



(21) 申请号 201780027236.6

(22) 申请日 2017.02.28

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109071666 A

(43) 申请公布日 2018.12.21

(30) 优先权数据
62/301,727 2016.03.01 US
62/364,924 2016.07.21 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.11.01

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/IL2017/050256 2017.02.28

(87) PCT国际申请的公布数据
W02017/149538 EN 2017.09.08

(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 里耶卡大学医学院

(72) 发明人 奥夫尔·曼德尔波姆
诺亚·S·凯南
皮恩卡斯·茨克尔曼
斯蒂潘·琼吉奇

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理
有限公司 11262
专利代理师 李敏春 郑霞

(51) Int.Cl.
C07K 16/28 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

(56) 对比文件
WO 2015009856 A2,2015.01.22
WO 2004074324 A2,2004.09.02
US 6518033 B1,2003.02.11
WO 2007072866 A1,2007.06.28
Inozume T 等.Development of a novel
immunotherapy for melanoma which inhibits
interaction between CD155 on melanoma
cells and TIGHT on activated CTL.《Nature
Publishing Group》.2013,第133卷(第suppl1
期),

张清等.TIGHT阻断性单克隆抗体的抗肿瘤
免疫治疗与效应机制探究.《第十四届全国肿瘤
生物治疗大会论文集》.2015,

N.Stanietsky等.The interaction of
TIGHT with PVR and PVRL2 inhibits human
NK cell cytotoxicity..《Proceedings of the
national academy of sciences》.2009,第106
卷(第42期),

邓虎平.人可溶型CD155分子产生机制的研
究.《中国优秀硕士学位论文全文数据库 医药卫
生科技辑》.2008,

审查员 黎舒婷

权利要求书2页 说明书32页
序列表26页 附图30页

(54) 发明名称

人脊髓灰质炎病毒受体(PVR)特异性抗体

(57) 摘要

本发明提供了识别脊髓灰质炎病毒受体
(PVR)并抑制其与具有Ig和ITIM结构域(TIGIT)
的T细胞免疫受体结合的单克隆抗体。本发明进
一步提供了包含所述抗体的药物组合物及其在
癌症免疫疗法、治疗感染和诊断中的使用方法。

1. 一种与人脊髓灰质炎病毒受体 (PVR) 结合的分离的单克隆抗体, 或其至少包含抗原结合部分的抗体片段, 所述抗体或其抗体片段包含六个CDR的组, 其中: HC CDR1为SNYWIE (SEQ ID NO:84); HC CDR2为EIFPGSGRINFNEKFKEG (SEQ ID NO:38); HC CDR3为TKIYGNSFDY (SEQ ID NO:40); LC CDR1为KASQDVGTAV (SEQ ID NO:85); LC CDR2选自: WASSRHN (SEQ ID NO:46)、WASSRHA (SEQ ID NO:56)、WASSRHR (SEQ ID NO:57)、WASSRHD (SEQ ID NO:58)、WASSRHE (SEQ ID NO:59)、WASSRHP (SEQ ID NO:60) 和WASSRHT (SEQ ID NO:61); 并且LC CDR3为QQYSRYPLT (SEQ ID NO:48);

其中所述分离的单克隆抗体能够抑制PVR与具有Ig和ITIM结构域 (TIGIT) 的T细胞免疫受体结合。

2. 根据权利要求1所述的分离的单克隆抗体或抗体片段, 其中LC CDR2由序列WASSRHE (SEQ ID NO:59) 组成。

3. 一种与人脊髓灰质炎病毒受体 (PVR) 结合的分离的单克隆抗体, 或其至少包含抗原结合部分的抗体片段, 所述抗体或其抗体片段包含: 重链 (HC) 可变区SEQ ID NO:77和轻链 (LC) 可变区SEQ ID NO:79。

4. 根据权利要求1所述的分离的单克隆抗体或其抗原片段, 所述抗体或其抗原片段包含重链 (HC) 可变区SEQ ID NO:77和选自由以下组成的组的轻链 (LC) 可变区: SEQ ID NO:79、SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53和SEQ ID NO:54。

5. 一种多核苷酸序列, 其编码根据权利要求1至3中任一项所述的分离的单克隆抗体或抗体片段。

6. 一种质粒, 其包含根据权利要求5所述的多核苷酸序列。

7. 一种宿主细胞, 其包含根据权利要求5所述的多核苷酸序列或根据权利要求6所述的质粒。

8. 一种杂交瘤细胞, 其能够产生根据权利要求1至4中任一项所述的单克隆抗体。

9. 根据权利要求1至3中任一项所述的单克隆抗体, 其附接至细胞毒性部分或可识别的部分。

10. 根据权利要求1至3中任一项所述的单克隆抗体, 其附接至放射性部分。

11. 一种药物组合物, 其包含作为活性成分的根据权利要求1至3中任一项所述的分离的抗体或其片段, 以及药学上可接受的赋形剂、稀释剂、盐或载体。

12. 根据权利要求11所述的药物组合物在制备用于通过抑制PVR与TIGIT的结合来调节所述免疫系统的药物中的应用。

13. 根据权利要求11所述的药物组合物在制备用于治疗有需要的受试者的癌症的药物中的应用, 其中所述癌症选自由以下组成的组: 黑素瘤、乳腺癌、结肠直肠癌、肾癌、肺癌、前列腺癌、脑肿瘤和肝细胞癌。

14. 根据权利要求13所述的应用, 其中所述药物进一步包括激酶抑制剂或任何其他抗癌剂。

15. 根据权利要求13所述的应用, 其中所述药物进一步包括另外的免疫调节剂或化疗剂。

16. 根据权利要求13所述的应用, 其中所述药物进一步包括经激活的淋巴细胞。

17. 根据权利要求15所述的应用, 其中所述另外的免疫调节剂为针对免疫检查点分子的抗体, 所述免疫检查点分子选自PD-1、CTLA-4、PDL-1、CEACAM1、NKG2A、B7-H3、B7-H4、VISTA、CD112R、淋巴细胞激活基因3 (LAG3)、CD137、OX40、杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (KIR)、TIGIT及其任何组合。

人脊髓灰质炎病毒受体 (PVR) 特异性抗体

发明领域

[0001] 本发明属于免疫疗法领域,并且涉及与脊髓灰质炎病毒受体蛋白结合的抗体及其片段、编码这些抗体的多核苷酸序列和产生这些抗体的杂交瘤细胞。本发明进一步涉及包含这些抗体的治疗组合物和诊断组合物,以及使用这些单克隆抗体来治疗和诊断疾病,特别是癌症的方法。

背景技术

[0002] 利用癌症免疫疗法来产生和增强抗肿瘤免疫应答,例如,通过对肿瘤细胞上的抗原具有特异性的抗体进行治疗、通过抗原呈递细胞与肿瘤细胞的融合进行治疗、或通过抗肿瘤T细胞的特异性激活进行治疗来产生和增强。在患者中募集针对肿瘤细胞的免疫细胞(例如,T细胞)的能力提供了抗击目前被认为无法治愈的癌症类型和转移的治疗模式。

[0003] T细胞介导的免疫应答病况包括由控制免疫应答大小的共刺激和共抑制信号之间的平衡所调节的多个连续步骤。抑制信号,也称为免疫检查点,对于维持自身耐受性以及限制免疫介导的附带组织损伤至关重要。当感染或免疫激发被清除、发生恶化或持续时,这些信号会发生变化,并且这些变化影响T细胞的应答并重新塑造免疫应答。

[0004] 免疫检查点蛋白的表达可被肿瘤所调节。例如,癌细胞表面上的程序性死亡-1配体(PD-L1)的上调允许它们通过与PD-1结合来抑制否则可能攻击这些肿瘤细胞的T细胞,从而逃避宿主免疫系统。因此,免疫检查点代表激活针对癌症的功能性细胞免疫的重要障碍。因此,对免疫细胞上的抑制性配体具有特异性的拮抗性抗体被认为是可行的抗癌剂,并且它们正在临床中进行评估(例如,纳武单抗和派姆单抗)。免疫检查点分子的另一实例是具有Ig和ITIM结构域的T细胞免疫受体(TIGIT)。TIGIT是在各种免疫细胞包括T细胞和自然杀伤细胞(NK细胞)上表达的共抑制分子。TIGIT以高亲和力与脊髓灰质炎病毒受体(PVR)结合。

[0005] 脊髓灰质炎病毒受体(PVR),也称为CD155,是参与介导与细胞外基质分子的细胞黏附的跨膜糖蛋白。由于脊髓灰质炎病毒受体的表达在神经外胚层癌中上调,因此它在先前被描述为肿瘤抗原,以及治疗干预的潜在靶标,该神经外胚层癌包括多形性成胶质细胞瘤、成神经管细胞瘤和结肠直肠癌(Solecki等人,J.Biol.Chem.2002,277:25697-700)以及胰腺癌(Nishiwada等人,Anticancer Res.2015,35(4):2287-97)。还已知PVR增强血清诱导的Ras-Raf-MEK-ERK信号传导的激活、细胞周期蛋白D2和E的上调以及p27Kip1的下调,最终缩短细胞周期的G0/G1期的时间(Kakunaga 2004,J.Biological Chemistry,279,36419-36425),因此阻断肿瘤细胞上的PVR预期会降低肿瘤细胞的活力。PVR在血管发生中也具有关键作用,并表明其通过控制VEGFR2与整合蛋白 $\alpha(v)\beta(3)$ 的相互作用来调节VEGF诱导的血管发生,并调节VEGFR2介导的Rap1-Akt信号传导途径(Kinugasa等人,2012,Circ Res.2012,110(5),716-26)。此外,PVR与IGF1R复合并且参与Met信号传导并且阻断降低细胞活力和血管发生的复合物形成(Lee等人,Scientific Reports 2014,20,4,7139)。

[0006] 通过将癌细胞注射到小鼠尾部并测量向肺的转移来证明PVR参与转移。在癌细胞

中上调的PVR已经显示出与血小板中的其反受体进行反式相互作用,并且这种反式相互作用增强了癌细胞向肺的转移(Morimoto等人,Oncogene (2008) 27,264-273)。

[0007] 美国专利申请号20070041985公开了与PVR或其任何衍生物的至少一个细胞内结构域或细胞外结构域特异性结合的分子,其中该分子具有调节表达PVR或其任何衍生物的细胞的受体介导的黏附、运输和/或侵入行为。

[0008] 美国专利申请号20090215175提供了调节细胞的黏附、运输、侵入和/或转移潜力所必需的PVR功能的分子(例如,小化学化合物、寡核苷酸、多肽、抗体和抗体片段)。该分子可用于治疗具有转移潜力、转移和癌症的细胞。

[0009] PCT申请公开号W0 2006/124667公开了通过阻断TIGIT与其配体PVR结合的单克隆抗体对蛋白zB7R1 (TIGIT)的调节。

[0010] 在提供单独或与其他药剂组合的另外的和更有效的、特异性的、安全的和/或稳定的药剂,以及通过抑制PVR与TIGIT的结合来增强免疫系统的细胞以攻击肿瘤或病毒感染的细胞方面存在未满足的需求。

发明内容

[0011] 本发明提供了识别脊髓灰质炎病毒受体(PVR)、防止所述脊髓灰质炎病毒受体与具有Ig和ITIM结构域(TIGIT)的T细胞免疫受体结合、以及抑制对淋巴细胞如自然杀伤(NK)细胞和T细胞的抑制活性的抗体及其片段。本文公开的抗PVR抗体能够与癌细胞上存在的PVR结合。这些抗体及其片段的特征在于具有独特的互补决定区(CDR)序列组、对PVR的高亲和力和高特异性,并且作为独立疗法和与其他抗癌剂组合在癌症免疫疗法中用于防止肿瘤免疫逃避。所述抗体还可用于治疗病毒感染。

[0012] 现在公开了本文公开的高亲和力抗PVR抗体阻断TIGIT-PVR相互作用并恢复T细胞和NK细胞活性。所述抗体对人PVR显示出高特异性。这些性质使得本发明的单克隆抗体(mAb)成为用于癌症免疫疗法的有价值的候选物,能够以副作用较少的较低剂量施用。

[0013] 有利地,根据本发明的抗PVR mAb在PD-L1体外模型(A549)中可比抗PD-1和CTLA-4mAb更好地诱导T细胞增殖。示出了外周单核血细胞(PMBC)和纯化的CD4 T细胞和CD8 T细胞的诱导作用。另外,PVR mAb能够在测试的大多数靶细胞中诱导NK细胞激活。此外,本文所述的一些抗PVR抗体在体外与治疗中目前使用的已知药剂**Erbitux®**具有相当的抗癌活性。而且,当与另外的抗癌剂诸如抗PD-1和CTLA-1抗体以及表皮生长因子受体(EGFR)组合时,本文所述的一些抗PVR抗体显示出协同作用。另外,发现一些抗PVR抗体诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)。进一步公开了根据本发明的一些抗PVR抗体对DNAM1的共刺激信号传导没有阻断作用,因此它们对其他免疫诱导信号没有有害作用。

[0014] 有趣的是,尽管人和啮齿动物PVR序列之间具有高序列相似性,但本发明的抗体对人PVR具有高度特异性。

[0015] 进一步公开了,出乎意料的是,一些包含人恒定链的嵌合单克隆抗体与其等效的鼠单克隆抗体相比显示出对免疫细胞激活的增强作用。

[0016] 本文所述的一些抗PVR mAb能够通过阻断肿瘤细胞上的PVR以独立于免疫的方式降低肿瘤细胞活力。不希望受任何作用机制约束,这种活性表明由PVR缩短细胞周期的G0/G1期的时间的能力引起。

[0017] 根据一个方面,本发明提供了与脊髓灰质炎病毒受体 (PVR) 结合的分离的单克隆抗体或其抗体片段,所述抗体片段至少包含抗原结合部分,其中所述分离的抗体或抗体片段选自:

[0018] i. 包含SEQ ID NO:77的重链(HC)可变区的三个CDR和包含SEQ ID NO:79的轻链可变区的三个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;

[0019] ii. 包含SEQ ID NO:69的重链可变区的三个互补决定区(CDR)和包含SEQ ID NO:71的轻链可变区的三个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;以及

[0020] iii. 包含SEQ ID NO:73的重链可变区的三个CDR和包含SEQ ID NO:75的轻链可变区的三个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] 含有包含在与SEQ ID NO:2、10、18、26、34或42的重链和轻链同源物中的CDR序列的抗体也包括在本发明的范围内。根据一些实施方案,SEQ ID NO:2可与SEQ ID NO:69互换。根据一些实施方案,SEQ ID NO:10可与SEQ ID NO:71互换。根据一些实施方案,SEQ ID NO:18可与SEQ ID NO:73互换。根据一些实施方案,SEQ ID NO:26可与SEQ ID NO:75互换。根据一些实施方案,SEQ ID NO:34可与SEQ ID NO:77互换。根据一些实施方案,SEQ ID NO:42可与SEQ ID NO:79互换。

[0022] 存在多种本领域已知的方法用于确定给定抗体分子的CDR序列,但没有标准的明确方法。可根据本领域已知的任何方法确定抗体重链和轻链可变区的CDR序列,所述方法包括但不限于称为KABAT、Chothia和IMGT的方法。选定的CDR组可包括通过多于一种方法鉴别的序列,即例如,一些CDR序列可使用KABAT确定而一些CDR序列可使用IMGT确定。

[0023] 根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体或片段包含表示为抗PVR 4E5(或hPVR.07)的单克隆抗体的CDR序列,即SEQ ID NO:69中阐述的重链可变区中包含的三个CDR序列和SEQ ID NO:71阐述的轻链可变区中包含的三个CDR序列。

[0024] 根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体或抗体片段含有包含序列GFDFSRYW (SEQ ID NO:4)的重链CDR1。根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体或抗体片段含有包含序列EIHPDSSKINYTPSQ (SEQ ID NO:6)的重链CDR2。根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体或抗体片段含有包含序列PDGNYNALDYW (SEQ ID NO:8)的重链CDR3。

[0025] 根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体或抗体片段含有包含序列RYW的重链CDR1。根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体或抗体片段含有包含序列RYWMT (SEQ ID NO:80)的重链CDR1。根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体或抗体片段含有包含序列PDGNYNALDY (SEQ ID NO:82)的重链CDR3。

[0026] 根据某些实施方案,所述分离的单克隆抗体或抗体片段包含:(i) 包含序列GFDFSRYW (SEQ ID NO:4)的HC CDR1;(ii) 包含序列:EIHPDSSKINYTPSQ (SEQ ID NO:6)的HC CDR2;以及(iii) 包含序列:PDGNYNALDYW (SEQ ID NO:8)的HC CDR3。

[0027] 根据某些实施方案,所述分离的单克隆抗体或抗体片段包含:(i) 包含序列RYW的HC CDR1;(ii) 包含序列:EIHPDSSKINYTPSQ (SEQ ID NO:6)的HC CDR2;以及(iii) 包含序列:PDGNYNALDY (SEQ ID NO:82)的HC CDR3。

[0028] 根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体或抗体片段含有包含序列KASQDVGTAVT (SEQ ID NO:12)的轻链CDR1。根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体或抗

体片段含有包含序列WASTRHT (SEQ ID NO:14)的轻链CDR2。根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体或抗体片段含有包含序列QQYSRYPYT (SEQ ID NO:16)的轻链CDR3。根据某些实施方案,所述分离的单克隆抗体或抗体片段包含:(i)包含序列KASQDVGTA VT (SEQ ID NO:12)的LC CDR1;(ii)包含序列:WASTRHT (SEQ ID NO:14)的LC CDR2;以及(iii)包含序列:QQYSRYPYT (SEQ ID NO:16)的LC CDR3。

[0029] 根据一些具体实施方案,所述分离的单克隆抗体或片段含有包含序列:GFDFSRYW (SEQ ID NO:4)的重链CDR1序列、包含序列:EIHPDSSKINYTPSQ (SEQ ID NO:6)的重链CDR2、包含序列:PDGNYNALDYW (SEQ ID NO:8)的重链CDR3、包含序列:KASQDVGTA VT (SEQ ID NO:12)的轻链CDR1、包含序列:WASTRHT (SEQ ID NO:14)的轻链CDR2和包含序列:QQYSRYPYT (SEQ ID NO:16)的轻链CDR3,或其在高变区(HVR)序列中包含不超过5%的氨基酸置换、缺失和/或插入的类似物。

[0030] 根据一些具体实施方案,所述分离的单克隆抗体或片段包含六个CDR序列的组,其由以下序列组成:

[0031] i.重链CDR1,其具有选自SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:80的序列,

[0032] ii.重链CDR2,其具有选自SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:81的序列,

[0033] iii.重链CDR3,其具有选自SEQ ID NO:8和SEQ ID NO:82的序列,

[0034] iv.轻链CDR1,其具有SEQ ID NO:12中阐述的序列,

[0035] v.轻链CDR2,其具有SEQ ID NO:14中阐述的序列,以及

[0036] vi.轻链CDR3,其具有SEQ ID NO:16中阐述的序列。

[0037] 根据一些具体实施方案,所述分离的单克隆抗体或片段包含六个CDR序列的组,其由以下序列组成:SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:16。

[0038] 根据一些其他实施方案,所述分离的单克隆抗体或片段包含六个CDR序列的组,其由以下序列组成:SEQ ID NO:80、SEQ ID NO:81、SEQ ID NO:82、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:16。

[0039] 根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体或其片段包含SEQ ID NO:69中阐述的重链可变区,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。

[0040] 根据一些实施方案,所述SEQ ID NO:2的类似物为具有SEQ ID NO:69中阐述的序列的重链可变区。

[0041] 根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体或其片段包含SEQ ID NO:71中阐述的轻链可变区,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。

[0042] 根据一些实施方案,所述SEQ ID NO:10的类似物为具有SEQ ID NO:71中阐述的序列的轻链可变区。

[0043] 根据具体实施方案,所述分离的单克隆抗体或其片段包含具有SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:69中阐述的序列的重链可变区以及具有SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:71中阐述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] 本发明还包括能够以高亲和力与人PVR蛋白内的表位结合的抗体或抗体片段,所述表位与单克隆抗体(mAb)4E5结合。

[0045] 根据其他实施方案,所述分离的单克隆抗体包含表示为7D4(或hPVR.01)的单克隆

抗体的CDR序列,即SEQ ID NO:73中阐述的重链可变区中包含的三个CDR序列和SEQ ID NO:75阐述的轻链可变区中包含的三个CDR序列。

[0046] 根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体或抗体片段含有包含序列GYTFTEYTMH (SEQ ID NO:20)的重链CDR1。根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体或抗体片段含有包含序列GIDPNNGGTNYNQNFKG (SEQ ID NO:22)的重链CDR2。根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体或抗体片段含有包含序列VIPLEY (SEQ ID NO:24)的重链CDR3。根据某些实施方案,所述分离的单克隆抗体或抗体片段包含:(i)包含序列GYTFTEYTMH (SEQ ID NO:20)的HC CDR1;(ii)包含序列:GIDPNNGGTNYNQNFKG (SEQ ID NO:22)的HC CDR2;以及(iii)包含序列:VIPLEY (SEQ ID NO:24)的HC CDR3。

[0047] 根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体或抗体片段含有包含序列EYTMH (SEQ ID NO:83)的重链CDR1。

[0048] 根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体或抗体片段含有包含序列KASQNVYTNVA (SEQ ID NO:28)的轻链CDR1。根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体或抗体片段含有包含序列SASYRYR (SEQ ID NO:30)的轻链CDR2。根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体或抗体片段含有包含序列QQYNSYPLA (SEQ ID NO:32)的轻链CDR3。根据某些实施方案,所述分离的单克隆抗体或抗体片段包含:(i)包含序列KASQNVYTNVA (SEQ ID NO:28)的LC CDR1;(ii)包含序列:SASYRYR (SEQ ID NO:30)的LC CDR2;以及(iii)包含序列:QQYNSYPLA (SEQ ID NO:32)的LC CDR3。

[0049] 根据一些具体实施方案,所述分离的单克隆抗体含有包含序列:GYTFTEYTMH (SEQ ID NO:20)的重链CDR1、包含序列:GIDPNNGGTNYNQNFKG (SEQ ID NO:22)的重链CDR2、包含序列:VIPLEY (SEQ ID NO:24)的重链CDR3、包含序列:KASQNVYTNVA (SEQ ID NO:28)的轻链CDR1、包含序列:SASYRYR (SEQ ID NO:30)的轻链CDR2和包含序列:QQYNSYPLA (SEQ ID NO:32)的轻链CDR3,或其HVR序列中包含不超过5%的氨基酸置换、缺失和/或插入的类似物。

[0050] 根据一些具体实施方案,所述分离的单克隆抗体或片段包含六个CDR序列的组,其由以下序列组成:重链CDR1,其具有选自SEQ ID NO:20和SEQ ID NO:83的序列;重链CDR2,其具有SEQ ID NO:22中阐述的序列;重链CDR3,其具有SEQ ID NO:24中阐述的序列;轻链CDR1,其具有SEQ ID NO:28中阐述的序列;轻链CDR2,其具有SEQ ID NO:30中阐述的序列;以及轻链CDR3,其具有SEQ ID NO:32中阐述的序列。

[0051] 根据一些具体实施方案,所述分离的单克隆抗体或片段包含六个CDR序列的组,其由以下序列组成:SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:32。

[0052] 根据其他具体实施方案,所述分离的单克隆抗体或片段包含六个CDR序列的组,其由以下序列组成:SEQ ID NO:83、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30和SEQ ID NO:32。

[0053] 根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体或其片段包含SEQ ID NO:73中阐述的重链可变区,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。

[0054] 根据一些实施方案,所述SEQ ID NO:18的类似物为具有SEQ ID NO:73中阐述的序列的重链可变区。

[0055] 根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体或其片段包含SEQ ID NO:75中阐述的

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。

[0056] 根据一些实施方案,所述SEQ ID NO:26的类似物为具有SEQ ID NO:75中阐述的序列的轻链可变区。

[0057] 根据具体实施方案,所述分离的单克隆抗体或其片段包含具有SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:73中阐述的序列的重链可变区以及具有SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:75中阐述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。

[0058] 本发明还包括能够以高亲和力与人PVR蛋白内的表位结合的抗体或抗体片段,所述表位与mAb 7D4结合。

[0059] 根据其他实施方案,所述分离的单克隆抗体包含表示为5B9(或hPVR.09)的单克隆抗体的CDR序列,即SEQ ID NO:77中阐述的重链可变区中包含的三个CDR序列和SEQ ID NO:79阐述的轻链可变区中包含的三个CDR序列。

[0060] 根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体包含SEQ ID NO:34中阐述的重链可变区中包含的互补决定区(CDR)序列和轻链可变区序列中包含的三个CDR序列,所述轻链可变区序列选自SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53和SEQ ID NO:54组成的组。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0061] 根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体或抗体片段含有包含序列GYTFSNYWIE (SEQ ID NO:36)的重链CDR1。根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体或抗体片段含有包含序列EIFPGSGRINFNEKFKG (SEQ ID NO:38)的重链CDR2。根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体或抗体片段含有包含序列TKIYGNSFDY (SEQ ID NO:40)的重链CDR3。根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体或抗体片段含有包含序列SNYWIE (SEQ ID NO:84)的重链CDR1。

[0062] 根据某些实施方案,所述分离的单克隆抗体或抗体片段包含:(i)包含序列SNYWIE (SEQ ID NO:84)的HC CDR1;(ii)包含序列:EIFPGSGRINFNEKFKG (SEQ ID NO:38)的HC CDR2;以及(iii)包含序列:TKIYGNSFDY (SEQ ID NO:40)的HC CDR3。

[0063] 根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体或抗体片段含有包含序列KASQDVGTA VV (SEQ ID NO:44)的轻链CDR1。根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体或抗体片段含有包含序列WASSRHN (SEQ ID NO:46)的轻链CDR2。根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体或抗体片段含有包含序列QQYSRYPLT (SEQ ID NO:48)的轻链CDR3。

[0064] 根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体或抗体片段含有包含序列KASQDVGTA V (SEQ ID NO:85)的轻链CDR1。

[0065] 根据某些实施方案,所述分离的单克隆抗体或抗体片段包含:(i)包含序列KASQDVGTA V (SEQ ID NO:85)的LC CDR1;(ii)包含序列:WASSRHN (SEQ ID NO:46)的LC CDR2;以及(iii)包含序列:QQYSRYPLT (SEQ ID NO:48)的LC CDR3。

[0066] 根据另外的实施方案,LC CDR2包含SEQ ID NO:46、56、57、58、59、60或61中阐述的序列。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0067] 根据一些具体实施方案,所述分离的单克隆抗体或片段含有包含序列:GYTFSNYWIE (SEQ ID NO:36)的重链CDR1序列、包含序列:EIFPGSGRINFNEKFKG (SEQ ID NO:38)的重链CDR2、包含序列:TKIYGNSFDY (SEQ ID NO:40)的重链CDR3、包含序列:KASQDVGTA VV (SEQ ID NO:44)的轻链CDR1、包含序列:WASSRHN (SEQ ID NO:46)的轻链CDR2

