(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 112752580 B
(45)授权公告日 2024.12.13

(21)申请号 201980060735.4
(22)申请日 2019.09.06
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112752580 A
(43)申请公布日 2021.05.04
(30)优先权数据
62/732329 2018.09.17 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.03.17
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2019/050110 2019.09.06
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/060781 EN 2020.03.26
(73)专利权人 布里格姆妇女医院
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 斯蒂芬诺·V.·古洛
肯尼斯·埃文·汤普森
(74)专利代理机构 北京林达刘知识产权代理事务所(普通合伙) 11277
专利代理师 李茂家 闫俊萍
(51)Int.Cl.
A61K 38/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
(56)对比文件
CN 101663323 A,2010.03.03
CN 103347896 A,2013.10.09
审查员 叶金金

权利要求书1页 说明书24页
序列表34页 附图2页

(54)发明名称

抗KLRG1抗体

(57)摘要

本发明涉及与杀伤细胞凝集素样受体G1(KLRG1)特异性结合的抗体或其抗原结合片段。此类抗体或其抗原结合片段可用于包括治疗癌症的各种治疗或诊断目的以及用于增加疫苗的有效性。

CN 112752580 B

1.一种抗体或其抗原结合片段,所述抗体或其抗原结合片段包含:

(a)包含CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3的互补决定区(CDR)的重链可变(VH)结构域,所述CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3的互补决定区(CDR)分别由SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的氨基酸序列组成;以及

(b)包含CDR-L2和CDR-L3、以及CDR-L1的轻链可变(VL)结构域,所述CDR-L2和CDR-L3分别由SEQ ID NO:17和SEQ ID NO:18的氨基酸序列组成;所述CDR-L1由SEQ ID NO:16的氨基酸序列或者其中NG基序被NA、QG或KG取代的SEQ ID NO:16的氨基酸序列组成;

其中所述抗体或其抗原结合片段特异性结合人杀伤细胞凝集素样受体亚家族G成员1(KLRG1)的细胞外结构域和食蟹猴KLRG1的细胞外结构域。

2.如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其中CDR-L1(SEQ ID NO:16)具有被NA取代的NG基序。

3.如权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,包含:

(i)SEQ ID NO:3的VH结构域序列和SEQ ID NO:4的VL结构域序列、或其中所述CDR-L1中NG基序被NA取代的SEQ ID NO:4的VL结构域序列;或

(ii)SEQ ID NO:27的VH结构域序列和SEQ ID NO:28的VL结构域序列、或其中所述CDR-L1中NG基序被NA取代的SEQ ID NO:28的VL结构域序列。

4.如权利要求1至3中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体特异性结合选自由SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90组成的组中的至少一个氨基酸序列。

5.如权利要求4所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体特异性结合KLRG1的细胞外结构域,其亲和力以K_D表示为至少2nM、1nM、100pM、10pM或5pM。

6.如权利要求1至3中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体为人源化的。

7.如权利要求1至3中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体为IgG_1或IgG_4。

8.一种药物组合物,所述药物组合物包含如权利要求1至3中任一项所述的抗体或其抗原结合片段和药学上可接受的载剂。

9.一种分离的核酸,所述分离的核酸编码如权利要求1至3中任一项所述的抗体或其抗原结合片段。

10.一种表达载体,所述表达载体包含如权利要求9所述的核酸。

11.一种宿主细胞,所述宿主细胞包含如权利要求10所述的表达载体。

12.如权利要求11所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞选自:大肠杆菌细菌、中国仓鼠卵巢细胞、HeLa细胞和NS0细胞。

13.如权利要求9所述的核酸,其中所述核酸编码以下中列出的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:27、或SEQ ID NO:28。

抗KLRG1抗体

技术领域

[0001] 本技术领域涉及抑制淋巴细胞共抑制受体杀伤细胞凝集素样受体亚家族G成员1(KLRG1)。

背景技术

[0002] 响应于激活信号诸如在主要组织相容性复合体(MHC)与T细胞受体(TCR)结合的情况下的抗原肽,淋巴细胞共抑制受体调节适应性免疫系统(例如T细胞和NK细胞)的作用。共抑制受体包括PD-1、LAG-3、TIM-3和CTLA4。共抑制受体的作用通常是通过使配体与共抑制受体的细胞外结构域结合,然后通过位于共抑制受体的细胞内结构域的基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)募集细胞内磷酸酶来进行的。共抑制受体的作用通常是抑制TCR接合的免疫反应。近年来,已显示阻断共抑制受体活性的剂可用作癌症和传染病的有效治疗。

[0003] 杀伤细胞凝集素样受体G1(KLRG1)是通过调节T细胞和NK细胞的活性而起共抑制受体作用的II型跨膜蛋白。它的细胞外部分含有已知配体为钙粘蛋白的C型凝集素结构域,并且它的细胞内部分含有负责共抑制T细胞受体(TCR)介导的信号传导的基于免疫受体酪氨酸的抑制基序(ITIM)结构域。KLRG1配体可为E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白、R-钙粘蛋白或其组合。

[0004] 受体杀伤细胞凝集素样受体G1(KLRG1)在T细胞和NK细胞上表达,与上皮细胞和间充质细胞上的配体结合。KLRG1的配体已被描述为E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白和R-钙粘蛋白。

[0005] 在人体内,KLRG1表达限于免疫系统的细胞,并且特别是CD8阳性T细胞、NK细胞和较小程度的CD4阳性T细胞。KLRG1表达与晚期分化表型有关。当抗原特异性T细胞分化时,它们获得增加的细胞毒性分子表达,并因此具有增加的细胞毒性潜力。KLRG1的生物学功能是抑制这些T细胞的细胞毒性和增殖。在癌症和传染病中,已显示其对于恢复T细胞活性是有益的。

[0006] 通常,需要提供用于癌症或传染病的安全且有效的治疗方法。这些病症中涉及的细胞毒性(或CD8+)T细胞和NK细胞激活的调节可通过操纵KLRG1途径来完成。

发明内容

[0007] 本公开提供了结合KLRG1的细胞外结构域(ECD)并抑制其与配体E-钙粘蛋白、N-钙粘蛋白和R-钙粘蛋白相互作用的新的抗体或其抗原结合片段的表征。此处描述的抗体已通过小鼠杂交瘤技术获得,并且可通过将其互补决定区(CDR)移植到人框架中来进行人源化。本公开还提供了调节(例如激活)CD8+细胞毒性T细胞和NK细胞并通过调节(例如中和)KLRG1与其配体之间的相互作用来实现此目的的抗体或结合片段。此处描述的抗体可作为单一疗法或与其他免疫治疗剂(诸如抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体或抗CTLA4抗体)组合或与化学治疗剂或癌症疫苗组合来用作治疗癌症的有效治疗剂。此处描述的抗体可用作传染病的有效治疗或增强针对传染病的疫苗的有效性。

[0008] 抗体的非限制性说明性实施方案被称为ABC_HG1N01、ABC_HG1N02、ABC_HG1N07、

ABC_G1N01、ABC_G1N02、ABC_G1N03、ABC_G1N04、ABC_G1N05、ABC_G1N06、ABC_G1N07或ABC_G1N08。其他实施方案包含ABC_HG1N01、ABC_HG1N02、ABC_HG1N07、ABC_G1N01、ABC_G1N02、ABC_G1N03、ABC_G1N04、ABC_G1N05、ABC_G1N06、ABC_G1N07或ABC_G1N08的Fv片段的V_H和/或V_L结构域。其他实施方案包含这些VH和V_L结构域中任一者的一个或多个CDR。其他实施方案包含ABC_HG1N01、ABC_HG1N02、ABC_HG1N07、ABC_G1N01、ABC_G1N02、ABC_G1N03、ABC_G1N04、ABC_G1N05、ABC_G1N06、ABC_G1N07和ABC_G1N08的V_H结构域的H3片段。

[0009] 本公开还提供了包含KLRG1抗体的组合物,及其在调节免疫反应的方法中的用途,包括治疗人或动物的方法。在特定的实施方案中,抗KLRG1抗体通过激活CD8+细胞毒性T细胞和NK细胞用于治疗或预防癌症。易于用本发明的组合物治疗的病症包括但不限于癌症和传染病。

[0010] 另外,抗KLRG1抗体可用于诊断检测生物样品中的KLRG1或其片段。检测到的KLRG1的量可与KLRG1的表达水平相关,而KLRG1的表达水平又与受试者中淋巴细胞(例如,细胞毒性T细胞或自然杀伤细胞)的激活状态相关。

[0011] 本公开还提供了分离的核酸,其包含编码来自ABC_HG1N01、ABC_HG1N02、ABC_HG1N07、ABC_G1N01、ABC_G1N02、ABC_G1N03、ABC_G1N04、ABC_G1N05、ABC_G1N06、ABC_G1N07和ABC_G1N08的Fv片段的V_H或V_L结构域的序列。还提供了分离的核酸,其包含编码来自目前公开的VH和V_L结构域中任一者的一个或多个CDR的序列。本公开还提供了包含此类核酸的载体和宿主细胞。

[0012] 本公开还提供了一种产生新的V_H和V_L结构域和/或包含此类结构域中的全部或一部分的功能性抗体的方法,所述结构域衍生自ABC_HG1N01、ABC_HG1N02、ABC_HG1N07、ABC_G1N01、ABC_G1N02、ABC_G1N03、ABC_G1N04、ABC__G1N05、ABC_G1N06、ABC_G1N07和ABC_G1N08的V_H或V_L结构域。

[0013] 本公开的另外的方面将在下面的描述中部分列出,并且部分将由描述而变得显而易见,或可通过实践本发明来学习。在所附权利要求书中列出并特别指出了本发明,并且本公开不应被解释为以任何方式限制权利要求书的范围。以下详细描述包括本发明的各种实施方案的示例性表示,其不限制如所要求保护的本发明。附图构成本说明书的一部分,并且与说明书一起仅用于说明各种实施方案而不限制本发明。参考文献的引用并非承认这些参考文献是本发明的现有技术。

附图说明

[0014] 图1示出干扰素-γ(IFNγ)分泌测定的结果,证明抗KLRG1抗体激活CD8+人T细胞。

[0015] 图2示出CD8+ T细胞增殖测定的结果,证明抗KLRG1抗体诱导CD8+ T细胞的增殖。

[0016] 图3示出用抗KLRG1抗体处理的CD8+ T细胞中IFNγ分泌测定的结果与抗体的阻断活性(以IC50的形式示出)之间的关系。

具体实施方式

[0017] 定义

[0018] 如本公开中使用的术语“抗体”是指免疫球蛋白或其片段或衍生物,并且涵盖任何包含抗原结合位点的多肽,无论其是在体外还是在体内产生。术语包括但不限于多克隆、单

克隆、单特异性、多特异性、非特异性、人源化、单链、嵌合、合成、重组、杂交、突变和移植抗体。出于本公开的目的,除非术语“完整”以其他方式修饰,如在“完整抗体”中,否则术语“抗体”还包括抗体片段,诸如Fab、F(ab')$_2$、Fv、scFv、Fd、dAb和保留抗原结合功能(即特异性结合KLRG1的能力)的其他抗体片段。通常,此类片段将包含抗原结合结构域。

[0019] 术语“抗原结合结构域”、“抗原结合片段”和“结合片段”是指抗体分子的一部分,其包含负责抗体与抗原之间特异性结合的氨基酸。在抗原较大的情况下,抗原结合结构域可仅与抗原的一部分结合。负责与抗原结合结构域的特异性相互作用的抗原分子的一部分被称为“表位”或“抗原决定簇”。

[0020] 抗原结合结构域通常包含抗体轻链可变区(V_L)和抗体重链可变区(V_H),但不一定必须同时包含两者。例如,所谓的Fd抗体片段仅由V_H结构域组成,但仍保留完整抗体的某些抗原结合功能。

[0021] 术语“库(repertoire)”是指完全或部分衍生自编码所表达的免疫球蛋白的序列的核苷酸的遗传多样性集合。这些序列是通过H链的例如V、D和J区段以及L链的例如V和J区段的体内重排产生的。替代地,序列可通过响应于发生重排的体外刺激而从细胞系产生。替代地,序列的部分或全部可通过将例如未重排的V区段与D和J区段组合、通过核苷酸合成、随机诱变和其他方法(例如美国专利号5,565,332中所公开)获得。

[0022] 术语“特异性相互作用”和“特异性结合”是指形成在生理条件下相对稳定的复合物的两个分子。特异性结合的特征在于高亲和力和低至中等容量,与通常具有低亲和力和中等至高容量的非特异性结合不同。通常,当亲和常数K_A高于10^6M^{-1}或更优选高于10^8M^{-1}时,结合被认为是特异性的。如果必要的话,可通过改变结合条件来减少非特异性结合,而基本上不影响特异性结合。适当的结合条件,诸如抗体的浓度、溶液的离子强度、温度、允许结合的时间、阻断剂(例如血清白蛋白、牛奶酪蛋白)的浓度等,可由技术人员使用常规技术进行优化。

[0023] 短语“基本上如所述”意指本发明的相关CDR、V_H或V_L结构域将与所述序列的指定区(例如,CDR)相同或仅具有非实质性差异。非实质性差异包括较小的氨基酸变化,诸如取代指定区的序列中任何5个氨基酸中的1个或2个。

[0024] 术语“KLRG1活性”是指与KLRG1相关的一种或多种淋巴细胞共抑制活性。例如,KLRG1活性可能意味着对细胞毒性T细胞和NK细胞激活的调节。

[0025] 术语“调节”及其同源词是指由于KLRG1与抗KLRG1抗体的相互作用而引起的与T细胞和NK细胞的激活相关的KLRG1活性的降低或增加,其中降低或增加是相对于在不存在相同抗体的情况下KLRG1的活性。活性的降低或增加优选地为至少约10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%或更多。当KLRG1活性降低时,术语“调节(modulatory/modulate)”与术语“抑制(inhibitory/inhibit)”可互换。当KLRG1活性增加时,术语“调节(modulatory/modulate)”与术语“激活(activating/activate)”可互换。KLRG1的活性可使用诸如实施例6中所述的T细胞和NK细胞激活测定来定量测定。

