道癌、外阴癌和阴茎癌的标准治疗。除用于破坏癌症以外,激光手术还用于帮助缓解由癌症导致的症状(姑息护理)。例如,激光可以用于缩小或破坏阻断患者的气道(气管)的肿瘤,从而使得更容易呼吸。它有时还用于缓解结直肠癌和肛门癌。激光诱导间质热疗(LITT)是激光疗法的最新发展之一。LITT使用与被称为热疗的癌症治疗相同的概念,即热可以通过损伤细胞或剥除它们存活所需的物质来使肿瘤缩小。在该治疗中,将激光引导至身体的间质区(气管之间的区域)。然后激光升高肿瘤的温度,其损坏或破坏癌细胞。

[1356] 用疗法进行的治疗的持续时间和/或剂量可以根据具体治疗剂或其组合而变化。本领域技术人员将了解具体癌症治疗剂的适当治疗时间。本发明设想针对每种癌症治疗剂的最佳治疗时间表的持续评定,其中通过本发明的方法确定的受试者的癌症表型是确定最佳治疗剂量和时间表的因素。

[1357] 用于将多核苷酸引入到哺乳动物、人或非人或其细胞中的任何手段可以适用于本发明的用于将本发明的各种构建体递送到预期受体中的实践。在本发明的一个实施例中,通过转染,即通过用胶体分散体系递送“裸”DNA或在复合物中的DNA来将DNA构建体递送到细胞中。胶体体系包括大分子复合物、纳米胶囊、微球、珠和基于脂质的体系(包括水包油乳液)、胶束、混合胶束和脂质体。本发明的优选胶体体系是脂质复合或脂质体配制的DNA。在前一种方法中,在例如用脂质配制DNA之前,可以首先通过实验使含有携带所需DNA构建体的转基因的质粒针对表达优化(例如,在5’未翻译区中包含内含子并消除不需要的序列(Felgner等人,《纽约科学院年鉴(Ann NY Acad Sci)》126-139,1995))。然后例如用各种脂

质或脂质体材料配制DNA可以使用已知的方法和材料实现,并且将其递送到受体哺乳动物。参见例如,Canonico等人,《美国呼吸系统细胞和分子生物学杂志(Am J Respir Cell Mol Biol)》10:24-29,1994;Tsan等人,《美国生理学杂志(Am J Physiol)》268;Alton等人,《自然遗传学》5:135-142,1993以及Carson等人的美国专利第5,679,647号。

[1358] 脂质体的靶向可以基于解剖学和机械因素来分类。解剖学分类是基于选择性的水平,例如器官特异性、细胞特异性和细胞器特异性。机械靶向可以基于它是被动的还是主动的来区分。被动靶向利用脂质体的自然倾向来分配到含有窦状隙毛细管的器官中的网状内皮系统(RES)的细胞。另一方面,主动靶向涉及通过将脂质体与特定配体诸如单克隆抗体、糖、糖脂或蛋白质偶联,或通过改变脂质体的组成或大小来改变脂质体,以便实现向除了天然存在的定位部位以外的器官和细胞类型的靶向。

[1359] 靶向递送系统的表面可以各种方式修饰。在脂质体靶向的递送系统的情况下,可以将脂质基团并入到脂质体的脂质双层中,以便使靶向配体与脂质体双层维持稳定缔和。各种连接基团可以用于将脂质链与靶向配体接合。可以向受试者的若干部位施用裸DNA或与递送媒介物例如脂质体缔和的DNA(参见下文)。

[1360] 可以在任何所需的载体中递送核酸。这些包括病毒或非病毒载体,包括腺病毒载体、腺相关病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体和质粒载体。病毒的示例性类型包括HSV(单纯疱疹病毒)、AAV(腺相关病毒)、HIV(人类免疫缺陷病毒)、BIV(牛免疫缺陷病毒)和MLV(鼠白血病病毒)。核酸可以提供足够有效的递送水平的任何所需形式施用,包括在病毒颗粒中、在脂质体中、在纳米颗粒中和与聚合物复合。

[1361] 编码蛋白质的核酸或目标核酸可以在质粒或病毒载体或本领域已知的其他载体中。此类载体是熟知的,并且可以针对具体应用选择任何载体。在本发明的一个实施例中,基因递送媒介物包含启动子和去甲基酶编码序列。优选的启动子是组织特异性启动子和通过细胞增殖活化的启动子,诸如胸苷激酶和胸苷酸合成酶启动子。其他优选的启动子包括可通过病毒感染活化的启动子,诸如α-和β-干扰素启动子,和可通过激素诸如雌激素活化的启动子。其他可以使用的启动子包括莫洛尼病毒LTR、CMV启动子和小鼠白蛋白启动子。启动子可以是组成型或诱导型。

[1362] 在另一个实施例中,裸多核苷酸分子用作基因递送媒介物,如WO 90/11092和美国专利5,580,859中所述。此类基因递送媒介物可以是生长因子DNA或RNA,并且在某些实施例中,连接到灭活的腺病毒。Curiel等人,《人类基因疗法(Hum.Gene.Ther.)》3:147-154,1992。可以任选地使用的其他媒介物包括DNA-配体(Wu等人,《生物化学杂志》264:16985-16987,1989)、脂质-DNA组合(Felgner等人,《美国科学院院报》84:7413 7417,1989)、脂质体(Wang等人,《美国科学院院报》84:7851-7855,1987)和微粒(Williams等人,《美国科学院院报》88:2726-2730,1991)。

[1363] 基因递送媒介物可以任选地包含病毒序列,诸如病毒复制起点或包装信号。这些病毒序列可以选自病毒,诸如星状病毒、冠状病毒、正粘病毒、巴氏病毒、副粘病毒、细小病毒、小核糖核酸病毒、痘病毒、逆转录病毒、披膜病毒(togavirus)或腺病毒。在优选实施例中,生长因子基因递送媒介物是重组逆转录病毒载体。重组逆转录病毒及其各种用途已经在多个参考文献中描述,包括例如Mann等人,《细胞》33:153,1983,Cane和Mulligan,《美国科学院院报》81:6349,1984,Miller等人,《人类基因疗法》1:5-14,1990,美国专利第4,405,

712、4,861,719和4,980,289号以及PCT申请第WO 89/02,468、WO 89/05,349和WO 90/02,806号。多种逆转录病毒基因递送媒介物可以用于本发明,包括例如以下中描述的那些:EP 0,415,731;WO 90/07936;WO 94/03622;WO 93/25698;WO 93/25234;美国专利第5,219,740号;WO 9311230;WO 9310218;Vile和Hart,《癌症研究》53:3860-3864,1993;Vile和Hart,《癌症研究》53:962-967,1993;Ram等人,《癌症研究》53:83-88,1993;Takamiya等人,《神经科学杂志(J.Neurosci.Res.)》33:493-503,1992;Baba等人,《神经外科杂志(J.Neurosurg.)》79:729-735,1993(美国专利第4,777,127号、GB 2,200,651、EP 0,345,242和WO91/02805)。

[1364] 可以用于递送本发明的多核苷酸的其他病毒载体来源于疱疹病毒,例如单纯疱疹病毒(Woo等人1997年5月20号提交的美国专利第5,631,236号以及Neurovex的WO 00/08191)、痘苗病毒(Ridgeway(1988)Ridgeway,"《哺乳动物表达载体(Mammalian expression vectors)》,"在以下中:Rodriguez R L,Denhardt D T编辑《载体:分子克隆载体及其用途的调查(Vectors:A survey of molecular cloning vectors and their uses.)》Stoneham:Butterworth;Baichwal和Sugden(1986)"《来源于动物DNA病毒的用于基因转移的载体:转移基因的瞬时和稳定表达(Vectors for gene transfer derived from animal DNA viruses:Transient and stable expression of transferred genes)》,"在以下中:Kucherlapati R编辑《基因转移(Gene transfer.)》纽约:全会出版;Coupar等人(1988)《基因》,68:1-10)以及若干RNA病毒。优选的病毒包括α病毒、痘病毒、沙粒病毒、痘苗病毒、脊髓灰质炎病毒等。它们为各种哺乳动物细胞提供若干有吸引力的特征(Friedmann(1989)《科学》,244:1275-1281;Ridgeway,1988,同上;Baichwal和Sugden,1986,同上;Coupar等人,1988;Horwich等人(1990)《病毒学杂志》,64:642-650)。

[1365] 在其他实施例中,基因组中的靶DNA可以使用本领域熟知的方法来操纵。例如,基因组中的靶DNA可以通过以下来操纵:删除、插入和/或突变和逆转录病毒插入、人工染色体技术、基因插入、用组织特异性启动子进行的随机插入、基因靶向、转座元件和/或用于引入外源DNA或产生修饰的DNA/修饰的核DNA的任何其他方法。其他修饰技术包括从基因组删除DNA序列和/或改变核DNA序列。核DNA序列例如可以通过定点诱变来改变。

[1366] 在其他实施例中,可以向受试者施用重组生物标记物多肽及其片段。在一些实施例中,可以构建并施用具有增强的生物特性的融合蛋白。此外,可以根据本领域熟知的药理学方法(例如,聚乙二醇化、糖基化、寡聚化等)修饰生物标记物多肽及其片段,以便进一步增强期望的生物活性,诸如增加的生物可利用性和降低的蛋白水解降解。

[1367] 临床功效

[1368] 临床功效可以通过本领域已知的任何方法来测量。例如,对于疗法(诸如抗HHLA2抗体疗法)的应答涉及癌症(例如,肿瘤)对于疗法的任何应答,优选地新辅助或辅助性化疗开始之后肿瘤质量和/或体积的变化。肿瘤应答可以在新辅助或辅助情况中评定,其中可以将系统性干预之后肿瘤的大小与如通过CT、PET、乳房X光片、超声或触诊测量的初始大小和尺寸进行比较,并且可以组织学方式估计肿瘤的细胞结构,并且与治疗开始之前采集的肿瘤活检物的细胞结构进行比较。还可以通过活检或手术切除之后肿瘤的卡尺测量或病理学检查评定应答。应答可以定量方式记录,像肿瘤体积或细胞结构的百分比变化,或者使用半定量评分系统记录,诸如残余肿瘤负荷(Symmans等人,《临床肿瘤学杂志(J.Clin.Oncol.)》

(2007)25:4414-4422)或Miller-Payne评分(Ogston等人,(2003)《乳腺(Breast)》(爱丁堡,苏格兰)12:320-327),以定性方式记录,像“病理完全应答(pCR)”、“临床完全缓解(cCR)”、“临床部分缓解(cPR)”、“临床稳定型疾病(cSD)”、“临床进行性疾病(cPD)”或其他定性准则。肿瘤应答的评定可以在新辅助或辅助性疗法开始之后较早地进行,例如在几小时、几天、几周之后或优选地几个月之后进行。应答评定的典型终点是在新辅助性疗法结束时或在残留肿瘤细胞和/或肿瘤床被手术去除时。

[1369] 在一些实施例中,本文所述的治疗性治疗的临床功效可以通过测量临床受益率(CBR)确定。临床受益率通过确定在疗法结束至少6个月的时间点处处于完全缓解(CR)的患者的百分比、处于部分缓解(PR)的患者的数量和具有稳定型疾病(SD)的患者的数量的总和来测量。该式的简略表达为CBR=6个月期间的CR+PR+SD。在一些实施例中,特定抗免疫检查点治疗方案的CBR为至少25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%或更多。

[1370] 评估对抗免疫检查点疗法的应答的额外准则与“存活期”相关,其包括以下中的全部:存活至死亡,还被称为总存活期(其中所述死亡可以与病因或相关肿瘤无关);“无复发存活期”(其中术语复发应当包括局部和远处复发两者);无转移存活期;无疾病存活期(其中术语疾病应当包括癌症和与其相关联的疾病)。所述存活期的长度可以通过参考定义的起始点(例如,确诊或治疗开始的时间)和终点(例如,死亡、复发或转移)来计算。此外,治疗功效的准则可以扩展至包括对化疗的应答、存活的概率、给定时间段内转移的概率和肿瘤复发的概率。

[1371] 例如,为了确定适当的阈值,可以向受试者群体施用特定抗癌症治疗方案,并且可以将结果与在施用任何抗免疫检查点疗法之前确定的生物标记物测量值关联起来。结果测量值可以是对在新辅助环境中给予的疗法的病理学应答。可替代地,可以在抗免疫检查点疗法之后针对其生物标记物测量值已知的受试者在一定时间段内监测结果测量值,诸如总存活期和无疾病存活期。在某些实施例中,可以向每个受试者施用相同剂量的抗免疫检查点剂。在相关实施例中,施用的剂量是本领域已知的针对抗免疫检查点剂的标准剂量。监测受试者的时间段可以变化。例如,可以监测受试者至少2、4、6、8、10、12、14、16、18、20、25、30、35、40、45、50、55或60个月。与抗免疫检查点疗法的结果相关的生物标记物测量阈值可以使用诸如实例部分中所述的那些的方法来确定。

[1372] XIII.试剂盒

[1373] 此外,本发明还涵盖用于检测生物样品中HHLA2多肽或其片段的存在的试剂盒。例如,试剂盒可以包含能够检测生物样品中HHLA2多肽或其片段的标记的化合物或试剂;用于确定样品中HHLA2多肽或其片段的量的装置;以及用于将样品中HHLA2多肽或其片段的量与标准进行比较的装置。化合物或试剂可以包装在合适的容器中。例如,本发明提供了包含至少一种本文所述的抗体的试剂盒。含有本发明的抗体的试剂盒可用于检测HHLA2或治疗性或诊断性测定。本发明的试剂盒可以含有与固体支撑物,例如组织培养板或珠(例如,琼脂糖珠)偶联的抗体。

[1374] 试剂盒可以包括额外的组分以有利于试剂盒所设计用于的特定应用。例如,可以提供试剂盒,其含有用于例如在ELISA或蛋白质印迹法中检测和定量体外HHLA2的抗体。另外,试剂盒可以含有的示例性试剂包括检测标记的装置(例如,酶促标记的酶底物,检测荧

光标记的过滤器组,适当的第二标记诸如山羊抗小鼠-HRP等)和对照所需的试剂(例如,对照生物样品或HHLA2蛋白质标准)。试剂盒可以另外包括缓冲液和用于本发明公开的方法的公认的其他试剂。非限制性实例包括减少非特异性结合的剂,诸如载体蛋白或洗涤剂。本发明的试剂盒还可以包括公开或描述所公开的本发明的试剂盒或抗体在如本文提供的所公开的本发明的方法中的用途的说明材料。

[1375] 本发明进一步通过以下不应当被解释为限制性的实例来说明。在整个本申请中引述的所有参考文献、专利和公布的专利申请的内容以及附图通过引用并入本文。

[1376] 实例

[1377] 实例1:抗人HHLA2单克隆抗体的衍生

[1378] 生成并分析多个抗HHLA2单克隆抗体。简而言之,产生人HHLA2-mIgG2a融合蛋白,之后对其进行免疫化并生成小鼠单克隆抗体。使用引物5'-TGTTCTGCACAAGACA-3'(位于ATG起始的5'处的有义引物)和5'-GTAAGGATGCAGGTCATGAGT-3'(位于终止密码子的3'处的反义引物)对人HHLA2的编码区进行PCR扩增,并且通过TA克隆引入到pEF6载体中。通过使HHLA2细胞外结构域的cDNA与小鼠IgG2a铰链和Fc结构域(具有突变以减少与Fc受体的结合)融合来制备HHLA2-mIgG2a融合蛋白,并且克隆到pEF6载体中。将构建体引入到CHO细胞中,并且通过在蛋白质G柱上进行亲和色谱法来纯化HHLA2-mIgG2a融合蛋白。

[1379] 从查尔斯河实验室(Charles River Laboratories)(威尔明顿,马萨诸塞州)获得4-6周大的五只小鼠(Balb/c;C57Bl/6;Swiss-Webster)。所有动物根据哈佛动物常设委员会机构动物护理和使用委员会的指导获取并维持。

[1380] 对于初始免疫化,将50微克重组HHLA2-mIgG2a融合蛋白悬浮在Dulbecco磷酸盐缓冲盐水(PBS;GIBCO,中央格兰德岛,纽约州)中,并用等体积的完全弗氏佐剂(西格玛化学公司(Sigma Chemical Co.),圣路易斯,密苏里州)乳化。通过在可以发现淋巴结的五个皮下位点处(腹股沟、臂、腋窝和浅颈)和腹腔内注射乳剂来对小鼠进行免疫。初始免疫化14天之后,在腹腔内通过50微克的用等体积的不完全弗氏佐剂乳化的重组HHLA2-mIgG2a融合蛋白对小鼠给予强化免疫。14天之后,在腹腔内通过50微克的用等体积的不完全弗氏佐剂乳化的重组HHLA2-mIgG2a融合蛋白对小鼠进行强化。42天之后,在腹腔内通过50微克的用等体积的不完全弗氏佐剂乳化的重组HHLA2-mIgG2a融合蛋白和50微克的变性重组HHLA2-mIgG2a融合蛋白对小鼠进行强化。通过在0.1%十二烷基硫酸钠的存在下煮沸5分钟来使蛋白质变性。13天之后,在腹腔内通过50微克的用等体积的不完全弗氏佐剂乳化的重组HHLA2-mIgG2a融合蛋白和50微克的变性重组HHLA2-mIgG2a融合蛋白对小鼠进行强化。在进行强化10-12天之后,采集少量血液。在用HHLA2 cDNA转染的300.19细胞和未转染的300.19细胞上通过流式细胞术来对针对HHLA2的血清活性进行滴定。36天之后,在腹腔内和静脉内通过50微克变性的重组HHLA2-mIgG2a融合蛋白最后一次对小鼠进行强化。

[1381] 4天后选择具有最高滴度的小鼠#5用于融合。将收获的脾脏和淋巴结制成细胞悬浮液并且然后用DMEM洗涤。对脾脏/淋巴结细胞进行计数,并且以2:1的脾脏:骨髓瘤比率与不能分泌重链或轻链免疫球蛋白链的SP 2/0骨髓瘤细胞混合(Kearney等人(1979)《免疫学杂志》123:1548-1550以及Kilpatrick等人(1997)《杂交瘤(Hybridoma)》16:381-389)。根据标准程序,在HAT选择培养基中在八个96孔组织培养板中将细胞与聚乙二醇1450融合(Kohler和Milstein(1975)《自然》256:495-497)。

[1382] 在融合之后10天到21天之间,杂交瘤菌落变得可见,并且收获培养物上清液,然后在用HHLA2 cDNA转染的300.19细胞上通过流式细胞术和在未转染的300.19细胞上通过缺乏反应性来针对HHLA2进行筛选。

[1383] 实例2:抗HHLA2抗体

[1384] 对多个抗HHLA2 mAb进行测序以分析其CDR区。简而言之,进行RACE(cDNA末端的快速扩增)以扩增DNA的vH和vL(mRNA变性、cDNA合成、5'RACE反应和分析PCR结果)。为了鉴定阳性克隆,在琼脂糖凝胶上分析PCR反应样品以使扩增的DNA片段可视化。正确的抗体可变区DNA片段应当具有500-700碱基对之间的大小。对PCR阳性带进行TOPO克隆并且然后进行PCR扩增,接着进行凝胶电泳,从琼脂糖凝胶回收并测序。使用测序数据进行CDR分析(使用VBASE2定义CDR区,参见万维网vbase2.org/)。

[1385] 表2列出了mAb测序的结果。抗体的轻链是κ类型。小鼠抗体8A12、8D2和1C8是IgG2a同种型,而2C4、5H4、6G8、6D10、2G2、4D1、4E5和6F10是IgG1同种型。

[1386] 针对体外结合和TMIGD2阻断表征新鉴定的抗HHLA2抗体。

[1387] 具体地,测定每个抗HHLA2抗体的结合亲和力。通过电穿孔(300伏,1600微法拉)将HHLA2 cDNA和编码嘌呤霉素抗性的载体共转染到小鼠300.19细胞中,并且用含有5μg/ml嘌呤霉素的培养基选择。通过用TMIGD2-人Fc融合蛋白和缀合到嘌呤霉素的山羊抗人Fc抗体染色来鉴定表达HHLA2的细胞,并且通过流式细胞术分选单细胞。通过如上所述的流式细胞术确认个体克隆中HHLA2的表达。用抗HHLA2 mAb对HHLA2转染的300.19细胞进行滴定(图1A)。

[1388] 图1B示出了通过流式细胞术进行的TMIGD2阻断的评估结果。简而言之,进行抗HHLA2 mAb阻断TMIGD2-人IgG与用人HHLA2细胞转染的300.19细胞的结合的测定。例如,向96孔圆底板的每个孔添加20μl(相当于25,000个300.19细胞)用人HHLA2稳定转染的细胞。每个孔是50μl抗体。测定未稀释、1至10稀释度和1至100稀释度。对细胞进行上下移液以将细胞悬浮在mAb中,并且在4℃下温育30min,同时在旋转平台上混合。向每个孔添加20μl的在FACS缓冲液(PBS加2%FBS,0.02%叠氮化物)中的2μg/ml人TMIGD2-人IgG1融合蛋白(安迪生物,目录#8316-TR-050)。包括没有TMIGD2-hIgG的细胞的阴性对照孔和具有小鼠IgG同种型对照的TMIGD2的阳性对照。将板在4℃下温育30min,同时混合。将细胞在FACS缓冲液中洗涤两次,并且去除上清液。每孔添加50μl的2.5μg/ml二级抗体(Fab_2山羊抗人-IgG-PE,针对小鼠Ig交叉吸收;南方生物技术,2043-09)。对细胞进行上下移液3次以将细胞悬浮在Ab中,并且在4℃下温育30min,同时混合。将细胞在FACS缓冲液中洗涤两次并且去除上清液。将细胞重悬浮在80μl的PBS加2%甲醛中,并且在FACS机器上分析结合。使用FACS缓冲液(PBS加2%FBS,0.02%叠氮化物)。

[1389] 图2示出了使用抗HHLA2单克隆抗体8D2分析的人肿瘤细胞系的蛋白质印迹法结果。简而言之,根据制造商的说明书(赛默飞世尔科技)用RIPA缓冲液制备蛋白质裂解液,并且在裂解液制备之前向缓冲液添加蛋白酶抑制剂混合物(完全超片剂(complete Ultra tablets),微型,无EDTA,罗氏公司(Roche))。由用人HHLA2稳定转染的300.19细胞和指定的人肿瘤细胞系制备蛋白质裂解液。L428和HDLM2是霍奇金淋巴瘤细胞系,OC1-Ly1是B细胞非霍奇金淋巴瘤(弥漫性大细胞)细胞系,Raji是Burkitt淋巴瘤细胞系,Jurkat E6是T细胞白血病细胞系,THP-1是急性单核细胞白血病细胞系,MDA231和SKBR乳腺肿瘤细胞系,CAKI2是

人透明细胞肾细胞癌(ccRCC)细胞系。将80μg裂解液加载到4％-15％梯度mini-Protean TGX凝胶(伯乐(BioRad))上并通过半干法转移。在室温下用具有Tween20的Tris缓冲盐水(TBST)和12％脱脂奶和1％正常山羊血清封闭膜,持续1小时。将膜用TBST洗涤,并且在4℃下与初级抗体(在TBST和1％BSA中1μg/ml最终浓度的抗HHLA2 mAb 499.5.8D2)一起温育过夜。将膜在室温下用TBST洗涤三次,并且在TBST、6％脱脂奶和0.5％正常山羊血清中与二级抗体(1:4000,辣根缀合的山羊抗小鼠IgG HRP抗体,南方生物技术,目录#1030-05)一起温育30min。在用TBST额外洗涤3次之后,将1:1比率的ECL底物:增强剂添加到膜(SuperSignal West Pico稳定过氧化物溶液,Supersignal West Pico鲁米诺/增强剂溶液,赛默飞世尔科技)并在Hyblot CL放射自显影片(丹维尔科技(Denville Scientific))上成像。

[1390] 实例3:正常组织和癌组织中的HHLA2 mRNA表达

[1391] 图3示出了正常肾相对于肾癌中与其他检查点抑制剂相比的HHLA2 mRNA表达的结果。通过归一化来自TCGA数据库的RNA序列数据评估正常肾和肾肿瘤中指定的B7家族成员免疫受体和肿瘤浸润白细胞的表达。针对PD-L1、PD-L2、B7-H3、VISTA和HHLA2观察到与正常组织相比肿瘤中受体表达增加。与正常组织相比,也在肿瘤中观察到CD8+和CD14+肿瘤浸润细胞的水平增加。

[1392] 类似地,图4示出了来自TCGA数据库的各种癌症中HHLA2表达的结果(图4)。简而言之,通过RNA序列分析使用TCGA的数据库(由美国国家癌症研究所癌症基因组中心(National Cancer Institute's Center for Cancer Genomics)和美国国家人类基因组研究所(National Human Genome Research Institute)监管)研究各种癌症类型中HHLA2的表达谱。如图4所示,HHLA2在透明细胞和乳头状肾细胞癌、肺腺癌、结直肠癌和胰腺癌中以高水平表达(加粗斜体),并且在AML、宫颈癌、头颈癌、肝癌、卵巢癌、前列腺癌、睾丸癌和肺鳞状细胞癌中中等地表达。

[1393] 图5示出了通过免疫组织化学,诸如在HHLA2阳性和阴性细胞系肾癌肿瘤阵列上所得的HHLA2表达的结果。通过免疫组织化学检测肾癌肿瘤阵列和细胞系中的HHLA2表达。将再水化石蜡包埋的组织切片和细胞系切片在125℃下在EDTA缓冲液pH 8(生命技术公司)中用高压锅(邦健医疗(Biocare Medical))煮沸30秒。在室温(RT)下冷却之后,将组织切片在RT下用过氧化酶封闭剂(双重内源性酶封闭剂,达科(Dako))和蛋白质封闭剂(无血清封闭剂,达科)依次温育,各自持续5分钟。接下来将切片在RT下用在具有背景消除组分的抗体稀释剂(达科)中稀释的小鼠抗HHLA2抗体(1/100,克隆8D2)温育1小时。然后将组织切片在RT下用EnVision®抗小鼠辣根(HRP)缀合的抗体(达科)温育30分钟。通过施加3,3-二氨基联苯胺底物(DAB+,达科)来进行HRP可视化。在每个步骤之间,在免除蛋白质封闭和初级抗体温育步骤时,将组织切片在洗涤缓冲液(0.1mM Tris,pH7.4+0.05％Tween 20)中洗涤5分钟。将核用苏木精复染(图5A至图5D)。

[1394] 图11示出了基于HHLA2和PD-L1免疫染色研究计算PD-L1阳性和阴性非小细胞肺癌中HHLA2表达的百分比(Cheng等人(2018)《临床癌症研究》24:1954-1964)。显示总NSCLC群体的63％可被HHLA2靶向。

[1395] 实例4:HHLA2受体鉴定

[1396] HHLA2被鉴定为TMIGD2的特异性配体,并且HHLA2/TMIGD2相互作用经由AKT依赖性信号传导级联选择性地共刺激人T细胞生长和细胞因子产生(Zhu等人(2013)《自然通讯》4:

2043;Janakiram等人(2015)《临床癌症研究》21:2359-2366)。若干研究表明了活化T细胞上HHLA2的发挥共抑制功能的第二受体(Zhao等人(2013)《美国科学院院报》110:9879-9884;Xiao和Freeman等人(2015)《临床癌症研究》21:2201-2203;Wang等人(2014)《免疫学杂志》192:126.11)。在本发明的研究中,确认了TMIGD2与HHLA2结合,并且鉴定了新HHLA2受体KIR3DL3。简而言之,针对与可溶性人HHLA2-mIg融合蛋白的结合,评估了覆盖在HEK293细胞上表达并使用细胞微阵列技术(Retrogenix,惠利布里奇,英国)在载玻片上印迹的超过3,500个不同质膜蛋白的>4500全长克隆的文库。

[1397] 在开始完全筛选之前首先建立用于结合的测定条件。在2、10和20ug/ml浓度下,针对与可溶性HHLA2-mIgG2a的特异性结合,评估用阳性对照受体TMIGD2或阴性对照EGFR转染细胞或未转染细胞加印迹的载玻片,如用在2:1摩尔比下与HHLA2-mIgG2a预复合或顺序添加的AF647标记的抗小鼠IgG检测抗体所检测。

[1398] 针对初级筛选,将各自编码全长人质膜蛋白的4,500+个表达载体分别在13个微阵列载玻片(“载玻片组”)上一式两份排列。

[1399] 将表达载体(pIRES-hEGFR-IRES-ZsGreen1)在每个载玻片上一式四份点加,并且用于确保每个载玻片上实现或超过转染效率的最小阈值。先前已经定义了该最小阈值(来自pIRES-EGFR-ZsGreen1载体的超过背景1.5的平均ZsGreen1信号)。

[1400] 在20ug/ml浓度下向固定的转染的HEK293细胞载玻片的载玻片添加人HHLA2-mIgG2a融合蛋白,并且用AF647标记的抗小鼠IgG检测抗体检测蛋白质。针对13个载玻片组中的每一个筛选两个重复载玻片。使用ImageQuant软件(GE)分析并定量(针对转染效率)荧光图像。蛋白质“命中”被定义为显示与背景水平相比信号升高的一式两份点。这通过使用在ImageQuant软件上网格化的图像进行的目视检查来实现。

[1401] 根据一式两份点的强度,命中被分类为“强、中、弱或非常弱”。对编码两个初级筛选中的一个或两个中鉴定的命中的所有载体进行测序以双重检查其身份。

[1402] 为了确定哪个或哪些命中(如果有的话)是可再现的并且对人HHLA2是特异性的,将编码初级命中的所有载体加适当的对照KIR受体排列在新载玻片上。使用初级筛选中使用的剂量和温育条件和适当的阳性和阴性对照,用每个测试配体筛选相同的载玻片(n=2个载玻片/处理)。

[1403] 使用可溶性HHLA2-mIgG2a筛选超过>4500全长细胞表面受体克隆将KIR3DL3鉴定为HHLA2结合的命中。一式两份的约300个质膜克隆的代表性组的筛选结果在图6A中示出。在HHLA2-mIgG2a不存在的情况下添加AF647标记的抗小鼠IgG检测抗体不产生信号。

[1404] 新排列的载玻片上的确认性筛选显示HHLA2与KIR3DL3结合(图6A)。在HHLA2-mIgG2a不存在的情况下仅添加AF647标记的抗小鼠IgG检测抗体不产生信号。使用在载玻片上排列的一组14种KIR受体评估HHLA2与KIR3DL3结合的选择性。证明了HHLA2与KIR3DL3的选择性结合(表4和图6B至图6C)。

[1405] 表4

[1406]

KIR受体	KIR3DL3	KIR2DL1	KIR2DL2	KIR2DL3	KIR2DL4	KIR2DL5A	KIR2DL5B	KIR2DS1	KIR2DS2	KIR2DS3	KIR2DS5	KIR3DL1	KIR3DS1	KIR3DL2
HHLA2结合	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[1407] 实例5:确认抗人HHLA2 mAb的免疫检查点抑制的T细胞活化测定

[1408] A.质粒构建

[1409] 通过将抗人CD3 mAb OKT3的单链可变片段(scFv)(Kipriyanov等人(1997)PEDS 10:445-453)与小鼠CD8α(登录号:NP_001074579.1)的包括铰链、跨膜和细胞质结构域的C末端结构域(残基113-220)融合来构建作为膜锚定嵌合抗体的TCR活化物。通过这样,将抗CD3 scFv锚定到CHO-K1细胞表面作为T细胞活化物。合成编码TCR活化物的DNA序列并且插入到pIRES-hyg3载体中(克隆技术(ClonTech))以制备所得的构建体TCRαpIREShyg3。

[1410] 将人HHLA2(登录号:NP_009003.1)和TMIGD2(登录号:NM_144615.2)的DNA序列单个地克隆到pIRES-Hyg3或pIRES-Neo3中以分别制备HHLA2_pIRESneo3和TMIGD2_pIREShyg3。合成KIR3DL3的DNA序列(登录号:BC143802.1,来自复能基因(Genecopoeia))并插入到puroEIF2载体中。

[1411] NFAT报告子含有在NFAT应答元件的四个拷贝的控制下的萤火虫萤光素酶基因,接着是最小启动子。IL2报告子含有在内源性IL2启动子的控制下的萤火虫萤光素酶基因。将编码报告子的DNA序列插入到pcDNA 3.1中以生成NFAT-Luc-pcDNA和IL2-Luc-pcDNA。

[1412] B.细胞系和细胞培养物

[1413] 从ATCC获得亲本Jurkat(克隆E6-1)(ATCC#TIB-152)和CHO-K1(ATCC#CCL-61)细胞。使用补充有10%FBS(生命技术公司,#26140-079)和1%青霉素/链霉素(Hyclone#SV30010.01)的RPMI1640培养基(生命技术公司,#A10491-01)在37℃下以5%CO2培养Jurkat细胞。

[1414] 向TMIGD2-NFAT-Jurkat稳定细胞系培养物补充1000μg/ml遗传霉素(生命技术公司,#11811031)和200ug/ml潮霉素(英杰公司,#10687010),以确保维持TMIGD2和NFAT报告子的重组表达。

[1415] 向KIR3DL3-IL2-Jurkat稳定细胞系培养物补充1000μg/ml遗传霉素和250ng/ml嘌呤霉素(英杰公司,#ant-pr-1),以确保维持KIR3DL3和IL-2报告子的重组表达。

[1416] 将CHO细胞维持在补充有10%FBS和1%青霉素/链霉素的F12-K(Hyclone#SH30526.01)培养基中。向HHLA2-TCR-CHO稳定细胞系培养物补充1000μg/ml遗传霉素和500μg/ml潮霉素,以确保维持HHLA2和TCR活化物的重组表达。

[1417] C.Jurkat报告子和CHO稳定细胞系的生成

[1418] Jurkat克隆:为了制备TMIGD2-NFAT-Jurkat稳定细胞系,通过电穿孔用NFAT_Luc_pcDNA和TMIGD2_pIREShyg3依次对Jurkat细胞(克隆E6-1)进行共转染。通过潮霉素和G418双选择和有限稀释生成稳定的克隆。用补充有潮霉素和G418的完全细胞培养基维持所选的稳定细胞克隆。将细胞维持在RPMI+10%FBS+1%P/S+1000μg/mL G418+200μg/mL潮霉素中。

[1419] 为了制备KIR3DL3-IL2-Jurkat稳定细胞系,通过电穿孔用IL2_Luc_pcDNA和KIR3DL3_puro依次对Jurkat细胞(克隆E6-1)进行共转染。通过嘌呤霉素和G418双选择和有限稀释生成稳定的克隆。用补充有嘌呤霉素和G418的完全细胞培养基维持所选的稳定细胞克隆。将细胞维持在RPMI+10%FBS+1%P/S+1000μg/mL G418+250ng/mL嘌呤霉素中。

[1420] 将仅表达NFAT(Jurkat-萤光素酶)或IL-2启动子(Jurkat-IL-2)的亲本Jurkat克隆维持在RPMI+10%FBS+1%P/S+1000μg/mL G418(BPS生物科学)中。