和包含序列:QQYSRYPLT (SEQ ID NO:48) 的轻链CDR3,或其在HVR序列中包含不超过5%的氨基酸置换、缺失和/或插入的类似物。

[0068] 根据一些具体实施方案,所述分离的单克隆抗体或片段由以下序列组成:重链CDR1,其具有选自SEQ ID NO:36和SEQ ID NO:84的序列;重链CDR2,其具有SEQ ID NO:38中阐述的序列;重链CDR3,其具有SEQ ID NO:40中阐述的序列;轻链CDR1,其具有选自SEQ ID NO:44和SEQ ID NO:85的序列;轻链CDR2,其具有SEQ ID NO:46中阐述的序列;以及轻链CDR3,其具有SEQ ID NO:48中阐述的序列。

[0069] 根据一些具体实施方案,所述分离的单克隆抗体或片段由以下组成:重链CDR1,其具有SEQ ID NO:36或SEQ ID NO:84中阐述的序列;重链CDR2,其具有SEQ ID NO:38中阐述的序列;重链CDR3,其具有SEQ ID NO:40中阐述的序列;轻链CDR1,其具有SEQ ID NO:44或SEQ ID NO:85中阐述的序列;轻链CDR2,其具有选自SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:57、SEQ ID NO:58、SEQ ID NO:59、SEQ ID NO:60和SEQ ID NO:61的序列;以及轻链CDR3,其具有SEQ ID NO:48中阐述的序列。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0070] 根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体或其片段包含SEQ ID NO:77中阐述的重链可变区,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。

[0071] 根据一些实施方案,所述SEQ ID NO:34的类似物为具有SEQ ID NO:77中阐述的序列的重链可变区。

[0072] 根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体或其片段包含SEQ ID NO:79中阐述的轻链可变区,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。

[0073] 根据一些实施方案,所述SEQ ID NO:42的类似物为具有SEQ ID NO:79中阐述的序列的轻链可变区。

[0074] 根据具体实施方案,所述分离的单克隆抗体或其片段包含具有选自SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:77的序列的重链可变区以及具有选自SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:79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。

[0075] 根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体或其片段包含具有SEQ ID NO:34中阐述的序列的重链可变区以及具有SEQ ID NO:42、SEQ ID NO:49、SEQ ID NO:50、SEQ ID NO:51、SEQ ID NO:52、SEQ ID NO:53或SEQ ID NO:54中阐述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。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0076] 本发明还包括能够以高亲和力与人PVR蛋白内的表位结合的抗体或抗体片段,所述表位与mAb 5B9结合。

[0077] 根据一些实施方案,所述分离的抗体或其片段以至少 10^{-8} M的亲和力识别人PVR。根据其他实施方案,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或更高的亲和力与人PVR结合。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0078] 所述分离的mAb抗体的类似物和衍生物以及上述抗体片段也在本发明的范围内。在一些实施方案中,包含选自SEQ ID NO:2、10、18、26、34和42的序列中阐述的至少一个可变区的特定类似物或分离的mAb或其片段也在本发明的范围内。包含选自SEQ ID NO:69、71、73、75、77和79的序列中阐述的至少一个可变区的分离的mAb或其片段也在本发明的范围内。

[0079] 根据一些实施方案,所述抗体或抗体片段类似物与参考抗体序列的高变区具有至少90%的序列同一性。

[0080] 根据某些实施方案,所述分离的抗体或其片段的类似物或衍生物与所述参考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单独实施方案。

[0081] 根据一些实施方案,根据本发明的抗体或抗体片段包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:69中阐述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。根据其他实施方案,根据本发明的抗体或抗体片段包含SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:73中阐述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。根据其他实施方案,根据本发明的抗体或抗体片段包含SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:77中阐述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。

[0082] 根据一些实施方案,所述抗体或抗体片段包含SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:71中阐述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。根据其他实施方案,所述抗体或抗体片段包含SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:75中阐述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。根据其他实施方案,所述抗体或抗体片段包含SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:79中阐述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。

[0083] 根据一些实施方案,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:2并且所述轻链包含SEQ ID NO:10;(ii)所述重链包含SEQ ID NO:18并且所述轻链包含SEQ ID NO:26;或(iii)所述重链包含SEQ ID NO:34并且所述轻链包含SEQ ID NO:42。还包括与所述重链或轻链具有至少95%序列相似性的所述抗体或片段的类似物。

[0084] 根据其他实施方案,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:69并且所述轻链包含SEQ ID NO:71;(ii)所述重链包含SEQ ID NO:73并且所述轻链包含SEQ ID NO:75;或(iii)所述重链包含SEQ ID NO:77并且所述轻链包含SEQ ID NO:79。还包括与所述重链或轻链具有至少95%序列相似性的所述抗体或片段的类似物。

[0085] 根据一些实施方案,所述类似物与上述抗体轻链可变区或重链可变区具有至少96%、97%、98%或99%的序列同一性。根据一些实施方案,所述类似物包含所述高变区的一个或多个CDR序列的不超过一个氨基酸置换、缺失或添加,所述CDR序列即SEQ ID NO:4、6、8、12、14、16、20、22、24、28、30、32、36、38、40、44、46、48、80、81、82、83、84和85中阐述的任一个CDR序列。每种可能性代表本发明的单独实施方案。根据一些实施方案,所述氨基酸置换为保守置换。

[0086] 根据一些实施方案,所述抗体或抗体片段包含具有以上定义的轻链区和重链区的高变区(HVR),其中置换、缺失和/或添加1、2、3、4或5个氨基酸。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0087] 根据一些实施方案,所述抗体或抗体片段包含具有以上定义的轻链区和重链区的HVR,其中一个氨基酸被置换。根据具体实施方案,所述抗体或抗体片段包含如上定义的CDR,其中一个氨基酸被置换。根据一些具体实施方案,所述抗体或抗体片段包含如上定义的轻链CDR2,其中一个氨基酸被置换。

[0088] 根据一些具体实施方案,所述抗体或抗体片段包含具有SEQ IDNO:55 (WASSRHX) 中

阐述的序列的轻链CDR2,其中X选自A、R、D、E、P和T。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0089] 根据一些实施方案,所述抗体或抗体片段包含具有选自SEQ ID NO:56-61的序列的轻链CDR2。

[0090] 根据一些实施方案,所述分离的单克隆抗体或抗体片段包含选自以下的CDR组:

[0091] i.六个CDR的CDR组,其中:HC CDR1选自GYTFSNYWIE (SEQ ID NO:36) 和SNYWIE (SEQ ID NO:84);HC CDR2为EIFPGSGRINFNEKFKG (SEQ ID NO:38);HC CDR3为TKIYGNSFDY (SEQ ID NO:40);LC CDR1选自KASQDVGTA VV (SEQ ID NO:44) 和KASQDVGTA V (SEQ ID NO:85);LC CDR2选自:WASSRHN (SEQ ID NO:46)、WASSRHA (SEQ ID NO:56)、WASSRHR (SEQ ID NO:57)、WASSRHD (SEQ ID NO:58)、WASSRHE (SEQ ID NO:59)、WASSRHP (SEQ ID NO:60) 和WASSRHT (SEQ ID NO:61);并且

[0092] LC CDR3为QQYSRYPLT (SEQ ID NO:48);

[0093] ii.六个CDR的CDR组,其中:HC CDR1序列选自GFDFSRYW (SEQ ID NO:4) 和RYWMT (SEQ ID NO:80);HC CDR2选自EIHPDSSKINYTPSQ (SEQ ID NO:6) 和EIHPDSSKINYTPSQKD (SEQ ID NO:81);HC CDR3选自PDGNYNALDYW (SEQ ID NO:8) 和PDGNYNALDY (SEQ ID NO:82);LC CDR1为KASQDVGTA VT (SEQ ID NO:12);LC CDR2为WASTRHT (SEQ ID NO:14);并且LC CDR3为QQYSRYPYT (SEQ ID NO:16);

[0094] iii.六个CDR的CDR组,其中:HC CDR1序列选自GYTFTEYTMH (SEQ ID NO:20) 和EYTMH (SEQ ID NO:83);HC CDR2为GIDPNNGGTNYNQNFKG (SEQ ID NO:22);HC CDR3为VIPLEY (SEQ ID NO:24);LC CDR1为KASQNVYTNVA (SEQ ID NO:28);LC CDR2为SASYRYR (SEQ ID NO:30);并且LC CDR3为QQYNSYPLA (SEQ ID NO:32)。

[0095] 因此,本发明提供了与人蛋白PVR特异性结合的单克隆抗体或其结合片段,其中所述单克隆抗体或片段包含六个CDR序列的组,其中所述组选自:

[0096] i. SEQ ID NO:4、6、8、12、14和16;

[0097] ii. SEQ ID NO:20、22、24、28、30和32;

[0098] iii. SEQ ID NO:36、38、40、44、46和48;

[0099] iv. SEQ ID NO:36、38、40、44、55和48;

[0100] v. SEQ ID NO:80、81、82、12、14和16;

[0101] vi. SEQ ID NO:83、22、24、28、30和32;

[0102] vii. SEQ ID NO:84、38、40、85、46和48;以及

[0103] viii. SEQ ID NO:84、38、40、85、55和48。

[0104] 本发明还提供了包含重链和轻链的单克隆抗体及其结合片段,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:

[0105] i. SEQ ID NO:2和10;

[0106] ii. SEQ ID NO:69和71;

[0107] iii. SEQ ID NO:18和26;

[0108] iv. SEQ ID NO:73和75;

[0109] v. SEQ ID NO:34和42;以及

[0110] vi. SEQ ID NO:77和79。

[0111] 根据一些实施方案,所述抗体或抗体片段能够抑制人PVR与T细胞或NK细胞上表达的TIGIT的结合。

[0112] 根据具体实施方案,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。根据具体实施方案,所述抗体为嵌合抗体。根据其他实施方案,所述嵌合抗体包含人恒定区。根据其他实施方案,所述嵌合单克隆抗体包含人IgG1恒定区。根据具体实施方案,所述抗体片段选自:Fab、Fab'、F(ab')₂、Fd、Fd'、Fv、dAb、分离的CDR区、单链抗体(scab)、“双抗体”和“线性抗体”。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0113] 根据一些实施方案,所述抗体或抗体片段包含选自以下的框架序列:小鼠IgG2a、小鼠IgG2b、小鼠IgG3、人IgG1、人IgG2、人IgG3和人IgG4。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0114] 根据一些实施方案,提供了包含如上所述的抗体或其片段的偶联物。

[0115] 根据一些实施方案,所述偶联物包含载体蛋白。

[0116] 根据本发明的另一方面,提供了编码对PVR具有高亲和力和特异性的单克隆抗体的多核苷酸序列,以及携带这些多核苷酸序列的载体和宿主细胞。

[0117] 根据一些实施方案,提供了编码上述HC可变区和轻LC可变区的氨基酸序列的多核苷酸序列。

[0118] 根据一些实施方案,所述多核苷酸序列编码能够与人PVR蛋白内的表位结合的抗体或抗体片段或链,所述表位结合:(i)具有SEQ ID NO:2的重链可变区和SEQ ID NO:10的轻链可变区的单克隆抗体(本文鉴别为4E5);(ii)具有SEQ ID NO:18的重链可变区和SEQ ID NO:26的轻链可变区的单克隆抗体(本文鉴别为7D4);或(iii)具有SEQ ID NO:34的重链可变区和SEQ ID NO:42的轻链可变区的单克隆抗体(本文鉴别为5B9)。

[0119] 根据一些实施方案,所述多核苷酸序列编码包含SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:69中阐述的序列的抗体或抗体片段或链。根据一些实施方案,所述多核苷酸序列编码包含SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:71中阐述的序列的抗体或抗体片段或链。

[0120] 根据其他实施方案,所述多核苷酸序列编码包含SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:73中阐述的序列的抗体或抗体片段或链。根据另外的实施方案,所述多核苷酸序列编码包含SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:75中阐述的序列的抗体或抗体片段或链。

[0121] 根据其他实施方案,所述多核苷酸序列编码包含SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:77中阐述的序列的抗体或抗体片段或链。根据另外的实施方案,所述多核苷酸序列编码包含SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:79中阐述的序列的抗体或抗体片段或链。

[0122] 根据又一些实施方案,根据本发明的所述多核苷酸序列编码包含六个CDR序列的抗体或抗体片段或链,所述CDR序列为:(i)具有序列:GFDFSRYW(SEQ ID NO:4)或RYWMT(SEQ ID NO:80)的重链CDR1、具有序列:EIHPDSSKINYTPSQ(SEQ ID NO:6)的重链CDR2、具有序列:PDGNYNALDY(SEQ ID NO:82)的重链CDR3、具有序列:KASQDVGTAVT(SEQ ID NO:12)的轻链CDR1、具有序列:WASTRHT(SEQ ID NO:14)的轻链CDR2和具有序列:QQYSRYPYT(SEQ ID NO:16)的轻链CDR3;(ii)具有序列:EYTMH(SEQ ID NO:83)的重链CDR1、具有序列:GIDPNNGGTNYNQNFKG(SEQ ID NO:22)的重链CDR2、具有序列:VIPLEY(SEQ ID NO:24)的重链CDR3、具有序列:KASQNVYTNVA(SEQ ID NO:28)的轻链CDR1、具有序列:SASYRYR(SEQ ID NO:30)的轻链CDR2和具有序列:QQYNSYPLA(SEQ ID NO:32)的轻链CDR3;或(iii)具有序列:

SNYWIE (SEQ ID NO:84) 的重链CDR1、具有序列:EIFPGSGRINFNEKFKG (SEQ ID NO:38) 的重链CDR2、具有序列:TKIYGNSFDY (SEQ ID NO:40) 的重链CDR3、具有序列:KASQDVGTAV (SEQ ID NO:85) 的轻链CDR1、具有序列:WASSRHN (SEQ ID NO:46) 的轻链CDR2和具有序列:QQYSRYPLT (SEQ ID NO:48) 的轻链CDR3。

[0123] 根据一些实施方案,以上定义的所述多核苷酸序列编码选自以下的分子:抗体、至少包含抗原结合部分的抗体片段以及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单独实施方案。

[0124] 根据一些实施方案,编码单克隆抗体重链可变区的所述多核苷酸序列包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:68中阐述的序列或其具有至少90%序列同一性的变体。

[0125] 根据一些实施方案,编码单克隆抗体重链可变区的所述多核苷酸序列包含SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:72中阐述的序列或其具有至少90%序列同一性的变体。

[0126] 根据一些实施方案,编码单克隆抗体重链可变区的所述多核苷酸序列包含SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:76中阐述的序列或其具有至少90%序列同一性的变体。

[0127] 根据一些实施方案,编码单克隆抗体轻链可变区的所述多核苷酸序列包含SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:70中阐述的序列或其具有至少90%序列同一性的变体。

[0128] 根据一些实施方案,编码单克隆抗体轻链可变区的所述多核苷酸序列包含SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:74中阐述的序列或其具有至少90%序列同一性的变体。

[0129] 根据一些实施方案,编码单克隆抗体轻链可变区的所述多核苷酸序列包含SEQ ID NO:41或SEQ ID NO:78中阐述的序列或其具有至少90%序列同一性的变体。

[0130] 根据一些实施方案,本发明提供了多肽,其包含至少一个由以上公开的至少一个多核苷酸序列编码的序列。

[0131] 在另一方面,本发明提供了核酸构建体,其包含编码根据本发明的至少一个抗体链或其片段的核酸分子。根据一些实施方案,所述核酸构建体为质粒。

[0132] 根据一些实施方案,所述质粒包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:17或SEQ ID NO:33中阐述的多核苷酸序列。

[0133] 根据一些实施方案,所述质粒包含SEQ ID NO:68、SEQ ID NO:72或SEQ ID NO:76中阐述的多核苷酸序列。

[0134] 根据一些实施方案,所述质粒包含SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:41中阐述的多核苷酸序列。

[0135] 根据一些实施方案,所述质粒包含SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:74或SEQ ID NO:78中阐述的多核苷酸序列。

[0136] 在又一方面,本发明提供了能够产生抗体或抗体片段的杂交瘤细胞,所述抗体或抗体片段包含以上定义的具体CDR序列和/或具体重链可变区和轻链可变区。

[0137] 根据一些实施方案,提供了杂交瘤细胞,其包含至少一种以上公开的多核苷酸序列。

[0138] 根据一些实施方案,所述杂交瘤能够产生包含六个互补决定区(CDR)序列的单克隆抗体,所述CDR序列为:(i)具有序列:GFDFSRYW (SEQ ID NO:4) 或RYWMT (SEQ ID NO:80) 的重链CDR1、具有序列:EIHPDSSKINYTPSQ (SEQ ID NO:6) 的重链CDR2、具有序列:PDGNYNALDY (SEQ ID NO:82) 的重链CDR3、具有序列:KASQDVGTAVT (SEQ ID NO:12) 的轻链CDR1、具有序

列:WASTRHT (SEQ ID NO:14) 的轻链CDR2和具有序列:QQYSRYPYT (SEQ ID NO:16) 的轻链CDR3; (ii) 具有序列EYTMH (SEQ ID NO:83) 的重链CDR1、具有序列:GIDPNNGGTNYNQNFKG (SEQ ID NO:22) 的重链CDR2、具有序列:VIPLEY (SEQ ID NO:24) 的重链CDR3、具有序列:KASQNVYTNVA (SEQ ID NO:28) 的轻链CDR1、具有序列:SASYRYR (SEQ ID NO:30) 的轻链CDR2和具有序列:QQYNSYPLA (SEQ ID NO:32) 的轻链CDR3;或 (iii) 具有序列:SNYWIE (SEQ ID NO:84) 的重链CDR1、具有序列:EIFPGSGRINFNEKFKG (SEQ ID NO:38) 的重链CDR2、具有序列:TKIYGNSFDY (SEQ ID NO:40) 的重链CDR3、具有序列:KASQDVGTAV (SEQ ID NO:85) 的轻链CDR1、具有序列:WASSRHN (SEQ ID NO:46) 的轻链CDR2和具有序列:QQYSRYPLT (SEQ ID NO:48) 的轻链CDR3。

[0139] 根据本发明的抗体或其片段可附接至细胞毒性部分、放射性部分或可识别的部分。

[0140] 根据另一方面,本发明提供药物组合物,所述药物组合物包含以高亲和力和特异性识别PVR的作为活性成分的至少一种抗体、抗体片段或其偶联物,以及任选的至少一种药学上可接受的赋形剂、稀释剂、盐或载体。

[0141] 根据一些实施方案,所述药物组合物包含能够与人PVR蛋白内的表位结合的单克隆抗体或其片段,所述表位与选自以下的单克隆抗体结合: (i) 本文鉴别为4E5 (也表示为PVR.07) 的抗体,其具有SEQ ID NO:2的重链可变区和SEQ ID NO:10的轻链可变区; (ii) 本文鉴别为7D4的抗体 (也表示为PVR.01), 其具有SEQ ID NO:18的重链可变区和SEQ ID NO:26的轻链可变区;以及 (iii) 本文鉴别为5B9 (也表示为PVR.09) 的抗体,其具有SEQ ID NO:34的重链可变区和SEQ ID NO:42的轻链可变区。

[0142] 根据一些实施方案,所述药物组合物含有包含六个CDR的单克隆抗体或其抗体片段,所述CDR为: (i) 具有序列:GFDFSRYW (SEQ ID NO:4) 或RYWMT (SEQ ID NO:80) 的重链CDR1、具有序列:EIHPDSSKINYTPSQ (SEQ ID NO:6) 的重链CDR2、具有序列:PDGNYNALDY (SEQ ID NO:82) 的重链CDR3、具有序列:KASQDVGTAVT (SEQ ID NO:12) 的轻链CDR1、具有序列:WASTRHT (SEQ ID NO:14) 的轻链CDR2和具有序列:QQYSRYPYT (SEQ ID NO:16) 的轻链CDR3; (ii) 具有序列EYTMH (SEQ ID NO:83) 的重链CDR1、具有序列:GIDPNNGGTNYNQNFKG (SEQ ID NO:22) 的重链CDR2、具有序列:VIPLEY (SEQ ID NO:24) 的重链CDR3、具有序列:KASQNVYTNVA (SEQ ID NO:28) 的轻链CDR1、具有序列:SASYRYR (SEQ ID NO:30) 的轻链CDR2和具有序列:QQYNSYPLA (SEQ ID NO:32) 的轻链CDR3;或 (iii) 具有序列:SNYWIE (SEQ ID NO:84) 的重链CDR1、具有序列:EIFPGSGRINFNEKFKG (SEQ ID NO:38) 的重链CDR2、具有序列:TKIYGNSFDY (SEQ ID NO:40) 的重链CDR3、具有序列:KASQDVGTAV (SEQ ID NO:85) 的轻链CDR1、具有序列:WASSRHN (SEQ ID NO:46) 的轻链CDR2和具有序列:QQYSRYPLT (SEQ ID NO:48) 的轻链CDR3。

[0143] 根据一些实施方案,所述药物组合物包含单克隆抗体或其片段,所述单克隆抗体或其片段包含重链可变区,所述重链可变区具有选自SEQ ID NO:2、SEQ ID NO:69、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:73、SEQ ID NO:34和SEQ ID NO:77的序列。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0144] 根据一些实施方案,所述药物组合物包含单克隆抗体或其片段,所述单克隆抗体或其片段包含轻链可变区,所述轻链可变区具有选自SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:71、SEQ ID

NO:26、SEQ ID NO:75、SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:79的序列。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0145] 根据具体实施方案,所述药物组合物包含单克隆抗体或其片段,所述单克隆抗体或其片段包含具有SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:69中阐述的序列的重链可变区以及具有SEQ ID NO:10或SEQ ID NO:71中阐述的序列的轻链可变区。

[0146] 根据具体实施方案,所述药物组合物包含单克隆抗体或其片段,所述单克隆抗体或其片段包含具有SEQ ID NO:18或SEQ ID NO:73中阐述的序列的重链可变区以及具有SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:75中阐述的序列的轻链可变区。

[0147] 根据具体实施方案,所述药物组合物包含单克隆抗体或其片段,所述单克隆抗体或其片段包含具有SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:77中阐述的序列的重链可变区以及具有SEQ ID NO:42或SEQ ID NO:79中阐述的序列的轻链可变区。

[0148] 根据一些实施方案,所述药物组合物包含识别人PVR的至少两种抗体或抗体片段的组合。

[0149] 根据又一实施方案,所述药物组合物包含一种与根据本发明的PVR特异性结合的mAb或片段,以及一种与不同抗原如细胞受体、肿瘤抗原或免疫调节蛋白特异性结合的mAb或片段。

[0150] 还提供了药物组合物,其包含至少一种根据本发明的抗体、抗体片段或抗体偶联物,用于通过抑制PVR与NK细胞上表达的TIGIT的结合来恢复NK细胞毒性。

[0151] 根据一些实施方案,所述抗体、抗体片段或抗体偶联物能够抑制人PVR与T细胞上表达的TIGIT的结合。

[0152] 根据一些实施方案,根据本发明的药物组合物用于癌症免疫疗法或增强免疫应答。

[0153] 所述癌症可以是表达PVR的任何癌症。根据一些实施方案,所述癌症过表达PVR。

[0154] 根据本发明的一些实施方案,所述癌症为转移性癌症。根据一些实施方案,根据本发明的药物组合物用于抑制转移的形成或分布或者减少受试者中转移的总数。

[0155] 根据本发明的一些实施方案,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(kidney cancer)、肺癌、甲状腺癌、前列腺癌、脑癌、肾癌(renal cancer)、咽喉癌、喉癌、膀胱癌、肝癌、纤维肉瘤、子宫内膜细胞癌、成胶质细胞瘤、肉瘤、骨髓瘤、白血病和淋巴瘤。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0156] 根据一些实施方案,所述癌症为实体癌。根据一些具体实施方案,所述实体癌选自黑素瘤(皮肤)、肺癌、结肠癌、乳腺癌、子宫癌和肾癌。根据具体实施方案,所述癌症选自乳腺癌、肺癌和脂肪肉瘤。

[0157] 根据其他实施方案,所述癌症为血液学癌症。根据一些实施方案,所述血液学癌症为髓样白血病、急性成淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、骨髓增生性疾病、多发性骨髓瘤或骨髓增生异常综合征。每种可能性代表本发明的单独实施方案。根据某些实施方案,所述癌症为白血病。根据具体实施方案,所述癌症为急性髓样白血病(AML)。

[0158] 根据一些实施方案,根据本发明的药物组合物用于治疗病毒感染。

[0159] 根据一些实施方案,所述病毒感染由病毒引起,所述病毒经由被感染细胞表面上的PVR与靶细胞结合。

[0160] 根据一些实施方案,根据本发明的药物组合物用于治疗血管发生相关的疾病或病症。根据某些实施方案,所述血管发生相关的疾病或病症选自:癌症、眼的细胞增生性疾病(眼部疾病)、视网膜病症和炎性疾病。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0161] 根据又一方面,本发明提供了通过使用以上定义的单克隆抗体或抗体片段来抑制人PVR与至少一种配体结合的方法。

[0162] 根据另一方面,本发明提供了用于增强有需要的受试者的免疫应答的方法,所述方法包括向所述受试者施用治疗有效量的以上定义的单克隆抗体、抗体片段或抗体偶联物。

[0163] 根据另一方面,本发明提供了治疗癌症的方法,所述方法包括向有需要的受试者施用治疗有效量的包含至少一种抗体、抗体片段或其偶联物的药物组合物,其以高亲和力和特异性识别人PVR并能够抑制所述人PVR与其配体的结合。

[0164] 根据一些实施方案,施用的所述药物组合物中的抗体选自:(i)单克隆抗体,其含有包含在SEQ ID NO:2中阐述的重链可变区中的CDR序列和包含在SEQ ID NO:10中阐述的轻链可变区中的CDR序列;(ii)单克隆抗体,其含有包含在SEQ ID NO:18中阐述的重链可变区中的CDR序列和包含在SEQ ID NO:26中阐述的轻链可变区中的CDR序列;或(iii)单克隆抗体,其含有包含在SEQ ID NO:34中阐述的重链可变区中的CDR序列和包含在SEQ ID NO:42中阐述的轻链可变区中的CDR序列。

[0165] 根据一些具体实施方案,施用的所述药物组合物中的单克隆抗体包含:重链CDR1,其包含选自GFDFSRYW(SEQ ID NO:4)和RYWMT(SEQ ID NO:80)的序列;重链CDR2,其包含序列:EIHPDSSKINYTPSQ(SEQ ID NO:6);重链CDR3,其包含序列:PDGNYNALDY(SEQ ID NO:82);轻链CDR1,其包含序列:KASQDVGTAVT(SEQ ID NO:12);轻链CDR2,其包含序列:WASTRHT(SEQ ID NO:14);以及轻链CDR3,其包含序列:QQYSRYPYT(SEQ ID NO:16)。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0166] 根据其他具体实施方案,施用的所述药物组合物中的单克隆抗体包含:重链CDR1,其包含序列EYTMH(SEQ ID NO:83);重链CDR2,其包含序列:GIDPNNGGTNYNQNFKG(SEQ ID NO:22);重链CDR3,其包含序列:VIPLEY(SEQ ID NO:24);轻链CDR1,其包含序列:KASQNVYTNVA(SEQ ID NO:28);轻链CDR2,其包含序列:SASYRYR(SEQ ID NO:30);以及轻链CDR3,其包含序列:QQYNSYPLA(SEQ ID NO:32)。