[0026] 术语“治疗”和“治疗方法”是指治疗方法和预防(prophylactic/preventative)措施。需要治疗者可包括已患有特定医学病症的个体以及可能最终获得所述病症的个体(即需要预防措施的个体)。

[0027] 术语“有效量”是指足以降低KLRG1活性以导致患者症状改善或达到期望的生物学

结果的剂量或量,所述期望的生物学结果例如,降低KLRG1活性、调节淋巴细胞共抑制反应、增加细胞毒性T细胞和NK细胞的激活或增加细胞毒性T细胞或NK细胞的IFNγ释放。

[0028] 术语“分离的”是指基本上没有自然环境的分子。例如,分离的蛋白质基本上没有来自其所来源的细胞或组织来源的细胞物质或其他蛋白质。术语“分离的”还指制剂,其中分离的蛋白质足够纯以作为药物组合物施用,或至少70%-80%(w/w)纯,更优选至少80%-90%(w/w)纯,甚至更优选90%-95%纯;并且最优选至少95%、96%、97%、98%、99%或100%(w/w)纯。

[0029] 抗KLRG1抗体

[0030] 本公开提供了包含新的抗原结合片段的抗KLRG1抗体。

[0031] 通常,可例如使用传统杂交瘤技术(Kohler和Milstein(1975)Nature,256:495-499)、重组DNA方法(美国专利号4,816,567)或用抗体文库进行噬菌体展示(Clackson等人(1991)Nature,352:624-628;Marks等人(1991)J.Mol.Biol.,222:581-597)来制备抗体。对于其他抗体产生技术,另外参见Antibodies:A Laboratory Manual,Harlow等人编,Cold Spring Harbor Laboratory,1988。本发明不限于任何特定来源、起源物种或产生方法。

[0032] 完整抗体(也称为免疫球蛋白)通常为四聚体糖基化蛋白,由两条分别为大约25kDa的轻(L)链和两条分别为大约50kDa的重链(H)组成。在抗体中发现了两种类型的轻链,命名为λ链和κ链。根据重链恒定结构域的氨基酸序列,免疫球蛋白可分为五种主要类别:A、D、E、G和M,并且这些中的几种可被进一步分为亚类(同种型),例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2。

[0033] 不同类别免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是本领域中众所周知的。对于抗体结构的综述,参见Harlow等人,同上。简而言之,每条轻链由N端可变结构域(V_L)和恒定结构域(C_L)组成。每条重链由N端可变结构域(V_H)、三个或四个恒定结构域(C_H)和铰链区组成。最接近V_H的C_H结构域命名为C_H1。V_H和V_L结构域由相对保守的序列的四个区域(称为框架区(FR1、FR2、FR3和FR4))组成,所述四个区域形成高变序列的三个区域(称为互补决定区(CDR))的支架。CDR含有负责与抗原特异性相互作用的大多数残基。三个CDR称为CDR1、CDR2和CDR3。因此,重链上的CDR成分称为H1、H2和H3,而轻链上的CDR成分称为L1、L2和L3。CDR3,并且特别是H3,是抗原结合结构域内分子多样性的最大来源。例如,H3可短至两个氨基酸残基或大于26个。

[0034] Fab片段(抗原结合片段)由通过恒定区之间的二硫键共价连接的V_H-C_H1和V_L-C_L结构域组成。为了克服在宿主细胞中共表达时Fv中非共价连接的V_H和V_L结构域解离的趋势,可构建所谓的单链(sc)Fv片段(scFv)。在scFv中,柔性且足够长的多肽将V_H的C端连接到V_L的N端或将V_L的C端连接到V_H的N端。最通常地,使用15个残基的(Gly_4Ser)3肽作为接头,但是其他接头也是本领域中已知的。

[0035] 抗体多样性是编码可变区的多个种系基因和各种体细胞事件的组合组装的结果。体细胞事件包括可变基因区段与多样性(D)和连接(J)基因区段的重组以形成完整的V_H区,以及可变基因区段与连接基因区段的重组以形成完整的V_L区。重组过程本身是不精确的,从而导致V(D)J连接处氨基酸的丢失或增加。这些多样性机制存在于抗原暴露之前的发育中的B细胞中。抗原刺激后,B细胞中所表达的抗体基因发生体细胞突变。

[0036] 基于种系基因区段的估计数量、这些区段的随机重组以及随机V_H-V_L配对,可产生

多达1.6×10^{7}个不同的抗体(Fundamental Immunology,第3版,Paul编,Raven Press,New York,N.Y.,1993)。当考虑到有助于抗体多样性的其他过程(诸如体细胞突变)时,人们认为有可能产生超过1×10^{10}个不同的抗体(Immunoglobulin Genes,第2版,Jonio等人编,Academic Press,San Diego,Calif.,1995)。由于涉及抗体多样性的许多过程,独立产生的抗体极不可能在CDR中具有相同的氨基酸序列。

[0037] 本公开提供了衍生自人免疫球蛋白基因文库的新的CDR。用于携带CDR的结构通常为抗体重链或轻链或其一部分,其中CDR位于对应于天然存在的V_H和V_L的CDR的位置。免疫球蛋白可变结构域的结构和位置可例如如Rabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第91-3242期,National Institutes of Health Publications,Bethesda,Md.,1991中所述来确定。

[0038] 人源化抗KLRG1抗体的V_H和V_L结构域的氨基酸序列在序列表中列出,并如表1所示列举。

[0039] 表1:人源化抗KLRG1抗体可变区的氨基酸序列

[0040]

SEQ ID NO.	mAb	V_H / V_L	氨基酸序列
SEQ ID NO:1	ABC_HG1N01	V_H	QVILKESGPGLVKPTQTLTLTCTFSGFSLTTFGMGIGWIRQPPGKALEWLAHIWWNDDKSYNSALKSRLTISKDTSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCARTIYYGNYLTFYAMEHWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:2		V_L	DILMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQNIVHSNGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPPTFGAGTKLELKRTV
SEQ ID NO:3	ABC_HG1N02	V_H	QVTLKESGPGLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTFGMGVGWIRQPPGKALEWLAHIWWDDDKWYELALKSRLTISKDSSKNQVVLTMTNMDPVDTATYYCARVIYYGSRSAYYSMDYWGPGTTVTVSS
SEQ ID NO:4		V_L	DILMTQSPLSLPVTPGEPASISCKSSQSIVHSNGHTYLEWYLQKPGQSPRLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPVTFGAGTKLELKRTV
SEQ ID NO:5	ABC_HG1N07	V_H	QVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFRNYAMSWIRQTPGKGLEWVATISESGNYNNYPDNVKGRLTISRDNAKNSLYLQMNSLKAEDTAVYYCVRDDWEGRAMDYWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:6		V_L	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASRDIGSSLNWYQQKPGGAPKRLIYATSSLDSGVPKRFSGSGSGTDFTLTISSLQSEDFATYYCLQYASSPWTFGQGTKVEIKRTV

[0041] 抗体的特定非限制性说明性实施方案称为ABC_HG1N01、ABC_HG1N02和ABC_HG1N07。说明性实施方案的V_H和V_L结构域内CDR的氨基酸序列在序列表中列出,并如表2所示列举。

[0042] 表2.人源化抗KLRG1抗体的CDR氨基酸序列

[0043]

SEQ ID NO.	mAb	CDR	氨基酸序列
SEQ ID NO:7	ABC_HG1N01	CDR-H1	GFSLTTFGM
SEQ ID NO:8		CDR-H2	WWNDD
SEQ ID NO:9		CDR-H3	TIYYGNYLTFYAMEH
SEQ ID NO:10		CDR-L1	RSSQNIVHSNGNTYLE
SEQ ID NO:11		CDR-L2	KVSNRFS
SEQ ID NO:12		CDR-L3	FQGSHVPPT
SEQ ID NO:13	ABC_HG1N02	CDR-H1	GFSLSTFGM
SEQ ID NO:14		CDR-H2	WWDDD
SEQ ID NO:15		CDR-H3	VIYYGSRSAYYSMDY
SEQ ID NO:16		CDR-L1	KSSQSIVHSNGHTYLE

[0044]

SEQ ID NO.	mAb	CDR	氨基酸序列
SEQ ID NO:17		CDR-L2	KVSNRFS
SEQ ID NO:18		CDR-L3	FQGSHVPVT
SEQ ID NO:19	ABC_HG1N07	CDR-H1	GFTFRNY
SEQ ID NO:20		CDR-H2	SESGNY
SEQ ID NO:21		CDR-H3	DDWEGRAMDY
SEQ ID NO:22		CDR-L1	RASRDIGSSLN
SEQ ID NO:23		CDR-L2	ATSSLDS
SEQ ID NO:24		CDR-L3	LQYASSPWT

[0045] 小鼠抗KLRG1抗体的V_H和V_L结构域的氨基酸序列在序列表中列出,并如表3所示列举。

[0046] 表3:小鼠抗KLRG1抗体的可变区氨基酸序列

[0047]

SEQ ID NO.	mAb	V_H / V_L	氨基酸序列
SEQ ID NO:25	ABC_G1N01	V_H	QVILKESGPGILQPSQTLSLTCSFSGFSLTTFGMGIGWIRHPSGKALEWLAHIWWNDDKSYNSALKSRLTISKDTSKNQVFLRLANVATADTATYYCARTIYYGNYLTFYAMEHWGQGTSVTVSS
SEQ ID NO:26		V_L	DVLLTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQNIVHSNGNTYLEWYLLKPGQSPKLLIFKVSNRFSGVPDKFSGSGSGTDFTLKIRRVEAEDLGIYYCFQGSHVPPTFGAGTKLELK
SEQ ID NO:27	ABC_G1N02	V_H	QVTLKESGPGILQPSQTLSLTCSVSGFSLSTFGMGVGWIRQPSGKGLEWLAHIWWDDDKWYELALKSRLTISKDSSKNQVFLKIANVDTADTATYFCARVIYYGSRSAYYSMDYWGPGTSVTVSS
SEQ ID NO:28		V_L	DVLMTQTPLSLPVSLGAQASISCKSSQSIVHSNGHTYLEWYLQKPGQSPKILIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPVTFGAGTKLELK
SEQ ID NO:29	ABC_G1N03	V_H	QVHLQQSGPELVKPGASVKLSCKASGDTFTTYDITWVKQRPGQGLEWIGWIYPKDGRTQNSEKFKDKATLTVDTSSTTAYMELHSLTSEDSAVYFCARRGQFGPYFDHWGQGSTLTVSS
SEQ ID NO:30		V_L	VIQMTQSSSFLSASLGGRVSITCRASDHIYNWLAWYQQKPGNAPRLLISGATSLETGIPSRFSGGGSGKDYTLTIISLQTEDIASYYCQQYWNTPPTFGGGTKVEIK

[0048]

SEQ ID NO.	mAb	V_H / V_L	氨基酸序列
SEQ ID NO:31	ABC_G1N04	V_H	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFSFSTFGMHWVRQVPEKGLEWVAYISSGSYSIFYADSVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDTAIYYCTRTRDSGSSPHYFDYWGQGTTVTVSS
SEQ ID NO:32		V_L	DIVLTQSPTSLAVSLGQRATISCRASKSVDSYGISFMNWFQQKPGQSPKLLIYGASNRGSGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEEDDTAMYFCQQSKEGPFTFGTGTKLELR
SEQ ID NO:33	ABC_G1N05	V_H	EVLLMESGGDLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYDMSWVRQTPDKRLEWVATISSSGRYTFYPDNVKGRFTISRDNAKNTLYLQVSNLKSEDTAMYYCSRTGVTTVVFTDYFDYWGQGTTLTVSS
SEQ ID NO:34		V_L	DIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASQDIGNSLNWLQQGPDGTIKRLIYATSSLDSGVPKRFSGSRSGSTYSLTISSLESEDFVAYYCLQYLSSPPTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO:35	ABC_G1N06	V_H	QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTTHAVHWVRQSPGKGLDWLGVIWSGGNTDYNAAFISRLTISKDNSKSQVFFKMNSLQADDTAIYYCVRLLLPAMDYWGQGTSVTVSS
SEQ ID NO:36		V_L	QIVLTQSPAIMSASLGERVTMTCTATSSVSSTYLHWYRQKPGSSPKLWIYSTSTLASGVPVRFRGSGSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQYRRSPYTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO:37	ABC_G1N07	V_H	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCTASGFTFRNYAMSWVRQTPEKRLEWVATISESGNYNNYPDNVKGRLTISRDNAKNNLYLQMSLLKSEDTAMYYCVRDDWEGRAMDYWGQGTSVTVSS
SEQ ID NO:38		V_L	GIQMTQSPSSLSASLGERVSLTCRASRDIGSSLNWLQQKPDGTIKRLIYATSSLDSGVPKRFSGSRSGTDYSLTISSLESEDFVDYFCLQYASSPWTFGGGTKLEIK
SEQ ID NO:39	ABC_G1N08	V_H	QVQLQQSGAELAKPGASVKLSCKASGYTFTSYFLHWVKQRPGQGLEWIGYMNPSSGYTKCNQKFKDKATLTADKSSSTAYMQVSSLTYEDSAVYYCARDRIGYWDFDVWGTGTTVTVSS
SEQ ID NO:40		V_L	DVVMTQSQKFMSTTVGDRVSITCKASQNVGTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASNRYTGVPDRFTGSGSGTDFTLTITNMQSEDLADYFCQQYSSYLTFGAGTKLDLK

[0049] 抗体的特定非限制性说明性实施方案被称为ABC_G1N01、ABC_G1N02、ABC_G1N03、ABC_G1N04、ABC_G1N05、ABC_G1N06、ABC_G1N07和ABC_G1N08。说明性实施方案的V_H和V_L结构