[1421] CHO细胞克隆:为了制备HHLA2-TCR-CHO稳定细胞系,通过Lipofectamine® 2000(英杰公司)用TCRa_pIREShyg3和HHLA2 pIRESneo3依次对CHO-K1细胞进行共转染。通过潮霉素和G418双选择和有限稀释生成稳定的克隆。用补充有潮霉素和G418的完全细胞培养基维持所选的稳定细胞克隆。将细胞维持在F12-K+10%FBS+1%P/S+1000μg/mL G418+500μg/mL潮霉素中。将表达抗CD3 scFv的亲本CHO克隆维持在F12-K+10%FBS+1%P/S+500μg/mL潮霉素(BPS生物科学)中。

[1422] D.Jurkat报告基因测定

[1423] TMIGD2 NFAT Jurkat报告基因共刺激测定和通过HHLA2抗体进行的抑制:将HHLA2-TCR-CHO细胞在白色不透明底96孔板中在CHOK1生长培养基中以2x 10^4个细胞/孔密度接种。在37℃下以5%CO_2过夜温育之后,细胞附着到板。第二天,小心地将培养基从每个孔去除,在50μl Jurkat细胞培养基中添加抗HHLA2抗体,并且将HHLA2-TCR-CHO细胞温育1小时,之后在50μl Jurkat细胞培养基中以4-5x 10^4个细胞/孔添加TMIGD2_NFAT_Jurkat报告细胞系。将板孔混合并温育大约3-6小时。为了使荧光素酶信号可见,根据建议的方案,将100μl ONE-Step™荧光素酶测定系统(BPS生物科学,目录#60690)添加到每个孔中。使用光度计读取发光。

[1424] KIR3DL3 IL2 Jurkat报告基因抑制测定和通过HHLA2抗体进行的逆转:将HHLA2-TCR-CHO细胞在白色不透明底96孔板中在CHOK1生长培养基中以2x 10^4个细胞/孔密度接种。在37℃下以5%CO_2过夜温育之后,细胞附着到板。第二天,小心地将培养基从每个孔去除,在50μl Jurkat细胞培养基中添加抗HHLA2抗体,并且将HHLA2-TCR-CHO细胞温育1小时,之后在50μl Jurkat细胞培养基加2μg/mL抗CD28抗体(BPS生物科学,#100186)(最终浓度为在100μL测定混合物中1μg/mL/孔)中以4-5x 10^4个细胞/孔添加KIR3DL3_IL2_Jurkat报告细胞系。将板孔混合并温育大约5小时。为了使荧光素酶信号可见,根据建议的方案,将100μl ONE-Step™荧光素酶测定系统(BPS生物科学,目录#60690)添加到每个孔中。使用光度计读取发光。

[1425] 使用这些材料和方法,在如图14所示和以下表9中概述的TMIGD2/HHLA2 T细胞共刺激测定中,针对共刺激阻断评估HHLA2 mAb或同种型对照抗体。

[1426] 表9:用于在TMIGD2/HHLA2 T细胞共刺激测定中评估HHLA2 mAb的研究概述

[1427]

应答者 Jurkat NFAT 细胞	刺激 CHO 细胞	预期应答
Jurkat NFAT / TMIGD2	CHO-亲本细胞	无
Jurkat NFAT / TMIGD2	CHO-抗 CD3 Fv	活化
Jurkat NFAT / TMIGD2	CHO-抗 CD3 Fv / HHLA2	增强的活化
Jurkat NFAT / TMIGD2	CHO-抗 CD3 Fv / HHLA2 + HHLA2 mAb	增强活化的逆转

[1428] 检测用抗CD3 scFV和HHLA2转染的CHO细胞上HHLA2的表达(图15)。还检测用TMIGD2转染的Jurkat NFAT报告细胞上TMIGD2的表达(图16)。在T细胞共刺激测定中使用表达抗CD3 scFV和HHLA2的CHO细胞和表达TMIGD2的Jurkat NFAT报告细胞。发现HHLA2 mAb(6F10)逆转由HHLA2诱导的增强活化,而同种型对照抗体不具有这种作用(图17)。

[1429] 在如图18所示和以下表10中概述的KIR3DL3/HHLA2 T细胞抑制测定中,还针对检查点阻断评估HHLA2 mAb或同种型对照抗体。

[1430] 表10:KIR3DL3/HHLA2 T细胞检查点测定(Jurkat T细胞IL-2报告基因测定)的研究概述

[1431]

应答者 Jurkat NFAT 细胞	刺激 CHO 细胞	预期应答
Jurkat IL-2/ KIR3DL3	CHO-亲本细胞	无

[1432]

Jurkat IL-2 / KIR3DL3	CHO-抗 CD3 Fv	活化
Jurkat IL-2 / KIR3DL3	CHO-抗 CD3 Fv / HHLA2	抑制
Jurkat IL-2 / KIR3DL3	CHO-抗 CD3 Fv / HHLA2 + HHLA2 mAb	抑制逆转

[1433] 还检测用KIR3DL3转染的Jurkat-IL-2报告细胞上KIR3DL3的表达(图19A和图19B)。在T细胞抑制测定中使用表达抗CD3 scFV和HHLA2的CHO细胞和表达KIR3DL3的Jurkat-IL-2报告细胞。发现HHLA2 mAb(克隆6F10和克隆2C4)逆转由HHLA2进行的抑制,而同种型对照抗体不具有这种作用(图20A至图20C和图21A至图21C)。KIR3DL3选择性HHLA2 mAb克隆2C4不阻断由TMIGD2介导的共刺激(图22)。

[1434] 本文所述的数据证明了TMIGD2为HHLA2的T细胞共刺激性受体,并且鉴定了阻断TMIGD2共刺激的HHLA2 mAb。这些数据还证明了KIR3DL3为HHLA2的T细胞抑制性受体,并且鉴定了HHLA2 mAb检查点阻断剂。

[1435] 还可以使用额外的测定来评估HHLA2 mAb。例如,可以使用同种异基因刺激T细胞测定(诸如使用CD4 T细胞和同种异基因单核细胞来源的DC或巨噬细胞的那些)来确认抗人

HHLA2 mAb的免疫检查点抑制。此类方法是本领域熟知的,诸如在Wang等人(2014)《癌症免疫学研究(Cancer Immunol.Res.)》2:846和Brown等人(2003)《免疫学杂志》170:1257中所述。

[1436] 在一些实施例中,HHLA2在树突细胞和巨噬细胞中表达。衍生树突细胞的方法是本领域熟知的,诸如在例如Zhao等人(2013)《美国科学院院报》110:9879和Zhu等人(2013)《自然通讯》4:2043中所述。

[1437] 在一些实施例中,通过以下生成单核细胞来源的未成熟DC(iDC):使用单核细胞纯化试剂盒(德国默天旎生物技术有限公司(Miltenyi Biotec))培养从PBMC分离的单核细胞,并且用50ng/ml IL-4和100ng/ml GM-CSF(安迪生物)培养7天。可以通过以下生成单核细胞来源的活化DC:使用单核细胞纯化试剂盒(德国默天旎生物技术有限公司)培养从PBMC分离的单核细胞,并且用1ug/ml LPS和100ng/ml IFN-γ或poly IC培养7天。

[1438] 在一些实施例中,通过以下生成巨噬细胞:使用单核细胞纯化试剂盒(德国默天旎生物技术有限公司)培养从PBMC分离的单核细胞,并且在100ng/ml LPS加100ng/ml IFN-g或Poly IC的存在下培养3天。

[1439] 使用针对这些抗原的抗体,通过流式细胞术针对HHLA2、TMIGD2(CD28H)和PD-L1的表达评估树突细胞和巨噬细胞培养物。

[1440] 还可以使用同种异基因刺激T细胞活化测定来测量T细胞增殖。简而言之,在一些实施例中,在具有和没有抗人HHLA2、PD-1(纳武单抗)和同种型对照抗体的情况下,在10:1(T/DC)比率下共培养如上所述来源的CD4+T细胞(1x 10^5)和同种异基因DC(1x 10^4)或巨噬细胞,持续6天。通过ELISA(BD生物科学(BD biosciences)或安迪生物试剂盒)测量在第5天时培养物上清液中的IFN-γ分泌。使用流式细胞术通过CFSE稀释测量第6天时的T细胞增殖。

[1441] 在一些实施例中,还可以使用IL-2和IFN-γ水平来确认T细胞活化,诸如使用SEB刺激的PBMC活化测定(参见例如,Wang等人(2014)《癌症免疫学研究》2:846)。例如,可以在1、0.1和0.01ug/ml浓度下的葡萄球菌肠毒素B(SEB;毒素技术(Toxin Technology))的存在下,在具有或没有饱和浓度的抗人HHLA2、PD-1(纳武单抗)和同种型对照抗体的情况下将来自健康供体的PBMC(10^5个细胞)共培养3天。可以通过ELISA或多重分析(BD生物科学)测量培养物上清液中的IL-2和IFN-γ水平。

[1442] 在其他实施例中,可以使用CMV裂解液刺激的PBMC活化回忆测定来确认T细胞活化(参见例如,Sinclair等人(2004)《病毒免疫学(Viral Immunol.)》17:445和Wang等人(2014)《癌症免疫学研究》2:846)。例如,可以在具有和没有抗人HHLA2、PD-1(纳武单抗)和同种型对照抗体的情况下共培养来自CMV阳性供体的PBMC(2x10^5个细胞),并且用来自CMV感染的细胞(3ug/ml,先进生物技术(Advanced Biotechnologies))的裂解液刺激4天。可以通过ELISA(BD生物科学或安迪生物试剂盒)测量培养物上清液中的IFN-γ分泌。可以使用流式细胞术通过CFSE稀释测量T细胞增殖。

[1443] 在一些实施例中,可以使用基于肿瘤的混合淋巴细胞反应(MLR)测定来确认T细胞活化(参见例如,McWhirter等人(2006)《美国科学院院报》103:1041)。例如,可以通过以下生成树突细胞(DC):使用单核细胞纯化试剂盒(德国默天旎生物技术有限公司)培养从PBMC分离的单核细胞,并且用500U/ml IL-4、800U/ml GM-CSF和100ug/ml的IFN-γ培养5天。可

以在抗HHLA2 mAb或同种型对照(10ug/ml)的存在下,使用树突细胞(2x 10^5)、同种异基因$CD3^+$T细胞(1x 10^6)和表达HHLA2的辐射的肿瘤细胞(2x 10^5),将混合的淋巴细胞培养物设置在24孔板中48小时。收获上清液并且使用多重细胞因子测定试剂盒评估细胞因子产生。

[1444] 在一些实施例中,可以使用Jurkat T细胞NFAT-Luc报告基因测定来确认T细胞活化(参见例如,BPS生物科学网站和Wang等人(2017)《药学与生物医学分析杂志(J.Pharm.Biomed.Anal.)》145:247)。例如,在抗HHLA2 mAb存在或不存在的情况下,使用用跨膜抗CD3 scFV(BPS生物科学)和HHLA2转染的CHO细胞来刺激用NFAT-荧光素酶报告基因盒(BPS生物科学)和KIR3DL受体(参见以下测定#1)或TMIGD2受体(参见以下测定#2)转染的Jurkat T细胞(图7)。示例性Jurkat NFAT报告基因测定配置在以下表5中列出。将5x 10^4个CHO细胞接种在96孔测定板中并培养12-14小时。在37℃下将附着的CHO细胞与抗HHLA2 mAb或同种型对照在10ug/ml下一起预温育1小时。将1x 10^5个Jurkat细胞与CHO细胞共培养6小时,并且添加发光底物,并且使用光度计定量荧光素酶单位。

[1445] 表5

[1446]

测定#1：KIR3DL3 测定		
应答者 Jurkat NFAT 细胞	**刺激 CHO 细胞**	**应答**
Jurkat NFAT / KIR3DL3（登录号 BC143802.1）	CHO-亲本细胞	无活化
Jurkat NFAT / KIR3DL3（登录号 BC143802.1）	CHO-抗 CD3 Fv （用于 PD-1 测定的相同抗 CD3 克隆）	活化
Jurkat NFAT / KIR3DL3（登录号 BC143802.1）	CHO-抗 CD3 Fv / HHLA2 （用于 PD-1 测定的相同抗 CD3 克隆）	抑制
Jurkat NFAT / KIR3DL3（登录号 BC143802.1）	CHO-抗 CD3 Fv / HHLA2 + 抗 HHLA2 6F10 mAb （用于 PD-1 测定的相同抗 CD3 克隆）	抑制逆转
测定#2：TMIGD2 测定		
应答者 Jurkat NFAT 细胞	**刺激 CHO 细胞**	**应答**
Jurkat NFAT / TMIGD2	CHO-亲本细胞	无活化
Jurkat NFAT / TMIGD2	CHO-抗 CD3 Fv （用于 PD-1 测定的相同抗 CD3 克隆）	活化
Jurkat NFAT / TMIGD2	CHO-抗 CD3 Fv / HHLA2 （用于 PD-1 测定的相同抗 CD3 克隆）	增强的活化

[1447]

Jurkat NFAT / TMIGD2	CHO-抗 CD3 Fv / HHLA2 + 抗 HHLA2 6F10 mAb（用于 PD-1 测定的相同抗 CD3 克隆）	增强活化的逆转

[1448] 实例6:HHLA2 mAb的活性的体内确认和动物模型发展

[1449] 此外,抗体的体内表征方法是本领域熟知的,诸如在Wang等人(2014)《癌症免疫学研究》2:846,Brown等人(2003)《免疫学杂志》170:1257,Zhao等人(2013)《美国科学院院报》110:9879,Zhu等人(2013)《自然通讯》4:2043,和Sinclair等人(2004)《病毒免疫学》17:445)中所述。肿瘤模型的啮齿类动物、狗和其他常规物种中HHLA2途径缺失需要新的动物肿瘤或药理学模型。

[1450] 在一些实施例中,使用嵌合抗原受体-T细胞(CAR-T)模型(图8)。例如,向NSG小鼠植入表达碳酸酐酶IX(CAIX)、HHLA2和PD-L1的人肾癌细胞系细胞。静脉内注射表达抗碳酸酐酶IX(CAIX)靶向嵌合抗原受体(抗CAIX CAR T细胞)和PD-1的人T细胞(CAR-T)和KIR3DL受体以及单独的或与抗PD-1/L-1mAb组合的抗HHLA2或KIR3DL mAb。在荧光素酶IP注射之后通过生物发光成像来定量肿瘤生长(例如,如在Suarez等人(2016)《肿瘤标靶(Oncotarget)》7:34341中所述)。

[1451] 在一些实施例中,开发在SCID小鼠中的CAR-T细胞肿瘤模型。向携带HeLa-CD19-HHLA2肿瘤的SCID小鼠给予HHLA2 mab和CD19/KIR3DL3 CAR-T细胞,并且评估肿瘤生长抑制。利用6周大的雌性SCID小鼠(杰克逊实验室(Jackson Laboratories),巴港,缅因州)。在第0天对每只小鼠皮下(SC)注射100μl含有2x 10^6个HeLa-CD19或HeLa-CD19+HHLA2细胞的无菌PBS。在第19天(5x 10^6个细胞)和第33天(9x 10^6个细胞)瘤内注射在PBS中的CAR-T细胞,并且每天追踪肿瘤生长。经由腹腔内(IP)给药每周三次进行抗体给药。每周两次监测体重。用卡尺每天测量肿瘤大小,并且使用式W2L/2确定肿瘤体积(以mm^3为单位),其中W是肿瘤宽度并且L是肿瘤长度。研究长度为大约45天,并且每个臂使用10只小鼠。基于这些抗体的PK谱,向小鼠给予HHLA2 mAb。

[1452] 在实验结束时,切除肿瘤,进行末端放血,并且储存血清用于ELISA和FACS分析。收获肿瘤,称重并且将一半肿瘤新鲜冷冻而另一半固定在4%多聚甲醛中,然后包埋在石蜡中用于H&E染色和免疫组织化学(IHC)。示例性CD19/KIR3DL3 CAR-T细胞肿瘤模型配置在以下表12中列出。

[1453] 表12:CD19/KIR3DL3 CAR-T细胞肿瘤模型中HHLA2 mAb的体内评估

[1454]

肿瘤	处理	预期结果
HeLa/CD19/HHLA2	无T细胞	肿瘤生长
HeLa/CD19/HHLA2	CAR-T/aCD19	肿瘤生长的抑制
HeLa/CD19/HHLA2	CAR-T/aCD19/KIR3DL3+同种型对照	肿瘤生长
HeLa/CD19/HHLA2	CAR-T/aCD19/KIR3DL3+HHLA2 mAb	肿瘤生长的抑制

[1455] 在一些实施例中,使用抗原引发和强化测定确认了HHLA2 mAb具有体内活性,从而确认了食蟹猴中的T细胞增殖、细胞因子和/或T细胞依赖性抗体应答(TDAR)。在一些实施例中,生成并使用食蟹猴KLH抗原攻击T细胞模型(图24A和图24B)。例如,在第2天用在不完全弗氏佐剂中的KLH(0.1mg)对静脉内给予抗HHLA2 mAb的食蟹猴进行免疫,并且在14天后用

在不完全弗氏佐剂中的低剂量KLH进行强化。使用免疫测定针对抗KLH IgG抗体的增强产生评估免疫前和免疫后血液。在第1天用HHLA2mAb处理食蟹猴,并且每周接受2-50mg/kg的HHLA2 mAb的IV给药。通过Ki67染色和流式细胞术评估从剂量前和剂量后抗HHLA2 mAb处理的食蟹猴分离的PBMC的T细胞依赖性抗KLH抗体应答、T细胞和NK细胞增殖,并且通过体内CD107a FACS染色或通过针对K562细胞的离体细胞毒性评估所述PBMC的NK细胞细胞毒性。在一些实施例中,开发食蟹猴SIV模型并且用于体内评估HHLA2 mAb。

[1456] 在一些实施例中,使用人源化SRG-15小鼠肿瘤模型,并且测试HHLA2 mAb对于人源化SRG-15(Flavell)或NSG-15(Greiner)小鼠中的人肿瘤的作用(图23A至图23C,Herndler-Brandstetter D等人(2017)114:E9626-E9634)。

[1457] 实例7:HHLA2 mAb细胞结合和受体阻断特征

[1458] 分析HHLA2 mAb结合和阻断特征。例如,检测HHLA2 mAb结合HHLA2的EC50,以及HHLA2 mAb阻断HHLA2结合TMIGD2或KIR3DL3的IC50。通过流式细胞术检测转染的293T细胞上TMIGD2和KIR3DL3的表达(图12A和图12B)。示出了HHLA2-Fc结合TMIGD2和KIR3DL3转染的293T细胞(图12C和图12D)。还生成了表达HHLA2、TMIGD2或KIR3DL3的稳定转染的300.19前B细胞。

[1459] 然后进行HHLA2 mAb细胞结合和受体阻断实验。在一个实验中,在4℃下将不同浓度的HHLA2 mAb与HHLA2转染的300.19前B细胞一起温育30分钟。用PE标记的山羊抗小鼠IgG(H+L)检测HHLA2 mAb与转染的300.19细胞的结合。对于HHLA2 mAb阻断实验,在1:1比率下将不同浓度的HHLA2 mAb与4ug/ml的HHLA2-mIgG2a一起预温育30分钟,并且添加到TMIGD2或KIR3DL3转染的293T细胞中并在4℃下温育30分钟。用PE标记的Fab2山羊抗mIgG2a抗体检测HHLA2-mIgG2a与TMIGD2或KIR3DL3转染的293T细胞的结合。使用Graph Pad Prism进行EC50和IC50分析。数据在表6中示出。示出了HHLA2 mAb克隆2C4具有完全KIR3DL3阻断和部分TMIGD2阻断的所需特性(表6)。

[1460] 表6:HHLA2 mAb细胞结合和受体阻断实验#1

[1461]

HHLA2 mAb（同种型）\	[1]HHLA2 结合 EC50（ug/ml）	[2]TMIGD2 阻断 IC50（ug/ml）		[2]KIR3DL3 阻断 IC50（ug/ml）	
1C8（IgG2a）	0.63	+	1.65	+	1.15
2C4（IgG1）	**0.24**	**+/-**	**28.2**	**+**	**0.52**
2G2（IgG1）	0.21	+	0.85	+	0.53
4D1（IgG1）	0.44	+	0.56	+	0.68
6D10（IgG1）	22.5	+/-	11.7	+/-	7.0
6F10（IgG1）	0.25	+	0.55	+	0.9

[1462] [1]HHLA2 mAb与HHLA2转染的300.19小鼠前B细胞系的结合

[1463] [2]HHLA2 mAb阻断HHLA2-mIgG2a与TMIGD2或KIR3DL3转染的293T细胞的结合(瞬时)

[1464] 在另一个实验中,在4℃下将不同浓度的HHLA2 mAb与HHLA2转染的300.19前B细胞一起温育30分钟。用PE标记的山羊抗小鼠IgG(H+L)检测HHLA2 mAb与转染的300.19细胞的

结合。对于HHLA2 mAb阻断实验,在1:1比率下将不同浓度的HHLA2 mAb与4ug/ml的HHLA2-mIgG2a一起预温育30分钟,并且添加到TMIGD2或KIR3DL3转染的300.19前B细胞中并在4℃下温育30分钟。用PE标记的Fab2山羊抗mIgG2a抗体检测HHLA2-mIgG2a与TMIGD2或KIR3DL3转染的300.19前B细胞的结合。使用Graph Pad Prism进行EC50和IC50分析。数据在表7中示出。示出了HHLA2 mAb克隆2C4具有完全KIR3DL3阻断和部分TMIGD2阻断的所需特性(表7)。

[1465] 表7:HHLA2 mAb细胞结合和受体阻断实验#2

[1466]

HHLA2 mAb（同种型）\	1HHLA2 结合 EC50（ug/ml）	2TMIGD2 阻断 IC50（ug/ml）		2KIR3DL3 阻断 IC50（ug/ml）	
2C4（IgG1）	**0.29**	**+/-**	**7.3**	**+**	**0.97**
5H4（IgG1）	2.03	+/-	9.63	+	1.25
6F10（IgG1）	0.22	+	0.92	+	0.74
6G8（IgG1）	2.14	+/-	10.85	+	1.18

[1467] [1]HHLA2 mAb与HHLA2转染的300.19小鼠前B细胞的结合

[1468] [2]HHLA2 mAb阻断HHLA2-mIgG2a与TMIGD2或KIR3DL3转染的300.19前B细胞的结合

[1469] 还测试了不同的HHLA2 mAb与人和食蟹猴HHLA2的结合,并且进行EC50结合分析(图13A和图13B)。在4℃下将不同浓度的HHLA2 mAb与人或食蟹猴HHLA2转染的300.19前B细胞一起温育30分钟。用PE标记的山羊抗小鼠IgG(H+L)检测HHLA2mAb与转染的300.19细胞的结合。使用Graph Pad Prism进行EC50分析。数据在表8中示出。

[1470] 表8:HHLA2 mAb与人和食蟹猴hhla2结合

[1471]

HHLA2 mAb（同种型）	[1]人 HHLA2 结合 EC50（ug/ml）	食蟹猴 HHLA2 结合 EC50（ug/ml）
2C4（IgG1）	0.29	0.47
5H4（IgG1）	2.03	无结合
6F10（IgG1）	0.22	0.40
6G8（IgG1）	2.14	无结合

[1472] [1]HHLA2 mAb与人HHLA2转染的300.19小鼠前B细胞的结合

[1473] [2]HHLA2 mAb与食蟹猴转染的300.19小鼠前B细胞的结合

[1474] 实例8:HHLA2 mAb的活性的体外确认

[1475] 在一些实施例中,在HHLA2 mAb存在或不存在的情况下,评估表达CD19和KIRDL3的CAR-T细胞(CAR-T/CD19/KIRDL3)针对表达HeLa-CD19和HHLA2的靶肿瘤细胞的细胞毒性。生成CAR-T/CD19/KIRDL3细胞。构建表达抗CD19 scFv和KIR3DL3的慢病毒质粒并亚克隆到第二代CAR盒中,所述第二代CAR盒含有来自GM-CSF的分泌信号肽,来自CD28的铰链区、跨膜结构域和共刺激结构域,和CD3ζ活化结构域。将一千万个生长停滞的HEK293FT细胞接种到T75烧瓶中并培养过夜,然后使用CalPhos™转染试剂盒(宝生物(Takara,)山景城,加利福尼亚

州),用pPACKH1慢病毒载体包装混合物(系统生物科学(System Biosciences),帕罗奥多,加利福尼亚州)和10μg各自含有抗CD19 scFv和KIR3DL3的慢病毒载体转染。一天后,用新鲜培养基替换培养基,并且在48h后采集含有慢病毒的培养基。通过在2100g下离心30min来从培养基清除细胞碎片。通过在112,000g下离心100min来采集病毒颗粒,等份分装并在-80℃下冷冻。使用Lenti-X™ qRT-PCR试剂盒通过定量RT-PCR确定病毒制品的滴度。

[1476] 从以1x 10^6个细胞/ml悬浮在含有10%FBS和300U/ml IL-2的AIM V培养基中的人外周血单核细胞(根据其批准的IRB方案,由达纳法伯癌症研究院提供)分离PBMC,与等量的(1:1比率)CD3/CD28磁珠(赛默飞世尔)混合,并且在未处理的24孔板(0.5ml/孔)中培养。在24小时和48小时,以5的感染复数(MOI)将慢病毒以及1μl的TransPlus™转导增强剂(AlStem)添加到培养物中。在T细胞在接下来的两周增殖时,每2-3天对细胞进行计数,并且将具有300U/ml IL-2的新鲜培养基添加到培养物中以将细胞密度维持在1-3x 10^6个细胞/ml。使用抗CD4、CD8和CD19抗体通过流式细胞术评定CAR表达。因此,在转导之前,使用抗CD3抗体以及抗CD28抗体共刺激活化T细胞。通常在两周内实现CAR-T细胞在培养物中的快速扩增,通过外源性IL-2的存在驱动。该CAR在后文中被称为CAR-T/CD19/KIRDL3。

[1477] 生成HHLA2转染的HeLa-CD19细胞。通过Lipofectamine® 2000(英杰公司)用HHLA2_pIRESneo3转染表达HeLa-CD19的细胞。通过G418选择和有限稀释生成稳定克隆,并且通过流式细胞术评估HHLA2表达。

[1478] 进行实时细胞毒性测定(RTCA)中原代T细胞的体外KIR3DL3抑制。以1x 10^4个细胞/孔将附着的靶细胞(HeLa或HeLa-CD19)接种到96孔E-板(艾森生物(Acea Biosciences),圣地亚哥,加利福尼亚州)中,并且用基于阻抗的实时细胞分析(RTCA)xCELLigence系统(艾森生物)在培养物中过夜监测。第二天,去除培养基,并且用含有10%FBS±1x 10^5个效应细胞(CAR-T/CD19/KIRDL3细胞或未转导的T细胞)的AIM V-AlbuMAX®培养基替换,一式三份进行。用RTCA系统再监测E-板中的细胞2-3天,并且随时间绘制阻抗的图。将细胞裂解计算为(没有效应细胞的靶细胞的阻抗-具有效应细胞的靶细胞的阻抗)x100/没有效应细胞的靶细胞的阻抗。

[1479] 还评估细胞因子分泌。在一些实施例中,进行细胞因子诱导测定。例如,将HeLa-CD19/HHLA2靶细胞与效应CAR-T/CD19/KIRDL3细胞或未转导的T细胞以1:1比率(各自1x 10^4个细胞)在具有200ml含有10%FBS的AIM V-AlbuMAX®培养基的U底96孔板中一起培养,一式三份进行。在16h之后,将上部150ml的培养基转移到V底96孔板中并在300g下离心5min,以使任何残留细胞沉淀。将上部120ml的上清液转移到新的96孔板中,并且根据制造商的方案使用来自赛默飞世尔的试剂盒,通过ELISA分析人IFN-γ和IL-2水平。

[1480] 示例性CAR-T细胞细胞毒性模型体外配置在以下表11中列出。

[1481] 表11:CAR-T细胞细胞毒性模型中HHLA2 mAb的体外评估

[1482]

肿瘤	处理	预期结果
HeLa/CD19/HHLA2	无 T 细胞	无活化
HeLa/CD19/HHLA2	CAR-T/aCD19	T 细胞活化
HeLa/CD19/HHLA2	CAR-T/aCD19/ KIR3DL3 + 同种型对照	T 细胞活化的抑制
HeLa/CD19/HHLA2	CAR-T/aCD19/KIR3DL3 + HHLA2 mAb	T 细胞活化的逆转

[1483] 在一些实施例中,进行NK细胞毒性测定的KIR3DL3抑制。生成KIR3DL3转染的NK92细胞。例如,用KIR3DL3 puroEIF2载体转染NK92细胞并针对嘌呤霉素抗性进行选择,并且通过流式细胞术检测KIR3DL3表达。

[1484] 生成HHLA2转染的K562靶细胞。例如,用HHLA2 pIRESneo3转染靶K562细胞并针对新霉素抗性进行选择,并且通过流式细胞术检测HHLA2表达。

[1485] 在4小时细胞毒性测定中,在HHLA2 mAb存在或不存在的情况下,在不同的E/T比率下评估用KIR3DL3转染的NK92细胞的针对K562细胞(+或-HHLA2)的NK细胞毒性。示例性CAR-T细胞细胞毒性模型体外配置在以下表13中列出。

[1486] 表13:NK细胞毒性模型中HHLA2 mAb的评估

[1487]

效应NK细胞	靶K562细胞	预期应答
NK92/KIRDL3	K562	细胞毒性
NK92/KIRDL3	K562/HHLA2+同种型对照	细胞毒性的抑制
NK92/KIRDL3	K562/HHLA2+HHLA2 mAb	细胞毒性

[1488] 在一些实施例中,研究Jurkat T细胞中的KIR3DL3信号传导途径。

[1489] 通过引用并入

[1490] 本文提到的所有公布、专利和专利申请都特此通过引用整体并入,就如同具体且单个地指出单个的公布、专利或专利申请各自通过引用并入本文中一样。在有冲突的情况下,将以本申请,包括本文中的任何定义为准。

[1491] 还通过引用整体并入了参考与公共数据库中的条目相关的登录号的任何多核苷酸和多肽序列,诸如由美国国家基因组研究院(TIGR)在万维网tigr.org上维持的那些和/或由美国国家生物技术信息中心(NCBI))在万维网ncbi.nlm.nih.gov上维持的那些。

[1492] 等效物

[1493] 本领域技术人员仅仅使用常规试验将认识到或者能够确定本文所述的发明的具体实施例的多种等效物。此类等效物旨在涵盖于以下权利要求书中。

序列表

<110> 丹娜法伯癌症研究院(DANA-FARBER CANCER INSTITUTE, INC.)

