



(10) 授权公告号 CN 112088167 B

(45) 授权公告日 2025. 01. 10

(21) 申请号 201980029788.X

(22) 申请日 2019.05.06

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112088167 A

(43) 申请公布日 2020.12.15

(30) 优先权数据
62/668,824 2018.05.09 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.11.02

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/IL2019/050508 2019.05.06

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/215728 EN 2019.11.14

(73) 专利权人 耶路撒冷希伯来大学伊森姆研究
发展有限公司

地址 以色列耶路撒冷

专利权人 耐科廷疗法有限公司

(72) 发明人 奥夫尔·曼德尔波姆

阿迪·雷切斯 斯提潘·约尼奇
平沙斯·楚克尔曼

(74) 专利代理机构 北京汉智嘉成知识产权代理
有限公司 11682
专利代理师 金洁 郇春艳

(51) Int.Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61K 39/00 (2006.01)

(56) 对比文件
W0 2017042210 A1, 2017.03.16
W0 2022056304 A1, 2022.03.17

审查员 夏颖

权利要求书1页 说明书38页
序列表17页 附图17页

(54) 发明名称

特异性针对人类连接蛋白4的抗体

(57) 摘要

本发明提供了以高亲和性和特异性识别人类连接蛋白4 (Nectin4) 并抑制它与具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体 (TIGIT) 的结合的单克隆抗体。本发明还提供了包含所述抗体的药物组合物和将它们用于癌症免疫疗法和诊断的方法。

1. 一种与连接蛋白4结合的分离的单克隆抗体或其包含至少抗原结合部分的抗体片段,包含6个互补决定区(CDR)的组,其中:重链(HC)CDR1是SYIYH(SEQ ID NO:25);HC CDR2是WIYPGNVNTKYNERFKG(SEQ ID NO:26);HC CDR3是SNPYVMDY(SEQ ID NO:27);轻链(LC)CDR1是KASQSVNNDVA(SEQ ID NO:28);LC CDR2是YASNRFT(SEQ ID NO:29);并且LC CDR3是QQAYRSPYT(SEQ ID NO:30)。

2. 根据权利要求1所述的分离的单克隆抗体或抗体片段,其包含重链可变区SEQ ID NO:39或与所述重链可变区序列具有至少95%序列相似性的类似物。

3. 根据权利要求1所述的分离的单克隆抗体或抗体片段,其包含轻链可变区序列SEQ ID NO:40或与所述轻链可变区序列具有至少95%序列相似性的类似物。

4. 根据权利要求1所述的分离的单克隆抗体或抗体片段,其包含重链和轻链,其中所述重链包含SEQ ID NO:39,并且所述轻链包含SEQ ID NO:40。

5. 根据权利要求1所述的分离的单克隆抗体或其片段,其中所述片段是单链Fv(scFv)。

6. 根据权利要求5所述的分离的单克隆抗体或其片段,其包含序列SEQ ID NO:32或其与所述序列具有至少90%序列相似性的变体。

7. 根据权利要求1所述的分离的单克隆抗体或抗体片段,其中所述单克隆抗体以 10^{-9} M至 10^{-10} M的亲和性与人连接蛋白4结合。

8. 一种多核苷酸,包含编码根据权利要求1所述的单克隆抗体或抗体片段的HC可变区序列和LC可变区序列的序列。

9. 根据权利要求8所述的多核苷酸,其包含编码HC可变区的序列SEQ ID NO:45或其与所述序列具有至少90%同一性的变体。

10. 根据权利要求8所述的多核苷酸,其包含编码LC可变区的SEQ ID NO:46序列或其与所述序列具有至少90%同一性的变体。

11. 一种质粒,其包含根据权利要求8所述的至少一种多核苷酸。

12. 一种细胞,其包含根据权利要求8所述的多核苷酸。

13. 一种细胞,其能够产生根据权利要求1所述的单克隆抗体。

14. 一种药物组合物,其包含至少一种根据权利要求1所述的分离的抗体或其片段作为活性成分,以及可药用赋形剂、稀释剂、盐或载体。

15. 根据权利要求14所述的药物组合物在制备用于治疗选自淋巴瘤、前列腺癌、乳腺癌和膀胱癌的癌症的药物中的用途。

16. 权利要求1所述的抗体或抗体片段在制备用于检测或定量细胞上表达的或分泌到生物培养基中的连接蛋白4存在的试剂盒中的用途,所述用途包括将生物样品与根据权利要求1所述的抗体或抗体片段相接触。

17. 一种用于在对象中诊断癌症的药剂盒,其包含至少一种根据权利要求1所述的抗体或抗体片段。

18. 一种嵌合抗原受体(CAR),其包含至少一种根据权利要求1所述的抗体或抗体片段;所述CAR包含跨膜结构域和细胞内T或NK细胞信号传导结构域。

19. 根据权利要求18所述的CAR,其包含含有SEQ ID NO:32的抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞内T或NK细胞信号传导结构域。

20. 一种T-细胞群或NK-细胞群,其被工程化改造以表达根据权利要求19所述的CAR。

特异性针对人类连接蛋白4的抗体

技术领域

[0001] 本发明属于免疫治疗领域,并涉及结合到人类蛋白连接蛋白4(Nectin4)的抗体及其片段、编码这些抗体的多核苷酸序列和产生这些抗体的细胞。本发明还涉及包含这些抗体的治疗和诊断组合物,以及使用这些抗体治疗和诊断疾病、特别是癌症的方法。

背景技术

[0002] 免疫疗法是在过去十年中在癌症治疗中做出的最有希望的进展之一。通过例如用特异性针对肿瘤细胞上的抗原的抗体治疗、使用抗原呈递细胞与肿瘤细胞的融合体治疗或通过抗肿瘤T细胞的激活,癌症免疫疗法被用于产生并增强抗肿瘤免疫应答。在患者中召集针对肿瘤细胞的免疫细胞(例如T细胞)的能力,提供了一种对抗到目前为止被认为是不可治愈的癌症类型和转移瘤的治疗模式。

[0003] T细胞介导的免疫应答包括多个连续步骤,它们受到控制免疫应答强度的共刺激和共抑制信号之间的平衡的调控。被称为免疫检查点的抑制信号对于维持自我耐受和限制免疫介导的附带组织损伤来说至关重要。当感染或免疫激发被清除、恶化或持续时,这些信号改变,并且这些改变影响并重塑免疫应答。

[0004] 免疫检查点蛋白的表达可以被肿瘤调控。例如,癌细胞表面上程序性死亡配体-1(PD-L1)上调,通过与PD-1结合以抑制原本可能攻击这些肿瘤细胞的T细胞,允许它们避开宿主免疫系统。因此,免疫检查点代表了激活针对癌症的功能性细胞免疫的重要屏障。因此,特异性针对免疫细胞上的抑制性配体的拮抗性抗体被认为是可行的抗癌药剂,并且它们正被用于癌症治疗(例如纳武单抗和派姆单抗)。免疫检查点分子的另一个实例是“具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体”(TIGIT)。TIGIT是在包括T细胞和自然杀伤细胞(NK细胞)在内的各种不同免疫细胞上表达的一种共抑制分子。TIGIT以高亲和性结合到脊髓灰质炎病毒受体(PVR,CD155)。特异性针对TIGIT的单克隆抗体(mAb)被公开在例如WO 2016/028656和WO 2017/037707中。

[0005] 脊髓灰质炎病毒受体(PVR)是参与介导细胞粘附到细胞外基质分子的一种跨膜糖蛋白。PVR是一种已知的肿瘤抗原和用于治疗性干预的靶点。阻断肿瘤细胞上的PVR预期会降低肿瘤细胞的存活力。PVR在血管生成和肿瘤转移中也具有关键作用。包括美国专利申请号20070041985、美国专利申请号20090215175和WO 2017149538在内的几项专利申请公开了特异性结合到PVR的分子和抗体及其对抗癌症的用途。

[0006] 连接蛋白细胞粘附分子4(连接蛋白4),也被称为脊髓灰质炎病毒受体相关蛋白4(PVRL4),是一种I型跨膜蛋白,并且是由相关免疫球蛋白样粘附分子构成的连接蛋白家族的成员。连接蛋白4是包括肺癌、乳腺癌、结肠癌和卵巢癌在内的许多肿瘤的一种肿瘤相关标志物。

[0007] Chailta-Eid等,2016(Cancer Res.2016;76:3003-13)公开了抗连接蛋白4抗体(恩诺单抗(Enfortumab))-药物偶联物在多种临床前癌症模型中是高效治疗剂。与微管蛋白抑制剂瑞他汀偶联的所述抗体结合人类以及大鼠和猴的连接蛋白4,并抑制表达连接蛋

白4的几种细胞系和异种移植物的生长。

[0008] 尽管在癌症免疫疗法中取得了成功,但对增强免疫系统的细胞以攻击肿瘤细胞的其他方法和更加有效且特异的药剂和药物组合,仍存在着未满足的需求。一种这样的方法涉及通过特异性单克隆抗体抑制连接蛋白4与TIGIT的结合。

发明内容

[0009] 本发明提供了结合到人类蛋白连接蛋白4的抗体及其片段、编码这些抗体的多核苷酸序和产生这些抗体的细胞。本发明部分是基于下述发现,即以前作为麻疹病毒的受体和肿瘤抗原而为人所知的连接蛋白4是免疫抑制分子TIGIT的一种配体,并因此首次提出了将它作为抑制TIGIT对抗癌免疫力的抑制效应的靶点。在某些实施方式中,本发明还提供了包含连接蛋白4的结合位点的嵌合抗原受体(CAR)。

[0010] 本发明提供了特异性针对人类连接蛋白4的高度有效的单克隆抗体(mAb),其不仅阻断连接蛋白4与抑制性受体TIGIT之间的相互作用,而且对表达这种受体的靶细胞具有直接作用。这些与连接蛋白4的结合常数在亚纳摩尔范围内的抗体,在未偶联到任何毒素或抗肿瘤剂的情况下逆转了免疫系统的TIGIT抑制,并直接增强肿瘤细胞的消除。因此,本发明的抗体可用于例如在癌症免疫疗法中抑制靶细胞上的连接蛋白4与免疫细胞上的TIGIT之间的相互作用。此外,本文中描述的一些完整抗体诱导ADCC(抗体依赖性细胞介导的细胞毒性)活性。连接蛋白4在肿瘤细胞上特异性过表达。本发明的抗体的ADCC活性诱导与它们对连接蛋白4的高亲和性和它们的ADCC活性一起,使它们成为用于免疫疗法的理想候选者。

[0011] 本发明提供了识别连接蛋白4、阻止它结合到TIGIT蛋白并抑制对淋巴细胞例如自然杀伤(NK)细胞和T-细胞的抑制活性的抗体及其片段。本文中公开的抗连接蛋白4抗体能够结合到靶细胞例如癌细胞上存在的连接蛋白4。本发明的抗体和片段的特征在于具有独特的成组互补决定区(CDR)序列,对人类连接蛋白4的高亲和性和高特异性,并且可以作为独立疗法和与其他抗癌药剂相组合用于癌症免疫疗法,以对抗肿瘤免疫逃避。所述抗体也可用于预防病毒感染,特别是预防麻疹感染。

[0012] 现在已公开,本文中公开的高亲和性抗连接蛋白4抗体阻断TIGIT-连接蛋白4相互作用并恢复T和NK细胞活性。

[0013] 某些本发明的单克隆抗体还能够阻断连接蛋白4与连接蛋白1之间的相互作用,表明了它们干扰表达连接蛋白4的肿瘤的侵入性的能力。此外,抗连接蛋白4mAb能够在大多数靶细胞中诱导NK细胞活化。有利的是,根据本发明所述的抗连接蛋白4mAb对靶癌细胞具有直接作用,在不需NK细胞和/或毒素的情况下诱导它们的杀死。还已公开,本发明的抗连接蛋白4抗体对共刺激受体例如DNAM1的信号传导没有阻断作用,因此预期它们对其他免疫诱导信号没有有害效应。

[0014] 有趣的是,尽管在人类与啮齿动物连接蛋白4序列之间具有高的序列相似性,但某些本发明的抗体对人类连接蛋白4高度特异,并且不结合啮齿动物连接蛋白4。

[0015] 某些本文中描述的抗连接蛋白4mAb能够通过阻断肿瘤细胞上的连接蛋白4,以不依赖于免疫的方式降低肿瘤细胞存活率。在某些实施方式中,本文中描述的连接蛋白4抗体在未结合到任何有毒分子的情况下,通过以不依赖于免疫的方式干扰与肿瘤细胞上的连接蛋白1的结合而抑制肿瘤细胞的增殖。

[0016] 根据一个方面,本发明提供了一种分离的单克隆抗体(mAb)或其抗体片段,其至少包含特异性结合到人类连接蛋白4并抑制它与TIGIT的结合的抗原结合部分。

[0017] 本发明还提供了一种能够抑制人类连接蛋白4与人类TIGIT的结合的mAb或其抗体片段,其与T-淋巴细胞和/或自然杀伤(NK)细胞一起用于癌症的治疗。

[0018] 根据某些实施方式,所述mAb未被偶联到任何毒素或抗肿瘤剂。

[0019] 根据某些实施方式,所述分离的抗体或抗体片段包含选自下述的6个互补决定区(CDR)序列的组:

[0020] i. 包含SEQ ID NO:22的重链(HC)可变区的三个CDR和包含SEQ ID NO:24的轻链(LC)可变区的三个CDR,或其与所述抗体或片段序列具有至少90%序列同一性的类似物或衍生物;

[0021] ii. 包含SEQ ID NO:2的HC可变区的三个CDR和包含SEQ ID NO:4的LC可变区的三个CDR,或其与所述抗体或片段序列具有至少90%序列同一性的类似物或衍生物;和

[0022] iii. 包含SEQ ID NO:6的HC可变区的三个CDR和包含SEQ ID NO:8的LC可变区的三个CDR,或其与所述抗体或片段序列具有至少90%序列同一性的类似物或衍生物。

[0023] 根据某些实施方式,所述分离的抗体或抗体片段包含选自下述的6个CDR的组序列:

[0024] i. 包含SEQ ID NO:39的HC可变区的三个CDR和包含SEQ ID NO:40的LC可变区的三个CDR,或其与所述抗体或片段序列具有至少90%序列同一性的类似物或衍生物;

[0025] ii. 包含SEQ ID NO:35的HC可变区的三个CDR和包含SEQ ID NO:36的LC可变区的三个CDR,或其与所述抗体或片段序列具有至少90%序列同一性的类似物或衍生物;和

[0026] iii. 包含SEQ ID NO:37的HC可变区的三个CDR和包含SEQ ID NO:38的LC可变区的三个CDR,或其与所述抗体或片段序列具有至少90%序列同一性的类似物或衍生物。

[0027] 存在几种本领域中已知的用于确定给定抗体分子的CDR序列的方法,但不存在标准的明确方法。来自于抗体重链和轻链可变区的CDR序列的确定可以按照本领域中已知的任何方法,包括但不限于被称为KABAT、Chothia和IMGT的方法来做出。所选的CDR组可以包括通过一种以上的方法鉴定的序列,即例如某些CDR序列可以使用KABAT来确定,某些序列使用IMGT来确定。根据某些实施方式,所述mAb可变区的CDR序列使用IMGT方法来确定。

[0028] 根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或片段包含被称为hNec4.11(或连接蛋白4.11或克隆11)的单克隆抗体的CDR序列,即包含在SEQ ID NO:39中示出的重链可变区中的三个CDR序列和包含在SEQ ID NO:40中示出的轻链可变区中的三个CDR序列。

[0029] 根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或抗体片段包含含有序列SYIIH(SEQ ID NO:25)的重链CDR1。根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或抗体片段包含含有序列WIYPGNVNTKYNERFKG(SEQ ID NO:26)的重链CDR2。根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或抗体片段包含含有序列SNPYVMDY(SEQ ID NO:27)的重链CDR3。

[0030] 根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或抗体片段包含:(i) 包含序列SYIIH(SEQ ID NO:25)的HC CDR1;(ii) 包含序列WIYPGNVNTKYNERFKG(SEQ ID NO:26)的HC CDR2;和(iii) 包含序列SNPYVMDY(SEQ ID NO:27)的HC CDR3。

[0031] 根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或抗体片段包含含有序列KASQSVNNDVA(SEQ ID NO:28)的轻链CDR1。根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或抗

体片段包含含有序列YASNRFT (SEQ ID NO:29)的轻链CDR2。根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或抗体片段包含含有序列QQAYRSPYT (SEQ ID NO:30)的轻链CDR3。

[0032] 根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或抗体片段包含:(i)包含序列KASQSVNNDVA (SEQ ID NO:28)的LC CDR1;(ii)包含序列YASNRFT (SEQ ID NO:29)的LC CDR2;和(iii)包含序列QQAYRSPYT (SEQ ID NO:30)的HC CDR3。

[0033] 根据某些特定实施方式,所述分离的单克隆抗体或片段包含含有序列SYIIH (SEQ ID NO:25)的重链CDR1序列,含有序列WIYPGNVNTKYNERFKG (SEQ ID NO:26)的重链CDR2,含有序列SNPYVMDY (SEQ ID NO:27)重链CDR3,含有序列KASQSVNNDVA (SEQ ID NO:28)的轻链CDR1,含有序列YASNRFT (SEQ ID NO:29)的轻链CDR2和含有序列QQAYRSPYT (SEQ ID NO:30)的轻链CDR3,或其在高变区 (HVR) 序列中包含不超过5%的氨基酸替换、缺失和/或插入的类似物。

[0034] 根据某些特定实施方式,所述分离的单克隆抗体或片段包含由下述构成的6个CDR的组序列:

[0035] i.具有SEQ ID NO:25中示出的序列的重链CDR1;

[0036] ii.具有SEQ ID NO:26中示出的序列的重链CDR2;

[0037] iii.具有SEQ ID NO:27中示出的序列的重链CDR3;

[0038] iv.具有SEQ ID NO:28中示出的序列的轻链CDR1;

[0039] v.具有SEQ ID NO:29中示出的序列的轻链CDR2;和

[0040] vi.具有SEQ ID NO:30中示出的序列的轻链CDR3。

[0041] 根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或其片段包含SEQ ID NO:39中示出的重链可变区或与其与所述重链可变区序列具有至少90%序列同一性的类似物或衍生物。

[0042] 根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或其片段包含SEQ ID NO:40中示出的轻链可变区或与其与所述轻链可变区序列具有至少90%序列同一性的类似物或衍生物。

[0043] 根据特定实施方式,所述分离的单克隆抗体或其片段包含具有SEQ ID NO:39中示出的序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:40中示出的序列的轻链可变区,或其与所述轻链和/或重链序列具有至少90%序列同一性的类似物。

[0044] 本发明还涵盖了能够以高亲和性与人类连接蛋白4内单克隆抗体hNec4.11结合到的表位结合的抗体或抗体片段。

[0045] 根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或片段包含被称为hNec4.01 (或连接蛋白4.01)的单克隆抗体的CDR序列,即在SEQ ID NO:35中示出的重链可变区中含有的三个CDR序列和在SEQ ID NO:36中示出的轻链可变区中含有的三个CDR序列。

[0046] 根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或抗体片段包含含有序列AYNIH (SEQ ID NO:9)的重链CDR1。根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或抗体片段包含含有序列YIYPNNGSGYNQKFMN (SEQ ID NO:10)的重链CDR2。根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或抗体片段包含含有序列FDYDEAWFIY (SEQ ID NO:11)的重链CDR3。

[0047] 根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或抗体片段包含:(i)包含序列AYNIH (SEQ ID NO:9)的HC CDR1;(ii)包含序列YIYPNNGSGYNQKFMN (SEQ ID NO:10)的HC CDR2;和(iii)包含序列FDYDEAWFIY (SEQ ID NO:11)的HC CDR3。

[0048] 根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或抗体片段包含含有序列SASSSVSYMH

(SEQ ID NO:12)的轻链CDR1。根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或抗体片段包含含有序列DTSKLAS (SEQ ID NO:13)的轻链CDR2。根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或抗体片段包含含有序列FQGSGSPYT (SEQ ID NO:14)的轻链CDR3。

[0049] 根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或抗体片段包含:(i)包含序列SASSSVSYMH (SEQ ID NO:12)的LC CDR1;(ii)包含序列DTSKLAS (SEQ ID NO:13)的LC CDR2;和(iii)包含序列FQGSGSPYT (SEQ ID NO:14)的HC CDR3。

[0050] 根据某些特定实施方式,所述分离的单克隆抗体或片段包含含有序列AYNIH (SEQ ID NO:9)的重链CDR1序列,含有序列YIYPNNGSGYNQKFMN (SEQ ID NO:10)的重链CDR2,含有序列FDYDEAWFIY (SEQ ID NO:11)的重链CDR3,含有序列SASSSVSYMH (SEQ ID NO:12)的轻链CDR1,含有序列DTSKLAS (SEQ ID NO:13)的轻链CDR2和含有序列FQGSGSPYT (SEQ ID NO:14)的轻链CDR3,或其在高变区 (HVR) 序列中包含不超过5%的氨基酸替换、缺失和/或插入的类似物。

[0051] 根据某些特定实施方式,所述分离的单克隆抗体或片段包含由下述构成的6个CDR的组序列:

[0052] i.具有SEQ ID NO:9中示出的序列的重链CDR1;

[0053] ii.具有SEQ ID NO:10中示出的序列的重链CDR2;

[0054] iii.具有SEQ ID NO:11中示出的序列的重链CDR3;

[0055] iv.具有SEQ ID NO:12中示出的序列的轻链CDR1;

[0056] v.具有SEQ ID NO:13中示出的序列的轻链CDR2;和

[0057] vi.具有SEQ ID NO:14中示出的序列的轻链CDR3。

[0058] 根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或其片段包含SEQ ID NO:35中示出的重链可变区或其与所述重链可变区序列具有至少90%序列同一性的类似物或衍生物。

[0059] 根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或其片段包含SEQ ID NO:36中示出的轻链可变区或其与所述轻链可变区序列具有至少90%序列同一性的类似物或衍生物。

[0060] 根据特定实施方式,所述分离的单克隆抗体或其片段包含具有SEQ ID NO:35中示出的序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:36中示出的序列的轻链可变区,或其与所述轻链和/或重链序列具有至少90%序列同一性的类似物。

[0061] 本发明还涵盖了能够以高亲和性与人类连接蛋白4内单克隆抗体hNec4.01结合到的表位结合的抗体或抗体片段。

[0062] 根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或片段包含被称为hNec4.05 (或连接蛋白4.05)的单克隆抗体的CDR序列,即包含在SEQ ID NO:37中示出的重链可变区中的三个CDR序列和包含在SEQ ID NO:38中示出的轻链可变区中的三个CDR序列。

[0063] 根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或抗体片段包含含有序列TYYIH (SEQ ID NO:15)的重链CDR1。根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或抗体片段包含含有序列WIYPGNVNTKNNEKFKV (SEQ ID NO:16)的重链CDR2。根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或抗体片段包含含有序列SNPYVMDY (SEQ ID NO:17)的重链CDR3。

[0064] 根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或抗体片段包含:(i)包含序列TYYIH (SEQ ID NO:15)的HC CDR1;(ii)包含序列WIYPGNVNTKNNEKFKV (SEQ ID NO:16)的HC CDR2;和(iii)包含序列SNPYVMDY (SEQ ID NO:17)的HC CDR3。

[0065] 根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或抗体片段包含含有序列KASQSVSNDVA(SEQ ID NO:18)的轻链CDR1。根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或抗体片段包含含有序列YASNRYT(SEQ ID NO:19)的轻链CDR2。根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或抗体片段包含含有序列QQDYSSPYT(SEQ ID NO:20)的轻链CDR3。

[0066] 根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或抗体片段包含:(i)包含序列KASQSVSNDVA(SEQ ID NO:18)的LC CDR1;(ii)包含序列YASNRYT(SEQ ID NO:19)的LC CDR2;和(iii)包含序列QQDYSSPYT(SEQ ID NO:20)的HC CDR3。

[0067] 根据某些特定实施方式,所述分离的单克隆抗体或片段包含含有序列TYYIH(SEQ ID NO:15)的重链CDR1序列,含有序列WIYPGNVNTKNNEKFKV(SEQ ID NO:16)的重链CDR2,含有序列NPYVMDY(SEQ ID NO:17)的重链CDR3,含有序列KASQSVSNDVA(SEQ ID NO:18)的轻链CDR1,含有序列YASNRYT(SEQ ID NO:19)的轻链CDR2和含有序列QQDYSSPYT(SEQ ID NO:20)的轻链CDR3,或其在高变区(HVR)序列中包含不超过5%的氨基酸替换、缺失和/或插入的类似物。

[0068] 根据某些特定实施方式,所述分离的单克隆抗体或片段包含由下述构成的6个CDR的组序列:

[0069] i.具有SEQ ID NO:15中示出的序列的重链CDR1;

[0070] ii.具有SEQ ID NO:16中示出的序列的重链CDR2;

[0071] iii.具有SEQ ID NO:17中示出的序列的重链CDR3;

[0072] iv.具有SEQ ID NO:18中示出的序列的轻链CDR1;

[0073] v.具有SEQ ID NO:19中示出的序列的轻链CDR2;和

[0074] vi.具有SEQ ID NO:20中示出的序列的轻链CDR3。

[0075] 根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或其片段包含SEQ ID NO:37中示出的重链可变区或与其与所述重链可变区序列具有至少90%序列同一性的类似物或衍生物。

[0076] 根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或其片段包含SEQ ID NO:38中示出的轻链可变区或与其与所述轻链可变区序列具有至少90%序列同一性的类似物或衍生物。

[0077] 根据特定实施方式,所述分离的单克隆抗体或其片段包含具有SEQ ID NO:37中示出的序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:38中示出的序列的轻链可变区,或其与所述轻链和/或重链序列具有至少90%序列同一性的类似物。

[0078] 本发明还涵盖了能够以高亲和性与人类连接蛋白4内单克隆抗体hNec4.05结合到的表位结合的抗体或抗体片段。

[0079] 根据某些实施方式,所述分离的抗体或其片段以至少 10^{-8} M的亲和性识别人类连接蛋白4。根据其他实施方式,所述抗体或抗体片段以 10^{-8} M、 5×10^{-9} M、 10^{-9} M、 5×10^{-10} M、 10^{-10} M、 5×10^{-11} M或甚至更高的亲和性结合人类连接蛋白4。根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段以 10^{-9} M至 10^{-10} M的亲和性结合到人类连接蛋白4。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0080] 上述分离的mAb和片段的类似物和衍生物,也在本发明的范围之内。

[0081] 根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段类似物与所述参比抗体序列的高变区具有至少90%的序列同一性。

[0082] 根据某些实施方式,所述分离的抗体或其片段的类似物或衍生物与所述参比抗体

序列的可变区具有至少91、92、93、94、95、96、97、98或99%的序列同一性。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0083] 根据某些实施方式,根据本发明所述的抗体或抗体片段包含在SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:37中示出的重链可变区或与所述序列具有至少95%序列相似性的类似物。

[0084] 根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段包含在SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:38中示出的轻链可变区或与所述序列具有至少95%序列相似性的类似物。

[0085] 根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段包含重链和轻链,其中:(i)所述重链包含SEQ ID NO:39并且所述轻链包含SEQ ID NO:40;(ii)所述重链包含SEQ ID NO:35并且所述轻链包含SEQ ID NO:36;或(iii)所述重链包含SEQ ID NO:37并且所述轻链包含SEQ ID NO:38。也包括所述抗体或片段的与所述重链或轻链具有至少95%序列相似性的类似物。

[0086] 根据某些实施方式,所述类似物与上述抗体轻链或重链可变区具有至少96、97、98或99%的序列同一性。根据某些实施方式,所述类似物包含对所述高变区的一个或多个CDR序列、即在SEQ ID NO:25、26、27、28、29、30、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19和20中示出的CDR序列中的任一序列的不超过一个氨基酸替换、缺失或添加。每种可能性代表本发明的独立实施方式。根据某些实施方式,所述氨基酸替换是保守替换。

[0087] 根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段包含具有上文定义的轻链和重链区的高变区(HVR),其中1、2、3、4或5个氨基酸被替换、缺失和/或添加。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0088] 根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段包含具有上文定义的轻链和重链区的HVR,其中一个氨基酸被替换。根据特定实施方式,所述抗体或抗体片段包含如上所定义的CDR,其中一个氨基酸被替换。

[0089] 根据某些实施方式,所述分离的单克隆抗体或抗体片段包含选自下述的CDR组:

[0090] i. 6个CDR的组,其中:HC CDR1是SYYIH(SEQ ID NO:25);HC CDR2是WIYPGNVNTKYNERFKG(SEQ ID NO:26);HC CDR3是SNPYVMDY(SEQ ID NO:27);LC CDR1是KASQSVNNDVA(SEQ ID NO:28);LC CDR2是YASNRFT(SEQ ID NO:29);并且LC CDR3是QQAYRSPYT(SEQ ID NO:30);

[0091] ii. 6个CDR的组,其中:HC CDR1是AYNIH(SEQ ID NO:9),HC CDR2是YIYPNNGSGYNQKFMN(SEQ ID NO:10),HC CDR3是FDYDEAWFIY(SEQ ID NO:11),LC CDR1是SASSSVSYMH(SEQ ID NO:12),LC CDR2是DTSKLAS(SEQ ID NO:13),并且LC CDR3是FQSGSPYT(SEQ ID NO:14);和