[0167] 根据其他具体实施方案,施用的所述药物组合物中的单克隆抗体包含:重链CDR1,其包含序列SNYWIE(SEQ ID NO:84);重链CDR2,其包含序列:EIFPGSGRINFNEKFKG(SEQ ID NO:38);重链CDR3,其包含序列:TKIYGNSFDY(SEQ ID NO:40);轻链CDR1,其包含序列:KASQDVGTAV(SEQ ID NO:85);轻链CDR2,其包含序列:WASSRHN(SEQ ID NO:46);以及轻链CDR3,其包含序列:QQYSRYPLT(SEQ ID NO:48)。

[0168] 根据本发明的一些实施方案,所述治疗有效量导致受试者中的肿瘤大小减小或转移数目减少。

[0169] 根据一些实施方案,所述治疗癌症的方法包括施用或进行至少一种另外的抗癌疗法。根据某些实施方案,所述另外的抗癌疗法为手术、化疗、放疗或免疫疗法。

[0170] 根据一些实施方案,所述治疗癌症的方法包括施用以高亲和力和特异性识别人PVR的单克隆抗体以及另外的抗癌剂。根据一些实施方案,所述另外的抗癌剂选自:免疫调

节剂、经激活的淋巴细胞、激酶抑制剂和化疗剂。

[0171] 根据其他实施方案,所述另外的免疫调节剂为与除人PVR之外的抗原结合的抗体、抗体片段或抗体偶联物。

[0172] 根据一些实施方案,所述另外的免疫调节剂为针对免疫检查点分子的抗体。根据一些实施方案,所述另外的免疫调节剂为针对免疫检查点分子的抗体,所述免疫检查点分子选自人程序性细胞死亡蛋白1 (PD-1)、PD-L1和PD-L2、癌胚抗原相关细胞黏附分子1 (CEACAM1)、淋巴细胞激活基因3 (LAG3)、CD137、OX40 (也称为CD134)、杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (KIR)、TIGIT及其任何组合。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0173] 根据一些实施方案,所述抗癌剂选自:Erbitux、阿糖胞苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、巯嘌呤、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、氮芥、美法仑、噻替哌、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单独实施方案。

[0174] 根据一些实施方案,所述抗癌剂为表皮生长因子受体 (EGFR) 抑制剂。根据一些实施方案,所述EGFR抑制剂选自:西妥昔单抗 (Erbitux®)、帕尼单抗 (Vectibix®) 和 necitumumab (Portrazza®)。根据一些实施方案,所述EGFR抑制剂为西妥昔单抗 (Erbitux®)。

[0175] 根据本发明的一些实施方案,所述受试者为人类受试者。

[0176] 根据本发明的一些实施方案,所述用途进一步包括下调免疫共抑制受体活性或表达的药剂的用途。

[0177] 根据本发明的一些实施方案,所述免疫细胞为T细胞。

[0178] 根据本发明的一些实施方案,所述免疫共抑制受体选自PD-1、TIGIT、DNAM-1、CTLA-4、LAG3、TIM3、BTLA、VISTA、B7H4、CD96、BY55、LAIR1、SIGLEC10和2B4。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0179] 根据一个方面,本发明提供了用于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的抗体来调节PVR与TIGIT的结合。

[0180] 根据一个方面,本发明提供了预防或治疗病毒的病毒感染的方法,所述方法在有需要的受试者中利用CD155作为进入受体,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的本文所述的抗PVR单克隆抗体。根据一些实施方案,所述病毒选自:脊髓灰质炎病毒、柯萨奇病毒、腺病毒和人缺陷病毒 (HIV)。

[0181] 根据又一方面,本发明提供了用于治疗血管发生相关的疾病或病症的方法。根据某些实施方案,所述血管发生相关的疾病或病症选自:癌症、眼的细胞增生性疾病(眼部疾病)、视网膜病症和炎症性疾病。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0182] 根据一些实施方案,治疗癌症的方法涉及通过抑制血管发生来预防或减少受试者中转移的形成、生长或扩散。

[0183] 根据一个方面,本发明提供了诊断或预测受试者中的癌症或感染性疾病的方法,所述方法包括使用至少一种如本文所述的抗体确定所述受试者的生物样品中PVR的表达水平。

[0184] 根据另一方面,本发明还包括确定或定量PVR表达的方法,所述方法包括使生物样品与抗体或抗体片段接触,并且测量复合物形成的水平,其中所述抗体或抗体片段包含选自以下的互补决定区(CDR):(i)具有序列:GFDFSRYW(SEQ ID NO:4)或RYWMT(SEQ ID NO:80)的重链CDR1、具有序列:EIHPDSSKINYTPSQ(SEQ ID NO:6)的重链CDR2、具有序列:PDGNYNALDY(SEQ ID NO:82)的重链CDR3、具有序列:KASQDVGTA VT(SEQ ID NO:12)的轻链CDR1、具有序列:WASTRHT(SEQ ID NO:14)的轻链CDR2和具有序列:QQYSRYPYT(SEQ ID NO:16)的轻链CDR3;(ii)具有序列:EYTMH(SEQ ID NO:83)的重链CDR1、具有序列:GIDPNNGGTNYNQNFKG(SEQ ID NO:22)的重链CDR2、具有序列:VIPLEY(SEQ ID NO:24)的重链CDR3、具有序列:KASQNVYTNVA(SEQ ID NO:28)的轻链CDR1、具有序列:SASYRYR(SEQ ID NO:30)的轻链CDR2和具有序列:QQYNSYPLA(SEQ ID NO:32)的轻链CDR3;或(iii)具有序列:SNYWIE(SEQ ID NO:84)的重链CDR1、具有序列:EIFPGSGRINFNEKFKG(SEQ ID NO:38)的重链CDR2、具有序列:TKIYGNSFDY(SEQ ID NO:40)的重链CDR3、具有序列:KASQDVGTA V(SEQ ID NO:85)的轻链CDR1、具有序列:WASSRHN(SEQ ID NO:46)的轻链CDR2和具有序列:QQYSRYPLT(SEQ ID NO:48)的轻链CDR3。

[0185] 根据一些实施方案,确定和定量方法可在体外或离体进行,或者可用于诊断与PVR表达相关的病况。根据本发明的抗体还可用于配置筛选方法。例如,可构建酶联免疫吸附测定(ELISA)或放射免疫测定(RIA)来使用本领域已知的抗体和方法测量分泌的或细胞相关的多肽的水平。

[0186] 根据一些实施方案,用于检测或定量PVR的存在的方法包括以下步骤:

[0187] i.将样品与PVR特异性抗体或其至少包含抗原结合部分的抗体片段一起温育;

[0188] ii.使用可检测的探针检测结合的PVR。

[0189] 根据一些实施方案,所述方法进一步包括以下步骤:

[0190] iii.将(ii)的所述量与从含有已知量的PVR的参考样品获得的标准曲线进行比较;以及

[0191] iv.从所述标准曲线计算所述样品中PVR的量。

[0192] 根据一些特定实施方案,所述样品为体液。

[0193] 根据一些实施方案,所述方法在体外或离体进行。

[0194] 还提供了用于测量生物样品中的PVR表达的试剂盒,其包含至少一种抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段包含选自以下的互补决定区(CDR):(i)具有序列:GFDFSRYW(SEQ ID NO:4)或RYWMT(SEQ ID NO:80)的重链CDR1、具有序列:EIHPDSSKINYTPSQ(SEQ ID NO:6)的重链CDR2、具有序列:PDGNYNALDY(SEQ ID NO:82)的重链CDR3、具有序列:KASQDVGTA VT(SEQ ID NO:12)的轻链CDR1、具有序列:WASTRHT(SEQ ID NO:14)的轻链CDR2和具有序列:QQYSRYPYT(SEQ ID NO:16)的轻链CDR3;(ii)具有序列:EYTMH(SEQ ID NO:83)的重链CDR1、具有序列:GIDPNNGGTNYNQNFKG(SEQ ID NO:22)的重链CDR2、具有序列:VIPLEY(SEQ ID NO:24)的重链CDR3、具有序列:KASQNVYTNVA(SEQ ID NO:28)的轻链CDR1、具有序列:SASYRYR(SEQ ID NO:30)的轻链CDR2和具有序列:QQYNSYPLA(SEQ ID NO:32)的轻链CDR3;或(iii)具有序列:SNYWIE(SEQ ID NO:84)的重链CDR1、具有序列:EIFPGSGRINFNEKFKG(SEQ ID NO:38)的重链CDR2、具有序列:TKIYGNSFDY(SEQ ID NO:40)的重链CDR3、具有序列:KASQDVGTA V(SEQ ID NO:85)的轻链CDR1、具有序列:WASSRHN(SEQ ID NO:46)的轻链CDR2和具有序列:

QQYSRYPLT (SEQ ID NO:48) 的轻链CDR3。

[0195] 根据一个方面,本发明提供了用于检测癌症的试剂盒,所述诊断试剂盒包含本文公开的抗体或其片段。

[0196] 根据一些实施方案,本发明提供对免疫相关疾病或增生性疾病进行诊断、严重性评估或分期的方法,所述方法包括使用根据本发明的抗体或其片段或其偶联物确定来自受试者的样品中PVR的表达或活性,并将所述PVR的表达或活性与PVR表达或活性的参考量进行比较。所述参考量可从取自正常受试者的样品获得、从处于疾病的不同阶段的同一受试者获得、或者从较大受试者群体的临床数据确定。

[0197] 从以下给出的详细描述中,本发明的其他实施方案和全部适用范围将变得显而易见。然而,应当理解,虽然指出了本发明的优选实施方案,但详细描述和具体实例仅以说明的方式给出,因为在本发明的精神和范围内的各种改变和修改将从该详细描述中变得对于本领域技术人员显而易见。

附图说明

[0198] 图1A-图1C为描绘PVR mRNA表达水平(如所示的高或低)与存活概率的相关性的图表。测量针对肺癌(图1A)、乳腺癌(图1B)和脂肪肉瘤(图1C)的相关性。从GEO位点获得mRNA表达的数据集并使用bioprofiling.de位点分析如下:肺癌GEO数据集ID:GSE31210,乳腺癌GEO数据集ID:GSE25055,脂肪肉瘤GEO数据集ID:GSE30929。

[0199] 图2为免疫细胞和肿瘤细胞上受体表达的示意图。TIGIT涉及许多免疫细胞(例如,T细胞)上的共抑制受体;DNAM-1(也称为CD226)涉及许多免疫细胞(例如,T细胞)上的激活受体;Fc受体涉及主要在NK细胞上表达,但也在包括嗜中性粒细胞和巨噬细胞的骨髓细胞上表达的强激活受体;PVR涉及针对许多肿瘤细胞表达的TIGIT的抑制性配体(与DNAM-1的结合较弱);柄蛋白-2涉及针对许多肿瘤细胞表达的DNAM-1的激活配体(TIGIT的边缘识别)。根据本发明的抗PVR的结合示出双重作用:1)增强经由Fc受体的肿瘤细胞的杀伤;2)通过阻断与TIGIT的相互作用来增加免疫细胞的激活。

[0200] 图3A-图3D为描绘产生的四种抗PVR抗体的FACS分析的图表。示出了抗体阻断TIGIT-Fc与肿瘤细胞系直接结合的功效。图3A图示了非阻断性抗PVR抗体(抗PVR mAb抗体2G3,也称为hPVR.17)。图3B-图3D示出,产生的三种抗体,分别称为5B9(也称为hPVR.09)、7D4(也称为hPVR.01)和4E5(也称为hPVR.07),是阻断抗PVR的mAb,如通过TIGIT-Ig结合的阻断所示。将杂交瘤汤(5 μ l/孔)添加至HepG2细胞。使用2 μ g/孔的TIGIT-Fc至终浓度20 μ g/ml,并在添加荧光标记的抗-Fc Ab后通过FACS测量细胞结合的TIGIT水平。填充的直方图示出了抗Fc试剂的背景染色。

[0201] 图4为示出用抗PVR mAb抗体7D4(也称为hPVR.01)阻断PVR-TIGIT相互作用如何增强人细胞系MDA-MB-231(乳腺癌)的NK细胞杀伤的图表。基于来自靶细胞的[35S]-甲硫氨酸的分泌来计算特异性杀伤。对照(Ctrl)为非相关的小鼠IgG。P值=0.0056。

[0202] 图5为描绘使用抗PVR mAb 4E5(也称为hPVR.07)阻断PVR-TIGIT相互作用增强了人癌细胞系HepG2(肝细胞癌)的NK细胞杀伤的图表。无-没有mAb的HepG2的杀伤;抗PVR 4E5-用小鼠抗PVR4E5mIgG1杀伤HepG2(未激活人Fc受体);抗PVR 4e5hIgG1-用抗PVR4E5-hIgG1杀伤HepG2(激活人Fc受体);Erbix(P.C)-阳性对照mAb Erbitux(抗EGFR)。以10 μ g/

m1使用所有mAb。P值:抗PVR 4E5-0.04,抗PVR 4e5hIgG1-0.000746,Erbitux (阳性对照) -0.003219。

[0203] 图6A-图6O为描绘人肿瘤细胞系表达PVR和柄蛋白-2的图表。黑素瘤细胞(图6A-图6E)、乳腺癌细胞(图6F-图6H)、结肠直肠细胞(图6I)、肾细胞(图6J)、肺癌细胞(图6K)、前列腺癌细胞(图6L)、脑肿瘤细胞(图6M)和肝细胞癌细胞(图6N-图6O)均表达PVR和柄蛋白-2。以0.2 μ g/孔使用mAb:商业的抗柄蛋白-2mAb和抗PVR mAb 4E5(也称为hPVR.07)。

[0204] 图7A-图7C为FACS分析图表,描绘出PVR为主要的TIGIT配体。图7A图示HepG2细胞(人肝细胞癌细胞)表达PVR和柄蛋白-2。图7B图示纯化的抗PVR mAb 4E5(也称为hPVR.07)(0.15 μ g)几乎完全(高于97%)阻断TIGIT-Ig(2 μ g/ml)结合,但这些细胞也表达柄蛋白-2。图7C图示CHO细胞表达高水平的h柄蛋白-2。图7D示出了所有PVR mAb缺乏与图7C中相同的CHO细胞的染色,这意味着抗-PVR mAb没有直接识别柄蛋白-2,并且因此图7B中所见的TIGIT结合的阻断不能通过柄蛋白-2的阻断来解释,而是直接PVR阻断的结果。

[0205] 图8A-图8C示出了所有针对人PVR的抗PVR mAb的类似结合功效。所有三种阻断克隆与内源性PVR HepG2细胞(图8A)和过表达的hPVR B16-hPVR细胞(图8B)产生相似(小于10%的差异)的结合。还使用来自非洲绿猴的Vero细胞系检查结合(图8C),所述Vero细胞系表达与人PVR具有93%相似性的PVR蛋白。在这种情况下,不同的Ab显示有差别的染色强度。在所有情况下使用0.2 μ g的每种mAb。

[0206] 图9为描绘本发明的抗PVR抗体不识别犬PVR的图表。人TIGIT-Fc(10 μ g/ml)具有强交叉反应性,并与犬MDCK细胞系结合。PVR mAb均不能够与这些细胞结合,从而表明不识别犬PVR。

[0207] 图10A-图10D描绘柄蛋白-2优先被DNAM-1结合而非被TIGIT结合。使用指示的抗体浓度对过表达PVR或柄蛋白2的细胞进行染色。图10A图示了TIGIT-Fc与表达柄蛋白2的细胞的结合;图10B图示了DNAM-FC与表达柄蛋白-2的细胞的结合。图10C图示了TIGIT与表达PVR的细胞的结合。图10D图示了DNAM-1与表达PVR的细胞的结合。

[0208] 图11示出了抗PVR抗体对T细胞增殖的影响。用CFSE标记人PBMC,并在指示的抗体的存在下将人PBMC与靶细胞一起温育。结果表示为增殖相对于对照的倍数增加。结果为10个健康供体的汇集的共7个实验。P值:mAb 4E5-0.000241,mAb 5B9-1.96E⁻⁰⁵,抗PD-1-0.016303,抗CTLA4-0.000171,4E5hIgG1-0.008176。

[0209] 图12示出了抗PVR抗体和其他抗体对T细胞增殖的联合作用。CFSE标记人PBMC,并在指示的抗体组合的存在下将人PBMC与靶细胞一起温育。结果表示为增殖相对于对照的倍数增加。结果为使用12个健康供体的7个独立实验。P值:抗PD1+抗CTLA-47.54E⁻⁰³,抗PD-1+4E5-7.02E⁻⁰²,抗PD-1+5B9-1.11E⁻⁰⁴,抗CTLA4+4E5-1.37E⁻⁰³,抗CTLA4+5B9-5.47E⁻⁰⁶。

[0210] 图13描绘了抗PVR抗体对CD8 T细胞增殖的特异性作用。用CFSE标记人PBMC,并在指示的抗体的存在下将人PBMC与靶细胞(A549)一起温育。在9-12天后通过FACS计数培养物中的CD8阳性细胞。结果表示为增殖相对于对照的倍数增加。结果属于使用健康PBMC供体的2个独立实验。

[0211] 图14描绘了用不同抗体诱导后CD8细胞与CD4细胞的比率。用CFSE标记人PBMC,并在指示的抗体的存在下将人PBMC与靶细胞(A549)一起温育。在9-12天后计数培养物中的细胞。结果属于2个健康供体的汇集的共2个实验。

[0212] 图15示出了抗PVR抗体对NK脱粒的作用。在指示的抗体的存在下,将人NK细胞与MDA-MB-231细胞(三阴性乳腺癌细胞系)一起温育。结果代表5个不同的健康NK细胞供体进行的7个独立实验。P值:PVR4E5-0.005063,PVR5B9-0.00374,PVR7D4-0.019448,PVR4E5-hIgG1- $2.03E^{-05}$,PVR5B9-hIgG1- $1.45E^{-05}$,PVR7D4-hIgG1- $5.8E^{-05}$ 。

[0213] 图16A-图16D示出了在没有免疫细胞存在的情况下抗PVR抗体对肿瘤细胞存活的作用。在50微克/ml指示的mAb存在下,使用MTT细胞存活测定检查A549细胞(图16A)、U373细胞(图16B)、HCT116细胞(图16C)和Me1-624(图16D)的存活达24小时。通过单尾学生TTEST计算显著性,* <0.05 ,** <0.03 ,并且*** <0.02 。

具体实施方式

[0214] 本发明提供了人脊髓灰质炎病毒受体(PVR)特异性单克隆抗体。本发明还提供了mAb作为治疗剂的生产和用途。具体地,本发明的mAb可以单独或与其他药剂联合使用,用于恢复和增强免疫细胞的抗肿瘤杀伤活性,以及作为诊断试剂。

[0215] 如本文所用的术语“抗原”指能够引发抗体形成并与抗体特异性结合的分子或分子的一部分。抗原可具有一个或多个表位。以上提到的特异性结合意指表示抗原将以高度选择性的方式与其相应的抗体反应,而非与可被其他抗原诱发的多种其他抗体反应。根据本发明的一些实施方案的抗原为PVR蛋白。

[0216] 如本文所用的术语“PVR”指脊髓灰质炎病毒受体,也称为CD155(分化簇155)。PVR为具有N-末端信号序列、三个细胞外免疫球蛋白(Ig)样结构域、跨膜结构域和胞质尾区的跨膜糖蛋白。其具有大约80kDa的分子大小和由三个Ig样结构域(具体为最外侧的V样结构域,随后是两个C2样结构域)组成的结构。根据本发明的示例性PVR阐述于GenBank登录号:NP_001129240.1、NP_001129241.1、NP_001129242.2和NP_006496.4中。这些脊髓灰质炎病毒受体共享细胞外结构域的序列,并因此可以被本发明的亲和结合部分靶向。

[0217] 如本文所用的术语“抗原决定簇”或“表位”是指与特定抗体特异性反应的抗原分子区域。应用本领域已知的方法,可以单独或与载体部分结合使用衍生自表位的肽序列以使动物免疫并产生另外的多克隆或单克隆抗体。所分离的衍生自表位的肽可用于诊断方法以检测抗体。

[0218] 应当注意,可使用已知方法如表面等离子体共振(SPR)(描述于Scarano S, Mascini M, Turner AP, Minunni M. Surface plasmon resonance imaging for affinity-based biosensors. Biosens Bioelectron. 2010, 25:957-66)对亲和力进行定量,并且可以使用例如解离常数Kd来计算该亲和力,使得较低的Kd反映较高的亲和力。

[0219] 根据本发明的抗体或其片段与hPVR中的表位结合。具体地,抗体与如NP_006496.4中阐述的PVR的氨基酸1-343内的表位结合。

[0220] 抗体或免疫球蛋白包含通过二硫键连接在一起的两个重链以及两个轻链,每个轻链通过二硫键以“Y”形构型与相应的重链连接。抗体的蛋白水解消化产生Fv(可变片段)结构域和Fc(结晶片段)结构域。抗原结合结构域Fab包含多肽序列有所变化的区域。术语F(ab')₂代表通过二硫键连接在一起的两个Fab'臂。抗体的中心轴称为Fc片段。每个重链在一端具有可变结构域(V_H),随后是许多恒定结构域(C_H)。每个轻链在一端具有可变结构域(V_L)并且在另一端具有恒定结构域(C_L),轻链可变结构域与重链的可变结构域对齐,且轻链

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位点。轻链和重链上的结构域具有相同的一般结构,并且每个结构域包含四个框架区,该框架区的序列相对保守,由称为互补决定区(CDR1-3)的三个高变结构域连接。这些结构域有助于抗原结合位点的特异性和亲和力。

[0221] 通常使用本领域已知的少数方法之一对来自给定的重链可变序列或轻链可变序列的CDR进行鉴别或确定。例如,根据Kabat(Wu T.T和Kabat E.A.,J Exp Med,1970;132:211-50)和IMGT(Lefranc M-P等人,Dev Comp Immunol,2003,27:55-77)进行这样的确定。

[0222] 当使用术语“具有……序列的CDR”或类似术语时,该术语包括其中CDR包含指定序列的选项,以及其中CDR由指定序列组成的选项。

[0223] 抗体的抗原特异性基于高变区(HVR),即一起形成抗原结合位点的轻链和重链的独特CDR序列。

[0224] 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)。轻链是两种同种型(κ 或 λ)中的任一种。这两种同种型可见于所有抗体类别。

[0225] 术语“抗体”以最广义使用,并且包括单克隆抗体(包括全长单克隆抗体或完整单克隆抗体)、多克隆抗体、多价抗体和足够长以表现出所需生物活性(即与人PVR结合)的抗体片段。

[0226] 根据本发明的一种或多种抗体包括完整抗体,诸如多克隆抗体或单克隆抗体(mAb),以及其蛋白水解片段,诸如Fab或F(ab')₂片段。单链抗体也属于本发明的范围。

[0227] 抗体片段

[0228] “抗体片段”仅包含完整抗体的一部分,其通常包含该完整抗体的抗原结合位点,因此保留了与抗原结合的能力。本定义包括的抗体片段的实例包括:(i) Fab片段,其具有VL、CL、VH和CH1结构域;(ii) Fab'片段,其为在CH1结构域的C末端具有一个或多个半胱氨酸残基的Fab片段;(iii) Fd片段,其具有VH和CH1结构域;(iv) Fd'片段,其在CH1结构域的C末端具有VH和CH1结构域和一个或多个半胱氨酸残基;(v) Fv片段,其具有抗体单臂的VL和VH结构域;(vi) dAb片段(Ward等人,Nature 1989,341,544-546),其由VH结构域组成;(vii) 分离的CDR区;(viii) F(ab')₂片段,其为在铰链区包括通过二硫桥连接的两个Fab'片段的二价片段;(ix) 单链抗体分子(例如,单链Fv;scFv)(Bird等人,Science 1988,242,423-426;和Huston等人,Proc.Natl.Acad.Sci.(USA) 1988,85,5879-5883);(x) 具有两个抗原结合位点的“双抗体”,其包含与相同多肽链中的轻链可变结构域(VL)连接的重链可变结构域(VH)(参见例如,EP 404,097;WO 93/11161;和Hollinger等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,1993,90,6444-6448);(xi) “线性抗体”,其包含一对串联Fd区段(VH-CH1-VH-CH1),该片段与互补的轻链多肽一起形成一对抗原结合区(Zapata等人Protein Eng.,1995,8,1057-1062;和美国专利号5,641,870)。

[0229] 已经开发了用于产生抗体片段的各种技术。传统地,经由完整抗体的蛋白水解消化而衍生这些片段(参见例如,Morimoto等人,Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117(1992)和Brennan等人,Science,229:81(1985))。然而,现在可以通过重组宿主细胞直接产生这些片段。例如,可从抗体噬菌体文库中分离抗体片段。或者,可直接从大肠杆菌(E.coli)中回收Fab'-SH片段并进行化学耦合以形成F(ab')₂片段(Carter等人,Bio/Technology 10:163-167(1992))。根据另一方法,可直接从重组宿主细胞培养物中

分离F(ab')₂片段。用于产生抗体片段的其他技术对于技术人员将会显而易见。在其他实施方案中,选择的抗体为单链Fv片段(scFv)。

[0230] 单链抗体可以是具有抗原结合能力的单链复合多肽,并且该单链抗体包含与免疫球蛋白轻链和重链的可变区即连接的VH-VL或者单链Fv(scFv)同源或类似的氨基酸序列。用于产生单链抗体的技术(美国专利号4,946,778)可适于产生针对PVR的单链抗体。

[0231] 如本文所用的术语“单克隆抗体”(mAb)是指从基本上同质的抗体群体获得的抗体,即除了可能少量存在的可能的天然发生的突变之外,构成该群体的单个抗体是相同的。单克隆抗体具有高度特异性,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剂相反,每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。修饰语“单克隆”不应解释为需要通过任何特定方法产生抗体。可通过本领域技术人员已知的方法获得mAb。例如,根据本发明使用的单克隆抗体可通过Kohler等人,Nature 1975,256,495首次描述的杂交瘤方法制备,或者可通过重组DNA方法制备(参见例如,美国专利号4,816,567)。还可使用例如Clackson等人,Nature 1991,352,624-628或Marks等人,J.Mol.Biol.,1991,222:581-597中描述的技术从噬菌体抗体文库中分离单克隆抗体。

[0232] Fields等人2013,8(6):1125-48中描述了通过快速鉴别以及功能性可变重链(VH)基因和可变轻链(VL)基因的克隆而衍生自单克隆抗体的重组单价抗原结合分子的设计和开发,以及优化用于在重组细菌中表达的合成DNA序列的设计和克隆。

[0233] 本发明的mAb可属于任何免疫球蛋白类别,该类别包括IgG、IgM、IgE、IgA和IgD。可体外或体内培育产生mAb的杂交瘤。通过体内产生可获得高滴度的mAb,其中将来自单个杂交瘤的细胞腹膜内注射至未致敏(pristine-primed)的Balb/c小鼠中以产生含有高浓度所需mAb的腹水。可使用本领域技术人员公知的方法从这样的腹水或从培养上清液中纯化mAb。