<120> 作为HHLA2受体的KIR3DL3、抗HHLA2抗体及其用途

<130> DFS-21225

<140> PCT/US2019/026034
<141> 2019-04-05

<160> 371

<170> PatentIn 版本3.5

<210> 1
<211> 2679
<212> DNA
<213> 智人

<400> 1

[0001] agttctcttc aagtcatgta atcgactttt ttgaattagt tttcagtttc attttgtttt 60

ccctaattca agttgggaac acttcatttt ccccaattca agttgggaac acttccttgg 120

tatttccttg ctacatggac tttagcaaat gctactttac tctccttcca gctactcagg 180

aggctgaggc aggagaatcg cttgaacccg ggaggcggag gttacagtga gccttttcct 240

agttttactg ttggaagcct aactcacagg agagattatg caatacagtc ctgaagtcaa 300

gggaggagag catgtaggag aatactaacc ctgcacagat tgtgatggtg atgtggaata 360

tactaaagcc tagaacgcac ctcctctgca tgactaatat gttctgcaca agacatgaag 420

gcacagacag cactgtcttt cttcctcatt ctcataacat ctctgagtgg atctcaaggc 480

atattccctt tggctttctt catttatgtt cctatgaatg aacaaatcgt cattggaaga 540

cttgatgaag atataattct cccttcttca tttgagaggg gatccgaagt cgtaatacac 600

tggaagtatc aagatagcta taaggttcac agttactaca aaggcagtga ccatttggaa 660

agccaagatc ccagatatgc aaacaggaca tccctttttct ataatgagat tcaaaatggg 720

aatgcgtcgc tatttttcag aagagtaagc cttctggacg aaggaattta cacctgctat 780

gtaggaacag caattcaagt gattacaaac aaagtggtgc taaaggtggg agtttttctc 840

acacccgtga tgaagtatga aaagaggaac acaaacagct tcttaatatg cagcgtgtta 900

agtgtttatc ctcgtccaat tatcacgtgg aaaatggaca acacacctat ctctgaaaac 960

aacatggaag aaacagggtc tttggattct ttttctatta acagcccact gaatattaca 1020

ggatcaaatt catcttatga atgtacaatt gaaaattcac tgctgaagca aacatggaca 1080

gggcgctgga cgatgaaaga tggccttcat aaaatgcaaa gtgaacacgt ttcactctca 1140

tgtcaacctg taaatgatta tttttcacca aaccaagact tcaaagttac ttggtccaga 1200

atgaaaagtg ggactttctc tgtcctggct tactatctga gctcctcaca aaatacaatt 1260

atcaatgaat cccgattctc atggaacaaa gagctgataa accagagtga cttctctatg 1320

aatttgatgg atcttaatct ttcagacagt ggggaatatt tatgcaatat ttcttcggat 1380

[0002]

gaatatactt tacttaccat ccacacagtg catgtagaac cgagccaaga aacagcttcc 1440

cataacaaag gcttatggat tttggtgccc tctgcgattt tggcagcttt tctgctgatt 1500

tggagcgtaa aatgttgcag agcccagcta gaagccagga ggagcagaca ccctgctgat 1560

ggagcccaac aagaaagatg ttgtgtccct cctggtgagc gctgtcccag tgcacccgat 1620

aatggcgaag aaaatgtgcc tctttcagga aaagtatagg aaatgagaga agactgtgac 1680

aactcatgac ctgcatcctt aatatccagt gacttcatct ccccttttctt caccacaatt 1740

ccaggcaatg gcctgtcgga gcagacaatt ctaccactgc aaagagttgt aaccattttc 1800

tggtatcaca tttatttttc aagacatact tttcaagaca tcattcactg acccactacc 1860

tgcattgagt ataaatgcct ggatgttaag gattccaatt taactttgaa aagaactgtc 1920

tcattcattt acatttctgt tacagtcagc ccaggaggtt acagtgagct ctccactaag 1980

aatctggaag aaatgcatca ctaggggttg attcccaatc tgatcaactg ataatgggtg 2040

agagagcagg taagagccaa agtcacctta gtggaaaggt taaaaaccag agcctggaaa 2100

ccaagatgat tgatttgaca aggtatttta gtctagtttt atatgaacgg ttgtatcagg 2160

gtaaccaact cgatttggga tgaatcttag ggcaccaaag actaagacag tatctttaag 2220

attgctaggg aaaagggccc tatgtgtcag gcctctgagc ccaagccaag catcgcatcc 2280

cctgtgattt gcacgtatac atccagatgg cctaaagtaa ctgaagatcc acaaaagaag 2340

taaaaatagc cttaactgat gacattccac cattgtgatt tgttcctgcc ccaccctaac 2400

tgatcaatgt actttgtaat ctcccccacc cttaagaagg tactttgtaa tcttccccac 2460

ccttaagaag gttctttgta attctcccca cccttgagaa tgtactttgt gagatccacc 2520

ctgcccacaa aacattgctc ttaacttcac cgcctaaccc aaaacctata agaactaatg 2580

ataatccatc acccttcgct gactctcttt tcggactcag cccacctgca cccaggtgaa 2640

ataaacagct ttattgctca cacaaaaaaa aaaaaaaaa 2679

[0003]

<210> 2
<211> 414
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2
Met Lys Ala Gln Thr Ala Leu Ser Phe Phe Leu Ile Leu Ile Thr Ser
1 5 10 15

Leu Ser Gly Ser Gln Gly Ile Phe Pro Leu Ala Phe Phe Ile Tyr Val
20 25 30

Pro Met Asn Glu Gln Ile Val Ile Gly Arg Leu Asp Glu Asp Ile Ile
35 40 45

Leu Pro Ser Ser Phe Glu Arg Gly Ser Glu Val Val Ile His Trp Lys
50 55 60

Tyr Gln Asp Ser Tyr Lys Val His Ser Tyr Tyr Lys Gly Ser Asp His
65 70 75 80

Leu Glu Ser Gln Asp Pro Arg Tyr Ala Asn Arg Thr Ser Leu Phe Tyr
85 90 95

Asn Glu Ile Gln Asn Gly Asn Ala Ser Leu Phe Phe Arg Arg Val Ser
100 105 110

Leu Leu Asp Glu Gly Ile Tyr Thr Cys Tyr Val Gly Thr Ala Ile Gln
115 120 125

Val Ile Thr Asn Lys Val Val Leu Lys Val Gly Val Phe Leu Thr Pro
130 135 140

[0004] Val Met Lys Tyr Glu Lys Arg Asn Thr Asn Ser Phe Leu Ile Cys Ser
145 150 155 160

Val Leu Ser Val Tyr Pro Arg Pro Ile Ile Thr Trp Lys Met Asp Asn
165 170 175

Thr Pro Ile Ser Glu Asn Asn Met Glu Glu Thr Gly Ser Leu Asp Ser
180 185 190

Phe Ser Ile Asn Ser Pro Leu Asn Ile Thr Gly Ser Asn Ser Ser Tyr
195 200 205

Glu Cys Thr Ile Glu Asn Ser Leu Leu Lys Gln Thr Trp Thr Gly Arg
210 215 220

Trp Thr Met Lys Asp Gly Leu His Lys Met Gln Ser Glu His Val Ser
225 230 235 240

Leu Ser Cys Gln Pro Val Asn Asp Tyr Phe Ser Pro Asn Gln Asp Phe
245 250 255

Lys Val Thr Trp Ser Arg Met Lys Ser Gly Thr Phe Ser Val Leu Ala
260 265 270

Tyr Tyr Leu Ser Ser Ser Gln Asn Thr Ile Ile Asn Glu Ser Arg Phe
275 280 285

Ser Trp Asn Lys Glu Leu Ile Asn Gln Ser Asp Phe Ser Met Asn Leu
290 295 300

Met Asp Leu Asn Leu Ser Asp Ser Gly Glu Tyr Leu Cys Asn Ile Ser
305 310 315 320

[0005] Ser Asp Glu Tyr Thr Leu Leu Thr Ile His Thr Val His Val Glu Pro
325 330 335

Ser Gln Glu Thr Ala Ser His Asn Lys Gly Leu Trp Ile Leu Val Pro
340 345 350

Ser Ala Ile Leu Ala Ala Phe Leu Leu Ile Trp Ser Val Lys Cys Cys
355 360 365

Arg Ala Gln Leu Glu Ala Arg Arg Ser Arg His Pro Ala Asp Gly Ala
370 375 380

Gln Gln Glu Arg Cys Cys Val Pro Pro Gly Glu Arg Cys Pro Ser Ala
385 390 395 400

Pro Asp Asn Gly Glu Glu Asn Val Pro Leu Ser Gly Lys Val
405 410

<210> 3
<211> 2488
<212> DNA
<213> 智人

<400> 3
aaatcaaacg taccttggac tttactctct gagaaactca tagctgaatt caatgtttat 60

tcttatggac tacttagcat ttgactagac ggtatgaatt tctaagtaag cacatataga 120

actggatgcc cttgtggtac atctcaaggc tgatttgaaa gcttgagaga ccatcaagaa 180

ttggatttgg ggaagagcat gactaatatg ttctgcacaa gacatgaagg cacagacagc 240

actgtctttc ttcctcattc tcataacatc tctgagtgga tctcaaggca tattcccttt 300

ggctttcttc atttatgttc ctatgaatga acaaatcgtc attggaagac ttgatgaaga 360

tataattctc ccttcttcat ttgagagggg atccgaagtc gtaatacact ggaagtatca 420

[0006] agatagctat aaggttcaca gttactacaa aggcagtgac catttggaaa gccaagatcc 480

cagatatgca aacaggacat ccctttttcta taatgagatt caaaatggga atgcgtcgct 540

atttttcaga agagtaagcc ttctggacga aggaatttac acctgctatg taggaacagc 600

aattcaagtg attacaaaca aagtggtgct aaaggtggga gtttttctca cacccgtgat 660

gaagtatgaa aagaggaaca caaacagctt cttaatatgc agcgtgttaa gtgtttatcc 720

tcgtccaatt atcacgtgga aaatggacaa cacacctatc tctgaaaaca acatggaaga 780

aacagggtct ttggattctt tttctattaa cagcccactg aatattacag gatcaaattc 840

atcttatgaa tgtacaattg aaaattcact gctgaagcaa acatggacag ggcgctggac 900

gatgaaagat ggccttcata aaatgcaaag tgaacacgtt tcactctcat gtcaacctgt 960

aaatgattat ttttcaccaa accaagactt caaagttact tggtccagaa tgaaaagtgg 1020

gactttctct gtcctggctt actatctgag ctcctcacaa aatacaatta tcaatgaatc 1080

ccgattctca tggaacaaag agctgataaa ccagagtgac ttctctatga atttgatgga 1140

tcttaatctt tcagacagtg gggaatattt atgcaatatt tcttcggatg aatatacttt 1200

acttaccatc cacacagtgc atgtagaacc gagccaagaa acagcttccc ataacaaagg 1260

cttatggatt ttggtgccct ctgcgatttt ggcagctttt ctgctgattt ggagcgtaaa 1320

atgttgcaga gcccagctag aagccaggag gagcagacac cctgctgatg gagcccaaca 1380

agaaagatgt tgtgtccctc ctggtgagcg ctgtcccagt gcacccgata atggcgaaga 1440

aaatgtgcct ctttcaggaa aagtatagga aatgagagaa gactgtgaca actcatgacc 1500

tgcatcctta atatccagtg acttcatctc ccctttcttc accacaattc caggcaatgg 1560

cctgtcggag cagacaattc taccactgca aagagttgta accattttct ggtatcacat 1620

ttatttttca agacatactt ttcaagacat cattcactga cccactacct gcattgagta 1680

taaatgcctg gatgttaagg attccaattt aactttgaaa agaactgtct cattcattta 1740

[0007]

catttctgtt acagtcagcc caggaggtta cagtgagctc tccactaaga atctggaaga 1800

aatgcatcac taggggttga ttcccaatct gatcaactga taatgggtga gagagcaggt 1860

aagagccaaa gtcaccttag tggaaaggtt aaaaaccaga gcctggaaac caagatgatt 1920

gatttgacaa ggtattttag tctagtttta tatgaacggt tgtatcaggg taaccaactc 1980

gatttgggat gaatcttagg gcaccaaaga ctaagacagt atctttaaga ttgctaggga 2040

aaagggccct atgtgtcagg cctctgagcc caagccaagc atcgcatccc ctgtgatttg 2100

cacgtataca tccagatggc ctaaagtaac tgaagatcca caaaagaagt aaaaatagcc 2160

ttaactgatg acattccacc attgtgattt gttcctgccc caccctaact gatcaatgta 2220

ctttgtaatc tcccccaccc ttaagaaggt actttgtaat cttccccacc cttaagaagg 2280

ttctttgtaa ttctccccac ccttgagaat gtactttgtg agatccaccc tgcccacaaa 2340

acattgctct taacttcacc gcctaaccca aaacctataa gaactaatga taatccatca 2400

cccttcgctg actctctttt cggactcagc ccacctgcac ccaggtgaaa taaacagctt 2460

tattgctcac acaaaaaaaa aaaaaaaa 2488

<210> 4
<211> 414
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4
Met Lys Ala Gln Thr Ala Leu Ser Phe Phe Leu Ile Leu Ile Thr Ser
1 5 10 15

Leu Ser Gly Ser Gln Gly Ile Phe Pro Leu Ala Phe Phe Ile Tyr Val
20 25 30

Pro Met Asn Glu Gln Ile Val Ile Gly Arg Leu Asp Glu Asp Ile Ile
35 40 45

[0008]

Leu Pro Ser Ser Phe Glu Arg Gly Ser Glu Val Val Ile His Trp Lys
50 55 60

Tyr Gln Asp Ser Tyr Lys Val His Ser Tyr Tyr Lys Gly Ser Asp His
65 70 75 80

Leu Glu Ser Gln Asp Pro Arg Tyr Ala Asn Arg Thr Ser Leu Phe Tyr
85 90 95

Asn Glu Ile Gln Asn Gly Asn Ala Ser Leu Phe Phe Arg Arg Val Ser
100 105 110

Leu Leu Asp Glu Gly Ile Tyr Thr Cys Tyr Val Gly Thr Ala Ile Gln
115 120 125

Val Ile Thr Asn Lys Val Val Leu Lys Val Gly Val Phe Leu Thr Pro

130 135 140

Val Met Lys Tyr Glu Lys Arg Asn Thr Asn Ser Phe Leu Ile Cys Ser
145 150 155 160

Val Leu Ser Val Tyr Pro Arg Pro Ile Ile Thr Trp Lys Met Asp Asn
165 170 175

Thr Pro Ile Ser Glu Asn Asn Met Glu Glu Thr Gly Ser Leu Asp Ser
180 185 190

Phe Ser Ile Asn Ser Pro Leu Asn Ile Thr Gly Ser Asn Ser Ser Tyr
195 200 205

Glu Cys Thr Ile Glu Asn Ser Leu Leu Lys Gln Thr Trp Thr Gly Arg
210 215 220

[0009]

Trp Thr Met Lys Asp Gly Leu His Lys Met Gln Ser Glu His Val Ser
225 230 235 240

Leu Ser Cys Gln Pro Val Asn Asp Tyr Phe Ser Pro Asn Gln Asp Phe
245 250 255

Lys Val Thr Trp Ser Arg Met Lys Ser Gly Thr Phe Ser Val Leu Ala
260 265 270

Tyr Tyr Leu Ser Ser Ser Gln Asn Thr Ile Ile Asn Glu Ser Arg Phe
275 280 285

Ser Trp Asn Lys Glu Leu Ile Asn Gln Ser Asp Phe Ser Met Asn Leu
290 295 300

Met Asp Leu Asn Leu Ser Asp Ser Gly Glu Tyr Leu Cys Asn Ile Ser

305 310 315 320

Ser Asp Glu Tyr Thr Leu Leu Thr Ile His Thr Val His Val Glu Pro
325 330 335

Ser Gln Glu Thr Ala Ser His Asn Lys Gly Leu Trp Ile Leu Val Pro
340 345 350

Ser Ala Ile Leu Ala Ala Phe Leu Leu Ile Trp Ser Val Lys Cys Cys
355 360 365

Arg Ala Gln Leu Glu Ala Arg Arg Ser Arg His Pro Ala Asp Gly Ala
370 375 380

Gln Gln Glu Arg Cys Cys Val Pro Pro Gly Glu Arg Cys Pro Ser Ala
385 390 395 400

[0010]

Pro Asp Asn Gly Glu Glu Asn Val Pro Leu Ser Gly Lys Val
405 410

<210> 5
<211> 2419
<212> DNA
<213> 智人

<400> 5
agtttactct acatcatagc agagaaaatg gacaaaacac agctgttttg catgtaggag 60

aatactaacc ctgcacagat tgtgatggtg atgtggaata tactaaagcc tagaacgcac 120

ctcctctgca tgactaatat gttctgcaca agacatgaag gcacagacag cactgtcttt 180

cttcctcatt ctcataacat ctctgagtgg atctcaaggc atattccctt tggctttctt 240

catttatgtt cctatgaatg aacaaatcgt cattggaaga cttgatgaag atataattct 300

cccttcttca tttgagaggg gatccgaagt cgtaatacac tggaagtatc aagatagcta 360

taaggttcac agttactaca aaggcagtga ccatttggaa agccaagatc ccagatatgc 420

aaacaggaca tccctttttct ataatgagat tcaaaatggg aatgcgtcgc tatttttcag 480

aagagtaagc cttctggacg aaggaattta cacctgctat gtaggaacag caattcaagt 540

gattacaaac aaagtggtgc taaaggtggg agtttttctc acacccgtga tgaagtatga 600

aaagaggaac acaaacagct tcttaatatg cagcgtgtta agtgtttatc ctcgtccaat 660

tatcacgtgg aaaatggaca acacacctat ctctgaaaac aacatggaag aaacagggtc 720

tttggattct ttttctatta acagcccact gaatattaca ggatcaaatt catcttatga 780

atgtacaatt gaaaattcac tgctgaagca aacatggaca gggcgctgga cgatgaaaga 840

tggccttcat aaaatgcaaa gtgaacacgt ttcactctca tgtcaacctg taaatgatta 900

tttttcacca aaccaagact tcaaagttac ttggtccaga atgaaaagtg ggactttctc 960

tgtcctggct tactatctga gctcctcaca aaatacaatt atcaatgaat cccgattctc 1020

[0011]

atggaacaaa gagctgataa accagagtga cttctctatg aatttgatgg atcttaatct 1080

ttcagacagt ggggaatatt tatgcaatat ttcttcggat gaatatactt tacttaccat 1140

ccacacagtg catgtagaac cgagccaaga aacagcttcc cataacaaag gcttatggat 1200

tttggtgccc tctgcgattt tggcagcttt tctgctgatt tggagcgtaa aatgttgcag 1260

agcccagcta gaagccagga ggagcagaca ccctgctgat ggagcccaac aagaaagatg 1320

ttgtgtccct cctggtgagc gctgtcccag tgcacccgat aatggcgaag aaaatgtgcc 1380

tctttcagga aaagtatagg aaatgagaga agactgtgac aactcatgac ctgcatcctt 1440

aatatccagt gacttcatct ccccttttctt caccacaatt ccaggcaatg gcctgtcgga 1500

gcagacaatt ctaccactgc aaagagttgt aaccattttc tggtatcaca tttatttttc 1560

aagacatact tttcaagaca tcattcactg acccactacc tgcattgagt ataaatgcct 1620

ggatgttaag gattccaatt taactttgaa aagaactgtc tcattcattt acatttctgt 1680

tacagtcagc ccaggaggtt acagtgagct ctccactaag aatctggaag aaatgcatca 1740

ctaggggttg attcccaatc tgatcaactg ataatgggtg agagagcagg taagagccaa 1800

agtcacctta gtggaaaggt taaaaaccag agcctggaaa ccaagatgat tgatttgaca 1860

aggtatttta gtctagtttt atatgaacgg ttgtatcagg gtaaccaact cgatttggga 1920

tgaatcttag ggcaccaaag actaagacag tatctttaag attgctaggg aaaagggccc 1980

tatgtgtcag gcctctgagc ccaagccaag catcgcatcc cctgtgattt gcacgtatac 2040

atccagatgg cctaaagtaa ctgaagatcc acaaaagaag taaaaatagc cttaactgat 2100

gacattccac cattgtgatt tgttcctgcc ccaccctaac tgatcaatgt actttgtaat 2160

ctcccccacc cttaagaagg tactttgtaa tcttccccac ccttaagaag gttctttgta 2220

attctcccca cccttgagaa tgtactttgt gagatccacc ctgcccacaa aacattgctc 2280

ttaacttcac cgcctaaccc aaaacctata agaactaatg ataatccatc acccttcgct 2340

[0012]

gactctcttt tcggactcag cccacctgca cccaggtgaa ataaacagct ttattgctca 2400

cacaaaaaaa aaaaaaaaa 2419

<210> 6
<211> 414
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6

Met Lys Ala Gln Thr Ala Leu Ser Phe Phe Leu Ile Leu Ile Thr Ser
1 5 10 15

Leu Ser Gly Ser Gln Gly Ile Phe Pro Leu Ala Phe Phe Ile Tyr Val
20 25 30

Pro Met Asn Glu Gln Ile Val Ile Gly Arg Leu Asp Glu Asp Ile Ile
35 40 45

Leu Pro Ser Ser Phe Glu Arg Gly Ser Glu Val Val Ile His Trp Lys
50 55 60

Tyr Gln Asp Ser Tyr Lys Val His Ser Tyr Tyr Lys Gly Ser Asp His
65 70 75 80

Leu Glu Ser Gln Asp Pro Arg Tyr Ala Asn Arg Thr Ser Leu Phe Tyr
85 90 95

Asn Glu Ile Gln Asn Gly Asn Ala Ser Leu Phe Phe Arg Arg Val Ser
100 105 110

Leu Leu Asp Glu Gly Ile Tyr Thr Cys Tyr Val Gly Thr Ala Ile Gln
115 120 125

[0013] Val Ile Thr Asn Lys Val Val Leu Lys Val Gly Val Phe Leu Thr Pro
130 135 140

Val Met Lys Tyr Glu Lys Arg Asn Thr Asn Ser Phe Leu Ile Cys Ser
145 150 155 160

Val Leu Ser Val Tyr Pro Arg Pro Ile Ile Thr Trp Lys Met Asp Asn
165 170 175

Thr Pro Ile Ser Glu Asn Asn Met Glu Glu Thr Gly Ser Leu Asp Ser
180 185 190

Phe Ser Ile Asn Ser Pro Leu Asn Ile Thr Gly Ser Asn Ser Ser Tyr
195 200 205

Glu Cys Thr Ile Glu Asn Ser Leu Leu Lys Gln Thr Trp Thr Gly Arg
210 215 220

Trp Thr Met Lys Asp Gly Leu His Lys Met Gln Ser Glu His Val Ser
225 230 235 240

Leu Ser Cys Gln Pro Val Asn Asp Tyr Phe Ser Pro Asn Gln Asp Phe
245 250 255

Lys Val Thr Trp Ser Arg Met Lys Ser Gly Thr Phe Ser Val Leu Ala
260 265 270

Tyr Tyr Leu Ser Ser Ser Gln Asn Thr Ile Ile Asn Glu Ser Arg Phe
275 280 285

Ser Trp Asn Lys Glu Leu Ile Asn Gln Ser Asp Phe Ser Met Asn Leu
290 295 300

[0014] Met Asp Leu Asn Leu Ser Asp Ser Gly Glu Tyr Leu Cys Asn Ile Ser
305 310 315 320

Ser Asp Glu Tyr Thr Leu Leu Thr Ile His Thr Val His Val Glu Pro
325 330 335

Ser Gln Glu Thr Ala Ser His Asn Lys Gly Leu Trp Ile Leu Val Pro
340 345 350

Ser Ala Ile Leu Ala Ala Phe Leu Leu Ile Trp Ser Val Lys Cys Cys
355 360 365

Arg Ala Gln Leu Glu Ala Arg Arg Ser Arg His Pro Ala Asp Gly Ala
370 375 380

Gln Gln Glu Arg Cys Cys Val Pro Pro Gly Glu Arg Cys Pro Ser Ala
385 390 395 400

Pro Asp Asn Gly Glu Glu Asn Val Pro Leu Ser Gly Lys Val
405 410

<210> 7
<211> 2515
<212> DNA
<213> 智人

<400> 7
aaatcaaacg taccttggac tttactctct gagaaactca tagctgaatt caatgtttat 60

tcttatggac tacttagcat ttgactagac ggtatgaatt tctaagtaag cacatataga 120

actggatgcc cttgtggtac atctcaaggc tgatttgaaa gcttgagaga ccatcaagaa 180

ttggatttgg ggaagagcat gtaggagaat actaaccctg cacagattgt gatggtgatg 240

tggaatatac taaagcctag aacgcacctc ctctgcatga ctaatatgtt ctgcacaaga 300

[0015] catgaaggca cagacagcac tgtctttctt cctcattctc ataacatctc tgagtggatc 360

tcaaggcata ttccctttgg ctttcttcat ttatgttcct atgaatgaac aaatcgtcat 420

tggaagactt gatgaagata taattctccc ttcttcattt gagaggggat ccgaagtcgt 480

aatacactgg aagtatcaag atagctataa ggttcacagt tactacaaag gcagtgacca 540

tttggaaagc caagatccca gatatgcaaa caggacatcc cttttctata atgagattca 600

aaatgggaat gcgtcgctat ttttcagaag agtaagcctt ctggacgaag gaatttacac 660

ctgctatgta ggaacagcaa ttcaagtgat tacaaacaaa gtggtgctaa aggtgggagt 720

ttttctcaca cccgtgatga agtatgaaaa gaggaacaca aacagcttct taatatgcag 780

cgtgttaagt gtttatcctc gtccaattat cacgtggaaa atggacaaca cacctatctc 840

tgaaaacaac atggaagaaa cagggtcttt ggattctttt tctattaaca gcccactgaa 900

tattacagga tcaaattcat cttatgaatg tacaattgaa aattcactgc tgaagcaaac 960

atggacaggg cgctggacga tgaaagatgg ccttcataaa atgcaaagtg aacacgtttc 1020

actctcatgt caacctgtaa atgattattt ttcaccaaac caagacttca aagttacttg 1080

gtccagaatg aaaagtggga ctttctctgt cctggcttac tatctgagct cctcacaaaa 1140

tacaattatc aatgaatccc gattctcatg gaacaaagag ctgataaacc agagtgactt 1200

ctctatgaat ttgatggatc ttaatctttc agacagtggg gaatatttat gcaatatttc 1260

ttcggatgaa tatactttac ttaccatcca cacagtgcat gtagaaccga gccaagaaac 1320

agcttcccat aacaaaggct tatggatttt ggtgccctct gcgattttgg cagcttttct 1380

gctgatttgg agcgtaaaat gttgcagaga aagatgttgt gtccctcctg gtgagcgctg 1440

tcccagtgca cccgataatg gcgaagaaaa tgtgcctctt tcaggaaaag tataggaaat 1500

gagagaagac tgtgacaact catgacctgc atccttaata tccagtgact tcatctcccc 1560

tttcttcacc acaattccag gcaatggcct gtcggagcag acaattctac cactgcaaag 1620

[0016]

agttgtaacc attttctggt atcacattta tttttcaaga catacttttc aagacatcat 1680

tcactgaccc actacctgca ttgagtataa atgcctggat gttaaggatt ccaatttaac 1740

tttgaaaaga actgtctcat tcatttacat ttctgttaca gtcagcccag gaggttacag 1800

tgagctctcc actaagaatc tggaagaaat gcatcactag gggttgattc ccaatctgat 1860

caactgataa tgggtgagag agcaggtaag agccaaagtc accttagtgg aaaggttaaa 1920

aaccagagcc tggaaaccaa gatgattgat ttgacaaggt attttagtct agttttatat 1980

gaacggttgt atcagggtaa ccaactcgat ttgggatgaa tcttagggca ccaaagacta 2040

agacagtatc tttaagattg ctagggaaaa gggccctatg tgtcaggcct ctgagcccaa 2100

gccaagcatc gcatcccctg tgatttgcac gtatacatcc agatggccta aagtaactga 2160

agatccacaa aagaagtaaa aatagcctta actgatgaca ttccaccatt gtgatttgtt 2220

cctgccccac cctaactgat caatgtactt tgtaatctcc cccaccctta agaaggtact 2280

ttgtaatctt ccccaccctt aagaaggttc tttgtaattc tccccaccct tgagaatgta 2340

ctttgtgaga tccaccctgc ccacaaaaca ttgctcttaa cttcaccgcc taacccaaaa 2400

cctataagaa ctaatgataa tccatcaccc ttcgctgact ctcttttcgg actcagccca 2460

cctgcaccca ggtgaaataa acagctttat tgctcacaca aaaaaaaaaa aaaaa 2515

<210> 8
<211> 397
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8
Met Lys Ala Gln Thr Ala Leu Ser Phe Phe Leu Ile Leu Ile Thr Ser
1 5 10 15

Leu Ser Gly Ser Gln Gly Ile Phe Pro Leu Ala Phe Phe Ile Tyr Val
20 25 30

[0017]

Pro Met Asn Glu Gln Ile Val Ile Gly Arg Leu Asp Glu Asp Ile Ile
35 40 45

Leu Pro Ser Ser Phe Glu Arg Gly Ser Glu Val Val Ile His Trp Lys
50 55 60

Tyr Gln Asp Ser Tyr Lys Val His Ser Tyr Tyr Lys Gly Ser Asp His
65 70 75 80

Leu Glu Ser Gln Asp Pro Arg Tyr Ala Asn Arg Thr Ser Leu Phe Tyr
85 90 95

Asn Glu Ile Gln Asn Gly Asn Ala Ser Leu Phe Phe Arg Arg Val Ser
100 105 110

Leu Leu Asp Glu Gly Ile Tyr Thr Cys Tyr Val Gly Thr Ala Ile Gln

115 120 125

Val Ile Thr Asn Lys Val Val Leu Lys Val Gly Val Phe Leu Thr Pro
130 135 140

Val Met Lys Tyr Glu Lys Arg Asn Thr Asn Ser Phe Leu Ile Cys Ser
145 150 155 160

Val Leu Ser Val Tyr Pro Arg Pro Ile Ile Thr Trp Lys Met Asp Asn
165 170 175

Thr Pro Ile Ser Glu Asn Asn Met Glu Glu Thr Gly Ser Leu Asp Ser
180 185 190

Phe Ser Ile Asn Ser Pro Leu Asn Ile Thr Gly Ser Asn Ser Ser Tyr
195 200 205

[0018]

Glu Cys Thr Ile Glu Asn Ser Leu Leu Lys Gln Thr Trp Thr Gly Arg
210 215 220

Trp Thr Met Lys Asp Gly Leu His Lys Met Gln Ser Glu His Val Ser
225 230 235 240

Leu Ser Cys Gln Pro Val Asn Asp Tyr Phe Ser Pro Asn Gln Asp Phe
245 250 255

Lys Val Thr Trp Ser Arg Met Lys Ser Gly Thr Phe Ser Val Leu Ala
260 265 270

Tyr Tyr Leu Ser Ser Ser Gln Asn Thr Ile Ile Asn Glu Ser Arg Phe
275 280 285

Ser Trp Asn Lys Glu Leu Ile Asn Gln Ser Asp Phe Ser Met Asn Leu

290 295 300

Met Asp Leu Asn Leu Ser Asp Ser Gly Glu Tyr Leu Cys Asn Ile Ser
305 310 315 320

Ser Asp Glu Tyr Thr Leu Leu Thr Ile His Thr Val His Val Glu Pro
325 330 335

Ser Gln Glu Thr Ala Ser His Asn Lys Gly Leu Trp Ile Leu Val Pro
340 345 350

Ser Ala Ile Leu Ala Ala Phe Leu Leu Ile Trp Ser Val Lys Cys Cys
355 360 365

Arg Glu Arg Cys Cys Val Pro Pro Gly Glu Arg Cys Pro Ser Ala Pro
370 375 380

[0019]

Asp Asn Gly Glu Glu Asn Val Pro Leu Ser Gly Lys Val
385 390 395

<210> 9
<211> 2304
<212> DNA
<213> 智人

<400> 9
aaatcaaacg taccttggac tttactctct gagaaactca tagctgaatt caatgtttat 60

tcttatggac tacttagcat ttgactagac ggtatgaatt tctaagtaag cacatataga 120

actggatgcc cttgtggtac atctcaaggc tgatttgaaa gcttgagaga ccatcaagaa 180

ttggatttgg ggaagagcat gtaggagaat actaaccctg cacagattgt gatggtgatg 240

tggaatatac taaagcctag aacgcacctc ctctgcatga ctaatatgtt ctgcacaaga 300

catgaaggca cagacagcac tgtctttctt cctcattctc ataacatctc tgagtggatc 360

tcaagaagag taagccttct ggacgaagga atttacacct gctatgtagg aacagcaatt 420

caagtgatta caaacaaagt ggtgctaaag gtgggagttt ttctcacacc cgtgatgaag 480

tatgaaaaga ggaacacaaa cagcttctta atatgcagcg tgttaagtgt ttatcctcgt 540

ccaattatca cgtggaaaat ggacaacaca cctatctctg aaaacaacat ggaagaaaca 600

gggtctttgg attctttttc tattaacagc ccactgaata ttacaggatc aaattcatct 660

tatgaatgta caattgaaaa ttcactgctg aagcaaacat ggacagggcg ctggacgatg 720

aaagatggcc ttcataaaat gcaaagtgaa cacgtttcac tctcatgtca acctgtaaat 780

gattattttt caccaaacca agacttcaaa gttacttggt ccagaatgaa aagtgggact 840

ttctctgtcc tggcttacta tctgagctcc tcacaaaata caattatcaa tgaatcccga 900

ttctcatgga acaaagagct gataaaccag agtgacttct ctatgaattt gatggatctt 960

aatctttcag acagtgggga atatttatgc aatatttctt cggatgaata tactttactt 1020

[0020]

accatccaca cagtgcatgt agaaccgagc caagaaacag cttcccataa caaaggctta 1080

tggattttgg tgccctctgc gattttggca gcttttctgc tgatttggag cgtaaaatgt 1140

tgcagagccc agctagaagc caggaggagc agacaccctg ctgatggagc ccaacaagaa 1200

agatgttgtg tccctcctgg tgagcgctgt cccagtgcac ccgataatgg cgaagaaaat 1260

gtgcctcttt caggaaaagt ataggaaatg agagaagact gtgacaactc atgacctgca 1320

tccttaatat ccagtgactt catctcccct ttcttcacca caattccagg caatggcctg 1380

tcggagcaga caattctacc actgcaaaga gttgtaacca ttttctggta tcacatttat 1440

ttttcaagac atacttttca agacatcatt cactgaccca ctacctgcat tgagtataaa 1500

tgcctggatg ttaaggattc caatttaact ttgaaaagaa ctgtctcatt catttacatt 1560

tctgttacag tcagcccagg aggttacagt gagctctcca ctaagaatct ggaagaaatg 1620

catcactagg ggttgattcc caatctgatc aactgataat gggtgagaga gcaggtaaga 1680

gccaaagtca ccttagtgga aaggttaaaa accagagcct ggaaaccaag atgattgatt 1740

tgacaaggta ttttagtcta gttttatatg aacggttgta tcagggtaac caactcgatt 1800

tgggatgaat cttagggcac caaagactaa gacagtatct ttaagattgc tagggaaaag 1860

ggccctatgt gtcaggcctc tgagcccaag ccaagcatcg catcccctgt gatttgcacg 1920

tatacatcca gatggcctaa agtaactgaa gatccacaaa agaagtaaaa atagccttaa 1980

ctgatgacat tccaccattg tgatttgttc ctgccccacc ctaactgatc aatgtacttt 2040

gtaatctccc ccacccttaa gaaggtactt tgtaatcttc cccaccctta agaaggttct 2100

ttgtaattct ccccaccctt gagaatgtac tttgtgagat ccaccctgcc cacaaaacat 2160

tgctcttaac ttcaccgcct aacccaaaac ctataagaac taatgataat ccatcaccct 2220

tcgctgactc tcttttcgga ctcagcccac ctgcacccag gtgaaataaa cagctttatt 2280

gctcacacaa aaaaaaaaaa aaaa 2304

[0021]

<210> 10
<211> 350
<212> PRT
<213> 智人

<400> 10
Met Val Met Trp Asn Ile Leu Lys Pro Arg Thr His Leu Leu Cys Met
1 5 10 15

Thr Asn Met Phe Cys Thr Arg His Glu Gly Thr Asp Ser Thr Val Phe
20 25 30

Leu Pro His Ser His Asn Ile Ser Glu Trp Ile Ser Arg Arg Val Ser
35 40 45

Leu Leu Asp Glu Gly Ile Tyr Thr Cys Tyr Val Gly Thr Ala Ile Gln
50 55 60

Val Ile Thr Asn Lys Val Val Leu Lys Val Gly Val Phe Leu Thr Pro
65 70 75 80

Val Met Lys Tyr Glu Lys Arg Asn Thr Asn Ser Phe Leu Ile Cys Ser
85 90 95

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

Thr Pro Ile Ser Glu Asn Asn Met Glu Glu Thr Gly Ser Leu Asp Ser
115 120 125

Phe Ser Ile Asn Ser Pro Leu Asn Ile Thr Gly Ser Asn Ser Ser Tyr
130 135 140

[0022] Glu Cys Thr Ile Glu Asn Ser Leu Leu Lys Gln Thr Trp Thr Gly Arg
145 150 155 160

Trp Thr Met Lys Asp Gly Leu His Lys Met Gln Ser Glu His Val Ser
165 170 175

Leu Ser Cys Gln Pro Val Asn Asp Tyr Phe Ser Pro Asn Gln Asp Phe
180 185 190

Lys Val Thr Trp Ser Arg Met Lys Ser Gly Thr Phe Ser Val Leu Ala
195 200 205

Tyr Tyr Leu Ser Ser Ser Gln Asn Thr Ile Ile Asn Glu Ser Arg Phe
210 215 220

Ser Trp Asn Lys Glu Leu Ile Asn Gln Ser Asp Phe Ser Met Asn Leu
225 230 235 240

Met Asp Leu Asn Leu Ser Asp Ser Gly Glu Tyr Leu Cys Asn Ile Ser
245 250 255

Ser Asp Glu Tyr Thr Leu Leu Thr Ile His Thr Val His Val Glu Pro
260 265 270

Ser Gln Glu Thr Ala Ser His Asn Lys Gly Leu Trp Ile Leu Val Pro
275 280 285

Ser Ala Ile Leu Ala Ala Phe Leu Leu Ile Trp Ser Val Lys Cys Cys
290 295 300

Arg Ala Gln Leu Glu Ala Arg Arg Ser Arg His Pro Ala Asp Gly Ala
305 310 315 320

[0023] Gln Gln Glu Arg Cys Cys Val Pro Pro Gly Glu Arg Cys Pro Ser Ala
325 330 335