域内CDR的氨基酸序列在序列表中列出,并如表4所示列举。

[0050] 表4:小鼠抗KLRG1抗体的CDR氨基酸序列

SEQ ID NO.	mAb	CDR	序列
SEQ ID NO:41	ABC_G1N01	CDR-H1	GFSLTTFGM
SEQ ID NO:42		CDR-H2	WWNDD
SEQ ID NO:43		CDR-H3	TIYYGNYLTFYAMEH
SEQ ID NO:44		CDR-L1	RSSQNIVHSNGNTYLE
SEQ ID NO:45		CDR-L2	KVSNRFS
SEQ ID NO:46		CDR-L3	FQGSHVPPT
SEQ ID NO:47	ABC_G1N02	CDR-H1	GFSLSTFGM
SEQ ID NO:48		CDR-H2	WWDDD
SEQ ID NO:49		CDR-H3	VIYYGSRSAYYSMDY
SEQ ID NO:50		CDR-L1	KSSQSIVHSNGHTYLE
SEQ ID NO:51		CDR-L2	KVSNRFS
SEQ ID NO:52		CDR-L3	FQGSHVPVT
SEQ ID NO:53	ABC_G1N03	CDR-H1	GDTFTTYDIT
SEQ ID NO:54		CDR-H2	YPKDGR
SEQ ID NO:55		CDR-H3	RGQFGPYFDH
SEQ ID NO:56		CDR-L1	RASDHIYNWLA
SEQ ID NO:57		CDR-L2	GATSLET
SEQ ID NO:58		CDR-L3	RGQFGPYFDH
SEQ ID NO:59	ABC_G1N04	CDR-H1	GFSFSTF
SEQ ID NO:60		CDR-H2	SSGSYS
SEQ ID NO:61		CDR-H3	TRTRDSGSSPHYFDY
SEQ ID NO:62		CDR-L1	RASKSVDSYGISFMN
SEQ ID NO:63		CDR-L2	GASNRGS
SEQ ID NO:64		CDR-L3	QQSKEGPFT
SEQ ID NO:65	ABC_G1N05	CDR-H1	GFTFSSY
SEQ ID NO:66		CDR-H2	SSSGRY
SEQ ID NO:67		CDR-H3	TGVTTVVFTDYFDY
SEQ ID NO:68		CDR-L1	SQDIGNS
SEQ ID NO:69		CDR-L2	SSLDS
SEQ ID NO:70		CDR-L3	LQYLSSPPTF
SEQ ID NO:71	ABC_G1N06	CDR-H1	GFSLTTH
SEQ ID NO:72		CDR-H2	WSGGN
SEQ ID NO:73		CDR-H3	LLLPAMDY
SEQ ID NO:74		CDR-L1	TATSSVSSTYLH
SEQ ID NO:75		CDR-L2	STSTLAS
SEQ ID NO:76		CDR-L3	HQYRRSPYT

[0051]

[0052]

SEQ ID NO.	mAb	CDR	序列
SEQ ID NO:77	ABC_G1N07	CDR-H1	GFTFRNY
SEQ ID NO:78		CDR-H2	SESGNY
SEQ ID NO:79		CDR-H3	DDWEGRAMDY
SEQ ID NO:80		CDR-L1	RASRDIGSSLN
SEQ ID NO:81		CDR-L2	ATSSLDS
SEQ ID NO:82		CDR-L3	LQYASSPWT
SEQ ID NO:83	ABC_G1N08	CDR-H1	GYTFTSY
SEQ ID NO:84		CDR-H2	NPSSGY
SEQ ID NO:85		CDR-H3	DRIGYWDFDV
SEQ ID NO:86		CDR-L1	KASQNVGTAVA
SEQ ID NO:87		CDR-L2	SASNRYT
SEQ ID NO:88		CDR-L3	QQYSSYLT

[0053] 抗KLRG1抗体可任选地包含抗体恒定区或其部分。例如,VL结构域可在其C端连接抗体轻链恒定结构域,包括人C K或Ck链。类似地,基于V_H结构域的特异性抗原结合结构域可能连接了衍生自任何抗体同型(例如IgG、IgA、IgE和IgM)和任何同型亚类(包括但不限于IgG1和IgG4)的免疫球蛋白重链的全部或部分。在示例性实施方案中,ABC_HG1N01、ABC_HG1N02、ABC_HG1N07、ABC_G1N01、ABC_G1N02、ABC_G1N03、ABC_G1N04、ABC_G1N05、ABC_G1N06、ABC_G1N07和ABC_G1N08抗体包含人IgG1k或IgG1x的重链和轻链的C端片段。C端片段的DNA和氨基酸序列是本领域中众所周知的(参见例如,Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第91-3242期,National Institutes of Health Publications,Bethesda,Md.,1991)。

[0054] 某些实施方案包含来自ABC_HG1N01、ABC_HG1N02、ABC_HG1N07、ABC_G1N01、ABC_G1N02、ABC_G1N03、ABC_G1N04、ABC_G1N05、ABC_G1N06、ABC_G1N07和ABC_G1N08的Fv片段的V_H和/或V_L结构域。其他实施方案包含这些V_H和V_L结构域中任一者的至少一个CDR。包含在以下中列出的CDR序列中的至少一个的抗体涵盖在本发明的范围内:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37和SEQ ID NO:38。例如,一个实施方案包含选自以下中的至少一个的抗体的V_H结构域的H3片段:ABC_HG1N01、ABC_HG1N02、ABC_HG1N07ABC_G1N01、ABC_G1N02、ABC_G1N03、ABC_G1N04、ABC_G1N05、ABC_G1N06、ABC_G1N07和ABC_G1N08。

[0055] 在某些实施方案中,可将V_H和/或V_L结构域种系化,即,使用常规分子生物学技术使这些结构域的框架区(FR)突变以匹配由种系细胞产生的那些。在其他实施方案中,框架序列与共有种系序列保持不同。

[0056] 在某些实施方案中,抗体特异性结合人或小鼠KLRG1的ECD内的表位,其亲和力以KD表示为至少约2nM、1nm、100pM、10pM或5pM。人和食蟹猴KLRG1的ECD的氨基酸序列在SEQ ID NO:89和SEQ ID NO:90中列出,如表6所示。

[0057] 设想本发明的抗体还可与其他蛋白质结合,所述其他蛋白质包括例如包含KLRG1的全部或部分的重组蛋白质。

[0058] 本领域普通技术人员将认识到,本发明的抗体可用于检测、测量和抑制与KLRG1有

所不同的蛋白质。只要靶蛋白包含的序列与SEQ ID NO:89或SEQ ID NO:90中列出的序列中至少130个、100个、80个、60个、40个或20个连续氨基酸的任何序列具有至少约60％、70％、80％、90％、95％或更高同一性,就预期抗体保留结合的特异性。同一性百分比通过标准比对算法来确定,例如像,Altshul等人(1990)J.Mol.Biol.,215:403-410中描述的基本局部比对工具(BLAST)、Needleman等人(1970)J.Mol.Biol.,48:444-453的算法或Meyers等人(1988)Comput Appl.Biosci.,4:11-17的算法。

[0059] 除了序列同源性分析之外,可进行表位作图(参见例如,Epitope Mapping Protocols,Morris编,Humana Press,1996)以及二级和三级结构分析,以鉴定由所公开抗体及其与抗原的复合物假定的特定3D结构。此类方法包括但不限于X射线晶体学(Engstom(1974)Biochem.Exp.Biol.,11:7-13)和当前所公开抗体的虚拟表示的计算机建模(Fletterick等人(1986)Computer Graphics and Molecular Modeling,in Current Communications in Molecular Biology,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.)。

[0060] 衍生物

[0061] 本公开还提供了一种用于获得对KLRG1具有特异性的抗体的方法。此类抗体中的CDR不限于表1和表3中鉴定的V_H和V_L的特定序列,并且可包括这些序列的保留特异性结合KLRG1的能力的变体。此类变体可由技术人员使用本领域中众所周知的技术从表1和表3中列出的序列中衍生。例如,可在FR和/或CDR中进行氨基酸取代、缺失或添加。通常将FR的变化设计为改善抗体的稳定性和免疫原性,而通常将CDR的变化设计为增加抗体对其靶标的亲和力。FR的变体还包括天然存在的免疫球蛋白同种异型(allotype)。可通过涉及改变CDR并测试抗体针对其靶标的亲和力的常规技术来凭经验确定此类亲和力增加的变化。例如,可在所公开的CDR中的任一种内进行保守性氨基酸取代。可根据Antibody Engineering,第2版,Oxford University Press,Borrebaeck编,1995中描述的方法进行各种改变。这些包括但不限于通过取代编码序列内功能上等效的氨基酸残基的不同密码子从而产生“沉默的”变化而改变的核苷酸序列。例如,非极性氨基酸包括丙氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、色氨酸和蛋氨酸。极性中性氨基酸包括甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、酪氨酸、天冬酰胺和谷氨酰胺。带正电的(碱性)氨基酸包括精氨酸、赖氨酸和组氨酸。带负电的(酸性)氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸。序列内氨基酸的取代者可选自所述氨基酸所属类别的其他成员(参见表5)。此外,多肽中的任何天然残基也可被丙氨酸取代(参见例如,MacLennan等人(1998)Acta Physiol.Scand.增刊643:55-67;Sasaki等人(1998)Adv.Biophys.35:1-24)。

[0062] 表5:示例性保守性取代:

[0063]

残基	保守性取代
Ala(A)	Ser(S)
Arg(R)	Lys(K)
Asn(N)	Gln(Q);His(H)
Asp(D)	Glu(E)
Cys(C)	Ser(S)
Gln(Q)	Asn(N)

Glu(E)	Asp(D)
Gly(G)	Pro(P)
His(H)	Asn(N)、Gln(Q)
Ile(I)	Leu(L)、Val(V)
Leu(L)	Ile(I)、Val(V)
Lys(K)	Arg(R)、Gin(Q)
Met(M)	Leu(L)、Ile(I)
Phe(F)	Met(M)、Leu(L)、Tyr(Y)
Ser(S)	Thr(T);Gly(G)
Thr(T)	Ser(S)、Val(V)
Trp(W)	Tyr(Y)
Tyr(Y)	Trp(W)、Phe(F)
Val(V)	Ile(I)、Leu(L)
Pro(P)	-

[0064] 本发明抗体的衍生物和类似物可通过本领域中众所周知的各种技术来产生,包括重组和合成方法(Maniatis(1990)Molecular Cloning,A Laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.,以及Bodansky等人(1995)The Practice of Peptide Synthesis,第2版,Spring Verlag,Berlin,Germany)。

[0065] 在一个实施方案中,一种用于制备作为本发明的V_H结构域的氨基酸序列变体的V_H结构域的方法包括在当前公开的V_H结构域中添加、删除、取代或插入一个或多个氨基酸的步骤,任选地将由此提供的V_H结构域与一个或多个V_L结构域组合,以及测试V_H结构域或一个或多个V_H/V_L组合与KLRG1的特异性结合,并且任选地测试此种抗原结合结构域调节KLRG1活性的能力。V_L结构域可具有与表1和表3相同或基本上如表1和表3所述的氨基酸序列。

[0066] 可采用类似的方法,其中将本文所公开的V_L结构域的一个或多个序列变体与一个或多个V_H结构域组合。

[0067] 本公开的另一方面提供了一种制备与KLRG1特异性结合的抗原结合片段的方法。所述方法包括:

[0068] (a)提供编码V_H结构域的核酸的起始库,所述V_H结构域包含要替代的CDR3或缺少CDR3编码区;

[0069] (b)将库与编码针对V_H CDR3(即,H3)基本上如本文所述的氨基酸序列的供体核酸组合,使得供体核酸被插入库中的CDR3区中,以便提供编码V_H结构域的核酸的产物库;

[0070] (c)表达产物库的核酸;

[0071] (d)选择对KLRG1具有特异性的结合片段;以及

[0072] (e)回收特异性结合片段或编码它的核酸。

[0073] 再次,可采用类似的方法,其中将本发明的V_L CDR3(即,L3)与编码V_L结构域的核酸的库组成,所述V_L结构域包括要替代的CDR3或缺少CDR3编码区。供体核酸可选自编码基本上如SEQ ID NO:7-24和41-88所述的氨基酸序列的核酸。

[0074] 编码本发明的CDR(例如,CDR3)的序列可使用重组DNA技术,例如,使用Marks等人描述的方法(Bio/Technology(1992)10:779-783)引入到缺少相应CDR(例如,CDR3)的可变

结构域的库中。特别地,可将针对可变结构域区域5′端或邻近可变结构域区域5′端的共有引物与人V_H基因的第三框架区的共有引物结合使用,以提供缺乏CDR3的V_H可变结构域的库。所述库可与特定抗体的CDR3组合。使用类似技术,CDR3衍生的序列可用缺乏CDR3的V_H或V_L结构域的库改组,并且将经改组的完整V_H或V_L结构域与同源V_L或V_H结构域组合以制备本发明的KLRG1特异性抗体。然后可在合适的宿主系统诸如噬菌体展示系统(诸如WO92/01047中所述)中展示所述库,使得可选择合适的抗原结合片段。

[0075] Stemmer(Nature(1994)370:389-391)也公开了类似的改组或组合技术,他描述了与β-内酰胺酶基因有关的技术,但观察到所述方法可用于产生抗体。

[0076] 在其他实施方案中,可使用一种或多种选择的V_H和/或V_L基因的随机诱变来产生携带衍生自本文所公开的序列的一个或多个序列的新的V_H或V_L区。Gram等人(Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.(1992)89:3576-3580)描述了一种这样的技术,即易错PCR。