[0234] 还包括与本发明抗体的高变区具有特异性免疫反应性的抗独特型抗体。

[0235] 本发明提供了包含抗原结合结构域(ABD)的单克隆抗体或抗体片段,该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与单克隆小鼠抗体的ABD具有至少90%的序列同一性或相似性,该单克隆小鼠抗体包含:(i)包含氨基酸序列SEQ ID NO:69的重链可变区和包含氨基酸序列SEQ ID NO:71的轻链可变区(本文鉴别为4E5或hPVR.07);(ii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:73的重链可变区和包含氨基酸序列SEQ ID NO:75的轻链可变区(本文鉴别为7D4或hPVR.01);或(iii)包含氨基酸序列SEQ ID NO:77的重链可变区和包含氨基酸序列SEQ ID NO:79的轻链可变区(本文鉴别为5B9或hPVR.09)。这样的抗体可具有与相应的4E5、7D4或5B9的ABD具有至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%的序列同一性或相似性或者100%的序列同一性的ABD结构域。

[0236] 序列同一性为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置换确定为相同的氨基酸。

[0237] 本发明还提供了根据本发明的抗体分子的保守氨基酸变体。根据本发明的变体还可被制备成保留所编码的蛋白质的整体分子结构。考虑到包含所公开的蛋白质产物的单个氨基酸的性质,技术人员将认识到一些合理的置换。氨基酸置换,即“保守置换”,可以例如基于所涉及残基的极性、电荷、溶解度、疏水性、亲水性和/或两亲性质的相似性来进行。如本文所用的术语“抗体类似物”是指通过一个或多个保守氨基酸置换衍生自另一抗体的抗

体。

[0238] 如本文所用的术语“抗体变体”指包含本发明的抗体的任何分子。例如,其中抗体或其抗原结合片段与另一化学实体连接的融合蛋白被认为是抗体变体。

[0239] 抗体序列的类似物和变体也在本申请的范围。这些包括但不限于序列内氨基酸的保守和非保守置换、插入和缺失。这样的修饰和所得抗体类似物或变体在本发明的范围内,只要它们赋予或甚至改善抗体与人PVR的结合即可。

[0240] 如本领域技术人员已知的氨基酸的保守置换在本发明的范围内。保守氨基酸置换包括用具有相同类型的官能团或侧链(例如,脂肪族、芳香族、带正电荷、带负电荷)的另一氨基酸替换氨基酸。这些置换可增强口服生物利用度、渗透和对特定细胞群的靶向、免疫原性等。技术人员将认识到,改变、添加或缺失编码序列中的单个氨基酸或少量氨基酸的对肽、多肽或蛋白质序列的单个置换、缺失或添加是“保守修饰的变体”,其中改变导致用化学上相似的氨基酸置换氨基酸。提供功能上相似的氨基酸的保守置换表是本领域公知的。例如,根据本领域已知的一个表,以下六组各自含有彼此保守置换的氨基酸:

[0241] 1) 丙氨酸(A),丝氨酸(S),苏氨酸(T);

[0242] 2) 天冬氨酸(D),谷氨酸(E);

[0243] 3) 天冬酰胺(N),谷氨酰胺(Q);

[0244] 4) 精氨酸(R),赖氨酸(K);

[0245] 5) 异亮氨酸(I),亮氨酸(L),甲硫氨酸(M),缬氨酸(V);

[0246] 6) 苯丙氨酸(F),酪氨酸(Y),色氨酸(W)。

[0247] 应当强调,通过使用特定引物的测序方法来确定变体链序列。由于技术问题和不同的引物,在相同序列上采用的不同测序方法可导致略微不同的序列,特别是在序列末端中。因此,随本申请一起具体说明了抗PVR可变链序列的不同变体。

[0248] 如本文所用的术语“具有抗体的抗原结合部分的分子”和“抗原结合片段”旨在不仅包括任何同种型并且由任何动物细胞系或微生物产生的完整免疫球蛋白分子,还包括其抗原结合反应性部分,该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迷你抗体(参见例如,WO 93/15210、美国专利申请08/256,790、WO 96/13583、美国专利申请08/817,788、WO 96/37621、美国专利申请08/999,554)、以及掺入这样的反应性部分的单链抗体,以及其中已经物理插入这样的抗体反应性部分的任何其他类型的分子。这样的分子可通过任何已知技术提供,包括但不限于酶促切割、肽合成或重组技术。

[0249] 本文的单克隆抗体具体包括“嵌合”抗体,其中重链和/或轻链的一部分与衍生自特定物种或者属于特定抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,而链的其余部分与衍生自另一物种或者属于另一抗体类别或亚类的抗体中的相应序列相同或同源,以及这样的抗体的片段,只要它们表现出所需的生物活性(美国专利号4,816,567;和Morrison等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 81:6851-6855(1984))。此外,可进行互补决定区(CDR)移植以改变抗体分子的某些性质(包括亲和力或特异性)。CDR移植的非限制性实例公开于美国专利5,225,539中。

[0250] 嵌合抗体为其中不同部分衍生自不同动物物种的分子,诸如具有衍生自鼠mAb的可变区和人免疫球蛋白恒定区的那些分子。具有基本上来自人抗体(称为受体抗体)的可变

区框架残基和基本上来自小鼠抗体(称为供体抗体)的CDR的抗体也被称为人源化抗体。嵌合抗体主要用于降低应用中的免疫原性和提高产生的产率,例如,其中鼠mAb具有来自杂交瘤的更高产率但在人中具有更高的免疫原性,因此使用人/鼠嵌合mAb。嵌合抗体及其产生方法是本领域已知的(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)。

[0251] 根据一些具体实施方案,单克隆抗体为嵌合单克隆抗体。

[0252] 根据一些实施方案,嵌合抗体包含人源恒定区。

[0253] 根据一些实施方案,嵌合抗体的人恒定区选自:人IgG1、人IgG2、人IgG3和人IgG4。

[0254] 根据具体实施方案,嵌合单克隆抗体或其片段包含人IgG1亚型的恒定区亚类。

[0255] 根据具体实施方案,提供了识别PVR的嵌合单克隆抗体,其包含选自以下的六个CDR的组:(i) SEQ ID NO:4或80、6或81、8或82、12、14和16;(ii) SEQ ID NO:20或83、22、24、28、30和32;以及(iii) SEQ ID NO:36或84、38、40、44或85、46和48。

[0256] 药理学

[0257] 在药物制剂和医药制剂中,活性剂优选与一种或多种药学上可接受的载体和任选的任何其他治疗成分一起使用。在与制剂的其他成分相容并且对其接受者不过度有害的意义上,载体必须是药学上可接受的。以对实现如上所述的所需药理作用有效的量提供活性剂,并且以适合于实现所需的暴露的数量提供活性剂。

[0258] 通常,包含抗体的抗原结合部分或包含另一包含肽模拟物的多肽的本发明的抗体及其片段和偶联物将会悬浮在无菌盐水溶液中用于治疗用途。或者可配制药组合物以控制活性成分(包含抗体的抗原结合部分的分子)的释放或延长其在患者系统中的存在。许多合适的药物递送系统是已知的,并且包括例如可植入的药物释放系统、水凝胶、羟甲基纤维素、微胶囊、脂质体、微乳液、微球等。可通过使用聚合物制备控释制剂来复合或吸附根据本发明的分子。例如,生物相容性聚合物包括聚(乙烯-共-乙酸乙烯酯)基质和硬脂酸二聚体和癸二酸的聚酐共聚物的基质。根据本发明的分子即抗体或抗体片段从这样的基质中释放的速率取决于分子的分子量、基质内分子的量和分散颗粒的大小。

[0259] 本发明的药物组合物可通过任何合适的方式施用,诸如口服施用、局部施用、鼻内施用、皮下施用、肌肉施用、静脉内施用、动脉内施用、关节内施用、病灶内施用、肿瘤内施用或肠胃外施用。通常,使用静脉内(i.v.)施用来递送抗体。

[0260] 对于本领域普通技术人员将会显而易见的是,除此之外,根据本发明的分子的治疗有效量将取决于施用方案、所施用分子的单位剂量、该分子是否与其他治疗剂联合施用、患者的免疫状态和健康、所施用分子的治疗活性、其在血液循环中的持久性和治疗医生的判断。

[0261] 如本文所用的术语“治疗有效量”指对治疗哺乳动物疾病或病症有效的药物的量。在癌症的情况下,治疗有效量的药物可减少癌细胞的数量;减小肿瘤大小;抑制(即在一定程度上放慢并优选停止)癌细胞浸润到外周器官;抑制(即在一定程度上放慢并优选停止)肿瘤转移;在一定程度上抑制肿瘤生长;和/或在一定程度上缓解与病症相关的一种或多种症状。在药物可防止现有癌细胞生长和/或杀伤现有癌细胞的程度上,该药物可以是抑制细胞生长的和/或细胞毒性的。对于癌症疗法,可通过例如评估存活持续时间、疾病进展时间(TTP)、应答率(RR)、应答持续时间和/或生活质量来测量体内功效。

[0262] 通过本发明的治疗可改善的癌症包括但不限于：癌、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤和白血病或淋巴恶性肿瘤。这样的癌症的更具体的实例包括鳞状细胞癌、肺癌（包括小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞癌）、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、子宫内膜癌或子宫癌、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/滤泡性非霍奇金淋巴瘤（NHL）；小淋巴细胞（SL）NHL；中度/滤泡性NHL；中度弥漫性NHL；高级别成免疫细胞性NHL；高级别成淋巴细胞性NHL；高级别小无核裂细胞性；巨块型NHL；套细胞淋巴瘤；AIDS相关淋巴瘤；和瓦尔登斯特伦巨球蛋白血症）；慢性淋巴细胞白血病（CLL）；急性成淋巴细胞白血病（ALL）；多毛细胞白血病；慢性成髓细胞白血病；和移植后淋巴组织增生性病症（PTLD），以及与癥瘕性错构瘤病（phakomatoses）、水肿（诸如与脑肿瘤相关的水肿）和梅格斯综合征（Meigs's syndrome）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、卡波西肉瘤、类癌、头颈癌、黑素瘤、卵巢癌、间皮瘤和多发性骨髓瘤。本发明的治疗可改善的癌性病况包括转移性癌症。

[0263] 根据其他实施方案，根据本发明的药物组合物用于治疗以PVR过表达为特征的癌症。可使用已知的数据库如癌症基因组图谱（TCGA）鉴别与PVR过表达相关的癌症类型。根据某些实施方案，所述癌症选自肾上腺皮质癌（ACC）、嫌色性肾细胞癌（KICH）、肝细胞肝癌（LIHC）、结肠腺癌和直肠腺癌（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）、子宫体内膜癌（UCEC）、宫颈癌（CESC）、皮肤黑素瘤（SKCM）、间皮瘤（MESO）、膀胱尿路上皮癌（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）、多形性成胶质细胞瘤（GBM）、乳腺癌（BRCA）、低级别胶质瘤（LGG）和弥漫性大B细胞淋巴瘤（DLBC）。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0264] 将作为活性成分的本发明分子溶解、分散或掺和在赋形剂中，该赋形剂为药学上可接受的并且与活性成分相容，也是公知的。合适的赋形剂例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水（PBS）、右旋糖、甘油、乙醇等及其组合。其他合适的载体是本领域技术人员公知的。此外，如果需要，该组合物可含有少量辅助物质，诸如润湿或乳化剂、pH缓冲剂。

[0265] 根据本发明的药物组合物可与抗增生性组合物一起施用。

[0266] 如本文所用的术语“治疗”指治疗性治疗和预防性措施或防止性措施。需要治疗的患者包括已经罹患病症的患者以及需要预防病症的患者。

[0267] 术语“癌症”和“癌性”是指或描述哺乳动物中通常以不受调节的细胞生长为特征的生理状况。癌症的实例包括但不限于癌、淋巴瘤、胚细胞瘤、肉瘤和白血病。这样的癌症的更特定的实例包括黑素瘤、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。

[0268] 根据一些实施方案，治疗癌症的方法包括将施用药物组合物作为治疗方案的一部分，该治疗方案包括施用至少一种另外的抗癌剂。

[0269] 根据一些实施方案，所述抗癌剂选自抗代谢物、有丝分裂抑制剂、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

性代表本发明的单独实施方案。

[0270] 根据一些实施方案,所述抗代谢物选自阿糖胞苷、氟达拉滨、氟尿嘧啶、巯嘌呤、甲氨蝶呤、硫鸟嘌呤、吉西他滨和羟基脲。根据一些实施方案,所述有丝分裂抑制剂选自长春新碱、长春碱和长春瑞滨。根据一些实施方案,所述拓扑异构酶抑制剂选自拓扑替康和伊立替康。根据一些实施方案,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、氮芥、美法仑、噻替哌、达卡巴嗪和丙卡巴肼。根据一些实施方案,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。根据一些实施方案,所述拓扑异构酶II选自依托泊苷和替尼泊苷。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0271] 根据一些特定实施方案,所述另外的抗癌剂选自贝伐珠单抗、卡铂、环磷酰胺、盐酸多柔比星、盐酸吉西他滨、盐酸拓扑替康、噻替哌及其组合。每种可能性代表本发明的单独实施方案。

[0272] 根据本发明的单克隆抗体可用作与至少一种抗癌剂的联合疗法的一部分。根据一些实施方案,另外的抗癌剂为免疫调节剂、经激活的淋巴细胞、激酶抑制剂或化疗剂。

[0273] 根据一些实施方案,所述抗癌剂为免疫调节剂,可以是激动剂或拮抗剂,诸如针对免疫检查点分子的抗体。

[0274] 检查点免疫疗法阻断已被证明是癌症治疗令人兴奋的新场所。免疫检查点途径由一系列共刺激和抑制分子组成,该分子协同工作以维持自身耐受性并保护组织在生理条件下免受免疫系统的损害。肿瘤利用某些检查点途径以便逃避免疫系统。因此,抑制这样的途径已显现为有前途的抗癌治疗策略。

[0275] 抗细胞毒性T淋巴细胞4 (CTLA-4) 抗体易普利姆玛 (2011年批准) 是显示出有益于癌症患者治疗的第一种免疫治疗剂。在将抗原呈递至T细胞期间,抗体干扰抑制信号。抗程序性细胞死亡1 (PD-1) 抗体派姆单抗 (2014年批准) 阻断由T细胞表达的PD-1受体的负免疫调节性信号传导。2014年,另一抗PD-1剂被提交进行监管部门批准用于治疗非小细胞肺癌 (NSCLC)。积极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、淋巴细胞激活基因3 (LAG3)、CD137、OX40 (也称为CD134) 和杀伤细胞免疫球蛋白样受体 (KIR)。

[0276] 根据一些具体实施方案,所述免疫调节剂选自:抑制CTLA-4的抗体、抗人程序性细胞死亡蛋白1 (PD-1)、PD-L1和PD-L2抗体、经激活的细胞毒性淋巴细胞、淋巴细胞激活剂、抗CEACAM抗体、抗TIGIT抗体和RAF/MEK途径抑制剂。每种可能性代表本发明的单独实施方案。根据一些具体实施方案,另外的免疫调节剂选自PD-1的mAb、PD-L1的mAb、PD-L2的mAb、CEACAM1的mAb、CTLA-4的mAb、TIGIT的mAb、白介素2 (IL-2) 或淋巴因子激活的杀伤 (LAK) 细胞。

[0277] 根据其他实施方案,另外的抗癌剂为化疗剂。可与本发明的抗体一起施用或单独施用的化疗剂可包含本领域已知的表现出抗癌活性的任何这样的试剂,该化疗剂包括但不限于:米托蒽醌、拓扑异构酶抑制剂、纺锤体毒素长春花:长春碱、长春新碱、长春瑞滨 (泰素 (taxol))、紫杉醇、多西他赛;烷化剂:氮芥、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、美法仑、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:多柔比星 (阿霉素)、博来霉素、丝裂霉素;亚硝基脲: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。

[0278] 根据一些实施方案,化疗剂选自烷化剂、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、葱二酮取代的尿素、甲基胍衍生物、肾上腺皮质抑制剂、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。根据另一实施方案,化疗剂选自5-氟尿嘧啶(5-FU)、亚叶酸(LV)、伊立替康、奥沙利铂、卡培他滨、紫杉醇和多西他赛。可使用一种或多种化疗剂。

[0279] 在一些实施方案中,根据本发明的药物组合物用于治疗癌症或用于增强免疫应答。

[0280] 术语“增强免疫应答”指增加免疫系统的反应性并诱导或延长其记忆。根据本发明的药物组合物可用于在疫苗接种后刺激免疫系统。因此,在一个实施方案中,药物组合物可用于改善疫苗接种。

[0281] 在某些实施方案中,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单独实施方案。

[0282] 根据一些实施方案,包含根据本发明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通过单独施用用于治疗癌症。

[0283] 根据另一方面,本发明提供了治疗有需要的受试者的癌症的方法,包括向所述受试者施用治疗有效量的根据本发明的单克隆抗体或抗体片段。

[0284] 如本文所用的术语“有效量”指当施用于受试者时将会具有预期治疗作用的足够量的单克隆抗体或抗体片段。达到治疗最终结果所需的有效量可取决于许多因素,包括例如,肿瘤的具体类型和患者病况的严重程度,以及该组合是否进一步与放射共同施用。在本发明的上下文中,活性剂的有效量(剂量)应当足以影响受试者随时间的有益治疗反应,该有益的治疗反应包括但不限于抑制于肿瘤生长、降低肿瘤生长速率、防止肿瘤和转移生长以及增强存活率。

[0285] 可通过细胞培养物或实验动物中的标准药理学程序来确定本文所述组合物的毒性和治疗功效,例如,通过确定主题化合物的IC₅₀(提供50%抑制的浓度)和最大耐受剂量。从这些细胞培养测定和动物研究获得的数据可用于配制用于人类的一系列剂量。所述剂量可根据所用的剂型、所选的给药方案、用于治疗的药剂的组成和所用的施用途径以及其他相关因素而变化。确切的制剂、给药途径和剂量可由个体医生考虑到患者的病况来选择。根据待治疗病况的严重程度和反应性,给药也可以是缓释组合物的单次施用,治疗过程持续数天至数周或直至实现治愈或实现疾病状态的减轻。当然,待施用的组合物的量将取决于所治疗的受试者、痛苦的严重程度、施用方式、处方医生的判断以及所有其他相关因素。

[0286] 术语向受试者“施用”物质、化合物或药剂可使用本领域技术人员已知的各种方法之一进行。例如,化合物或药剂可肠内施用或肠胃外施用。肠内施用是指经由胃肠道的施用,包括口服施用、舌下施用或直肠施用。肠胃外施用包括静脉内施用、皮内施用、肌肉施用、腹膜内施用、皮下施用、眼睛施用、舌下施用、鼻内施用、通过吸入、脊柱内施用、脑内施用和经皮施用(通过吸收,例如通过皮肤导管)。化合物或药剂还可通过可再充电的或可生

物降解的聚合物装置或其他装置(例如贴剂和泵)或者制剂适当地引入,其提供化合物或药剂的延长、缓慢或控制的释放。施用也可进行例如一次、多次和/或在一个或多个延长的时期内进行。在一些实施方案中,施用包括直接施用(包括自行施用)和非直接施用(包括开药的行为)。例如,如本文所用,由指导患者自行施用药物或通过他人施用药物的医生和/或向患者提供药物处方的医生向患者施用药物。

[0287] 通常以约0.1mg/kg患者体重至约20mg/kg患者体重的范围施用抗体,一般约0.5mg/kg至约10mg/kg,经常约1mg/kg至约5mg/kg。对此,优选使用具有至少12小时,优选至少4天,更优选至多21天的循环半衰期的抗体。预期嵌合抗体具有至多14-21天的循环半衰期。在一些情况下,在治疗期间施用大负荷剂量随后施用周期性(例如,每周)维持剂量可能是有利的。还可通过缓释递送系统、泵和其他已知的递送系统来递送抗体以供连续输注。

[0288] 术语“约”意指应当假定特定值的可接受的误差范围,例如至多5%或10%。

[0289] 血管发生

[0290] 根据一个方面,本发明提供了用于治疗血管发生相关疾病或病症的根据本发明的药物组合物。

[0291] 血管发生是重要的细胞事件,其中血管内皮细胞增殖、修剪和重组以从先前存在的血管网络形成新血管。强有力的证据表明血管供应的发展对于正常和病理性增殖过程和炎症至关重要。血管隔室不仅对于胚胎发生期间的器官发育和分化是必需的,而且对于成人中的伤口愈合、组织修复和生殖功能也是必需的。

[0292] 血管发生还涉及各种病症的发病机理,该病症包括但不限于肿瘤、增生性视网膜病变、年龄相关性黄斑变性、类风湿性关节炎和银屑病。血管发生对于大多数原发性肿瘤的生长及其随后的转移至关重要。肿瘤可通过简单扩散至大小1-2mm来吸收足够的营养和氧气,此时它们的进一步生长需要血管供应的细化。该过程被认为涉及募集邻近的宿主成熟脉管系统以开始使新血管毛细血管萌芽,该新血管毛细血管朝向肿瘤块生长并随后渗入肿瘤块。另外,肿瘤血管发生涉及从骨髓募集循环内皮细胞前体细胞以促进新血管形成。

[0293] 诊断

[0294] 本发明进一步公开了用于诊断和预测癌症的方法。

[0295] 根据一个方面,本发明提供了受试者中癌症或感染性疾病的诊断和/或预后方法,该方法包括使用至少一种如本文所述的抗体确定所述受试者的生物样品中PVR的表达水平的步骤。

[0296] 术语“生物样品”包括从可用于诊断测定或监测测定的生物体获得的各种样品类型。该术语包括生物来源的血液和其他液体样品、实体组织样品,诸如活检标本或者组织培养物或由其衍生的细胞及其后代。此外,该术语可包括循环肿瘤或其他细胞。该术语具体包括临床样品,并且进一步包括细胞培养物、细胞上清液、细胞裂解物、血清、血浆、尿液、羊水、生物液体包括眼睛样品的房水和玻璃体、以及组织样品中的细胞。该术语还包括在获得后已经以任何方式进行操作的样品,诸如用试剂处理、增溶或针对某些组分进行富集。

[0297] 确定PVR的表达水平可通过如本文所述的标记的抗PVR抗体进行。确定表达可以例如通过ELISA进行。

[0298] 本发明的方法可进一步包括将所述表达水平与对照水平进行比较的步骤。

[0299] 提出以下实施例以更充分地说明本发明的一些实施方案。它们不应被解释为限制

本发明的范围。

[0300] 实施例

[0301] 实验程序

[0302] 现参考以下实施例,其与以上描述一起以非限制性方式说明本发明。

[0303] 通常,本文使用的术语和本发明中使用的实验室程序包括分子、生物化学、微生物学和重组DNA技术。这样的技术是本领域公知的。为了方便读者,在本文档中提供了涉及公知的程序的其他一般参考文献。实施例1.高PVR表达与不良预后相关

[0304] PVR和柄蛋白-2为抑制性受体TIGIT的配体(图2)。结果表明,高PVR表达水平与肺癌、乳腺癌和脂肪肉瘤(分别为图1A-图1C)的不良癌症预后相关。使用bioprofiling.de表明,PVR的GEO表达与存活相关,相关数据集为ID:GSE31210、GSE25055、GSE30929。此外,使用相同的分析表明,柄蛋白-2表达主要是存活的阳性标记。

[0305] 实施例2.抗PVR mAb的产生和纯化

[0306] 为了产生抗PVR抗体,产生并纯化重组蛋白hPVR-Fc,其作为免疫原与人PVR的细胞外部分和免疫球蛋白G载体的人Fc区结合。

[0307] 向BALB/c小鼠注射完全弗氏佐剂中的50 μ g免疫原,并且2周后注射不完全弗氏佐剂中的50 μ g免疫原。2周后,筛选血清的抗体滴度。用PBS中的免疫原加强最佳应答者(通过ELISA测定监测血清中抗hPVR-Fc抗体的滴度)。三天后,收集脾细胞,并在裂解红细胞后将该脾细胞与SP2/0细胞融合。将细胞接种在含有次黄嘌呤、氨基嘌呤和胸苷的20% RPMI 1640培养基中用于杂交瘤选择,并使用ELISA筛选细胞的mAb。通过将SP2/0骨髓瘤细胞与免疫小鼠的脾细胞融合来产生稳定的杂交瘤细胞系。

[0308] 进一步选择阳性结果(分泌识别hPVR-Fc的抗体的细胞系)以产生会具有以下几个差异特征的产物:a)高产率,以降低抗体生产成本;b)小鼠与人PVR以及免疫细胞受体的几种其他配体之间交叉反应性的缺乏;c)对在活细胞表面表达的天然的、成熟的人PVR分子的强结合能力(抗体选自全面的抗hPVR单克隆抗体库,其具有已证明在不同技术例如流式细胞术、蛋白质印迹、ELISA中识别hPVR的能力)。实际上,人和小鼠PVR具有高水平的同源性,并且不容易产生识别人同源物的小鼠单克隆抗体。更重要地,人PVR在其细胞外区域被广泛糖基化。因此,使用常见抗原(诸如衍生自大肠杆菌的抗原)产生识别天然蛋白质的抗体并不容易。

[0309] 本发明人已经使用hPVR-Fc免疫原以接近地模拟天然蛋白质人PVR,hPVR-Fc免疫原是在哺乳动物人胚肾293 (HEK 293T) 细胞中产生并通过免疫亲和层析在天然条件下纯化的分子。总之,从产生的抗hPVR mAb库中鉴别了识别活细胞上的天然人PVR形式的代表,这是开发在治疗期间会影响人免疫细胞应答的衍生物的先决条件。

[0310] 产生了四种抗PVR抗体。其中,三种抗体阻断抗PVR mAb,即抗体5B9(也称为hPVR.09)、抗体7D4(也称为hPVR.01)和抗体4E5(也称为hPVR.07)。这些抗体均阻断TIGIT-Ig结合(分别如图3B-图3D所示)。产生了不阻断TIGIT-Ig结合的第四抗体,其称为2G3(也称为hPVR.17)(图3A)。

[0311] 使用表面等离子共振 (SPR) Biosensor Biacore™ 100 (GE Healthcare) 来确定抗体与hPVR之间的 K_{off} 、 K_{on} 和 K_D (表1)。

[0312] 表1.通过Biacore™进行的抗体亲和力测量

[0313]	mAB	亲和力
	4E5	7.22E^{-10}
	5B9	1.62E^{-09}
	7D4	1.93E^{-10}

[0314] 使用本领域已知的方法从以上三种抗体产生包含SEQ ID NO:86 (对应于GenBank: AAA02914.1) 中阐述的人重链恒定区IgG1的嵌合单克隆抗体。

[0315] 实施例3. 用抗PVR mAb阻断PVR-TIGIT相互作用增强了人细胞系的NK细胞杀伤

[0316] 在测定前12小时用[35S]-甲硫氨酸标记靶细胞。添加指示的抗体至终浓度 $5\mu\text{g}/\text{ml}$, 并将其与标记的靶标(5000细胞/孔)在冰上一起温育30分钟。在96U形板中的RPMI培养基中在 37°C 下进行5小时的测定。将标记的靶标与效应NK细胞以10:1的E:T比率一起温育。温育后, 将板离心(1600rpm, 5min, 4°C), 收集上清液($50\mu\text{l}$)并将其转移至不透明的Opti板(Packard)。添加150 μl 闪烁液(Perkin Elmer)并通过微 β , β -计数器(Perkin Elmer)进行分析。通过将100 μl 的0.1N NaOH添加至等量的靶标(5000/孔)来确定最大标记。在仅含有靶细胞的孔中确定自发释放。最终的特异性杀伤计算如下: $((\text{放射性读数} - \text{自发释放}) / (\text{最大标记} - \text{自发释放})) * 100 = \text{特异性杀伤}$ 。如图4所示, 将NK细胞与抗PVR mAb 7D4 (也称为hPVR.01)一起培养增强了(两倍)人乳腺癌细胞系MDA-MB-231的NK细胞杀伤。