Pro Asp Asn Gly Glu Glu Asn Val Pro Leu Ser Gly Lys Val
340 345 350

<210> 11
<211> 1282
<212> DNA
<213> 智人

<400> 11
ggaagtctgt caactgggag ggggagaggg gggtgatggg ccaggaatgg ggtccccggg 60

catggtgctg ggcctcctgg tgcagatctg ggccctgcaa gaagcctcaa gcctgagcgt 120

gcagcagggg cccaacttgc tgcaggtgag gcagggcagt caggcgaccc tggtctgcca 180

ggtggaccag gccacagcct gggaacggct ccgtgttaag tggacaaagg atggggccat 240

cctgtgtcaa ccgtacatca ccaacggcag cctcagcctg ggggtctgcg ggccccaggg 300

acggctctcc tggcaggcac ccagccatct caccctgcag ctggaccctg tgagcctcaa 360

ccacagcggg gcgtacgtgt gctgggcggc cgtagagatt cctgagttgg aggaggctga 420

gggcaacata acaaggctct ttgtggaccc agatgacccc acacagaaca gaaaccggat 480

cgcaagcttc ccaggattcc tcttcgtgct gctgggggtg ggaagcatgg gtgtggctgc 540

gatcgtgtgg ggtgcctggt tctggggccg ccgcagctgc cagcaaaggg actcaggtaa 600

cagcccagga aatgcattct acagcaacgt cctataccgg ccccgggggg ccccaaagaa 660

gagtgaggac tgctctggag aggggaagga ccagaggggc cagagcattt attcaacctc 720

cttcccgcaa ccggcccccc gccagccgca cctggcgtca agaccctgcc ccagcccgag 780

accctgcccc agccccaggc ccggccaccc cgtctctatg gtcagggtct ctcctagacc 840

aagccccacc cagcagccga ggccaaaagg gttccccaaa gtgggagagg agtgagagat 900

[0024] cccaggagac ctcaacagga ccccacccat aggtacacac aaaaaagggg ggatcgaggc 960

cagacacggt ggctcacgcc tgtaatccca gcagtttggg aagccgaggc gggtggaaca 1020

cttgaggtca ggggtttgag accagcctgg cttgaacctg ggaggcggag gttgcagtga 1080

gccgagattg cgccactgca ctccagcctg ggcgacagag tgagactccg tctcaaaaaa 1140

aacaaaaagc aggaggattg ggagcctgtc agccccatcc tgagaccccg tcctcatttc 1200

tgtaatgatg gatctcgctc ccactttccc ccaagaacct aataaaggct tgtgaagaaa 1260

aagcaaaaaa aaaaaaaaaa aa 1282

<210> 12
<211> 282
<212> PRT
<213> 智人

<400> 12
Met Gly Ser Pro Gly Met Val Leu Gly Leu Leu Val Gln Ile Trp Ala

1 5 10 15

Leu Gln Glu Ala Ser Ser Leu Ser Val Gln Gln Gly Pro Asn Leu Leu
20 25 30

Gln Val Arg Gln Gly Ser Gln Ala Thr Leu Val Cys Gln Val Asp Gln
35 40 45

Ala Thr Ala Trp Glu Arg Leu Arg Val Lys Trp Thr Lys Asp Gly Ala
50 55 60

Ile Leu Cys Gln Pro Tyr Ile Thr Asn Gly Ser Leu Ser Leu Gly Val
65 70 75 80

Cys Gly Pro Gln Gly Arg Leu Ser Trp Gln Ala Pro Ser His Leu Thr
85 90 95

[0025]

Leu Gln Leu Asp Pro Val Ser Leu Asn His Ser Gly Ala Tyr Val Cys
100 105 110

Trp Ala Ala Val Glu Ile Pro Glu Leu Glu Glu Ala Glu Gly Asn Ile
115 120 125

Thr Arg Leu Phe Val Asp Pro Asp Asp Pro Thr Gln Asn Arg Asn Arg
130 135 140

Ile Ala Ser Phe Pro Gly Phe Leu Phe Val Leu Leu Gly Val Gly Ser
145 150 155 160

Met Gly Val Ala Ala Ile Val Trp Gly Ala Trp Phe Trp Gly Arg Arg
165 170 175

Ser Cys Gln Gln Arg Asp Ser Gly Asn Ser Pro Gly Asn Ala Phe Tyr

180 185 190

Ser Asn Val Leu Tyr Arg Pro Arg Gly Ala Pro Lys Lys Ser Glu Asp
195 200 205

Cys Ser Gly Glu Gly Lys Asp Gln Arg Gly Gln Ser Ile Tyr Ser Thr
210 215 220

Ser Phe Pro Gln Pro Ala Pro Arg Gln Pro His Leu Ala Ser Arg Pro
225 230 235 240

Cys Pro Ser Pro Arg Pro Cys Pro Ser Pro Arg Pro Gly His Pro Val
245 250 255

Ser Met Val Arg Val Ser Pro Arg Pro Ser Pro Thr Gln Gln Pro Arg
260 265 270

[0026]

Pro Lys Gly Phe Pro Lys Val Gly Glu Glu
275 280

<210> 13
<211> 1270
<212> DNA
<213> 智人

<400> 13
ggaagtctgt caactgggag ggggagaggg gggtgatggg ccaggaatgg ggtccccggg 60

catggtgctg ggcctcctgg tgcagatctg ggccctgcaa gaagcctcaa gcctgagcgt 120

gcagcagggg cccaacttgc tgcaggtgag gcagggcagt caggcgaccc tggtctgcca 180

ggtggaccag gccacagcct gggaacggct ccgtgttaag tggacaaagg atggggccat 240

cctgtgtcaa ccgtacatca ccaacggcag cctcagcctg ggggtctgcg ggccccaggg 300

acggctctcc tggcaggcac ccagccatct caccctgcag ctggaccctg tgagcctcaa 360

ccacagcggg gcgtacgtgt gctgggcggc cgtagagatt cctgagttgg aggaggctga 420

gggcaacata acaaggctct ttgtggaccc agatgacccc acacagaaca gaaaccggat 480

cgcaagcttc ccaggattcc tcttcgtgct gctgggggtg ggaagcatgg gtgtggctgc 540

gatcgtgtgg ggtgcctggt tctggggccg ccgcagctgc cagcaaaggg actcaggaaa 600

tgcattctac agcaacgtcc tataccggcc ccgggggggcc ccaaagaaga gtgaggactg 660

ctctggagag gggaaggacc agaggggcca gagcatttat tcaacctcct tcccgcaacc 720

ggcccccccgc cagccgcacc tggcgtcaag accctgcccc agcccgagac cctgccccag 780

ccccaggccc ggccaccccg tctctatggt cagggtctct cctagaccaa gccccaccca 840

gcagccgagg ccaaaagggt tccccaaagt gggagaggag tgagagatcc caggagacct 900

caacaggacc ccacccatag gtacacacaa aaaaggggggg atcgaggcca gacacggtgg 960

[0027] ctcacgcctg taatcccagc agtttgggaa gccgaggcgg gtggaacact tgaggtcagg 1020

ggtttgagac cagcctggct tgaacctggg aggcggaggt tgcagtgagc cgagattgcg 1080

ccactgcact ccagcctggg cgacagagtg agactccgtc tcaaaaaaaa caaaaagcag 1140

gaggattggg agcctgtcag ccccatcctg agaccccgtc ctcatttctg taatgatgga 1200

tctcgctccc actttccccc aagaacctaa taaaggcttg tgaagaaaaa gcaaaaaaaa 1260

aaaaaaaaaa 1270

<210> 14
<211> 278
<212> PRT
<213> 智人

<400> 14
Met Gly Ser Pro Gly Met Val Leu Gly Leu Leu Val Gln Ile Trp Ala
1 5 10 15

Leu Gln Glu Ala Ser Ser Leu Ser Val Gln Gln Gly Pro Asn Leu Leu
20 25 30

Gln Val Arg Gln Gly Ser Gln Ala Thr Leu Val Cys Gln Val Asp Gln
35 40 45

Ala Thr Ala Trp Glu Arg Leu Arg Val Lys Trp Thr Lys Asp Gly Ala
50 55 60

Ile Leu Cys Gln Pro Tyr Ile Thr Asn Gly Ser Leu Ser Leu Gly Val
65 70 75 80

Cys Gly Pro Gln Gly Arg Leu Ser Trp Gln Ala Pro Ser His Leu Thr
85 90 95

[0028]

Leu Gln Leu Asp Pro Val Ser Leu Asn His Ser Gly Ala Tyr Val Cys
100 105 110

Trp Ala Ala Val Glu Ile Pro Glu Leu Glu Glu Ala Glu Gly Asn Ile
115 120 125

Thr Arg Leu Phe Val Asp Pro Asp Asp Pro Thr Gln Asn Arg Asn Arg
130 135 140

Ile Ala Ser Phe Pro Gly Phe Leu Phe Val Leu Leu Gly Val Gly Ser
145 150 155 160

Met Gly Val Ala Ala Ile Val Trp Gly Ala Trp Phe Trp Gly Arg Arg
165 170 175

Ser Cys Gln Gln Arg Asp Ser Gly Asn Ala Phe Tyr Ser Asn Val Leu
180 185 190

Tyr Arg Pro Arg Gly Ala Pro Lys Lys Ser Glu Asp Cys Ser Gly Glu
195 200 205

Gly Lys Asp Gln Arg Gly Gln Ser Ile Tyr Ser Thr Ser Phe Pro Gln
210 215 220

Pro Ala Pro Arg Gln Pro His Leu Ala Ser Arg Pro Cys Pro Ser Pro
225 230 235 240

Arg Pro Cys Pro Ser Pro Arg Pro Gly His Pro Val Ser Met Val Arg
245 250 255

Val Ser Pro Arg Pro Ser Pro Thr Gln Gln Pro Arg Pro Lys Gly Phe
260 265 270

Pro Lys Val Gly Glu Glu
[0029] 275

<210> 15
<211> 918
<212> DNA
<213> 智人

<400> 15
ggaagtctgt caactgggag ggggagaggg gggtgatggg ccaggaatgg ggtccccggg 60

catggtgctg ggcctcctgg tgcagatctg ggatgacccc acacagaaca gaaaccggat 120

cgcaagcttc ccaggattcc tcttcgtgct gctgggggtg ggaagcatgg gtgtggctgc 180

gatcgtgtgg ggtgcctggt tctggggccg ccgcagctgc cagcaaaggg actcaggtaa 240

cagcccagga aatgcattct acagcaacgt cctataccgg ccccgggggg ccccaaagaa 300

gagtgaggac tgctctggag aggggaagga ccagaggggc cagagcattt attcaacctc 360

cttcccgcaa ccggcccccc gccagccgca cctggcgtca agaccctgcc ccagcccgag 420

accctgcccc agccccaggc ccggccaccc cgtctctatg gtcagggtct ctcctagacc 480

aagccccacc cagcagccga ggccaaaagg gttccccaaa gtgggagagg agtgagagat 540

cccaggagac ctcaacagga ccccacccat aggtacacac aaaaaagggg ggatcgaggc 600

cagacacggt ggctcacgcc tgtaatccca gcagtttggg aagccgaggc gggtggaaca 660

cttgaggtca ggggtttgag accagcctgg cttgaacctg ggaggcggag gttgcagtga 720

gccgagattg cgccactgca ctccagcctg ggcgacagag tgagactccg tctcaaaaaa 780

aacaaaaagc aggaggattg ggagcctgtc agccccatcc tgagaccccg tcctcatttc 840

tgtaatgatg gatctcgctc ccactttccc ccaagaacct aataaaggct tgtgaagaaa 900

aagcaaaaaa aaaaaaaa 918

<210> 16
<211> 162
[0030] <212> PRT
<213> 智人

<400> 16
Met Gly Ser Pro Gly Met Val Leu Gly Leu Leu Val Gln Ile Trp Asp
1 5 10 15

Asp Pro Thr Gln Asn Arg Asn Arg Ile Ala Ser Phe Pro Gly Phe Leu
20 25 30

Phe Val Leu Leu Gly Val Gly Ser Met Gly Val Ala Ala Ile Val Trp
35 40 45

Gly Ala Trp Phe Trp Gly Arg Arg Ser Cys Gln Gln Arg Asp Ser Gly
50 55 60

Asn Ser Pro Gly Asn Ala Phe Tyr Ser Asn Val Leu Tyr Arg Pro Arg
65 70 75 80

Gly Ala Pro Lys Lys Ser Glu Asp Cys Ser Gly Glu Gly Lys Asp Gln
85 90 95

Arg Gly Gln Ser Ile Tyr Ser Thr Ser Phe Pro Gln Pro Ala Pro Arg
100 105 110

Gln Pro His Leu Ala Ser Arg Pro Cys Pro Ser Pro Arg Pro Cys Pro
115 120 125

Ser Pro Arg Pro Gly His Pro Val Ser Met Val Arg Val Ser Pro Arg
130 135 140

Pro Ser Pro Thr Gln Gln Pro Arg Pro Lys Gly Phe Pro Lys Val Gly
145 150 155 160

Glu Glu

[0031]

<210> 17
<211> 1723
<212> DNA
<213> 智人

<400> 17
tgctgctgaa ctgagctggg gcgcagccgc ctgtctgcac cggcagcacc atgtcgctca 60

tggtcgtcag catggcgtgt gttgggttct tcttgctgga ggggccctgg ccacatgtgg 120

gtggtcagga caagcccttc ctctctgcct ggcccggcac tgtggtgtct gaaggacaac 180

atgtgactct tcagtgtcgc tctcgtcttg ggtttaatga attcagtctg tccaaagaag 240

acgggatgcc tgtccctgag ctctacaaca gaatattccg gaacagcttt ctcatgggcc 300

ctgtgacccc agcacatgca gggacctaca gatgttgcag ttcacaccca cactccccca 360

ctgggtggtc ggcacccagc aaccctgtgg tgatcatggt cacaggagtc cacagaaaac 420

cttccctcct ggcccaccca ggtcccctgg tgaaatcagg agagacggtc atcctgcaat 480

gttggtcaga tgtcaggttt gagcgcttcc ttctgcacag agaggggatc actgaggacc 540

ccttgcgcct cgttggacag ctccacgatg cgggttccca ggtcaactat tccatgggtc 600

ccatgacacc tgcccttgca gggacctaca gatgctttgg ttctgtcact cacttaccct 660

atgagttgtc ggctcccagt gaccctctgg acatcgtggt cgtaggtcta tatgggaaac 720

cttctctctc agcccagccg ggccccacgg ttcaggcagg agagaatgtg accttgtcct 780

gcagctcccg gagcttgttt gacatttacc atctatccag ggaggcggag gccggtgaac 840

ttaggctcac tgcagtgctg agggtcaatg gaacattcca ggccaacttc cctctgggcc 900

ctgtgaccca cggagggaac tacagatgct tcggctcttt ccgtgccctg ccccatgcgt 960

ggtcagaccc gagtgaccca ctgcccgttt ctgtcacagg taactccaga aacctgcacg 1020

ttctgattgg gacctcagtg gtcatcatcc cctttgctat cctcctcttc tttctccttc 1080

[0032]

atcgctggtg tgccaacaaa aagaatgctg ttgtaatgga ccaagagcct gcagggaaca 1140

gaacagtgaa cagggaggac tctgatgaac aagaccctca ggaggtgaca tacgcacagt 1200

tgaatcactg cgttttcaca cagagaaaaa tcactcgccc ttctcagagg cccaagacac 1260

ccccaacaga taccagcgtg taacacggaa cttccaaatg ctgagcgcag atccaaagtt 1320

gtcttctgtc cactagcacc acagtcaggc cttgatggga tcttctaggg agacaatagc 1380

cctgtctcaa aaccgggttg ccagctccca tgtaccagca gctggactct gaaggcgtga 1440

gtctgcatct tagggcatcg ctcttcctca caccacgaat ctgaacatgc ctctctcttg 1500

cttacaaatg tctaaggtcc ccactgcctg ctggagagaa aacacacttg cttagcccac 1560

aattctccat ttcacttgac ccctgcccac ctctccaacc taactggctt acttcctagt 1620

ctacttgagg ctgcgatcac actgaggaac tcacaattcc aaacatataa gaggctccct 1680

cttaacacgg cacttagata cgtgctattc cacctttcct cag 1723

<210> 18
<211> 410
<212> PRT
<213> 智人

<400> 18
Met Ser Leu Met Val Val Ser Met Ala Cys Val Gly Phe Phe Leu Leu
1 5 10 15

Glu Gly Pro Trp Pro His Val Gly Gly Gln Asp Lys Pro Phe Leu Ser
20 25 30

Ala Trp Pro Gly Thr Val Val Ser Glu Gly Gln His Val Thr Leu Gln
35 40 45

Cys Arg Ser Arg Leu Gly Phe Asn Glu Phe Ser Leu Ser Lys Glu Asp
50 55 60

[0033]

Gly Met Pro Val Pro Glu Leu Tyr Asn Arg Ile Phe Arg Asn Ser Phe
65 70 75 80

Leu Met Gly Pro Val Thr Pro Ala His Ala Gly Thr Tyr Arg Cys Cys
85 90 95

Ser Ser His Pro His Ser Pro Thr Gly Trp Ser Ala Pro Ser Asn Pro
100 105 110

Val Val Ile Met Val Thr Gly Val His Arg Lys Pro Ser Leu Leu Ala
115 120 125

His Pro Gly Pro Leu Val Lys Ser Gly Glu Thr Val Ile Leu Gln Cys
130 135 140

Trp Ser Asp Val Arg Phe Glu Arg Phe Leu Leu His Arg Glu Gly Ile
145 150 155 160

Thr Glu Asp Pro Leu Arg Leu Val Gly Gln Leu His Asp Ala Gly Ser
165 170 175

Gln Val Asn Tyr Ser Met Gly Pro Met Thr Pro Ala Leu Ala Gly Thr
180 185 190

Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Val Thr His Leu Pro Tyr Glu Leu Ser Ala
195 200 205

Pro Ser Asp Pro Leu Asp Ile Val Val Val Gly Leu Tyr Gly Lys Pro
210 215 220

[0034] Ser Leu Ser Ala Gln Pro Gly Pro Thr Val Gln Ala Gly Glu Asn Val
225 230 235 240

Thr Leu Ser Cys Ser Ser Arg Ser Leu Phe Asp Ile Tyr His Leu Ser
245 250 255

Arg Glu Ala Glu Ala Gly Glu Leu Arg Leu Thr Ala Val Leu Arg Val
260 265 270

Asn Gly Thr Phe Gln Ala Asn Phe Pro Leu Gly Pro Val Thr His Gly
275 280 285

Gly Asn Tyr Arg Cys Phe Gly Ser Phe Arg Ala Leu Pro His Ala Trp
290 295 300

Ser Asp Pro Ser Asp Pro Leu Pro Val Ser Val Thr Gly Asn Ser Arg
305 310 315 320

Asn Leu His Val Leu Ile Gly Thr Ser Val Val Ile Ile Pro Phe Ala
325 330 335

Ile Leu Leu Phe Phe Leu Leu His Arg Trp Cys Ala Asn Lys Lys Asn
340 345 350

Ala Val Val Met Asp Gln Glu Pro Ala Gly Asn Arg Thr Val Asn Arg
355 360 365

Glu Asp Ser Asp Glu Gln Asp Pro Gln Glu Val Thr Tyr Ala Gln Leu
370 375 380

Asn His Cys Val Phe Thr Gln Arg Lys Ile Thr Arg Pro Ser Gln Arg
385 390 395 400

Pro Lys Thr Pro Pro Thr Asp Thr Ser Val
[0035] 405 410

<210> 19
<211> 134
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 19
Met Leu Leu Gly Leu Lys Trp Ile Phe Phe Val Val Phe Tyr Gln Gly
1 5 10 15

Val His Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Asn Thr Asn Val Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Thr Lys Thr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
65 70 75 80

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

Gln Ser Met Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr
100 105 110

Ala Thr Tyr Phe Cys Val Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Ser Val Thr Val Ser Ser
[0036] 130

<210> 20
<211> 402
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 20
atgctgttgg ggctgaagtg gattttcttt gttgtttttt atcaaggtgt gcattgtgag 60

gtgcaacttg ttgagactgg tggaggattg gtgcagccta aagggtcatt gaaactctca 120

tgtgcagcct ctggattcac cttcaacacc aatgtcatga actgggtccg ccaggctcca 180

ggaaagggtt tggaatgggt tggtcgcata agaactaaaa ctaataatta tgcaacatat 240

tatgccgatt cagtgaaagg caggttcacc atctccagag atgattcaca aagtatgctc 300

tatctgcaaa tgaacaactt gaaaactgag gacacagcca cgtatttctg tgtgggagct 360

atggactact ggggtcaagg aacctcagtc accgtctcct ca 402

<210> 21
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 21
atgctgttgg ggctgaagtg gattttcttt gttgtttttt atcaaggtgt gcattgt 57

<210> 22
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

[0037]
<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 22
Met Leu Leu Gly Leu Lys Trp Ile Phe Phe Val Val Phe Tyr Gln Gly
1 5 10 15

Val His Cys

<210> 23
<211> 75
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 23
gaggtgcaac ttgttgagac tggtggagga ttggtgcagc ctaaagggtc attgaaactc 60

tcatgtgcag cctct 75

<210> 24
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 24
Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

[0038]

<210> 25
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 25
ggattcacct tcaacaccaa t 21

<210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 26
Gly Phe Thr Phe Asn Thr Asn
1 5

<210> 27

<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 27
gtcatgaact gggtccgcca ggctccagga aagggtttgg aatgggttgg tcgcata 57

<210> 28
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 28
Val Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
[0039] 1 5 10 15

Gly Arg Ile

<210> 29
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 29
agaactaaaa ctaataatta tgca 24

<210> 30
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 30
Arg Thr Lys Thr Asn Asn Tyr Ala
1 5

<210> 31
<211> 123
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 31
acatattatg ccgattcagt gaaaggcagg ttcaccatct ccagagatga ttcacaaagt 60

atgctctatc tgcaaatgaa caacttgaaa actgaggaca cagccacgta tttctgtgtg 120

[0040] gga 123

<210> 32
<211> 41
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 32
Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
1 5 10 15

Asp Ser Gln Ser Met Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu
20 25 30

Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Val Gly
35 40

<210> 33
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 33
gctatggact ac 12

<210> 34
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 34
[0041] Ala Met Asp Tyr
1

<210> 35
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 35
tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc tca 33

<210> 36
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 36
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 37
<211> 131
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 37
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
20 25 30

[0042]

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Val Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
35 40 45

Val Asp Asn Ser Gly Ile Asn Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Leu Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Lys Ser
65 70 75 80

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Thr Gly Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gln Gln Ser Tyr Lys Asp Pro Pro Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu

115 120 125

Glu Leu Lys
130

<210> 38
<211> 393
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 38
atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccacaggt 60

gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctggggca gagggccacc 120

gtctcctgca gagccagcga aagtgttgat aattctggca taaattttat acactggtac 180

[0043]

cagcagaaac caggacagtc acccaaactc ctcctctatc gtgcatccaa cctaaaatct 240

gggatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattaat 300

cctgtggaga ctggtgatgt tgcaacctat tactgtcagc aaagttataa ggatcctcct 360

acgttcggta ctgggaccaa gctggagctg aag 393

<210> 39
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 39
atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccacaggt 60

<210> 40
<211> 20

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 40
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> 41
<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
[0044] <223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 41
gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctggggca gagggccacc 60

gtctcctgc 69

<210> 42
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 42
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Val Ser Cys
20

<210> 43
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 43
agagccagcg aaagtgttga taattctggc ataaatttta tacac 45

<210> 44
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 44
[0045] Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Ser Gly Ile Asn Phe Ile His
1 5 10 15

<210> 45
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 45
tggtaccagc agaaaccagg acagtcaccc aaactcctcc tctat 45

<210> 46
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 46
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 47
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 47
cgtgcatcca acctaaaatc t 21

[0046]

<210> 48
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 48
Arg Ala Ser Asn Leu Lys Ser
1 5

<210> 49
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 49
gggatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattaat 60

cctgtggaga ctggtgatgt tgcaacctat tactgt 96

<210> 50
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 50
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Thr Gly Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

[0047]

<210> 51
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 51
cagcaaagtt ataaggatcc tcctacg 27

<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 52
Gln Gln Ser Tyr Lys Asp Pro Pro Thr
1 5

<210> 53
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 53
ttcggtactg ggaccaagct ggagctgaag 30

<210> 54
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 54
[0048] Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
1 5 10

<210> 55
<211> 134
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 55
Met Leu Leu Gly Leu Lys Trp Ile Phe Phe Val Val Phe Tyr Gln Gly
1 5 10 15

Val His Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Asn Thr Asn Val Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Arg Ile Arg Thr Lys Thr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
65 70 75 80

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

Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr
100 105 110

Ala Met Tyr Tyr Cys Val Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

[0049] Ser Val Thr Val Ser Ser
130

<210> 56
<211> 402
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 56
atgctgttgg ggctgaagtg gattttcttt gttgtttttt atcaaggtgt gcattgtgag 60

gtgcagcttg ttgagactgg tggaggattg gtgcagccta aagggtcatt gaaactctca 120

tgtgcagcct ctggattcac cttcaatacc aatgtcatga actgggtccg ccaggctcca 180

ggaaagggtt tggaatgggt tgctcgcata agaactaaaa ctaataatta tgcaacatat 240

tatgccgatt cagtgaaaga caggttcacc atcttcagag atgattcaca aagcattctc 300

tatctgcaaa tgaacaactt gaaaactgag gacacagcca tgtattactg tgtgggagct 360

atggactact ggggtcaagg aacctcagtc accgtctcct ca 402

<210> 57
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 57
atgctgttgg ggctgaagtg gattttcttt gttgtttttt atcaaggtgt gcattgt 57

<210> 58
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

[0050]

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 58
Met Leu Leu Gly Leu Lys Trp Ile Phe Phe Val Val Phe Tyr Gln Gly
1 5 10 15

Val His Cys

<210> 59
<211> 75
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 59

gaggtgcagc ttgttgagac tggtggagga ttggtgcagc ctaaagggtc attgaaactc 60

tcatgtgcag cctct 75

<210> 60
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 60
Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

[0051]

<210> 61
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 61
ggattcacct tcaataccaa t 21

<210> 62
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 62
Gly Phe Thr Phe Asn Thr Asn

1 5

<210> 63
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 63
gtcatgaact gggtccgcca ggctccagga aagggtttgg aatgggttgc tcgcata 57

<210> 64
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

[0052]
<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 64
Val Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10 15

Ala Arg Ile

<210> 65
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 65
agaactaaaa ctaataatta tgca 24

<210> 66
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 66
Arg Thr Lys Thr Asn Asn Tyr Ala
1 5

<210> 67
<211> 123
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

[0053] <400> 67
acatattatg ccgattcagt gaaagacagg ttcaccatct tcagagatga ttcacaaagc 60

attctctatc tgcaaatgaa caacttgaaa actgaggaca cagccatgta ttactgtgtg 120

gga 123

<210> 68
<211> 41
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 68
Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Phe Arg Asp
1 5 10 15

Asp Ser Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu
20 25 30

Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Val Gly
35 40

<210> 69
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 69
gctatggact ac 12

<210> 70
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

[0054]
<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 70
Ala Met Asp Tyr
1

<210> 71
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 71
tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc tca 33

<210> 72
<211> 11

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 72
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 73
<211> 131
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 73
[0055] Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
35 40 45

Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Lys Ser
65 70 75 80

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Thr Gly Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gln Gln Ser Ser Lys Asp Pro Pro Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Leu Lys
130

<210> 74
<211> 393
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 74
atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccacaggt 60

[0056]

gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctagggca gagggccacc 120

atctcctgca gagccagcga gagtgttgat aattatggca ttagttttat gcactggtac 180

cagcagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctatc gtgcatccaa cctaaaatct 240

gggatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattaat 300

cctgtggaga ctggtgatgt tgctacctat tactgtcagc aaagtagtaa ggatcctcct 360

acgttcggta ctgggaccaa gctagagctg aaa 393

<210> 75
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 75

atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccacaggt 60

<210> 76
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 76
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

[0057]

<210> 77
<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 77
gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctagggca gagggccacc 60

atctcctgc 69

<210> 78
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 78
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys
20

<210> 79
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 79
agagccagcg agagtgttga taattatggc attagtttta tgcac 45

[0058]

<210> 80
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 80
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe Met His
1 5 10 15

<210> 81
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 81
tggtaccagc agaaaccagg acagccaccc aaactcctca tctat 45

<210> 82
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 82
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 83
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

[0059] <400> 83
cgtgcatcca acctaaaatc t 21

<210> 84
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 84
Arg Ala Ser Asn Leu Lys Ser
1 5

<210> 85
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 85
gggatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattaat 60

cctgtggaga ctggtgatgt tgctacctat tactgt 96

<210> 86
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 86
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

[0060]
Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Thr Gly Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 87
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 87
cagcaaagta gtaaggatcc tcctacg 27

<210> 88
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 88
Gln Gln Ser Ser Lys Asp Pro Pro Thr
1 5

<210> 89
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 89
ttcggtactg ggaccaagct agagctgaaa 30

<210> 90
<211> 10
<212> PRT
[0061] <213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 90
Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
1 5 10

<210> 91
<211> 135
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 91
Met Glu Arg His Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val His Leu Gln Gln Ser Ala Ala Glu Leu Ala Arg
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Thr Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly His Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Asp Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

[0062]

Tyr Tyr Cys Ala Arg His Pro Trp Asp Ser Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
115 120 125

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 92
<211> 405
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 92
atggaaaggc actggatctt tctcttcctg ttgtcagtaa ctgcaggtgt ccactcccag 60

gtccacctgc agcagtctgc agctgaactg gcaagacctg gggcctcagt gaagatgtcc 120

tgcaaggctt ctggctacac ctttactacc tacacgatgc actgggtaaa acagaggcct 180

ggacagggtc tggaatggat tggacacatt aatcctagca gtggatatac tgattacaat 240

cagaaattca aggacaagac cacattgact gcagacaaat cctccagtac agcctacatg 300

caactgaaca gcctgacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag acacccctgg 360

gactcggact actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctca 405

<210> 93
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 93
atggaaaggc actggatctt tctcttcctg ttgtcagtaa ctgcaggtgt ccactcc 57

[0063]

<210> 94
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 94
Met Glu Arg His Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val His Ser

<210> 95
<211> 75
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 95
caggtccacc tgcagcagtc tgcagctgaa ctggcaagac ctggggcctc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttct 75

<210> 96
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 96
Gln Val His Leu Gln Gln Ser Ala Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

[0064]

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 97
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 97
ggctacacct ttactaccta c 21

<210> 98
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 98
Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
1 5

<210> 99
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 99
acgatgcact gggtaaaaca gaggcctgga cagggtctgg aatggattgg acacatt 57

[0065]

<210> 100
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 100
Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
1 5 10 15

Gly His Ile

<210> 101
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 101
aatcctagca gtggatat 18

<210> 102
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 102
Asn Pro Ser Ser Gly Tyr
1 5

<210> 103
<211> 123
<212> DNA
<213> 人工序列

[0066]

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 103
actgattaca atcagaaatt caaggacaag accacattga ctgcagacaa atcctccagt 60

acagcctaca tgcaactgaa cagcctgaca tctgaggact ctgcggtcta ttactgtgca 120

aga 123

<210> 104
<211> 41
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 104
Thr Asp Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp

1 5 10 15

Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Asn Ser Leu Thr Ser Glu
20 25 30

Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
35 40

<210> 105
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 105
caccctggg actcggacta c 21

[0067]

<210> 106
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 106
His Pro Trp Asp Ser Asp Tyr
1 5

<210> 107
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 107

tggggccaag gcaccactct cacagtctcc tca 33

<210> 108
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 108
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 109
<211> 127
<212> PRT
<213> 人工序列

[0068] <220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 109
Met Ser Val Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn
35 40 45

Ile Asp Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Arg Ser Pro
50 55 60

Gln Leu Leu Val Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Gln Ile Asn
85 90 95

Arg Leu Gln Ser Glu Asp Val Ala Arg Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Tyr
100 105 110

Ile Thr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Ala
115 120 125

<210> 110
<211> 381
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 110
[0069] atgagtgtgc ccactcagct cctggggttg ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt 60

gacatccaga tgactcagtc tccagcttcc ctgtctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 120

atcacatgtc gagcaagtga gaatattgac agttatttag catggtatca gcagaaacag 180

ggaagatctc ctcagctcct ggtctatgct gcaacaaact tagcagatgg tgtgccatca 240

aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttctctcc agatcaaccg cctgcagtct 300

gaagatgttg cgagatatta ctgtcaacat tattatatta ctccattcac gttcggctcg 360

gggacaaaat tggaaatagc a 381

<210> 111
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 111
atgagtgtgc ccactcagct cctggggttg ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt 60

<210> 112
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 112
Met Ser Val Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys
20

[0070] <210> 113
<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 113
gacatccaga tgactcagtc tccagcttcc ctgtctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60

atcacatgt 69

<210> 114
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 114

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

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 115
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 115
cgagcaagtg agaatattga cagttattta gca 33

<210> 116
[0071] <211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 116
Arg Ala Ser Glu Asn Ile Asp Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 117
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 117
tggtatcagc agaaacaggg aagatctcct cagctcctgg tctat 45

<210> 118
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 118
Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Arg Ser Pro Gln Leu Leu Val Tyr
1 5 10 15

<210> 119
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

[0072]

<400> 119
gctgcaacaa acttagcaga t 21

<210> 120
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 120
Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp
1 5

<210> 121
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 121
ggtgtgccat caaggttcag tggcagtgga tcaggcacac agttttctct ccagatcaac 60

cgcctgcagt ctgaagatgt tgcgagatat tactgt 96

<210> 122
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 122
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser
1 5 10 15

[0073]

Leu Gln Ile Asn Arg Leu Gln Ser Glu Asp Val Ala Arg Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 123
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 123
caacattatt atattactcc attcacg 27

<210> 124
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 124
Gln His Tyr Tyr Ile Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 125
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 125
ttcggctcgg ggacaaaatt ggaaatagca 30

<210> 126
<211> 10
[0074] <212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 126
Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Ala
1 5 10

<210> 127
<211> 134
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 127
Met Leu Leu Gly Leu Lys Trp Ile Phe Phe Val Val Phe Tyr Gln Gly
1 5 10 15

Val His Cys Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln
20 25 30

Pro Lys Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
35 40 45

Asn Thr Asn Val Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Thr Lys Thr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr
65 70 75 80

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

[0075]

Gln Ser Met Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr
100 105 110

Ala Thr Tyr Phe Cys Val Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
115 120 125

Ser Val Thr Val Ser Ser
130

<210> 128
<211> 402
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 128
atgctgttgg ggctgaagtg gattttcttt gttgtttttt atcaaggtgt gcattgtgag 60

gtgcaacttg ttgagactgg tggaggattg gtgcagccta aagggtcatt gaaactctca 120

tgtgcagcct ctggattcac cttcaacacc aatgtcatga actgggtccg ccaggctcca 180

ggaaagggtt tggaatgggt tggtcgcata agaactaaaa ctaataatta tgcaacatat 240

tatgccgatt cagtgaaagg caggttcacc atctccagag atgattcaca aagtatgctc 300

tatctgcaaa tgaacaactt gaaaactgag gacacagcca cgtatttctg tgtgggagct 360

atggactact ggggtcaagg aacctcagtc accgtctcct ca 402

<210> 129
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 129
[0076] atgctgttgg ggctgaagtg gattttcttt gttgtttttt atcaaggtgt gcattgt 57