[0092] iii. 6个CDR的组,其中:HC CDR1是TYYIH(SEQ ID NO:15),HC CDR2是WIYPGNVNTKNNEKFKV(SEQ ID NO:16),HC CDR3是SNPYVMDY(SEQ ID NO:17),LC CDR1是KASQSVSNDVA(SEQ ID NO:18),LC CDR2是YASNRYT(SEQ ID NO:19),并且LC CDR3是QQDYSSPYT(SEQ ID NO:20)。

[0093] 本发明还提供了单克隆抗体及其结合片段,其包含重链和轻链,其中所述链包含重链可变区序列和轻链可变区序列的组,所述组选自:

[0094] i. 包含SEQ ID NO:39和40的组;

[0095] ii. 包含SEQ ID NO:35和36的组;和

[0096] iii.包含SEQ ID NO:37和38的组。

[0097] 根据某些实施方式,所述抗体或抗体片段能够抑制人类连接蛋白4结合到在T细胞或NK细胞上表达的TIGIT。

[0098] 根据特定实施方式,所述mAb选自嵌合抗体和至少包含抗体的抗原结合部分的抗体片段。根据特定实施方式,所述抗体是嵌合抗体。根据其他实施方式,所述嵌合抗体包含人类恒定区。根据特定实施方式,所述抗体片段选自Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fd'、Fv、dAb、分离的CDR区、单链可变区(scFV)、单链抗体(scab)、“双体抗体”和“线性抗体”。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0099] 根据本发明,还提供了包含本文中描述的抗体的重链和轻链可变区的单链可变区(scFV)。根据某些实施方式,在所述可变区之间存在铰链区。

[0100] 根据某些实施方式,所述scFV序列阐述在SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:34或与其与所述序列具有至少90%序列相似性的类似物中。

[0101] 根据某些实施方式,所述抗体包含选自下述的恒定区序列:小鼠IgG1,小鼠IgG2a,小鼠IgG2b,小鼠IgG3,人类IgG1,人类IgG2,人类IgG3和人类IgG4。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0102] 根据某些特定实施方式,所述单克隆抗体是嵌合单克隆抗体。

[0103] 根据某些实施方式,所述嵌合抗体包含源自于人类的恒定区。

[0104] 根据某些实施方式,所述嵌合抗体的人类恒定区选自人类IgG1、人类IgG2、人类IgG3和人类IgG4。

[0105] 根据特定实施方式,所述抗体是人类IgG1。根据某些实施方式,提供了一种包含本文中描述的抗体的可变区的人类IgG。

[0106] 根据某些实施方式,提供了一种包含如上所述的抗体或其片段的偶联物。

[0107] 根据某些实施方式,所述偶联物包含载体蛋白。

[0108] 根据本发明的另一方面,提供了一种嵌合抗原受体(CAR),其包含能够结合到连接蛋白4的细胞外部分(结合结构域)。

[0109] 根据某些实施方式,所述CAR包含细胞外部分,其含有本文中描述的任何提供的抗体或其片段。

[0110] 根据某些实施方式,所述CAR包含连接蛋白4结合位点,所述结合位点包含选自下述的CDR组:

[0111] i.6个CDR的组,其中:HC CDR1是SYYIH(SEQ ID NO:25);HC CDR2是WIYPGNVNTKYNERFKG(SEQ ID NO:26);HC CDR3是SNPYVMDY(SEQ ID NO:27);LC CDR1是KASQSVNNDVA(SEQ ID NO:28);LC CDR2是YASNRFT(SEQ ID NO:29);并且LC CDR3是QQAYRSPYT(SEQ ID NO:30);

[0112] ii.6个CDR的组,其中:HC CDR1是AYNIH(SEQ ID NO:9),HC CDR2是YIYPNNGSGYNQKFMN(SEQ ID NO:10),HC CDR3是FDYDEAWFIY(SEQ ID NO:11),LC CDR1是SASSSVSYMH(SEQ ID NO:12),LC CDR2是DTSKLAS(SEQ ID NO:13),并且LC CDR3是FQSGSPYT(SEQ ID NO:14);和

[0113] iii.6个CDR的组,其中:HC CDR1是TYYIH(SEQ ID NO:15),HC CDR2是WIYPGNVNTKNNEKFKV(SEQ ID NO:16),HC CDR3是SNPYVMDY(SEQ ID NO:17),LC CDR1是

KASQSVSNDVA (SEQ ID NO:18), LC CDR2是YASNRYT (SEQ ID NO:19), 并且LC CDR3是QQDYSSPYT (SEQ ID NO:20)。

[0114] 根据某些实施方式,所述CAR包含含有SEQ ID NO:32或34的抗原结合结构域、跨膜结构域和细胞内T细胞信号传导结构域。

[0115] 根据一个方面,本发明提供了一种分离的核酸分子,其编码包含抗体或抗体片段的CAR,所述抗体或抗体片段包括连接蛋白4结合结构域,所述结合结构域包含选自下述的CDR组:

[0116] i. 6个CDR的组,其中:HC CDR1是SYYIH (SEQ ID NO:25);HC CDR2是WIYPGNVNTKYNERFKG (SEQ ID NO:26);HC CDR3是SNPYVMDY (SEQ ID NO:27);LC CDR1是KASQSVNNDVA (SEQ ID NO:28);LC CDR2是YASNRFT (SEQ ID NO:29);并且LC CDR3是QQAYRSPYT (SEQ ID NO:30);

[0117] ii. 6个CDR的组,其中:HC CDR1是AYNIH (SEQ ID NO:9),HC CDR2是YIYPNNGSGYNQKFMN (SEQ ID NO:10),HC CDR3是FDYDEAWFIY (SEQ ID NO:11),LC CDR1是SASSSVSYMH (SEQ ID NO:12),LC CDR2是DTSKLAS (SEQ ID NO:13),并且LC CDR3是FQSGSPYT (SEQ ID NO:14);和

[0118] iii. 6个CDR的组,其中:HC CDR1是TYYIH (SEQ ID NO:15),HC CDR2是WIYPGNVNTKNNEKFKV (SEQ ID NO:16),HC CDR3是SNPYVMDY (SEQ ID NO:17),LC CDR1是KASQSVSNDVA (SEQ ID NO:18),LC CDR2是YASNRYT (SEQ ID NO:19),并且LC CDR3是QQDYSSPYT (SEQ ID NO:20)。

[0119] 根据某些实施方式,提供了一种载体,所述载体包含SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:33中示出的多核苷酸序列或与所述序列具有至少95%相似性的类似物。

[0120] 根据某些实施方式,提供了一种被工程化改造以表达本文中描述的CAR的T细胞。

[0121] 根据另外的实施方式,提供了一种被工程化改造以表达本文中描述的CAR的NK细胞。

[0122] 根据本发明的另一方面,提供了编码对人类连接蛋白4具有高亲和性和特异性的单克隆抗体的多核苷酸序列,以及带有这些多核苷酸序列的载体和宿主细胞。

[0123] 根据某些实施方式,提供了编码上述重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列的多核苷酸序列。

[0124] 根据某些实施方式,所述多核苷酸序列编码能够与人类连接蛋白4内被下述抗体结合的表位结合的抗体或抗体片段或链:(i) 具有SEQ ID NO:39的重链可变区和SEQ ID NO:40的轻链可变区的单克隆抗体(在本文中被鉴定为hNec4.11);(ii) 具有SEQ ID NO:35的重链可变区和SEQ ID NO:36的轻链可变区的单克隆抗体(在本文中被鉴定为hNec4.01);或(iii) 具有SEQ ID NO:37的重链可变区和SEQ ID NO:38的轻链可变区的单克隆抗体(在本文中被鉴定为hNec4.05)。

[0125] 根据某些实施方式,所述多核苷酸序列编码包含选自下述的序列中示出的序列的抗体或抗体片段或链:SEQ ID NO:39和SEQ ID NO:40;SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36;或SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0126] 根据另一些实施方式,根据本发明所述的多核苷酸序列编码抗体或抗体片段或链,其包含:

[0127] i. 6个CDR的组,其中:HC CDR1是SYIYH (SEQ ID NO:25);HC CDR2是WIYPGNVNTKYNERFKG (SEQ ID NO:26);HC CDR3是SNPYVMDY (SEQ ID NO:27);LC CDR1是KASQSVNNDVA (SEQ ID NO:28);LC CDR2是YASNRFT (SEQ ID NO:29);并且LC CDR3是QQAYRSPYT (SEQ ID NO:30);

[0128] ii. 6个CDR的组,其中:HC CDR1是AYNIH (SEQ ID NO:9),HC CDR2是YIYPNNGSGYNQKFMN (SEQ ID NO:10),HC CDR3是FDYDEAWFIY (SEQ ID NO:11),LC CDR1是SASSSVSYMH (SEQ ID NO:12),LC CDR2是DTSKLAS (SEQ ID NO:13),并且LC CDR3是FQGSQSPYT (SEQ ID NO:14);和

[0129] iii. 6个CDR的组,其中:HC CDR1是TYIYH (SEQ ID NO:15),HC CDR2是WIYPGNVNTKNNEKFKV (SEQ ID NO:16),HC CDR3是SNPYVMDY (SEQ ID NO:17),LC CDR1是KASQSVSNDVA (SEQ ID NO:18),LC CDR2是YASNRYT (SEQ ID NO:19),并且LC CDR3是QQDYSSPYT (SEQ ID NO:20)。

[0130] 每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0131] 根据某些实施方式,上文定义的多核苷酸序列编码选自下述的分子:抗体,至少包含抗原结合部分的抗体片段,和包含所述抗体或抗体片段的抗体偶联物。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0132] 根据某些实施方式,所述编码单克隆抗体重链可变区的多核苷酸序列包含SEQ ID NO:21中示出的序列或其具有至少90%序列同一性的变体。

[0133] 根据某些实施方式,所述编码单克隆抗体重链可变区的多核苷酸序列包含SEQ ID NO:1中示出的序列或其具有至少90%序列同一性的变体。

[0134] 根据某些实施方式,所述编码单克隆抗体重链可变区的多核苷酸序列包含SEQ ID NO:5中示出的序列或其具有至少90%序列同一性的变体。

[0135] 根据某些实施方式,所述编码单克隆抗体轻链可变区的多核苷酸序列包含SEQ ID NO:23中示出的序列或其具有至少90%序列同一性的变体。

[0136] 根据某些实施方式,所述编码单克隆抗体轻链可变区的多核苷酸序列包含SEQ ID NO:3中示出的序列或其具有至少90%序列同一性的变体。

[0137] 根据某些实施方式,所述编码单克隆抗体轻链可变区的多核苷酸序列包含SEQ ID NO:7中示出的序列或其具有至少90%序列同一性的变体。

[0138] 根据某些实施方式,所述编码单克隆抗体重链可变区的多核苷酸序列包含SEQ ID NO:45中示出的序列或其具有至少90%序列同一性的变体。

[0139] 根据某些实施方式,所述编码单克隆抗体重链可变区的多核苷酸序列包含SEQ ID NO:41中示出的序列或其具有至少90%序列同一性的变体。

[0140] 根据某些实施方式,所述编码单克隆抗体重链可变区的多核苷酸序列包含SEQ ID NO:43中示出的序列或其具有至少90%序列同一性的变体。

[0141] 根据某些实施方式,所述编码单克隆抗体轻链可变区的多核苷酸序列包含SEQ ID NO:46中示出的序列或其具有至少90%序列同一性的变体。

[0142] 根据某些实施方式,所述编码单克隆抗体轻链可变区的多核苷酸序列包含SEQ ID NO:42中示出的序列或其具有至少90%序列同一性的变体。

[0143] 根据某些实施方式,所述编码单克隆抗体轻链可变区的多核苷酸序列包含SEQ ID

N0:44中示出的序列或其具有至少90%序列同一性的变体。

[0144] 根据某些实施方式,本发明提供了一种多肽,其包含由上文公开的至少一个多核苷酸序列编码的至少一个序列。

[0145] 另一方面,本发明提供了一种核酸构建物,其包含编码根据本发明所述的至少一个抗体链或其片段的核酸分子。根据某些实施方式,所述核酸构建物是质粒。

[0146] 根据某些实施方式,所述质粒包含在选自下述的序列中示出的至少一个多核苷酸序列:SEQ ID NO:45,SEQ ID NO:46,SEQ ID NO:41,SEQ ID NO:42,SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:44。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0147] 另一方面,本发明提供了一种细胞,其能够产生包含上文定义的特定CDR序列和/或特定重链和轻链可变区的抗体或抗体片段。

[0148] 根据某些实施方式,提供了一种细胞,其包含上文定义的至少一个多核苷酸序列。

[0149] 根据某些实施方式,所述细胞能够产生包含下述CDR组的单克隆抗体:

[0150] i. 6个CDR的组,其中:HC CDR1是SYIYH (SEQ ID NO:25);HC CDR2是WIYPGNVNTKYNERFKG (SEQ ID NO:26);HC CDR3是SNPYVMDY (SEQ ID NO:27);LC CDR1是KASQSVNNDVA (SEQ ID NO:28);LC CDR2是YASNRFT (SEQ ID NO:29);并且LC CDR3是QQAYRSPYT (SEQ ID NO:30);

[0151] ii. 6个CDR的组,其中:HC CDR1是AYNIH (SEQ ID NO:9),HC CDR2是YIYPNNGSGYNGKFMN (SEQ ID NO:10),HC CDR3是FDYDEAWFIY (SEQ ID NO:11),LC CDR1是SASSSVSYMH (SEQ ID NO:12),LC CDR2是DTSKLAS (SEQ ID NO:13),并且LC CDR3是FQSGSPYT (SEQ ID NO:14);和

[0152] iii. 6个CDR的组,其中:HC CDR1是TYIYH (SEQ ID NO:15),HC CDR2是WIYPGNVNTKNNEKFKV (SEQ ID NO:16),HC CDR3是SNPYVMDY (SEQ ID NO:17),LC CDR1是KASQSVSNDVA (SEQ ID NO:18),LC CDR2是YASNRYT (SEQ ID NO:19),并且LC CDR3是QQDYSSPYT (SEQ ID NO:20)。

[0153] 每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0154] 根据某些实施方式,所述生产单克隆抗体的细胞是杂交瘤细胞。

[0155] 根据本发明所述的抗体或其片段可以被附连到细胞毒性组成部分、放射活性组成部分或可识别的组成部分。

[0156] 根据另一方面,本发明提供了一种药物组合物,其包含以高亲和性和特异性识别人类连接蛋白4的至少一种抗体、抗体片段或其偶联物作为活性成分,和任选的至少一种可药用赋形剂、稀释剂、盐或载体,其中所述至少一种抗体或抗体片段能够抑制人类连接蛋白4与人类TIGIT的结合。

[0157] 根据某些实施方式,所述药物组合物包含特异性针对连接蛋白4的mAb,其中所述mAb未被偶联到任何毒素或抗肿瘤剂。

[0158] 根据某些实施方式,所述药物组合物包含能够与人类连接蛋白4内被选自下述的单克隆抗体结合的表位结合的单克隆抗体或其片段:具有上文公开的可变区和CDR序列的hNec4.11、hNec4.01和hNec4.05。

[0159] 根据某些实施方式,所述药物组合物包含至少一种单克隆抗体,所述单克隆抗体包含下述CDR组:

[0160] i.6个CDR的组,其中:HC CDR1是SEQ ID NO:25;HC CDR2是SEQ ID NO:26;HC CDR3是SEQ ID NO:27;LC CDR1是SEQ ID NO:28;LC CDR2是SEQ ID NO:29;并且LC CDR3是SEQ ID NO:30;

[0161] ii.6个CDR的组,其中:HC CDR1是SEQ ID NO:9;HC CDR2是SEQ ID NO:10;HC CDR3是SEQ ID NO:11;LC CDR1是SEQ ID NO:12;LC CDR2是SEQ ID NO:13;并且LC CDR3是SEQ ID NO:14;或

[0162] iii.6个CDR的组,其中:HC CDR1序列是SEQ ID NO:15;HC CDR2是SEQ ID NO:16;HC CDR3是SEQ ID NO:17;LC CDR1是SEQ ID NO:18;LC CDR2是SEQ ID NO:19;并且LC CDR3是SEQ ID NO:20。

[0163] 每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0164] 根据某些实施方式,所述药物组合物包含一种单克隆抗体或其片段,其包含具有选自SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:37的序列的重链可变区。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0165] 根据某些实施方式,所述药物组合物包含一种单克隆抗体或其片段,其包含具有选自SEQ ID NO:40、SEQ ID NO:36和SEQ ID NO:38的序列的轻链可变区。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0166] 根据特定实施方式,所述药物组合物包含一种单克隆抗体或其片段,其包含具有SEQ ID NO:39中示出的序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:40中示出的序列的轻链可变区。

[0167] 根据特定实施方式,所述药物组合物包含一种单克隆抗体或其片段,其包含具有SEQ ID NO:35中示出的序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:36中示出的序列的轻链可变区。

[0168] 根据特定实施方式,所述药物组合物包含一种单克隆抗体或其片段,其包含具有SEQ ID NO:37中示出的序列的重链可变区和具有SEQ ID NO:38中示出的序列的轻链可变区。

[0169] 还提供了包含根据本发明所述的至少一种抗体、抗体片段或抗体偶联物的药物组合物,其用于通过抑制连接蛋白4与NK细胞上表达的TIGIT的结合来恢复NK细胞毒性。

[0170] 根据某些实施方式,所述抗体、抗体片段或抗体偶联物能够抑制人类连接蛋白4与T-细胞上表达的TIGIT的结合。

[0171] 根据某些实施方式,根据本发明所述的药物组合物用于癌症免疫疗法或增强免疫应答。

[0172] 根据某些实施方式,所述药物组合物还包含表达TIGIT的人类淋巴细胞。

[0173] 根据某些实施方式,所述人类淋巴细胞是选自T细胞、NK细胞和自然杀伤T(NKT)细胞的杀伤细胞。

[0174] 根据某些实施方式,所述杀伤细胞是自体或同种异体的。

[0175] 根据某些实施方式,所述药物组合物包含表达TIGIT的自体或同种异体NK细胞。

[0176] 可以使用根据本发明所述的组合物治疗的癌症可以是表达连接蛋白4的任何癌症。根据某些实施方式,所述癌症过表达连接蛋白4。根据本发明的某些实施方式,所述癌症是转移癌症。根据某些实施方式,根据本发明所述的药物组合物用于在对象中抑制转移瘤

的形成或分布或减少转移瘤的总数。

[0177] 根据本发明的某些实施方式,所述癌症选自黑素瘤、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、结肠直肠癌、结肠癌、宫颈癌、肾癌、肺癌、甲状腺癌、前列腺癌、脑癌、肾癌、喉癌、咽癌、膀胱癌、肝癌、纤维肉瘤、子宫内膜细胞癌、成胶质细胞瘤、肉瘤、髓系白血病和淋巴瘤。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0178] 根据某些实施方式,所述癌症是实体癌症。根据某些特定实施方式,所述实体癌症选自乳腺癌、肺癌、膀胱癌、胰腺癌和卵巢癌。

[0179] 根据其他实施方式,所述癌症是血液癌症。根据某些实施方式,所述药物组合物如果用于治疗癌症,则与人类淋巴细胞一起使用。

[0180] 根据某些实施方式,所述人类淋巴细胞是选自T细胞、NK细胞和NKT细胞的杀伤细胞。

[0181] 根据某些实施方式,所述杀伤细胞是自体或同种异体的。

[0182] 根据某些实施方式,所述杀伤细胞是NK细胞。

[0183] 根据某些实施方式,根据本发明所述的药物组合物用于预防或治疗病毒感染。

[0184] 根据某些实施方式,所述药物组合物用于预防麻疹病毒感染。

[0185] 根据另一方面,本发明提供了一种使用上文定义的单克隆抗体或抗体片段来抑制人类连接蛋白4与TIGIT的结合的方法。

[0186] 根据另一方面,本发明提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包括向需要的对象给药结合到连接蛋白4的抗体或其片段,其中所述抗体或其片段未被偶联到任何毒素或抗肿瘤剂。

[0187] 根据另一方面,本发明提供了一种在需要的对象中增强免疫应答的方法,所述方法包括向所述对象给药治疗有效量的上文定义的单克隆抗体、抗体片段或抗体偶联物。

[0188] 根据另一方面,本发明提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包括向需要的对象给药一种药物组合物,其包含治疗有效量的以高亲和性和特异性识别人类连接蛋白4并且能够抑制它与它的配体TIGIT结合的至少一种抗体或其抗体片段。

[0189] 根据本发明的某些实施方式,所述治疗有效量导致所述对象中肿瘤尺寸或转移瘤数目的降低。

[0190] 根据某些实施方式,所述方法包括给药包含未被偶联到任何毒素或抗肿瘤剂的mAb的药物组合物。

[0191] 根据某些实施方式,所述治疗癌症的方法包括给药或进行至少一种另外的抗癌疗法。根据某些实施方式,所述另外的抗癌疗法是手术、化疗、放疗或免疫疗法。

[0192] 根据某些实施方式,所述治疗癌症的方法包括给药以高亲和性和特异性识别人类连接蛋白4的单克隆抗体和另外的抗癌药剂。根据某些实施方式,所述另外的抗癌药剂选自免疫调节剂、活化的淋巴细胞、激酶抑制剂和化学治疗剂。

[0193] 根据其他实施方式,所述另外的免疫调节剂是结合到人类连接蛋白4之外的抗原的抗体、抗体片段或抗体偶联物。

[0194] 根据某些实施方式,所述另外的免疫调节剂是针对免疫检查点分子的抗体。根据某些实施方式,所述另外的免疫调节剂是针对选自下述的免疫检查点分子的抗体:人类程序性细胞死亡蛋白1(PD-1),PD-L1和PD-L2,癌胚抗原相关细胞粘附分子1(CEACAM1),淋巴

细胞活化基因3 (LAG3), CD137, OX40 (也被称为CD134), 杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (KIR), TIGIT, PVR, CTLA-4, NKG2A, GITR和任何其他检查点分子或其组合。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0195] 根据某些实施方式, 所述抗癌药剂选自: 爱必妥, 阿糖胞苷, 氟达拉滨, 氟尿嘧啶, 巯基嘌呤, 甲氨蝶呤, 硫鸟嘌呤, 吉西他滨, 长春新碱, 长春碱, 长春瑞滨, 卡莫司汀, 洛莫司汀, 苯丁酸氮芥, 环磷酰胺, 顺铂, 卡铂, 异环磷酰胺, 二氯甲基二乙胺, 马法兰, 噻替派, 达卡巴嗪, 博来霉素, 放线菌素D, 柔红霉素, 多柔比星, 伊达比星, 丝裂霉素, 米托蒽醌, 普卡霉素, 依托泊苷, 替尼泊苷, 及其任何组合。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0196] 根据某些实施方式, 所述抗癌药剂是表皮生长因子受体 (EGFR) 抑制剂。根据某些实施方式, 所述EGFR抑制剂选自西妥昔单抗 (爱必妥®)、帕尼单抗 (Vectibix®) 和耐昔妥珠单抗 (Portrazza®)。根据某些实施方式, 所述EGFR抑制剂是西妥昔单抗 (爱必妥®)。

[0197] 根据本发明的某些实施方式, 所述对象是人类对象。

[0198] 根据本发明的某些实施方式, 所述用法进一步包括使用下调免疫共抑制受体的活性或表达的药剂。

[0199] 根据本发明的某些实施方式, 所述免疫细胞是T细胞。

[0200] 根据本发明的某些实施方式, 所述免疫共抑制受体选自PD-1、TIGIT、PVR、CTLA-4、LAG3、TIM3、BTLA、VISTA、B7H4、CD96、BY55、LAIR1、SIGLEC10和2B4。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0201] 根据一个方面, 本发明提供了一种调节免疫系统功能和/或活性的方法, 所述方法包括使用根据本发明所述的抗体调节连接蛋白4与TIGIT的结合。

[0202] 根据某些实施方式, 所述治疗癌症的方法包括在对象中阻止或减少转移瘤的形成、生长或扩散。

[0203] 根据某些实施方式, 所述治疗癌症的方法包括向需要的对象给药包含能够抑制人类连接蛋白4与人类TIGIT结合的mAb或其抗体片段的药物组合物, 并向所述对象进一步给药人类淋巴细胞。

[0204] 根据某些实施方式, 所述人类淋巴细胞是选自T细胞、NK细胞和NKT细胞的杀伤细胞。

[0205] 根据某些实施方式, 所述杀伤细胞是自体或同种异体的。

[0206] 根据某些实施方式, 所述杀伤细胞是NK细胞。

[0207] 本发明还提供了一种预防或治疗病毒感染的方法, 所述方法包括向对象给药至少一种特异性针对人类连接蛋白4的mAb或其至少包含抗原结合结构域的片段, 其中所述mAb或其片段能够抑制连接蛋白4与TIGIT的结合。

[0208] 根据某些实施方式, 提供了一种预防麻疹病毒感染的方法, 所述方法包括给药特异性针对人类连接蛋白4的mAb或其至少包含抗原结合结构域的片段, 其中所述mAb或其片段能够抑制麻疹病毒与上皮细胞上表达的人类连接蛋白4的结合。根据某些实施方式, 所述细胞是上皮细胞。

[0209] 根据一个方面, 本发明提供了一种在对象中诊断或预后癌症或传染病的方法, 所

述方法包括使用本文中所描述的至少一种抗体来确定所述对象的生物样品中连接蛋白4的表达水平。

[0210] 根据另一方面,本发明提供了一种治疗癌症的方法,所述方法包括向需要的对象给药治疗有效量的包含本文中所描述的CAR分子的细胞。

[0211] 根据另一方面,本发明还包括一种确定或定量连接蛋白4的表达的方法,所述方法包括将生物样品与抗体或抗体片段相接触并测量复合体形成的水平,其中所述抗体或抗体片段包含下述CDR组:

[0212] i. 6个CDR的组,其中:HC CDR1是SEQ ID NO:25;HC CDR2是SEQ ID NO:26;HC CDR3是SEQ ID NO:27;LC CDR1是SEQ ID NO:28;LC CDR2是SEQ ID NO:29;并且LC CDR3是SEQ ID NO:30;

[0213] ii. 6个CDR的组,其中:HC CDR1是SEQ ID NO:9;HC CDR2是SEQ ID NO:10;HC CDR3是SEQ ID NO:11;LC CDR1是SEQ ID NO:12;LC CDR2是SEQ ID NO:13;并且LC CDR3是SEQ ID NO:14;或

[0214] iii. 6个CDR的组,其中:HC CDR1序列是SEQ ID NO:15;HC CDR2是SEQ ID NO:16;HC CDR3是SEQ ID NO:17;LC CDR1是SEQ ID NO:18;LC CDR2是SEQ ID NO:19;并且LC CDR3是SEQ ID NO:20。

[0215] 根据某些实施方式,确定和定量方法可以体外或离体进行,或者可用于诊断与连接蛋白4的表达相关的病症。根据本发明所述的抗体也可用于设置筛选方法。例如,可以构建酶联免疫吸附测定法(ELISA)或放射免疫测定法(RIA)以及诸如IHC或FACS的方法,使用所述抗体和本领域中已知的方法测量分泌或细胞结合的多肽的水平。

[0216] 根据某些实施方式,所述用于检测或定量细胞上表达的或分泌到生物培养基中的连接蛋白4的存在的方法包括下述步骤:

[0217] i. 将样品与特异性针对人类连接蛋白4的抗体或其至少包含抗原结合部分的抗体片段温育;

[0218] ii. 使用可检测探针检测结合的连接蛋白4。

[0219] 根据某些实施方式,所述方法还包括下述步骤:

[0220] iii. 将(ii)的量与从含有已知量的连接蛋白4的参比样品获得的标准曲线进行比较;和

[0221] iv. 从所述标准曲线计算所述样品中所述连接蛋白4的量。

[0222] 根据某些特定实施方式,所述样品是体液。

[0223] 根据某些实施方式,所述方法在体外或离体进行。

[0224] 还提供了一种用于测量生物样品中连接蛋白4的表达或存在的试剂盒,所述试剂盒包含根据本发明所述的至少一种抗体或抗体片段。根据某些实施方式,所述试剂盒包含的抗体或抗体片段包含下述CDR组:

[0225] i. 6个CDR的组,其中:HC CDR1是SEQ ID NO:25;HC CDR2是SEQ ID NO:26;HC CDR3是SEQ ID NO:27;LC CDR1是SEQ ID NO:28;LC CDR2是SEQ ID NO:29;并且LC CDR3是SEQ ID NO:30;

[0226] ii. 6个CDR的组,其中:HC CDR1是SEQ ID NO:9;HC CDR2是SEQ ID NO:10;HC CDR3是SEQ ID NO:11;LC CDR1是SEQ ID NO:12;LC CDR2是SEQ ID NO:13;并且LC CDR3是SEQ

ID NO:14;或

[0227] iii.6个CDR的组,其中:HC CDR1序列是SEQ ID NO:15;HC CDR2是SEQ ID NO:16;HC CDR3是SEQ ID NO:17;LC CDR1是SEQ ID NO:18;LC CDR2是SEQ ID NO:19;并且LC CDR3是SEQ ID NO:20。