[0077] 可使用的另一种方法是将诱变引导至V_H或V_L基因的CDR。由Barbas等人(Proc.Nat.Acad.Sci.U.S.A.(1994)91:3809-3813)和Schier等人(J.Mol.Biol.(1996)263:551-567)公开了此类技术。

[0078] 类似地,可将一个或多个或所有三个CDR移植到V_H或V_L结构域的库中,然后筛选对KLRG1具有特异性的抗原结合片段。

[0079] 免疫球蛋白可变结构域的一部分将包含基本上如本文所述的CDR中的至少一个,以及任选地来自如本文所述的scFv片段的介入框架区。所述部分可包括FR1和FR4中的一者或两者的至少约50%,所述50%为FRI的C端50%和FR4的N端50%。在可变结构域的实质部分的N端或C端的其他残基可为通常不与天然存在的可变结构域区域相关的那些残基。例如,通过重组DNA技术构建抗体可导致由被引入以促进克隆或其他操作步骤的接头编码的N端或C端残基的引入。其他操作步骤包括引入接头以将可变结构域连接到其他蛋白质序列,包括免疫球蛋白重链恒定区、其他可变结构域(例如,在双抗体的产生中)或蛋白质标记,如下文进一步详细讨论。

[0080] 尽管实施例中所示的实施方案包含一对“匹配的”V_H和V_L结构域,但是技术人员将认识到,替代实施方案可包含仅含有来自V_L或V_H结构域的单个CDR的抗原结合片段。单链特异性结合结构域中的任一者都可用于筛选能够形成能够例如与KLRG1结合的两个结构域特异性抗原结合片段的互补结构域。可使用WO92/01047中公开的所谓的分级双重组合方法,通过噬菌体展示筛选方法来完成筛选,其中使用含有H链或L链克隆的单个菌落来感染编码另一条链(L或H)的克隆的完整文库,并且根据如所述的噬菌体展示技术选择所得的两条链特异性结合结构域。

[0081] 本文所述的抗KLRG1抗体可连接到另一种功能分子,例如,另一种肽或蛋白质(白蛋白、另一种抗体等)、毒素、放射性同位素、细胞毒性或细胞抑制剂。例如,抗体可通过化学交联或通过重组方法来连接。也可以美国专利号4,640,835;4,496,689;4,301,144;4,670,417;4,791,192或4,179,337中列出的方式将抗体与多种非蛋白质聚合物中的一种连接,所述非蛋白质聚合物例如,聚乙二醇、聚丙二醇或聚氧化烯。抗体可通过与聚合物共价缀合来进行化学修饰,以例如增加其循环半衰期。示例性聚合物和连接它们的方法也显示于美国专利号4,766,106;4,179,337;4,495,285和4,609,546中。

[0082] 还可将所公开的抗体改变为具有不同于天然模式的糖基化模式。例如,可删除一

个或多个糖部分和/或将一个或多个糖基化位点添加到原始抗体。可通过改变氨基酸序列以含有本领域中已知的糖基化位点共有序列来实现将糖基化位点添加到目前公开的抗体。增加抗体上糖部分数量的另一种方式是通过糖苷与抗体氨基酸残基的化学或酶促偶联。此类方法描述于WO 87/05330和Aplin等人(1981)CRC Crit.Rev.Biochem.,22:259-306中。从抗体中去除任何糖部分可通过化学或酶促方法完成,例如,如Hakimuddin等人(1987)Arch.Biochem.Biophys.,259:52;和Edge等人(1981)Anal.Biochem.,118:131以及Thotakura等人(1987)Meth.Enzymol.,138:350所述。抗体也可用可检测的或功能性标记来加标。可检测的标记包括放射性标记,诸如^{131}I或^{99}Tc,也可使用常规化学方法将其连接到抗体。可检测的标记还包括酶标记,诸如辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶。可检测的标记还包括化学部分,诸如生物素,其可通过与特定同源可检测部分(例如经标记的亲和素)结合而被检测。

[0083] CDR序列与以下中列出的那些只有非实质性差异的抗体涵盖在本发明的范围内:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31、SEQ ID NO:32、SEQ ID NO:33、SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39或SEQ ID NO:40。通常,氨基酸被具有相似电荷、疏水性或立体化学特征的相关氨基酸取代。此类取代将在技术人员的普通技术之内。与在CDR中不同,在FR中可进行更多实质性变化,而不会不利地影响抗体的结合特性。对FR的改变包括但不限于使非人衍生的框架人源化或工程化对于抗原接触或稳定结合位点重要的某些框架残基,例如,改变恒定区的类别或亚类、改变可能更改效应子功能(诸如Fc受体结合)的特定氨基酸残基,例如,如美国专利号5,624,821和5,648,260以及Lund等人(1991)J.Immum.147:2657-2662和Morgan等人(1995)Immunology 86:319-324中所述,或改变恒定区所来源的物种。

[0084] 本领域技术人员将理解,上述修改不是完全详尽的,并且根据本公开的教导,许多其他修改对于本领域技术人员而言将是显而易见的。

[0085] 核酸、克隆和表达系统

[0086] 本公开还提供编码所公开的抗体的分离的核酸。核酸可包含DNA或RNA,并且可为全部或部分合成或重组的。除非上下文另外要求,否则对如本文所述的核苷酸序列的引用涵盖具有指定序列的DNA分子,并且涵盖具有其中U取代T的指定序列的RNA分子。

[0087] 本文提供的核酸包含本文所公开的CDR、V_H结构域和/或V_L结构域的编码序列。

[0088] 本公开还提供了呈质粒、载体、噬菌粒、转录或表达盒形式的构建体,其包含至少一种编码本文所公开的CDR、V_H结构域和/或V_L结构域的核酸。

[0089] 本公开还提供了一种宿主细胞,其包含一个或多个上述构建体。

[0090] 还提供了编码任何CDR(H1、H2、H3、L1、L2或L3)、V_H或V_L结构域的核酸,以及制备编码产物的方法。所述方法包括从编码核酸表达编码产物。表达可通过在适当条件下培养含有核酸的重组宿主细胞来实现。通过表达产生后,可使用任何合适的技术分离和/或纯化V_H或V_L结构域或特异性结合成员,然后适当使用。

[0091] 抗原结合片段、V_H和/或V_L结构域以及编码核酸分子和载体可从其自然环境中以基本上纯的或均质的形式分离和/或纯化,或者在核酸的情况下,不含或基本上不合除了编码

具有所需功能的多肽的序列之外的核酸或起源基因。

[0092] 在多种不同宿主细胞中克隆和表达多肽的系统是本领域中众所周知的。对于适合产生抗体的细胞,参见Gene Expression Systems,Academic Press,Fernandez等人编,1999。简而言之,合适的宿主细胞包括细菌、植物细胞、哺乳动物细胞以及酵母和杆状病毒系统。本领域可供用于表达异源多肽的哺乳动物细胞系包括中国仓鼠卵巢细胞、HeLa细胞、幼年仓鼠肾细胞、NSO小鼠骨髓瘤细胞和许多其他细胞。常见的细菌宿主为大肠杆菌。与本发明相容的任何蛋白质表达系统都可用于产生所公开的抗体。合适的表达系统包括描述于Gene Expression Systems,Academic Press,Fernandez等人编,1999中的转基因动物。

[0093] 可选择或构建合适的载体,使得其包含适当的调控序列,包括启动子序列、终止子序列、聚腺苷酸化序列、增强子序列、标记基因和其他适当的序列。适当时,载体可为质粒或病毒,例如噬菌体或噬菌粒。对于更多细节,参见例如,Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,1989。在Current Protocols in Molecular Biology,第2版,Ausubel等人编,John Wiley&Sons,1992中详细描述了许多已知技术和方案,用于例如,在制备核酸构建体、诱变、测序、将DNA引入细胞和基因表达以及蛋白质分析中操纵核酸。

[0094] 本公开的另一方面提供了一种宿主细胞,其包含如此处所公开的核酸。另一方面提供了一种方法,其包括将此种核酸引入宿主细胞中。引入可采用任何可用的技术。对于真核细胞,合适的技术可包括磷酸钙转染、DEAE-葡聚糖、电穿孔、脂质体介导的转染和使用逆转录病毒或其他病毒(例如牛痘或对于昆虫细胞为杆状病毒)的转导。对于细菌细胞,合适的技术可包括氯化钙转化、电穿孔和使用噬菌体的转染。将核酸引入细胞中之后,可引起或允许从核酸表达,例如,通过在表达基因的条件下培养宿主细胞。

[0095] 使用方法

[0096] 所公开的抗KLRG1抗体能够调节KLRG1相关的免疫应答调节。在特定的实施方案中,细胞毒性T细胞和NK细胞的激活是通过调节KLRG1信号传导来介导的。所公开的抗体可充当KLRG1的激动剂或拮抗剂,这取决于它们的使用方法。所述抗体可用于预防、诊断或治疗哺乳动物、特别是人的医学病症。本发明的抗体也可用于分离KLRG1或KLRG1表达细胞。此外,所述抗体可用于治疗处于病症风险或易患病症或患有与异常KLRG1表达或功能相关的病症的风险或易患所述病症或患有所述病症的受试者。

[0097] 本发明的抗体可用于例如在某些类型的癌症和传染病中可能期望调节细胞毒性T细胞和NK细胞激活的情况。

[0098] 当期望减弱的淋巴细胞激活时,本发明的抗KLRG1抗体可用作KLRG1的激动剂,以便增强KLRG1相关的细胞毒性(或CD8+)T细胞和NK细胞激活的衰减。

[0099] 在某些情况下,可能期望引发或增强患者的免疫反应,以便治疗癌症或传染病。通过所公开的方法治疗或预防的疾病包括但不限于微生物(例如细菌)、病毒(例如全身性病毒感染诸如流感、病毒性皮肤病诸如疱疹或带状疱疹)或寄生虫的感染;以及癌症(例如,黑色素瘤和前列腺癌)。

[0100] 抗KLRG1抗体对细胞毒性T细胞和NK细胞的激活增强T细胞和NK细胞反应。在此类情况下,抗体充当KLRG1的拮抗剂。因此,在一些实施方案中,抗体可用于抑制或减少与KLRG1相关的下调活性,即与细胞毒性T细胞和NK细胞激活的下调相关的活性。如实施例中

所证实的,阻断KLRG1/E-钙粘蛋白与拮抗性抗KLRG1抗体的相互作用导致这些细胞的T细胞增殖反应和IFNγ分泌增强,这与细胞毒性T细胞和NK细胞中KLRG1途径的下调作用一致。在各种实施方案中,抗体以小于约50nM、并且更优选小于约40nM、30nM、20nM、10nM或5nM的IC50抑制E-钙粘蛋白与KLRG1的结合。E-钙粘蛋白结合的抑制可如实施例6中所述或使用本领域已知的技术来测量。

[0101] 本发明的抗体或抗体组合物以治疗有效量施用。通常,治疗有效量可随受试者的年龄、状况和性别以及受试者的医学病状的严重性而变化。抗体的治疗有效量为约0.001mg/kg体重至约30mg/kg体重、优选约0.01mg/kg体重至约25mg/kg体重、约0.1mg/kg体重至约20mg/kg体重或约1mg/kg体重至约10mg/kg体重。可根据需要调整剂量,以适应所观察到的治疗效果。基于临床指征治疗医师选择合适的剂量。

[0102] 抗体可以推注剂量给药,以在给药后的最大时间长度内最大化抗体的循环水平。推注剂量后还可使用连续输注。

[0103] 免疫细胞(例如,T细胞或NK细胞)也可从患者中分离并用本发明的抗体离体孵育。在一些实施方案中,可通过从受试者去除免疫细胞,使免疫细胞在体外与本发明的抗KLRG1抗体接触来调节T细胞和NK细胞的激活。在此类实施方案中,抗KLRG1抗体可以多价形式使用,使得免疫细胞表面上的KLRG1分子在与此类抗体结合后变成“交联的”。例如,抗KLRG1抗体可结合至固体载体诸如珠粒,或通过第二抗体交联。然后可使用本领域已知的方法分离免疫细胞并将其重新植入患者体内。

[0104] 在另一方面,本发明的抗体可用作靶向剂,用于将另一种治疗剂或细胞毒性剂(例如,毒素)递送至表达KLRG1的细胞。所述方法包括施用与治疗剂或细胞毒性剂偶联的抗KLRG1抗体,或在允许抗体与KLRG1结合的条件下施用。

[0105] 本发明的抗体还可用于检测生物样品中KLRG1的存在。检测到的KLRG1的量可与KLRG1的表达水平相关,而KLRG1的表达水平又与受试者中免疫细胞(例如,激活的T细胞或NK细胞)的激活状态相关。

[0106] 采用抗体的检测方法是本领域中众所周知的,并且包括例如ELISA、放射免疫测定、免疫印迹、蛋白质印迹、免疫荧光、免疫沉淀。可在结合了这些技术中的一种或多种以检测KLRG1的诊断试剂盒中提供抗体。此种试剂盒可含有其他组分、包装、说明书或其他材料,以帮助检测蛋白质。

[0107] 当抗体用于诊断目的时,可能期望例如用配体基团(诸如生物素)或可检测的标记基团(诸如荧光基团、放射性同位素或酶)来修饰它们。若需要,可使用常规技术标记本发明的抗体。合适的可检测标记包括例如,荧光团、发色团、放射性原子、电子致密试剂、酶和具有特异性结合伴侣的配体。酶通常通过它们的活性来检测。例如,辣根过氧化物酶可通过其将四甲基联苯胺(TMB)转化为蓝色颜料的能力来检测,所述能力可用分光光度计定量。对于检测,合适的结合伴侣包括但不限于生物素和亲和素或链霉亲和素、IgG和蛋白A以及本领域中已知的众多受体-配体对。对于本领域普通技术人员而言,其他排列和可能性将是显而易见的,并且被视为本发明范围内的等效物。