<210> 130
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 130
Met Leu Leu Gly Leu Lys Trp Ile Phe Phe Val Val Phe Tyr Gln Gly
1 5 10 15

Val His Cys

<210> 131
<211> 75
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 131
gaggtgcaac ttgttgagac tggtggagga ttggtgcagc ctaaagggtc attgaaactc 60

tcatgtgcag cctct 75

<210> 132
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 132
Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Lys Gly
1 5 10 15

[0077]

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 133
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 133
ggattcacct tcaacaccaa t 21

<210> 134
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 134
Gly Phe Thr Phe Asn Thr Asn
1 5

<210> 135
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 135
gtcatgaact gggtccgcca ggctccagga aagggtttgg aatgggttgg tcgcata 57

[0078]
<210> 136
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 136
Val Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
1 5 10 15

Gly Arg Ile

<210> 137
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 137
agaactaaaa ctaataatta tgca 24

<210> 138
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 138
Arg Thr Lys Thr Asn Asn Tyr Ala
1 5

[0079]

<210> 139
<211> 123
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 139
acatattatg ccgattcagt gaaaggcagg ttcaccatct ccagagatga ttcacaaagt 60

atgctctatc tgcaaatgaa caacttgaaa actgaggaca cagccacgta tttctgtgtg 120

gga 123

<210> 140
<211> 41
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 140
Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp

1 5 10 15

Asp Ser Gln Ser Met Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu
20 25 30

Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys Val Gly
35 40

<210> 141
<211> 12
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 141
gctatggact ac 12

[0080]

<210> 142
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 142
Ala Met Asp Tyr
1

<210> 143
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 143
tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc tca 33

<210> 144
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 144
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 145
<211> 131
<212> PRT
<213> 人工序列

[0081]
<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 145
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

Gly Ser Thr Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala
20 25 30

Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Val Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser
35 40 45

Val Asp Asn Ser Gly Ile Asn Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Leu Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Lys Ser
65 70 75 80

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
85 90 95

Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Thr Gly Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
100 105 110

Gln Gln Ser Tyr Lys Asp Pro Pro Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu
115 120 125

Glu Leu Lys
130

<210> 146
<211> 393
<212> DNA
<213> 人工序列

[0082]

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 146
atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccacaggt 60

gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctggggca gagggccacc 120

gtctcctgca gagccagcga aagtgttgat aattctggca taaattttat acactggtac 180

cagcagaaac caggacagtc acccaaactc ctcctctatc gtgcatccaa cctaaaatct 240

gggatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattaat 300

cctgtggaga ctggtgatgt tgcaacctat tactgtcagc aaagttataa ggatcctcct 360

acgttcggta ctgggaccaa gctggagctg aag 393

<210> 147
<211> 60

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 147
atggagacag acacactcct gctatgggtg ctgctgctct gggttccagg ttccacaggt 60

<210> 148
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 148
Met Glu Thr Asp Thr Leu Leu Leu Trp Val Leu Leu Leu Trp Val Pro
1 5 10 15

[0083]

Gly Ser Thr Gly
20

<210> 149
<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 149
gacattgtgc tgacccaatc tccagcttct ttggctgtgt ctctggggca gagggccacc 60

gtctcctgc 69

<210> 150
<211> 23
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 150
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Gln Arg Ala Thr Val Ser Cys
20

<210> 151
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

[0084]

<400> 151
agagccagcg aaagtgttga taattctggc ataaatttta tacac 45

<210> 152
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 152
Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Asn Ser Gly Ile Asn Phe Ile His
1 5 10 15

<210> 153
<211> 46
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 153
ctggtaccag cagaaaccag gacagtcacc caaactcctc ctctat 46

<210> 154
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 154
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 155
[0085] <211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 155
cgtgcatcca acctaaaatc t 21

<210> 156
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 156
Arg Ala Ser Asn Leu Lys Ser
1 5

<210> 157
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 157
gggatccctg ccaggttcag tggcagtggg tctaggacag acttcaccct caccattaat 60

cctgtggaga ctggtgatgt tgcaacctat tactgt 96

<210> 158
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
[0086] <223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 158
Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Thr Gly Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 159
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 159
cagcaaagtt ataaggatcc tcctacg 27

<210> 160
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 160
Gln Gln Ser Tyr Lys Asp Pro Pro Thr
1 5

<210> 161
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

[0087] <400> 161
ttcggtactg ggaccaagct ggagctgaag 30

<210> 162
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 162
Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
1 5 10

<210> 163
<211> 135
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 163
Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys
20 25 30

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

Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
50 55 60

Glu Trp Val Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser His Thr Tyr Tyr Pro
65 70 75 80

[0088]

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
85 90 95

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met
100 105 110

Tyr Tyr Cys Thr Arg Leu Gly Arg Ala Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
115 120 125

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 164
<211> 405
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 164
atgaacttcg ggctcagctt gattttcctt gtccttgttt taaaaggtgt ccagtgtgaa 60

gtgatgctgg tggagtcagg gggaggctta gtgaagcctg gaggatccct gaaactctcc 120

tgtgcagtct ctggattaac ttttagtagt tatgccatgt cttgggttcg ccagactccg 180

gagaagaggc tggagtgggt cgcaaccatt agtagtggtg gtagtcacac ctactatcca 240

gacagtgtga aggggcgatt catcatttct agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300

caaatgaaca gtctgaggtc tgaggacacg gccatgtatt actgtacaag actgggacgg 360

gcctttgact actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctca 405

[0089]

<210> 165
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 165
atgaacttcg ggctcagctt gattttcctt gtccttgttt taaaaggtgt ccagtgt 57

<210> 166
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 166
Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
1 5 10 15

Val Gln Cys

<210> 167
<211> 75
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 167
gaagtgatgc tggtggagtc agggggaggc ttagtgaagc ctggaggatc cctgaaactc 60

tcctgtgcag tctct 75

<210> 168
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

[0090]

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 168
Glu Val Met Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Val Ser
20 25

<210> 169
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 169

ggattaactt ttagtagtta t 21

<210> 170
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 170
Gly Leu Thr Phe Ser Ser Tyr
1 5

<210> 171
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

[0091]

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 171
gccatgtctt gggttcgcca gactccggag aagaggctgg agtgggtcgc aaccatt 57

<210> 172
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 172
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
1 5 10 15

Ala Thr Ile

<210> 173
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 173
agtagtggtg gtagtcac 18

<210> 174
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 174
[0092] Ser Ser Gly Gly Ser His
1 5

<210> 175
<211> 123
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 175
acctactatc cagacagtgt gaaggggcga ttcatcattt ctagagacaa tgccaagaac 60

accctgtacc tgcaaatgaa cagtctgagg tctgaggaca cggccatgta ttactgtaca 120

aga 123

<210> 176
<211> 41

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 176
Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp
1 5 10 15

Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu
20 25 30

Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Thr Arg
35 40

[0093]

<210> 177
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 177
ctgggacggg cctttgacta c 21

<210> 178
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 178
Leu Gly Arg Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 179
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 179
tggggccaag gcaccactct cacagtctcc tca 33

<210> 180
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 180
[0094] Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 181
<211> 127
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 181
Met Glu Ser Gln Ile Gln Val Phe Val Phe Val Phe Leu Trp Leu Ser
1 5 10 15

Gly Val Asp Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser
20 25 30

Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp
35 40 45

Val Ser Thr Ala Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
50 55 60

Lys Val Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp
65 70 75 80

Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
85 90 95

Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys Gln Gln Asp Tyr
100 105 110

Ser Thr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

[0095] <210> 182
<211> 381
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 182
atggagtcac agattcaggt ctttgtattc gtgtttctct ggttgtctgg tgttgacgga 60

gacattgtga tgacccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 120

atcacctgca aggccagtca ggatgtgagt actgctgtag cctggtatca acaaaagcca 180

gggcaatctc ctaaagttct gatttactgg gcatccaccc ggcacactgg agtccctgat 240

cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat tttactctca ccatcagcag tgtgcaggct 300

gaagacctgg cactttatta ctgtcagcaa gattatagca ctccgtggac gttcggtgga 360

ggcaccaagc tggaaatcaa a 381

<210> 183
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 183
atggagtcac agattcaggt ctttgtattc gtgtttctct ggttgtctgg tgttgacgga 60

<210> 184
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

[0096] <400> 184
Met Glu Ser Gln Ile Gln Val Phe Val Phe Val Phe Leu Trp Leu Ser
1 5 10 15

Gly Val Asp Gly
20

<210> 185
<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 185
gacattgtga tgacccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60

atcacctgc 69

<210> 186
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 186
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys
20

<210> 187
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

[0097]
<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 187
aaggccagtc aggatgtgag tactgctgta gcc 33

<210> 188
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 188
Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 189
<211> 45

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 189
tggtatcaac aaaagccagg gcaatctcct aaagttctga tttac 45

<210> 190
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 190
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Val Leu Ile Tyr
1 5 10 15

[0098]

<210> 191
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 191
tgggcatcca cccggcacac t 21

<210> 192
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 192

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
1 5

<210> 193
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 193
ggagtccctg atcgcttcac aggcagtgga tctgggacag attttactct caccatcagc 60

agtgtgcagg ctgaagacct ggcactttat tactgt 96

<210> 194
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

[0099]

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 194
Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Leu Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 195
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 195

cagcaagatt atagcactcc gtggacg 27

<210> 196
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 196
Gln Gln Asp Tyr Ser Thr Pro Trp Thr
1 5

<210> 197
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

[0100]
<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 197
ttcggtggag gcaccaagct ggaaatcaaa 30

<210> 198
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 198
Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 199
<211> 140
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 199
Met Gly Trp Thr Trp Ile Phe Ile Leu Ile Leu Ser Val Thr Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser Glu Val His Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys
20 25 30

Pro Gly Val Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Ser Phe
35 40 45

Thr Asp Tyr Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Ser Gly Lys Ser Leu
50 55 60

[0101]
Glu Trp Ile Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Arg Ile Asn Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Ser Val Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met His Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Thr Gly Ala Tyr Thr Ser Gly Tyr Ser Trp Phe Ala
115 120 125

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
130 135 140

<210> 200
<211> 420

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 200
atgggatgga cctggatctt tattttaatc ctgtcagtaa ctacaggtgt ccactctgag 60

gtccacctgc agcagtctgg acctgagctg gagaagcctg gcgtttcagt gaagatatcc 120

tgcaaggctt ctggtttctc attcactgac tacaacatga actgggtgaa acagagcagt 180

ggaaagagcc ttgagtggat tggaaatatt gatccttact atggacgtat taactataac 240

cagaaattca agggcaaggc cacattgagt gtagacaaat cctccagcac agcctacatg 300

cacctcaaga gcctgacatc tgaggactct gcagtctatt actgtgcaac tggggcctac 360

acctcgggct actcctggtt tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctctgca 420

[0102]

<210> 201
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 201
atgggatgga cctggatctt tattttaatc ctgtcagtaa ctacaggtgt ccactct 57

<210> 202
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 202
Met Gly Trp Thr Trp Ile Phe Ile Leu Ile Leu Ser Val Thr Thr Gly

1 5 10 15

Val His Ser

<210> 203
<211> 75
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 203
gaggtccacc tgcagcagtc tggacctgag ctggagaagc ctggcgtttc agtgaagata 60

tcctgcaagg cttct 75

[0103]
<210> 204
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 204
Glu Val His Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Val
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 205
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 205
ggtttctcat tcactgacta c 21

<210> 206
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 206
Gly Phe Ser Phe Thr Asp Tyr
1 5

[0104]

<210> 207
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 207
aacatgaact gggtgaaaca gagcagtgga aagagccttg agtggattgg aaatatt 57

<210> 208
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 208
Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Ser Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
1 5 10 15

Gly Asn Ile

<210> 209
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 209
gatccttact atggacgt 18

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

[0105] <220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 210
Asp Pro Tyr Tyr Gly Arg
1 5

<210> 211
<211> 123
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 211
attaactata accagaaatt caagggcaag gccacattga gtgtagacaa atcctccagc 60

acagcctaca tgcacctcaa gagcctgaca tctgaggact ctgcagtcta ttactgtgca 120

act 123

<210> 212
<211> 41
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 212
Ile Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Ser Val Asp
1 5 10 15

Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met His Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu
20 25 30

Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Thr
35 40

[0106] <210> 213
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 213
ggggcctaca cctcgggcta ctcctggttt gcttac 36

<210> 214
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 214
Gly Ala Tyr Thr Ser Gly Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 215
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 215
tggggccaag ggactctggt cactgtctct gca 33

<210> 216
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
[0107] <223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 216
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
1 5 10

<210> 217
<211> 130
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 217
Met Gly Leu Gln Val Gln Val Ile Ser Phe Leu Leu Ile Ser Val Thr
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ile
20 25 30

Met Ala Ala Ser Leu Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser
35 40 45

Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His Trp Tyr Gln Gln Arg Ser Gly
50 55 60

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

Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu
85 90 95

Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Asp Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
100 105 110

[0108]

Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu
115 120 125

Ile Lys
130

<210> 218
<211> 390
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 218
atgggtttac aggtgcaggt tatcagcttc ctgttaatca gtgtcacagt cataatgtcc 60

agaggagaaa atgtgctcac ccagtctcca ggaataatgg ctgcctctct gggggagaag 120

gtcaccatga cctgcagtgc cagctcaagt gtaagttcca gttacttgca ctggtaccag 180

cagaggtcag gcgcttcccc caaacccttg attcatagga catccaacct ggcttctggt 240

gtcccagctc gcttcagtgg cagtgggtct gggacctctt actctctcac aatcagcagc 300

gtggaggctg aagatgatgc aacttattac tgccagcagt ggagtggtta cccattcacg 360

ttcggctcgg ggacaaagtt ggaaataaaa 390

<210> 219
<211> 66
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 219
atgggtttac aggtgcaggt tatcagcttc ctgttaatca gtgtcacagt cataatgtcc 60

agagga 66

[0109]

<210> 220
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 220
Met Gly Leu Gln Val Gln Val Ile Ser Phe Leu Leu Ile Ser Val Thr
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly
20

<210> 221
<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 221
gaaaatgtgc tcacccagtc tccaggaata atggctgcct ctctggggga gaaggtcacc 60

atgacctgc 69

<210> 222
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 222
Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Ile Met Ala Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

[0110]

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
20

<210> 223
<211> 36
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 223
agtgccagct caagtgtaag ttccagttac ttgcac 36

<210> 224
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 224
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr Leu His
1 5 10

<210> 225
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 225
tggtaccagc agaggtcagg cgcttccccc aaacccttga ttcat 45

[0111]
<210> 226
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 226
Trp Tyr Gln Gln Arg Ser Gly Ala Ser Pro Lys Pro Leu Ile His
1 5 10 15

<210> 227
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 227
aggacatcca acctggcttc t 21

<210> 228
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 228
Arg Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 229
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

[0112]

<400> 229
ggtgtcccag ctcgcttcag tggcagtggg tctgggacct cttactctct cacaatcagc 60

agcgtggagg ctgaagatga tgcaacttat tactgc 96

<210> 230
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 230
Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu Asp Asp Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 231
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 231
cagcagtgga gtggttaccc attcacg 27

<210> 232
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 232
[0113] Gln Gln Trp Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 233
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 233
ttcggctcgg ggacaaagtt ggaaataaaa 30

<210> 234
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 234
Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 235
<211> 138
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 235
Met Asp Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

[0114]
Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg
20 25 30

Pro Gly Val Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

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

Glu Trp Ile Gly Ser Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Thr Asn Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Ile
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Asn Tyr Asp Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp
115 120 125

Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 236
<211> 414
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 236
atggattgga gctgtatcat cttctttctg gtagcaacag ctacaggtgt gcactcccag 60

gtccagctgc agcagtctgg ggctgaactg gtgaggcctg gggtctcagt gaagatttcc 120

[0115] tgcaagggtt ctggctacac attcactgat tatgctatgc actgggtgaa gcagagtcat 180

gcaaagagtc tagagtggat tggaagtatt agtacttact atggtgatac taattacaac 240

cagaaattca agggcaaggc cacaatgact gtagacaaat cctccagcac agcctatatg 300

gaacttgcca gactgacatc tgaggattct gccatctatt actgtgcaag aggtaattac 360

gacgactggt acttcaatgt ctggggcgca gggaccacgg tcaccgtctc ctca 414

<210> 237
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 237
atggattgga gctgtatcat cttctttctg gtagcaacag ctacaggtgt gcactcc 57

<210> 238
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 238
Met Asp Trp Ser Cys Ile Ile Phe Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
1 5 10 15

Val His Ser

[0116]

<210> 239
<211> 75
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 239
caggtccagc tgcagcagtc tggggctgaa ctggtgaggc ctggggtctc agtgaagatt 60

tcctgcaagg gttct 75

<210> 240
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 240
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Val
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser
20 25

<210> 241
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 241
ggctacacat tcactgatta t 21

<210> 242
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

[0117]
<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 242
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
1 5

<210> 243
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 243
gctatgcact gggtgaagca gagtcatgca aagagtctag agtggattgg aagtatt 57

<210> 244
<211> 19
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 244
Ala Met His Trp Val Lys Gln Ser His Ala Lys Ser Leu Glu Trp Ile
1 5 10 15

Gly Ser Ile

<210> 245
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

[0118]

<400> 245
agtacttact atggtgat 18

<210> 246
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 246
Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp
1 5

<210> 247
<211> 123
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 247
actaattaca accagaaatt caagggcaag gccacaatga ctgtagacaa atcctccagc 60

acagcctata tggaacttgc cagactgaca tctgaggatt ctgccatcta ttactgtgca 120

aga 123

<210> 248
<211> 41
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 248
[0119]
Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Met Thr Val Asp
1 5 10 15

Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ala Arg Leu Thr Ser Glu
20 25 30

Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Arg
35 40

<210> 249
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 249
ggtaattacg acgactggta cttcaatgtc 30

<210> 250
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 250
Gly Asn Tyr Asp Asp Trp Tyr Phe Asn Val
1 5 10

<210> 251
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

[0120] <400> 251
tggggcgcag ggaccacggt caccgtctcc tca 33

<210> 252
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 252
Trp Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 253
<211> 128
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 253
Met Arg Ile Pro Ala His Val Phe Gly Phe Leu Leu Leu Trp Phe Pro
1 5 10 15

Gly Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Leu Gly Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp
35 40 45

Ile Ser Gly Tyr Leu Ser Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile
50 55 60

Lys Arg Leu Ile Tyr Ser Thr Ser Thr Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys
65 70 75 80

[0121]

Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Ser Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser
85 90 95

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

Ser Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Ala Lys Leu Glu Ile Lys Arg
115 120 125

<210> 254
<211> 381
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 254

atgaggattc ctgctcacgt ttttggcttc ttgttgctct ggtttccagg tgccagatgt 60

gacatccaaa tgacccagtc tccatcttcc ttatctgcct ctctgggaga aagagtcagt 120

ctcacttgtc gggcaagtca ggatattagt ggttacttaa gctggcttca gcagaaacca 180

gatggaacta ttaaacgtct gatttatagc acatccactt tagattctgg tgtcccaaaa 240

aggttcagtg gcagtaggtc tgggtcagat tattctctca ccatcagcag cctagagtct 300

gaagattttg cagactatta ctgtctacaa tatgctagtt ctccgtacac gttcggaggg 360

ggggccaagc tggaaataaa a 381

<210> 255
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

[0122]
<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 255
atgaggattc ctgctcacgt ttttggcttc ttgttgctct ggtttccagg tgccagatgt 60

<210> 256
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 256
Met Arg Ile Pro Ala His Val Phe Gly Phe Leu Leu Leu Trp Phe Pro
1 5 10 15

Gly Ala Arg Cys
20

<210> 257
<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 257
gacatccaaa tgacccagtc tccatcttcc ttatctgcct ctctgggaga aagagtcagt 60

ctcacttgt 69

<210> 258
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

[0123]

<400> 258
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys
20

<210> 259
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 259
cgggcaagtc aggatattag tggttactta agc 33

<210> 260

<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 260
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Gly Tyr Leu Ser
1 5 10

<210> 261
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 261
[0124] tggcttcagc agaaaccaga tggaactatt aaacgtctga tttat 45

<210> 262
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 262
Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 263
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 263
agcacatcca ctttagattc t 21

<210> 264
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 264
Ser Thr Ser Thr Leu Asp Ser
1 5

<210> 265
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列

[0125]

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 265
ggtgtcccaa aaaggttcag tggcagtagg tctgggtcag attattctct caccatcagc 60

agcctagagt ctgaagattt tgcagactat tactgt 96

<210> 266
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 266
Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly Ser Arg Ser Gly Ser Asp Tyr Ser
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 267
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 267
ctacaatatg ctagttctcc gtacacg 27

<210> 268
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

[0126] <220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 268
Leu Gln Tyr Ala Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 269
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 269
ttcggagggg gggccaagct ggaaataaaa 30

<210> 270
<211> 10

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 270
Phe Gly Gly Gly Ala Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 271
<211> 136
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 271
[0127] Met Lys Cys Ser Trp Ile Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
1 5 10 15

Val Asn Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Gln
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Asn Ile
35 40 45

Lys Asp Thr Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Asp Pro Ala Asn Gly Lys Thr Ile Phe Asp
65 70 75 80

Pro Lys Phe Gln Val Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn
85 90 95

Thr Val Tyr Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Ile
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Trp Leu Leu Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
115 120 125

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
130 135

<210> 272
<211> 408
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 272
[0128] atgaaatgca gctggattat cttcttcctg atggctgtgg ttacaggggt caattcagag 60

gttcagctgc agcagtctgg ggcagaactt gtgcagccag gggcctcagt caagttgtcc 120

tgtacagctt ctggcttcaa tattaaagac acctatatgc actgggtaaa acagaggcct 180

gaacagggcc tggagtggat tggaaggatt gatcctgcga atggtaaaac tatttttgac 240

ccgaagttcc aggtcaaggc cactataact gccgacacat cctccaacac agtctacctg 300

catctcagca gcctgacatc tgaggacact gccatctatt actgtgcttg gttacttcct 360

tactactttg actactgggg ccaaggcacc actctcacag tctcctca 408

<210> 273
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 273
atgaaatgca gctggattat cttcttcctg atggctgtgg ttacaggggt caattca 57

<210> 274
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 274
Met Lys Cys Ser Trp Ile Ile Phe Phe Leu Met Ala Val Val Thr Gly
1 5 10 15

Val Asn Ser

[0129]

<210> 275
<211> 75
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 275
gaggttcagc tgcagcagtc tggggcagaa cttgtgcagc caggggcctc agtcaagttg 60

tcctgtacag cttct 75

<210> 276
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 276

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

Ser Val Lys Leu Ser Cys Thr Ala Ser
20 25

<210> 277
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 277
ggcttcaata ttaaagacac c 21

<210> 278
[0130] <211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 278
Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr
1 5

<210> 279
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 279
tatatgcact gggtaaaaca gaggcctgaa cagggcctgg agtggattgg aaggatt 57

<210> 280
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 280
Tyr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
1 5 10 15

Gly Arg Ile

<210> 281
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

[0131]

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 281
gatcctgcga atggtaaa 18

<210> 282
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 282
Asp Pro Ala Asn Gly Lys
1 5

<210> 283

<211> 123
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 283
actatttttg acccgaagtt ccaggtcaag gccactataa ctgccgacac atcctccaac 60

acagtctacc tgcatctcag cagcctgaca tctgaggaca ctgccatcta ttactgtgct 120

tgg 123

<210> 284
<211> 41
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
[0132] <223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 284
Thr Ile Phe Asp Pro Lys Phe Gln Val Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp
1 5 10 15

Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr Leu His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu
20 25 30

Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala Trp
35 40

<210> 285
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 285
ttacttcctt actactttga ctac 24

<210> 286
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 286
Leu Leu Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5

<210> 287
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

[0133]

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 287
tggggccaag gcaccactct cacagtctcc tca 33

<210> 288
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 288
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 289
<211> 130

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 289
Met Asp Phe His Val Gln Ile Phe Ser Phe Met Leu Ile Ser Val Thr
1 5 10 15

Val Met Leu Ser Ser Gly Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Val
20 25 30

Met Ala Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys Ser Val Ser
35 40 45

Ser Ser Ile Ser Ser Ser Asn Leu His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly
50 55 60

[0134]

Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly
65 70 75 80

Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu
85 90 95

Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln
100 105 110

Lys Trp Ser His Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu
115 120 125

Leu Lys
130

<210> 290

<211> 390
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 290
atggattttc atgtgcagat tttcagcttc atgctaatca gtgtcacagt catgttgtcc 60

agtggggaaa ttgtactcac ccagtctcca gcagtcatgg ctgcatctcc aggggagaag 120

gtcaccatca cctgcagcgt cagttcaagt ataagttcca gcaacttgca ctggtaccag 180

cagaagtcag gaacctcgcc caaactctgg atttatggca catccaacct ggcttctgga 240

gtccctgttc gcttcagtgg cagtggatct gggacctctt attctctcac aatcagcagc 300

atggaggctg aagatgctgc cacttattac tgtcaaaagt ggagtcatta cccgctcacg 360

ttcggtgctg ggaccaagct ggagctgaaa 390

[0135]

<210> 291
<211> 66
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 291
atggattttc atgtgcagat tttcagcttc atgctaatca gtgtcacagt catgttgtcc 60

agtggg 66

<210> 292
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 292
Met Asp Phe His Val Gln Ile Phe Ser Phe Met Leu Ile Ser Val Thr
1 5 10 15

Val Met Leu Ser Ser Gly
20

<210> 293
<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 293
gaaattgtac tcacccagtc tccagcagtc atggctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60

atcacctgc 69

[0136]

<210> 294
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 294
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Val Met Ala Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 295
<211> 36
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 295
agcgtcagtt caagtataag ttccagcaac ttgcac 36

<210> 296
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 296
Ser Val Ser Ser Ser Ile Ser Ser Ser Asn Leu His
1 5 10

[0137]

<210> 297
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 297
tggtaccagc agaagtcagg aacctcgccc aaactctgga tttat 45

<210> 298
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 298
Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 299
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 299
ggcacatcca acctggcttc t 21

<210> 300
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

[0138]

<400> 300
Gly Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 301
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 301
ggagtccctg ttcgcttcag tggcagtgga tctgggacct cttattctct cacaatcagc 60

agcatggagg ctgaagatgc tgccacttat tactgt 96

<210> 302
<211> 32

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 302
Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 303
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

[0139]

<400> 303
caaaagtgga gtcattaccc gctcacg 27

<210> 304
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 304
Gln Lys Trp Ser His Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 305
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 305
ttcggtgctg ggaccaagct ggagctgaaa 30

<210> 306
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 306
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
1 5 10

<210> 307
[0140] <211> 135
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 307
Met Glu Arg His Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Ala Ala Glu Leu Ala Arg
20 25 30

Pro Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
35 40 45

Thr Thr Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
50 55 60

Glu Trp Ile Gly His Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Glu Tyr Asn
65 70 75 80

Gln Lys Phe Lys Asp Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
85 90 95

Thr Ala His Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Tyr Cys Ala Arg His Pro Trp Asp Ser Asn Tyr Trp Gly Gln Gly
115 120 125

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
130 135

[0141]

<210> 308
<211> 405
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 308
atggaaaggc actggatctt tctcttcctg ttgtcagtaa ctgcaggtgt ccactcccag 60

gtccagctgc agcagtctgc agctgaactg gcaagacctg gggcctcagt gaagatgtcc 120

tgcaaggctt ctggctacac ctttactacc tacacgatgc actgggtaaa acagaggcct 180

ggacagggtc tggagtggat tggacacatt aatcctagca gtggatatac tgagtacaat 240

cagaaattca aggacaagac cacactgact gcagacaaat cctccagcac agcccacatg 300

caactgagca gcctaacatc tgaggactct gcggtctatt actgtgcaag acacccctgg 360

gactcgaact actggggcca aggcaccact ctcacagtct cctca 405

<210> 309
<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 309
atggaaaggc actggatctt tctcttcctg ttgtcagtaa ctgcaggtgt ccactcc 57

<210> 310
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

[0142] <400> 310
Met Glu Arg His Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Ala Gly
1 5 10 15

Val His Ser

<210> 311
<211> 75
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 311
caggtccagc tgcagcagtc tgcagctgaa ctggcaagac ctggggcctc agtgaagatg 60

tcctgcaagg cttct 75

<210> 312
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 312
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Ala Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 313
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

[0143]

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 313
ggctacacct ttactaccta c 21

<210> 314
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 314
Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
1 5

<210> 315

<211> 57
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 315
acgatgcact gggtaaaaca gaggcctgga cagggtctgg agtggattgg acacatt 57

<210> 316
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 316
Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
1 5 10 15

[0144]

Gly His Ile

<210> 317
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 317
aatcctagca gtggatat 18

<210> 318
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 318
Asn Pro Ser Ser Gly Tyr
1 5

<210> 319
<211> 123
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 319
actgagtaca atcagaaatt caaggacaag accacactga ctgcagacaa atcctccagc 60

acagcccaca tgcaactgag cagcctaaca tctgaggact ctgcggtcta ttactgtgca 120

[0145] aga 123

<210> 320
<211> 41
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 320
Thr Glu Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Asp Lys Thr Thr Leu Thr Ala Asp
1 5 10 15

Lys Ser Ser Ser Thr Ala His Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu
20 25 30

Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
35 40

<210> 321
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 321
caccctggg actcgaacta c 21

<210> 322
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

[0146] <400> 322
His Pro Trp Asp Ser Asn Tyr
1 5

<210> 323
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 323
tggggccaag gcaccactct cacagtctcc tca 33

<210> 324
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 324
Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 325
<211> 127
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 325
Met Ser Val Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

[0147] Asp Ala Arg Cys Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser
20 25 30

Ala Ser Val Gly Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn
35 40 45

Ile Asp Ser Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Arg Ser Pro
50 55 60

Gln Leu Leu Val Tyr Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser
65 70 75 80

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Asn
85 90 95

Ser Leu Gln Ser Glu Asp Val Ala Arg Tyr Tyr Cys Gln His Tyr Tyr
100 105 110

Ile Thr Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
115 120 125

<210> 326
<211> 381
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多核苷酸

<400> 326
atgagtgtgc ccactcagct cctggggttg ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt 60

gacatccaga tgactcagtc tccagcttcc ctgtctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 120

atcacatgtc gagcaagtga gaatattgac agttatttag catggtatca gcagaaacag 180

ggaagatctc ctcagctcct ggtctatgct gcaacaaact tagcagatgg tgtgccatca 240

[0148] aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag tattctctca agatcaacag cctgcagtct 300

gaagatgttg cgagatatta ctgtcaacat tattatatta ctccattcac gttcggctcg 360

gggacaaagt tggaaataaa a 381

<210> 327
<211> 60
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 327
atgagtgtgc ccactcagct cctggggttg ctgctgctgt ggcttacaga tgccagatgt 60

<210> 328
<211> 20
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 328
Met Ser Val Pro Thr Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp Leu Thr
1 5 10 15

Asp Ala Arg Cys
20

<210> 329
<211> 69
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

[0149]

<400> 329
gacatccaga tgactcagtc tccagcttcc ctgtctgcat ctgtgggaga aactgtcacc 60

atcacatgt 69

<210> 330
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 330
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 331
<211> 33
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 331
cgagcaagtg agaatattga cagttattta gca 33

<210> 332
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 332
[0150] Arg Ala Ser Glu Asn Ile Asp Ser Tyr Leu Ala
1 5 10

<210> 333
<211> 45
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 333
tggtatcagc agaaacaggg aagatctcct cagctcctgg tctat 45

<210> 334
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 334
Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Arg Ser Pro Gln Leu Leu Val Tyr
1 5 10 15

<210> 335
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 335
gctgcaacaa acttagcaga t 21

[0151]

<210> 336
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 336
Ala Ala Thr Asn Leu Ala Asp
1 5

<210> 337
<211> 96
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 337
ggtgtgccat caaggttcag tggcagtgga tcaggcacac agtattctct caagatcaac 60

agcctgcagt ctgaagatgt tgcgagatat tactgt 96

<210> 338
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成多肽

<400> 338
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser
1 5 10 15

Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Ser Glu Asp Val Ala Arg Tyr Tyr Cys
20 25 30

[0152]

<210> 339
<211> 27
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 339
caacattatt atattactcc attcacg 27

<210> 340
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 340
Gln His Tyr Tyr Ile Thr Pro Phe Thr
1 5

<210> 341
<211> 30
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成寡核苷酸

<400> 341
ttcggctcgg ggacaaagtt ggaaataaaa 30

<210> 342
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 342
[0153] Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 343
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 343
Val Thr Tyr Ala Gln Leu
1 5

<210> 344
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 344
Gly Phe Thr Phe Asn Thr Asn Val
1 5

<210> 345
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 345
Ile Arg Thr Lys Thr Asn Asn Tyr Ala Thr
1 5 10

[0154]
<210> 346
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽
<400> 346
Val Gly Ala Met Asp Tyr
1 5

<210> 347
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 347
Glu Ser Val Asp Asn Ser Gly Ile Asn Phe
1 5 10

<210> 348
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 348
Glu Ser Val Asp Asn Tyr Gly Ile Ser Phe
1 5 10

<210> 349
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

[0155] <400> 349
Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr Thr
1 5

<210> 350
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 350
Ile Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr
1 5

<210> 351
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 351
Ala Arg His Pro Trp Asp Ser Asp Tyr
1 5

<210> 352
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 352
Glu Asn Ile Asp Ser Tyr
1 5

[0156] <210> 353
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 353
Gly Leu Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 354
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 354

Ile Ser Ser Gly Gly Ser His Thr
1 5

<210> 355
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 355
Thr Arg Leu Gly Arg Ala Phe Asp Tyr
1 5

<210> 356
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

[0157]

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 356
Gln Asp Val Ser Thr Ala
1 5

<210> 357
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 357
Gly Phe Ser Phe Thr Asp Tyr Asn
1 5

<210> 358

<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 358
Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Arg Ile
1 5

<210> 359
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 359
[0158] Ala Thr Gly Ala Tyr Thr Ser Gly Tyr Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5 10

<210> 360
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 360
Ser Ser Val Ser Ser Ser Tyr
1 5

<210> 361
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 361
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ala
1 5

<210> 362
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 362
Ile Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Thr
1 5

[0159]

<210> 363
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 363
Ala Arg Gly Asn Tyr Asp Asp Trp Tyr Phe Asn Val
1 5 10

<210> 364
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 364
Gln Asp Ile Ser Gly Tyr
1 5

<210> 365
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 365
Gly Phe Asn Ile Lys Asp Thr Tyr
1 5

<210> 366
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

[0160]
<400> 366
Ile Asp Pro Ala Asn Gly Lys Thr
1 5

<210> 367
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 367
Ala Trp Leu Leu Pro Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 368
<211> 7
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 368
Ser Ser Ile Ser Ser Ser Asn
1 5

<210> 369
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成肽

<400> 369
Ala Arg His Pro Trp Asp Ser Asn Tyr
1 5

[0161]