[0228] 根据一个方面,本发明提供了一种用于检测癌症的药剂盒,所述诊断药剂盒包含本文中所公开的抗体或其抗体片段。

[0229] 根据某些实施方式,本发明提供了一种诊断免疫相关疾病或增殖性疾病、评估其严重性或对其分期的方法,所述方法包括使用根据本发明所述的抗体或其片段或偶联物确定来自于对象的样品中连接蛋白4的表达、浓度或活性,并将所述连接蛋白4的表达或活性与连接蛋白4表达、浓度或活性的参比量进行比较。所述参比量可以从获自正常对象、处于所述疾病的不同阶段的同一对象的样品获得,或者从大群对象的临床数据确定。

[0230] 从后文中给出的详细描述,本发明的其他实施方式和完整适用性范围将变得显而易见。然而,应该理解,所述详细描述和具体实例尽管指明了本发明的优选实施方式,但仅仅作为说明提供,因为对于本领域技术人员来说,从该详细描述,本发明的精神和范围之内的各种不同改变和修改将变得显而易见。

附图说明

[0231] 图1参与免疫(NK)和肿瘤细胞上的TIGIT信号传导的受体的示意图。描绘了抗连接蛋白4Ab。

[0232] 图2抗体克隆hNec4.05和hNec4.01显示出TIGIT-连接蛋白4相互作用的最佳阻断能力。所述图描绘了用连接蛋白4转染的RAJI伯基特淋巴瘤细胞的FACS染色的平均荧光强度(MFI)值。将所述细胞与0.2 μ g不同克隆(如所示)温育,然后与3 μ g TIGIT-Ig温育,然后用抗人类第二抗体染色。

[0233] 图3抗体克隆与连接蛋白4的结合亲和性的定量。荧光团标记的连接蛋白4-Ig与抗体克隆hNec4.05和克隆hNec4.01的结合使用微量热泳来观察。用至少三个独立的蛋白制备物重复测量,并示出了结果的平均值($\pm$ SEM.)。

[0234] 图4A和4B抗体克隆hNec4.05和hNec4.01阻断连接蛋白4并提高NK细胞毒性。将³⁵S甲硫氨酸标记的(4A)用连接蛋白4转染的RAJI伯基特淋巴瘤细胞和(4B)LNCap前列腺癌细胞(天然表达连接蛋白4)与1 μ g/孔的作为对照抗体的小鼠IgG1或抗连接蛋白4抗体hNec4.01或hNec4.05温育。1h后,向所述细胞增添NK细胞并温育5小时。将在NK:癌细胞的各种不同的效应细胞:靶细胞(E:T)比率下的平均特异性灭杀($\pm$ s.d.)进行作图。*指示hNec4.01和hNec4.05克隆与对照抗体相比的显著效应($p<0.05$)。图示出了进行的三个实验中的一个代表性实验。使用均为乳腺癌细胞系的MCF-7、MDA-MB-453、SK-BR-3和T47D细胞确定了相同的效应。

[0235] 图5A-5C抗体克隆不结合鼠类连接蛋白4。(A)用鼠类连接蛋白4(标注为鼠连接蛋白4)转染并用商品化抗鼠类连接蛋白4mAb(克隆356704,其不能用于流式细胞术)检测的RAJI细胞的Western印迹。将表达与表达空载体的RAJI细胞(标注为空)进行比较。hGAPDH染色被用作载样对照。(B-C)用鼠类连接蛋白4转染的RAJI细胞(黑线柱状图)的FACS染色。细胞用0.2 μ g的(B)克隆hNec4.01或(C)克隆hNec4.05染色。

[0236] 图6A-6C连接蛋白4-连接蛋白1相互作用的阻断。(A-B) 用人类连接蛋白4转染的RAJI细胞的FACS染色。将细胞与1 μ g的(A) 克隆hNec4.01或(B) 克隆hNec4.05预温育,然后与3 μ g连接蛋白1-Ig温育(黑线柱状图)。没有阻断的染色显示为灰色线。灰色实心柱状图是仅仅第二抗体的背景对照染色。(C) A和B的FACS染色的平均荧光强度(MFI)值。

[0237] 图7A-7C抗连接蛋白4mAb的体内效应。(A) 将SCID-浅褐色小鼠用 5×10^6 个用空载体转染(EV)或过表达(OE)连接蛋白4的Raji细胞单独地(左图,无NK)或与 1×10^6 个NK细胞一起(右图,NK)皮下植入。(B) 将SCID-浅褐色小鼠用 5×10^6 个过表达连接蛋白4的Raji细胞与 1×10^6 个NK细胞一起皮下植入。将小鼠用75 μ g对照Ab或抗连接蛋白4克隆hNec4.05 mAb,每周两次通过腹膜内注射进行治疗。(C) 将SCID-浅褐色小鼠用 5×10^6 个MDA-MB-453细胞单独地或与 7×10^5 个NK细胞一起皮下植入。然后将小鼠如(B)中所述进行治疗。在肿瘤注射后第21(A)、27(B)或23(C)天收获肿瘤并称重。对于所有小鼠实验组来说 $N=7$ 。(*) $p<0.05$ 。

[0238] 图8A-8C抗体克隆hNec4.05和hNec4.11结合到细胞表面连接蛋白-4。(A) 通过FACS分析评估结合到人类细胞系MDA-MD-453上表达的连接蛋白-4的抗体。示出了对于每种克隆来说在Ab结合的滴定(范围为20-0.01nM)后计算的EC50值和最大结合信号。值得注意的是,使用其中鼠类IgG1 Fc被人类Fc代替的嵌合版本的Ab时观察到相似的结果。(B) 抗体结合到用食蟹猴(Cyno)-连接蛋白-4转染的CHO细胞,并如A中所述进行分析。(C) 抗体结合到用鼠类连接蛋白-4转染的CHO细胞,并如A中所述进行分析。ND-未检测到。

[0239] 图9A-9D抗体克隆hNec4.05和hNec4.11阻断连接蛋白-4与其配体TIGIT和连接蛋白-1的结合。通过FACS分析来评估连接蛋白-4配体的结合。将用人类连接蛋白-4转染的CHO细胞与均为20 μ g/ml的人类TIGIT-Ig(A&C)或人类连接蛋白-1-Ig(B&D)在含有或不含均为8 μ g/ml的抗连接蛋白-4克隆hNec4.05(A&B)或克隆hNec4.11(C&D)的情况下温育。在所有情况下观察到抗连接蛋白-4Ab的强有力的结合抑制。残余的信号可能是由配体结合到被CHO细胞表达的其他受体例如PVR造成的,这不受所述抗连接蛋白-4Ab影响。

[0240] 图10A-10B人类IgG1嵌合Ab克隆hNec4.05和hNec4.11在肿瘤细胞存在下增强NK细胞活化。将人类NK细胞(效应细胞,E)与靶细胞(T)HT1376(A)和MDA-MD-453(B)以2:1的E:T比例温育。温育在存在12 μ g/ml嵌合克隆hNec4.05和hNec4.11或对照hIgG1的情况下进行。2小时后,通过CD107a表达的FACS分析来测定NK细胞的脱颗粒和活化状态。将在对照hIgG1存在下NK细胞的脱颗粒设定为1,并计算相应的诱导倍数。示出的是2-3个重复实验的平均值及其归一化的SD。

[0241] 图11A-11D由hNec4.11驱动 CAR-T在表达连接蛋白-4的肿瘤细胞存在下引起特异性T细胞活化。(A) CART构建物的示意图。(B) 将Jurkat细胞用编码所述构建物和GFP的慢病毒粒子转导。正如通过GFP表达的FACS分析所判断的,转导效率高于99%。(C) 将亲代Jurkat细胞或表达所述CART构建物的Jurkat细胞(Jurkat pHAGE2.4.11)与靶细胞HT1376或MDA-MD-453(MDA-453)温育48小时,然后收集培养基并测试IL-2浓度,作为评估Jurkat活化的方式。IL-2的分泌被CART表达显著诱导(*=0.003,**=0.00014;双尾student检验)。示出了进行的两次实验中的代表性实验。(D) 将来自于健康供体的PBMC用所述CART构建物转导。将所述CART PBMC与HT1376细胞在多个E:T比例(在X轴上标注)下温育。在用星号标注之处靶细胞的灭杀是显著的(***) $p<7 \times 10^{-5}$ 。

具体实施方式

[0242] 本发明提供了特异性针对人类连接蛋白4的有效的单克隆抗体。本发明还提供了所述mAb的生产和作为治疗剂的用途。具体来说,本发明的mAb可用于恢复和增强免疫细胞的抗肿瘤杀伤活性,并且可用作诊断试剂。

[0243] 尽管现有的出版物显示了抗连接蛋白4mAb用于将药物靶向到过表达连接蛋白4的肿瘤细胞的用途,但本发明首次公开了通过抑制连接蛋白4与免疫细胞例如NK细胞的抑制性受体TIGIT的结合来直接增强免疫细胞以对抗肿瘤细胞的单克隆抗体。

[0244] 本发明的抗体克服了目前被试验用于治疗癌症的特异性针对TIGIT的抗体的缺点。据称,抗TIGIT抗体可通过阻断所有表达TIGIT受体的免疫细胞而使整个免疫系统趋向活化,并可能引起自身免疫作用,而本发明的抗连接蛋白4抗体仅靶向表达已知在肿瘤中过表达的连接蛋白4的细胞。

[0245] 此外,某些本发明的抗体也可以导致肿瘤细胞的免疫不依赖性灭杀,这可能是通过它们阻断连接蛋白4与连接蛋白1的相互作用的能力。

[0246] 当在本文中使用时,术语“抗原”是指能够引发抗体形成并被抗体特异性结合的分子或分子的一部分。抗原可能具有一个或一个以上的表位。上文提到的特异性结合意指所述抗原以高度选择性的方式与其相应抗体反应,并且不与可能由其他抗原激起的大量其他抗体反应。根据本发明的某些实施方式,抗原是连接蛋白4。

[0247] 当在本文中使用时,术语“连接蛋白4”或“连接蛋白细胞粘附分子4”是指一种单次跨膜I型膜蛋白,具有510个氨基酸和55454Da的分子量,也被称为PVRL4、LNIR、PRR4和EDSS1。所述连接蛋白4含有两个免疫球蛋白样(Ig样)C2型结构域和一个Ig样V型结构域。它通过反式-同嗜性和-异嗜性相互作用参与细胞粘附。可溶形式通过在细胞表面处被金属蛋白酶ADAM17/TACE蛋白水解切割产生,并且分泌形式存在于乳腺肿瘤细胞系和乳腺肿瘤患者两者中。根据本发明的示例性连接蛋白4在如下SwissPort、UniPort和GenBank符号或登记号中示出:Q96NY8-NECT4_HUMAN;Q96NY8;B4DQW3;Q96K15;Q96NY8-1;Q96NY8-2;ENSP00000356991;NP_112178.2;XP_005245565.1;XP_011508323.1;XP_011508324.1;或XP_011508325.1。

[0248] 根据本发明所述的抗体或其片段结合到连接蛋白4中的表位。具体来说,所述抗体结合到连接蛋白4蛋白质序列的胞外域(细胞外部分)内的表位。

[0249] 当在本文中使用时,术语“抗原决定簇”或“表位”是指抗原分子的与特定抗体特异性反应的区域。应用本领域中已知的方法,源自于表位的肽序列可以单独地或与载体在组成部分联合,用于免疫动物并产生另外的多克隆或单克隆抗体。源自于表位的分离的肽可用于诊断方法中以检测抗体。

[0250] 应该指出,亲和性可以使用已知方法例如表面等离子体共振(SPR)(描述在Scarano S,Mascini M,Turner AP,Minunni M.,用于基于亲和性的生物传感器的表面等离子体共振成像(Surface plasmon resonance imaging for affinity-based biosensors),Biosens Bioelectron.2010,25:957-66中)来定量,并且可以使用例如解离常数Kd来计算,使得较低的Kd反映出较高的亲和性。

[0251] 抗体或免疫球蛋白包含通过二硫键连接在一起的两条重链和两条轻链,每条轻链通过二硫键以“Y”形构型连接到相应的重链。抗体的蛋白水解消化得到Fv(可变片段)和Fc

(结晶片段) 结构域。抗原结合结构域Fab包括其中多肽序列变化的区域。术语 $F(ab')_2$ 表示通过二硫键连接在一起的两个Fab'臂。抗体的中心轴被称为Fc片段。每条重链在一个末端处具有可变结构域(V_H)，后面跟有多个恒定结构域(C_H)。每条轻链在一个末端处具有可变结构域(V_L)并在其另一个末端处具有恒定结构域(C_L)，所述轻链可变结构域与重链的可变结构域对齐，并且所述轻链恒定结构域与重链的第一恒定结构域(CH1)对齐。每对轻链和重链的可变结构域形成抗原结合部位。轻链和重链上的结构域具有相同的总体结构，并且每个结构域包含4个序列相对保守的构架区，其通过3个被称为互补决定区(CDR 1-3)的高变结构域相连。这些结构域对所述抗原结合部位的特异性和亲和性有贡献。

[0252] 来自于给定重链或轻链可变序列的CDR的鉴定或确定，通常使用本领域中已知的几种方法之一来进行。例如，这种确定按照Kabat (Wu T.T和Kabat E.A., J Exp Med, 1970; 132:211-50) 和IMGT (Lefranc M-P等, Dev Comp Immunol, 2003, 27:55-77) 来进行。

[0253] 当使用术语“具有某个序列的CDR”或类似术语时，它包括其中所述CDR包含所述指定的序列的选项以及其中所述CDR由所述指定的序列构成的选项。

[0254] 抗体的抗原特异性是基于高变区(HVR)，即轻链和重链两者的一起形成抗原结合部位的独特CDR序列。

[0255] 重链的同种型(γ 、 α 、 δ 、 ϵ 或 μ)决定免疫球蛋白类别(分别为IgG、IgA、IgD、IgE或IgM)。轻链具有两种同种型(κ 或 λ)。两种同种型存在于所有抗体类别中。

[0256] 术语“抗体”以最广泛的意义使用，并且包括单克隆抗体(包括全长或完整单克隆抗体)、多克隆抗体、多价抗体和长度足以显示出所需生物活性即与人类连接蛋白4的结合的抗体片段。

[0257] 根据本发明所述的一种或多种抗体包括完整抗体例如多克隆抗体或单克隆抗体(mAb)及其蛋白水解片段例如Fab或 $F(ab')_2$ 片段。单链抗体也在本发明的范围之内。

[0258] 抗体片段

[0259] “抗体片段”只包含完整抗体的一部分，通常包括所述完整抗体的抗原结合部位，并因此保留结合抗原的能力。本定义涵盖的抗体片段的实例包括(i) Fab片段，其具有 V_L 、 C_L 、 V_H 和 $CH1$ 结构域；(ii) Fab'片段，其是在 $CH1$ 结构域的C-端处具有一个或多个半胱氨酸残基的Fab片段；(iii) 具有 V_H 和 $CH1$ 结构域的Fd片段；(iv) 具有 V_H 和 $CH1$ 结构域并且在 $CH1$ 结构域的C-端处具有一个或多个半胱氨酸残基的Fd'片段；(v) 具有抗体的单一臂的 V_L 和 V_H 结构域的Fv片段；(vi) 由 V_H 结构域构成的dAb片段(Ward等, Nature 1989, 341, 544-546)；(vii) 分离的CDR区；(viii) $F(ab')_2$ 片段，其是包括在铰链区通过二硫桥相连的两个Fab'片段的二价片段；(ix) 单链抗体分子(例如单链Fv; scFv) (Bird等, Science 1988, 242, 423-426; 和Huston等, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 1988, 85, 5879-5883)；(x) 具有两个抗原结合部位的“双体抗体”，其包含在同一多肽链中与轻链可变结构域(V_L)相连的重链可变结构域(V_H) (参见例如EP 404,097; WO 93/11161; 和Hollinger等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993, 90, 6444-6448)；(xi) “线性抗体”，其包含一对串联的Fd区段(V_H - $CH1$ - V_H - $CH1$)，所述区段与互补的轻链多肽一起，形成一对抗原结合区(Zapata等, Protein Eng., 1995, 8, 1057-1062; 和美国专利号5,641,870)。

[0260] 已开发了用于生产抗体片段的各种不同技术。传统上，这些片段通过完整抗体的蛋白水解消化产生(参见例如Morimoto等, Journal of Biochemical and Biophysical

Methods 24:107-117(1992)和Brennan等,Science,229:81(1985))。然而,这些片段现在可以由重组宿主细胞直接产生。例如,所述抗体片段可以从抗体噬菌体文库分离。或者,Fab'-SH片段可以直接从大肠杆菌回收并化学偶联,以形成F(ab')₂片段(Carter等,Bio/Technology 10:163-167(1992))。根据另一种方法,F(ab')₂片段可以从重组宿主细胞培养物直接分离。用于生产抗体片段的其他技术对于专业技术人员来说将是显而易见的。在其他实施方式中,所述选择的抗体是单链Fv片段(scFv)。

[0261] 单链抗体可以是具有抗原结合能力并包含与免疫球蛋白轻链和重链的可变区同源或类似的氨基酸序列的单链复合多肽,即连接的V_H-V_L或单链Fv(scFv)。用于生产单链抗体的技术(美国专利号4,946,778)可以改编以适用于生产针对连接蛋白4的单链抗体。

[0262] 当在本文中使用时,术语“单克隆抗体”(mAb)是指从基本上均质的抗体群体获得的抗体,即构成所述群体的各个抗体除了可能少量存在的可能天然存在的突变之外是一致的。单克隆抗体是高度特异性的,针对单一抗原。此外,与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物相反,每个单克隆抗体针对所述抗原上的单一决定簇。修饰语“单克隆”不应被解释为需要通过任何特定方法生产所述抗体。mAb可以通过本领域技术人员已知的方法获得。例如,按照本发明使用的单克隆抗体可以通过首先由Kohler等,Nature1975,256,495描述的杂交瘤方法来制造,或者可以通过重组DNA方法来制造(参见例如美国专利号4,816,567)。单克隆抗体也可以使用例如在Clackson等,Nature 1991,352,624-628或Marks等,J.Mol.Biol.,1991,222:581-597中描述的技术,从噬菌体抗体文库来分离。

[0263] 通过功能性可变重链(VH)和可变轻链(VL)基因的快速鉴定和克隆来设计和开发源自于单克隆抗体的重组单价抗原结合分子以及被优化以用于在重组细菌中表达的合成DNA序列的设计和克隆,被描述在Fields等,2013,8(6):1125-48中。

[0264] 本发明的mAb可以是包括IgG、IgM、IgE、IgA和IgD的任何免疫球蛋白类别。生产mAb的杂交瘤可以在体外或体内培养。mAb的高滴度可以通过体内生产来获得,其中将来自于个体杂交瘤的细胞腹膜内注射到原始初免的Balb/c小鼠中,以产生含有高浓度所需mAb的腹水。mAb可以使用本领域技术人员公知的方法从这些腹水或从培养上清液纯化。

[0265] 也考虑到了与本发明的抗体的高变区具有特异性免疫反应性的抗独特型抗体。

[0266] 本发明提供了一种包含抗原结合结构域(ABD)的单克隆抗体或抗体片段,所述抗原结合结构域包含轻链的三个CDR和重链的三个CDR,其中所述ABD与包含下述链的单克隆小鼠抗体的ABD具有至少90%的序列同一性或相似性:(i)包含氨基酸序列SEQ ID NO:39的可变重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:40的可变轻链(在本文中被鉴定为hNec4.11);(ii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:35的可变重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:36的可变轻链(在本文中被鉴定为hNec4.01);或(iii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:37的可变重链和包含氨基酸序列SEQ ID NO:38的可变轻链(在本文中被鉴定为hNec4.05)。这些抗体可以具有与抗体hNec4.11、hNec4.01或hNec4.05的相应ABD具有至少93%、至少94%、至少95%、至少96、至少97、至少98、至少99%序列同一性或相似性或100%序列同一性的ABD结构域。

[0267] 序列同一性是两个不同序列之间精确匹配的氨基酸或核苷酸的量。序列相似性允许将氨基酸的保守替换确定为相同氨基酸。

[0268] 本发明还提供了根据本发明所述的抗体分子的保守氨基酸变体。根据本发明所述

的变体也可以被制造成保留所述被编码的蛋白质的总体分子结构。给定构成所公开的蛋白质产物的各个氨基酸的性质,专业技术人员将会认识到一些合理的替换。氨基酸替换即“保守替换”,可以例如在所涉及的残基的极性、电荷、溶解性、疏水性、亲水性和/或两亲性方面的相似性的基础上做出。当在本文中使用时,术语“抗体类似物”是指从另一个抗体通过一个或多个保守氨基酸替换衍生的抗体。

[0269] 当在本文中使用时,术语“抗体变体”是指包含本发明的抗体的任何分子。例如,其中所述抗体或其抗原结合片段被连接到另一个化学组成部分的融合蛋白被认为是抗体变体。

[0270] 所述抗体序列的类似物和变体也在本发明的范围之内。它们包括但不限于所述序列内氨基酸的保守和非保守替换、插入和缺失。这些修饰和得到的抗体类似物或变体在本发明的范围之内,只要它们提供或甚至提高所述抗体与人类连接蛋白4的结合即可。

[0271] 本领域技术人员已知的氨基酸的保守替换在本发明的范围之内。保守氨基酸替换包括将一个氨基酸用具有相同类型的官能团或侧链例如脂族、芳香族、带正电荷、带负电荷的官能团或侧链的另一个氨基酸代替。这些替换可能增强口服生物可利用性、穿透性和向特定细胞群的靶向、免疫原性等。专业技术人员将会认识到,对肽、多肽或蛋白质序列做出的改变、添加或缺失所述被编码序列中的单个氨基酸或小比例氨基酸的各个替换、缺失或添加,在所述改变导致氨基酸被化学上相似的氨基酸替换的情况下,是“保守修饰的变体”。提供功能上相似的氨基酸的保守替换表在本领域中是公知的。例如,根据本领域中已知的一个表,下面的6个组各自含有彼此为保守替换的氨基酸:

[0272] 1) 丙氨酸(A),丝氨酸(S),苏氨酸(T);

[0273] 2) 天冬氨酸(D),谷氨酸(E);

[0274] 3) 天冬酰胺(N),谷氨酰胺(Q);

[0275] 4) 精氨酸(R),赖氨酸(K);

[0276] 5) 异亮氨酸(I),亮氨酸(L),甲硫氨酸(M),缬氨酸(V);和

[0277] 6) 苯丙氨酸(F),酪氨酸(Y),色氨酸(W)。

[0278] 应该强调的是,所述变体链序列使用特异性引物通过测序方法来确定。对同一序列使用不同的测序方法,由于技术问题和不同的引物,可能产生略微不同的序列,特别是在序列末端中。因此,伴随本申请详细说明了所述抗连接蛋白4抗体可变链序列的不同变体。

[0279] 当在本文中使用时,术语“具有抗体的抗原结合部分的分子”和“抗原结合片段”打算不仅包括任何同种型和通过任何动物细胞系或微生物产生的完整的免疫球蛋白分子,而且包括其抗原结合反应性部分,包括但不限于Fab片段、Fab'片段、F(ab')₂片段、其重链和/或轻链的可变部分、Fab微型抗体(参见例如W0 93/15210、美国专利申请08/256,790、W0 96/13583、美国专利申请08/817,788、W0 96/37621、美国专利申请08/999,554)和并入这种反应性部分的单链抗体,以及其中已物理插入有这些抗体反应性部分的任何其他类型的分子。这些分子可以通过任何已知的技术包括但不限于酶切割、肽合成或重组技术来提供。

[0280] 本文中的单克隆抗体特别包括“嵌合”抗体,其中重链和/或轻链的一部分与源自于特定物种或属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列同一或同源,而所述链的其余部分与源自于另一个物种或属于另一个抗体类别或亚类的抗体中的相应序列同一或同源,以及这些“嵌合”抗体的片段,只要它们表现出所需生物活性即可(美国专利号4,816,567;

和Morrison等,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855(1984))。此外,可以进行互补决定区(CDR)接枝,以改变抗体分子的某些性质,包括亲和性或特异性。CDR接枝的非限制性实例公开在美国专利5,225,539中。

[0281] 嵌合抗体是其不同部分源自于不同动物物种的分子,例如那些具有源自于鼠类mAb的可变区和人类免疫球蛋白恒定区的分子。具有基本上来自于人类抗体(被称为受体抗体)的可变区构架残基和基本上来自于小鼠抗体(被称为供体抗体)的CDR的抗体,也被称为人源化抗体。嵌合抗体主要用于在应用中降低免疫原性和在生产中提高产率,例如在鼠类mAb具有从杂交瘤生产的更高产率但在人类中更高的免疫原性的情况下,使用人类/鼠类嵌合mAb。嵌合抗体和它们的生产方法在本领域中是已知的(例如PCT专利申请WO 86/01533、WO 97/02671、WO 90/07861、WO 92/22653和美国专利5,693,762、5,693,761、5,585,089、5,530,101和5,225,539)。

[0282] 根据某些特定实施方式,所述单克隆抗体是嵌合单克隆抗体。

[0283] 根据某些实施方式,所述嵌合抗体包含源自于人类的恒定区。

[0284] 根据某些实施方式,所述嵌合抗体的人类恒定区选自人类IgG1、人类IgG2、人类IgG3和人类IgG4。

[0285] 根据特定实施方式,提供了一种识别人类连接蛋白4的嵌合单克隆抗体,其包含:

[0286] i.6个CDR的组,其中:HC CDR1是(SEQ ID NO:25);HC CDR2是(SEQ ID NO:26);HC CDR3是(SEQ ID NO:27);LC CDR1是(SEQ ID NO:28);LC CDR2是(SEQ ID NO:29);并且LC CDR3是(SEQ ID NO:30);

[0287] ii.6个CDR的组,其中:HC CDR1是(SEQ ID NO:9);HC CDR2是(SEQ ID NO:10);HC CDR3是(SEQ ID NO:11);LC CDR1是(SEQ ID NO:12);LC CDR2是(SEQ ID NO:13);并且LC CDR3是(SEQ ID NO:14);或

[0288] iii.6个CDR的组,其中:HC CDR1序列是(SEQ ID NO:15);HC CDR2是(SEQ ID NO:16);HC CDR3是(SEQ ID NO:17);LC CDR1是(SEQ ID NO:18);LC CDR2是(SEQ ID NO:19);并且LC CDR3是(SEQ ID NO:20)。

[0289] 根据一个方面,本发明提供了一种CAR,其包含特异性结合到连接蛋白4的抗体片段。

[0290] 根据某些实施方式,所述CAR包含:i)可以特异性结合到连接蛋白4的特异性结合剂;ii)间隔物或铰链结构域;iii)将所述CAR锚定在T细胞膜内的跨膜结构域(TM);iv)在所述T细胞内传递信号的胞内结构域。

[0291] 根据某些实施方式,所述CAR包含选自下述的CDR组:

[0292] i.6个CDR的组,其中:HC CDR1是SYIYIH(SEQ ID NO:25);HC CDR2是WIYPGNVNTKYNERFKG(SEQ ID NO:26);HC CDR3是SNPYVMDY(SEQ ID NO:27);LC CDR1是KASQSVNNDVA(SEQ ID NO:28);LC CDR2是YASNRFT(SEQ ID NO:29);并且LC CDR3是QQAYRSPYT(SEQ ID NO:30);

[0293] ii.6个CDR的组,其中:HC CDR1是AYNIH(SEQ ID NO:9);HC CDR2是YIYPNNGSGGYNQKFMN(SEQ ID NO:10);HC CDR3是FDYDEAWFIY(SEQ ID NO:11);LC CDR1是SASSSVSYMH(SEQ ID NO:12);LC CDR2是DTSKLAS(SEQ ID NO:13);并且LC CDR3是FQSGSGPYT(SEQ ID NO:14);和

[0294] iii.6个CDR的组,其中:HC CDR1序列是TYYIH(SEQ ID NO:15);HC CDR2是WIYPGNVNTKNNEKFKV(SEQ ID NO:16);HC CDR3是SNPYVMDY(SEQ ID NO:17);LC CDR1是KASQSVSNDVA(SEQ ID NO:18);LC CDR2是YASNRYT(SEQ ID NO:19);并且LC CDR3是QQDYSSPYT(SEQ ID NO:20)。

[0295] 根据一个方面,本发明提供了一种编码CAR的分离的核酸分子,所述CAR包含包括连接蛋白4结合结构域的抗体或抗体片段,所述结合结构域包含选自下述的CDR组:

[0296] i.6个CDR的组,其中:HC CDR1是SYIYH(SEQ ID NO:25);HC CDR2是WIYPGNVNTKYNERFKG(SEQ ID NO:26);HC CDR3是SNPYVMDY(SEQ ID NO:27);LC CDR1是KASQSVNNDVA(SEQ ID NO:28);LC CDR2是YASNRFT(SEQ ID NO:29);并且LC CDR3是QQAYRSPYT(SEQ ID NO:30);