[0317] 实施例4. 用抗PVR mAb阻断PVR-TIGIT相互作用增强了人癌细胞系的NK细胞杀伤

[0318] 在测定前12小时用[35S]-甲硫氨酸标记靶细胞。添加指示的抗体至终浓度 $5\mu\text{g}/\text{ml}$, 并将其与标记的靶标(5000细胞/孔)在冰上一起温育30分钟。将细胞与效应NK细胞以10:1的E:T比率一起温育。在96U形板中的RPMI培养基中在 37°C 下进行5小时的测定。温育后, 将板离心(1600rpm, 5min 4°C), 收集上清液($50\mu\text{l}$)并将其转移至不透明的Opti板(Packard)。添加150 μl 闪烁液(Perkin Elmer)并通过微 β , β -计数器(Perkin Elmer)进行分析。通过将100 μl 的0.1N NaOH添加至等量的靶标(5000/孔)来确定最大标记。在仅含有靶细胞的孔中确定自发释放。最终的特异性杀伤计算如下: $((\text{放射性读数} - \text{自发释放}) / (\text{最大标记} - \text{自发释放})) * 100 = \text{特异性杀伤}$ 。

[0319] 如图5所示, 用抗PVR mAb 4E5 (也称为hPVR.07)阻断PVR-TIGIT相互作用增强了人癌细胞系HepG2 (肝细胞癌)的NK细胞杀伤。因此很显然, PVR的阻断导致靶细胞的杀伤增强。当4E5的人IgG对应物被用于嵌合形式的mAb时, 杀伤进一步增强。该杀伤等于阳性对照(Erbitux[®])。

[0320] 实施例5. 人肿瘤细胞系表达PVR和柄蛋白-2

[0321] 为了检查PVR和柄蛋白-2在肿瘤细胞上的表达, 使用分别 $2\mu\text{g}/\text{ml}$ 的抗PVR-4E5 Ab和抗柄蛋白-2Ab (克隆TX-31)通过FACS分析检查这些蛋白在不同肿瘤细胞系上的表达水平。如图6A-图6O所示, 多个人肿瘤细胞系表达PVR和柄蛋白-2。具体地, 显示黑素瘤细胞(图6A-图6E)、乳腺癌细胞(图6F-图6H)、结肠直肠细胞(图6I)、肾细胞(图6J)、肺癌细胞(图6K)、前列腺癌细胞(图6L)、脑肿瘤细胞(图6M)和肝细胞癌细胞(图6N-图6O)均表达PVR和柄蛋白-2。

[0322] 实施例6. PVR为主要的TIGIT配体

[0323] 图7A-图7C证明PVR为主要的TIGIT配体。具体地, 显示HepG2细胞(人肝细胞癌细胞)表达PVR和柄蛋白-2(图7A)。将HepG2细胞与纯化的抗PVR mAb 4E5, 也称为hPVR.07

(0.15 μ g/孔)一起培养,几乎完全阻断TIGIT-Ig结合(2 μ g/ml)(图7B),但这些细胞也表达柄蛋白-2。如图7C和图7D所示,很明显柄蛋白-2不被抗PVR mAb直接识别。

[0324] 实施例7.mAb克隆与人PVR和灵长类动物PVR的结合

[0325] 如图8A-图8C所示,使用FACS分析表明,经测试的所有抗PVR抗体克隆与人PVR(hPVR)结合。简言之,对细胞进行胰蛋白酶消化并将其转移以每孔 2×10^5 个细胞进行染色。在冰上在30分钟内添加指示的抗体。以2 μ g/ml的终浓度使用所有抗体。使用抗小鼠IgG-647进行结合的抗PVR Ab检测。小鼠IgG1 κ 用作阴性对照。

[0326] 图8A图示,通过在HepG2肝细胞癌细胞表面上进行FACS染色来检测内源性hPVR。在图8B中,使用鼠细胞系B16。鼠PVR序列与人物种不同,并且如缺乏信号可见(左侧组),小鼠PVR序列不能被抗人PVR抗体识别。当全长hPVR蛋白(NP_006496.4氨基酸1-418)在这些细胞中过表达时,所有三个克隆产生相同的信号(右侧组),这进一步支持了这种染色是这些Ab与人PVR蛋白特异性结合的结果的声明。

[0327] PVR氨基酸序列在一些物种中是保守的。在计算机中将人PVR的氨基酸保守性与非洲绿猴的PVR进行比较,发现非洲绿猴PVR与人PVR具有93%的相似性。非洲绿猴Vero细胞的FACS染色证明了猴的PVR被所有三种人mAb有效识别(图8C)。进一步发现这些人抗PVR抗体不识别来自犬和啮齿动物如仓鼠或小鼠的PVR。图9示出了表达犬PVR的MDCK细胞的FACS分析。可以看出,抗人Ab均未产生阳性信号,同时强TIGIT-Ig信号表明了PVR表达本身。

[0328] 实施例8.柄蛋白-2优先被DNAM-1结合

[0329] 以图10中的指示浓度使用TIGIT-Fc和DNAM-1-Fc来染色过表达h柄蛋白-2的细胞:RPMI-8866细胞系(图10A和图10B)或B16-hPVR细胞系(图10C和图10D)。使用抗人IgG-APC进行结合的融合蛋白检测,并通过FACS进行分析。

[0330] 对于PVR结合,TIGIT-Fc的信号比DNAM-1-Fc的信号高2-4倍,类似于先前的报道(Yu.X等人,2009,Nat Immunol.,10(1):48-57)。同时,h柄蛋白-2与DNAM-1-Fc的结合比其与TIGIT-Fc的结合强2-10倍,这与一项报道(Yu.X等人2009)相矛盾,但被另一项研究证实(Zhu Y等人,2016,J Exp Med.,8;213(2):167-76)。总之,结果表明DNAM-1是柄蛋白-2结合的优先受体。因此,PVR的阻断将防止TIGIT的抑制性信号传导,同时允许DNAM-1的共刺激信号传导。DNAM-1介导与携带其配体的其他细胞的细胞黏附。

[0331] 实施例9.抗PVR抗体增强T细胞增殖

[0332] 为了测试抗PVR mAb对T细胞增殖的影响,用羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)对外周血单核细胞(PBMC)进行染色,并将其在抗体的存在下以4 μ g/ml的浓度与靶细胞一起温育。在5-9天后,测量培养物中CD45阳性细胞的CFSE稀释度。如图11所示,抗PVR 5B9作为单一药剂的活性超过PD-1和CTLA4抗体活性。而且,具有人IgG1恒定区的嵌合抗PVR 4E5hIgG1克隆优于其小鼠对应物。随后,检查了抗PVR mAb与发现增强T细胞增殖的其他抗体的联合作用。用羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)对人PBMC进行染色,并将其在抗体的存在下以4 μ g/ml的浓度与靶细胞一起温育。在5-9天后,测量培养物中CD45阳性细胞的CFSE稀释度。结果显示,抗PVR 5B9与PD-1或CTLA-4组合的增殖活性超过PD-1与CTLA4组合的活性(图12)。而且,抗PVR 4E5与CTLA-4组合的活性等于PD-1与CTLA4组合的活性。随后,检查CD8的特异性诱导。如图13所示,抗PVR抗体CD8 T细胞增殖活性超过PD1的活性。并且,抗PVR 5B9抗体的诱导活性超过CTLA1的诱导活性。评估不同抗体的CD8/CD4增殖的比率(图14)。抗PVR 5B9

具有最高的CD8/CD4比率。使用可变重链和轻链的DNA序列构建嵌合抗体,该嵌合抗体包含人IgG1同种型恒定结构域和人IgGκ轻链恒定(CL)结构域。通过CFSE测定测量由小鼠和人嵌合对应抗体诱导的T细胞增殖。表2中示出的数字代表增殖与对照相比的相对水平。

[0333] 表2. 抗PVR抗体对T细胞增殖的影响的总结。

[0334]

克隆名称	Fc 类型	对 T 细胞增殖的影响 (CFSE)	对 T 细胞增殖细胞计数的影响
4E5	小鼠 IgG1	198%	320%
	人 IgG1	275%	353%
5B9	小鼠 IgG1	300%	410%
	人 IgG1	270%	364%
7D4	小鼠 IgG1	141%	260%
	人 IgG1	280%	360%

[0335] 随后,检查PVR-抗体对NK脱粒的影响。在脱粒期间,释放NK细胞中的溶细胞颗粒,并且存在于溶细胞颗粒表面上的溶酶体相关膜蛋白-1 (LAMP-1, CD107a) 被转运至细胞表面并变得易于抗体结合。该标志物允许鉴别经激活的NK细胞。将NK细胞与5种不同的靶细胞和抗PVR抗体(小鼠及其嵌合的人对应抗体)一起温育。使用抗CD107a抗体评估脱粒。

[0336] 表3. 抗PVR抗体对NK脱粒活性的影响。

[0337]

克隆	Fc 类型	靶癌细胞				
		MDA-MB-231	HepG2	MV-411	Me1-624*	A549
4E5	小鼠 IgG1	125%	150%	150%	120%	-
	人 IgG1	305%	260%	160%	145%	260%
5B9	小鼠 IgG1	132%	160%	150%	120%	-
	人 IgG1	300%	260%	220%	145%	240%
7D4	小鼠 IgG1	124%	160%	150%	115%	-
	人 IgG1	220%	200%	130%	120%	165%

[0338] *Me1 624中hPVR的表达较低,因此相对影响较低。

[0339] 如表3和图15所示,所有抗体显示NK脱粒活性,其中嵌合抗体与其相应的小鼠抗体相比具有显著更高的活性。

[0340] 实施例10. 抗PVR抗体在不存在免疫细胞的情况下减少肿瘤细胞的存活。

[0341] 在50微克/ml的不同抗PVR mAb存在下,使用MTT细胞存活测定在24小时内检查A549、U373、HCT116和Me1-624细胞的存活。如图16A-图16D和表4所示,与mIgG相比,5B9 mAb的PVR阻断显著降低了20%-40%的活力。

[0342] 表4. 抗PVR抗体对肿瘤细胞存活的影响。

[0343] 相对于mIgG处理的细胞,几种靶细胞系在24小时内死细胞的百分比。

[0344]	mAb	MDA-MB-231	HCT-116	Me1-624	A549
	4E5	12%	20%	-	25%
	5B9	20%	22%	32%	25%
	7D4	17%	27%	12%	25%

[0345] 实施例11.人源化小鼠模型中抗PVR抗体对人肿瘤的体内影响-短期人源化

[0346] 在体内研究抗体的抗肿瘤功效。为了估计本文所述抗体抑制人癌症的功效,在结合人源肿瘤和淋巴细胞的模型中研究抗体。向NOD scid γ (NSG) 小鼠植入hPBMC以恢复免疫能力并用人癌细胞进行攻击。在预定的时间点/肿瘤大小用根据本发明的抗人PVR抗体处理小鼠,在肿瘤攻击后的不同时间点以多种剂量施用抗人PVR抗体。用嵌合抗PVR抗体进行相同的实验。每周测量3次肿瘤生长曲线和体重,并且在处死小鼠后,对不同器官中的TIL和免疫群体进行广泛表型分析。

[0347] 根据Gupta P., Oncoimmunology. 2015 Mar 6; 4 (2): e981449, 进行具有PBMC huNSG小鼠中的肿瘤系的类似模型。

[0348] 实施例12.人源化小鼠模型中抗PVR抗体对人肿瘤的体内影响-长期人源化

[0349] 为了估计抗PVR抗体抑制人癌症的功效,在结合人源肿瘤和淋巴细胞的模型中研究抗体。照射新生的NOD scid γ (NSG) 幼崽并植入CD34+HSC以恢复免疫能力。在确定免疫细胞重建后1-2周用人癌细胞攻击小鼠,并在预定的时间点/肿瘤大小用根据本发明的抗人PVR抗体处理小鼠,在不同时间点以多种剂量施用抗人PVR抗体。用人源抗PVR抗体进行相同的实验。每周测量3次肿瘤生长曲线和体重。在处死小鼠后,对不同器官中TIL和免疫群体进行广泛表型分析。

[0350] 用于研究本发明抗体的肿瘤抑制活性的类似模型由The Jackson Laboratory建立 (<http://immune-checkpoint.com/wp-content/uploads/sites/24/2015/01/Day-1-15.45-Rick-Huntress.pdf>)。

[0351] 实施例13. IFN γ 分泌的诱导

[0352] 为了测试抗PVR mAb对细胞因子分泌的影响,将来自2个健康供体的人外周血单核细胞(PBMC)以1 μ g/ml和0.1 μ g/ml的浓度与靶细胞在抗体(mIgG、5B9mIgG、称为易普利姆玛的抗CTL-4抗体)的存在下一起温育。测量6天后培养物中的IFN γ 水平。观察到抗PVR 5B9抗体显著诱导IFN γ (对于1 μ g/ml, $P=7.34548E^{-11}$, 而对于0.1 μ g/ml, $P=2.73179E^{-08}$)。

[0353] IFN γ 分泌是抗肿瘤免疫的关键组分,抗PVR mAb诱导IFN γ 分泌表明这些化合物在癌症治疗中有潜在的附加抗肿瘤发生作用。

[0354] 具体实施方案的前述描述将充分揭示本发明的一般性质,其他人可通过应用当前知识容易地修改和/或改变这样的具体实施方案的各种应用而无需过度实验且不脱离一般概念,因此,在所公开实施方案的等同物的含义和范围内,应当并且旨在理解此类改变和修改。应当理解,本文采用的措辞或术语出于描述目的而非限制。

- [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] 里耶卡大学医学院
- [0004] <120> 人脊髓灰质炎病毒受体(PVR)特异性抗体
- [0005] <130> Yissum/0137 PCT
- [0006] <150> US 62/301727
- [0007] <151> 2016-03-01
- [0008] <150> US 62/364924
- [0009] <151> 2016-07-21
- [0010] <160> 86
- [0011] <170> PatentIn version 3.5
- [0012] <210> 1
- [0013] <211> 390
- [0014] <212> DNA
- [0015] <213> 小鼠
- [0016] <400> 1
- [0017] gaggtgaagc tgcaggagtc tggaggtggc ctggtgcagc ctggaggatc cctgaaactc 60
- [0018] tcctgtgcag cctcaggatt cgatttttagt agatactgga tgacttgggt ccggcaggct 120
- [0019] ccagggaag ggctagaatg gattggagaa attcatccag atagcagtaa gataaactat 180
- [0020] acgccatctc aaaaggataa attcatcatc tccagagaca acgccccaaa tacgctgttc 240
- [0021] ctgcaaatga gcaaagttag atttgaggac acagcccttt atttctgtgc aagacctgat 300
- [0022] ggtaactaca atgctctgga ctactgggtt caaggaacct cagtcaccgt ctcctcagcc 360
- [0023] aaaacgacac ccccatctgt ctatgtcgac 390
- [0024] <210> 2
- [0025] <211> 130
- [0026] <212> PRT
- [0027] <213> 小鼠
- [0028] <400> 2
- [0029] Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
- [0030] 1 5 10 15
- [0031] Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
- [0032] 20 25 30
- [0033] Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
- [0034] 35 40 45
- [0035] Gly Glu Ile His Pro Asp Ser Ser Lys Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Gln
- [0036] 50 55 60
- [0037] Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe
- [0038] 65 70 75 80

[0039] Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Phe Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Phe Cys
 [0040] 85 90 95
 [0041] Ala Arg Pro Asp Gly Asn Tyr Asn Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 [0042] 100 105 110
 [0043] Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr
 [0044] 115 120 125
 [0045] Val Asp
 [0046] 130
 [0047] <210> 3
 [0048] <211> 24
 [0049] <212> DNA
 [0050] <213> 小鼠
 [0051] <400> 3
 [0052] ggattcgatt ttagtagata ctgg 24
 [0053] <210> 4
 [0054] <211> 8
 [0055] <212> PRT
 [0056] <213> 小鼠
 [0057] <400> 4
 [0058] Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr Trp
 [0059] 1 5
 [0060] <210> 5
 [0061] <211> 45
 [0062] <212> DNA
 [0063] <213> 小鼠
 [0064] <400> 5
 [0065] gaaattcatc cagatagcag taagataaac tatacgccat ctcaa 45
 [0066] <210> 6
 [0067] <211> 15
 [0068] <212> PRT
 [0069] <213> 小鼠
 [0070] <400> 6
 [0071] Glu Ile His Pro Asp Ser Ser Lys Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Gln
 [0072] 1 5 10 15
 [0073] <210> 7
 [0074] <211> 33
 [0075] <212> DNA
 [0076] <213> 小鼠
 [0077] <400> 7

[0078]	cctgatggta actacaatgc tctggactac tgg 33
[0079]	<210> 8
[0080]	<211> 11
[0081]	<212> PRT
[0082]	<213> 小鼠
[0083]	<400> 8
[0084]	Pro Asp Gly Asn Tyr Asn Ala Leu Asp Tyr Trp
[0085]	1 5 10
[0086]	<210> 9
[0087]	<211> 374
[0088]	<212> DNA
[0089]	<213> 小鼠
[0090]	<400> 9
[0091]	ctgcaaccgg tgtacattcc gacattgtga tgactcagtc tcacaaattc atgtccacat 60
[0092]	cagtgggaga cagggtcagc atcacctgca aggccagtc ggaatgtgggt actgctgtaa 120
[0093]	cctggtatca acagaaacca ggacaatctc ctaaactact gatttactgg gcatccaccc 180
[0094]	ggcacactgg agtcctgat cgcttcacag gcagtgaatc tgggacagat ttactctca 240
[0095]	ccattagtga tgtgcaatct gaagacttgg caaattatct ctgtcagcaa tatagcaggt 300
[0096]	atccgtacac gttcggaggg gggaccaagc tggaaataaa acgggccgat gctgcaccaa 360
[0097]	ctgtatccgt cgac 374
[0098]	<210> 10
[0099]	<211> 124
[0100]	<212> PRT
[0101]	<213> 小鼠
[0102]	<400> 10
[0103]	Ala Thr Gly Val His Ser Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe
[0104]	1 5 10 15
[0105]	Met Ser Thr Ser Val Gly Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser
[0106]	20 25 30
[0107]	Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
[0108]	35 40 45
[0109]	Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val
[0110]	50 55 60
[0111]	Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Glu Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
[0112]	65 70 75 80
[0113]	Ile Ser Asp Val Gln Ser Glu Asp Leu Ala Asn Tyr Phe Cys Gln Gln
[0114]	85 90 95
[0115]	Tyr Ser Arg Tyr Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile
[0116]	100 105 110

[0117] Lys Arg Ala Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Val Asp
[0118] 115 120
[0119] <210> 11
[0120] <211> 33
[0121] <212> DNA
[0122] <213> 小鼠
[0123] <400> 11
[0124] aaggccagtc aggatgtggg tactgctgta acc 33
[0125] <210> 12
[0126] <211> 11
[0127] <212> PRT
[0128] <213> 小鼠
[0129] <400> 12
[0130] Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Thr
[0131] 1 5 10
[0132] <210> 13
[0133] <211> 21
[0134] <212> DNA
[0135] <213> 小鼠
[0136] <400> 13
[0137] tgggcatcca cccggcacac t 21
[0138] <210> 14
[0139] <211> 7
[0140] <212> PRT
[0141] <213> 小鼠
[0142] <400> 14
[0143] Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
[0144] 1 5
[0145] <210> 15
[0146] <211> 27
[0147] <212> DNA
[0148] <213> 小鼠
[0149] <400> 15
[0150] cagcaatata gcaggatatcc gtacacg 27
[0151] <210> 16
[0152] <211> 9
[0153] <212> PRT
[0154] <213> 小鼠
[0155] <400> 16

[0156]	Gln Gln Tyr Ser Arg Tyr Pro Tyr Thr	
[0157]	1	5
[0158]	<210> 17	
[0159]	<211> 526	
[0160]	<212> DNA	
[0161]	<213> 小鼠	
[0162]	<400> 17	
[0163]	gaattcgagg tgaagctgca ggagtctgga cctgagctgg tgaagcctgg ggcttcagtg	60
[0164]	aagatttcct gcaagacttc tggatacact ttactgaat acaccatgca ctgggtgagg	120
[0165]	cagagccatg gagagagcct tgagtggatt ggaggtattg atcctaacaa tgggtgtact	180
[0166]	aactacaacc agaacttcaa gggcaaggcc acattgactg tagacaagtc ctccagcaca	240
[0167]	gcctacatgg agctccgcag cctgacatct gaggattctg cggctctatta ctgtgcagga	300
[0168]	gtgattcctc tggagtactg ggggcaagga acctcagtc cgtctcctc agccaaaacg	360
[0169]	acacccccat ctgtctatgt cgaccatatg ggagagctcc caacgcgttg gatgcatagc	420
[0170]	ttgagtattc tatagtgtca cctaaatagc ttggcgtaat catggtcata gctgtttcct	480
[0171]	gtgtgaaatt gttatccgct cacaattcca cacaacatac gagccg	526
[0172]	<210> 18	
[0173]	<211> 144	
[0174]	<212> PRT	
[0175]	<213> 小鼠	
[0176]	<400> 18	
[0177]	Glu Phe Glu Val Lys Leu Gln Glu Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro	
[0178]	1	5 10 15
[0179]	Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr	
[0180]	20	25 30
[0181]	Glu Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ser His Gly Glu Ser Leu Glu	
[0182]	35	40 45
[0183]	Trp Ile Gly Gly Ile Asp Pro Asn Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln	
[0184]	50	55 60
[0185]	Asn Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr	
[0186]	65	70 75 80
[0187]	Ala Tyr Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr	
[0188]	85	90 95
[0189]	Tyr Cys Ala Gly Val Ile Pro Leu Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser	
[0190]	100	105 110
[0191]	Val Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr Pro Pro Ser Val Tyr Val Asp	
[0192]	115	120 125
[0193]	His Met Gly Glu Leu Pro Thr Arg Trp Met His Ser Leu Ser Ile Leu	
[0194]	130	135 140

[0195]	<210> 19
[0196]	<211> 30
[0197]	<212> DNA
[0198]	<213> 小鼠
[0199]	<400> 19
[0200]	ggatacactt tcactgaata caccatgcac 30
[0201]	<210> 20
[0202]	<211> 10
[0203]	<212> PRT
[0204]	<213> 小鼠
[0205]	<400> 20
[0206]	Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr Thr Met His
[0207]	1 5 10
[0208]	<210> 21
[0209]	<211> 51
[0210]	<212> DNA
[0211]	<213> 小鼠
[0212]	<400> 21
[0213]	ggtattgatc ctaacaatgg tggtactaac tacaaccaga acttcaaggg c 51
[0214]	<210> 22
[0215]	<211> 16
[0216]	<212> PRT
[0217]	<213> 小鼠
[0218]	<400> 22
[0219]	Gly Ile Asp Pro Asn Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Asn Phe Lys
[0220]	1 5 10 15
[0221]	<210> 23
[0222]	<211> 18
[0223]	<212> DNA
[0224]	<213> 小鼠
[0225]	<400> 23
[0226]	gtgattcctc tggagtac 18
[0227]	<210> 24
[0228]	<211> 6
[0229]	<212> PRT
[0230]	<213> 小鼠
[0231]	<400> 24
[0232]	Val Ile Pro Leu Glu Tyr
[0233]	1 5

[0234]	<210> 25
[0235]	<211> 321
[0236]	<212> DNA
[0237]	<213> 小鼠
[0238]	<400> 25
[0239]	gatattgtga tgacacagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagagtcagc 60
[0240]	gtcacctgca aggccagtca gaatgtgtat actaatgtag cctggatatca acagaaacca 120
[0241]	gggcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcatectacc ggtacagggg agtccctgat 180
[0242]	cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcaa tgtgcagtct 240
[0243]	gaagacttgg cagactatctt ctgtcagcaa tataacagct atcctctcgc gttcggctcg 300
[0244]	gggaccaagc tggagctgaa a 321
[0245]	<210> 26
[0246]	<211> 118
[0247]	<212> PRT
[0248]	<213> 小鼠
[0249]	<400> 26
[0250]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
[0251]	1 5 10 15
[0252]	Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Tyr Thr Asn
[0253]	20 25 30
[0254]	Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
[0255]	35 40 45
[0256]	Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Arg Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
[0257]	50 55 60
[0258]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
[0259]	65 70 75 80
[0260]	Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
[0261]	85 90 95
[0262]	Ala Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ala Asp Ala Ala
[0263]	100 105 110
[0264]	Pro Thr Val Ser Val Asp
[0265]	115
[0266]	<210> 27
[0267]	<211> 33
[0268]	<212> DNA
[0269]	<213> 小鼠
[0270]	<400> 27
[0271]	aaggccagtc agaattgtgta tactaatgta gcc 33
[0272]	<210> 28

[0273]	<211> 11
[0274]	<212> PRT
[0275]	<213> 小鼠
[0276]	<400> 28
[0277]	Lys Ala Ser Gln Asn Val Tyr Thr Asn Val Ala
[0278]	1 5 10
[0279]	<210> 29
[0280]	<211> 21
[0281]	<212> DNA
[0282]	<213> 小鼠
[0283]	<400> 29
[0284]	tcggcatcct accggtacag g 21
[0285]	<210> 30
[0286]	<211> 7
[0287]	<212> PRT
[0288]	<213> 小鼠
[0289]	<400> 30
[0290]	Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Arg
[0291]	1 5
[0292]	<210> 31
[0293]	<211> 27
[0294]	<212> DNA
[0295]	<213> 小鼠
[0296]	<400> 31
[0297]	cagcaatata acagctatcc tctcgcg 27
[0298]	<210> 32
[0299]	<211> 9
[0300]	<212> PRT
[0301]	<213> 小鼠
[0302]	<400> 32
[0303]	Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Ala
[0304]	1 5
[0305]	<210> 33
[0306]	<211> 345
[0307]	<212> DNA
[0308]	<213> 小鼠
[0309]	<400> 33
[0310]	caactgcagc agtctggagc tgagctgatg aagcctgggg cctcagtga gatttcctgc 60
[0311]	aaggctactg gctacacatt cagtaactac tggattgagt ggataaaaca gaggcctgga 120