<210> 370
<211> 16
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成引物

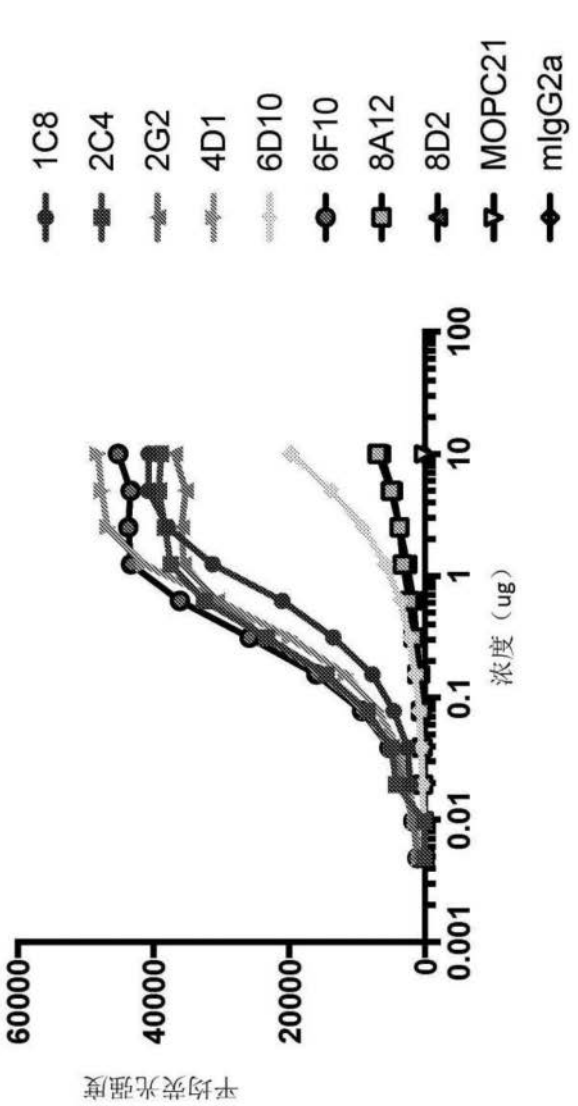
<400> 370
tgttctgcac aagaca 16

<210> 371
<211> 21
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 人工序列的描述：合成引物

<400> 371

[0162] gtaaggatgc aggtcatgag t 21



	1C8	2C4	2G2	4D1	6D10	6F10	8A12	8D2
EC-50	0.63	0.24	0.21	0.44	22.49	0.25		
功能	无阻断剂	加强	弱阻断剂	阻断剂	无阻断剂	阻断剂	IHC WB	IHC WB

图1A

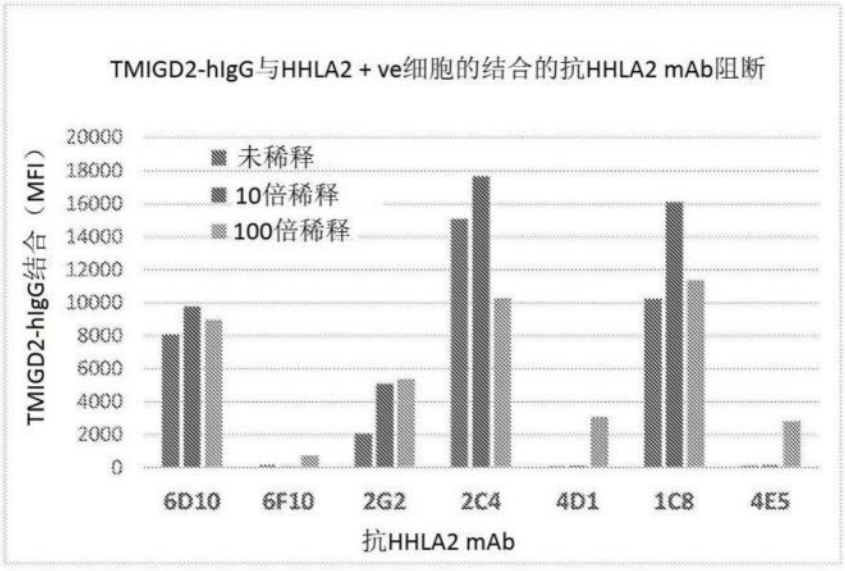

TMIGD2-hIgG与HHLA2 + ve细胞的结合的抗HHLA2 mAb阻断
TMIGD2-hIgG结合（MFI）
20000
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
未稀释
10倍稀释
100倍稀释
6D10
6F10
2G2
2C4
4D1
1C8
4E5
抗HHLA2 mAb

图1B

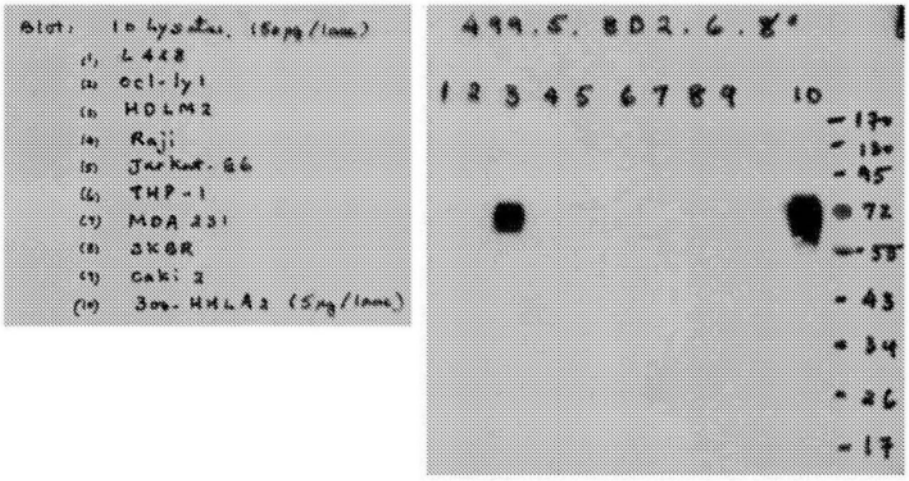

499.5. BD2.6.8
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10
- 95
- 72
- 43
- 34
- 26
- 17

图2

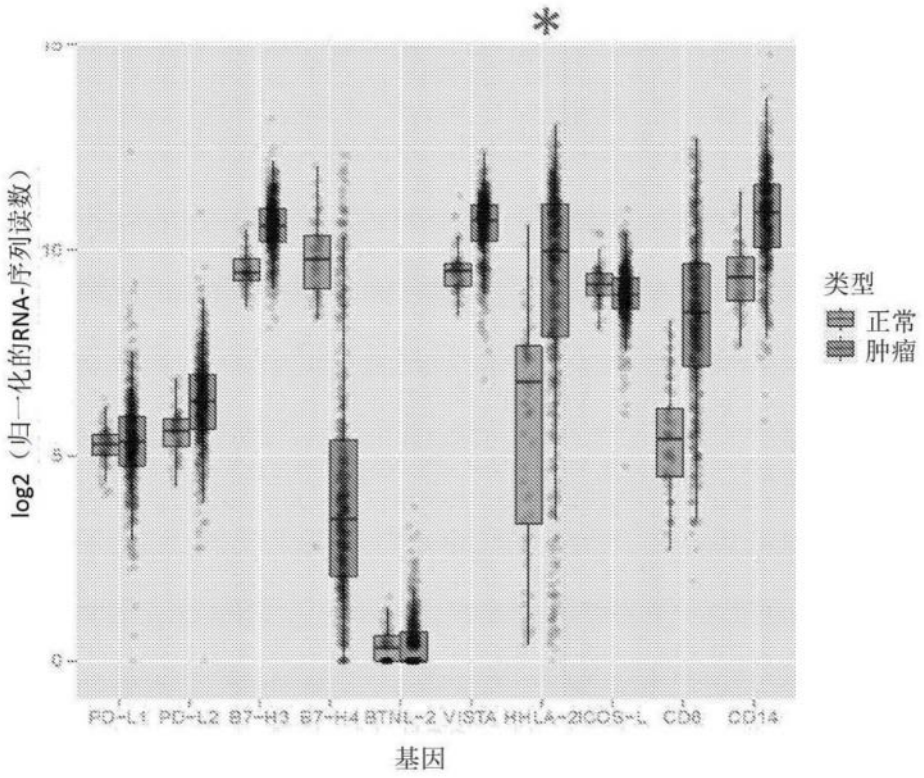

*
log2（归一化的RNA-序列读数）
15
10
5
0
PD-L1
PD-L2
B7-H3
B7-H4
BTNL-2
VISTA
HHLA-2
ICOS-L
CD8
CD14
基因
类型
正常
肿瘤

图3

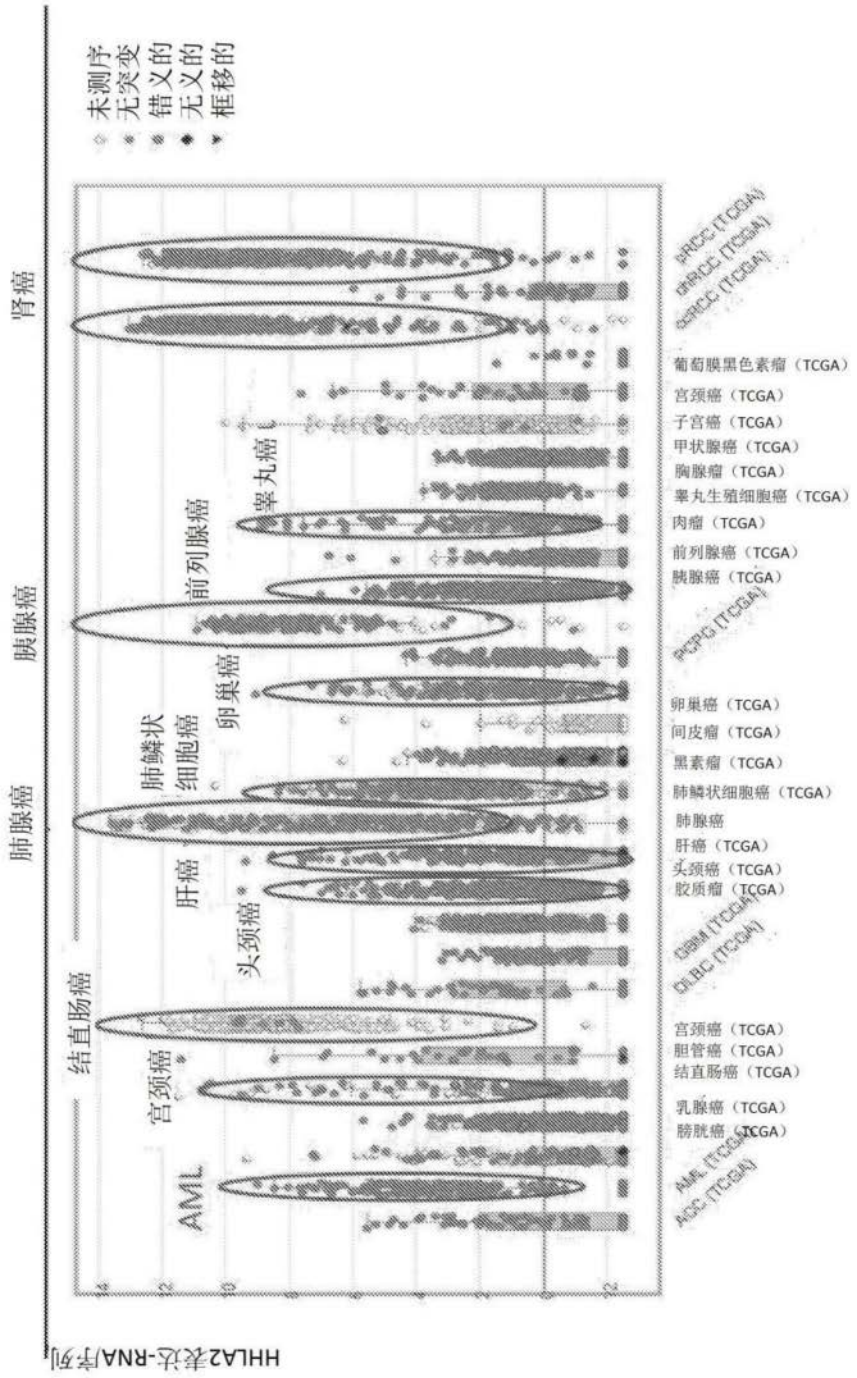

未测序
无突变
错义的
无义的
框移的
肾癌
胰腺癌
肺腺癌
结直肠癌
宫颈癌
AML
肝癌
头颈癌*
肺鳞状细胞癌
卵巢癌
前列腺癌
睾丸癌
pRCC (TCGA)
mRCC (TCGA)
cRCC (TCGA)
葡萄膜黑色素瘤（TCGA）
宫颈癌（TCGA）
子宫癌（TCGA）
甲状腺癌（TCGA）
胸腺瘤（TCGA）
睾丸生殖细胞癌（TCGA）
肉瘤（TCGA）
前列腺癌（TCGA）
胰腺癌（TCGA）
PCPG (TCGA)
卵巢癌（TCGA）
间皮瘤（TCGA）
黑素瘤（TCGA）
肺鳞状细胞癌（TCGA）
肺腺癌
肝癌（TCGA）
头颈癌（TCGA）
胶质瘤（TCGA）
GBM (TCGA)
DLBC (TCGA)
宫颈癌（TCGA）
胆管癌（TCGA）
结直肠癌（TCGA）
乳腺癌（TCGA）
膀胱癌（TCGA）
AML (TCGA)
ACC (TCGA)
HHLA2表达-RNA/序列

图4

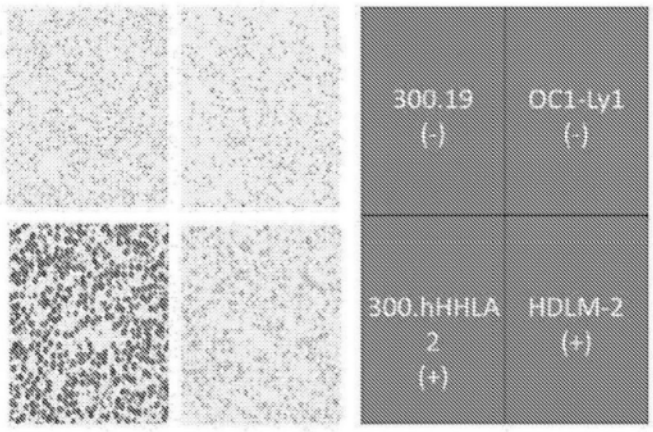


图5A

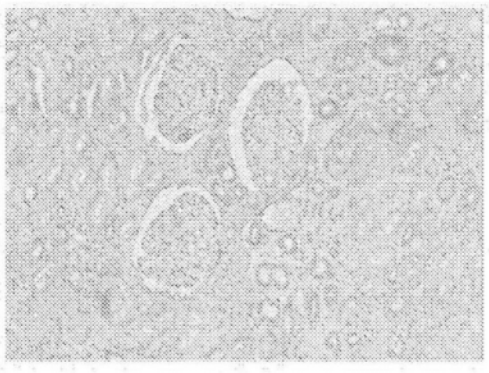


图5B

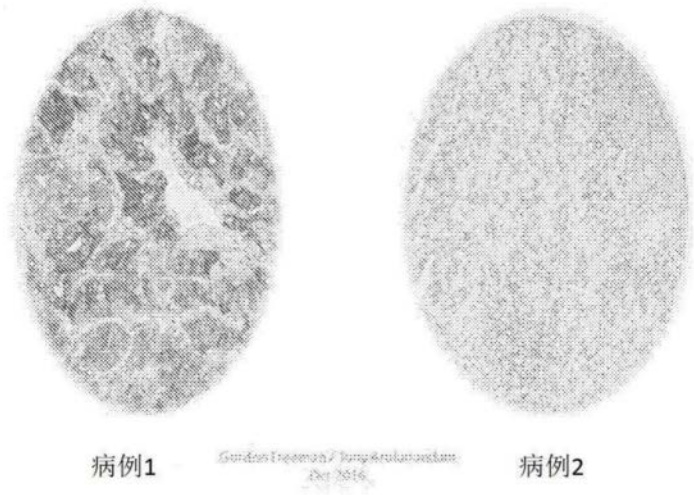


图5C

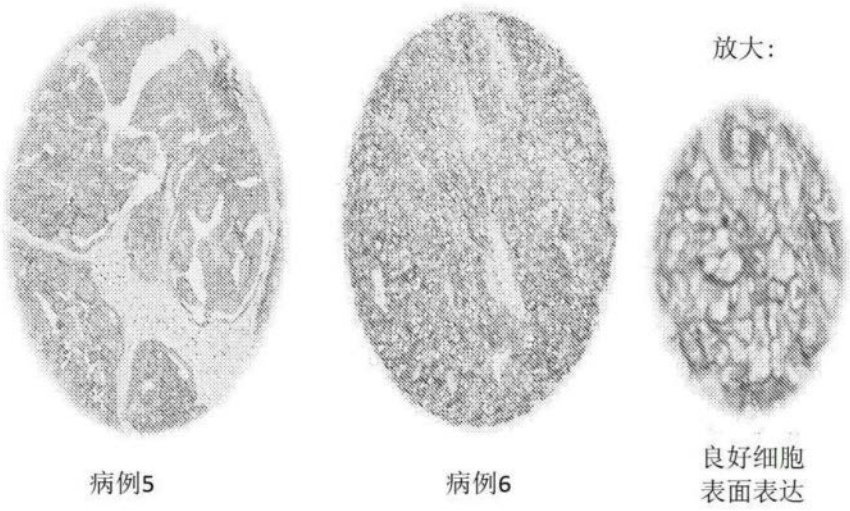

放大：
病例5
病例6
良好细胞
表面表达

图5D

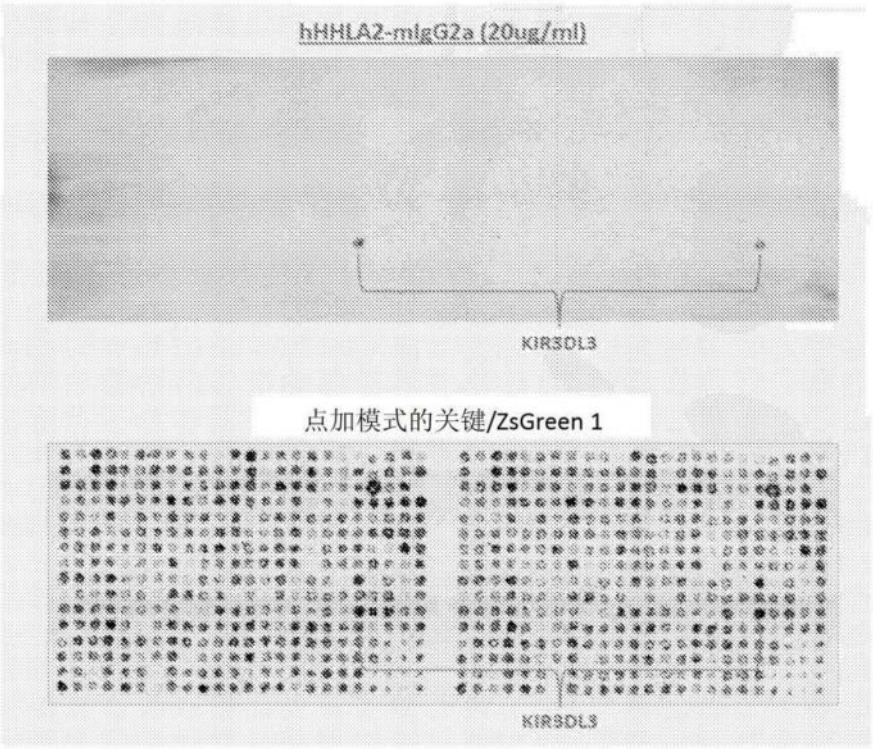

hHHLA2-mIgG2a (20ug/ml)
KIR3DL3
点加模式的关键/ZsGreen 1
KIR3DL3

图6A

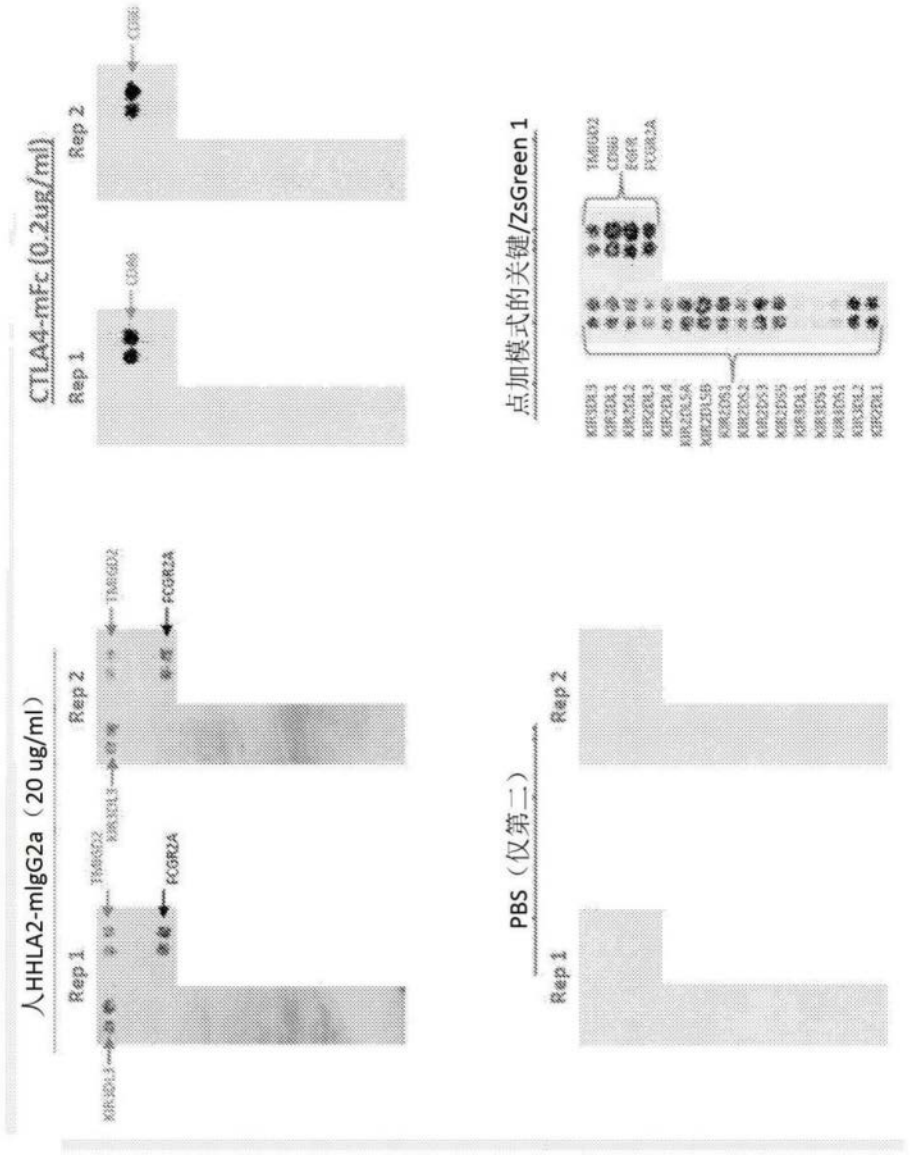
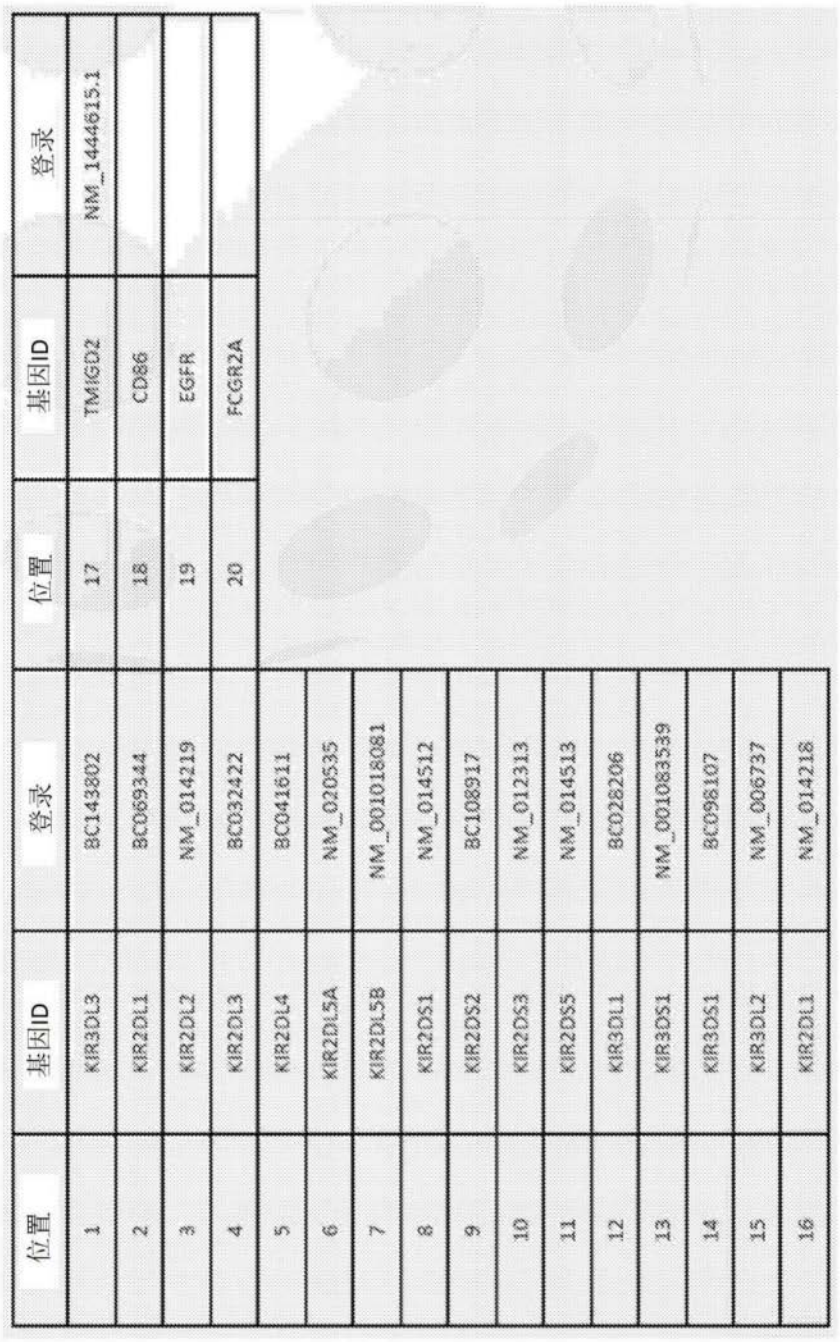

CTLA4-mFc (0.2ug/ml)
Rep 1
Rep 2
CD86
人HHLA2-mIgG2a（20 ug/ml）
TMIGD2
FCGR2A
点加模式的关键/ZsGreen 1
PBS（仅第二）

图6B



位置	基因ID	登录	位置	基因ID	登录
1	KIR3DL3	BC143802	17	TMIGD2	NM_1444615.1
2	KIR2DL1	BC069344	18	CD86	
3	KIR2DL2	NM_014219	19	EGFR	
4	KIR2DL3	BC032422	20	FCGR2A	
5	KIR2DL4	BC041611			
6	KIR2DL5A	NM_020535			
7	KIR2DL5B	NM_001018081			
8	KIR2DS1	NM_014512			
9	KIR2DS2	BC108917			
10	KIR2DS3	NM_012313			
11	KIR2DS5	NM_014513			
12	KIR3DL1	BC028206			
13	KIR3DS1	NM_001083539			
14	KIR3DS1	BC098107			
15	KIR3DL2	NM_006737			
16	KIR2DL1	NM_014218			

图6C

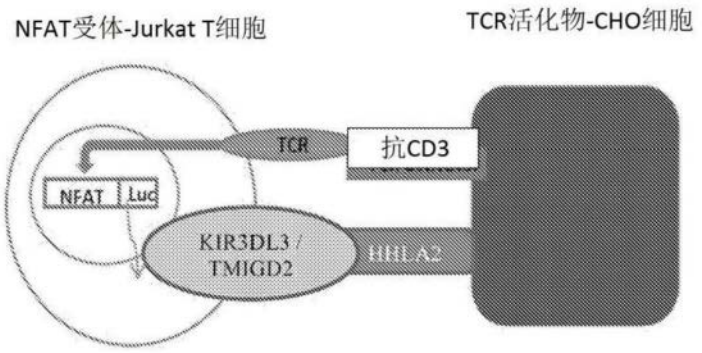

NFAT受体-Jurkat T细胞
TCR活化物-CHO细胞
TCR
抗CD3
NFAT
Luc
KIR3DL3 /
TMIGD2
HHLA2

图7

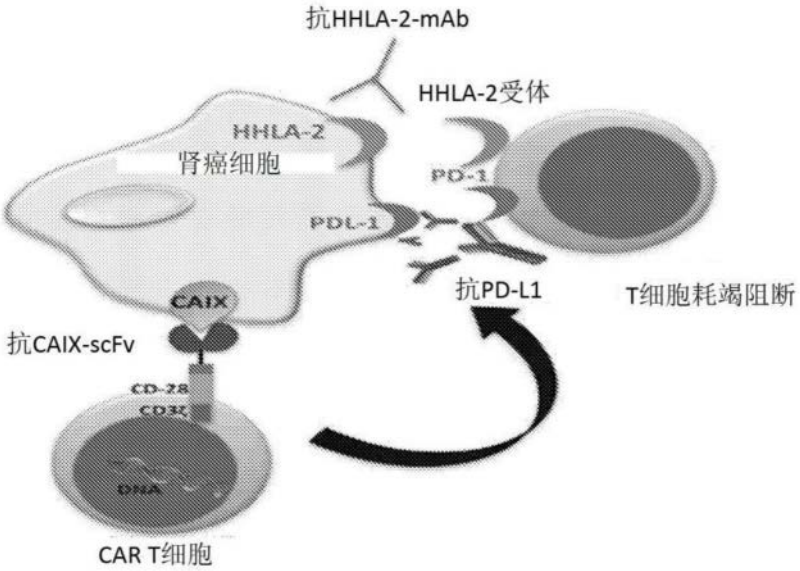

抗HHLA-2-mAb
HHLA-2受体
HHLA-2
肾癌细胞
PD-1
PDL-1
抗PD-L1
T细胞耗竭阻断
CAIX
抗CAIX-scFv
CD-28
CD3ζ
DNA
CAR T细胞

图8

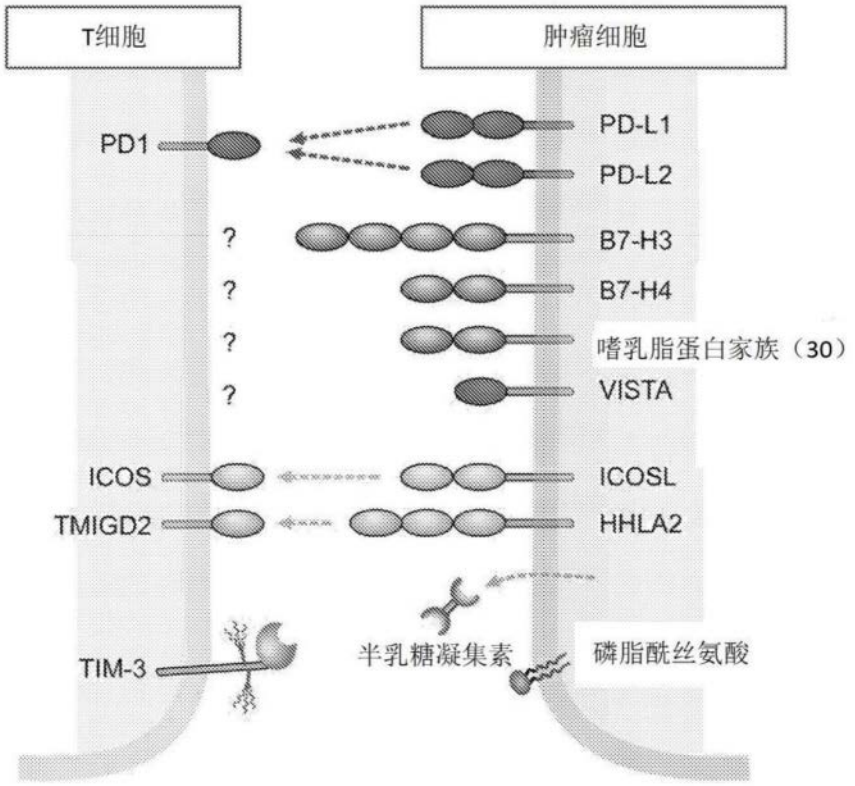

T细胞
肿瘤细胞
PD1
PD-L1
PD-L2
?
B7-H3
?
B7-H4
?
嗜乳脂蛋白家族（30）
?
VISTA
ICOS
ICOSL
TMIGD2
HHLA2
半乳糖凝集素
TIM-3
磷脂酰丝氨酸

图9

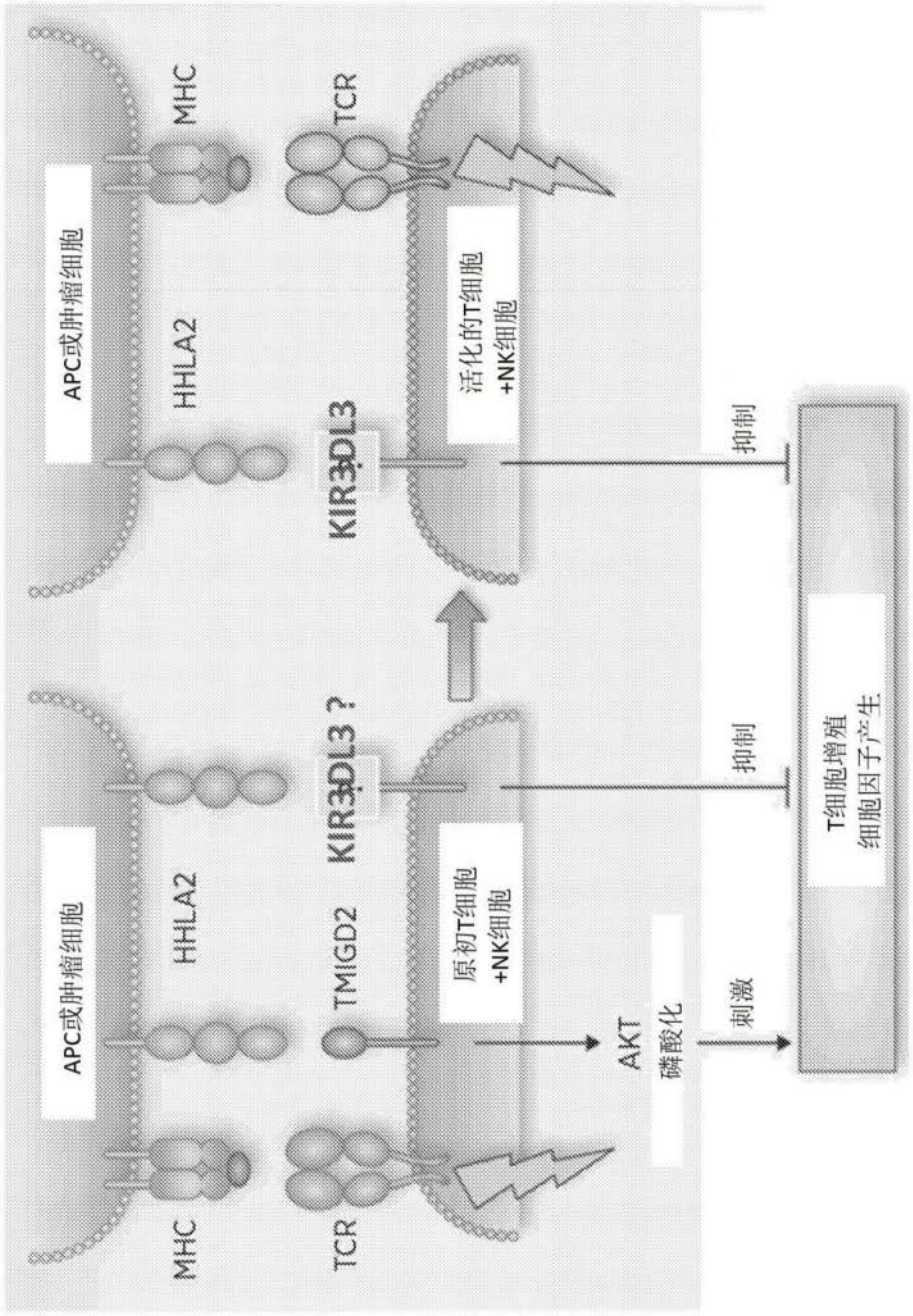

APC或肿瘤细胞
MHC
HHLA2
TCR
KIR3DL3
活化的T细胞
+NK细胞
抑制
APC或肿瘤细胞
HHLA2
KIR3DL3 ?
TMIGD2
原初T细胞
+NK细胞
抑制
T细胞增殖
细胞因子产生
AKT
磷酸化
刺激
MHC
TCR