[0108] 本发明的抗体可用于筛选方法中以鉴定作为治疗剂有效的KLRG1途径抑制剂。在此种筛选测定中,通过将KLRG1和本发明的抗体组合形成第一结合混合物;并测量第一结合混合物中的结合量(MO)。还通过将KLRG1、抗体和待筛选的化合物或剂组合形成第二结合混

合物,并测量第二结合混合物中的结合量(M1)。如实施例所示,待测试的化合物可为另一种抗KLRG1抗体。然后例如通过计算M1/M0比,比较第一结合混合物和第二结合混合物中的结合量。如果观察到与第一结合混合物相比第二结合混合物中的结合减少,则认为所述化合物或剂能够调节KLRG1相关的免疫反应下调。结合混合物的配制和最优化在本领域技术水平内,此类结合混合物还可含有增强或优化结合所必需的缓冲液和盐,并且另外的对照测定可包括在本发明的筛选测定中。因此,可鉴定据发现将KLRG1抗体结合降低至少约10%(即,M1/M0＜0.9),优选大于约30%的化合物,并且然后,若需要,在如下所述的其他测定或动物模型中针对改善病症的能力进行二次筛选。KLRG1与抗体之间的结合强度可使用例如酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、基于表面等离激元共振的技术(例如,Biacore)来测量,所有技术都是本领域中众所周知的技术。

[0109] 然后可如实施例中所述在体外或在动物模型中测试化合物。例如根据动物试验确定初步剂量,并且根据本领域公认的惯例进行人施用的剂量缩放。毒性和治疗功效可通过细胞培养物或实验动物中的标准药物程序来确定。由细胞培养测定或动物研究获得的数据可在配制用于人的剂量范围中使用。可使用本领域中已知的转化因子将在一种动物模型中获得的治疗有效剂量转化为用于另一种动物,包括人(参见例如,Freireich等人(1966)Cancer Chemother.Reports,50(4):219-244)。

[0110] 药物组合物和施用方法

[0111] 本公开提供了包含抗KLRG1抗体的组合物。此类组合物可适于药物用途和施用于患者。组合物通常包含本发明的一种或多种抗体和药学上可接受的赋形剂。短语“药学上可接受的赋形剂”包括可与药物施用相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。用于药物活性物质的此类介质和剂的使用是本领域中众所周知的。组合物也可含有提供补充的、另外的或增强的治疗功能的其他活性化合物。药物组合物也可与施用说明书一起包含在容器、包装或分配器中。

[0112] 本发明的药物组合物被配制成与其预期的施用途径相容。完成施用的方法是本领域普通技术人员已知的。施用可为例如静脉内、腹膜内、肌内、腔内、皮下或经皮施用。也可能获得可局部或口服施用或可能能够跨粘膜传输的组合物。

[0113] 用于皮内或皮下应用的溶液或悬浮液通常包含以下组分中的一种或多种:无菌稀释剂,诸如注射用水、盐溶液、不挥发性油、聚乙二醇、甘油、丙二醇或其他合成溶剂;抗细菌剂,诸如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,诸如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,诸如乙二胺四乙酸;缓冲剂,诸如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐;以及用于调节张力的剂,诸如氯化钠或右旋糖。可用酸或碱,诸如盐酸或氢氧化钠调节pH。此类制剂可封装在由玻璃或塑料制成的安瓿、一次性注射器或多剂量小瓶中。

[0114] 适合注射的药物组合物包括无菌水溶液或分散体和用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。对于静脉内施用,合适的载剂包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL(BASF,Parsippany,N.J.)或磷酸盐缓冲盐水(PBS)。在所有情况下,组合物必须为无菌的且应当为易于注射的流体。组合物在制造和储存条件下应当稳定且必须在贮存中防止诸如细菌和真菌的微生物的污染作用。可通过各种抗细菌剂和抗真菌剂(例如对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等)来实现防止微生物作用。在许多情况下,将优选在组合物中包含等渗剂,例如糖;多元醇诸如甘露糖醇、山梨糖醇和氯化钠。载剂可为溶剂或分散

介质,所述溶剂或分散介质含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)及其合适的混合物。例如,通过使用诸如卵磷脂的包衣、通过在分散体的情况下保持所需的颗粒大小和/或通过使用表面活性剂,可保持适当的流动性。可通过在组合物中包含例如单硬脂酸铝和明胶的延长吸收的剂来实现可注射组合物的延长吸收。

[0115] 口服组合物通常包含惰性稀释剂或可食用载剂。它们可封装在明胶胶囊中或压成片剂。对于口服施用,可将抗体与赋形剂组合并以片剂、锭剂或胶囊的形式使用。药学上相容的结合剂和/或佐剂材料可作为组合物的一部分包括在内。片剂、丸剂、胶囊剂、锭剂等可含有以下成分中的任一种或性质相似的化合物;粘合剂,诸如微晶纤维素、黄蓍胶或明胶;赋形剂,诸如淀粉或乳糖;崩解剂,诸如海藻酸、普利莫吉尔(Primogel)或玉米淀粉;润滑剂,诸如硬脂酸镁或斯特罗特斯(Sterotes);助流剂,诸如胶体二氧化硅;甜味剂,诸如蔗糖或糖精;或调味剂,诸如薄荷、水杨酸甲酯或橙调味剂。

[0116] 全身施用也可通过经粘膜或经皮方式进行。对于经粘膜或经皮施用,在制剂中使用适于要渗透的屏障的渗透剂。此类渗透剂通常在本领域中是已知的,并且包括例如洗涤剂、胆盐和夫西地酸衍生物。经粘膜施用可例如通过使用锭剂、鼻喷雾剂、吸入剂或栓剂来完成;例如,在包含Fc部分的抗体的情况下,组合物可能能够跨肠、口或肺中的粘膜传输(例如,通过如美国专利号6,030,613中所述的FcRn受体介导的途径)。对于经皮施用,可将活性化合物配制成软膏、药膏、凝胶或乳剂,如本领域通常已知的。对于吸入施用,抗体可以气溶胶喷雾的形式从含有合适推进剂(例如气体,诸如二氧化碳)的加压容器或分配器、或喷雾器中递送。

[0117] 在某些实施方案中,将目前公开的抗体与防止化合物从体内快速消除的载剂一起制备,诸如包含植入物和微囊化递送系统的控释制剂。可使用生物可降解、生物相容的聚合物,诸如乙烯乙酸乙烯酯、聚酸酐、聚乙醇酸、胶原蛋白、聚原酯和聚乳酸。此类制剂的制备方法对本领域技术人员而言是显而易见的。含有目前公开的抗体的脂质体悬浮液也可用作药学上可接受的载剂。这些可根据本领域技术人员已知的方法来制备,例如,如美国专利号4,522,811中所述。

[0118] 以易于施用和实现剂量均匀性的单位剂量形式配制口服或肠胃外组合物可以是有利的。如本文所用,术语“剂量单位形式”是指适合作为用于待治疗的受试者的单一剂量的物理上离散单位;每个单位含有经计算可与所需药物载剂结合产生期望治疗效果的预定量的活性化合物。

[0119] 本发明的组合物的毒性和治疗功效可通过细胞培养物或实验动物中例如用于确定LD50(50%群体致死剂量)和ED50(50%群体有效治疗剂量)的标准药物程序来确定。毒性作用与治疗作用之间的剂量比为治疗指数并且它可表示为LD50/ED50比。表现出高治疗指数的组合物为优选的。

[0120] 对于本发明中使用的任何组合物,治疗有效剂量最初可由细胞培养测定来估计。合适的生物测定的实例包括DNA复制测定、细胞因子释放测定、基于转录的测定、KLRG1/钙粘蛋白结合测定、免疫学测定、例如描述于实施例中的其他测定。由细胞培养测定和动物研究获得的数据可在配制用于人的剂量范围中使用。可在动物模型中配制剂量来实现包括IC50(即,实现症状的半最大抑制的抗体浓度)的循环血浆浓度范围。可例如通过高效液相色谱法测量血浆中的循环水平。可通过合适的生物测定来监测任何特定剂量的作用。剂量

优选处于具有极小或无毒性的循环浓度的范围内。剂量可取决于所采用的剂型和所利用的施用途径而变化。

[0121] 以下实施例不以任何方式限制本发明的范围。本领域普通技术人员将认识到,可在不改变本发明的精神或范围的情况下进行多种修改和变化。此类修改和变化涵盖在本发明的范围内。本申请引用的所有参考、专利和公开的专利申请的全部内容以引用的方式并入本文。

[0122] 实施例

[0123] 实施例1:重组蛋白的产生

[0124] 重组蛋白通过标准分子克隆产生,并且表达方案包括人KLRG1 ECD(SEQ ID NO:89)、食蟹猴KLRG1 ECD(SEQ ID NO:90)和人E-钙粘蛋白(SEQ ID NO:91),其氨基酸序列如下表6所示。重组蛋白通过将相应的cDNA克隆到pCDNA4载体(Invitrogen)中并在哺乳动物HEK293中进行瞬时转染,以FC融合蛋白或HIS加标形式产生。所表达的蛋白质的纯化通过对于FC融合蛋白形式使用蛋白A亲和树脂且对于HIS加标蛋白使用镍-NTA树脂的色谱法进行。所有纯化的蛋白质均通过SDS-PAGE电泳进行表征,以验证纯度和分子量。

[0125] 表6:人和食蟹猴KLRG1 ECD和人E-钙粘蛋白的氨基酸序列

[0126]

SEQ ID NO.	蛋白质	氨基酸序列
SEQ ID NO:89	人 KLRG1 ECD	LCQGSNYSTCASCPSCPDRWMKY GNHCYYFSVEEKDWNSSLEFCLA RDSHLLVITDNQEMSLLQVFLSEA FCWIGLRNNSGWRWEDGSPLNFS RISSNSFVQTCGAINKNGLQASSC EVPLHWVCKKVRL
SEQ ID NO:90	食蟹猴 KLRG1 ECD	LCQGSKYSTCASCPSCPDHWMKY GNHCYYFSVEKKDWISSLEFCLA RDSHLLMITDKQEMSLLQDFLSEA FHWVGLRNNSGWRWEDGSPLNF SRIYSNSLVQTCGAINKNSLQASS CEVSLQWVCKKVSP

[0127]

SEQ ID NO.	蛋白质	氨基酸序列
SEQ ID NO:91	人 E-钙粘蛋白	DWVIPPISCPENEKGPFPKNLVQIK SNKDKEGKVFYSITGQGADTPPV GVFIIERETGWLKVTEPLDRERIAT YTLFSHAVSSNGNAVEDPMEILIT VTDQNDNKPEFTQEVFKGSVMEG ALPGTSVMEVTATDADDDVNTY NAAIAYTILSQDPELPDKNMFTIN RNTGVISVVTTGLDRESFPTYTLV VQAADLQGEGLSTTATAVITVTD TNDNPPIFNPTTYKGQVPENEANV VITTLKVTDADAPNTPAWEAVYTI LNDDGGQFVVTTNPVNNDGILKT AKGLDFEAKQQYILHVAVTNVVP FEVSLTTSTATVTVDVLDVNEAPI FVPPEKRVEVSEDFGVGQEITSYT AQEPDTFMEQKITYRIWRDTANW LEINPDTGAISTRAELDREDFEHV KNSTYTALIIATDNGSPVATGTGT LLLILSDVNDNAPIPEPRTIFFCERN PKPQVINIIDADLPPNTSPFTAELT HGASANWTIQYNDPTQESIILKPK MALEVGDYKINLKLMDNQNKDQ VTTLEVSVCDCEGAAGVCRKAQP VEAGLQIPAILGILGGILALLILILL LLLFLRRRAVVKEPLLPPEDDTRD NVYYYDEEGGGEEDQDFDLSQLH RGLDARPEVTRNDVAPTLMSVPR YLPRPANPDEIGNFIDENLKAADT DPTAPPYDSLLVFDYEGSGSEAAS LSSLNSSESDKDQDYDYLNEWGN RFKKLADMYGGGEDD

[0128] 开发了稳定的细胞系作为免疫抗原以测试抗体与全长抗原的结合,并作为在功能性T细胞测定中的靶细胞。开发的细胞系包括表达全长人KLRG1的CHO和表达全长食蟹猴KLRG1的CHO。通过用编码感兴趣的蛋白质的pCDNA4质粒转染CHO细胞来获得稳定的细胞系。转染后,将细胞暴露于500ug/ml的G418以选择稳定整合的质粒。将细胞系通过FACS进一步针对表达进行表征,并分类以选择均质和稳定的表达。

[0129] 用CD3激动剂和E-钙粘蛋白双重转染的稳定CHO细胞在功能测定使用,用于证明对人T细胞中KLRG1的阻断作用。CD3激动剂和E-钙粘蛋白的共表达通过使用适当抗体的二色FACS进行验证。

[0130] 实施例2:抗KLRG1抗体的产生

[0131] 抗体ABC_HG1N01、ABC_HG1N02和ABC_HG1N07是针对KLRG1的细胞外结构域的人源化IgG1抗体。通过用人和食蟹猴KLRG1对雌性BALB/c小鼠和SJL小鼠进行标准免疫,随后进行杂交瘤筛选,产生针对人KLRG1的小鼠单克隆抗体(MAB)。已经采用了几种免疫策略来产生各种抗体命中。简而言之,用cDNA、重组抗原或表达感兴趣的抗原的CHO细胞对SJL和Balb/c小鼠进行重复免疫。抗原特异性抗体的滴度通过ELISA进行定期监测,并且当达到适

当的滴度(通常在1:1000与1:10000稀释因子之间)时处死动物。将来自处死小鼠的脾细胞与小鼠骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤细胞,然后进行培养并将其亚克隆成单细胞。将稳定的克隆扩大规模并收获条件培养基,并且通过ELISA和FACS测试抗KLRG1抗体的表达。