[0297] ii.6个CDR的组,其中:HC CDR1是AYNIH(SEQ ID NO:9);HC CDR2是YIYPNNGSGYNQKFMN(SEQ ID NO:10);HC CDR3是FDYDEAWFIY(SEQ ID NO:11);LC CDR1是SASSSVSYMH(SEQ ID NO:12);LC CDR2是DTSKLAS(SEQ ID NO:13);并且LC CDR3是FQSGSPYT(SEQ ID NO:14);和

[0298] iii.6个CDR的组,其中:HC CDR1序列是TYYIH(SEQ ID NO:15);HC CDR2是WIYPGNVNTKNNEKFKV(SEQ ID NO:16);HC CDR3是SNPYVMDY(SEQ ID NO:17);LC CDR1是KASQSVSNDVA(SEQ ID NO:18);LC CDR2是YASNRYT(SEQ ID NO:19);并且LC CDR3是QQDYSSPYT(SEQ ID NO:20)。

[0299] 根据某些实施方式,提供了一种载体,其包含SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:33中示出的多核苷酸序列。根据某些实施方式,所述载体是病毒载体。根据某些实施方式,所述病毒载体是慢病毒载体。

[0300] 根据某些实施方式,提供了一种被工程化改造以表达本文中描述的CAR的T细胞。

[0301] 对于所述跨膜结构域来说,在各种不同的实施方式中,CAR可以被设计成包含附连到所述CAR的细胞外结构域的跨膜结构域。跨膜结构域可以包括与所述跨膜区相邻的一个或多个另外的氨基酸,例如与所述跨膜区所源自的蛋白质的细胞外区域相关的一个或多个氨基酸(例如所述细胞外区域的1、2、3、4、5个或更多个氨基酸)和/或与所述跨膜区所源自的蛋白质的细胞内区域相关的一个或多个另外的氨基酸(例如所述细胞内区域的1、2、3、4、5个或更多个氨基酸)。根据某些实施方式,所述跨膜结构域可以被选择或通过氨基酸替换修饰,以避免这些结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合,以例如最小化与受体复合体的其他成员的相互作用。

[0302] 根据某些实施方式,所述跨膜结构域是选自下述的蛋白质的跨膜结构域:T-细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链,CD27,CD28,CD3 ϵ ,CD45,CD4,CD5,CD8,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137和CD154。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0303] 根据某些实施方式,所述包括连接蛋白4结合结构域的抗体或抗体片段通过铰链区连接到所述跨膜结构域。根据某些实施方式,所述铰链来自于人类蛋白质。根据某些实施方式,所述铰链是人类Ig(免疫球蛋白)铰链。根据某些实施方式,所述铰链是IgG4铰链或CD8a铰链。

[0304] 所述CAR的胞质结构域或区包括细胞内信号传导结构域。细胞内信号传导结构域通常负责其中已引入有所述CAR的免疫细胞的至少一种正常效应子功能的激活。术语“效应

子功能”是指细胞的一种特殊功能。例如，T细胞的效应子功能可以是细胞裂解活性或辅助活性，包括细胞因子的分泌。因此，术语“细胞内信号传导结构域”是指蛋白质的转导效应子功能信号并指导所述细胞执行特殊功能的部分。术语细胞内信号传导结构域意在包括所述细胞内信号传导结构域的足以转导所述效应子功能信号的任何截短的部分。用于本发明的CAR中的细胞内信号传导结构域的实例包括协同作用以在抗原受体接合后启动信号转导的T细胞受体 (TCR) 和辅助受体的胞质序列，以及这些序列的任何衍生物或变体和具有相同的功能性能力的任何重组序列。

[0305] 在某些实施方式中，单独通过TCR产生的信号不足以完全激活所述T细胞，并且也需要次级和/或共刺激信号。因此，T细胞活化可以被说成是由不同的两类胞质信号传导序列介导：通过TCR启动抗原依赖性初级活化的信号传导序列（初级细胞内信号传导结构域）和以抗原不依赖性方式起作用以提供次级或共刺激信号的信号传导序列（次级胞质结构域，例如共刺激结构域）。

[0306] 根据某些实施方式，所述细胞内信号传导结构域被设计成包含两个或更多个共刺激信号传导结构域。根据某些实施方式，所述两个或更多个共刺激信号传导结构域被连接物分子隔开。根据某些实施方式，所述连接物分子是甘氨酸残基。根据某些实施方式，所述连接物是丙氨酸残基。

[0307] 根据某些实施方式，所述CAR包含从选自OX40、CD2、CD27、CD28、CD276、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278) 和4-1BB (CD137) 的蛋白质获得的共刺激结构域。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0308] 本发明还涉及编码所述CAR的核酸分子以及载体和宿主细胞。本发明还涉及包含本发明的CAR的（异源）T细胞，以及包含这些CAR和适合的载体或赋形剂的药物组合物。本发明还涉及包含本发明的T细胞、组合物和CAR的自体T细胞疗法（和相应的医学用途）。

[0309] 根据某些实施方式，本文中描述的表达CAR的细胞可以进一步包含第二个CAR，例如包括针对例如同一个靶（连接蛋白4）或不同靶的不同抗原结合结构域的第二个CAR。根据某些实施方式，当所述表达CAR的细胞包含两个或更多个不同CAR时，所述不同CAR的抗原结合结构域可以使所述抗原结合结构域彼此不相互作用。

[0310] 根据某些实施方式，提供了一种细胞群体，其中所述群体中的至少一种细胞表达本文中描述的具有抗连接蛋白4结构域的CAR，并且第二种细胞表达另一种药剂，例如增强表达CAR的细胞的活性的药剂。

[0311] 本发明还涉及包含本发明的CAR的（异源）NK细胞，以及包含这些CAR和适合的载体或赋形剂的药物组合物。本发明还涉及包含本发明的NK细胞、组合物和CAR的自体NK细胞疗法（和相应的医学用途）。

[0312] 当在本文中使用， “嵌合抗原受体”或“CAR”是指一种人工构建的杂交多肽，其包含抗原结合结构域（例如抗体的抗原结合部分（例如scFv））、跨膜结构域和T-细胞或NK-细胞信号传导和/或T-细胞或NK-细胞活化结构域。CAR具有以非MHC限制性方式，利用单克隆抗体的抗原结合性质将T-细胞或NK-细胞的特异性和反应性重新导向所选靶点的能力。所述非MHC限制性抗原识别为表达CAR的T-细胞或NK-细胞提供了不依赖于抗原加工而识别抗原的能力，从而绕过了肿瘤逃避的主要机制。最通常情况下，所述CAR的细胞外结合结构域由将鼠类或人源化单克隆抗体的重链和轻链可变区融合而产生的单链可变片段（scFv）构

成。

[0313] 药理学

[0314] 在制药和药物剂型中,活性药剂优选地与一种或多种可药用载体和任选的任何其他治疗性成分一起使用。所述载体必须与与所述剂型的其他成分相容和不对其接受者过度有害的意义上是可药用的。所述活性药剂以有效实现如上所述的所需药理效果的量和适合于实现所需暴露的量提供。

[0315] 通常,将本发明的抗体及其包含抗体的抗原结合部分或包含包括肽模拟物在内的另一个多肽的片段和偶联物悬浮在无菌盐水溶液中,用于治疗性用途。所述药物组合物可以被可选地配制成控制活性成分(包含抗体的抗原结合部分的分子)的释放或延长它在患者系统中的存在。大量适合的药物递送系统是已知的,并且包括例如可植入药物释放系统、水凝胶、羟甲基纤维素、微胶囊、脂质体、微乳液、微球等。受控释放制剂可以通过使用聚合物来复合或吸附根据本发明所述的分子来制备。例如,生物相容性聚合物包括聚(乙烯-共-乙酸乙烯酯)的基质和硬脂酸二聚体和癸二酸的聚酸酐共聚物的基质。根据本发明所述的分子即抗体或抗体片段从这种基质释放的速率取决于所述分子的分子量、所述基质内所述分子的量和被分散粒子的尺寸。

[0316] 本发明的药物组合物可以通过任何适合的手段给药,例如口服、局部、鼻内、皮下、肌肉内、静脉内、动脉内、关节内、病灶内、肿瘤内或肠胃外给药。通常,将静脉内(i.v.)给药用于递送抗体。

[0317] 对于本领域普通技术人员来说,显然根据本发明所述的分子的治疗有效量将尤其取决于给药计划、给药的分子的单元剂量、所述分子是否与其他治疗剂组合给药、患者的免疫状态和健康、所述给药的分子的治疗活性、它在血液循环中的持久性和主治医师的判断。

[0318] 当在本文中使用时,术语“治疗有效量”是指在哺乳动物中有效治疗疾病或障碍的药物的量。在癌症的情况下,所述药物的治疗有效量可以减少癌细胞的数目,减小肿瘤尺寸,抑制(即在一定程度上减缓并且优选地停止)癌细胞浸润到周围器官中,抑制(即在一定程度上减缓并且优选地停止)肿瘤转移,在一定程度上抑制肿瘤生长,和/或在一定程度上缓和与所述障碍相关的一种或多种症状。在所述药物可以阻止现有癌细胞生长和/或杀死现有癌细胞的情况下,它可能具有细胞抑制性和/或细胞毒性。对于癌症疗法来说,体内效能可以例如通过评估存活时间长度、疾病进展时间(TTP)、响应率(RR)、响应持续时间和/或生活质量来衡量。

[0319] 适合于通过本发明治疗的癌症包括但不限于上皮癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病或淋巴样恶性肿瘤。这些癌症的更具体实例包括鳞状细胞癌、肺癌(包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺的腺癌和肺的鳞状癌)、腹膜癌、肝细胞癌、胃癌(包括胃肠癌)、胰腺癌、成胶质细胞瘤、宫颈癌、卵巢癌、肝癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜或子宫癌、唾液腺癌、肾癌、肝癌、前列腺癌、外阴癌、甲状腺癌、肝癌和各种类型的头颈癌以及B细胞淋巴瘤(包括低级别/滤泡性非霍奇金淋巴瘤(NHL)、小淋巴细胞(SL)NHL、中等级别/滤泡性NHL、中等级别弥漫性NHL、高级别成免疫细胞性NHL、高级别成淋巴细胞性NHL、高级别小非裂解细胞NHL、巨大肿块(bulky disease)NHL、套细胞淋巴瘤、AIDS相关淋巴瘤和Waldenstrom巨球蛋白血症)、慢性淋巴细胞性白血病(CLL)、急性淋巴细胞性白血病(ALL)、毛细胞白血病、慢性粒细胞性白血病和移植后淋巴增殖性障碍(PTLD),以及与斑痣、水肿

(例如与脑肿瘤相关的水肿)和Meigs综合征相关的异常血管增殖。优选地,所述癌症选自乳腺癌、结肠直肠癌、直肠癌、非小细胞肺癌、非霍奇金淋巴瘤(NHL)、肾细胞癌、前列腺癌、肝癌、胰腺癌、软组织肉瘤、卡波济氏肉瘤、类癌、头颈癌、黑色素瘤、卵巢癌、间皮瘤和多发性骨髓瘤。适合于本发明的治疗的癌性病症包括转移性癌症。

[0320] 根据其他实施方式,根据本发明所述的药物组合物用于治疗以连接蛋白4的过表达为特征的癌症。与连接蛋白4过表达相关的癌症类型可以使用已知的数据库例如The Cancer Genome Atlas(TCGA)来鉴定。根据某些实施方式,可以使用根据本发明所述的组合物治疗的癌症选自肾上腺皮质癌(ACC)、嫌色肾细胞癌(KICH)、肝细胞癌(LIHC)、结肠和直肠癌(COAD、READ)、胰腺导管腺癌(PAAD)、嗜铬细胞瘤和副神经节瘤(PCPG)、乳头状肾癌(KIRP)、肺腺癌(LUAD)、头颈鳞状细胞癌(HNSC)、前列腺腺癌(PRAD)、子宫体子宫内膜癌(UCEC)、宫颈癌(CESC)、皮肤黑色素瘤(SKCM)、间皮瘤(MESO)、尿路上皮膀胱癌(BLCA)、透明细胞肾癌(KIRC)、肺鳞状细胞癌(LUSC)、子宫癌肉瘤(UCS)、肉瘤(SARC)、卵巢浆液性囊腺癌(OV)、乳头状甲状腺癌(THCA)、多形成胶质细胞瘤(GBM)、乳腺癌(BRCA)、低级别神经胶质瘤(LGG)和弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBC)。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0321] 作为活性成分的本发明的分子被溶解、分散或混合在公知的可药用并且与所述活性成分相容的赋形剂中。适合的赋形剂是例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水(PBS)、右旋糖、甘油、乙醇等及其组合。其他适合的载体对于本领域技术人员来说是公知的。此外,如果需要,所述组合物可以含有少量辅助物质例如润湿或乳化剂、pH缓冲剂。

[0322] 根据本发明所述的药物组合物可以与抗肿瘤组合物一起给药。

[0323] 当在本文中使用时,术语“治疗”是指治疗性治疗和预防性措施两者。需要治疗的对象包括已经患有所述障碍的对象以及将要预防所述障碍的对象。

[0324] 术语“癌症”和“癌性”指称或描述哺乳动物中的一种通常以不受调控的细胞生长为特征的生理状况。癌症的实例包括但不限于上皮癌、淋巴瘤、母细胞瘤、肉瘤和白血病。这些癌症的更具体的实例包括黑色素瘤、肺癌、甲状腺癌、乳腺癌、结肠癌、前列腺癌、肝癌、膀胱癌、肾癌、宫颈癌、胰腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓癌、卵巢癌、子宫癌、肉瘤、胆管癌或子宫内膜癌。

[0325] 根据某些实施方式,所述治疗癌症的方法包括给药所述药物组合物作为包括给药至少一种另外的抗癌药剂在内的治疗方案的一部分。

[0326] 根据某些实施方式,所述抗癌药剂选自抗代谢物、紫杉烷、拓扑异构酶抑制剂、拓扑异构酶II抑制剂、天冬酰胺酶、烷化剂、抗肿瘤抗生素及其组合。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0327] 根据某些实施方式,所述抗代谢物选自阿糖胞苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、巯基嘌呤、甲氨蝶呤、硫鸟嘌呤、吉西他滨和羟基脲。根据某些实施方式,所述有丝分裂抑制剂选自长春新碱、长春碱和长春瑞滨。根据某些实施方式,所述拓扑异构酶抑制剂选自拓扑替康和伊立替康。根据某些实施方式,所述烷化剂选自白消安、卡莫司汀、洛莫司汀、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、顺铂、卡铂、异环磷酰胺、二氯甲基二乙胺、马法兰、噻替派、达卡巴嗪和丙卡巴肼。根据某些实施方式,所述抗肿瘤抗生素选自博来霉素、放线菌素D、柔红霉素、多柔比星、伊达比星、丝裂霉素、米托蒽醌和普卡霉素。根据某些实施方式,所述拓扑异构酶II抑制剂选自依托泊苷和替尼泊苷。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0328] 根据某些特定实施方式,所述另外的抗癌药剂选自贝伐单抗、卡铂、环磷酰胺、多柔比星盐酸盐、吉西他滨盐酸盐、拓扑替康盐酸盐、噻替派及其组合。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0329] 根据本发明所述的单克隆抗体可以与至少一种抗癌药剂一起用作组合疗法的一部分。根据某些实施方式,所述另外的抗癌药剂是免疫调节剂、活化的淋巴细胞、激酶抑制剂或化学治疗剂。

[0330] 根据某些实施方式,所述抗癌药剂是作为激动剂或拮抗剂的免疫调节剂,例如针对免疫检查点分子的抗体。

[0331] 检查点免疫疗法阻断已被证明是令人兴奋的癌症治疗新场所。免疫检查点途径由一系列共刺激和抑制性分子构成,这些分子协同工作,以便维持自身耐受性并保护组织在生理条件下不受免疫系统损伤。肿瘤利用某些检查点途径以便逃避免疫系统。因此,抑制这些途径已成为一种有前途的抗癌治疗策略。

[0332] 抗细胞毒性T淋巴细胞4 (CTLA-4) 抗体伊匹单抗(在2011年批准)是对癌症患者的治疗显示出益处的第一种免疫治疗剂。所述抗体干扰抗原呈递到T细胞期间的抑制性信号。抗程序性细胞死亡1 (PD-1) 抗体派姆单抗(在2014年批准)阻断由T细胞表达的PD-1受体的负免疫调控信号传导。另一种抗PD-1药剂在2014年提交管理部门批准,用于治疗非小细胞肺癌(NSCLC)。积极的研究目前正在探索许多其他免疫检查点,其中包括CEACAM1、NKG2A、B7-H3、B7-H4、VISTA、CD112R、淋巴细胞活化基因3 (LAG3)、CD137、OX40(也被称为CD134)和杀伤细胞免疫球蛋白样受体(KIR)。

[0333] 根据某些特定实施方式,所述免疫调节剂选自:抑制CTLA-4的抗体,抗人类程序性细胞死亡蛋白1 (PD-1)、PD-L1和PD-L2抗体,活化的细胞毒性淋巴细胞,淋巴细胞活化剂,针对CEACAM的抗体,针对TIGIT的抗体和RAF/MEK途径抑制剂。每种可能性代表本发明的独立实施方式。根据某些特定实施方式,所述另外的免疫调节剂选自针对PD-1的mAb、针对PD-L1的mAb、针对PD-L2的mAb、针对CEACAM1的mAb、针对CTLA-4的mAb、针对TIGIT的mAb、PVR、白介素2 (IL-2) 或淋巴因子活化的杀伤(LAK)细胞。

[0334] 根据其他实施方式,所述另外的抗癌药剂是化学治疗剂。可以与根据本发明所述的抗体一起或分开地给药的化学治疗剂可以包括本领域中已知的表现出抗癌活性的任何此类药剂,包括但不限于:米托蒽醌,拓扑异构酶抑制剂,纺锤体毒素长春花类:长春碱、长春新碱、长春瑞滨(taxol)、紫杉醇、多西他赛;烷化剂:二氯甲基二乙胺,苯丁酸氮芥,环磷酰胺,马法兰,异环磷酰胺;甲氨蝶呤;6-巯基嘌呤;5-氟尿嘧啶,阿糖胞苷,吉西他滨;鬼臼毒素:依托泊苷,伊立替康,拓扑替康,达卡巴嗪;抗生素类:多柔比星(阿霉素),博来霉素,丝裂霉素;亚硝基脲类:卡莫司汀(BCNU),洛莫司汀,表柔比星,伊达比星,柔红霉素;无机离子:顺铂,卡铂;干扰素,天冬酰胺酶;激素:他莫昔芬,亮丙瑞林,氟他胺和醋酸甲地孕酮。

[0335] 根据某些实施方式,所述化学治疗剂选自烷化剂、抗代谢物、叶酸类似物、嘧啶类似物、嘌呤类似物和相关抑制剂、长春花生物碱、表鬼臼毒素、抗生素、L-天冬酰胺酶、拓扑异构酶抑制剂、干扰素、铂配位络合物、蒽二酮取代的脲、甲基胍衍生物,肾上腺皮质激素抑制剂、肾上腺皮质类固醇、孕激素、雌激素、抗雌激素、雄激素、抗雄激素和促性腺激素释放激素类似物。根据另一个实施方式,所述化学治疗剂选自5-氟尿嘧啶(5-FU)、甲酰四氢叶酸(LV)、伊立替康、奥沙利铂、卡培他滨、紫杉醇和多西他赛。可以使用一种或多种化学治疗

剂。

[0336] 在某些实施方式中,根据本发明所述的药物组合物用于治疗癌症或用于增强免疫应答。

[0337] 术语“增强免疫应答”是指提高免疫系统的应答性和诱导或延长它的记忆。根据本发明所述的药物组合物可用于在疫苗接种后刺激免疫系统。因此,在一个实施方式中,所述药物组合物可用于改进疫苗接种。

[0338] 在某些实施方式中,所述癌症选自肺癌、甲状腺癌、乳腺癌、结肠癌、黑素瘤、前列腺癌、肝癌、膀胱癌、肾癌、宫颈癌、胰腺癌、白血病、淋巴瘤、骨髓癌、卵巢癌、子宫癌、肉瘤、胆管癌和子宫内膜细胞癌。每种可能性代表本发明的独立实施方式。

[0339] 根据某些实施方式,包含根据本发明所述的至少一种抗体或其片段的药物组合物和包含另外的免疫调节剂或激酶抑制剂的药物组合物,用于通过分开给药治疗癌症。

[0340] 根据另一方面,本发明提供了一种在需要的对象中治疗癌症的方法,所述方法包括向所述对象给药治疗有效量的根据本发明所述的单克隆抗体或抗体片段。

[0341] 根据另一方面,本发明提供了治疗与连接蛋白4过表达相关的疾病的方法。

[0342] 根据一个方面,本发明提供了一种在需要的对象中治疗癌症的方法,所述方法包括向所述对象给药治疗有效量的包含本文中所描述的CAR分子的多个T-细胞。

[0343] 当在本文中使用时,术语“有效量”是指所述单克隆抗体或抗体片段的足以在给药到对象时具有目标治疗效果的量。实现所述治疗最终结果所需的有效量可能取决于多种因素,包括例如肿瘤的具体类型和患者病症的严重性,以及所述组合是否进一步与辐射共同给药。在本发明的情形中,所述活性药剂的有效量(剂量)应该足以在所述对象中随时间实现有益治疗响应,包括但不限于肿瘤生长的抑制、肿瘤生长速率的降低、肿瘤和转移瘤生长的阻止和存活率提高。

[0344] 本文中描述的组合物的毒性和治疗效能可以通过标准的制药程序,在细胞培养物或实验动物中确定,例如通过确定主题化合物的IC₅₀(提供50%抑制的浓度)和最高耐受剂量。从这些细胞培养物测定法和动物研究获得的数据可用于配制在人类中使用的多种剂量。所述剂量可能尤其是随着所使用的剂型、所选的给药方案、用于治疗的药剂的组成和使用的给药途径以及其他相关因素而变。精确的剂型、给药途径和剂量可以由各个医师根据患者的状况来选择。取决于待治疗的病症的严重性和响应性,给药也可以是缓释组合物的单次给药,并且治疗过程持续数天到数周或直至实现治愈或实现疾病状态的消减。待给药的组合物的量当然取决于待治疗的对象、患病的严重性、给药方式、处方医师的判断和所有其他相关因素。

[0345] 术语将物质、化合物或药剂“给药”到对象,可以使用本领域技术人员已知的各种不同方法之一来进行。例如,化合物或药剂可以肠内或肠胃外给药。肠内是指通过胃肠道给药,包括经口、舌下或直肠给药。肠胃外给药包括静脉内、真皮内、肌肉内、腹膜内、皮下、眼、舌下、鼻内、通过吸入、脊髓内、大脑内和透皮(通过例如经皮肤导管吸收)给药。化合物或药剂也可以适合地通过可重复装填或生物可降解聚合物装置或其他装置例如贴片和泵,或通过提供所述化合物或药剂的延长、缓慢或受控释放的剂型来引入。给药也可以进行例如一次、多次,和/或在一个或多个延长的时间段内进行。在某些实施方式中,所述给药包括直接给药(包括自我给药)和间接给药(包括开药的行动)两者。例如,当在本文中使用时,指示患

者自我给药药物或由另一人给药药物的医师和/或向患者提供药物处方的医师,正在对所述患者给药所述药物。

[0346] 抗体通常以约0.1至约20mg/kg患者体重、通常为约0.5至约10mg/kg、通常为约1至约5mg/kg范围内的剂量给药。就此而言,优选地使用循环半衰期为至少12小时、优选为至少4天、更优选长达21天的抗体。嵌合抗体预期具有长达14-21天的循环半衰期。在某些情况下,给药大的负荷剂量,随后在治疗期内给药定期(例如每周)维持剂量,可能是有利的。抗体也可以通过缓释递送系统、泵和用于连续输注的其他已知递送系统来递送。

[0347] 术语“约”意味着对于特定值来说应该假设例如至多5%或10%的可接受的误差范围。

[0348] 诊断

[0349] 本发明还公开了用于诊断和预后癌症的方法。

[0350] 根据一个方面,本发明提供了一种对象中的癌症或传染性疾病的诊断和/或预后方法,所述方法包括使用本文中所描述的至少一种抗体来确定所述对象的生物样品中连接蛋白4的表达水平的步骤。

[0351] 术语“生物样品”涵盖了从生物体获得的可用于诊断或监测测定法的各种不同的样品类型。所述术语涵盖了血液和生物来源的其他液体样品、实体组织样品例如活检样本或组织培养物或源自于它们的细胞及其后代。此外,所述术语涵盖了循环的肿瘤或其他细胞。所述术语特别涵盖了临床样品,并且还包括细胞培养物中的细胞、细胞上清液、细胞裂解液、血清、血浆、尿液、羊水、包括用于眼部样品的房水和玻璃体液在内的生物流体和组织样品。所述术语还涵盖在获取后以任何方式处理过的样品,例如用试剂处理、增溶或富集某些组分的样品。

[0352] 确定连接蛋白4的表达水平可以通过本文中描述的标记的抗连接蛋白4抗体来进行。确定所述表达可以例如通过ELISA进行。本发明的方法还可以包括将所述表达水平与对照水平进行比较的步骤。

[0353] 展现下面的实施例是为了更全面地说明本发明的某些实施方式。它们绝不应该被解释为限制本发明的范围。

[0354] 实施例

[0355] 实验程序

[0356] 现在将参考下述实施例,所述实施例与上面的描述一起,以非限制性方式说明本发明。

[0357] 通常,本文中使用的命名法和在本发明中使用的实验室程序包括分子、生物化学、微生物学、免疫学和重组DNA技术。这样的技术在本领域中是公知的。为了方便读者,在整个本文件中提供了涉及公知程序的其他通用参考文献。

[0358] 方法

[0359] 细胞系

[0360] 使用的细胞系是LNCap、JEG3、MCF-7、RAJI、MDA-MD-453、HT1376和CHO细胞。在某些情况下,将CHO细胞用食蟹猴(Cyno)或鼠类连接蛋白-4稳定转染。对于除了RAJI细胞之外的所有细胞来说,将细胞在37°C、>95%湿度和5%CO₂条件下在DMEM中生长,而RAJI细胞被培养在增补有10%热失活FCS的RPMI中(培养基和血清来自于Sigma-Aldrich)。

[0361] 流式细胞术

[0362] 流式细胞术使用抗鼠类连接蛋白4mAb(克隆356704)来进行。将细胞与每100,000个细胞0.2 μ g mAb在冰上温育30分钟。检测使用偶联到AlexaFluor 647的山羊第二抗体(Jackson ImmunoResearch)在冰上进行30min。

[0363] 在某些情况下,抗连接蛋白-4Ab以各种不同的浓度使用,并与靶细胞在冰上温育30分钟。使用偶联到AlexaFluor 647的针对鼠类或人类Fc的第二抗体(Jackson ImmunoResearch)在冰上30min进行检测。

[0364] 对于人类TIGIT-Ig或人类连接蛋白1-Ig的染色来说,将细胞与每100,000个细胞3 μ g的TIGIT-Ig在冰上温育1小时。使用Alexa Fluor 647抗人类第二抗体(Jackson ImmunoResearch)在冰上30min进行检测。对于阻断实验来说,在TIGIT-Ig或人类连接蛋白1-Ig染色之前将细胞与1 μ g所指示的抗体预温育。在某些情况下,将细胞与8 μ g/ml所指示的Ab和人类TIGIT-Ig或人类连接蛋白-1-Ig(20 μ g/ml)一起温育。配体结合的检测使用Alexa Fluor 647抗人类第二抗体(Jackson ImmunoResearch)来进行。

[0365] 分析使用FACS-Calibur(BD Biosciences)或Cytotflex Becman Coulter流式细胞仪和FCS express软件来进行。

[0366] 灭杀测定法

[0367] 为了评估NK细胞对靶细胞的细胞毒性活性,按照描述进行了S³⁵释放测定(Mandelboim等,Exp.Med.184(3):913-22)。NK细胞使用EasySep人类NK分离试剂盒(19055STEMCELL TECHNOLOGIES)从健康供体分离,并用PHA和IL-2生长。将靶细胞在含有放射活性甲硫氨酸[S³⁵]的无甲硫氨酸培养基中温育过夜。接下来,将所述细胞清洗,并与每孔每个5000细胞1 μ g的抗体在冰上温育。然后将所述细胞与NK细胞温育5小时。S³⁵释放使用 β 计数器TopCount(Packard)测量。结果被表示为:(CPM(样品)-CPM(自发释放))/(CPM(总释放)-CPM(自发释放)) $\times$ 100,其中CPM表示每分钟的计数。

[0368] ADCC测定法

[0369] NK细胞使用EasySep人类NK分离试剂盒(19055STEMCELL TECHNOLOGIES)从健康供体分离,并用PHA和IL-2生长。将靶细胞以每孔 2.5×10^4 个细胞的密度在96U板中铺板,并与活化的NK细胞以2:1的E:T比例共温育。温育在12 μ g/ml嵌合克隆hNec4.05hIgG1和hNec4.11hIgG1或对照hIgG1存在下进行。2小时后,通过FACS分析NK细胞的CD107a(Biolegend,目录号328619)脱颗粒标志物的表达。