[0312] catggccttg agtggattgg agagattttt cctggaagtg gtcgtattaa cttcaatgag 180
 [0313] aagttcaagg gcaaggccac attcactgca gacacatcct ccgacacaac ctacatgcaa 240
 [0314] ctcagcagcc tgacatctgc ggactctgcc gtctattact gtgcaagaac gaagatctat 300
 [0315] ggtaactcct ttgactactg gggccaaggc accactctca cagtc 345
 [0316] <210> 34
 [0317] <211> 115
 [0318] <212> PRT
 [0319] <213> 小鼠
 [0320] <400> 34
 [0321] Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala Ser Val
 [0322] 1 5 10 15
 [0323] Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Asn Tyr Trp Ile
 [0324] 20 25 30
 [0325] Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile Gly Glu
 [0326] 35 40 45
 [0327] Ile Phe Pro Gly Ser Gly Arg Ile Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys Gly
 [0328] 50 55 60
 [0329] Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asp Thr Thr Tyr Met Gln
 [0330] 65 70 75 80
 [0331] Leu Ser Ser Leu Thr Ser Ala Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
 [0332] 85 90 95
 [0333] Thr Lys Ile Tyr Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 [0334] 100 105 110
 [0335] Leu Thr Val
 [0336] 115
 [0337] <210> 35
 [0338] <211> 30
 [0339] <212> DNA
 [0340] <213> 小鼠
 [0341] <400> 35
 [0342] ggctacacat tcagtaacta ctggattgag 30
 [0343] <210> 36
 [0344] <211> 10
 [0345] <212> PRT
 [0346] <213> 小鼠
 [0347] <400> 36
 [0348] Gly Tyr Thr Phe Ser Asn Tyr Trp Ile Glu
 [0349] 1 5 10
 [0350] <210> 37

[0351]	<211> 51
[0352]	<212> DNA
[0353]	<213> 小鼠
[0354]	<400> 37
[0355]	gagatttttc ctggaagtgg tcgtattaac ttcaatgaga agttcaaggg c 51
[0356]	<210> 38
[0357]	<211> 16
[0358]	<212> PRT
[0359]	<213> 小鼠
[0360]	<400> 38
[0361]	Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Arg Ile Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys
[0362]	1 5 10 15
[0363]	<210> 39
[0364]	<211> 30
[0365]	<212> DNA
[0366]	<213> 小鼠
[0367]	<400> 39
[0368]	acgaagatct atggttaactc ctttgactac 30
[0369]	<210> 40
[0370]	<211> 10
[0371]	<212> PRT
[0372]	<213> 小鼠
[0373]	<400> 40
[0374]	Thr Lys Ile Tyr Gly Asn Ser Phe Asp Tyr
[0375]	1 5 10
[0376]	<210> 41
[0377]	<211> 324
[0378]	<212> DNA
[0379]	<213> 小鼠
[0380]	<400> 41
[0381]	gacatcgtga tgactcagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga caggggtcaac 60
[0382]	atcacctgca aggccagtca ggatgtgggt actgctgtgg tctggtatca acagaaacca 120
[0383]	ggacaatctc ctaaattatt gatttactgg gcatccagtc ggcacaatgg agtccctgat 180
[0384]	cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcaactctca cgattagtaa tgtgcagtct 240
[0385]	gaagacttgt cagattatct ctgtcagcaa tatagcaggt atccactcac attcggggct 300
[0386]	gggaccaagc tggagctgaa acgt 324
[0387]	<210> 42
[0388]	<211> 108
[0389]	<212> PRT

[0390] <213> 小鼠
 [0391] <400> 42
 [0392] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 [0393] 1 5 10 15
 [0394] Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
 [0395] 20 25 30
 [0396] Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 [0397] 35 40 45
 [0398] Tyr Trp Ala Ser Ser Arg His Asn Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 [0399] 50 55 60
 [0400] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
 [0401] 65 70 75 80
 [0402] Glu Asp Leu Ser Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Arg Tyr Pro Leu
 [0403] 85 90 95
 [0404] Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 [0405] 100 105
 [0406] <210> 43
 [0407] <211> 33
 [0408] <212> DNA
 [0409] <213> 小鼠
 [0410] <400> 43
 [0411] aaggccagtc aggatgtggg tactgctgtg gtc 33
 [0412] <210> 44
 [0413] <211> 11
 [0414] <212> PRT
 [0415] <213> 小鼠
 [0416] <400> 44
 [0417] Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val Val
 [0418] 1 5 10
 [0419] <210> 45
 [0420] <211> 21
 [0421] <212> DNA
 [0422] <213> 小鼠
 [0423] <400> 45
 [0424] tgggcatcca gtcggcaca t 21
 [0425] <210> 46
 [0426] <211> 7
 [0427] <212> PRT
 [0428] <213> 小鼠

[0429]	<400> 46
[0430]	Trp Ala Ser Ser Arg His Asn
[0431]	1 5
[0432]	<210> 47
[0433]	<211> 27
[0434]	<212> DNA
[0435]	<213> 小鼠
[0436]	<400> 47
[0437]	cagcaatata gcaggtatcc actcaca 27
[0438]	<210> 48
[0439]	<211> 9
[0440]	<212> PRT
[0441]	<213> 小鼠
[0442]	<400> 48
[0443]	Gln Gln Tyr Ser Arg Tyr Pro Leu Thr
[0444]	1 5
[0445]	<210> 49
[0446]	<211> 107
[0447]	<212> PRT
[0448]	<213> 人工序列
[0449]	<220>
[0450]	<223> 突变的链
[0451]	<400> 49
[0452]	Asp Ile Met Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
[0453]	1 5 10 15
[0454]	Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
[0455]	20 25 30
[0456]	Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
[0457]	35 40 45
[0458]	Tyr Trp Ala Ser Ser Arg His Ala Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
[0459]	50 55 60
[0460]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
[0461]	65 70 75 80
[0462]	Glu Asp Leu Ser Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Arg Tyr Pro Leu
[0463]	85 90 95
[0464]	Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
[0465]	100 105
[0466]	<210> 50
[0467]	<211> 107

[0468]	<212>	PRT
[0469]	<213>	人工序列
[0470]	<220>	
[0471]	<223>	突变的链
[0472]	<400>	50
[0473]	Asp Ile Met Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly	
[0474]	1 5 10 15	
[0475]	Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala	
[0476]	20 25 30	
[0477]	Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile	
[0478]	35 40 45	
[0479]	Tyr Trp Ala Ser Ser Arg His Arg Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly	
[0480]	50 55 60	
[0481]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser	
[0482]	65 70 75 80	
[0483]	Glu Asp Leu Ser Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Arg Tyr Pro Leu	
[0484]	85 90 95	
[0485]	Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys	
[0486]	100 105	
[0487]	<210>	51
[0488]	<211>	107
[0489]	<212>	PRT
[0490]	<213>	人工序列
[0491]	<220>	
[0492]	<223>	突变的链
[0493]	<400>	51
[0494]	Asp Ile Met Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly	
[0495]	1 5 10 15	
[0496]	Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala	
[0497]	20 25 30	
[0498]	Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile	
[0499]	35 40 45	
[0500]	Tyr Trp Ala Ser Ser Arg His Asp Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly	
[0501]	50 55 60	
[0502]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser	
[0503]	65 70 75 80	
[0504]	Glu Asp Leu Ser Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Arg Tyr Pro Leu	
[0505]	85 90 95	
[0506]	Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys	

[0507]	100	105
[0508]	<210> 52	
[0509]	<211> 107	
[0510]	<212> PRT	
[0511]	<213> 人工序列	
[0512]	<220>	
[0513]	<223> 突变的链	
[0514]	<400> 52	
[0515]	Asp Ile Met Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly	
[0516]	1 5 10 15	
[0517]	Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala	
[0518]	20 25 30	
[0519]	Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile	
[0520]	35 40 45	
[0521]	Tyr Trp Ala Ser Ser Arg His Glu Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly	
[0522]	50 55 60	
[0523]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser	
[0524]	65 70 75 80	
[0525]	Glu Asp Leu Ser Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Arg Tyr Pro Leu	
[0526]	85 90 95	
[0527]	Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys	
[0528]	100 105	
[0529]	<210> 53	
[0530]	<211> 107	
[0531]	<212> PRT	
[0532]	<213> 人工序列	
[0533]	<220>	
[0534]	<223> 突变的链	
[0535]	<400> 53	
[0536]	Asp Ile Met Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly	
[0537]	1 5 10 15	
[0538]	Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala	
[0539]	20 25 30	
[0540]	Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile	
[0541]	35 40 45	
[0542]	Tyr Trp Ala Ser Ser Arg His Pro Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly	
[0543]	50 55 60	
[0544]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser	
[0545]	65 70 75 80	

[0546]	Glu Asp Leu Ser Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Arg Tyr Pro Leu
[0547]	85 90 95
[0548]	Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
[0549]	100 105
[0550]	<210> 54
[0551]	<211> 107
[0552]	<212> PRT
[0553]	<213> 人工序列
[0554]	<220>
[0555]	<223> 突变的链
[0556]	<400> 54
[0557]	Asp Ile Met Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
[0558]	1 5 10 15
[0559]	Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
[0560]	20 25 30
[0561]	Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
[0562]	35 40 45
[0563]	Tyr Trp Ala Ser Ser Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
[0564]	50 55 60
[0565]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
[0566]	65 70 75 80
[0567]	Glu Asp Leu Ser Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Arg Tyr Pro Leu
[0568]	85 90 95
[0569]	Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
[0570]	100 105
[0571]	<210> 55
[0572]	<211> 7
[0573]	<212> PRT
[0574]	<213> 人工序列
[0575]	<220>
[0576]	<223> 突变的CDR
[0577]	<220>
[0578]	<221> MISC_FEATURE
[0579]	<222> (7) .. (7)
[0580]	<223> Xaa为选自Ala、Arg、Asp、Glu、Pro和Thr的氨基酸残基
[0581]	<400> 55
[0582]	Trp Ala Ser Ser Arg His Xaa
[0583]	1 5
[0584]	<210> 56

[0585] <211> 7
[0586] <212> PRT
[0587] <213> 人工序列
[0588] <220>
[0589] <223> 突变的CDR
[0590] <400> 56
[0591] Trp Ala Ser Ser Arg His Ala
[0592] 1 5
[0593] <210> 57
[0594] <211> 7
[0595] <212> PRT
[0596] <213> 人工序列
[0597] <220>
[0598] <223> 突变的CDR
[0599] <400> 57
[0600] Trp Ala Ser Ser Arg His Arg
[0601] 1 5
[0602] <210> 58
[0603] <211> 7
[0604] <212> PRT
[0605] <213> 人工序列
[0606] <220>
[0607] <223> 突变的CDR
[0608] <400> 58
[0609] Trp Ala Ser Ser Arg His Asp
[0610] 1 5
[0611] <210> 59
[0612] <211> 7
[0613] <212> PRT
[0614] <213> 人工序列
[0615] <220>
[0616] <223> 突变的CDR
[0617] <400> 59
[0618] Trp Ala Ser Ser Arg His Glu
[0619] 1 5
[0620] <210> 60
[0621] <211> 7
[0622] <212> PRT
[0623] <213> 人工序列

[0624]	<220>	
[0625]	<223>	突变的CDR
[0626]	<400>	60
[0627]	Trp Ala Ser Ser Arg His Pro	
[0628]	1	5
[0629]	<210>	61
[0630]	<211>	7
[0631]	<212>	PRT
[0632]	<213>	人工序列
[0633]	<220>	
[0634]	<223>	突变的CDR
[0635]	<400>	61
[0636]	Trp Ala Ser Ser Arg His Thr	
[0637]	1	5
[0638]	<210>	62
[0639]	<211>	321
[0640]	<212>	DNA
[0641]	<213>	人工序列
[0642]	<220>	
[0643]	<223>	突变的多核苷酸
[0644]	<400>	62
[0645]	gacatcatga tgaccagtc tcacaaattc atgtctacat ctgtaggaga cagagtcaac	60
[0646]	atcacttgca aggcgagtca ggatgtgggt actgctgtgg tctggtatca gcagaaacca	120
[0647]	gggcaatctc ctaagttgct gatctattgg gcatccagtc ggcacgctgg ggtcccagat	180
[0648]	aggttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tgtgcagtct	240
[0649]	gaagatttgt cagattatct ctgccaacag tatagcagat accctctcac attcggggct	300
[0650]	gggaccaagc tggagctcaa a	321
[0651]	<210>	63
[0652]	<211>	321
[0653]	<212>	DNA
[0654]	<213>	人工序列
[0655]	<220>	
[0656]	<223>	突变的多核苷酸
[0657]	<400>	63
[0658]	gacatcatga tgaccagtc tcacaaattc atgtctacat ctgtaggaga cagagtcaac	60
[0659]	atcacttgca aggcgagtca ggatgtgggt actgctgtgg tctggtatca gcagaaacca	120
[0660]	gggcaatctc ctaagttgct gatctattgg gcatccagtc ggcacagagg ggtcccagat	180
[0661]	aggttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcaa tgtgcagtct	240
[0662]	gaagatttgt cagattatct ctgccaacag tatagcagat accctctcac attcggggct	300

[0663]	gggaccaagc tggagctcaa a 321
[0664]	<210> 64
[0665]	<211> 321
[0666]	<212> DNA
[0667]	<213> 人工序列
[0668]	<220>
[0669]	<223> 突变的多核苷酸
[0670]	<400> 64
[0671]	gacatcatga tgaccagtc tcacaaattc atgtctacat ctgtaggaga cagagtcaac 60
[0672]	atcacttgca aggcgagtca ggatgtgggt actgctgtgg tctggtatca gcagaaacca 120
[0673]	gggcaatctc ctaagttgct gatctattgg gcatccagtc ggcacgatgg ggtcccagat 180
[0674]	aggttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcaa tgtgcagtct 240
[0675]	gaagatttgt cagattattt ctgccaacag tatagcagat accctctcac attcggggct 300
[0676]	gggaccaagc tggagctcaa a 321
[0677]	<210> 65
[0678]	<211> 321
[0679]	<212> DNA
[0680]	<213> 人工序列
[0681]	<220>
[0682]	<223> 突变的多核苷酸
[0683]	<400> 65
[0684]	gacatcatga tgaccagtc tcacaaattc atgtctacat ctgtaggaga cagagtcaac 60
[0685]	atcacttgca aggcgagtca ggatgtgggt actgctgtgg tctggtatca gcagaaacca 120
[0686]	gggcaatctc ctaagttgct gatctattgg gcatccagtc ggcacgaggg ggtcccagat 180
[0687]	aggttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcaa tgtgcagtct 240
[0688]	gaagatttgt cagattattt ctgccaacag tatagcagat accctctcac attcggggct 300
[0689]	gggaccaagc tggagctcaa a 321
[0690]	<210> 66
[0691]	<211> 321
[0692]	<212> DNA
[0693]	<213> 人工序列
[0694]	<220>
[0695]	<223> 突变的多核苷酸
[0696]	<400> 66
[0697]	gacatcatga tgaccagtc tcacaaattc atgtctacat ctgtaggaga cagagtcaac 60
[0698]	atcacttgca aggcgagtca ggatgtgggt actgctgtgg tctggtatca gcagaaacca 120
[0699]	gggcaatctc ctaagttgct gatctattgg gcatccagtc ggcaccctgg ggtcccagat 180
[0700]	aggttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcaa tgtgcagtct 240
[0701]	gaagatttgt cagattattt ctgccaacag tatagcagat accctctcac attcggggct 300

[0702]	gggaccaagc tggagctcaa a 321
[0703]	<210> 67
[0704]	<211> 321
[0705]	<212> DNA
[0706]	<213> 人工序列
[0707]	<220>
[0708]	<223> 突变的多核苷酸
[0709]	<400> 67
[0710]	gacatcatga tgaccagtc tcacaaattc atgtctacat ctgtaggaga cagagtcaac 60
[0711]	atcacttgca aggcgagtc ggatgtgggt actgctgtgg tctggtatca gcagaaacca 120
[0712]	gggcaatctc ctaagttgct gatctattgg gcatccagtc ggcacactgg ggtcccagat 180
[0713]	aggttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcaa tgtgcagtct 240
[0714]	gaagatttgt cagattatct ctgccaacag tatagcagat accctctcac attcggggct 300
[0715]	gggaccaagc tggagctcaa a 321
[0716]	<210> 68
[0717]	<211> 356
[0718]	<212> DNA
[0719]	<213> 小鼠
[0720]	<400> 68
[0721]	gaggtgaagc ttctcgagtc tggaggtggc ctggtgcagc ctggaggatc cctgaaactc 60
[0722]	tcctgtgcag cctcaggatt cgatttttagt agatactgga tgacttgggt cccgcaggct 120
[0723]	ccagggaag ggctagaatg gattggagaa attcatccag atagcagtaa gataaactat 180
[0724]	acgccatctc aaaaggataa attcatcacc tccagagaca acgcaaaaaa tacgctgttc 240
[0725]	ctgcaaatga gcaaagttag atttgaggac acagcccttt atttctgtgc aagacctgat 300
[0726]	ggtaactaca atgctctgga ctactgggt caaggaacct cagtcaccgt ctcctc 356
[0727]	<210> 69
[0728]	<211> 119
[0729]	<212> PRT
[0730]	<213> 小鼠
[0731]	<400> 69
[0732]	Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0733]	1 5 10 15
[0734]	Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser Arg Tyr
[0735]	20 25 30
[0736]	Trp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
[0737]	35 40 45
[0738]	Gly Glu Ile His Pro Asp Ser Ser Lys Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Gln
[0739]	50 55 60
[0740]	Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Phe

[0741]	65	70	75	80
[0742]	Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Phe Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Phe Cys			
[0743]		85	90	95
[0744]	Ala Arg Pro Asp Gly Asn Tyr Asn Ala Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
[0745]		100	105	110
[0746]	Thr Ser Val Thr Val Ser Ser			
[0747]		115		
[0748]	<210> 70			
[0749]	<211> 321			
[0750]	<212> DNA			
[0751]	<213> 小鼠			
[0752]	<400> 70			
[0753]	gacattgtga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtgggaga cagggtcagc	60		
[0754]	atcacctgca aggccagtca ggatgtgggt actgctgtaa cctggtatca acagaaacca	120		
[0755]	ggacaatctc ctaaactact gatttactgg gcatccaccc ggcacactgg agtccctgat	180		
[0756]	cgcttcacag gcagtgaatc tgggacagat ttactctca ccattagtga tgtgcaatct	240		
[0757]	gaagacttgg caaattatct ctgtcagcaa tatagcaggt atccgtacac gttcggaggg	300		
[0758]	gggaccaagc tggaaataaa a	321		
[0759]	<210> 71			
[0760]	<211> 107			
[0761]	<212> PRT			
[0762]	<213> 小鼠			
[0763]	<400> 71			
[0764]	Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly			
[0765]	1	5	10	15
[0766]	Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala			
[0767]		20	25	30
[0768]	Val Thr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile			
[0769]		35	40	45
[0770]	Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly			
[0771]		50	55	60
[0772]	Ser Glu Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asp Val Gln Ser			
[0773]	65	70	75	80
[0774]	Glu Asp Leu Ala Asn Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Arg Tyr Pro Tyr			
[0775]		85	90	95
[0776]	Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
[0777]		100	105	
[0778]	<210> 72			
[0779]	<211> 345			

[0780] <212> DNA
 [0781] <213> 小鼠
 [0782] <400> 72
 [0783] gaggtccagc tgcaacagtc tggacctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagatt 60
 [0784] tcctgcaaga cttctggata cactttcact gaatacacca tgcactgggt gaagcagagc 120
 [0785] catggagaga gccttgagtg gattggaggt attgataccta acaatggtgg tactaactac 180
 [0786] aaccagaact tcaagggcaa ggccacattg actgtagaca agtcctccag cacagcctac 240
 [0787] atggagctcc gcagcctgac atctgaggat tctgcggtct attactgtgc aggagtgatt 300
 [0788] cctctggagt actgggggca aggaacctca gtcaccgtct cctca 345
 [0789] <210> 73
 [0790] <211> 115
 [0791] <212> PRT
 [0792] <213> 小鼠
 [0793] <400> 73
 [0794] Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 [0795] 1 5 10 15
 [0796] Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 [0797] 20 25 30
 [0798] Thr Met His Trp Val Lys Gln Ser His Gly Glu Ser Leu Glu Trp Ile
 [0799] 35 40 45
 [0800] Gly Gly Ile Asp Pro Asn Asn Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Gln Asn Phe
 [0801] 50 55 60
 [0802] Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 [0803] 65 70 75 80
 [0804] Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0805] 85 90 95
 [0806] Ala Gly Val Ile Pro Leu Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr
 [0807] 100 105 110
 [0808] Val Ser Ser
 [0809] 115
 [0810] <210> 74
 [0811] <211> 321
 [0812] <212> DNA
 [0813] <213> 小鼠
 [0814] <400> 74
 [0815] gacattgtga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagagtcagc 60
 [0816] gtcacctgca aggccagtca gaatgtgtat actaatgtag cctggtatca acagaaacca 120
 [0817] gggcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcatacctacc ggtacagggg agtcctgat 180
 [0818] cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcaa tgtgcagtct 240

[0819] gaagacttgg cagactatTT ctgtcagcaa tataacagct atcctctcgc gttcggctcg 300
 [0820] gggacaaagt tggaaataaa a 321
 [0821] <210> 75
 [0822] <211> 107
 [0823] <212> PRT
 [0824] <213> 小鼠
 [0825] <400> 75
 [0826] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 [0827] 1 5 10 15
 [0828] Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Tyr Thr Asn
 [0829] 20 25 30
 [0830] Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Ile
 [0831] 35 40 45
 [0832] Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Arg Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 [0833] 50 55 60
 [0834] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
 [0835] 65 70 75 80
 [0836] Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
 [0837] 85 90 95
 [0838] Ala Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 [0839] 100 105
 [0840] <210> 76
 [0841] <211> 357
 [0842] <212> DNA
 [0843] <213> 小鼠
 [0844] <400> 76
 [0845] caggttcagt tgcagcagtc tggagctgag ctgatgaagc ctggggcctc agtgaagatt 60
 [0846] tcctgcaagg ctactggcta cacattcagt aactactgga ttgagtggat aaaacagagg 120
 [0847] cctggacatg gccttgagtg gatttgagag atttttcctg gaagtggtcg tattaacttc 180
 [0848] aatgagaagt tcaagggcaa ggccacattc actgcagaca catcctccga cacaacctac 240
 [0849] atgcaactca gcagcctgac atctgcggac tctgccgtct attactgtgc aagaacgaag 300
 [0850] atctatggta actcctttga ctactggggc caaggcacca ctctcacagt ctcccca 357
 [0851] <210> 77
 [0852] <211> 119
 [0853] <212> PRT
 [0854] <213> 小鼠
 [0855] <400> 77
 [0856] Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly Ala
 [0857] 1 5 10 15

[0858]	Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Thr Gly Tyr Thr Phe Ser Asn Tyr		
[0859]	20	25	30
[0860]	Trp Ile Glu Trp Ile Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu Trp Ile		
[0861]	35	40	45
[0862]	Gly Glu Ile Phe Pro Gly Ser Gly Arg Ile Asn Phe Asn Glu Lys Phe		
[0863]	50	55	60
[0864]	Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asp Thr Thr Tyr		
[0865]	65	70	75
[0866]	Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Ala Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0867]	85	90	95
[0868]	Ala Arg Thr Lys Ile Tyr Gly Asn Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly		
[0869]	100	105	110
[0870]	Thr Thr Leu Thr Val Ser Pro		
[0871]	115		
[0872]	<210> 78		
[0873]	<211> 321		
[0874]	<212> DNA		
[0875]	<213> 小鼠		
[0876]	<400> 78		
[0877]	gacattatga tgaccagtc tcacaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcaac	60	
[0878]	atcacctgca aggccagtca ggatgtgggt actgctgtgg tctggtatca acagaaacca	120	
[0879]	ggacaatctc ctaaattatt gatttactgg gcatccagtc ggcacaatgg agtcctgat	180	
[0880]	cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca cgattagtaa tgtgcagtct	240	
[0881]	gaagacttgt cagattatct ctgtcagcaa tatagcaggt atccactcac attcggggct	300	
[0882]	gggaccaagc tggagctgaa a	321	
[0883]	<210> 79		
[0884]	<211> 107		
[0885]	<212> PRT		
[0886]	<213> 小鼠		
[0887]	<400> 79		
[0888]	Asp Ile Met Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly		
[0889]	1	5	10
[0890]	Asp Arg Val Asn Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala		
[0891]	20	25	30
[0892]	Val Val Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile		
[0893]	35	40	45
[0894]	Tyr Trp Ala Ser Ser Arg His Asn Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly		
[0895]	50	55	60
[0896]	Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser		

[0897]	65	70	75	80
[0898]	Glu Asp Leu Ser Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ser Arg Tyr Pro Leu			
[0899]	85	90	95	
[0900]	Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys			
[0901]	100	105		
[0902]	<210> 80			
[0903]	<211> 5			
[0904]	<212> PRT			
[0905]	<213> 小鼠			
[0906]	<400> 80			
[0907]	Arg Tyr Trp Met Thr			
[0908]	1	5		
[0909]	<210> 81			
[0910]	<211> 17			
[0911]	<212> PRT			
[0912]	<213> 小鼠			
[0913]	<400> 81			
[0914]	Glu Ile His Pro Asp Ser Ser Lys Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Gln Lys			
[0915]	1	5	10	15
[0916]	Asp			
[0917]	<210> 82			
[0918]	<211> 10			
[0919]	<212> PRT			
[0920]	<213> 小鼠			
[0921]	<400> 82			
[0922]	Pro Asp Gly Asn Tyr Asn Ala Leu Asp Tyr			
[0923]	1	5	10	
[0924]	<210> 83			
[0925]	<211> 5			
[0926]	<212> PRT			
[0927]	<213> 小鼠			
[0928]	<400> 83			
[0929]	Glu Tyr Thr Met His			
[0930]	1	5		
[0931]	<210> 84			
[0932]	<211> 6			
[0933]	<212> PRT			
[0934]	<213> 小鼠			
[0935]	<400> 84			

[0936]	Ser Asn Tyr Trp Ile Glu
[0937]	1 5
[0938]	<210> 85
[0939]	<211> 10
[0940]	<212> PRT
[0941]	<213> 小鼠
[0942]	<400> 85
[0943]	Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala Val
[0944]	1 5 10
[0945]	<210> 86
[0946]	<211> 329
[0947]	<212> PRT
[0948]	<213> 智人
[0949]	<400> 86
[0950]	Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser
[0951]	1 5 10 15
[0952]	Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
[0953]	20 25 30
[0954]	Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly
[0955]	35 40 45
[0956]	Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu
[0957]	50 55 60
[0958]	Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr
[0959]	65 70 75 80
[0960]	Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys
[0961]	85 90 95
[0962]	Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
[0963]	100 105 110
[0964]	Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
[0965]	115 120 125
[0966]	Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
[0967]	130 135 140
[0968]	Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
[0969]	145 150 155 160
[0970]	Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
[0971]	165 170 175
[0972]	Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
[0973]	180 185 190
[0974]	Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys

[0975]	195	200	205
[0976]	Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln		
[0977]	210	215	220
[0978]	Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met		
[0979]	225	230	235
[0980]	Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro		
[0981]	245	250	255
[0982]	Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn		
[0983]	260	265	270
[0984]	Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu		
[0985]	275	280	285
[0986]	Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val		
[0987]	290	295	300
[0988]	Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln		
[0989]	305	310	315
[0990]	Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
[0991]	325		