[0132] 实施例3:抗KLRG1阻断抗体的选择

[0133] 针对与人KLRG1 ECD和食蟹猴KRG1 ECD的结合对杂交瘤产生的抗体进行筛选。选择在两种抗原之间具有交叉反应性的抗体进入下一筛选阶段,以确定它们中和KLRG1与E-钙粘蛋白之间相互作用的能力。根据抗体与人和食蟹猴(cyno)KLRG1的结合EC50对抗体进行排名,并在E-钙粘蛋白竞争测定中根据其IC50进行进一步排序。根据这些标准,总共选择48种抗体。优先在基于细胞的测定中对八种抗体进行功能表征。表3总结了所选择的8种小鼠抗体的可变区氨基酸序列,并且表4示出了所选择的8种小鼠抗体的CDR区。根据表7中概述的序列责任(liability)基序的存在,对抗体进行进一步排名。在ABC_G1N01和ABC_G1N02的CDR-L1中发现了脱酰胺位点(NG),这可能影响药物材料的稳定性、可制造性和活性。为了去除这种潜在的责任,构建并测试了一系列突变体。具体地,NG基序可被NA、QG和KG序列取代,而不失去结合。可通过将CDR区移植到人框架中来使小鼠抗体人源化。表1示出了ABC_G1N01(ABC_HG1N01)、ABC_G1N02(ABC_HG1N02)和ABC_G1N07(ABC_HG1N07)的人源化构建体的可变区序列的实例。此外,可对CDR区进行保守性突变以改善亲和力、效力或生物物理特征。表5总结了可对CDR区进行的保守性突变的列表。根据单克隆抗体相互竞争的能力,对它们进行表位分仓。发现可将抗体分为3个不同的仓;BIN1包括:ABC_G1N01、ABC_G1N02、ABC_G1N03、ABC_G1N04、ABC_G1N05。BIN2包括:MAB25、MAB031。BIN3包括:ABC_G1N07、ABC_G1N08。通过将可变小鼠区克隆到人IgG恒定框架上来产生嵌合形式的抗体,并在功能测定中测试以确定它们对人T细胞的功能活性,如本文中所述。

[0134] 表7:用于针对潜在的可制造性问题对抗体进行筛选的序列责任基序

[0135]

责任	基序	结果
未配对的半胱氨酸	C	加合物形成、活性丧失、杂乱化(scrambling)、聚集、过程不一致
脱酰胺	NG	活性丧失、聚集、过程不一致
N-糖基化	NXS/T，X 不是 P	严重唾液酸化下影响 PK、活性丧失
酪氨酸硫酸化	Neg-Neg-Y-Neg-Neg	活性丧失、过程不一致
水解 Asp-Pro	DP	片段化、稳定性
蛋氨酸氧化	M	活性丧失、聚集
色氨酸氧化	W	光敏、活性丧失
脱酰胺	NS、QG、NN	活性丧失、聚集、过程不一致
天冬氨酸异构化	DG、DS、DQ、DK	活性丧失、聚集

[0136] 实施例4:通过FACS表征抗体与KLRG1的结合(EC50)和对KLRG1/E-钙粘蛋白相互作

用的抑制(IC50)

[0137] 通过FACS进行抗KLRG1单克隆抗体与细胞表达的人和食蟹猴KLRG1的结合。稳定转染中国仓鼠卵巢(CHO)细胞以表达全长人KLRG1(CHO-人-KLRG1)和食蟹猴KLRG1(CHO-食蟹猴-KLRG1)。通过在1-100nM的浓度范围内孵育各种浓度的抗KLRG1单克隆抗体,并使用与荧光探针直接缀合的抗小鼠检测抗体测量经标记细胞的荧光,确定EC50值。

[0138] 通过FACS测量单克隆抗体抑制E-钙粘蛋白/KLRG1结合的能力。E-钙粘蛋白与CHO-hKLRG1细胞的结合首先是通过将KLRG1表达细胞与不同浓度的HIS加标的重组E-钙粘蛋白一起孵育,并且使用抗HIS检测抗体通过FACS检测来确定的。通过此方法确定E-钙粘蛋白/KLRG1相互作用的EC50为1μM。通过随着从0.1nM至100nM改变单克隆抗体的浓度监测E-钙粘蛋白结合的损失来确定每种单克隆抗体的IC50值。使用SigmaPlot软件计算EC50和IC50值,并总结于表8中。

[0139] 表8:通过FACS测量的MAB的结合EC50和E-钙粘蛋白抑制IC50。

[0140]

抗体 ID	结合 EC50 (nM)		E-钙粘蛋白抑制 IC50 (nM)
	人 KLRG1	食蟹猴 KLRG1	
ABC_G1N01	1.21	1.45	12.2
ABC_G1N02	1.01	2.02	5.03
ABC_G1N03	1.3	1.06	不适用
ABC_G1N04	29.0	0.47	不适用
ABC_G1N05	39.8	0.5	23
ABC_G1N06	1.43	1.5	41
MAB031	5.1	5.93	39
ABC_G1N07	0.94	0.98	9.6
ABC_G1N08	4.8	1.3	10

[0141] 实施例5:结合动力学的测量

[0142] 人源化抗体对人和食蟹猴KLRG1的结合动力学通过OCTET®测量来确定。OCTET®系统使用生物层干涉(BLI)技术直接实时监测蛋白质和其他生物分子与其伙伴的结合,从而提供动力学结合常数的分析。参见https://www.fortebio.com/bli-technology.html,其内容(包括与其关联的所有链接和子链接)以引用的方式整体并入本文。实验设置包括将生物素化重组抗原(人-KLRG-ECD或食蟹猴-KLRG1-ECD)固定在的链霉亲和素OCTET®传感器上,以产生加载抗原的传感器。经加载的传感器在OCTET®仪器中暴露于100nM至0.1nM的不同浓度的每种人源化抗体,并收集600秒的数据以测量抗体/抗原复合物的缔合动力学(K_{on})。在接下来的步骤中,将传感器暴露于不合抗体的1X磷酸盐缓冲盐水(PBS)缓冲溶液中600秒,以观察解离动力学(K_{off})。然后使用ForteBio®分析软件将所得的数据拟合到1:1结合动力学模型,以计算K_D。表9中总结了通过此方法得到的三种人源化抗体的动力学结合参数。

[0143] 表9:通过OCTET®测量所选择的MAB的结合亲和力:

[0144]

抗原	抗体	K_{on} (1/Ms)	K_{off} (1/s)	K_D (M)
人 KLRG1	ABC_G1N01	2.29E+06	2.87E-04	1.25E-10
	ABC_G1N02	2.80E+06	6.81E-04	2.43E-10
	ABC_G1N07	1.97E+06	<1.0E-05	<5.1E-12
食蟹猴 KLRG1	ABC_G1N01	6.64E+05	4.10E-05	6.17E-11
	ABC_G1N02	6.30E+05	4.07E-05	6.47E-11
	ABC_G1N07	8.80E+05	1.25E-03	1.42E-09

[0145] 实施例6:KLRG1阻断抗体的功能活性的表征

[0146] 通过测量抗体介导的KLRG1信号传导阻断对IFNγ产生和对T细胞增殖(增殖指数)的影响,阻断KLRG1与其配体的相互作用对人CD8+ T细胞具有激活作用。为了证明KLRG1阻断对免疫系统细胞的作用,从健康供体中分离出CD8+ T细胞,并与共表达CD3激动剂和E-钙粘蛋白的CHO细胞系(eAPC)进行共培养测试。测定通过向T细胞提供2种竞争信号来运行,其中CD3刺激被E-钙粘蛋白的抑制作用抵消。当KLRG1信号传导被抗KLRG1抗体阻断时,抑制信号被破坏,并且T细胞根据其与细胞表面上表达的CD3激动剂的相互作用而被激活。通过ELISA测量IFNγ分泌,并且结果总结在表10和图1中。

[0147] 表10:KLRG1阻断抗体在人CD8+ T细胞中对IFNγ释放的恢复

[0148]

	释放的 IFNγ (pg/ml)	
	样品 1	样品 2
CD8 阳性对照	1624.09	1401.42
同种型	390.02	355.94
ABC_G1N07	1579.71	1389.6
ABC_G1N02	1440.87	1290.52
ABC_G1N01	1185.14	1217.73
ABC_G1N06	1023.15	1142.09
ABC_G1N05	1012.46	1083.04
ABC_G1N08	1013.8	1063.23
ABC_G1N04	987.48	1002.46
ABC_G1N03	934.34	868.9

[0149] 此数据表明E-钙粘蛋白对人T细胞具有抑制作用,所述抑制作用可通过用阻断抗体阻断KLRG1信号传导来逆转。

[0150] 表11和图2中呈现的数据表明,通过测量响应于eAPC的增殖指数,阻断KLRG1/E-钙粘蛋白相互作用导致人CD8+ T细胞的增殖。在此测定中,通过用h-E钙粘蛋白和CD3激动剂稳定转导CHO细胞来产生eAPC。然后将由此产生的eAPC与来自健康志愿者的新鲜分离的CD8+ T细胞在10微克/毫升测试抗体或同种型对照存在下共孵育3天。通过将CD8+ T细胞与稳定表达抗CD3但缺乏抑制性配体E-钙粘蛋白表达的CHO细胞一起孵育来制备阳性对照样品,从而使CHO细胞上表达的抗CD3不受抑制地刺激CD8+ T细胞。结果显示,CD8+ T细胞如预期那样响应于CD3刺激而增殖,并且eAPC上的抑制性配体E-钙粘蛋白共表达抑制了CD8+ T细胞的增殖。此外,可通过中和抗体阻断KLRG1来恢复CD8+ T细胞的增殖。

[0151] 表11:KLRG1阻断对CD8+ T细胞增殖的影响

[0152]

	分裂指数	
阳性对照	0.214	0.229
同种型	0.139	0.121
ABC_G1N07	0.252	0.235
ABC_G1N02	0.25	0.236

[0153] 表12和图3中呈现的数据显示了抗KLRG1中和剂抗体在IFNγ分泌测定中的T细胞活性与抗体的阻断活性之间的相关性。每种抗体的IC50值均来自E-钙粘蛋白结合抑制研究,并针对在CD8+ T细胞IFNγ释放测定中测得的IFNγ产生水平作图。相关性显示,具有较低IC50值的抗体(例如,更有效的KLRG1/E-钙粘蛋白结合阻断剂)导致CD8+ T细胞的更高水平的IFNγ释放。此数据表明,抗体阻断KLRG1导致T细胞活性以E-钙粘蛋白依赖性方式恢复。

[0154] 表12:E-钙粘蛋白IC50竞争值与IFNγ分泌之间的相关性

[0155]

mAb	IFNγ (pg/ml)	IC50(nM)
ABC_G1N07	1512.76	4.21
ABC_G1N02	1484.66	9.6
ABC_G1N01	1365.7	5
MAB034	1201.44	11.2
MAB024	1129.8	15.4
ABC_G1N05	1082.62	12.3
ABC_G1N08	1047.75	23
MAB036	1038.52	10
MAB031	975.34	18
同种型	799.27	390

序列表

<110> 阿波科有限责任公司

<120> 抗 KLRG1 抗体

<130> 117872-4

<160> 91

<170> SIPOSequenceListing 1.0

<210> 1

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工抗体(Artificial Sequence)

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)..(125)

<223> 人源化小鼠抗体部分序列

<400> 1

[0001]

Gln Val Ile Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Phe
20 25 30

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

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

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Thr Ile Tyr Tyr Gly Asn Tyr Leu Thr Phe Tyr Ala Met
100 105 110

Glu His Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 2

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工抗体(Artificial Sequence)

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)..(115)

<223> 人源化小鼠抗体部分序列

<400> 2

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

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

[0002]

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

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

Arg Thr Val
115

<210> 3

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工抗体(Artificial Sequence)

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)..(125)

<223> 人源化小鼠抗体部分序列

<400> 3

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

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Phe

20 25 30

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

35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Trp Tyr Glu Leu Ala

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Gln Val

65 70 75 80

Val Leu Thr Met Thr Asn Met Asp Pro Val Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Val Ile Tyr Tyr Gly Ser Arg Ser Ala Tyr Tyr Ser Met

100 105 110

Asp Tyr Trp Gly Pro Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115 120 125

<210> 4

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工抗体(Artificial Sequence)

[0003]

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)..(115)

<223> 人源化小鼠抗体部分序列

<400> 4

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser

20 25 30

Asn Gly His Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly

85 90 95

Ser His Val Pro Val Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110
Arg Thr Val
115
<210> 5
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工抗体(Artificial Sequence)
<220>
<221> CHAIN
<222> (1)..(119)
<223> 人源化小鼠抗体部分序列
<400> 5
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn Tyr
20 25 30

[0004]

Ala Met Ser Trp Ile Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Thr Ile Ser Glu Ser Gly Asn Tyr Asn Asn Tyr Pro Asp Asn Val
50 55 60
Lys Gly Arg Leu Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Val Arg Asp Asp Trp Glu Gly Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 6
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工抗体(Artificial Sequence)
<220>

<221> CHAIN

<222> (1)..(110)

<223> 人源化小鼠抗体部分序列

<400> 6

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

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

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

Tyr Ala Thr Ser Ser Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ser
65 70 75 80

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

[0005] Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val
100 105 110

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工抗体(Artificial Sequence)

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)..(9)

<223> 人源化小鼠抗体部分序列

<400> 7

Gly Phe Ser Leu Thr Thr Phe Gly Met
1 5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工抗体(Artificial Sequence)

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)..(5)

<223> 人源化小鼠抗体部分序列

<400> 8

Trp Trp Asn Asp Asp

1 5

<210> 9

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工抗体(Artificial Sequence)

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)..(15)

<223> 人源化小鼠抗体部分序列

<400> 9

Thr Ile Tyr Tyr Gly Asn Tyr Leu Thr Phe Tyr Ala Met Glu His

[0006] 1 5 10 15

<210> 10

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工抗体(Artificial Sequence)

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)..(16)

<223> 人源化小鼠抗体部分序列

<400> 10

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

1 5 10 15

<210> 11

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工抗体(Artificial Sequence)