[0370] CAR-T产生和功能测定法

[0371] 将hNec4.11 Ab的单链同框克隆到CD8茎区,然后依次克隆CD28TM结构域、41BB细胞内结构域和CD3 ζ 链的细胞内结构域。CAR-T构建物的示意图示出在图11A中。将所述构建物引入到含有hEf1a启动子的慢病毒载体(pHAGE2)中,然后引入IRES GFP盒以监测转导效率。将Jurkat细胞用编码所述构建物的慢病毒粒子转导。所述转导效率高于99%(图11B)。

[0372] 将亲代Jurkat细胞或表达所述CAR-T构建物的Jurkat细胞(Jurkat pHAGE2.4.11)(每孔 5×10^4 个)与靶细胞HT1376和MDA-MD-453以1:1的E:T比例温育48小时。在离心后收集上清液,并使用Peprotech的IL-2ELISA试剂盒(目录号900-T12)按照制造商的流程测量IL-2水平。

[0373] 使用ImmunoCult™人类CD3/CD28 T细胞活化剂,按照制造商的流程将来自于健康

供体的PBMC预活化72小时。将所述细胞按照Kochenderfer JN等人的描述(J Immunother.2009doi:10.1097/CJI.0b013e3181ac6138)用pHAGE2.4.11慢病毒转导,并通过GFP水平确认表达。将所述CART PBMC与HT1376(2.5×10^4 /孔)细胞在多种E:T比例下温育。48小时后除去效应细胞,将靶细胞清洗三次,并使用CellTiter-Glo®发光细胞存活性测定法,按照制造商的流程测量存活性。

[0374] 体内小鼠肿瘤模型

[0375] 所有实验使用6-8周龄的SCID浅褐色雌性小鼠进行。所有小鼠在希伯来大学医学院(Hebrew University Medical School)(Ein-Kerem,Jerusalem)的无特定病原体设施中并按照伦理委员会的指导方针,在SPF条件、正常光/暗周期和 $22 \pm 2^\circ\text{C}$ 下饲养。每个小鼠组含有7只雌性小鼠($n=7$)。通过将所指明的细胞皮下注射给药到左肋区域中,产生异种移植物。每周两次腹膜内给药抗连接蛋白4抗体克隆05和对照(抗鼠类CD3抗体,InVivoMAb克隆17A2)抗体的注射液。每天监测所述小鼠。在测定结束的当天(参见图例),将所有小鼠处死并记录各个肿瘤的重量。在基线时,在各个不同小鼠组之间在总体健康方面没有观察到差异。

[0376] 实施例1.抗连接蛋白-4mAb的产生和选择

[0377] 免疫原(Nec4-Fc)表达技术基于哺乳动物HEK 293T细胞,是一种特别是在糖蛋白的情况下给出最佳质量、稳定性、溶解性和产率的选择技术。Nec4-Fc蛋白这种连接蛋白-4的胞外域与人类IgG1 Fc结构域的融合蛋白如下所述通过重组方法生产并纯化:

[0378] 将人类连接蛋白4的编码序列克隆成与人类IgG1的Fc片段融合,以产生重组Fc-融合蛋白。使用人类连接蛋白4分子的胞外域(细胞外)部分,其横跨第32至349位残基。将连接蛋白4氨基酸序列在第349位处的C-端丝氨酸残基融合到人类IgG1的去糖基化的Fc(N297A)的重链铰链,随后是CH2和CH3恒定区。将所述重组蛋白的开放阅读框(ORF)进行密码子优化,用于在哺乳动物细胞中高水平表达。所述优化的DNA序列由GeneArt合成服务(Invitrogen)产生,并在所述DNA片段的5'和3'末端分别添加了对应于EcoRI和NotI限制性位点的侧翼DNA序列。通过将所述优化的DNA片段用EcoRI和NotI双消化,然后将它连接到pIRESpuro3(Clontech Laboratories,Inc.)中,来构建表达载体。使用FuGENE 6转染试剂(Roche Diagnostics)将得到的构建物转染到HEK-293T细胞中。48h后,使用5g/mL嘌呤霉素(Sigma-Aldrich)对转染的细胞进行抗生素选择。通过SDS/PAGE分析稳定的合并物的蛋白质分泌。收集上清液并在高压灌注色谱站BioCAD(PerSeptive Biosystems)中,在Poros 20蛋白G柱上纯化。得到的融合蛋白免疫原被称为连接蛋白4-Fc。

[0379] 对于免疫接种来说,将BALB/c小鼠用弗氏完全佐剂(CFA)中的50 μg 免疫原注射,随后在第一次免疫接种后第14天用弗氏不完全佐剂(IFA)中的50 μg 免疫原注射。接下来,通过ELISA分析血清的抗Nec-4-Fc抗体滴度。将具有最高滴度的小鼠用PBS中的50 μg 免疫原加强免疫。三天后,取出免疫小鼠的脾脏,并在裂解红细胞后,将脾细胞与SP2/0细胞系融合。将潜在的杂交瘤细胞接种在含有次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷(HAT)的20% RPMI 1640培养基中,用于选择稳定的杂交瘤细胞系。将上述程序重复两次,通过ELISA筛选了总共1034个孔的抗Nec4-Fc抗体分泌。接下来,将上清液对ELISA板上包被的Nec4-Fc的结合为阳性的30个孔重新试验它们的阳性,并平行地在无关的Fc融合蛋白上进行交叉反应性试验。这产生了分泌特异性识别连接蛋白-4胞外域的抗体的10个杂交瘤细胞系。试验所有这些在ELISA中

显示出特异性信号的候选者识别转染细胞系上的本源人类连接蛋白-4的能力。

[0380] 将RAJI伯基特淋巴瘤细胞用人类连接蛋白4转染并通过FACS进行分析,以确定所指定的5个杂交瘤克隆的结合。将细胞与不同的克隆温育,然后与人类TIGIT-Ig温育并用第二抗体染色。所述FACS染色的平均荧光强度(MFI)值描绘在图2中。正如所示,由克隆hNec4.01(克隆1)和hNec4.05(克隆5)产生的单克隆抗体表现出TIGIT-连接蛋白4相互作用的最佳阻断能力。

[0381] 也使用天然表达连接蛋白4的JEG3和LNCap细胞系进行了类似测定,并得到了类似结果。

[0382] 5种抗体显示出阳性染色。在这5种抗体中,对4种进行了进一步选择以获得它们的IgG同种型(而不是IgM同种型)。最后,所述4个剩余候选者对活细胞表面上表达的本源人类连接蛋白-4分子均显示出强结合能力,并在几种无关融合蛋白上进行了重复试验,以选择在连接蛋白-4与免疫细胞受体的其他配体之间没有交叉反应性的抗体。然而,它们之中仅有2种显示出是针对连接蛋白-4的阻断抗体。因此,产生了2个稳定的克隆细胞系hNec4.01和hNec4.05,两者均为同种型 κ IgG1。接下来进行大规模Ab生产,并使用GE AKTA Prime Plus液相色谱系统和HiTrap蛋白G柱从无血清培养基以几毫克的量纯化两种单克隆抗体。

[0383] 与上述相似,鉴定了另外的克隆,其中克隆11(hNec4.11)具有最佳结合和阻断能力,因此如下所述与hNec4.05平行地进行筛选。

[0384] 基于上述尝试可以得出结论,即使在免疫原非常类似于靶蛋白连接蛋白-4(就它是二聚体、被哺乳动物细胞机器糖基化和在非变性条件下生产而言)的情况下,获得分泌阻断性抗连接蛋白4抗体的杂交瘤细胞系的机会低于2%(每毫升)。

[0385] 实施例2.抗连接蛋白-4mAb对人类连接蛋白4的亲合性

[0386] 使用微量热泳测定法(Wienken等,2010,Nat.Comm.1:100)进一步确定了抗体hNec4.01和hNec4.05对荧光团标记的人类连接蛋白4-Ig分子的亲和性。使用至少三个独立的蛋白制备物重复测量。如图3中所示,对于两种抗体均观察到非常高的结合亲和性。对于克隆hNec4.05来说,计算的Kd是 272 ± 154 pM,对于hNec4.01克隆来说,计算的Kd是 107 ± 115 pM。

[0387] 实施例3.抗连接蛋白-4mAb的测序

[0388] 将被证实对连接蛋白4-TIGIT结合具有最佳抑制的两个杂交瘤克隆No.0.1和No.0.5送去进行核苷酸和氨基酸测序。

[0389] 方法

[0390] 遵照TRIzol®试剂(Ambion,目录号15596-026)的技术手册,从所述杂交瘤细胞分离总RNA。然后遵照PrimeScript™第一链cDNA合成试剂盒(Takara,目录号6110A)的技术手册,使用同种型特异性反义引物或通用引物将总RNA反转录成cDNA。按照GenScript的cDNA末端快速扩增(RACE)的标准操作程序(SOP)扩增V_H和V_L的抗体片段。将扩增的抗体片段分别克隆到标准克隆载体中。进行菌落PCR以筛选具有正确尺寸的插入片段的克隆。对于每个片段来说,对不少于5个具有正确尺寸的插入片段的克隆进行测序。将不同克隆的序列进行比对,并提供这些克隆的共有序列。

[0391] 使用了下述用于免疫球蛋白可变区的序列分析的工具:

- [0392] i.NCBI核苷酸BLAST;
- [0393] ii.IMGT/V Quest程序;和
- [0394] iii.NCBI IgBLAST.
- [0395] 获得的序列是:
- [0396] 克隆hNec4.01:
- [0397] 重链可变区DNA序列,414个碱基对 (SEQ ID NO:1):
- [0398] 前导序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4
- [0399] ATGGGATGGAGCTGGATCTTTCTCTCCTCCTGTCAGGAAGTGCAGGCTTCCACTCTGAGGTCCAACCT
CAGCAGTCAGGACCTGAACTGGTGAAACCTGGGGCCTCAGTGAAGATTGCCTGCAGGGCCTCTGGATACACATTAC
TGCCTACAATATCCACTGGGTGAGCCAGAGACATGGAAAGAGCCTTGAATGGATTGGATATATCTATCCTAACAATG
GTGGTTCTGGCTACAACCAGAAATTCATGAACAAGGCCACATTGACTGTAGACCATTCTCCAATACAGCCTACATG
GAGCTCCGCAGCCTGACGTCTGAGGACTCTGCAGTCTATTACTGTGCAATATTTGATTACGACGAGGCCTGGTTTAT
TTACTGGGGCCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCTGCA
- [0400] 重链可变区多肽序列,138个氨基酸 (SEQ ID NO:2):
- [0401] 前导序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4MGWSWIFLFLLSGTAGFHSEVQLQQSGPE
LVKPGASVKIACRASGYTFTAYNIHWVSQRHGKSLEWIGYIYPNNGSGYNQKFMNKATLTVDHSSNTAYMELRSLT
SEDSAVYYCAIFDYDEAWFIYWGGTLTVTSA
- [0402] 重链可变区多肽序列 (FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4) (SEQ ID NO:35)
- [0403] EVQLQQSGPELVKPGASVKIACRASGYTFTAYNIHWVSQRHGKSLEWIGYIYPNNGSGYNQKFMNKAT
LTVDHSSNTAYMELRSLTSEDSAVYYCAIFDYDEAWFIYWGGTLTVTSA
- [0404] 轻链可变区DNA序列,384个碱基对 (SEQ ID NO:3):
- [0405] 前导序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4
- [0406] ATGGATTTTCAAGTGCAGATTTTCAGCTTCTGCTAATCAGTGCCTCAGTCATAATGTCCAGAGGAGAA
AATGTTCTCACCAGTCTCCAGAAATCATGTCTGCATCTCCCGGGGAAGAGGTCACCATGACCTGTAGTGCCAGCTC
AAGTGTTAGTTACATGCACTGGTTCCAGCAGAAGTCAACTATCTCCCCAAACTCTGGATTTATGACACATCCAAAC
TGGCTTCTGGAGTCCCCGGTCGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGCAAGTCTTACTCTCTCAGCATCAGAAACATGGAG
GCTGAAGATGTTGCCACCTATTACTGTTTTTCAGGGGAGTGGGAGCCCGTACACGTTTCGAGGGGGGACCAAGCTGGA
AATTAAA
- [0407] 轻链可变区多肽序列,128个氨基酸 (SEQ ID NO:4):
- [0408] 前导序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4
- [0409] MDFQVQIFSFLISASVIMSRGENVLTSPEIMSASPGEVMTCSASSSVSYMHWFQQKSTISPKLWI
YDTSKLASGVPGRFSGSGSGKSYSLTIRNMEAEDVATYYCFQSGSPYTFGGGTKLEIK
- [0410] 轻链可变区多肽序列 (FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4) (SEQ ID NO:36)
- [0411] ENVLTSPEIMSASPGEVMTCSASSSVSYMHWFQQKSTISPKLWIYDTSKLASGVPGRFSGSGSGKS
YSLTIRNMEAEDVATYYCFQSGSPYTFGGGTKLEIK
- [0412] 克隆hNec4.05
- [0413] 重链可变区DNA序列,408个碱基对 (SEQ ID NO:5):
- [0414] 前导序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4
- [0415] ATGGGATGGAGCCGATCTTTCTCTCCTCCTGTCAATAATTGCAGGTGTCCATTGCCAGGTCCAGCTG

CAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAGGATATCCTGCAAGGCCTCTGGCTACACCTTCAC
AACCTACTATATACACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTATCCTGGAAATG
TTAATACTAAGAACAATGAGAAGTTCAAGGTCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATG
CAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGATCGAACCCCTATGTTATGGACTACTG
GGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

[0416] 重链可变区多肽序列,136个氨基酸 (SEQ ID NO:6) :

[0417] 前导序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0418] MGWSRIFLFLLSIIAGVHCQVQLQQSGPELVKPGASVRISCKASGYFTFTYYIHVWKQRPQGQLEWIGW
IYPGNVNTKNNEKFKVKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSNPYVMDYWGQGSTVTSS

[0419] 重链可变区多肽序列 (FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (SEQ ID NO:37))

[0420] QVQLQQSGPELVKPGASVRISCKASGYFTFTYYIHVWKQRPQGQLEWIGWIYPGNVNTKNNEKFKVKAT
LTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSNPYVMDYWGQGSTVTSS

[0421] 轻链可变区DNA序列,381个碱基对 (SEQ ID NO:7) :

[0422] 前导序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0423] ATGAAGTCACAGACCCAGGTCTTCGTATTTCTACTGCTCTGTGTGTCTGGTGCTCATGGGAGTATTGTG
ATGACCCAGACTCCCAAATTCCTGCTTGTATCAGCAGGAGACAGGGTTACCATAACCTGCAAGGCCAGTCAGAGTGT
GAGTAATGATGTAGCTTGGTACCAACAGAAGCCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATATACTATGCATCCAATCGCT
ACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGGATATGGGACGGATTTCACTTTCACCATCAGCGCTGTGCAGGCT
GAAGACCTGGCAGTTTATTTCTGTCAGCAGGATTATAGCTCTCCGTACACGTTTCGGAGGGGGACCAAGCTGGAAAT
AAAA

[0424] 轻链可变区多肽序列,127个氨基酸 (SEQ ID NO:8) :

[0425] 前导序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0426] MKSQTQVFVFLLLCVSGAHGSIVMTQTPKFLLSAGDRVITITCKASQSVSNDAWYQQKPGQSPKLLIY
YASNRYTGVPDRFTGSGYGTDFTTISAVQAEDLAVYFCQQDYSSPYTFGGGKLEIK

[0427] 轻链可变区多肽序列 (FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (SEQ ID NO:38))

[0428] SIVMTQTPKFLLSAGDRVITITCKASQSVSNDAWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPDRFTGSGYGT
DFTTISAVQAEDLAVYFCQQDYSSPYTFGGGKLEIK

[0429] 克隆hNec4.11

[0430] 重链可变区DNA序列,408个碱基对 (SEQ ID NO:21) :

[0431] 前导序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0432] ATGGGATGGAGCCGATCTTTCTCTCCTCTGTCAATAATTGCAGGTGTCCATTGCCAGGTCCAGCTG
CAGCAGTCTGGACCTGAACTGGTGAAGCCTGAGACTTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCAC
AAGTTACTATATACACTGGGTGAAACAGAGGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGCTGGATTTATCCTGGAAATG
TTAATACTAAGTATAATGAGAGGTTTAAGGGCAAGGCCACTCTGACTGCAGACAAATCCTCCAACACAGCCCACATG
CAGCTCACCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGATCGAACCCCTATGTTATGGACTACTG
GGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCA

[0433] 重链可变区多肽序列,136个氨基酸 (SEQ ID NO:22) :

[0434] 前导序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0435] MGWSRIFLFLLSIIAGVHCQVQLQQSGPELVKPVTSVKISCKASGYFTTSYYIHVWKQRPQGQLEWIGW

IYPGNVNTKYNERFKGKATLTADKSSNTAHMQLTSLTSEDSAVYFCARSNPYVMDYWGQGTSTVTVSS

[0436] 重链可变区多肽序列(FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (SEQ ID NO:39))

[0437] QVQLQQSGPELVKPKETSVKISCKASGYTFTSYIHWVKRPGQGLEWIGWIYPGNVNTKYNERFKGKAT
LTADKSSNTAHMQLTSLTSEDSAVYFCARSNPYVMDYWGQGTSTVTVSS

[0438] 轻链可变区DNA序列,381个碱基对 (SEQ ID NO:23) :

[0439] 前导序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0440] ATGAAGTCACAGACCCAGGTCTTCGTATTTCTACTGCTCTGTGTGTCTGGTGCTCATGGGAGTATTGTG
ATGACCCAGACTCCCAAATTCCTGCTTGATCAGCAGGAGACAGAGTCACCATAACCTGCAAGGCCAGTCAGAGTGT
GAATAATGATGTGGCTTGGTATCAACAGAAGCCAGGGCTGTCTCCTGAACTGCTTATGTATTATGCATCCAATCGCT
TCACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGGATATGGGACGGATTTCACTTTCACCATCAGCTCTGTGCAGGCT
GAAGACCTGGCAATTTATTTCTGTCAGCAGGCTTATAGTCTCCGTACACGTTCCGAGGGGGACCAAGCTGGAAAT
TCAA

[0441] 轻链可变区多肽序列,127个氨基酸 (SEQ ID NO:24) :

[0442] 前导序列-FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4

[0443] MKSQTQVFVFLLLCVSGAHGSIVMTQTPKFLLSAGDRVITITCKASQSVNNDVAWYQQKPGLSPELLMY
YASNRFTGVPDRFTGSGYGTDFTFITISSVQAEDLAIYFCQQAYRSPYTFGGGTKLEIQ

[0444] 轻链可变区多肽序列(FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 (SEQ ID NO:40))

[0445] SIVMTQTPKFLLSAGDRVITITCKASQSVNNDVAWYQQKPGLSPELLMYASNRFTGVPDRFTGSGYGT
DFTFITISSVQAEDLAIYFCQQAYRSPYTFGGGTKLEIQ

[0446] 实施例4.用抗连接蛋白4mAb阻断连接蛋白4-TIGIT相互作用增强了人类细胞系的NK细胞灭杀

[0447] 测试抗体克隆hNec4.05和hNec4.01对连接蛋白4结合到TIGIT和抑制NK细胞毒性的阻断。将³⁵S]甲硫氨酸标记的用连接蛋白4转染的RAJI伯基特淋巴瘤细胞和LNCap前列腺癌细胞(天然表达连接蛋白4)与1μg/孔的作为对照抗体的小鼠IgG1或小鼠抗人类连接蛋白4mAb hNec4.01或hNec4.05温育。1h后,向所述细胞添加NK细胞并温育5小时。在NK:癌细胞的各种不同效应细胞:靶细胞(E:T)比例下的平均特异性灭杀(±s.d.)被作图在图4A(RAJI细胞)和图4B(LNCap细胞)中。*指示hNec4.01和hNec4.05克隆与对照抗体相比的显著效果(p<0.05)。每张图示出了进行的三个实验中的一个代表性实验。当使用MCF-7乳腺癌细胞系时,确定了相同的效果。

[0448] 实施例5.抗连接蛋白4抗体的结合特异性的确认

[0449] 正如使用FACS染色所测试和在图5A-5C中所证实的,mAb hNec4.01和hNec4.05特异性针对人类连接蛋白4并且不结合鼠类蛋白。将RAJI细胞用鼠类连接蛋白4转染(黑线柱状图)。首先,将用鼠类连接蛋白4转染的RAJI细胞裂解液用于使用商业化抗鼠类连接蛋白4mAb(克隆356704)的Western印迹测定法,以便确认鼠类连接蛋白4表达(A)。接下来,将所述细胞用0.2μg的(B)克隆hNec4.01或(C)克隆hNec4.05染色。hNec4.01和hNec4.05 mAb两者均未显示出与鼠类连接蛋白4的结合。

[0450] 实施例6.抗连接蛋白4抗体能够阻断连接蛋白4-连接蛋白1相互作用

[0451] 还确定了抗连接蛋白4阻断连接蛋白4-连接蛋白1相互作用的能力。用连接蛋白4转染的RAJI细胞的FACS染色显示在图6A-6C中。将细胞与1μg的(图6A)克隆hNec4.01或(图

6B) 克隆hNec4.05预温育,然后与3 μ g连接蛋白1-Ig温育(黑色线)。没有阻断的染色显示为灰色线。灰色实心柱状图是仅仅第二抗体的背景对照染色。结论是所述mAb能够阻断连接蛋白4-连接蛋白1相互作用,所述相互作用疑似提高了表达连接蛋白4的肿瘤的侵入性。

[0452] 实施例7. 体内模型

[0453] 在动物模型中确定了抗连接蛋白4mAb在体内的效能。将天然(MDA-MB-453)或重组(Raji Nectin4 OE)表达连接蛋白4的细胞系SC注射到小鼠(每只小鼠 5×10^6 个细胞)。使用缺少NK、B和T细胞的SCID浅褐色小鼠。为了研究在这些模型中NK细胞对肿瘤细胞生长的贡献,在某些治疗组中将人类NK细胞以 1×10^6 的量与所述肿瘤细胞共同注射。

[0454] 测试了抗连接蛋白4mAb克隆hNec4.05或对照Ab(抗鼠类CD3抗体,InVivoMAb-克隆17A2)直接地或与NK细胞一起对肿瘤生长的体内效应。所述mAb以每只小鼠75 μ g的量每周两次IP注射。在研究结束时测量肿瘤重量。正如在图7(A)中看到的,与用空载体转染的亲代细胞(EV)的生长相比,连接蛋白-4在Raji细胞上的过表达(OE)不影响它们的生长。然而,在人类NK细胞存在下,连接蛋白4的OE提高了肿瘤生长,表明了连接蛋白4对NK细胞的NK介导的肿瘤抑制活性的负面作用。正如在图7B中看到的,抗连接蛋白4Ab的添加阻断NK细胞抑制,导致与对照Ab治疗的动物相比肿瘤生长降低。最后并且正如可以在图7C中看到的,在使用天然表达连接蛋白4的细胞系(MDA-MB-453)时也观察到这些效应。在不存在NK细胞的情况下,所述Ab没有作用,而所述Ab显著增强了与肿瘤细胞共同注射的人类NK细胞的抗肿瘤效应。合在一起,这些实验表明抗连接蛋白4抗体例如hNec4.05 mAb可以在体内增强NK细胞毒性并导致肿瘤生长抑制。

[0455] 实施例8. 抗连接蛋白-4克隆与细胞上表达的人类、猴和鼠类连接蛋白-4的结合

[0456] 通过FACS分析评估了鼠类抗人类连接蛋白-4克隆hNec4.05和hNec4.11与在人类细胞系MDA-MD-453上表达的连接蛋白-4的结合。图8A描绘了每种克隆在Ab结合的滴定(20-0.01nM的范围)后计算的EC50值和最大结合信号。当试验鼠类Ab的嵌合版本时达到了相近的值,在所述嵌合版本中将鼠类IgG1 Fc链用人类IgG1 Fc链代替。图8B描绘了抗体与用食蟹猴(Cyno)连接蛋白-4转染的CHO细胞的结合,图8C描绘了抗体与用鼠类连接蛋白-4转染的CHO细胞的结合。这些数据证实与人类靶的EC50值在亚纳摩尔范围内,这在图3中为克隆hNec4.01和hNec4.05呈现的Kd值的级别。另外,这些结果证实了这两种克隆对猴(食蟹猴)连接蛋白-4靶的交叉反应性,因为它们以与为人类靶计算的EC50值相近的EC50值与其结合。这对于所述Ab的临床前研究来说可能是重要的。最后,克隆hNec4.11但不是克隆hNec4.05显示出也与鼠类连接蛋白-4靶交叉反应。另外,在这种情况下计算的EC50比为人类靶计算的EC50高约10倍。

[0457] 实施例9. 抗连接蛋白-4克隆对连接蛋白-4配体的阻断

[0458] 抗体克隆hNec4.05和hNec4.11阻断连接蛋白-4与其配体TIGIT和连接蛋白-1的结合。连接蛋白-4配体的结合通过FACS分析来评估。在存在或不存在均为8 μ g/ml的抗连接蛋白-4克隆hNec4.05(9A和9B)或克隆hNec4.11(9C和9D)的情况下,将用人类连接蛋白-4转染的CHO细胞与均为20 μ g/ml的人类TIGIT-Ig(图9A和C)或人类连接蛋白-1-Ig(图9B和D)温育。在所有情况下观察到了所述抗连接蛋白-4Ab的强有力的结合抑制。残留的信号可能是由配体与CHO细胞表达的其他受体例如PVR的结合造成的,这种结合不受抗连接蛋白-4Ab影响。这些结果表明连接蛋白-4克隆hNec4.05和hNec4.11可能通过阻断经细胞表面连接蛋

白-4的信号传导来影响所述靶癌细胞。另外,这些Ab可能也影响表达连接蛋白-4配体例如抑制性配体TIGIT的效应细胞。

[0459] 实施例10. 人类IgG1嵌合Ab克隆hNec4.05和hNec4.1在肿瘤细胞存在下增强NK细胞活化。

[0460] 在图11中描绘了NK细胞上的脱颗粒标志物CD107a的相对表达水平。将人类NK细胞(效应细胞,E)与靶细胞(T) HT1376(图10A)和MDA-MD-453(图10B)以2:1的E:T比例温育。温育在12 μ g/ml嵌合克隆hNec4.05hIgG1、hNec4.11hIgG1或对照hIgG1存在下进行。2小时后,通过CD107a表达的FACS分析测定NK细胞的脱颗粒和活化状态。将在对照hIgG1存在下NK细胞的脱颗粒设定为1并计算相应的诱导倍数。示出了2-3次重复实验的平均值及其归一化的SD。这些结果表明了这些Ab通过增强抗肿瘤NK细胞活性的抗癌效果。示出了克隆hNec4.11-hIgG1与克隆hNec4.05hIgG1相比在ADCC诱导方面的轻微优势,这与图8A中所示的克隆hNec4.11的更高最大结合相一致。

[0461] 实施例11. 由hNec4.11驱动的CAR-T在表达连接蛋白-4的肿瘤细胞存在下引起特异性T细胞活化。

[0462] 图11A中示出了CAR-T构建物的示意图。通过GFP表达判断的转导效能高于99%(图11B)。将亲代Jurkat细胞或表达带有基于hNec4.11的单链可变区(scFv)的CAR-T构建物的Jurkat细胞(Jurkat pHAGE2.4.11)与靶细胞HT1376和MDA-MD-453(MDA-453)温育(图11C)。Jurkat细胞的IL-2分泌被CAR-T表达显著诱导。接下来,使用pHAGE2.4.11慢病毒粒子转导PBMC(图11D)。将CAR-T PBMC与HT1376细胞在多种E:T下温育。48小时后除去效应细胞,并使用CellTiter-Glo®发光细胞存活性测定法评估靶细胞存活性。靶细胞的灭杀是显著的。合在一起,这些观察指向进一步开发基于本文中描述的连接蛋白4Ab的CR-T疗法的可能性。

[0463] CAR构建物的ScFv序列

[0464] 克隆11-核酸(SEQ ID NO:31)

[0465] ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTACAGGTCCAGCTG
CAGCAGTCTGGACCTGAACTGGTGAAGCCTGAGACTTCAGTGAAGATTTCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCAC
AAGTTACTATATACACTGGGTGAAACAGAGGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGCTGGATTTATCCTGGAAATG
TTAATACTAAGTATAATGAGAGGTTTAAGGGCAAGGCCACTCTGACTGCAGACAAATCCTCCAACACAGCCCACATG
CAGCTCACCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGATCGAACCCCTATGTTATGGACTACTG
GGGTCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGCTCCGGAGGAGGTGGTTCTGGAGGAGGTGGTTCTG
ATATCGTGATGACCCAGACTCCCAAATTCCTGCTTGATCAGCAGGAGACAGAGTCACCATAACCTGCAAGGCCAGT
CAGAGTGTGAATAATGATGTGGCTTGGTATCAACAGAAGCCAGGGCTGTCTCCTGAACTGCTTATGTATTATGCATC
CAATCGCTTCACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGGATATGGGACGGATTTCACTTTCACCATCAGCTCTG
TGCAGGCTGAAGACCTGGCAATTTATTTCTGTGTCAGCAGGCTTATAGGTCTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAG
CTGGAAATTCAA