图10

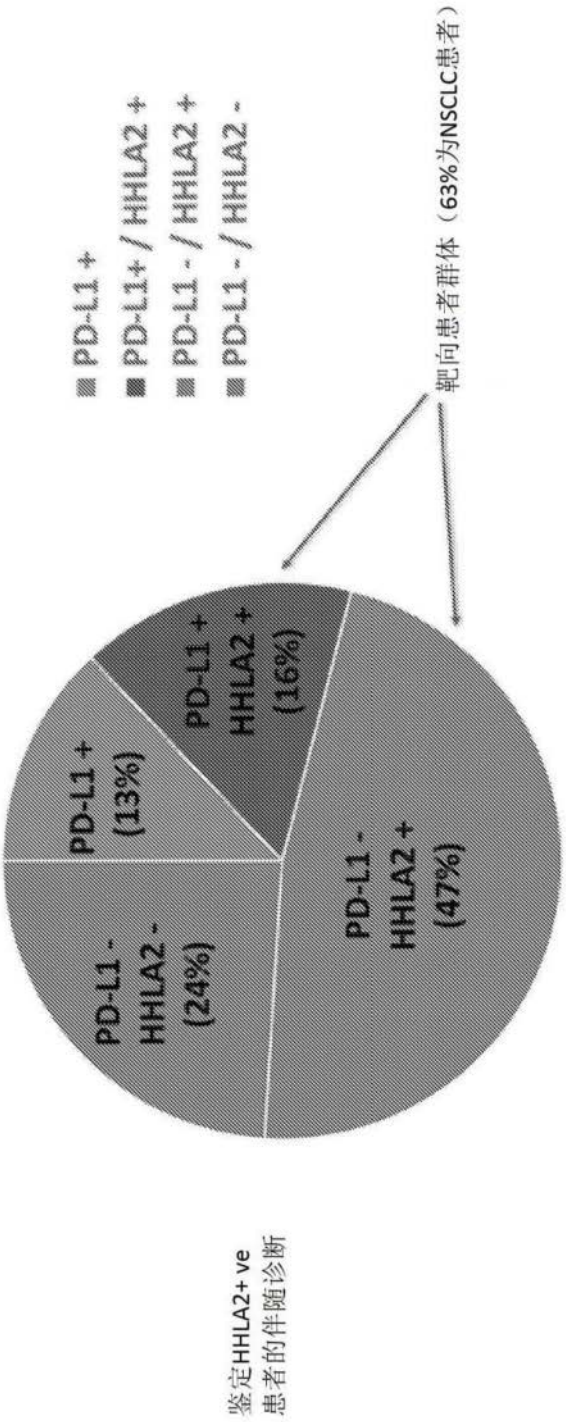
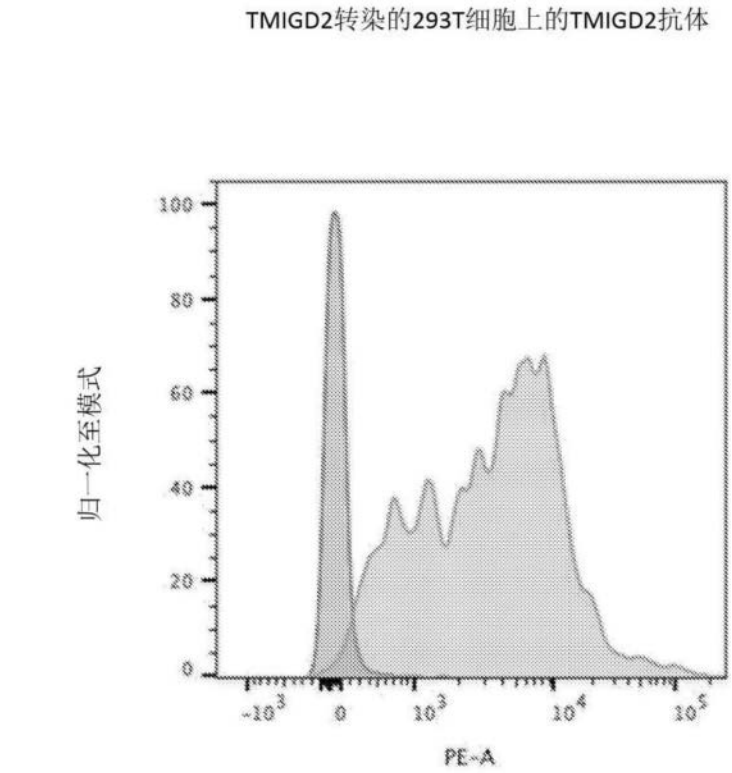
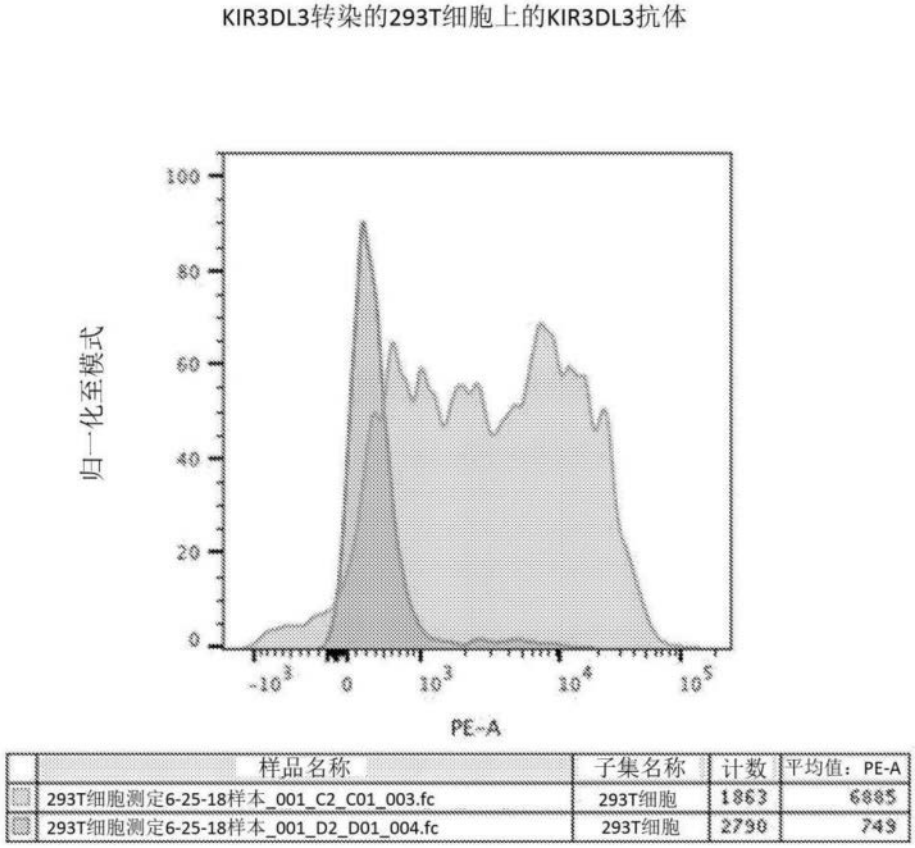

PD-L1 +
PD-L1+ / HHLA2 +
PD-L1 - / HHLA2 +
PD-L1 - / HHLA2 -
靶向患者群体（63%为NSCLC患者）
PD-L1 + HHLA2 + (16%)
PD-L1 + (13%)
PD-L1 - HHLA2 + (47%)
PD-L1 - HHLA2 - (24%)
鉴定HHLA2+ ve
患者的伴随诊断

图11



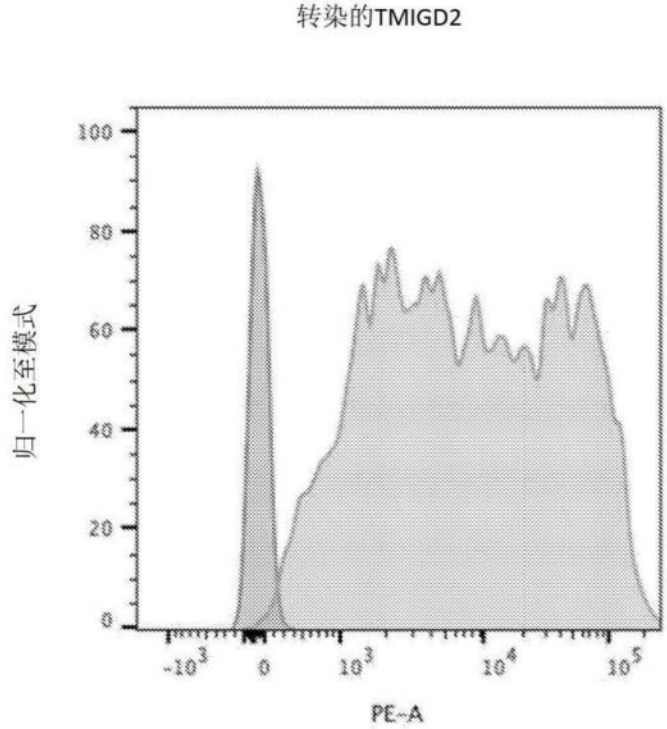
	样品名称	子集名称	计数	平均值：PE-A
	293T细胞测定6-25-18样本_001_B2_B02_005.fcs	293T细胞	1320	6923
	293T细胞测定6-25-18样本_001_D2_D02_011.fc	293T细胞	2332	583

图12A



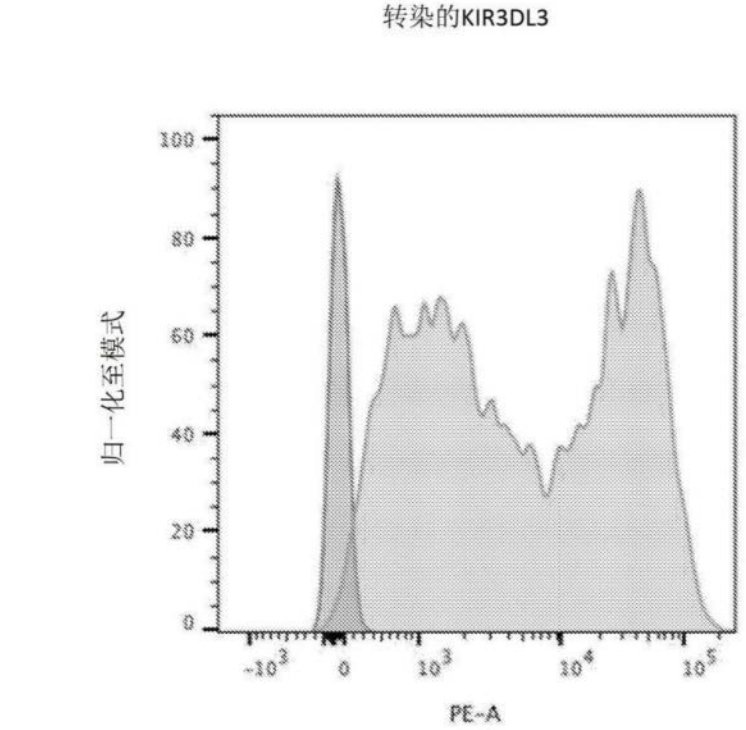
	样品名称	子集名称	计数	平均值：PE-A
	293T细胞测定6-25-18样本_001_C2_C01_003.fc	293T细胞	1863	6885
	293T细胞测定6-25-18样本_001_D2_D01_004.fc	293T细胞	2790	749

图12B



	样品名称	子集名称	计数	平均值：PE-A
	293T细胞测定6-25-18样本_001_C3_C03_011.fc	293T细胞	5477	23536
	293T细胞测定6-25-18样本_001_F3_F03_023.fc	293T细胞	4405	58.4

图12C



	样品名称	子集名称	计数	平均值：PE-A
	293T细胞测定6-25-18样本_001_E3_E03_019.fc	293T细胞	4536	18525
	293T细胞测定6-25-18样本_001_F3_F03_023.fc	293T细胞	4405	58.4

图12D

人HHLA2结合

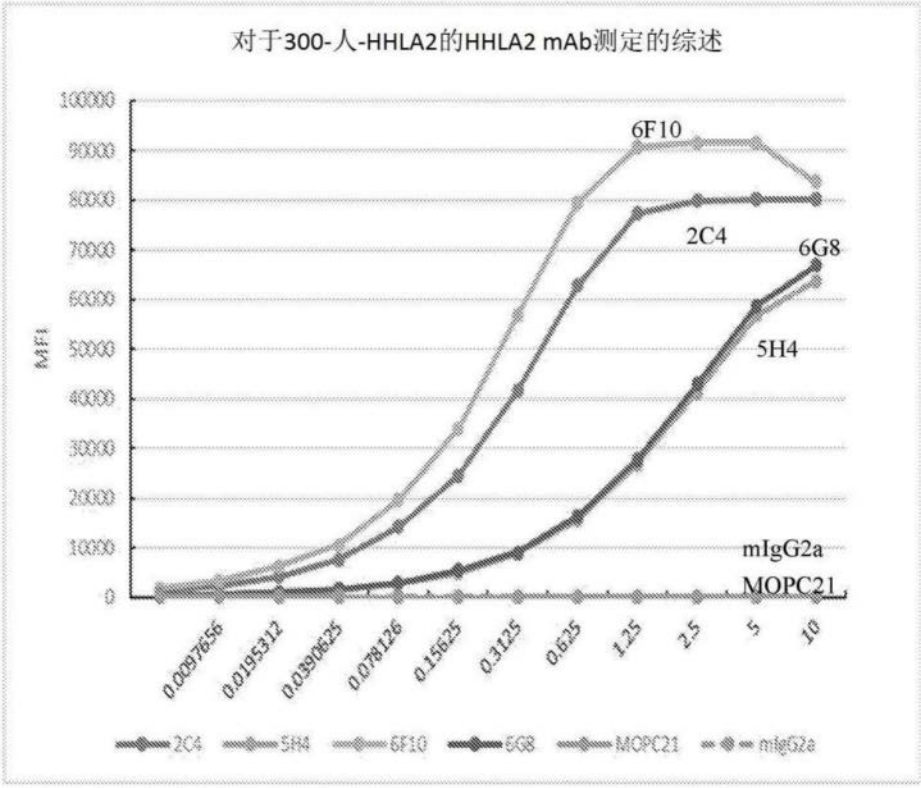


图13A

食蟹猴HHLA2结合

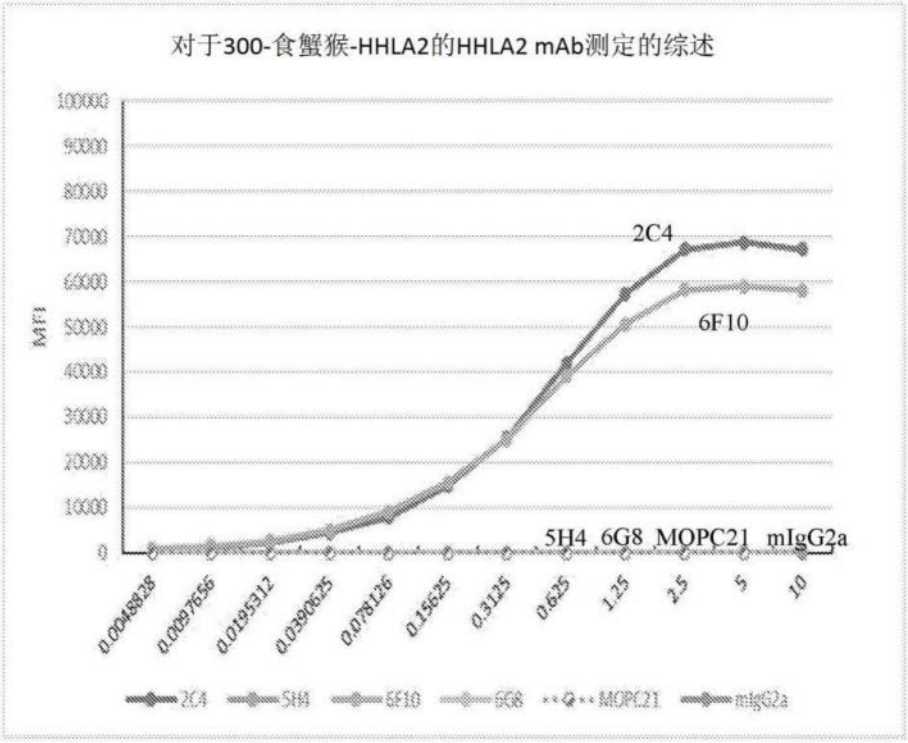


图13B

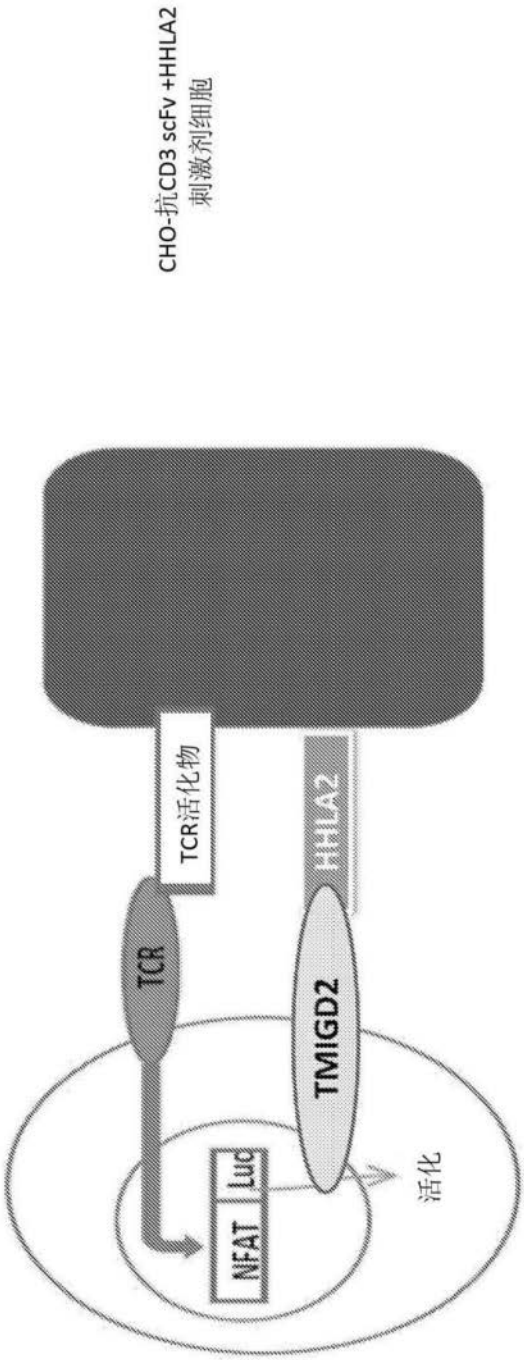

CHO-抗CD3 scFv +HHLA2
刺激剂细胞
TCR活化物
HHLA2
TCR
TMIGD2
NFAT
Luc
活化

图14

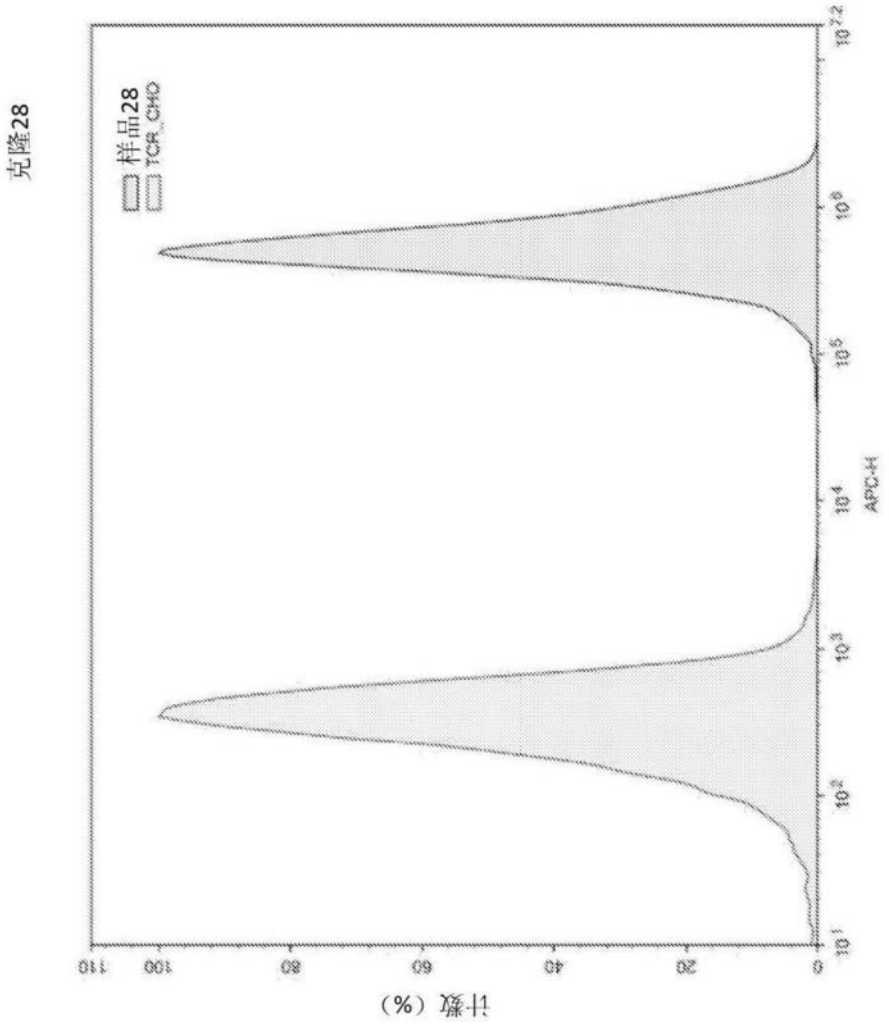


图15

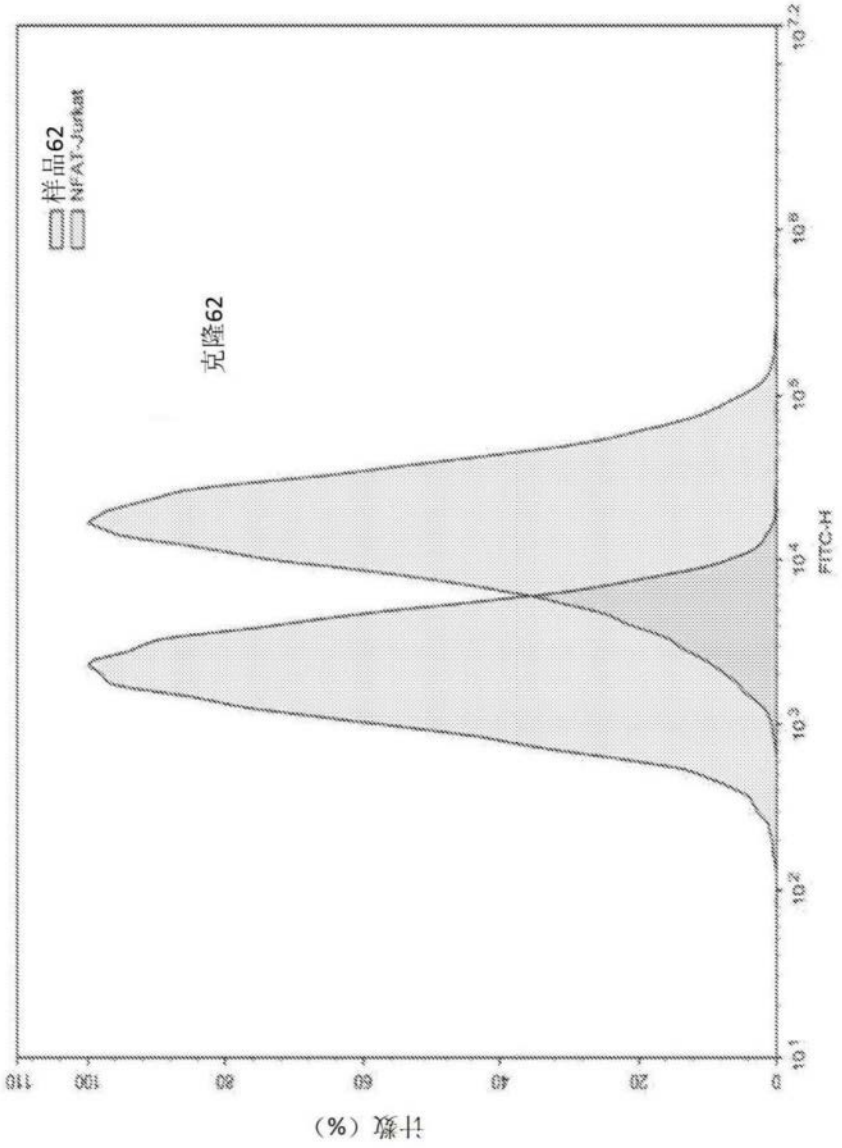


图16

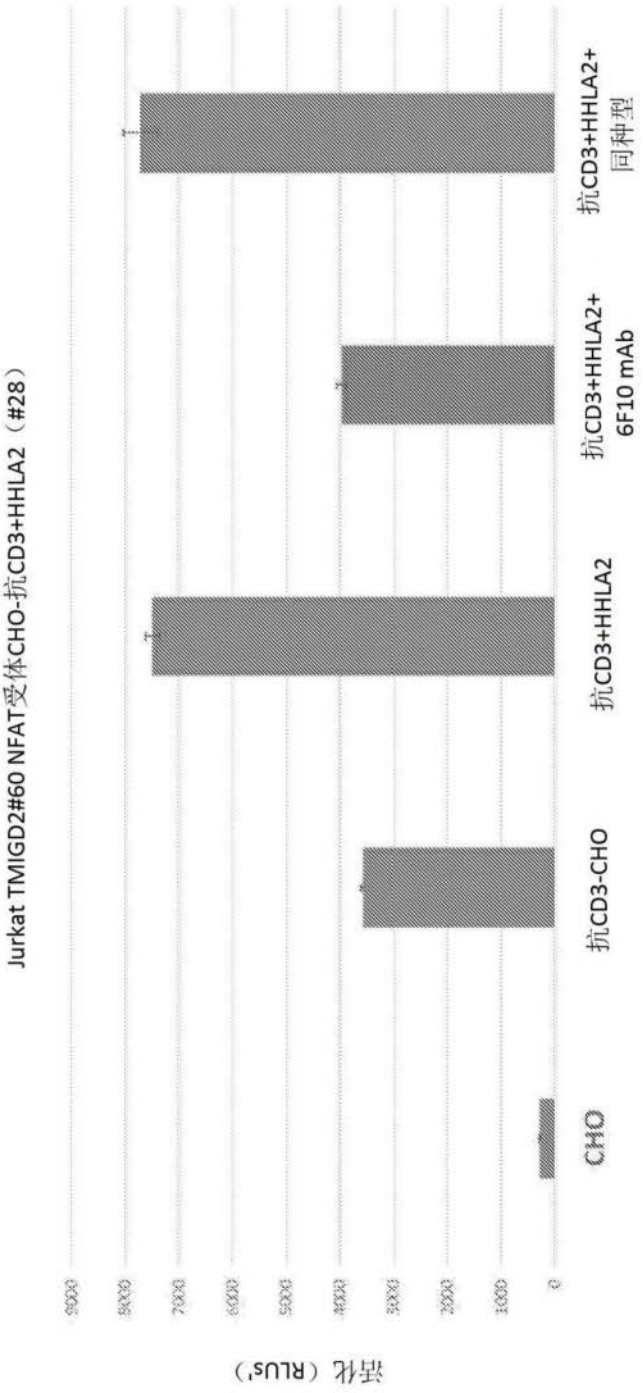

Jurkat TMIGD2#60 NFAT受体CHO-抗CD3+HHLA2（#28）
活化（RLUs）
9000
8000
7000
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
CHO
抗CD3-CHO
抗CD3+HHLA2
抗CD3+HHLA2+ 6F10 mAb
抗CD3+HHLA2+ 同种型

图17

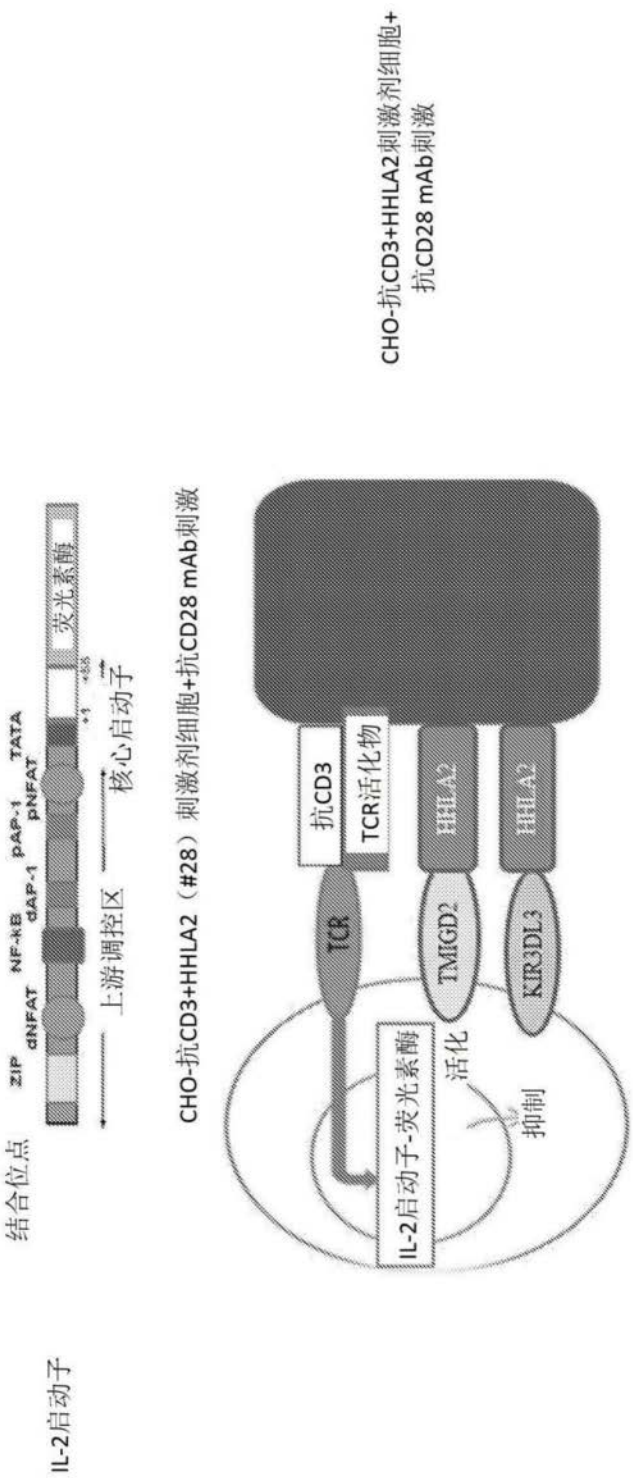

CHO-抗CD3+HHLA2刺激剂细胞+
抗CD28 mAb刺激
CHO-抗CD3+HHLA2（#28）刺激剂细胞+抗CD28 mAb刺激
抗CD3
TCR活化物
TCR
HHLA2
TMIGD2
HHLA2
KIR3DL3
IL-2启动子-荧光素酶
活化
抑制
IL-2启动子
结合位点
ZIP
dNFAT
NF-kB
dAP-1
pAP-1
pNFAT
TATA
荧光素酶
上游调控区
核心启动子