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)..(7)

<223> 人源化小鼠抗体部分序列

<400> 11

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 12

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工抗体(Artificial Sequence)

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)..(9)

<223> 人源化小鼠抗体部分序列

<400> 12

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr

[0007] 1 5

<210> 13

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工抗体(Artificial Sequence)

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)..(9)

<223> 人源化小鼠抗体部分序列

<400> 13

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Phe Gly Met

1 5

<210> 14

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工抗体(Artificial Sequence)

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)..(5)

<223> 人源化小鼠抗体部分序列

<400> 14

Trp Trp Asp Asp Asp

1 5

<210> 15

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工抗体(Artificial Sequence)

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)..(15)

<223> 人源化小鼠抗体部分序列

<400> 15

Val Ile Tyr Tyr Gly Ser Arg Ser Ala Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr

[0008] 1 5 10 15

<210> 16

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工抗体(Artificial Sequence)

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)..(16)

<223> 人源化小鼠抗体部分序列

<400> 16

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

1 5 10 15

<210> 17

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工抗体(Artificial Sequence)

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)..(7)

<223> 人源化小鼠抗体部分序列

<400> 17

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工抗体(Artificial Sequence)

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)..(9)

<223> 人源化小鼠抗体部分序列

<400> 18

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Val Thr

[0009] 1 5

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工抗体(Artificial Sequence)

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)..(7)

<223> 人源化小鼠抗体部分序列

<400> 19

Gly Phe Thr Phe Arg Asn Tyr

1 5

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工抗体(Artificial Sequence)

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)..(6)

<223> 人源化小鼠抗体部分序列

<400> 20

Ser Glu Ser Gly Asn Tyr

1 5

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工抗体(Artificial Sequence)

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)..(10)

<223> 人源化小鼠抗体部分序列

<400> 21

Asp Asp Trp Glu Gly Arg Ala Met Asp Tyr

[0010] 1 5 10

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工抗体(Artificial Sequence)

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)..(11)

<223> 人源化小鼠抗体部分序列

<400> 22

Arg Ala Ser Arg Asp Ile Gly Ser Ser Leu Asn

1 5 10

<210> 23

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工抗体(Artificial Sequence)

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)..(7)

<223> 人源化小鼠抗体部分序列

<400> 23

Ala Thr Ser Ser Leu Asp Ser

1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工抗体(Artificial Sequence)

<220>

<221> CHAIN

<222> (1)..(9)

<223> 人源化小鼠抗体部分序列

<400> 24

Leu Gln Tyr Ala Ser Ser Pro Trp Thr

1 5

[0011]

<210> 25

<211> 125

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 25

Gln Val Ile Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln

1 5 10 15

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Phe Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Phe

20 25 30

Gly Met Gly Ile Gly Trp Ile Arg His Pro Ser Gly Lys Ala Leu Glu

35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asn Asp Asp Lys Ser Tyr Asn Ser Ala

50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val

65 70 75 80

Phe Leu Arg Leu Ala Asn Val Ala Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr

85 90 95

Cys Ala Arg Thr Ile Tyr Tyr Gly Asn Tyr Leu Thr Phe Tyr Ala Met
100 105 110
Glu His Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120 125
<210> 26
<211> 112
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 26
Asp Val Leu Leu Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Leu Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Leu Leu Ile Phe Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

[0012]

Asp Lys Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Arg Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95
Ser His Val Pro Pro Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110
<210> 27
<211> 125
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 27
Gln Val Thr Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Ile Leu Gln Pro Ser Gln
1 5 10 15
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Phe
20 25 30
Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Ser Gly Lys Gly Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala His Ile Trp Trp Asp Asp Asp Lys Trp Tyr Glu Leu Ala
50 55 60
Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80
Phe Leu Lys Ile Ala Asn Val Asp Thr Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Phe
85 90 95
Cys Ala Arg Val Ile Tyr Tyr Gly Ser Arg Ser Ala Tyr Tyr Ser Met
100 105 110
Asp Tyr Trp Gly Pro Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120 125
<210> 28
<211> 112
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 28
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

[0013]

Ala Gln Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30
Asn Gly His Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Lys Ile Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95
Ser His Val Pro Val Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110
<210> 29
<211> 119
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 29

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

[0014]

<210> 30
<211> 107
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 30
Val Ile Gln Met Thr Gln Ser Ser Ser Phe Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Gly Arg Val Ser Ile Thr Cys Arg Ala Ser Asp His Ile Tyr Asn Trp
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Asn Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45
Ser Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Gly Gly Ser Gly Lys Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ile Ser Leu Gln Thr
65 70 75 80
Glu Asp Ile Ala Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Asn Thr Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105

<210> 31

<211> 122

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 31

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

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

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

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

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

[0015]

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

Thr Arg Thr Arg Asp Ser Gly Ser Ser Pro His Tyr Phe Asp Tyr Trp
100 105 110

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

<210> 32

<211> 111

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 32

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

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

Gly Ile Ser Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Asn Arg Gly Ser Gly Val Pro Ala

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Ser Leu Asn Ile His

65 70 75 80

Pro Met Glu Glu Asp Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Lys

85 90 95

Glu Gly Pro Phe Thr Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu Glu Leu Arg

100 105 110

<210> 33

<211> 123

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 33

Glu Val Leu Leu Met Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

20 25 30

[0016]

Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ala Thr Ile Ser Ser Ser Gly Arg Tyr Thr Phe Tyr Pro Asp Asn Val

50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Val Ser Asn Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ser Arg Thr Gly Val Thr Thr Val Val Phe Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr

100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 34

<211> 107

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 34

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

1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Ser

20 25 30

Leu Asn Trp Leu Gln Gln Gly Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile

35 40 45

Tyr Ala Thr Ser Ser Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly

50 55 60

Ser Arg Ser Gly Ser Thr Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser

65 70 75 80

Glu Asp Phe Val Ala Tyr Tyr Cys Leu Gln Tyr Leu Ser Ser Pro Pro

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 35

<211> 116

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

[0017]

<400> 35

Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln

1 5 10 15

Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr His

20 25 30

Ala Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Asp Trp Leu

35 40 45

Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Ile

50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe

65 70 75 80

Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val

85 90 95

Arg Leu Leu Leu Pro Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val

100 105 110

Thr Val Ser Ser

115

<210> 36

<211> 108

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 36

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

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Thr Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Thr
20 25 30

Tyr Leu His Trp Tyr Arg Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
35 40 45

Ile Tyr Ser Thr Ser Thr Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Arg
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu
65 70 75 80

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

[0018]

Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 37

<211> 119

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 37

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

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

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

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

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

Leu Gln Met Ser Leu Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Val Arg Asp Asp Trp Glu Gly Arg Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110
Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 38
<211> 107
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 38
Gly Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Val Ser Leu Thr Cys Arg Ala Ser Arg Asp Ile Gly Ser Ser
20 25 30
Leu Asn Trp Leu Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Arg Leu Ile
35 40 45
[0019]
Tyr Ala Thr Ser Ser Leu Asp Ser Gly Val Pro Lys Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Arg Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65 70 75 80
Glu Asp Phe Val Asp Tyr Phe Cys Leu Gln Tyr Ala Ser Ser Pro Trp
85 90 95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105
<210> 39
<211> 119
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)
<400> 39
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Phe Leu His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Tyr Met Asn Pro Ser Ser Gly Tyr Thr Lys Cys Asn Gln Lys Phe
50 55 60
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Gln Val Ser Ser Leu Thr Tyr Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Asp Arg Ile Gly Tyr Trp Asp Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly
100 105 110
Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115
<210> 40
<211> 106
<212> PRT
<213> 小家鼠(Mus musculus)

[0020]

<400> 40
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Thr Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala
20 25 30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Thr Asn Met Gln Ser
65 70 75 80
Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Leu Thr
85 90 95
Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Asp Leu Lys
100 105
<210> 41
<211> 9
<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 41

Gly Phe Ser Leu Thr Thr Phe Gly Met

1 5

<210> 42

<211> 5

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 42

Trp Trp Asn Asp Asp

1 5

<210> 43

<211> 15

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 43

[0021]

Thr Ile Tyr Tyr Gly Asn Tyr Leu Thr Phe Tyr Ala Met Glu His

1 5 10 15

<210> 44

<211> 16

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 44

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

1 5 10 15

<210> 45

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 45

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 46

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 46

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Pro Thr

1 5

<210> 47

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 47

Gly Phe Ser Leu Ser Thr Phe Gly Met

1 5

<210> 48

<211> 5

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

[0022]

<400> 48

Trp Trp Asp Asp Asp

1 5

<210> 49

<211> 15

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 49

Val Ile Tyr Tyr Gly Ser Arg Ser Ala Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 50

<211> 16

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 50

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

1 5 10 15

<210> 51

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 51

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 52

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 52

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Val Thr

1 5

<210> 53

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

[0023]

<400> 53

Gly Asp Thr Phe Thr Thr Tyr Asp Ile Thr

1 5 10

<210> 54

<211> 6

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 54

Tyr Pro Lys Asp Gly Arg

1 5

<210> 55

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 55

Arg Gly Gln Phe Gly Pro Tyr Phe Asp His

1 5 10

<210> 56

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 56

Arg Ala Ser Asp His Ile Tyr Asn Trp Leu Ala

1 5 10

<210> 57

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 57

Gly Ala Thr Ser Leu Glu Thr

1 5

<210> 58

<211> 10

<212> PRT

[0024]

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 58

Arg Gly Gln Phe Gly Pro Tyr Phe Asp His

1 5 10

<210> 59

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 59

Gly Phe Ser Phe Ser Thr Phe

1 5

<210> 60

<211> 6

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 60

Ser Ser Gly Ser Tyr Ser

1 5

<210> 61

<211> 15

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 61

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

1 5 10 15

<210> 62

<211> 15

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 62

Arg Ala Ser Lys Ser Val Asp Ser Tyr Gly Ile Ser Phe Met Asn

1 5 10 15

<210> 63

<211> 7

[0025]

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 63

Gly Ala Ser Asn Arg Gly Ser

1 5

<210> 64

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 64

Gln Gln Ser Lys Glu Gly Pro Phe Thr

1 5

<210> 65

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 65

Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

1 5

<210> 66

<211> 6

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 66

Ser Ser Ser Gly Arg Tyr

1 5

<210> 67

<211> 14

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 67

Thr Gly Val Thr Thr Val Val Phe Thr Asp Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

[0026]

<210> 68

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 68

Ser Gln Asp Ile Gly Asn Ser

1 5

<210> 69

<211> 5

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 69

Ser Ser Leu Asp Ser

1 5

<210> 70

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 70

Leu Gln Tyr Leu Ser Ser Pro Pro Thr Phe

1 5 10

<210> 71

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 71

Gly Phe Ser Leu Thr Thr His

1 5

<210> 72

<211> 5

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 72

Trp Ser Gly Gly Asn

1 5

[0027]

<210> 73

<211> 8

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 73

Leu Leu Leu Pro Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 74

<211> 12

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 74

Thr Ala Thr Ser Ser Val Ser Ser Thr Tyr Leu His

1 5 10

<210> 75

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 75

Ser Thr Ser Thr Leu Ala Ser

1 5

<210> 76

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 76

His Gln Tyr Arg Arg Ser Pro Tyr Thr

1 5

<210> 77

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 77

[0028] Gly Phe Thr Phe Arg Asn Tyr

1 5

<210> 78

<211> 6

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 78

Ser Glu Ser Gly Asn Tyr

1 5

<210> 79

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 79

Asp Asp Trp Glu Gly Arg Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 80

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 80

Arg Ala Ser Arg Asp Ile Gly Ser Ser Leu Asn

1 5 10

<210> 81

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 81

Ala Thr Ser Ser Leu Asp Ser

1 5

<210> 82

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

[0029]

<400> 82

Leu Gln Tyr Ala Ser Ser Pro Trp Thr

1 5

<210> 83

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 83

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

1 5

<210> 84

<211> 6

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 84

Asn Pro Ser Ser Gly Tyr

1 5

<210> 85

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 85

Asp Arg Ile Gly Tyr Trp Asp Phe Asp Val

1 5 10

<210> 86

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 86

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 87

<211> 7

<212> PRT

[0030] <213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 87

Ser Ala Ser Asn Arg Tyr Thr

1 5

<210> 88

<211> 8

<212> PRT

<213> 小家鼠(Mus musculus)

<400> 88

Gln Gln Tyr Ser Ser Tyr Leu Thr

1 5

<210> 89

<211> 130

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 89

Leu Cys Gln Gly Ser Asn Tyr Ser Thr Cys Ala Ser Cys Pro Ser Cys

1 5 10 15

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

[0031]

<210> 90
<211> 130
<212> PRT
<213> 食蟹猴(Macaca fascicularis)
<400> 90
Leu Cys Gln Gly Ser Lys Tyr Ser Thr Cys Ala Ser Cys Pro Ser Cys
1 5 10 15
Pro Asp His Trp Met Lys Tyr Gly Asn His Cys Tyr Tyr Phe Ser Val
20 25 30
Glu Lys Lys Asp Trp Ile Ser Ser Leu Glu Phe Cys Leu Ala Arg Asp
35 40 45
Ser His Leu Leu Met Ile Thr Asp Lys Gln Glu Met Ser Leu Leu Gln
50 55 60
Asp Phe Leu Ser Glu Ala Phe His Trp Val Gly Leu Arg Asn Asn Ser
65 70 75 80
Gly Trp Arg Trp Glu Asp Gly Ser Pro Leu Asn Phe Ser Arg Ile Tyr
85 90 95
Ser Asn Ser Leu Val Gln Thr Cys Gly Ala Ile Asn Lys Asn Ser Leu

100 105 110

Gln Ala Ser Ser Cys Glu Val Ser Leu Gln Trp Val Cys Lys Lys Val

115 120 125

Ser Pro

130

<210> 91

<211> 728

<212> PRT

<213> 智人(Homo sapiens)