[0466] 克隆11-氨基酸(SEQ ID NO:32)

[0467] MGWSCIIILFLVATATGVHSQVQLQQSGPELVKPEITSVKISKASGYTFTSYIIHWVKQRPGQGLEWIGW
IYPGNVNTKYNERFKGKATLTADKSSNTAHMQLTSLTSEDSAVYFCARSNPYVMDYWGQGTSTVTVSSGGGGSGGGGS
GGGGSDIVMTQTPKFLVLSAGDRVITITCKASQSVNNDVAWYQQKPKLSPELLMYASNRFTGVPDRFTGSGYGTDF
FTISSVQAEDLAIYFCQQAYRSPYTFGGGKLEIQ

[0468] 克隆5-核酸 (SEQ ID NO:33)

[0469] ATGGGATGGAGCTGTATCATCCTCTTCTTGGTAGCAACAGCTACAGGTGTGCATTACAGGTCCAGCTG
CAGCAGTCTGGACCTGAGCTGGTGAAGCCTGGGGCTTCAGTGAGGATATCCTGCAAGGCCTCTGGCTACACCTTCAC
AACCTACTATATACACTGGGTGAAGCAGAGGCCTGGACAGGGACTTGAGTGGATTGGATGGATTTATCCTGGAAATG
TTAATACTAAGAACAATGAGAAGTTCAAGGTCAAGGCCACACTGACTGCAGACAAATCCTCCAGCACAGCCTACATG
CAGCTCAGCAGCCTGACCTCTGAGGACTCTGCGGTCTATTTCTGTGCAAGATCGAACCCTATGTTATGGACTACTG
GGGTCAGGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAGGTGGAGGTGGCTCCGGAGGAGGTGGTTCTGGAGGAGGTGGTTCTA
GTATTGTGATGACCCAGACTCCCAAATTCCTGCTTGTATCAGCAGGAGACAGGGTTACCATAACCTGCAAGGCCAGT
CAGAGTGTGAGTAATGATGTAGCTTGGTACCAACAGAAGCCAGGGCAGTCTCCTAAACTGCTGATATACTATGCATC
CAATCGCTACACTGGAGTCCCTGATCGCTTCACTGGCAGTGGATATGGGACGGATTTCACTTTACCATCAGCGCTG
TGCAGGCTGAAGACCTGGCAGTTTATTTCTGTCAGCAGGATTATAGCTCTCCGTACACGTTCCGAGGGGGGACCAAG
CTGGAAATAAAA

[0470] 克隆5-氨基酸 (SEQ ID NO:34)

[0471] MGWSCIIILFLVATATGVHSQVQLQQSGPELVKPGASVRISCKASGYTFTTYYIHWVKRPGQGLEWIGW
IYPGNVNTKNNEKFKVKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARSNPYVMDYWGQTSVTVSSGGGSGGGGS
GGGSSIVMTQTPKFLLSAGDRVITITCKASQSVSNDVAWYQQKPGQSPKLLIYYASNRYTGVPDRFTGSGYGTDF
FTISAVQAEDLAVYFCQQDYSSPYTFGGGTKLEIK

[0472] 前述特定实施方式的描述非常充分地揭示出本发明的总体本质,使得其他人可以通过应用当前的知识容易地修改和/或改编这些特定实施方式以适应于各种不同的应用,而无需过多的实验并且不背离所述通用概念,因此,这些改编和修改应当并且打算被包含在所公开的实施方式的等同性的含义和范围之内。应当理解,本文中采用的短语或术语是出于描述而不是限制的目的。

[0001]	序列表
[0002]	<110> 耶路撒冷希伯来大学伊森姆研究发展有限公司
[0003]	耐科廷疗法有限公司
[0004]	<120> 特异性针对人类连接蛋白4的抗体
[0005]	<130> Yissum/0154 PCT
[0006]	<150> US 62/668824
[0007]	<151> 2018-05-09
[0008]	<160> 46
[0009]	<170> PatentIn version 3.5
[0010]	<210> 1
[0011]	<211> 414
[0012]	<212> DNA
[0013]	<213> Mus musculus
[0014]	<400> 1
[0015]	atgggatgga gctggatctt tctcttcctc ctgtcaggaa ctgcaggctt ccactctgag 60
[0016]	gtccaacttc agcagtcagg acctgaactg gtgaaacctg gggcctcagt gaagattgcc 120
[0017]	tgcagggcct ctggatacac attcactgcc tacaatatcc actgggtgag ccagagacat 180
[0018]	ggaaagagcc ttgaatggat tggatatatc tatectaaca atggtgggtc tggtacaac 240
[0019]	cagaaattca tgaacaaggc cacattgact gtagaccatt cctccaatac agcctacatg 300
[0020]	gagctccgca gcctgacgtc tgaggactct gcagtctatt actgtgcaat atttgattac 360
[0021]	gacgaggcct ggtttattta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc tgca 414
[0022]	<210> 2
[0023]	<211> 138
[0024]	<212> PRT
[0025]	<213> Mus musculus
[0026]	<400> 2
[0027]	Met Gly Trp Ser Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Gly Thr Ala Gly
[0028]	1 5 10 15
[0029]	Phe His Ser Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
[0030]	20 25 30
[0031]	Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ala Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
[0032]	35 40 45
[0033]	Thr Ala Tyr Asn Ile His Trp Val Ser Gln Arg His Gly Lys Ser Leu
[0034]	50 55 60
[0035]	Glu Trp Ile Gly Tyr Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Ser Gly Tyr Asn
[0036]	65 70 75 80
[0037]	Gln Lys Phe Met Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp His Ser Ser Asn
[0038]	85 90 95

[0039]	Thr Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val	
[0040]	100	105 110
[0041]	Tyr Tyr Cys Ala Ile Phe Asp Tyr Asp Glu Ala Trp Phe Ile Tyr Trp	
[0042]	115	120 125
[0043]	Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala	
[0044]	130	135
[0045]	<210> 3	
[0046]	<211> 384	
[0047]	<212> DNA	
[0048]	<213> Mus musculus	
[0049]	<400> 3	
[0050]	atggattttc aagtgcagat tttcagcttc ctgctaataca gtgcctcagt cataatgtcc	60
[0051]	agaggagaaa atgttctcac ccagtctcca gaaatcatgt ctgcatctcc cggggaagag	120
[0052]	gtcaccatga cctgtagtgc cagctcaagt gttagttaca tgcactgggt ccagcagaag	180
[0053]	tcaactatct cccccaaact ctggattttat gacacatcca aactggcttc tggagtcccc	240
[0054]	ggtcgcttca gtggcagtgg gtctggcaag tcttactctc tcacgatcag aaacatggag	300
[0055]	gctgaagatg ttgccaccta ttactgtttt caggggagtg ggagcccgta cacgttcgga	360
[0056]	ggggggacca agctggaaat taaa	384
[0057]	<210> 4	
[0058]	<211> 128	
[0059]	<212> PRT	
[0060]	<213> Mus musculus	
[0061]	<400> 4	
[0062]	Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser	
[0063]	1 5 10 15	
[0064]	Val Ile Met Ser Arg Gly Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Glu Ile	
[0065]	20 25 30	
[0066]	Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Glu Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser	
[0067]	35 40 45	
[0068]	Ser Ser Val Ser Tyr Met His Trp Phe Gln Gln Lys Ser Thr Ile Ser	
[0069]	50 55 60	
[0070]	Pro Lys Leu Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro	
[0071]	65 70 75 80	
[0072]	Gly Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Lys Ser Tyr Ser Leu Thr Ile	
[0073]	85 90 95	
[0074]	Arg Asn Met Glu Ala Glu Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly	
[0075]	100 105 110	
[0076]	Ser Gly Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys	
[0077]	115 120 125	

[0078]	<210> 5
[0079]	<211> 408
[0080]	<212> DNA
[0081]	<213> Mus musculus
[0082]	<400> 5
[0083]	atgggatgga gccggatctt tctcttcctc ctgtcaataa ttgcaggtgt ccattgccag 60
[0084]	gtccagctgc agcagtctgg acctgagctg gtgaagcctg gggcttcagt gaggatatcc 120
[0085]	tgcaaggcct ctggctacac cttcacaacc tactatatac actgggtgaa gcagaggcct 180
[0086]	ggacagggac ttgagtggat tggatggatt tatcctggaa atgttaatac taagaacaat 240
[0087]	gagaagtcca aggtcaaggc cacactgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
[0088]	cagctcagca gctgacctc tgaggactct gcggtctatt tctgtgcaag atcgaacccc 360
[0089]	tatgttatgg actactgggg tcagggaacc tcagtcaccg tctcctca 408
[0090]	<210> 6
[0091]	<211> 136
[0092]	<212> PRT
[0093]	<213> Mus musculus
[0094]	<400> 6
[0095]	Met Gly Trp Ser Arg Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Ile Ile Ala Gly
[0096]	1 5 10 15
[0097]	Val His Cys Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
[0098]	20 25 30
[0099]	Pro Gly Ala Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
[0100]	35 40 45
[0101]	Thr Thr Tyr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
[0102]	50 55 60
[0103]	Glu Trp Ile Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Lys Asn Asn
[0104]	65 70 75 80
[0105]	Glu Lys Phe Lys Val Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
[0106]	85 90 95
[0107]	Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
[0108]	100 105 110
[0109]	Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Asn Pro Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
[0110]	115 120 125
[0111]	Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
[0112]	130 135
[0113]	<210> 7
[0114]	<211> 381
[0115]	<212> DNA
[0116]	<213> Mus musculus

[0117] <400> 7
 [0118] atgaagtcac agaccaggt ctctgtatct ctactgctct gtgtgtctgg tgctcatggg 60
 [0119] agtattgtga tgaccagac tcccaaattc ctgcttgat cagcaggaga cagggttacc 120
 [0120] ataacctgca aggccagtca gagggtgagt aatgatgtag ctggtacca acagaagcca 180
 [0121] gggcagtcct ctaaactgct gatatactat gcatccaatc gctacactgg agtccctgat 240
 [0122] cgcttctactg gcagtgata tgggacggat ttactttca ccatcagcgc tgtgcaggct 300
 [0123] gaagacctgg cagtttattt ctgtcagcag gattatagct ctccgtacac gttcggaggg 360
 [0124] gggaccaagc tggaaataaa a 381
 [0125] <210> 8
 [0126] <211> 127
 [0127] <212> PRT
 [0128] <213> Mus musculus
 [0129] <400> 8
 [0130] Met Lys Ser Gln Thr Gln Val Phe Val Phe Leu Leu Leu Cys Val Ser
 [0131] 1 5 10 15
 [0132] Gly Ala His Gly Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu
 [0133] 20 25 30
 [0134] Val Ser Ala Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser
 [0135] 35 40 45
 [0136] Val Ser Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
 [0137] 50 55 60
 [0138] Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp
 [0139] 65 70 75 80
 [0140] Arg Phe Thr Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
 [0141] 85 90 95
 [0142] Ala Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr
 [0143] 100 105 110
 [0144] Ser Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 [0145] 115 120 125
 [0146] <210> 9
 [0147] <211> 5
 [0148] <212> PRT
 [0149] <213> Mus musculus
 [0150] <400> 9
 [0151] Ala Tyr Asn Ile His
 [0152] 1 5
 [0153] <210> 10
 [0154] <211> 17
 [0155] <212> PRT

[0156]	<213>	Mus musculus
[0157]	<400>	10
[0158]	Tyr Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Ser Gly Tyr Asn Gln Lys Phe Met	
[0159]	1	5 10 15
[0160]	Asn	
[0161]	<210>	11
[0162]	<211>	10
[0163]	<212>	PRT
[0164]	<213>	Mus musculus
[0165]	<400>	11
[0166]	Phe Asp Tyr Asp Glu Ala Trp Phe Ile Tyr	
[0167]	1	5 10
[0168]	<210>	12
[0169]	<211>	10
[0170]	<212>	PRT
[0171]	<213>	Mus musculus
[0172]	<400>	12
[0173]	Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His	
[0174]	1	5 10
[0175]	<210>	13
[0176]	<211>	7
[0177]	<212>	PRT
[0178]	<213>	Mus musculus
[0179]	<400>	13
[0180]	Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser	
[0181]	1	5
[0182]	<210>	14
[0183]	<211>	9
[0184]	<212>	PRT
[0185]	<213>	Mus musculus
[0186]	<400>	14
[0187]	Phe Gln Gly Ser Gly Ser Pro Tyr Thr	
[0188]	1	5
[0189]	<210>	15
[0190]	<211>	5
[0191]	<212>	PRT
[0192]	<213>	Mus musculus
[0193]	<400>	15
[0194]	Thr Tyr Tyr Ile His	

[0195]	1	5	
[0196]	<210>	16	
[0197]	<211>	17	
[0198]	<212>	PRT	
[0199]	<213>	Mus musculus	
[0200]	<400>	16	
[0201]	Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Lys Asn Asn Glu Lys Phe Lys		
[0202]	1	5	10 15
[0203]	Val		
[0204]	<210>	17	
[0205]	<211>	8	
[0206]	<212>	PRT	
[0207]	<213>	Mus musculus	
[0208]	<400>	17	
[0209]	Ser Asn Pro Tyr Val Met Asp Tyr		
[0210]	1	5	
[0211]	<210>	18	
[0212]	<211>	11	
[0213]	<212>	PRT	
[0214]	<213>	Mus musculus	
[0215]	<400>	18	
[0216]	Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Ala		
[0217]	1	5	10
[0218]	<210>	19	
[0219]	<211>	7	
[0220]	<212>	PRT	
[0221]	<213>	Mus musculus	
[0222]	<400>	19	
[0223]	Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr		
[0224]	1	5	
[0225]	<210>	20	
[0226]	<211>	9	
[0227]	<212>	PRT	
[0228]	<213>	Mus musculus	
[0229]	<400>	20	
[0230]	Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr		
[0231]	1	5	
[0232]	<210>	21	
[0233]	<211>	408	

[0234] <212> DNA
 [0235] <213> Mus musculus
 [0236] <400> 21
 [0237] atgggatgga gccggatctt tctcttcctc ctgtcaataa ttgcaggtgt ccattgccag 60
 [0238] gtccagctgc agcagtctgg acctgaactg gtgaagcctg agacttcagt gaagatatcc 120
 [0239] tgcaaggctt ctggctacac cttcacaagt tactatatac actgggtgaa acagaggcct 180
 [0240] ggacagggac ttgagtggat tggctggatt tatectggaa atgttaatac taagtataat 240
 [0241] gagaggttta agggcaaggc cactctgact gcagacaaat cctccaacac agcccacatg 300
 [0242] cagctcacca gcctgacctc tgaggactct gcggtctatt tctgtgcaag atcgaacccc 360
 [0243] tatgttatgg actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg tctcctca 408
 [0244] <210> 22
 [0245] <211> 136
 [0246] <212> PRT
 [0247] <213> Mus musculus
 [0248] <400> 22
 [0249] Met Gly Trp Ser Arg Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Ile Ile Ala Gly
 [0250] 1 5 10 15
 [0251] Val His Cys Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
 [0252] 20 25 30
 [0253] Pro Glu Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 [0254] 35 40 45
 [0255] Thr Ser Tyr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 [0256] 50 55 60
 [0257] Glu Trp Ile Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Lys Tyr Asn
 [0258] 65 70 75 80
 [0259] Glu Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn
 [0260] 85 90 95
 [0261] Thr Ala His Met Gln Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 [0262] 100 105 110
 [0263] Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Asn Pro Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 [0264] 115 120 125
 [0265] Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 [0266] 130 135
 [0267] <210> 23
 [0268] <211> 381
 [0269] <212> DNA
 [0270] <213> Mus musculus
 [0271] <400> 23
 [0272] atgaagtcac agaccaggt cttcgtatct ctactgctct gtgtgtctgg tgctcatggg 60

[0273] agtattgtga tgaccagac tcccaattc ctgcttgat cagcaggaga cagagtcacc 120
 [0274] ataacctgca aggccagtca gagtgtgaat aatgatgtgg cttggtatca acagaagcca 180
 [0275] gggctgtctc ctgaactgct tatgtattat gcatccaatc gcttcactgg agtccctgat 240
 [0276] cgcttcactg gcagtggata tgggacggat ttcactttca ccatcagctc tgtgcaggct 300
 [0277] gaagacctgg caatttattt ctgtcagcag gcttataggt ctccgtacac gttcggaggg 360
 [0278] gggaccaagc tggaaattca a 381
 [0279] <210> 24
 [0280] <211> 127
 [0281] <212> PRT
 [0282] <213> Mus musculus
 [0283] <400> 24
 [0284] Met Lys Ser Gln Thr Gln Val Phe Val Phe Leu Leu Leu Cys Val Ser
 [0285] 1 5 10 15
 [0286] Gly Ala His Gly Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu
 [0287] 20 25 30
 [0288] Val Ser Ala Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser
 [0289] 35 40 45
 [0290] Val Asn Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Leu Ser Pro
 [0291] 50 55 60
 [0292] Glu Leu Leu Met Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Phe Thr Gly Val Pro Asp
 [0293] 65 70 75 80
 [0294] Arg Phe Thr Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser
 [0295] 85 90 95
 [0296] Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Phe Cys Gln Gln Ala Tyr
 [0297] 100 105 110
 [0298] Arg Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Gln
 [0299] 115 120 125
 [0300] <210> 25
 [0301] <211> 5
 [0302] <212> PRT
 [0303] <213> Mus musculus
 [0304] <400> 25
 [0305] Ser Tyr Tyr Ile His
 [0306] 1 5
 [0307] <210> 26
 [0308] <211> 17
 [0309] <212> PRT
 [0310] <213> Mus musculus
 [0311] <400> 26

[0312]	Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Lys Tyr Asn Glu Arg Phe Lys
[0313]	1 5 10 15
[0314]	Gly
[0315]	<210> 27
[0316]	<211> 8
[0317]	<212> PRT
[0318]	<213> Mus musculus
[0319]	<400> 27
[0320]	Ser Asn Pro Tyr Val Met Asp Tyr
[0321]	1 5
[0322]	<210> 28
[0323]	<211> 11
[0324]	<212> PRT
[0325]	<213> Mus musculus
[0326]	<400> 28
[0327]	Lys Ala Ser Gln Ser Val Asn Asn Asp Val Ala
[0328]	1 5 10
[0329]	<210> 29
[0330]	<211> 7
[0331]	<212> PRT
[0332]	<213> Mus musculus
[0333]	<400> 29
[0334]	Tyr Ala Ser Asn Arg Phe Thr
[0335]	1 5
[0336]	<210> 30
[0337]	<211> 9
[0338]	<212> PRT
[0339]	<213> Mus musculus
[0340]	<400> 30
[0341]	Gln Gln Ala Tyr Arg Ser Pro Tyr Thr
[0342]	1 5
[0343]	<210> 31
[0344]	<211> 774
[0345]	<212> DNA
[0346]	<213> Artificial Sequence
[0347]	<220>
[0348]	<223> Synthetic sequence
[0349]	<400> 31
[0350]	atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt gcattcacag 60

[0351] gtccagctgc agcagttctgg acctgaactg gtgaagcctg agacttcagt gaagatttcc 120
 [0352] tgcaaggctt ctggctacac cttcacaagt tactatatac actgggtgaa acagaggcct 180
 [0353] ggacagggac ttgagtggat tggctggatt taccctggaa atgttaatac taagtataat 240
 [0354] gagaggttta agggcaaggc cactctgact gcagacaaat cctccaacac agcccacatg 300
 [0355] cagctcacca gcctgacctc tgaggactct gcggtctatt tctgtgcaag atcgaacccc 360
 [0356] tatgttatgg actactgggg tcaaggaacc tcagtcaccg tctcctcagg tggaggtggc 420
 [0357] tccggaggag gtggttctgg aggaggtggg tctgatatcg tgatgaccca gactcccaaa 480
 [0358] ttctgcttg tatcagcagg agacagagtc accataacct gcaaggccag tcagagtgtg 540
 [0359] aataatgatg tggcttggtg tcaacagaag ccagggtgtg ctcctgaact gcttatgtat 600
 [0360] tatgcatcca atcgcttcac tggagtcctt gatcgcttca ctggcagtgg atatgggacg 660
 [0361] gatttcactt tcaccatcag ctctgtgcag gctgaagacc tggcaattta tttctgtcag 720
 [0362] caggcttata ggtctccgta cacgttcgga ggggggacca agctggaaat tcaa 774
 [0363] <210> 32
 [0364] <211> 258
 [0365] <212> PRT
 [0366] <213> Artificial Sequence
 [0367] <220>
 [0368] <223> Synthetic sequence
 [0369] <400> 32
 [0370] Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
 [0371] 1 5 10 15
 [0372] Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
 [0373] 20 25 30
 [0374] Pro Glu Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
 [0375] 35 40 45
 [0376] Thr Ser Tyr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
 [0377] 50 55 60
 [0378] Glu Trp Ile Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Lys Tyr Asn
 [0379] 65 70 75 80
 [0380] Glu Arg Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn
 [0381] 85 90 95
 [0382] Thr Ala His Met Gln Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
 [0383] 100 105 110
 [0384] Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Asn Pro Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
 [0385] 115 120 125
 [0386] Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 [0387] 130 135 140
 [0388] Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys
 [0389] 145 150 155 160

[0390]	Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala
[0391]	165 170 175
[0392]	Ser Gln Ser Val Asn Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
[0393]	180 185 190
[0394]	Leu Ser Pro Glu Leu Leu Met Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Phe Thr Gly
[0395]	195 200 205
[0396]	Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe
[0397]	210 215 220
[0398]	Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Ile Tyr Phe Cys Gln
[0399]	225 230 235 240
[0400]	Gln Ala Tyr Arg Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
[0401]	245 250 255
[0402]	Ile Gln
[0403]	<210> 33
[0404]	<211> 774
[0405]	<212> DNA
[0406]	<213> Artificial Sequence
[0407]	<220>
[0408]	<223> Synthetic sequence
[0409]	<400> 33
[0410]	atgggatgga gctgtatcat cctcttcttg gtagcaacag ctacaggtgt gcattcacag 60
[0411]	gtccagctgc agcagtctgg acctgagctg gtgaagcctg gggcttcagt gaggatatcc 120
[0412]	tgcaaggcct ctggctacac cttcacaacc tactatatac actgggtgaa gcagaggcct 180
[0413]	ggacagggac ttgagtggat tggatggatt tatectggaa atgttaatac taagaacaat 240
[0414]	gagaagtcca aggtcaaggc cacactgact gcagacaaat cctccagcac agcctacatg 300
[0415]	cagctcagca gcctgacctc tgaggactct gcggtctatt tctgtgcaag atcgaacccc 360
[0416]	tatgttatgg actactgggg tcagggaacc tcagtcaccg tctcctcagg tggaggtggc 420
[0417]	tccggaggag gtggttctgg aggaggtggt tctagtattg tgatgaccca gactcccaaa 480
[0418]	ttcctgcttg tatcagcagg agacagggtt accataacct gcaaggccag tcagagtgtg 540
[0419]	agtaatgatg tagcttggtc ccaacagaag ccagggcagt ctcctaaact gctgatatac 600
[0420]	tatgcatcca atcgctacac tggagtcctt gatcgcttca ctggcagtggtg atatgggacg 660
[0421]	gatttcactt tcaccatcag cgctgtgcag gctgaagacc tggcagttta tttctgtcag 720
[0422]	caggattata gctctccgta cacgttcgga ggggggacca agctggaaat aaaa 774
[0423]	<210> 34
[0424]	<211> 258
[0425]	<212> PRT
[0426]	<213> Artificial Sequence
[0427]	<220>
[0428]	<223> Synthetic sequence

[0429]	<400> 34
[0430]	Met Gly Trp Ser Cys Ile Ile Leu Phe Leu Val Ala Thr Ala Thr Gly
[0431]	1 5 10 15
[0432]	Val His Ser Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
[0433]	20 25 30
[0434]	Pro Gly Ala Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe
[0435]	35 40 45
[0436]	Thr Thr Tyr Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu
[0437]	50 55 60
[0438]	Glu Trp Ile Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Lys Asn Asn
[0439]	65 70 75 80
[0440]	Glu Lys Phe Lys Val Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser
[0441]	85 90 95
[0442]	Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val
[0443]	100 105 110
[0444]	Tyr Phe Cys Ala Arg Ser Asn Pro Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln
[0445]	115 120 125
[0446]	Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
[0447]	130 135 140
[0448]	Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys
[0449]	145 150 155 160
[0450]	Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala
[0451]	165 170 175
[0452]	Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
[0453]	180 185 190
[0454]	Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly
[0455]	195 200 205
[0456]	Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe
[0457]	210 215 220
[0458]	Thr Ile Ser Ala Val Gln Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln
[0459]	225 230 235 240
[0460]	Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu
[0461]	245 250 255
[0462]	Ile Lys
[0463]	<210> 35
[0464]	<211> 119
[0465]	<212> PRT
[0466]	<213> Mus musculus
[0467]	<400> 35

[0468]	Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[0469]	1 5 10 15
[0470]	Ser Val Lys Ile Ala Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ala Tyr
[0471]	20 25 30
[0472]	Asn Ile His Trp Val Ser Gln Arg His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
[0473]	35 40 45
[0474]	Gly Tyr Ile Tyr Pro Asn Asn Gly Gly Ser Gly Tyr Asn Gln Lys Phe
[0475]	50 55 60
[0476]	Met Asn Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp His Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
[0477]	65 70 75 80
[0478]	Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
[0479]	85 90 95
[0480]	Ala Ile Phe Asp Tyr Asp Glu Ala Trp Phe Ile Tyr Trp Gly Gln Gly
[0481]	100 105 110
[0482]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
[0483]	115
[0484]	<210> 36
[0485]	<211> 106
[0486]	<212> PRT
[0487]	<213> Mus musculus
[0488]	<400> 36
[0489]	Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Glu Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
[0490]	1 5 10 15
[0491]	Glu Glu Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
[0492]	20 25 30
[0493]	His Trp Phe Gln Gln Lys Ser Thr Ile Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
[0494]	35 40 45
[0495]	Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser
[0496]	50 55 60
[0497]	Gly Ser Gly Lys Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Arg Asn Met Glu Ala Glu
[0498]	65 70 75 80
[0499]	Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Ser Pro Tyr Thr
[0500]	85 90 95
[0501]	Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0502]	100 105
[0503]	<210> 37
[0504]	<211> 117
[0505]	<212> PRT
[0506]	<213> Mus musculus

[0507]	<400> 37
[0508]	Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
[0509]	1 5 10 15
[0510]	Ser Val Arg Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Thr Tyr
[0511]	20 25 30
[0512]	Tyr Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0513]	35 40 45
[0514]	Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Val Asn Thr Lys Asn Asn Glu Lys Phe
[0515]	50 55 60
[0516]	Lys Val Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
[0517]	65 70 75 80
[0518]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
[0519]	85 90 95
[0520]	Ala Arg Ser Asn Pro Tyr Val Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser
[0521]	100 105 110
[0522]	Val Thr Val Ser Ser
[0523]	115
[0524]	<210> 38
[0525]	<211> 107
[0526]	<212> PRT
[0527]	<213> Mus musculus
[0528]	<400> 38
[0529]	Ser Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Lys Phe Leu Leu Val Ser Ala Gly
[0530]	1 5 10 15
[0531]	Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Ser Asn Asp
[0532]	20 25 30
[0533]	Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
[0534]	35 40 45
[0535]	Tyr Tyr Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
[0536]	50 55 60
[0537]	Ser Gly Tyr Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ala Val Gln Ala
[0538]	65 70 75 80
[0539]	Glu Asp Leu Ala Val Tyr Phe Cys Gln Gln Asp Tyr Ser Ser Pro Tyr
[0540]	85 90 95
[0541]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
[0542]	100 105
[0543]	<210> 39
[0544]	<211> 117
[0545]	<212> PRT

[0546]	<213> Mus musculus															
[0547]	<400> 39															
[0548]	Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Glu	Thr
[0549]	1				5					10					15	
[0550]	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
[0551]				20					25					30		
[0552]	Tyr	Ile	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
[0553]			35					40					45			
[0554]	Gly	Trp	Ile	Tyr	Pro	Gly	Asn	Val	Asn	Thr	Lys	Tyr	Asn	Glu	Arg	Phe
[0555]		50					55					60				
[0556]	Lys	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Ser	Asn	Thr	Ala	His
[0557]	65					70					75				80	
[0558]	Met	Gln	Leu	Thr	Ser	Leu	Thr	Ser	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys
[0559]					85					90					95	
[0560]	Ala	Arg	Ser	Asn	Pro	Tyr	Val	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser
[0561]				100					105					110		
[0562]	Val	Thr	Val	Ser	Ser											
[0563]				115												
[0564]	<210> 40															
[0565]	<211> 107															
[0566]	<212> PRT															
[0567]	<213> Mus musculus															
[0568]	<400> 40															
[0569]	Ser	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Thr	Pro	Lys	Phe	Leu	Leu	Val	Ser	Ala	Gly
[0570]	1				5					10					15	
[0571]	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asn	Asn	Asp
[0572]				20					25					30		
[0573]	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Leu	Ser	Pro	Glu	Leu	Leu	Met
[0574]			35					40					45			
[0575]	Tyr	Tyr	Ala	Ser	Asn	Arg	Phe	Thr	Gly	Val	Pro	Asp	Arg	Phe	Thr	Gly
[0576]		50					55					60				
[0577]	Ser	Gly	Tyr	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Val	Gln	Ala
[0578]	65					70					75				80	
[0579]	Glu	Asp	Leu	Ala	Ile	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Ala	Tyr	Arg	Ser	Pro	Tyr
[0580]					85					90					95	
[0581]	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Gln					
[0582]				100					105							
[0583]	<210> 41															
[0584]	<211> 357															