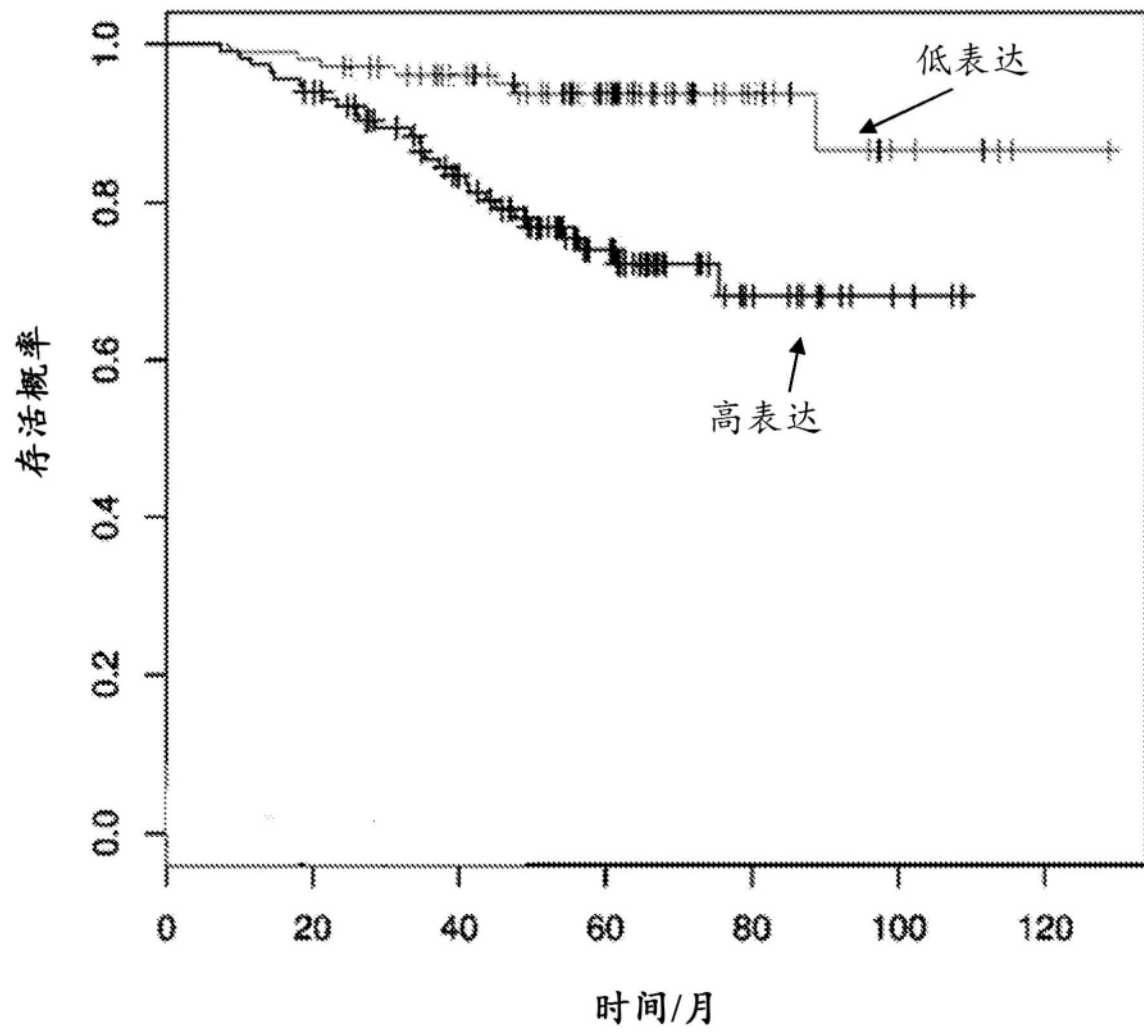


图1A

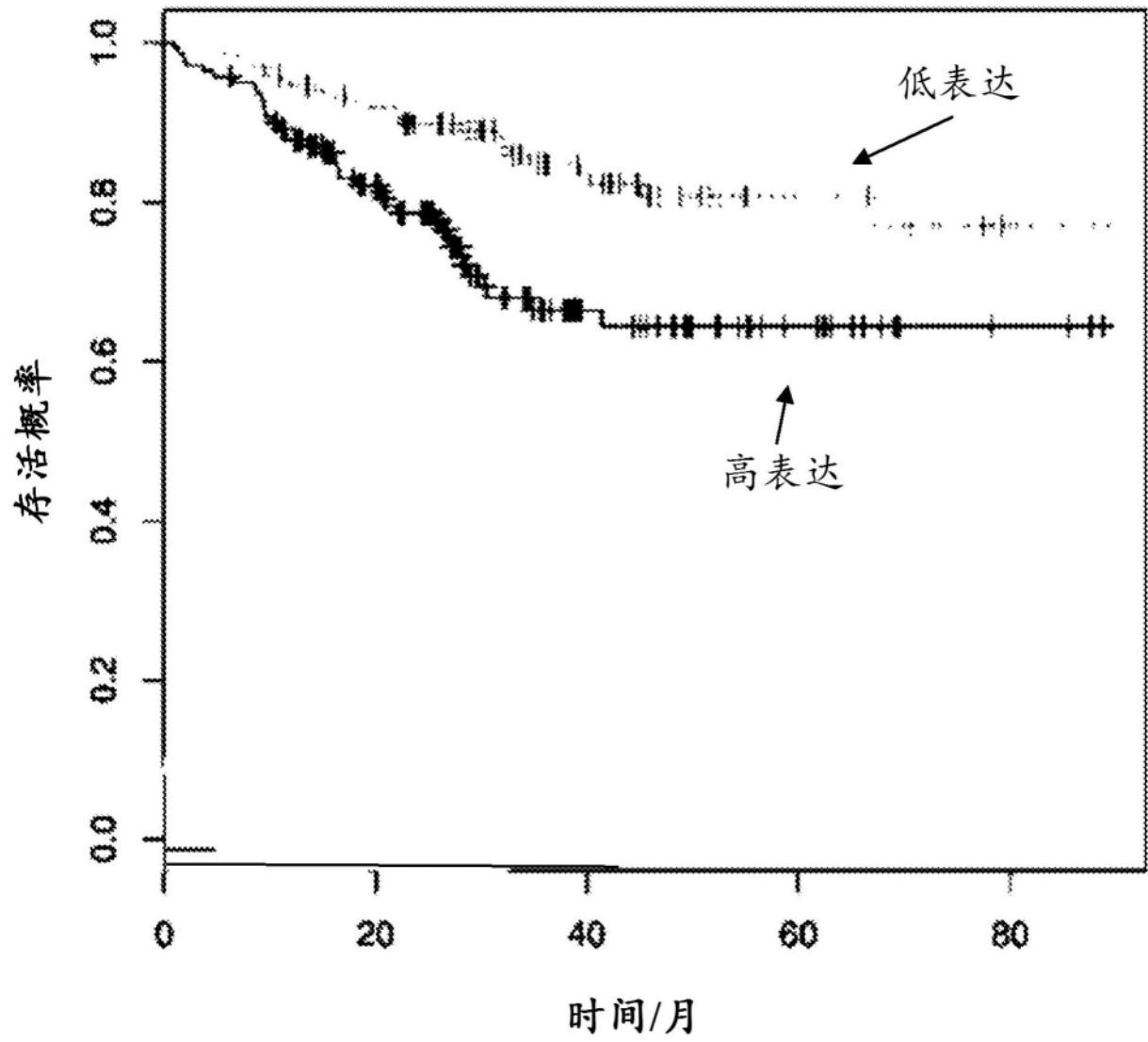


图1B

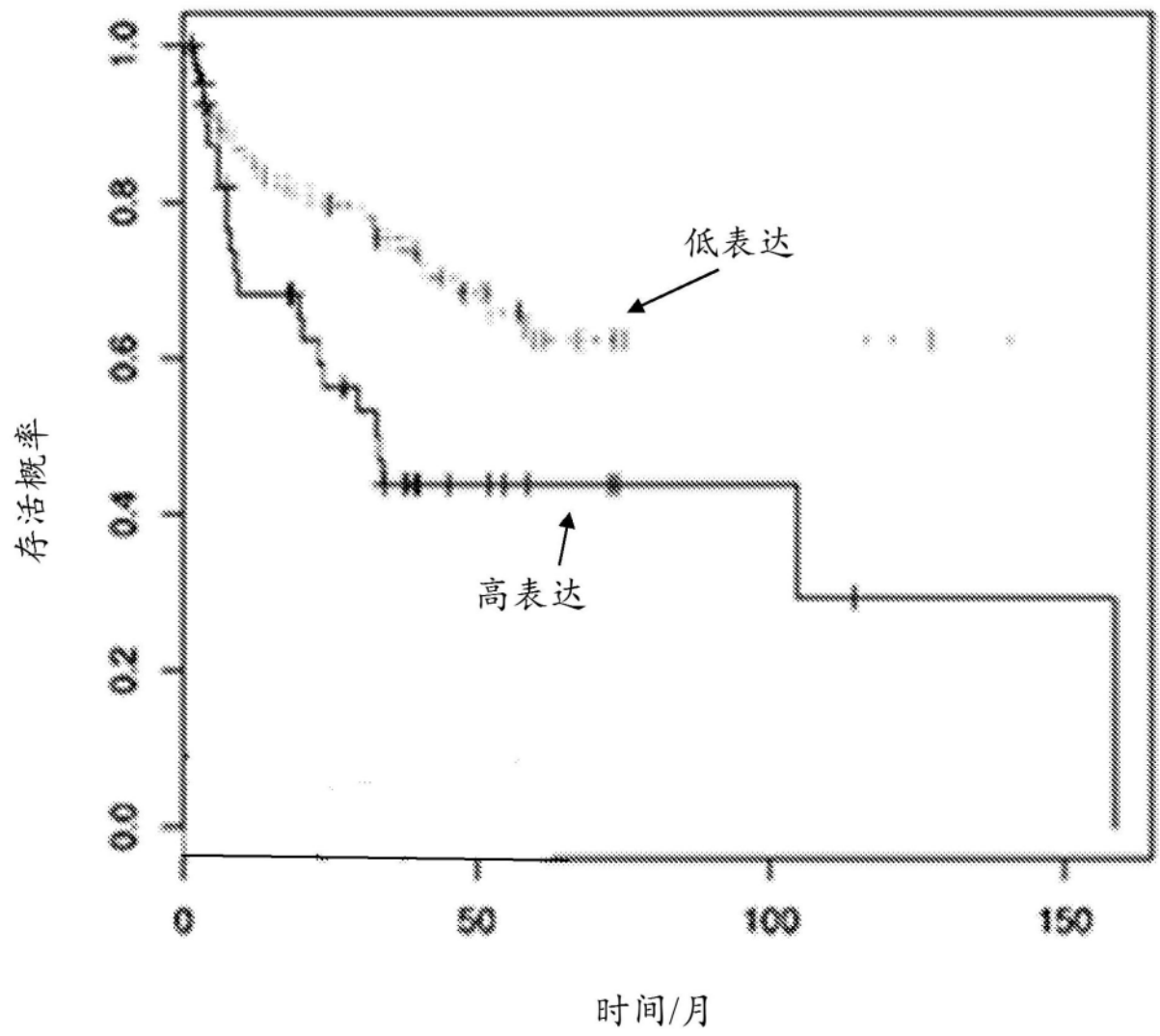


图1C

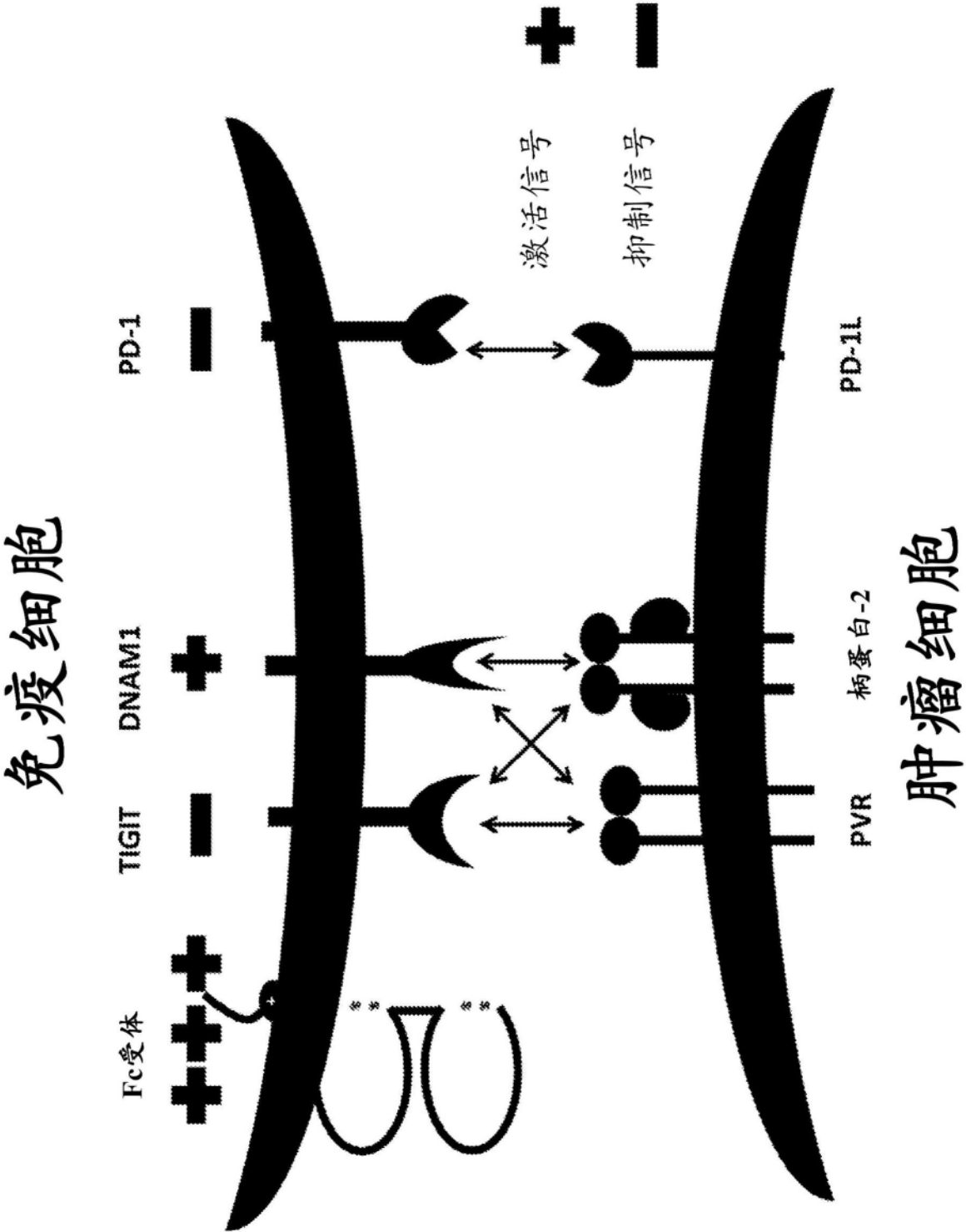


图2

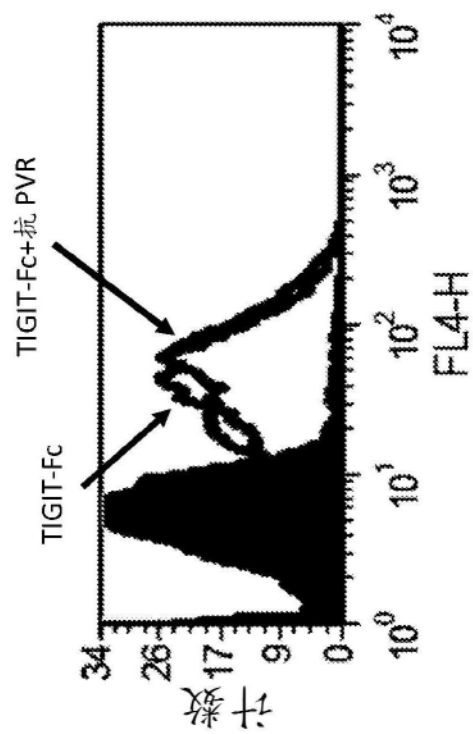


图3A

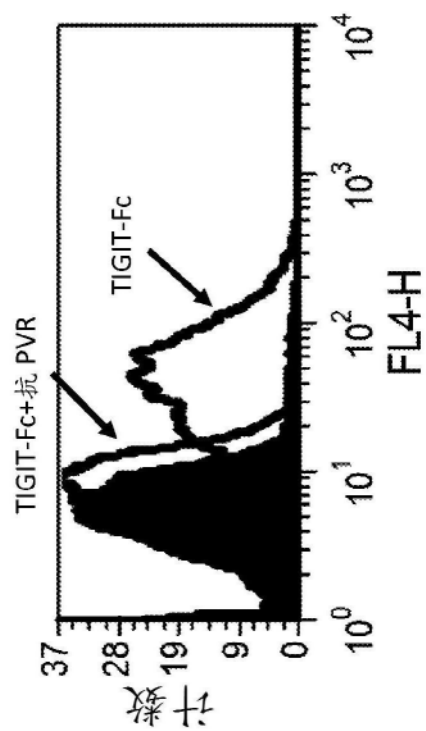


图3B

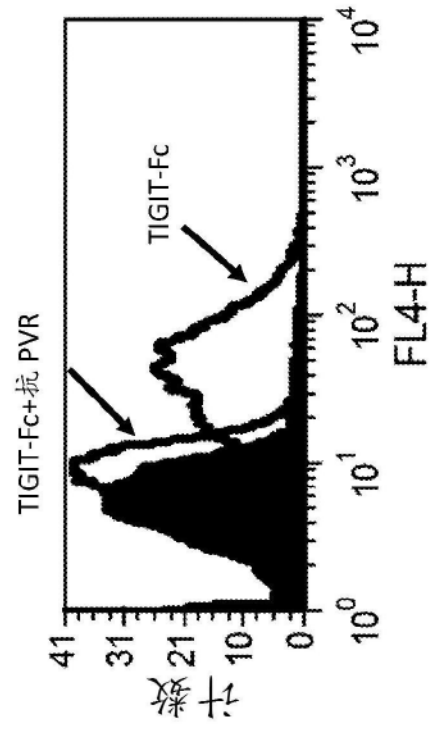


图3C

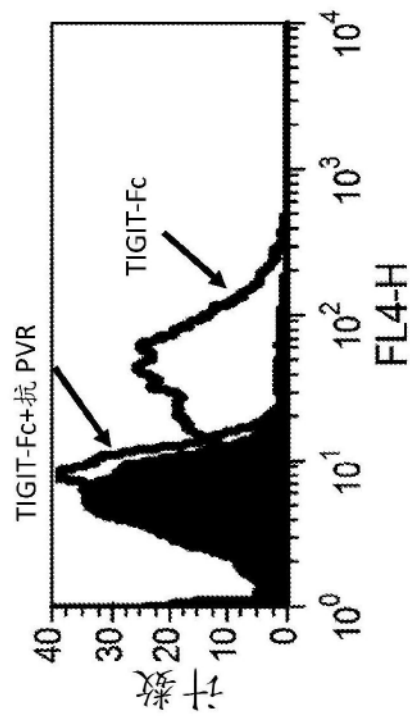


图3D

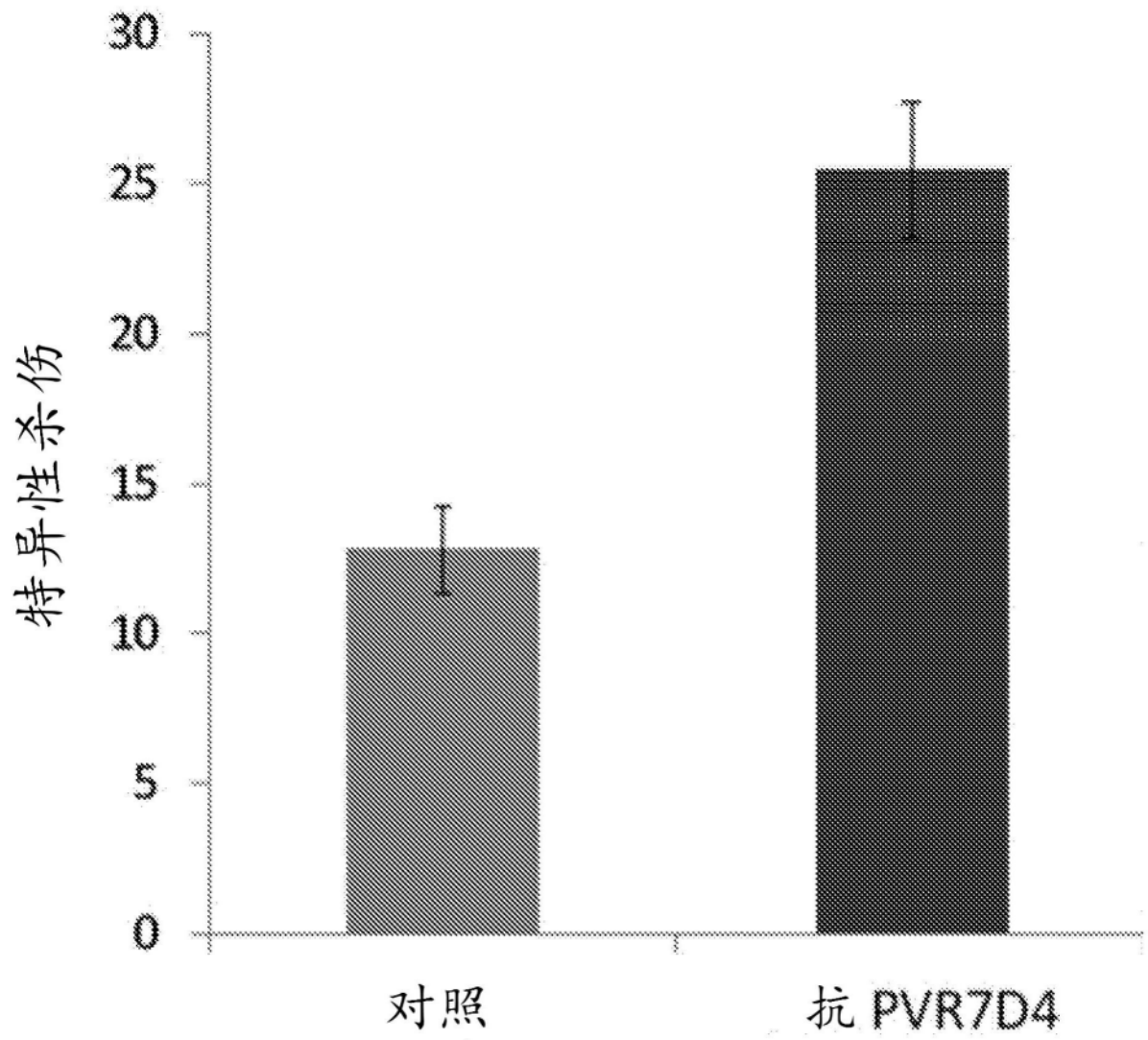


图4

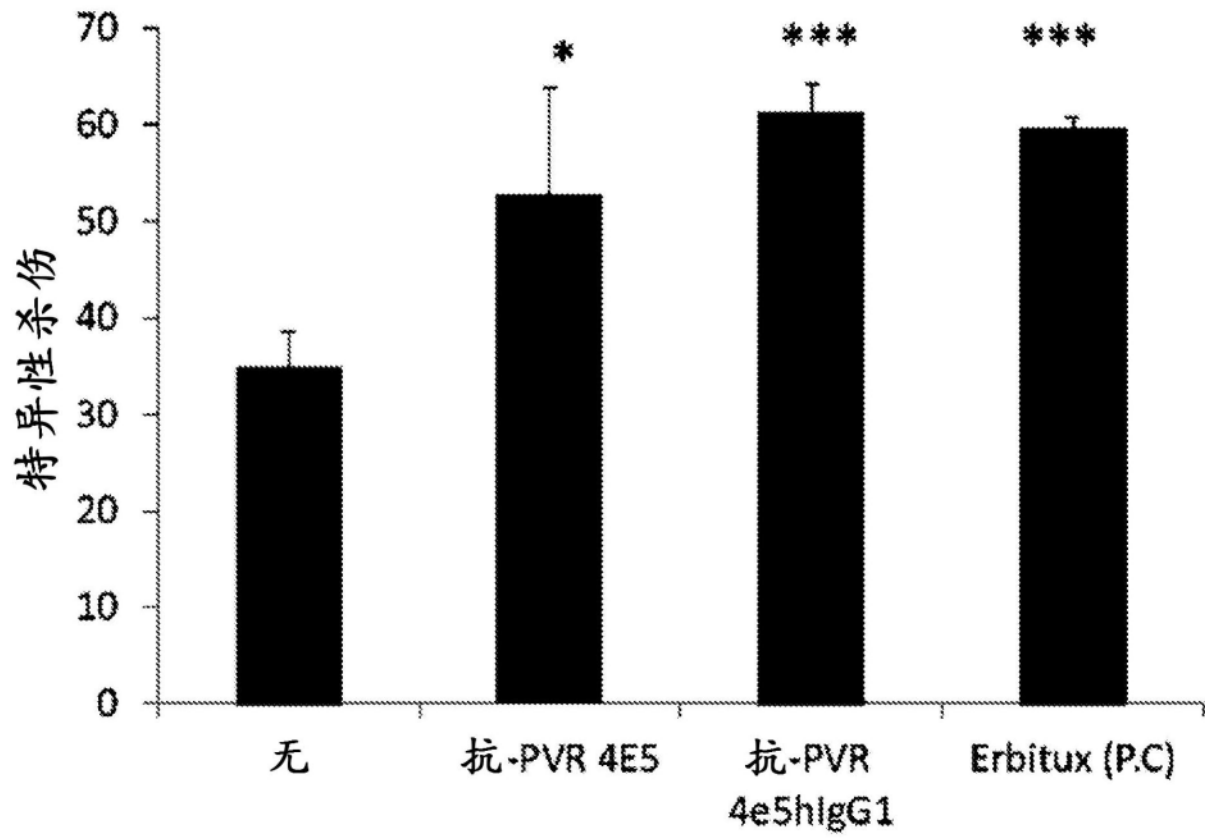


图5

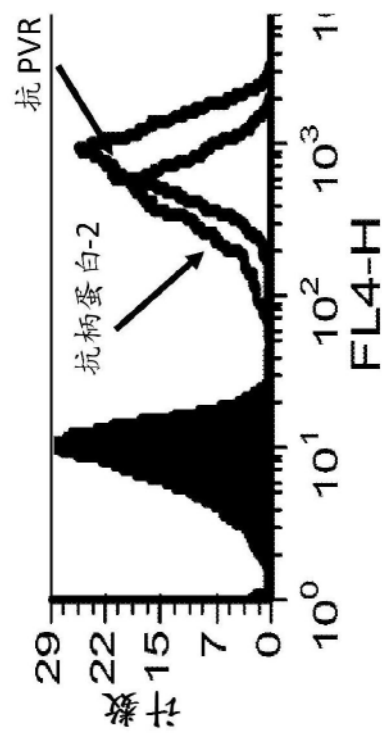


图6A

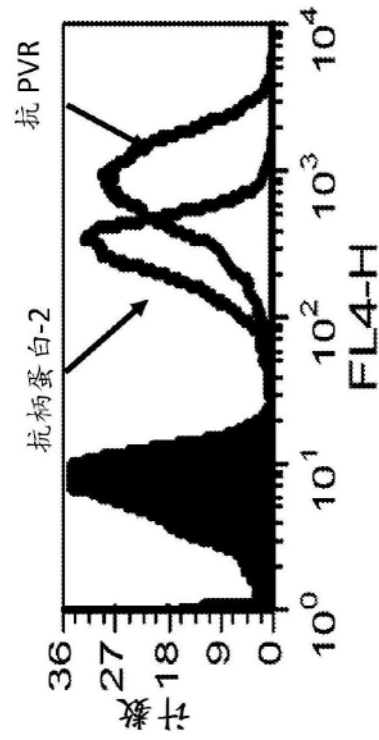


图6B

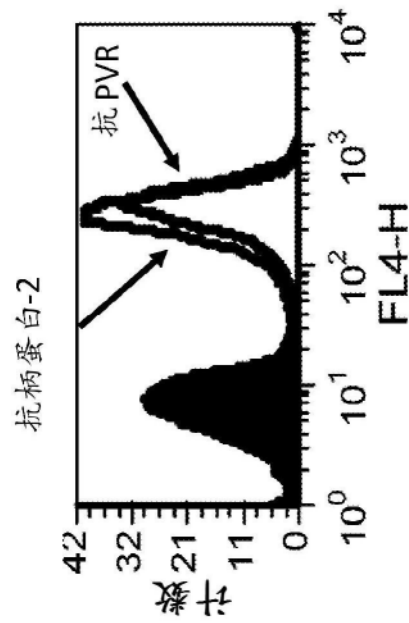


图6C

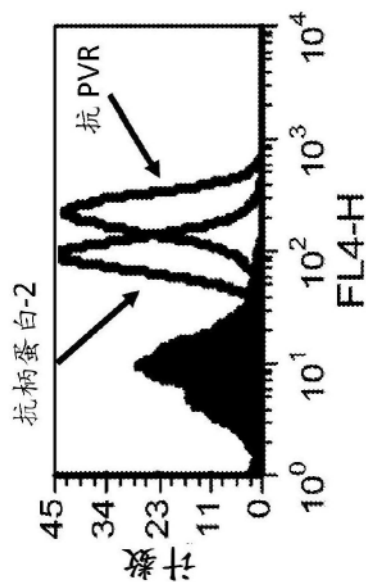


图6D

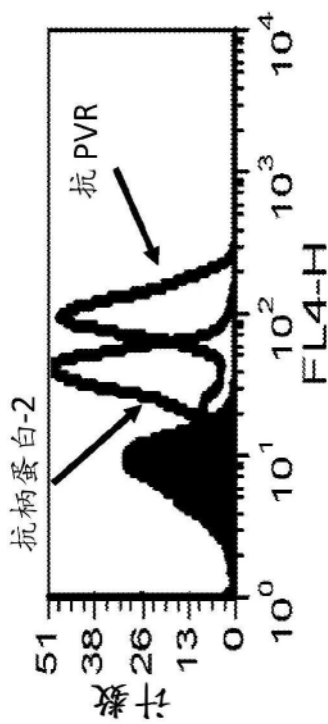


图6E

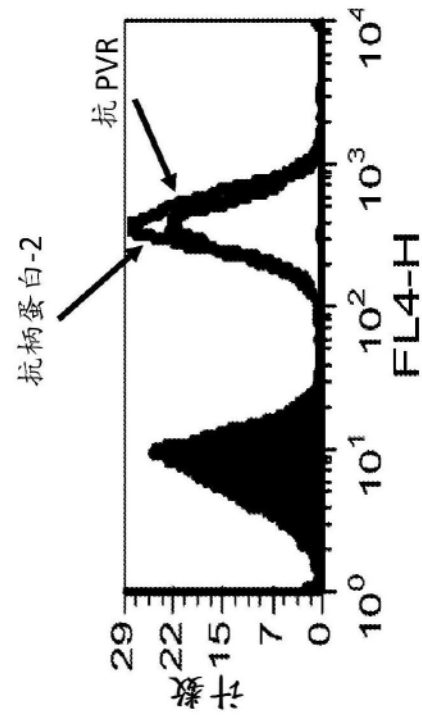


图6F