图18

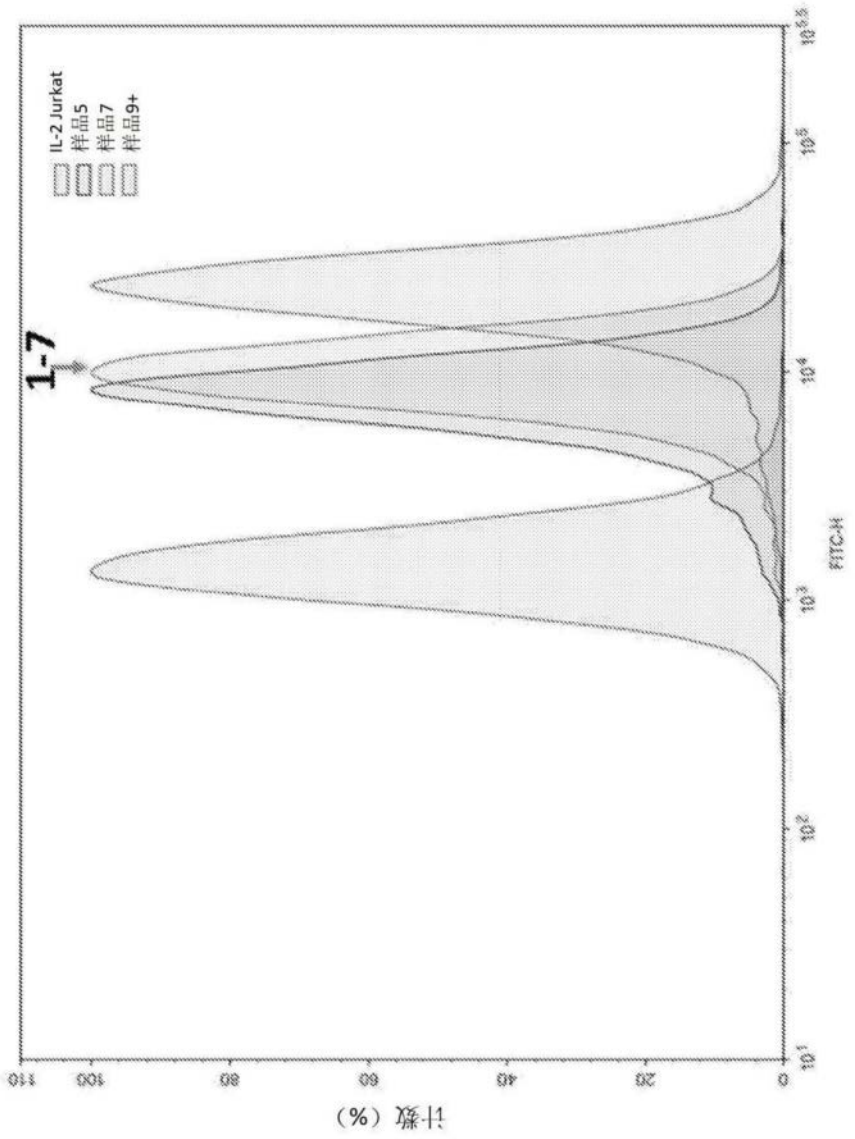


图19A

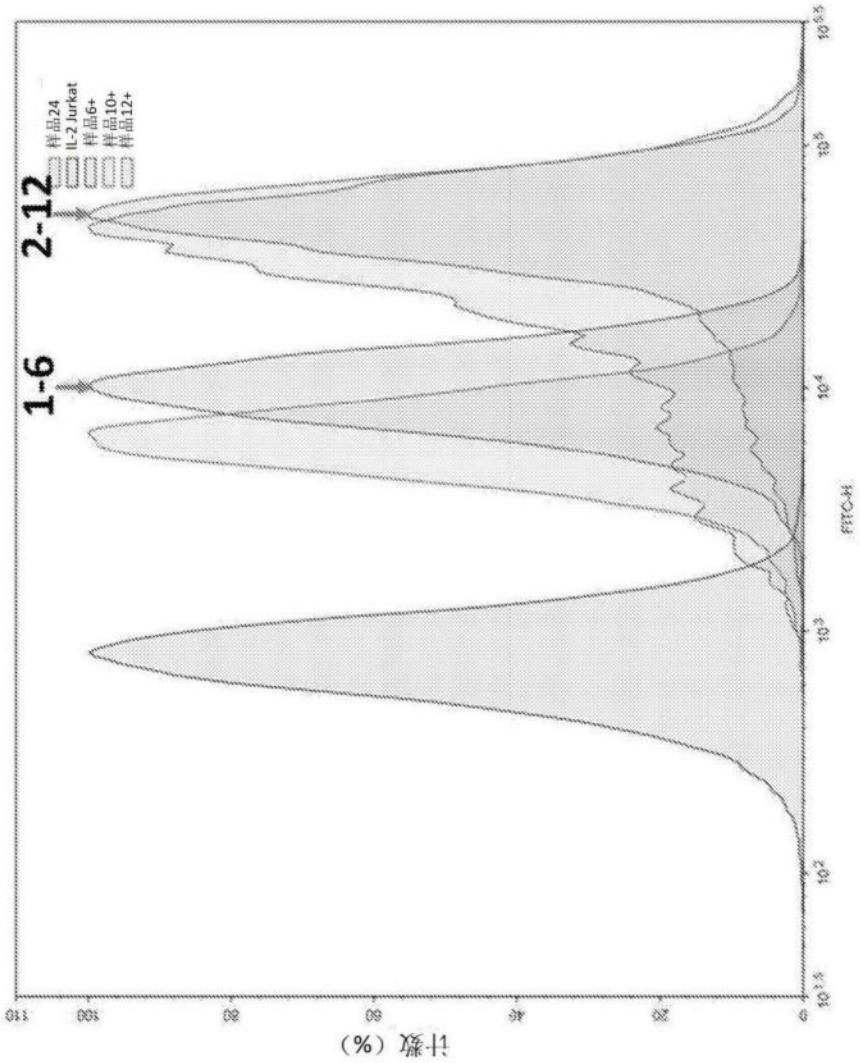


图19B

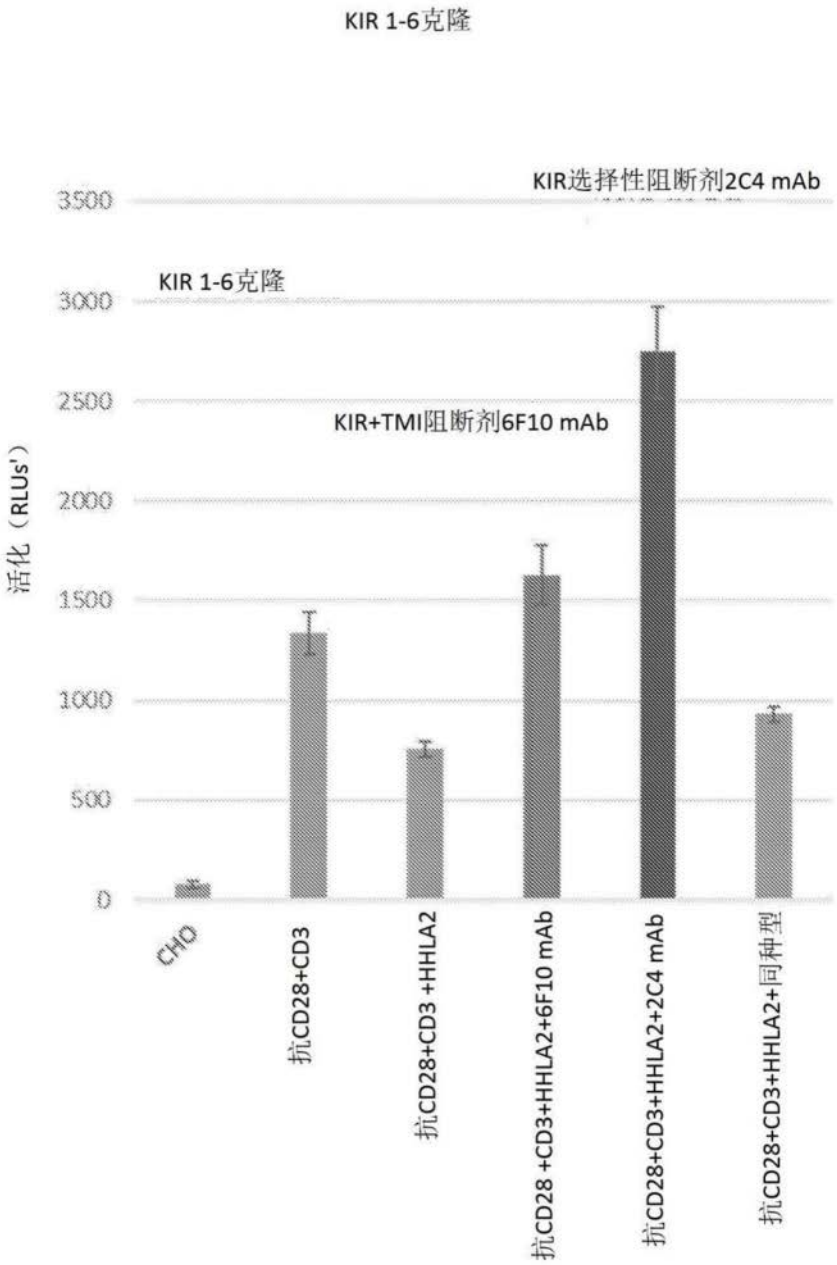

KIR 1-6克隆
KIR选择性阻断剂2C4 mAb
KIR 1-6克隆
KIR+TMI阻断剂6F10 mAb
活化（RLUs'）
3500
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
CHO
抗CD28+CD3
抗CD28+CD3 +HHLA2
抗CD28 +CD3+HHLA2+6F10 mAb
抗CD28+CD3+HHLA2+2C4 mAb
抗CD28+CD3+HHLA2+同种型

图20A

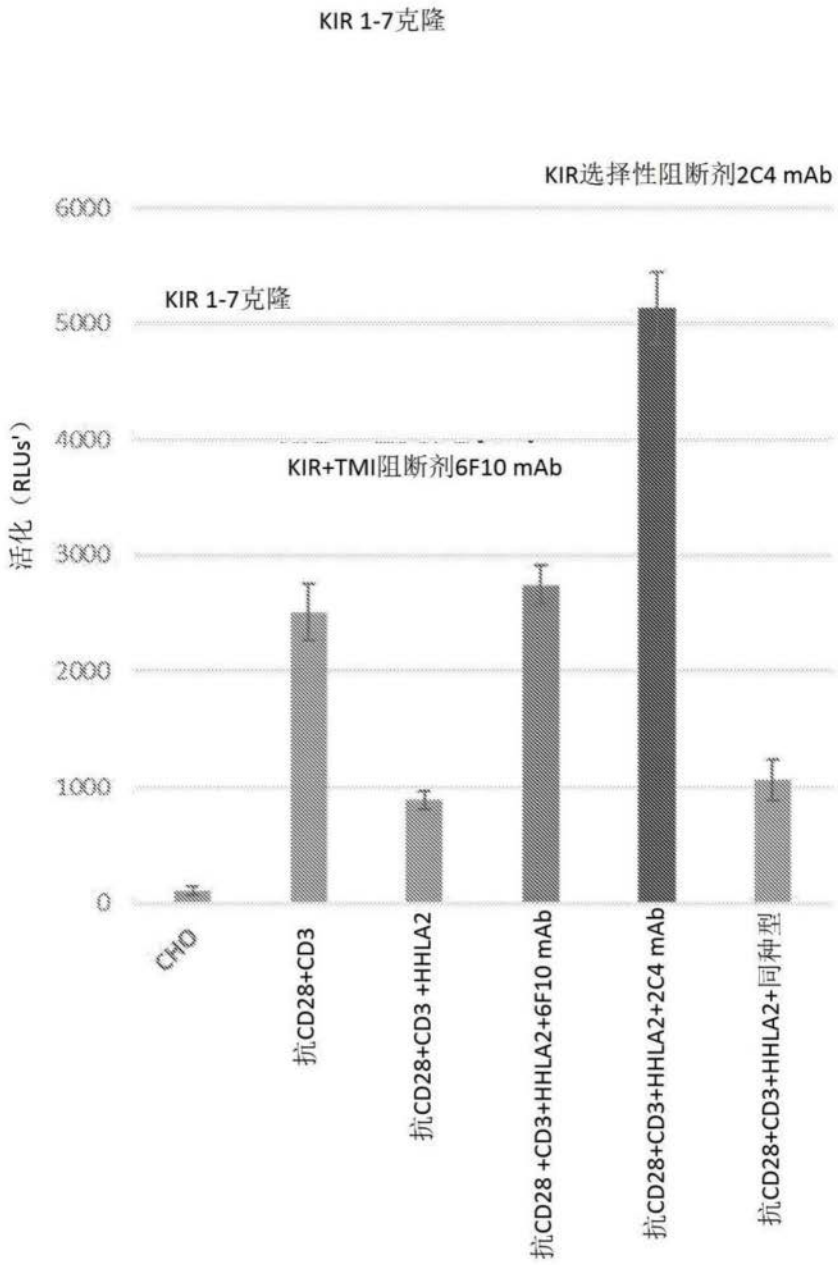

KIR 1-7克隆
KIR选择性阻断剂2C4 mAb
KIR 1-7克隆
KIR+TMI阻断剂6F10 mAb
活化（RLUs'）
6000
5000
4000
3000
2000
1000
0
CHO
抗CD28+CD3
抗CD28+CD3 +HHLA2
抗CD28 +CD3+HHLA2+6F10 mAb
抗CD28+CD3+HHLA2+2C4 mAb
抗CD28+CD3+HHLA2+同种型

图20B

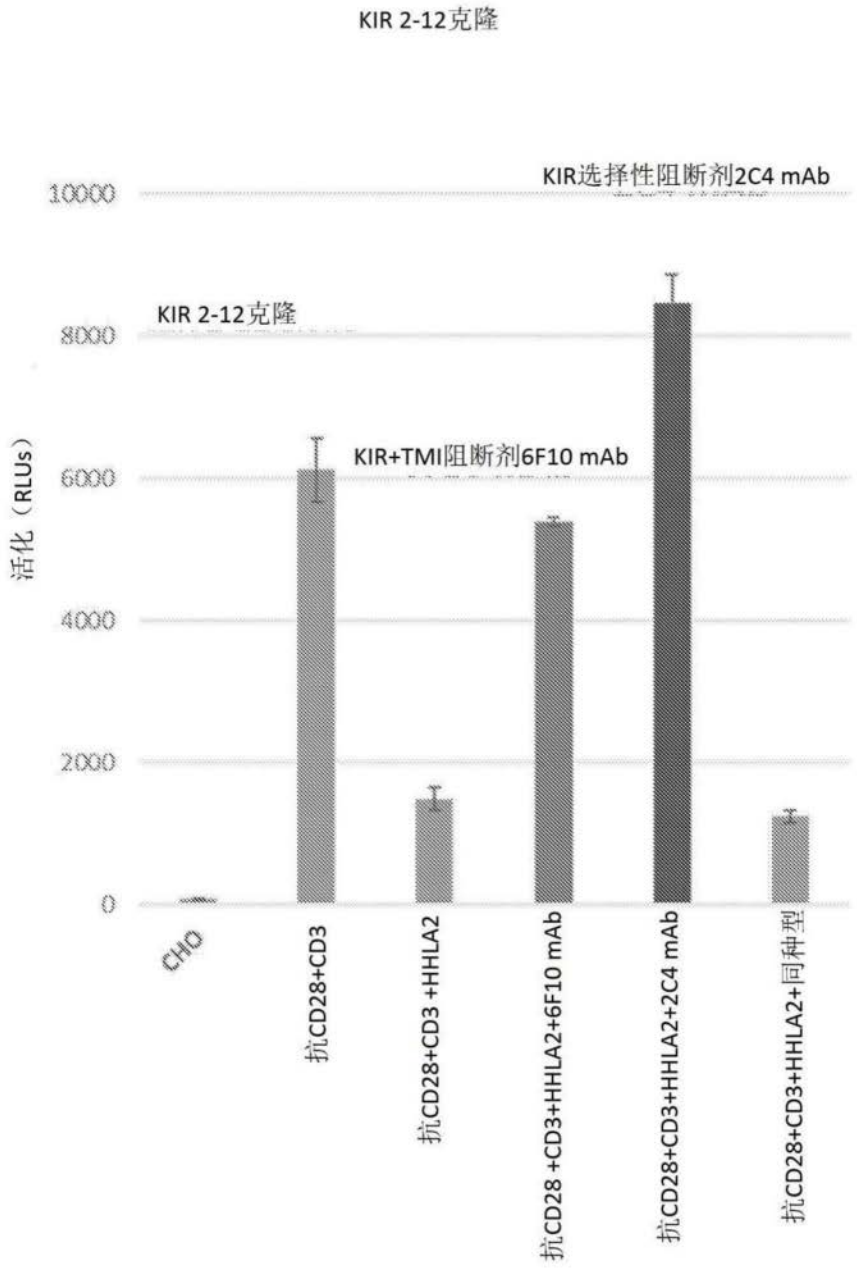

KIR 2-12克隆
KIR选择性阻断剂2C4 mAb
KIR 2-12克隆
KIR+TMI阻断剂6F10 mAb
活化（RLUs）
10000
8000
6000
4000
2000
0
CHO
抗CD28+CD3
抗CD28+CD3 +HHLA2
抗CD28 +CD3+HHLA2+6F10 mAb
抗CD28+CD3+HHLA2+2C4 mAb
抗CD28+CD3+HHLA2+同种型

图20C

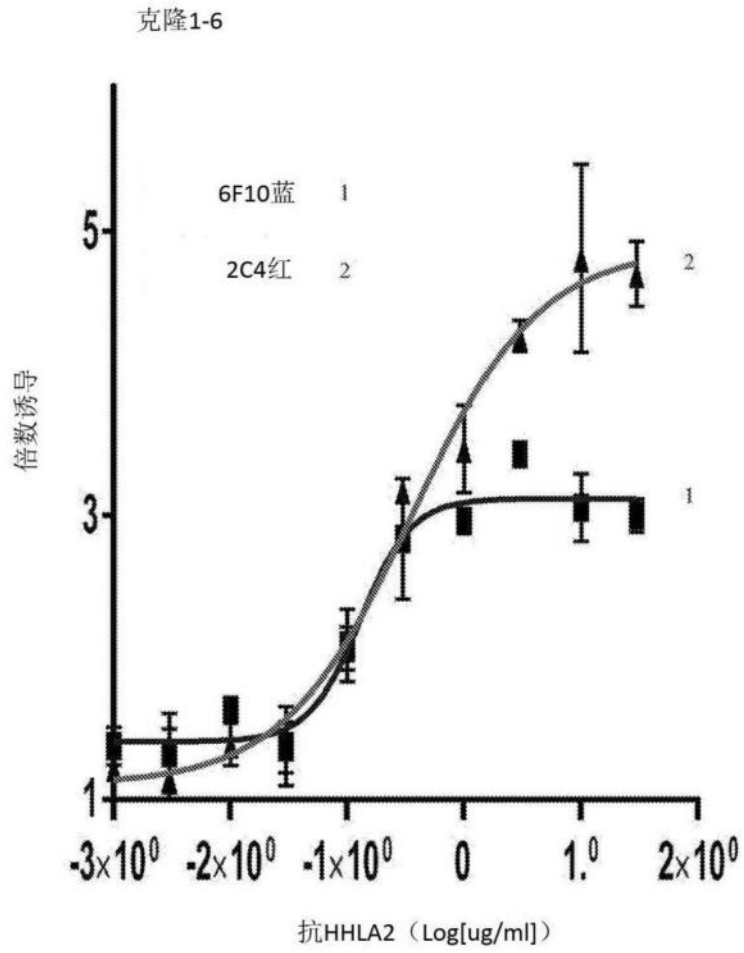

克隆1-6
6F10蓝 1
2C4红 2
倍数诱导
5
3
1
2
1
-3x10⁰ -2x10⁰ -1x10⁰ 0 1.⁰ 2x10⁰
抗HHLA2（Log[ug/ml]）

图21A

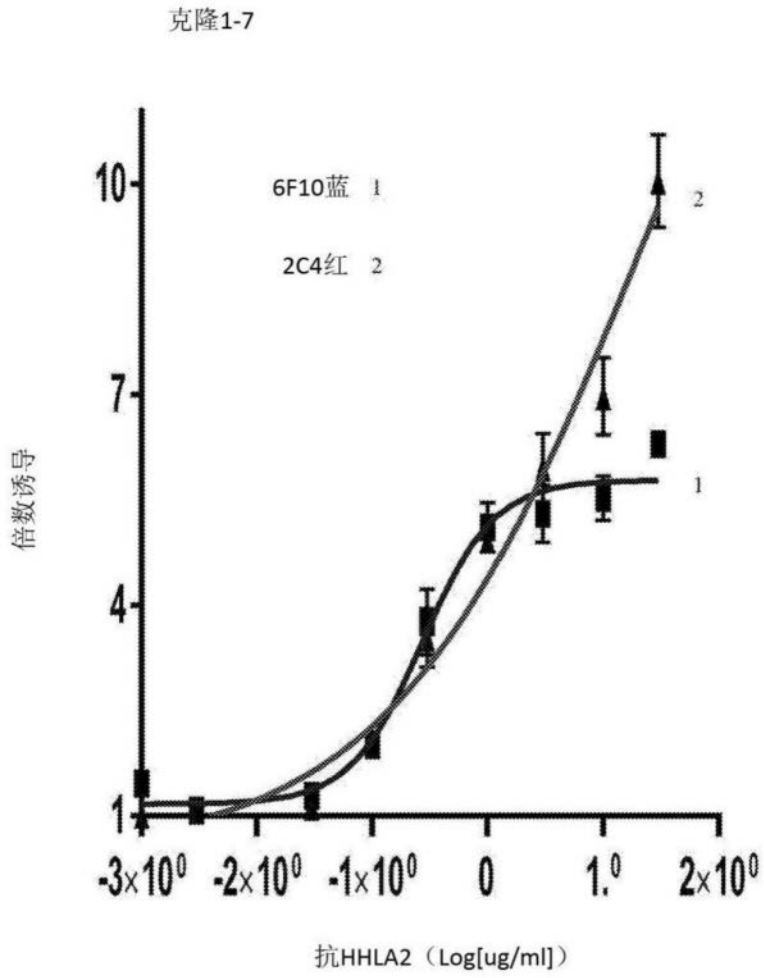

克隆1-7
10
7
4
1
6F10蓝 1
2C4红 2
2
1
倍数诱导
-3x10⁰
-2x10⁰
-1x10⁰
0
1.⁰
2x10⁰
抗HHLA2（Log[ug/ml]）

图21B

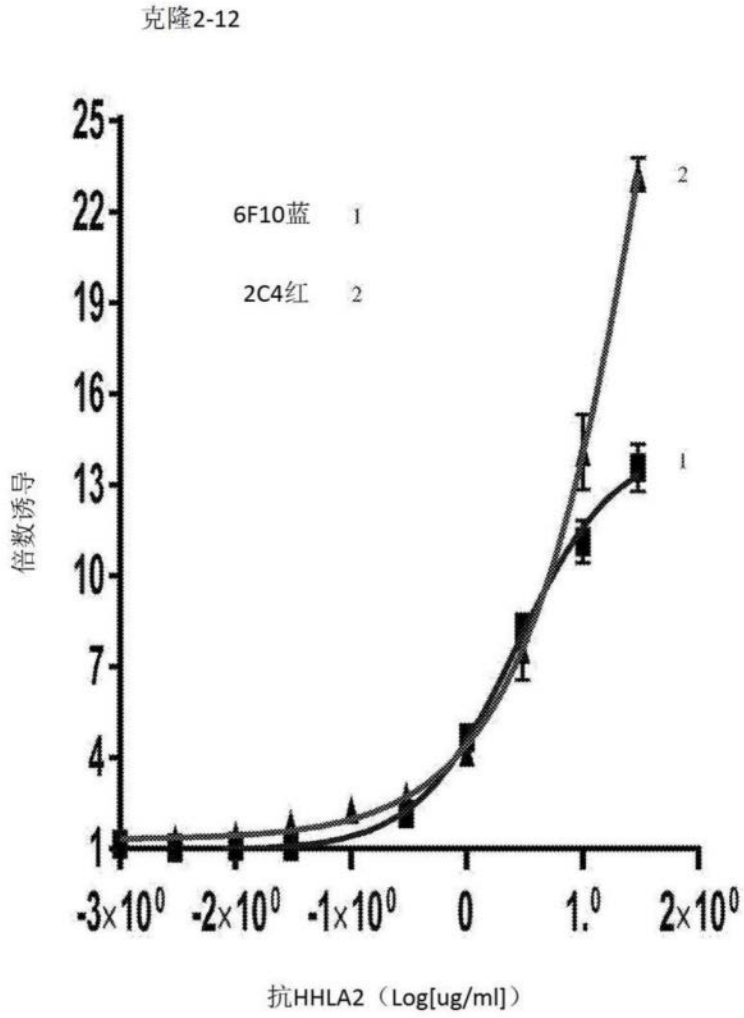

克隆2-12
25
22
19
16
13
10
7
4
1
6F10蓝 1
2C4红 2
2
1
倍数诱导
-3x10^0
-2x10^0
-1x10^0
0
1.^0
2x10^0
抗HHLA2（Log[ug/ml]）

图21C

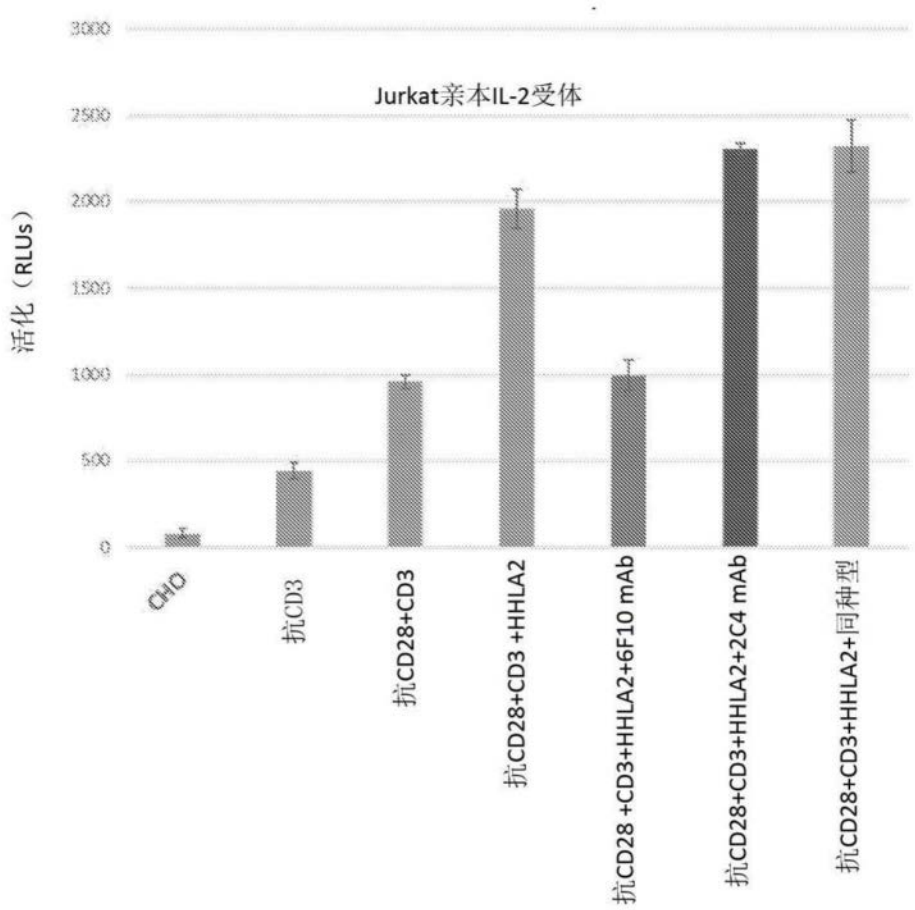

Jurkat亲本IL-2受体
活化（RLUs）
3000
2500
2000
1500
1000
500
0
CHO
抗CD3
抗CD28+CD3
抗CD28+CD3 +HHLA2
抗CD28 +CD3+HHLA2+6F10 mAb
抗CD28+CD3+HHLA2+2C4 mAb
抗CD28+CD3+HHLA2+同种型

图22

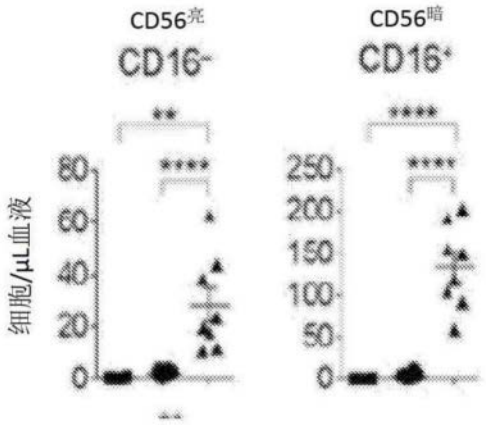

CD56亮
CD16-
CD56暗
CD16+
细胞/μL血液
80
60
40
20
0
250
200
150
100
50
0
**
****
****
****

图23A

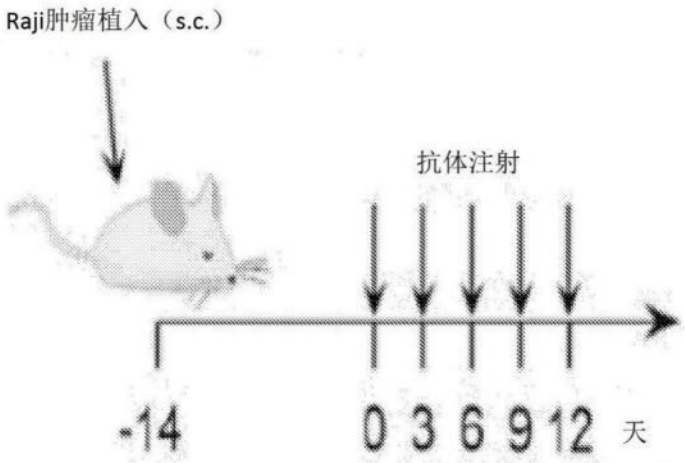

Raji肿瘤植入（s.c.）
抗体注射
-14
0 3 6 9 12 天

图23B

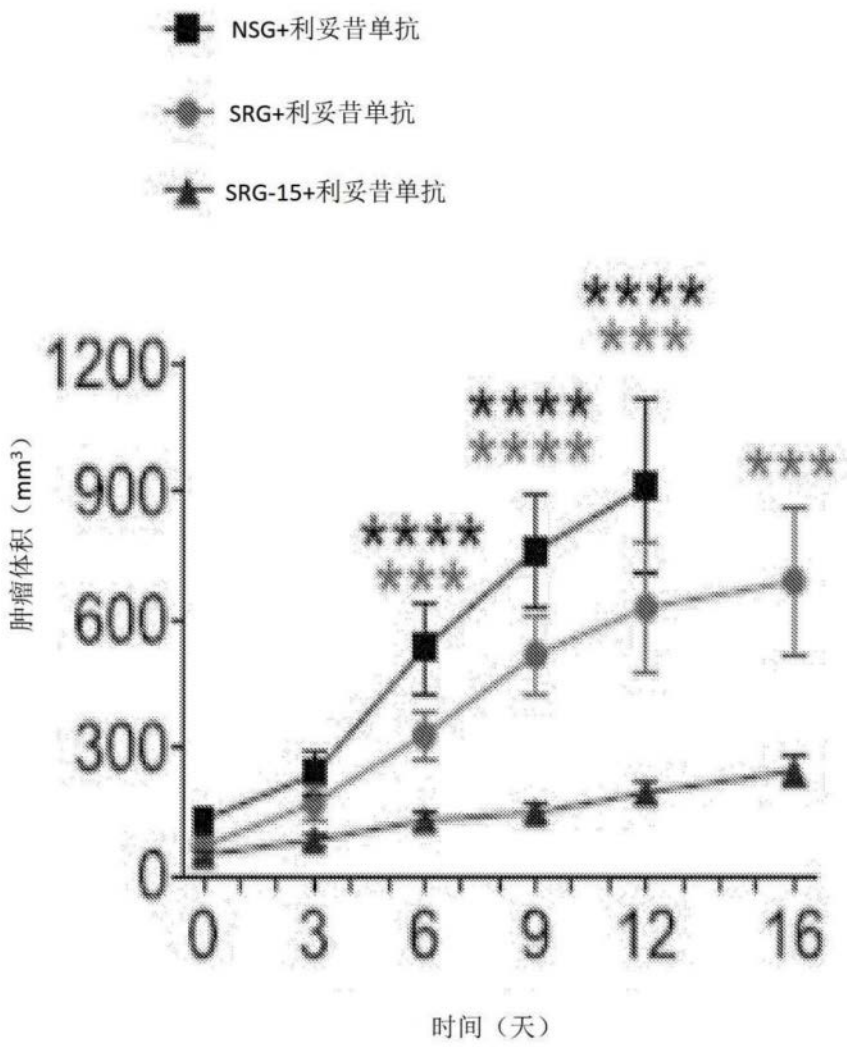

NSG+利妥昔单抗
SRG+利妥昔单抗
SRG-15+利妥昔单抗
肿瘤体积（mm³）
1200
900
600
300
0
0 3 6 9 12 16
时间（天）

图23C

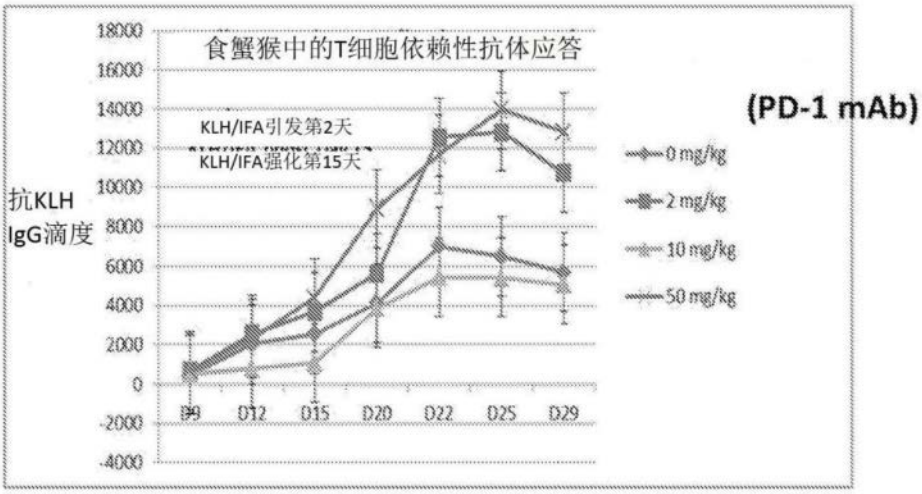

食蟹猴中的T细胞依赖性抗体应答
(PD-1 mAb)
KLH/IFA引发第2天
KLH/IFA强化第15天
抗KLH IgG滴度
18000
16000
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
-2000
-4000
D9
D12
D15
D20
D22
D25
D29
0 mg/kg
2 mg/kg
10 mg/kg
50 mg/kg

图24A

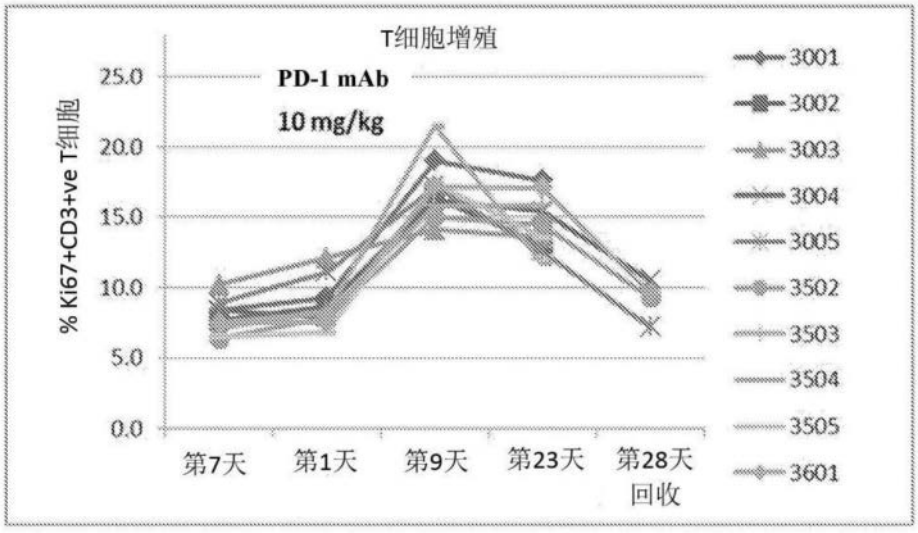

T细胞增殖
PD-1 mAb
10 mg/kg
% KI67+CD3+ve T细胞
25.0
20.0
15.0
10.0
5.0
0.0
第7天
第1天
第9天
第23天
第28天
回收
3001
3002
3003
3004
3005
3502
3503
3504
3505
3601

图24B