[0585] <212> DNA
 [0586] <213> Mus musculus
 [0587] <400> 41
 [0588] gaggtccaac ttcagcagtc aggacctgaa ctggtgaaac ctggggcctc agtgaagatt 60
 [0589] gcctgcaggg cctctggata cacattcact gcctacaata tccactgggt gagccagaga 120
 [0590] catggaaaga gccttgaatg gatttgatata atctatccta acaatggtgg ttctggctac 180
 [0591] aaccagaaat tcatgaacaa ggccacattg actgtagacc attcctccaa tacagcctac 240
 [0592] atggagctcc gcagcctgac gtctgaggac tctgcagtct attactgtgc aatatttgat 300
 [0593] tacgacgagg cctggtttat ttactggggc caagggactc tggtcactgt ctctgca 357
 [0594] <210> 42
 [0595] <211> 318
 [0596] <212> DNA
 [0597] <213> Mus musculus
 [0598] <400> 42
 [0599] gaaaatgttc tcaccagtc tccagaaatc atgtctgcat ctcccgggga agaggtcacc 60
 [0600] atgacctgta gtgccagctc aagtgttagt tacatgcact ggttccagca gaagtcaact 120
 [0601] atctcccca aactctggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccccggtcgc 180
 [0602] ttcagtggca gtgggtctgg caagtcttac tctctcacga tcagaaacat ggaggtgaa 240
 [0603] gatgttgcca cctattactg ttttcagggg agtgggagcc cgtacacgtt cggagggggg 300
 [0604] accaagctgg aaattaaa 318
 [0605] <210> 43
 [0606] <211> 357
 [0607] <212> DNA
 [0608] <213> Mus musculus
 [0609] <400> 43
 [0610] gaggtccaac ttcagcagtc aggacctgaa ctggtgaaac ctggggcctc agtgaagatt 60
 [0611] gcctgcaggg cctctggata cacattcact gcctacaata tccactgggt gagccagaga 120
 [0612] catggaaaga gccttgaatg gatttgatata atctatccta acaatggtgg ttctggctac 180
 [0613] aaccagaaat tcatgaacaa ggccacattg actgtagacc attcctccaa tacagcctac 240
 [0614] atggagctcc gcagcctgac gtctgaggac tctgcagtct attactgtgc aatatttgat 300
 [0615] tacgacgagg cctggtttat ttactggggc caagggactc tggtcactgt ctctgca 357
 [0616] <210> 44
 [0617] <211> 321
 [0618] <212> DNA
 [0619] <213> Mus musculus
 [0620] <400> 44
 [0621] agtattgtga tgaccagac tcccaaattc ctgcttgat cagcaggaga cagggttacc 60
 [0622] ataacctgca aggccagtca gagtgtgagt aatgatgtag cttggtacca acagaagcca 120
 [0623] gggcagtcct ctaaactgct gatatactat gcatccaatc gctacactgg agtcctgat 180

[0624] cgcttctactg gcagtggata tgggacggat ttactttca ccatcagcgc tgtgcaggct 240
[0625] gaagacctgg cagtttattt ctgtcagcag gattatagct ctccgtacac gttcggaggg 300
[0626] gggaccaagc tggaaataaa a 321
[0627] <210> 45
[0628] <211> 351
[0629] <212> DNA
[0630] <213> Mus musculus
[0631] <400> 45
[0632] caggtccagc tgcagcagtc tggacctgaa ctggtgaagc ctgagacttc agtgaagata 60
[0633] tcctgcaagg cttctggcta caccttcaca agttactata tacactgggt gaaacagagg 120
[0634] cctggacagg gacttgagtg gattggctgg atttatcctg gaaatgttaa tactaagtat 180
[0635] aatgagaggt ttaagggcaa ggccactctg actgcagaca aatcctccaa cacagccac 240
[0636] atgcagctca ccagcctgac ctctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagatcgaac 300
[0637] ccctatgtta tggactactg gggtaagga acctcagtc cgtctcctc a 351
[0638] <210> 46
[0639] <211> 321
[0640] <212> DNA
[0641] <213> Mus musculus
[0642] <400> 46
[0643] agtattgtga tgaccagac tcccaaattc ctgcttgtat cagcaggaga cagagtcacc 60
[0644] ataacctgca aggccagtca gagtgtgaat aatgatgtgg cttggtatca acagaagcca 120
[0645] gggctgtctc ctgaactgct tatgtattat gcatccaatc gcttctactgg agtccctgat 180
[0646] cgcttctactg gcagtggata tgggacggat ttactttca ccatcagctc tgtgcaggct 240
[0647] gaagacctgg caatttattt ctgtcagcag gcttataggt ctccgtacac gttcggaggg 300
[0648] gggaccaagc tggaaattca a 321