<400> 91

Asp Trp Val Ile Pro Pro Ile Ser Cys Pro Glu Asn Glu Lys Gly Pro

1 5 10 15

Phe Pro Lys Asn Leu Val Gln Ile Lys Ser Asn Lys Asp Lys Glu Gly

20 25 30

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

35 40 45

[0032] Gly Val Phe Ile Ile Glu Arg Glu Thr Gly Trp Leu Lys Val Thr Glu

50 55 60

Pro Leu Asp Arg Glu Arg Ile Ala Thr Tyr Thr Leu Phe Ser His Ala

65 70 75 80

Val Ser Ser Asn Gly Asn Ala Val Glu Asp Pro Met Glu Ile Leu Ile

85 90 95

Thr Val Thr Asp Gln Asn Asp Asn Lys Pro Glu Phe Thr Gln Glu Val

100 105 110

Phe Lys Gly Ser Val Met Glu Gly Ala Leu Pro Gly Thr Ser Val Met

115 120 125

Glu Val Thr Ala Thr Asp Ala Asp Asp Asp Val Asn Thr Tyr Asn Ala

130 135 140

Ala Ile Ala Tyr Thr Ile Leu Ser Gln Asp Pro Glu Leu Pro Asp Lys

145 150 155 160

Asn Met Phe Thr Ile Asn Arg Asn Thr Gly Val Ile Ser Val Val Thr

165 170 175

Thr Gly Leu Asp Arg Glu Ser Phe Pro Thr Tyr Thr Leu Val Val Gln

180 185 190

Ala Ala Asp Leu Gln Gly Glu Gly Leu Ser Thr Thr Ala Thr Ala Val
195 200 205

Ile Thr Val Thr Asp Thr Asn Asp Asn Pro Pro Ile Phe Asn Pro Thr
210 215 220

Thr Tyr Lys Gly Gln Val Pro Glu Asn Glu Ala Asn Val Val Ile Thr
225 230 235 240

Thr Leu Lys Val Thr Asp Ala Asp Ala Pro Asn Thr Pro Ala Trp Glu
245 250 255

Ala Val Tyr Thr Ile Leu Asn Asp Asp Gly Gly Gln Phe Val Val Thr
260 265 270

Thr Asn Pro Val Asn Asn Asp Gly Ile Leu Lys Thr Ala Lys Gly Leu
275 280 285

Asp Phe Glu Ala Lys Gln Gln Tyr Ile Leu His Val Ala Val Thr Asn
290 295 300

Val Val Pro Phe Glu Val Ser Leu Thr Thr Ser Thr Ala Thr Val Thr
305 310 315 320

[0033]

Val Asp Val Leu Asp Val Asn Glu Ala Pro Ile Phe Val Pro Pro Glu
325 330 335

Lys Arg Val Glu Val Ser Glu Asp Phe Gly Val Gly Gln Glu Ile Thr
340 345 350

Ser Tyr Thr Ala Gln Glu Pro Asp Thr Phe Met Glu Gln Lys Ile Thr
355 360 365

Tyr Arg Ile Trp Arg Asp Thr Ala Asn Trp Leu Glu Ile Asn Pro Asp
370 375 380

Thr Gly Ala Ile Ser Thr Arg Ala Glu Leu Asp Arg Glu Asp Phe Glu
385 390 395 400

His Val Lys Asn Ser Thr Tyr Thr Ala Leu Ile Ile Ala Thr Asp Asn
405 410 415

Gly Ser Pro Val Ala Thr Gly Thr Gly Thr Leu Leu Leu Ile Leu Ser
420 425 430

Asp Val Asn Asp Asn Ala Pro Ile Pro Glu Pro Arg Thr Ile Phe Phe
435 440 445

Cys Glu Arg Asn Pro Lys Pro Gln Val Ile Asn Ile Ile Asp Ala Asp
450 455 460

Leu Pro Pro Asn Thr Ser Pro Phe Thr Ala Glu Leu Thr His Gly Ala
465 470 475 480

Ser Ala Asn Trp Thr Ile Gln Tyr Asn Asp Pro Thr Gln Glu Ser Ile
485 490 495

Ile Leu Lys Pro Lys Met Ala Leu Glu Val Gly Asp Tyr Lys Ile Asn
500 505 510

Leu Lys Leu Met Asp Asn Gln Asn Lys Asp Gln Val Thr Thr Leu Glu
515 520 525

Val Ser Val Cys Asp Cys Glu Gly Ala Ala Gly Val Cys Arg Lys Ala
530 535 540

Gln Pro Val Glu Ala Gly Leu Gln Ile Pro Ala Ile Leu Gly Ile Leu
545 550 555 560

Gly Gly Ile Leu Ala Leu Leu Ile Leu Ile Leu Leu Leu Leu Leu Phe
565 570 575

Leu Arg Arg Arg Ala Val Val Lys Glu Pro Leu Leu Pro Pro Glu Asp
580 585 590

[0034] Asp Thr Arg Asp Asn Val Tyr Tyr Tyr Asp Glu Glu Gly Gly Gly Glu
595 600 605

Glu Asp Gln Asp Phe Asp Leu Ser Gln Leu His Arg Gly Leu Asp Ala
610 615 620

Arg Pro Glu Val Thr Arg Asn Asp Val Ala Pro Thr Leu Met Ser Val
625 630 635 640

Pro Arg Tyr Leu Pro Arg Pro Ala Asn Pro Asp Glu Ile Gly Asn Phe
645 650 655

Ile Asp Glu Asn Leu Lys Ala Ala Asp Thr Asp Pro Thr Ala Pro Pro
660 665 670

Tyr Asp Ser Leu Leu Val Phe Asp Tyr Glu Gly Ser Gly Ser Glu Ala
675 680 685

Ala Ser Leu Ser Ser Leu Asn Ser Ser Glu Ser Asp Lys Asp Gln Asp
690 695 700

Tyr Asp Tyr Leu Asn Glu Trp Gly Asn Arg Phe Lys Lys Leu Ala Asp
705 710 715 720

Met Tyr Gly Gly Gly Glu Asp Asp
725

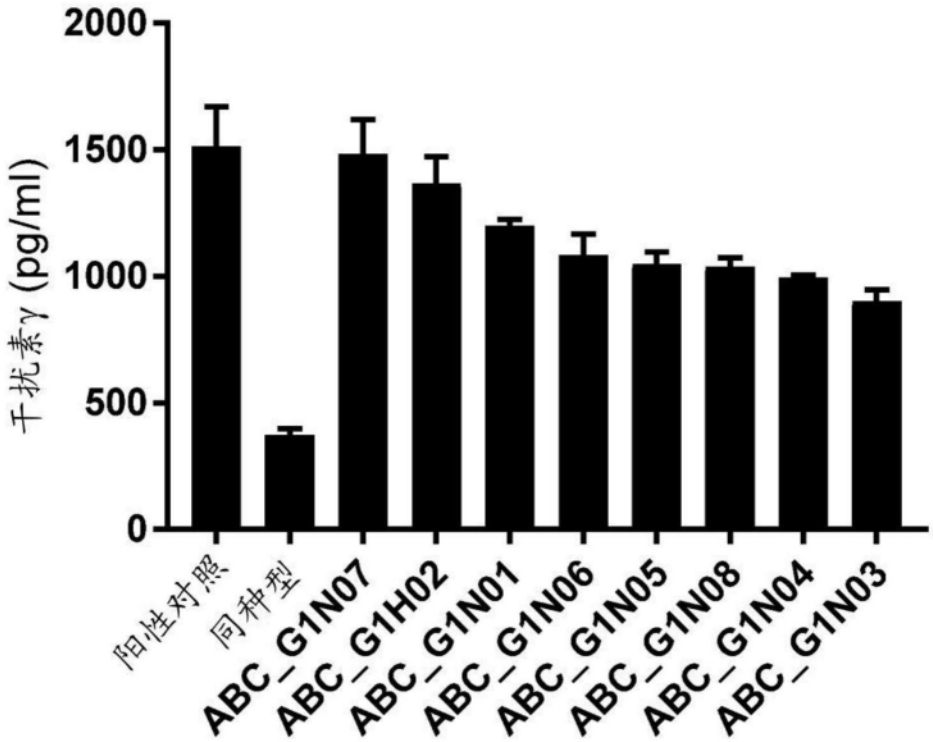

2000
1500
1000
500
0
干扰素γ (pg/ml)
阳性对照
同种型
ABC_G1N07
ABC_G1H02
ABC_G1N01
ABC_G1N06
ABC_G1N05
ABC_G1N08
ABC_G1N04
ABC_G1N03

图1

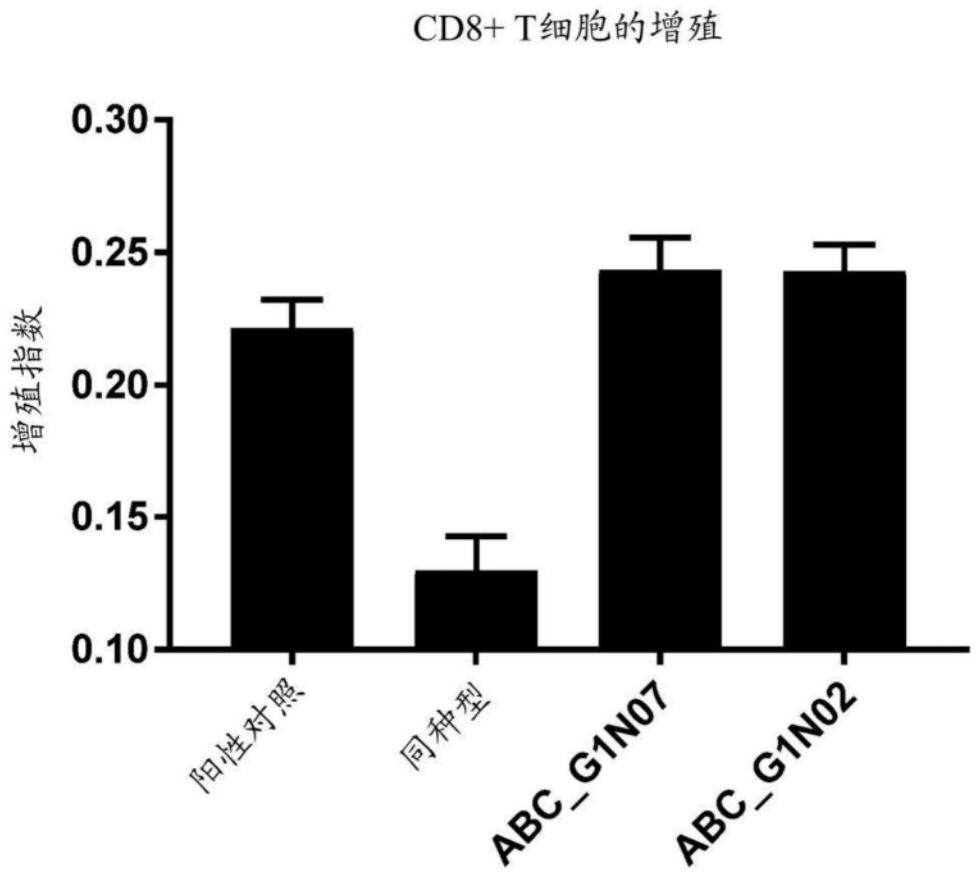

CD8+ T细胞的增殖
增殖指数
0.30
0.25
0.20
0.15
0.10
阳性对照
同种型
ABC_G1N07
ABC_G1N02

图2

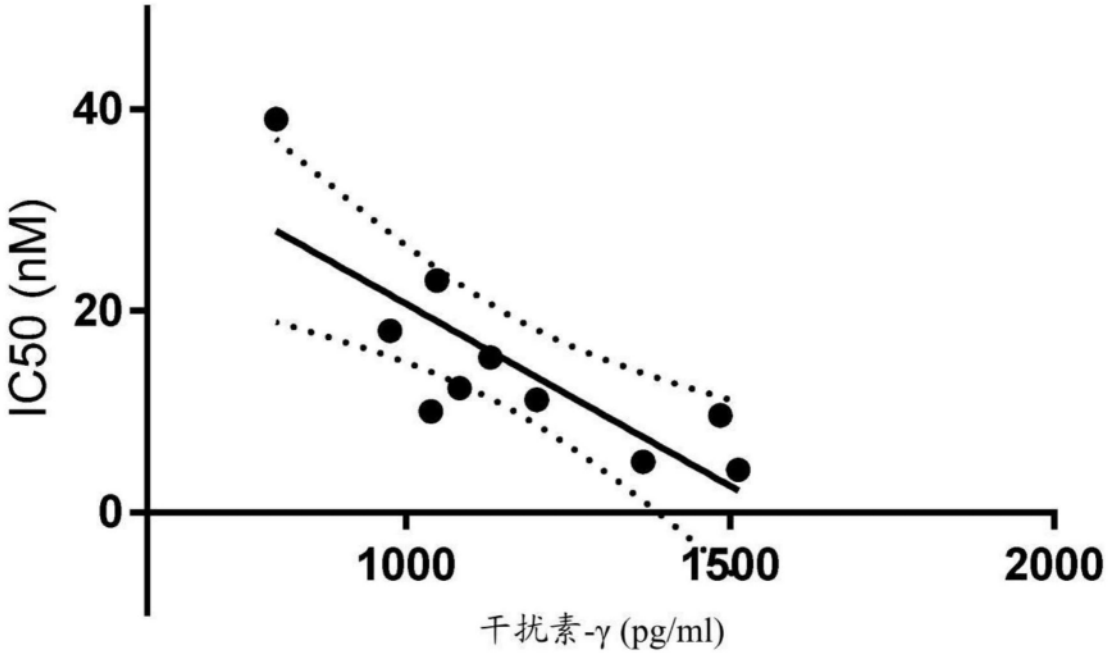

IC50 (nM)
40
20
0
1000
1500
2000
干扰素-γ (pg/ml)

图3