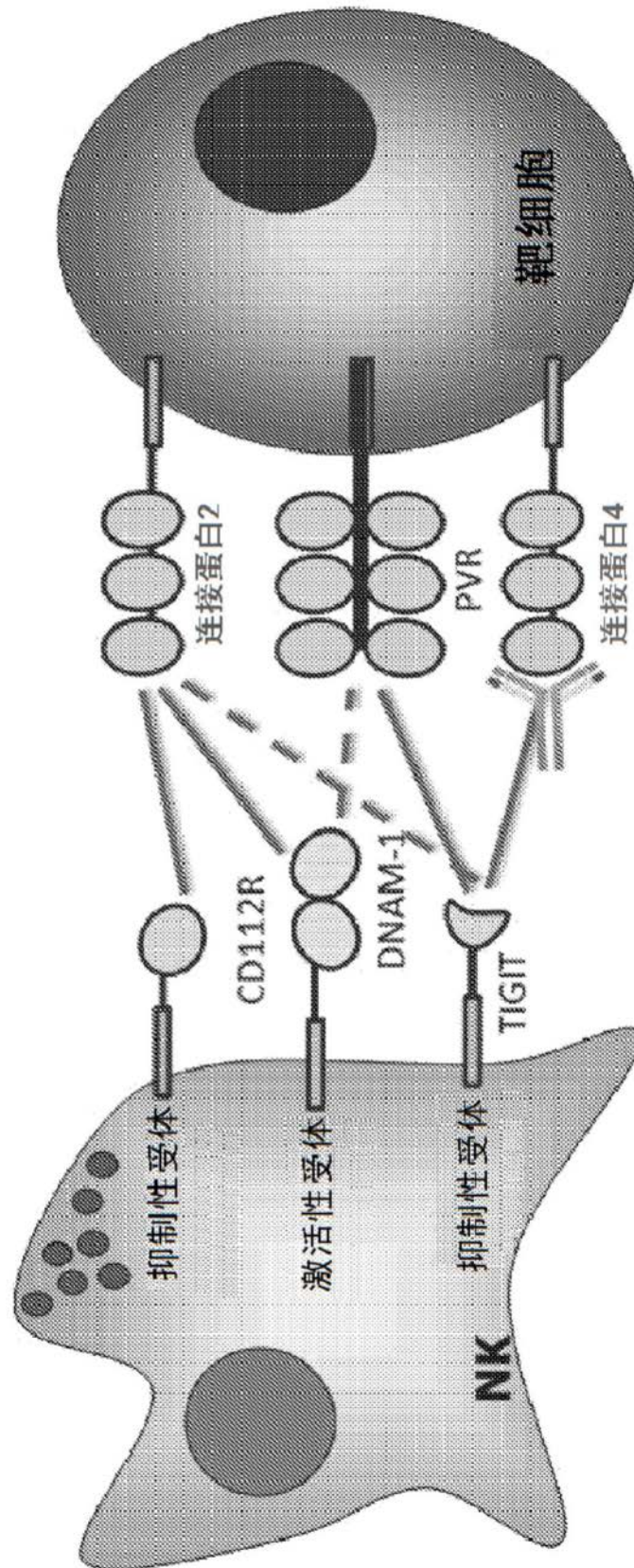


图1

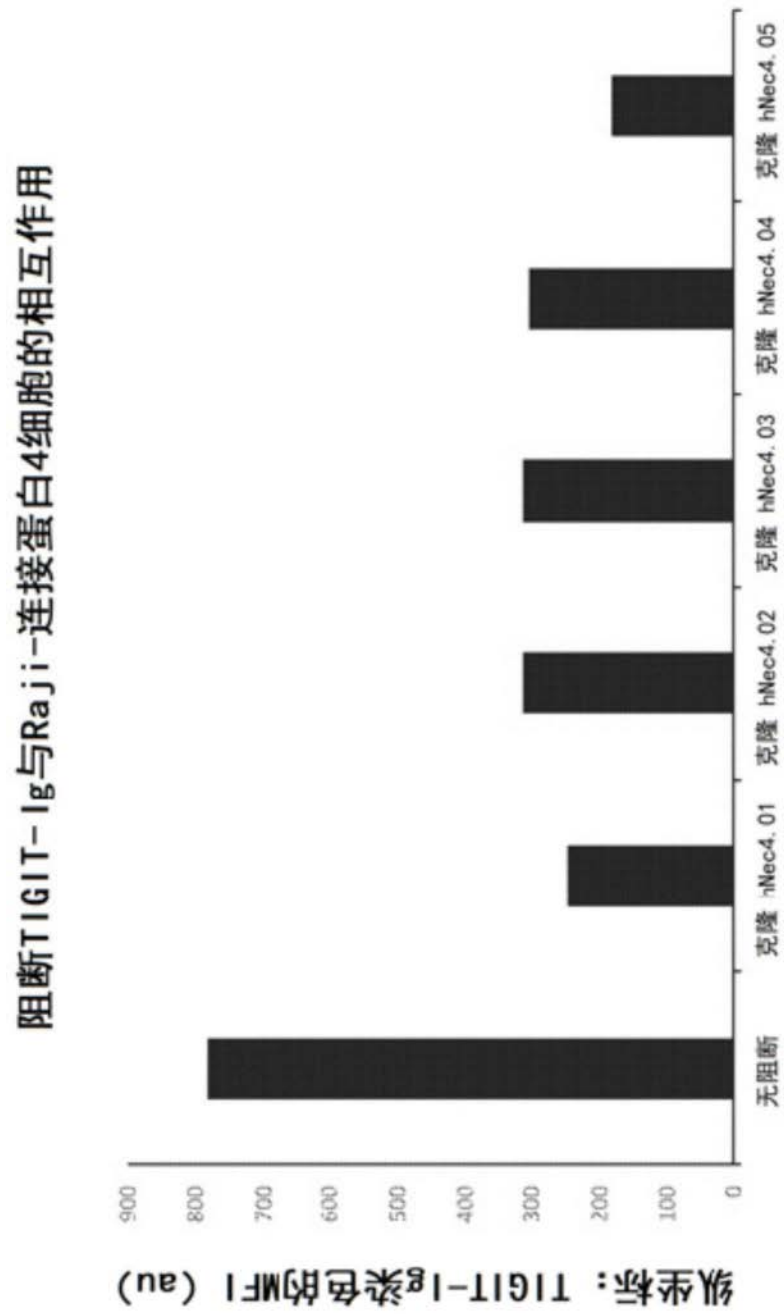


图2

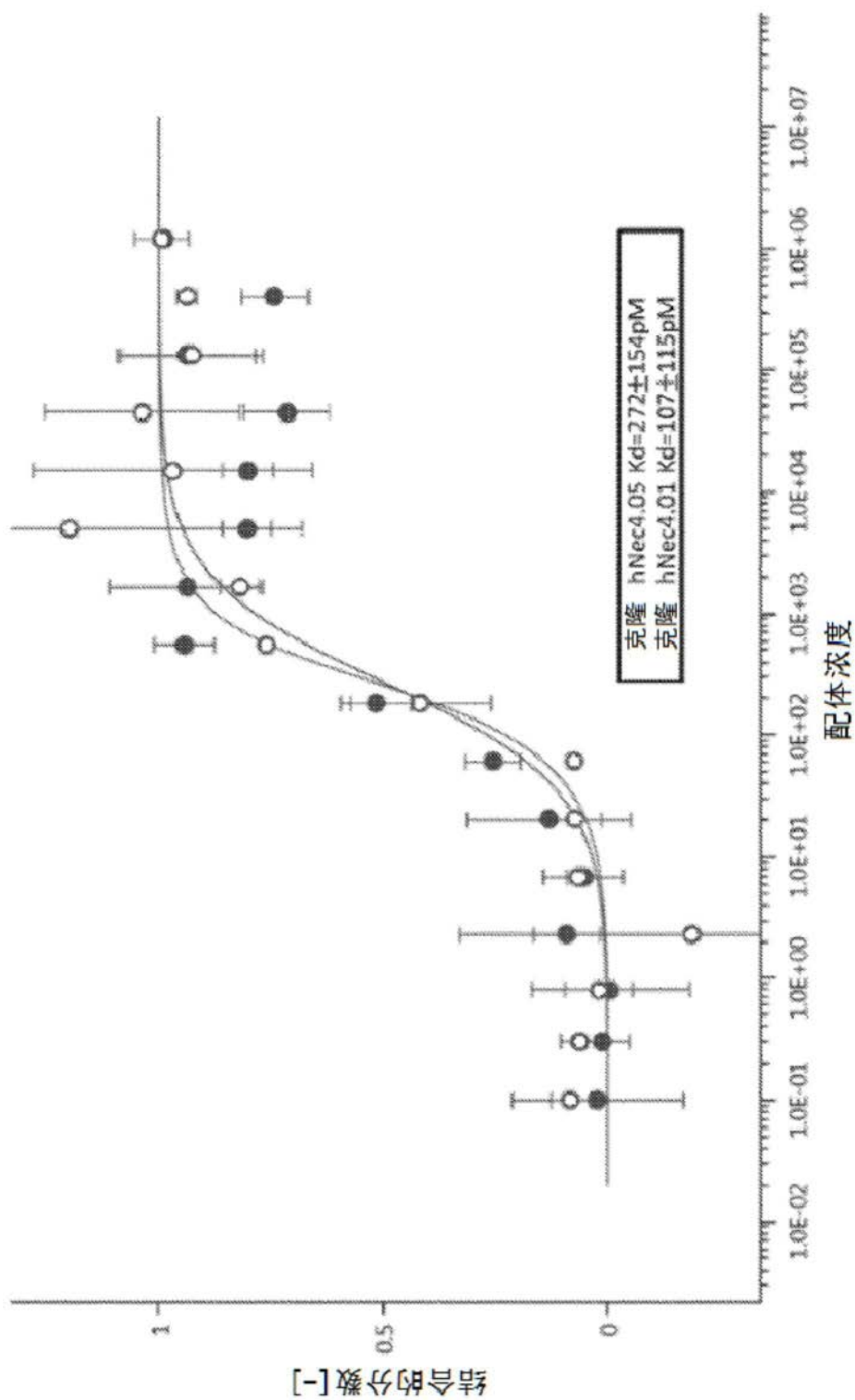


图3

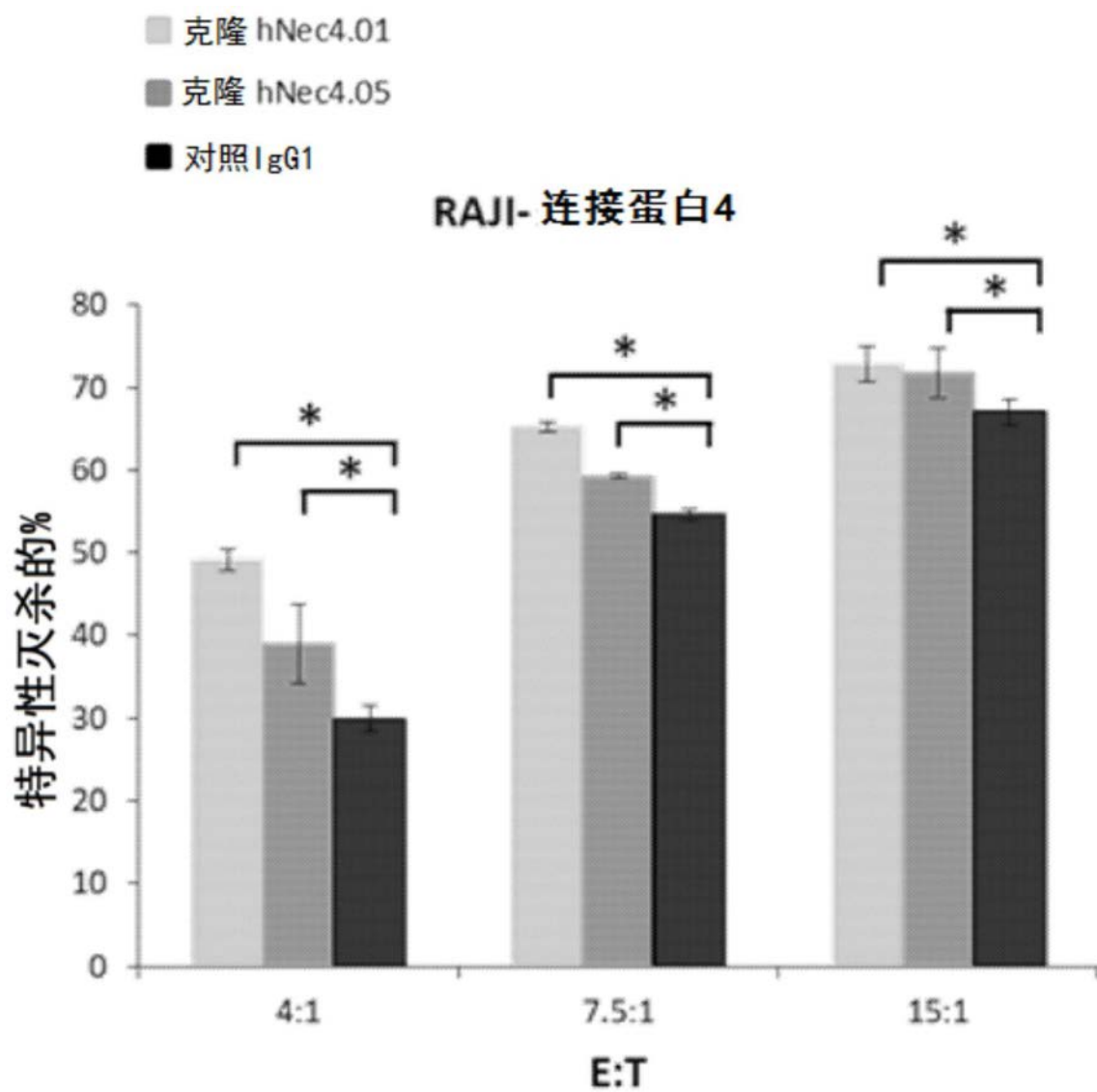


图4A

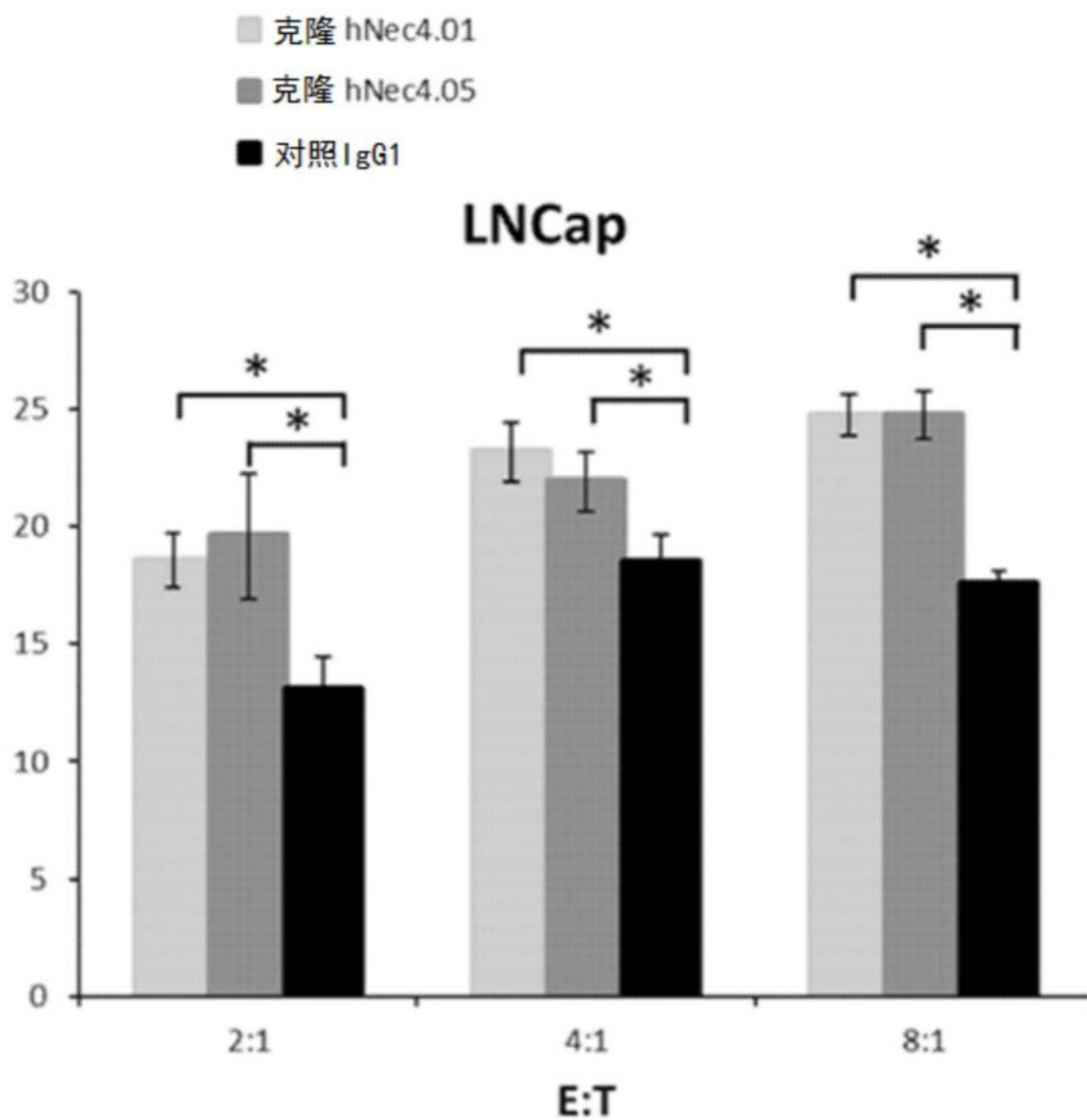


图4B

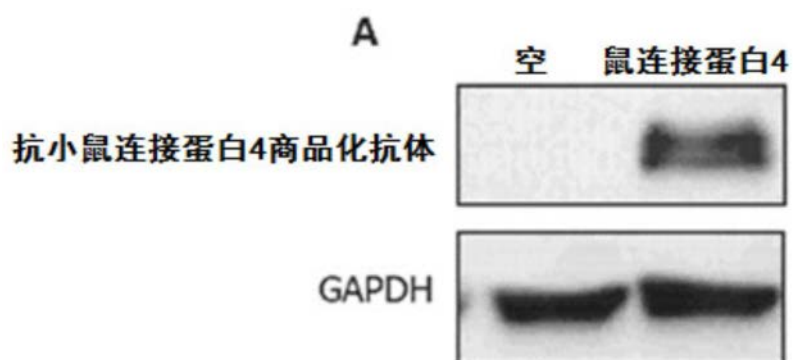


图5A

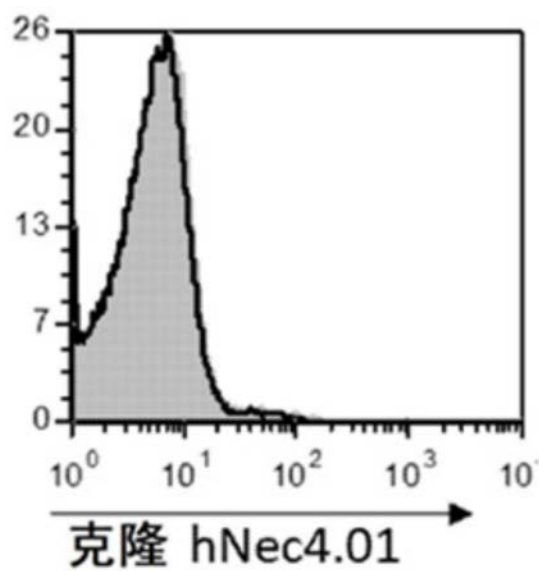


图5B

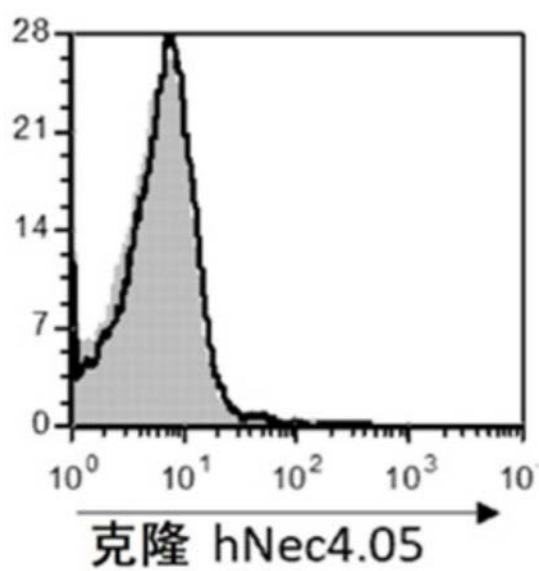


图5C

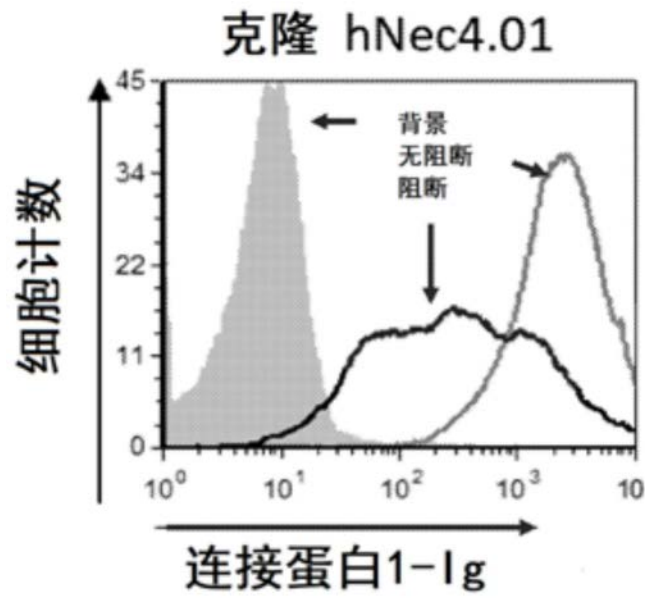


图6A

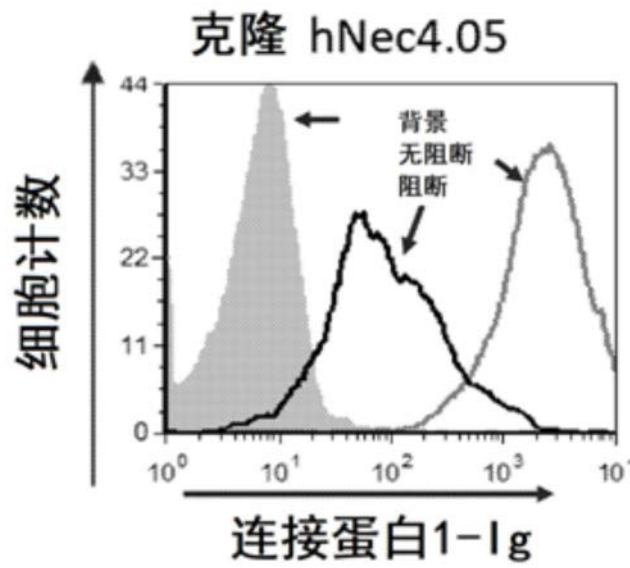


图6B

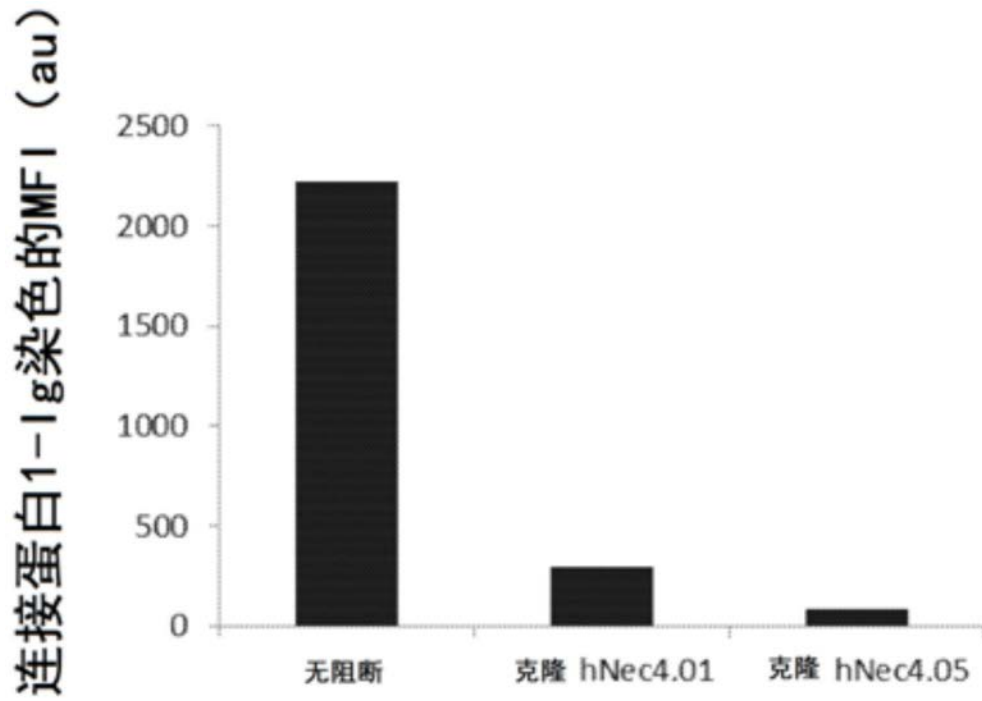


图6C

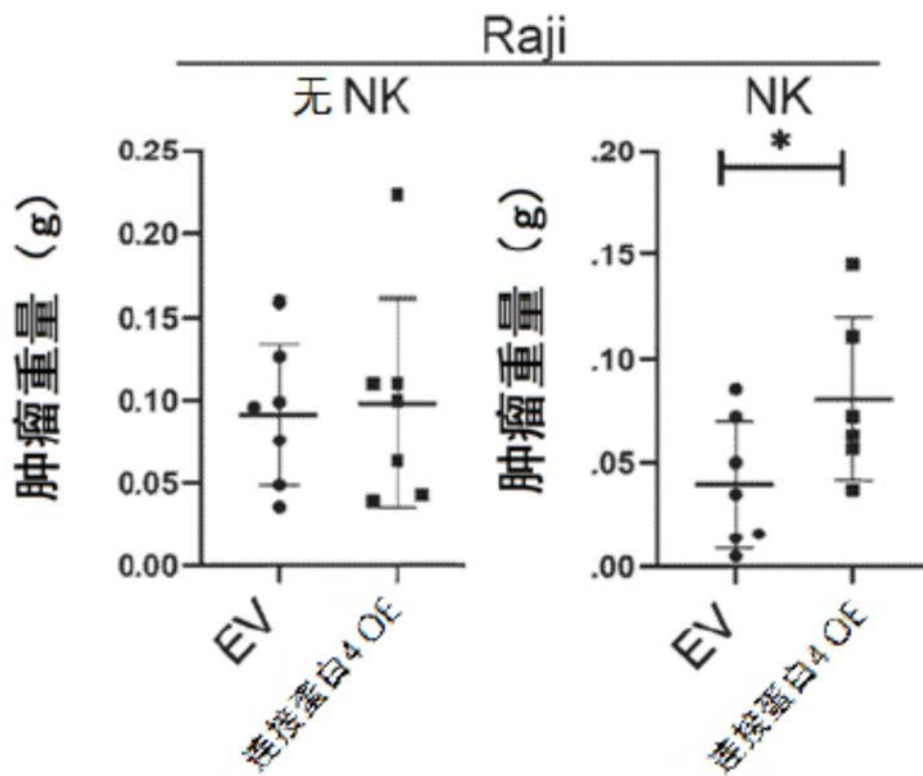


图7A

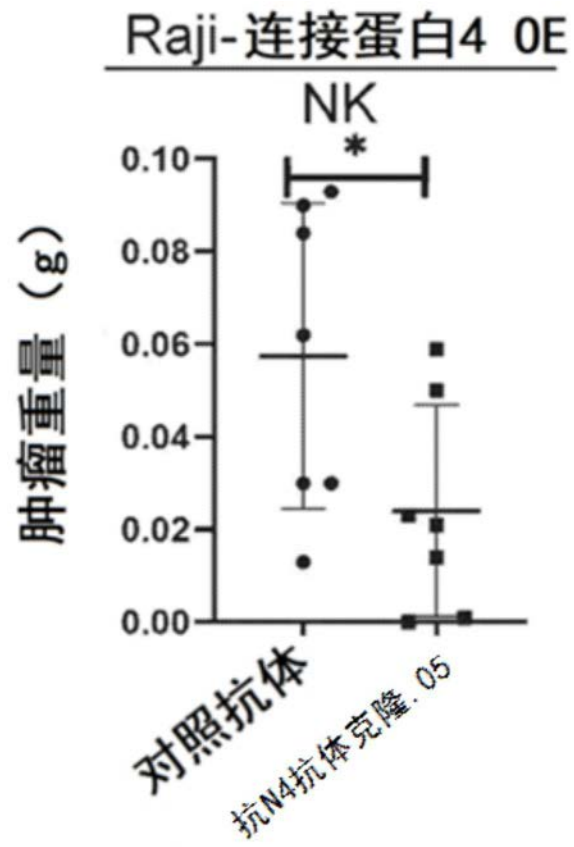


图7B

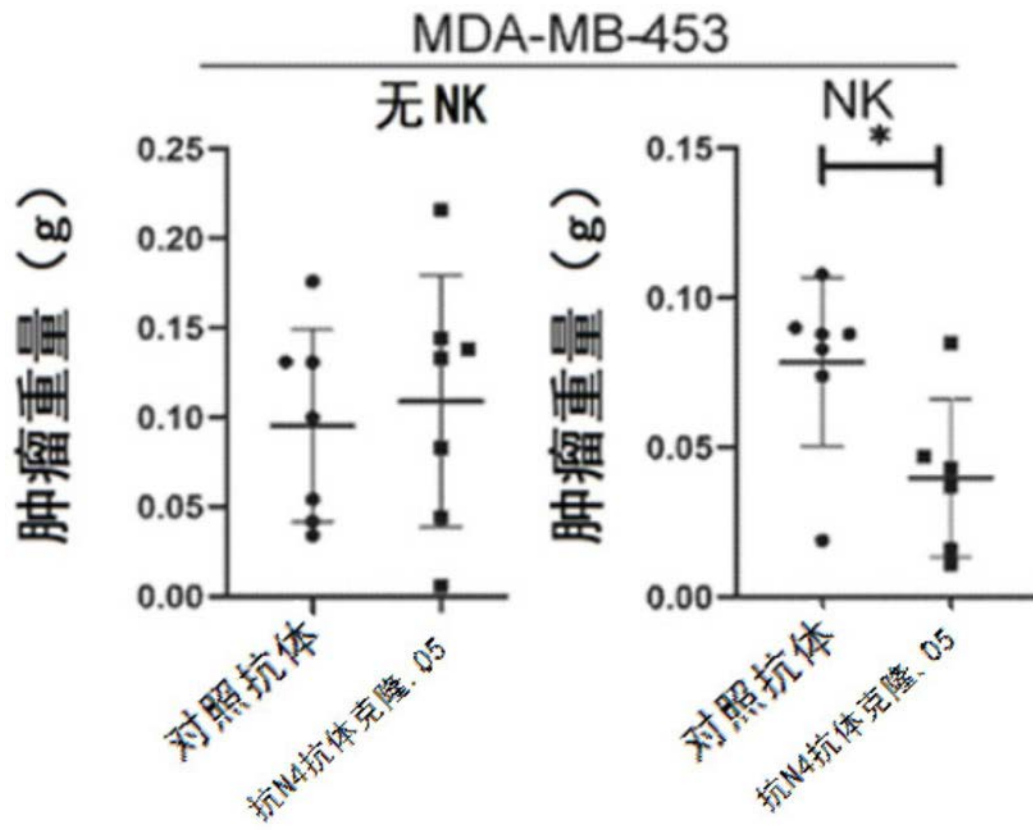


图7C

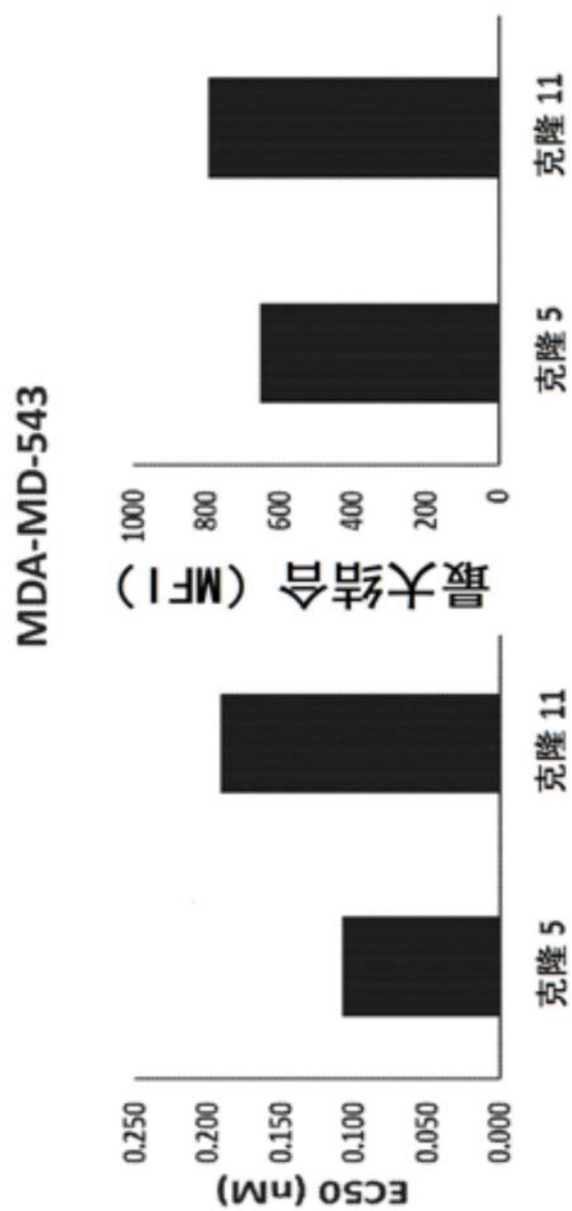


图8A

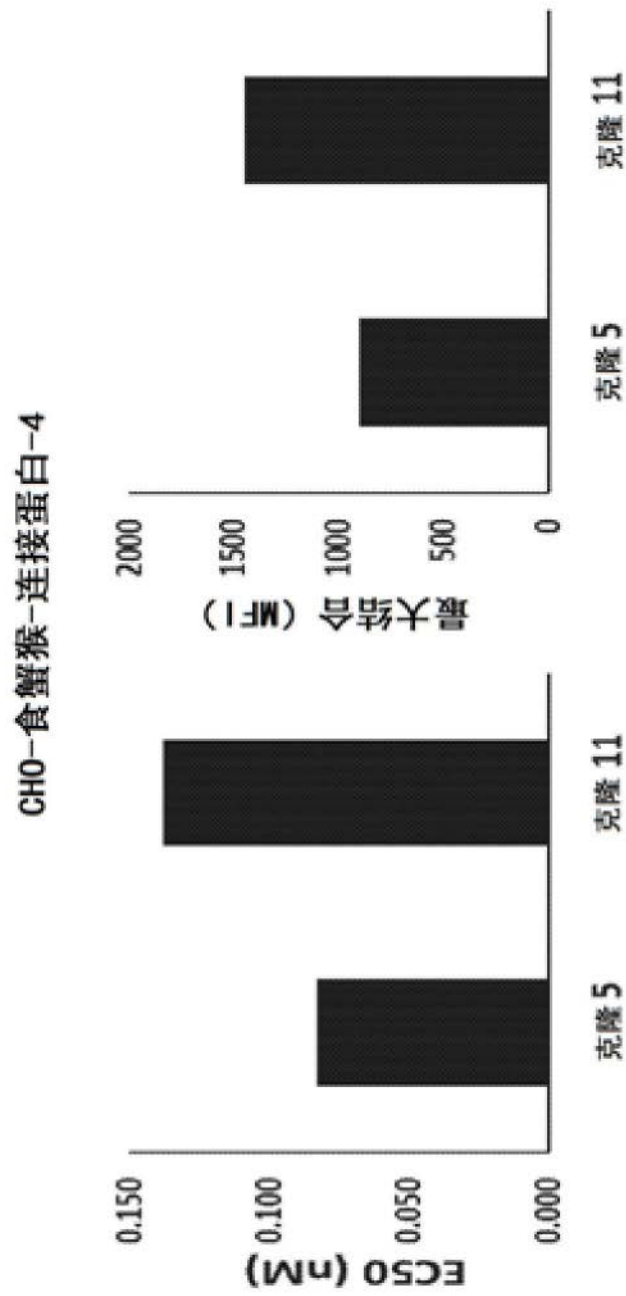


图8B

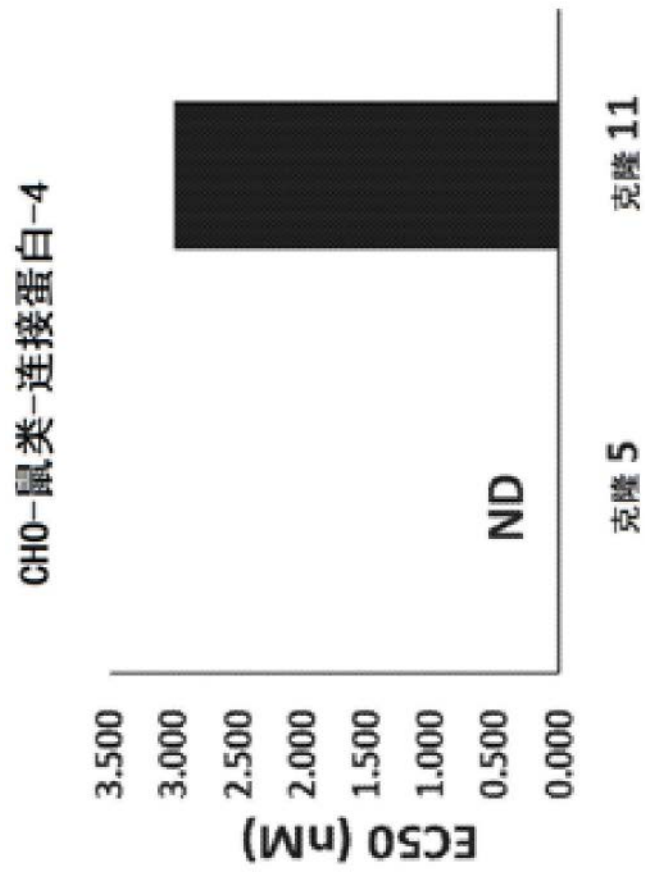


图8C

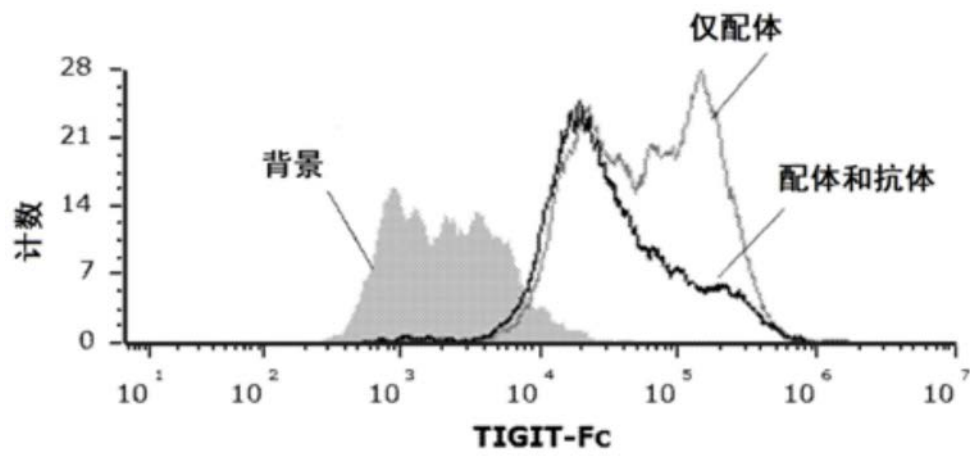


图9A

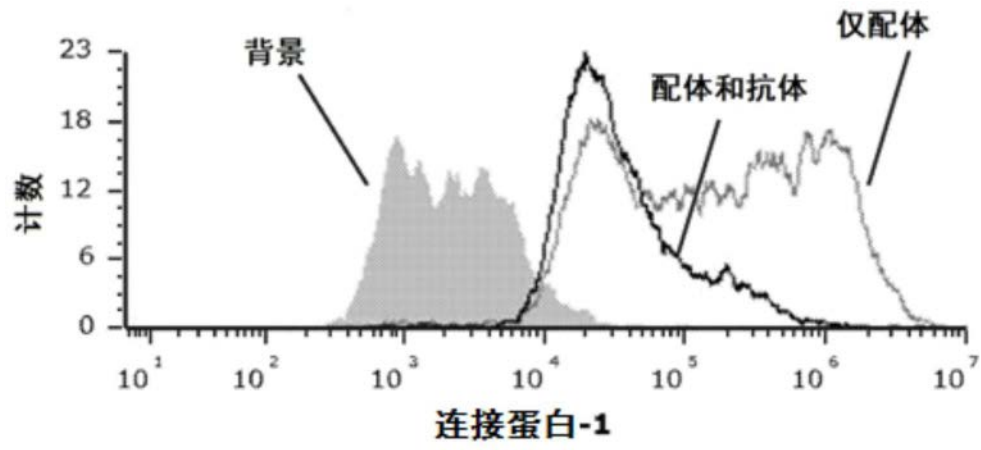


图9B

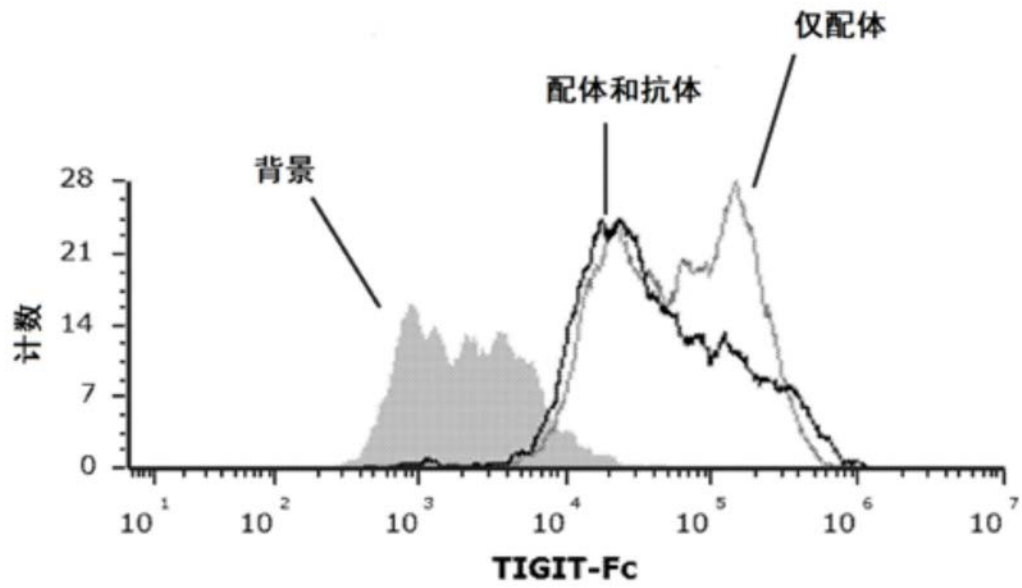


图9C

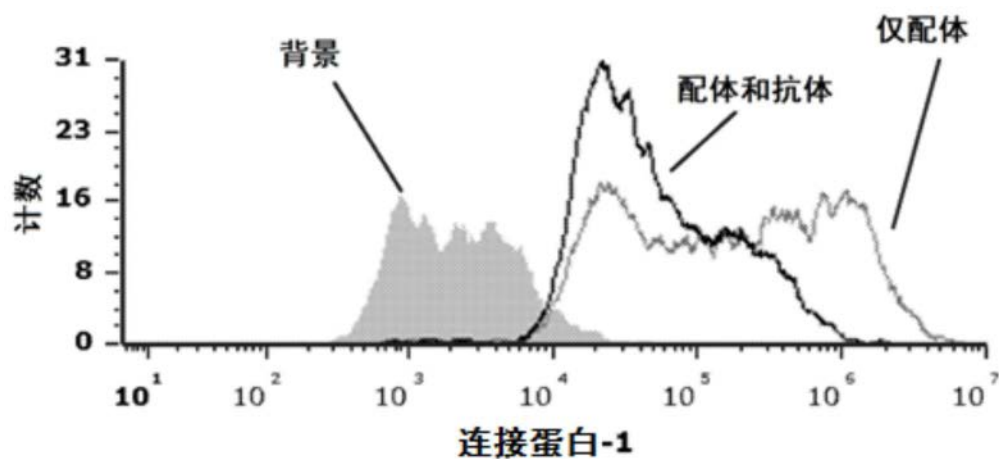


图9D

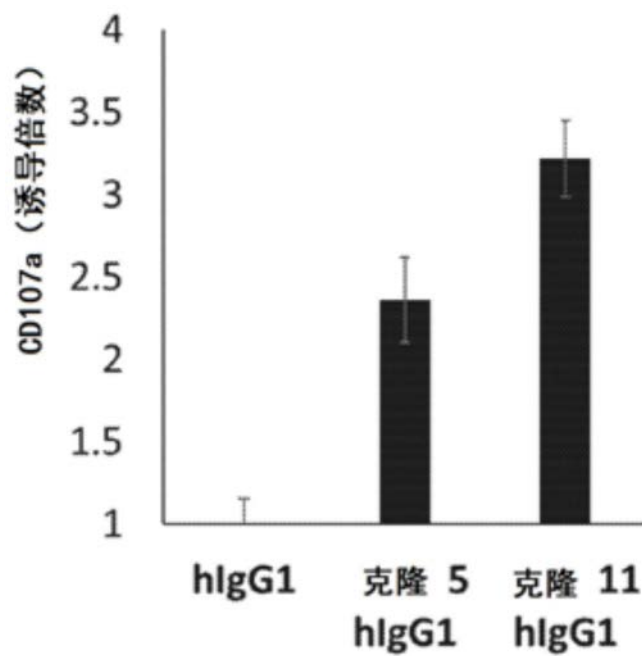


图10A

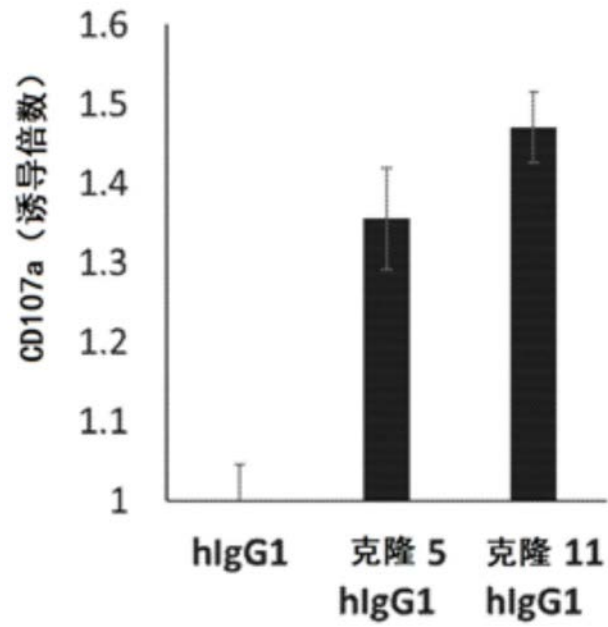


图10B



图11A

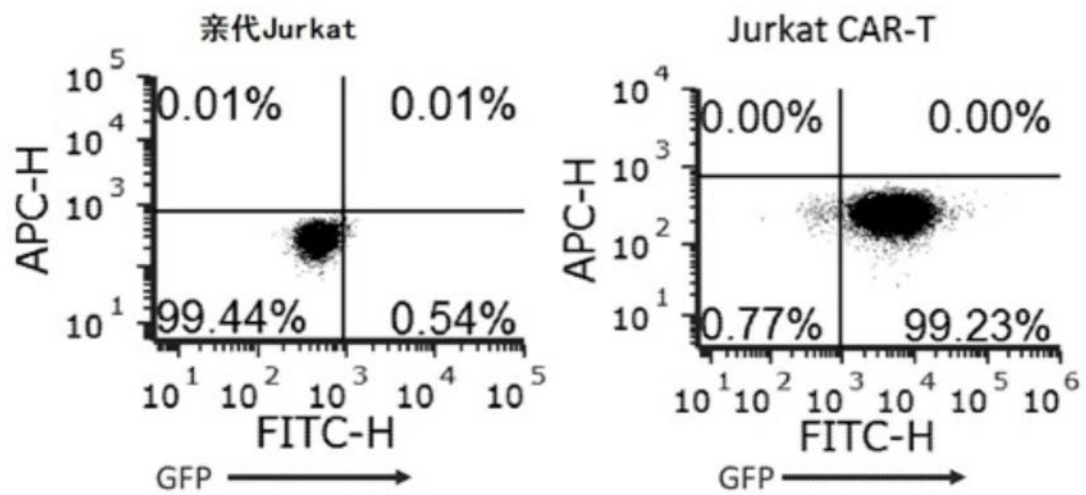


图11B

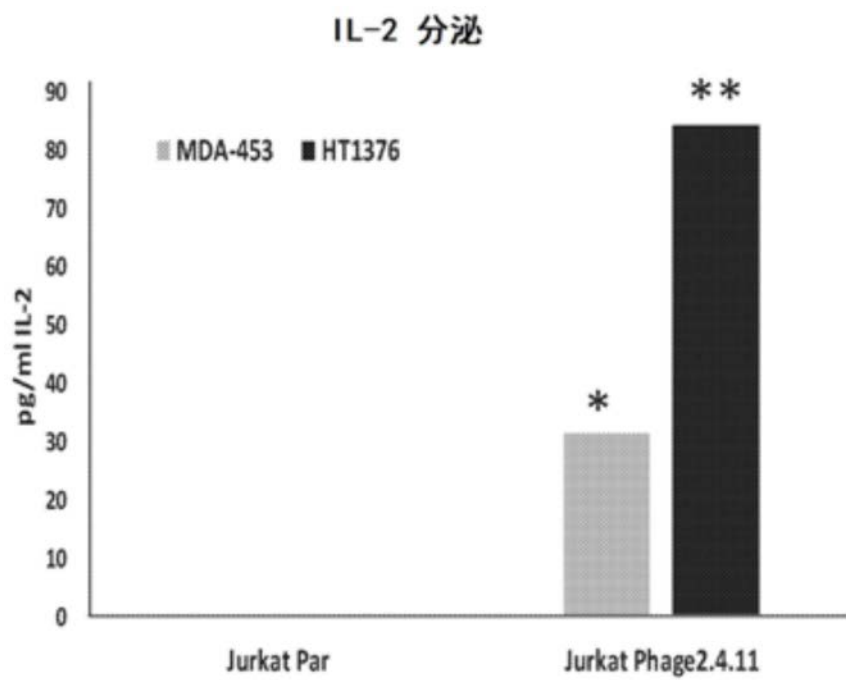


图11C

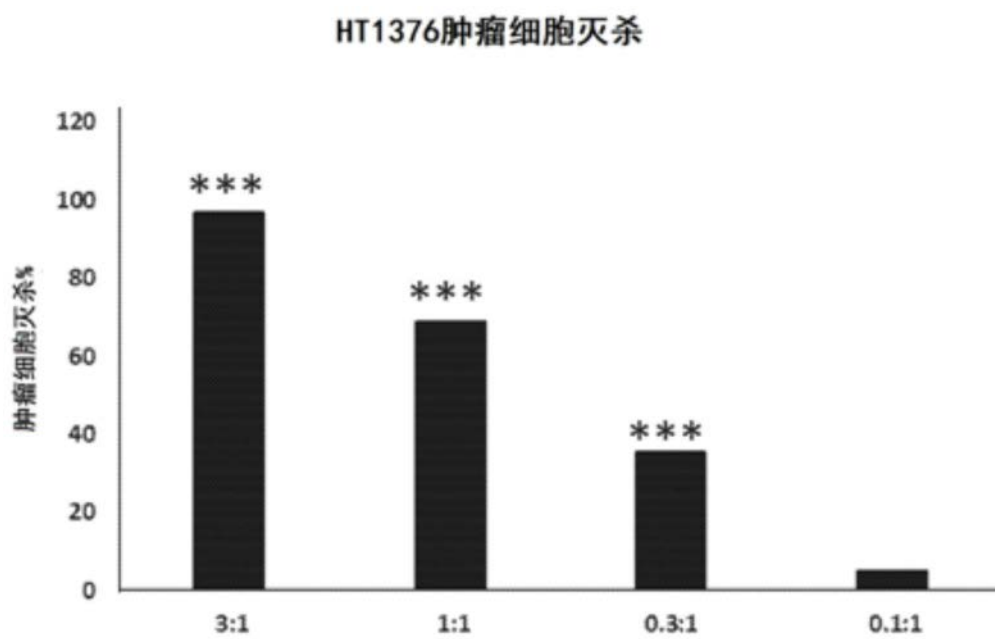


图11D