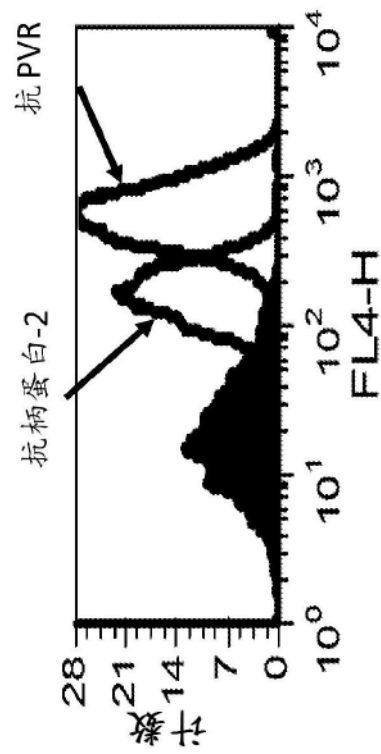


图6G

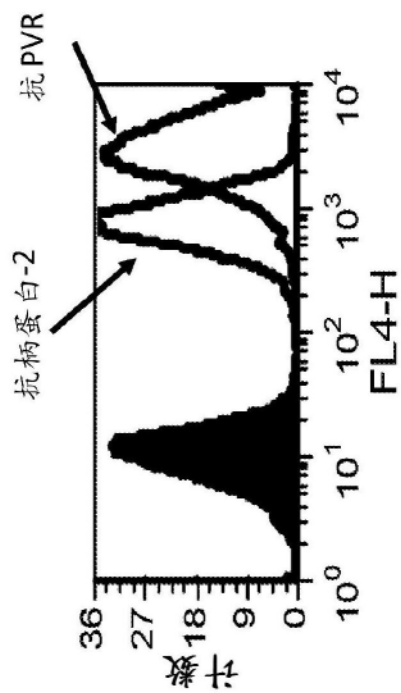


图6H

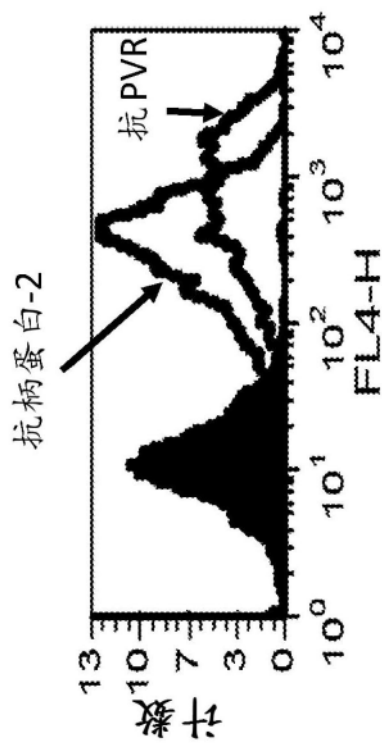


图6I

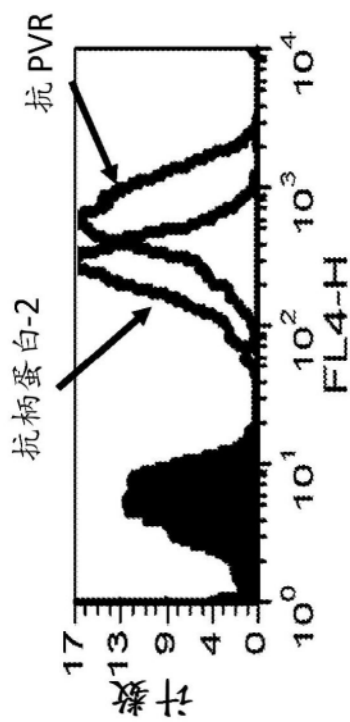


图6J

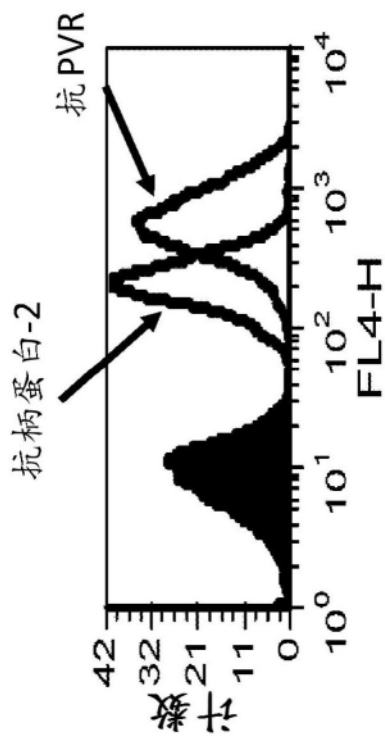


图6K

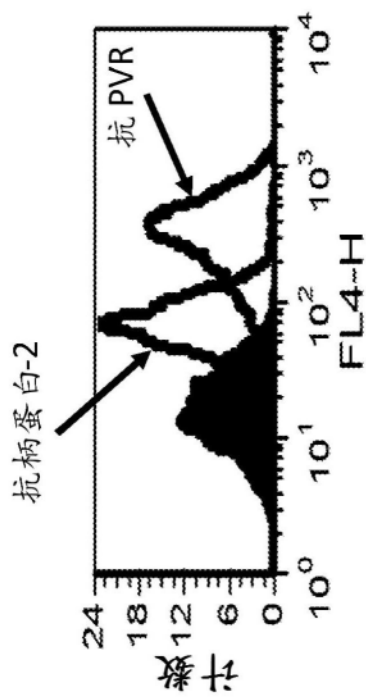


图6L

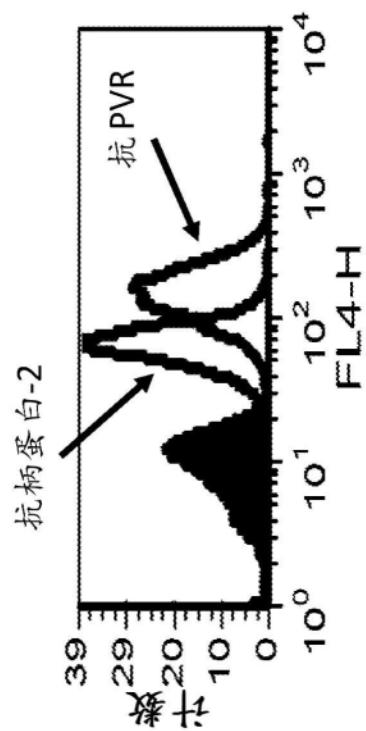


图6M

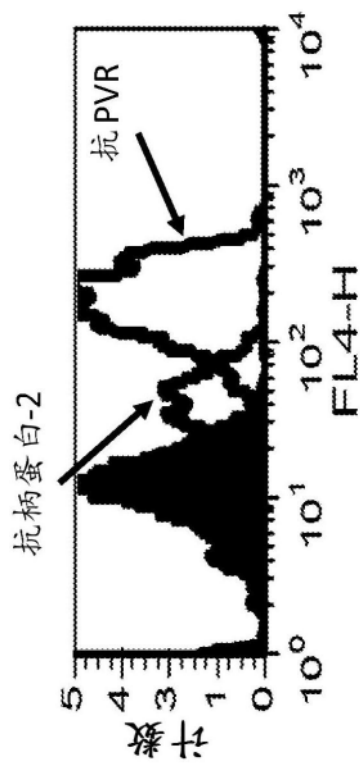


图6N

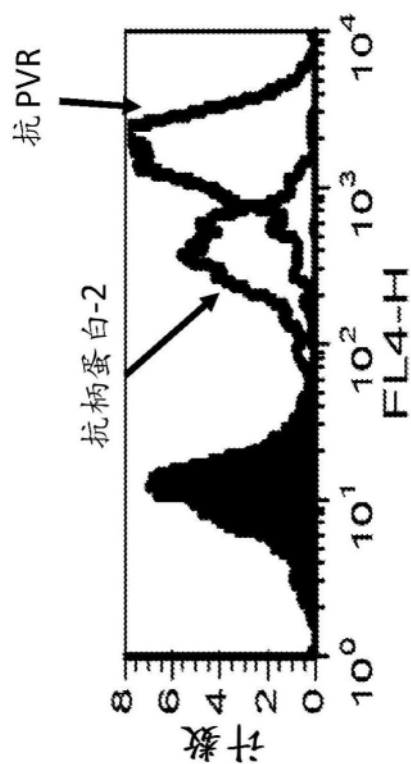


图60

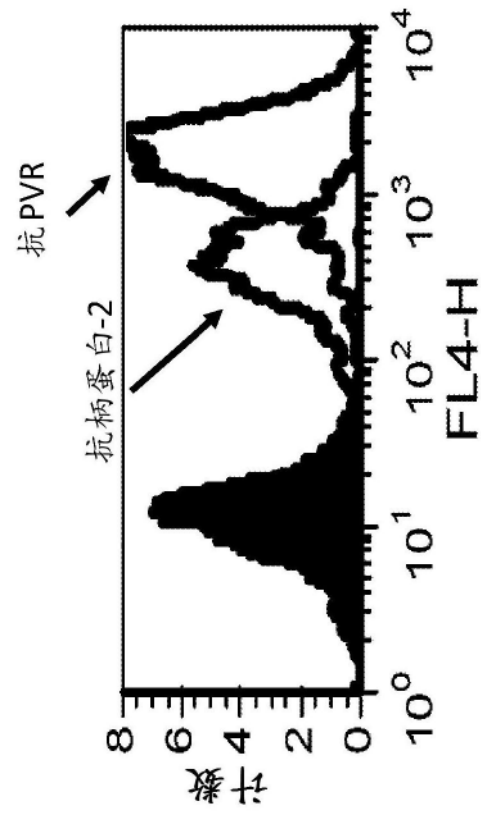


图7A

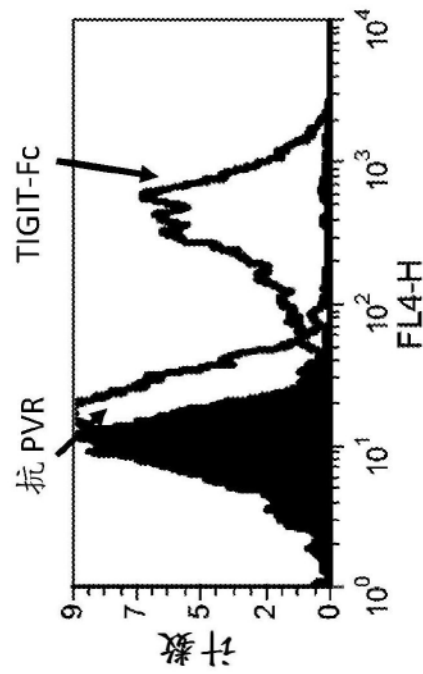


图7B

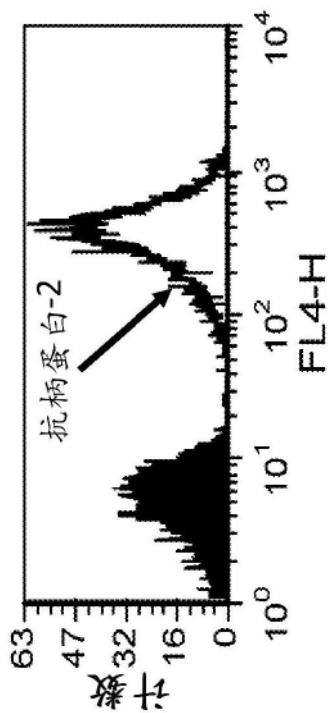


图7C

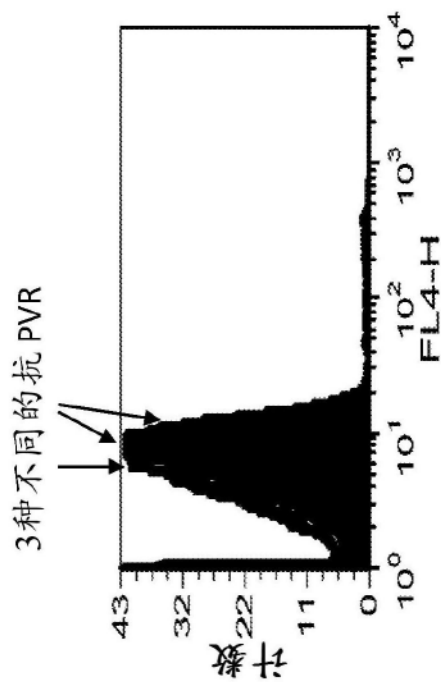


图7D

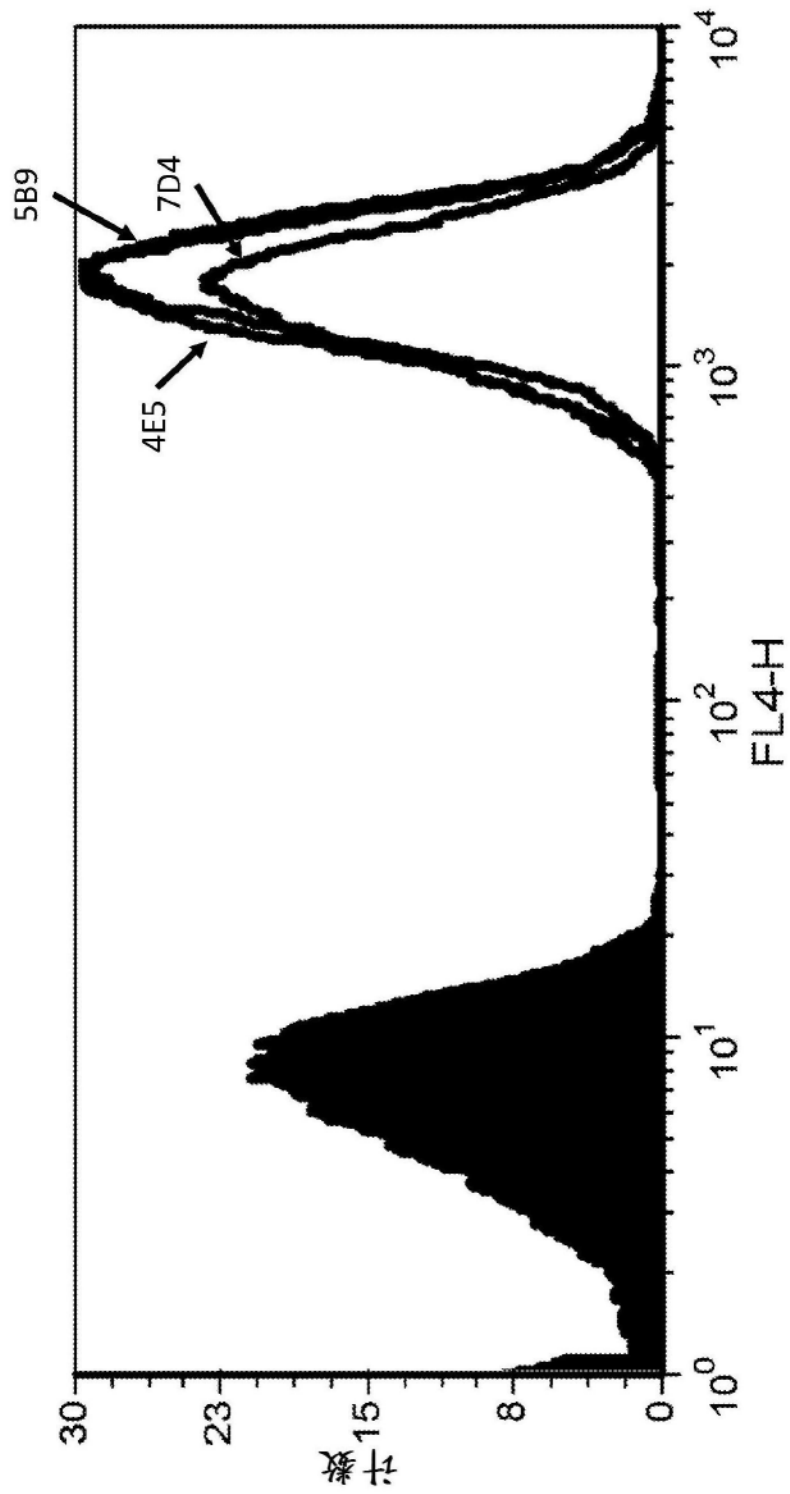


图8A

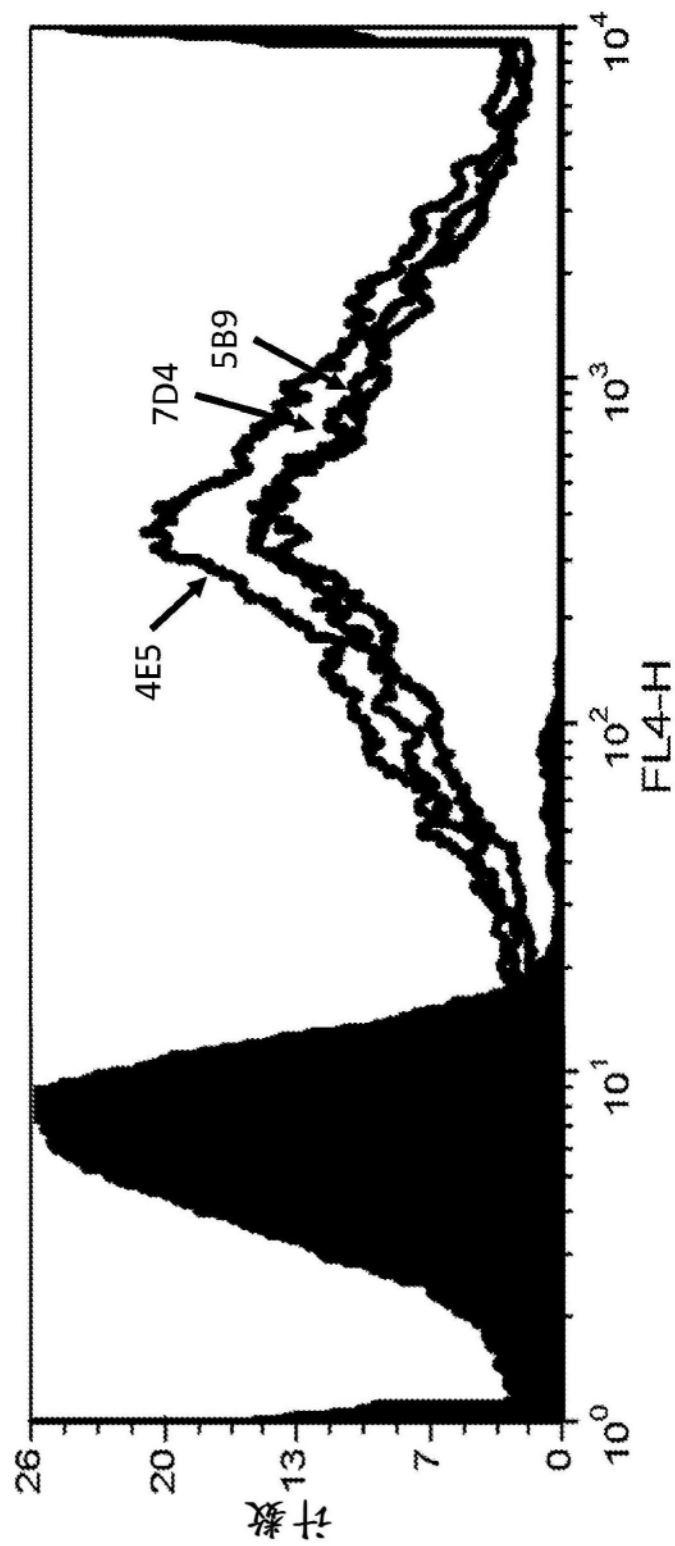


图8B

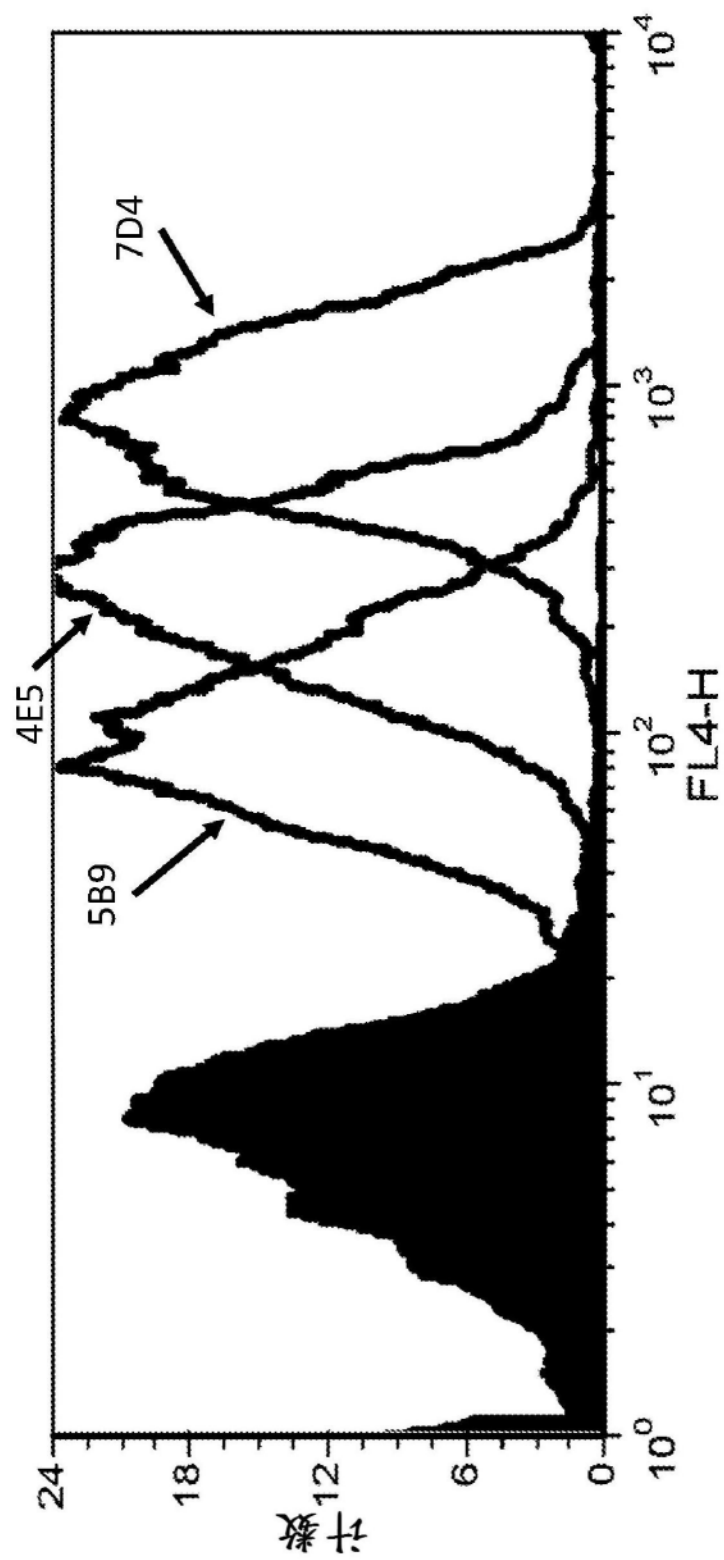


图8C

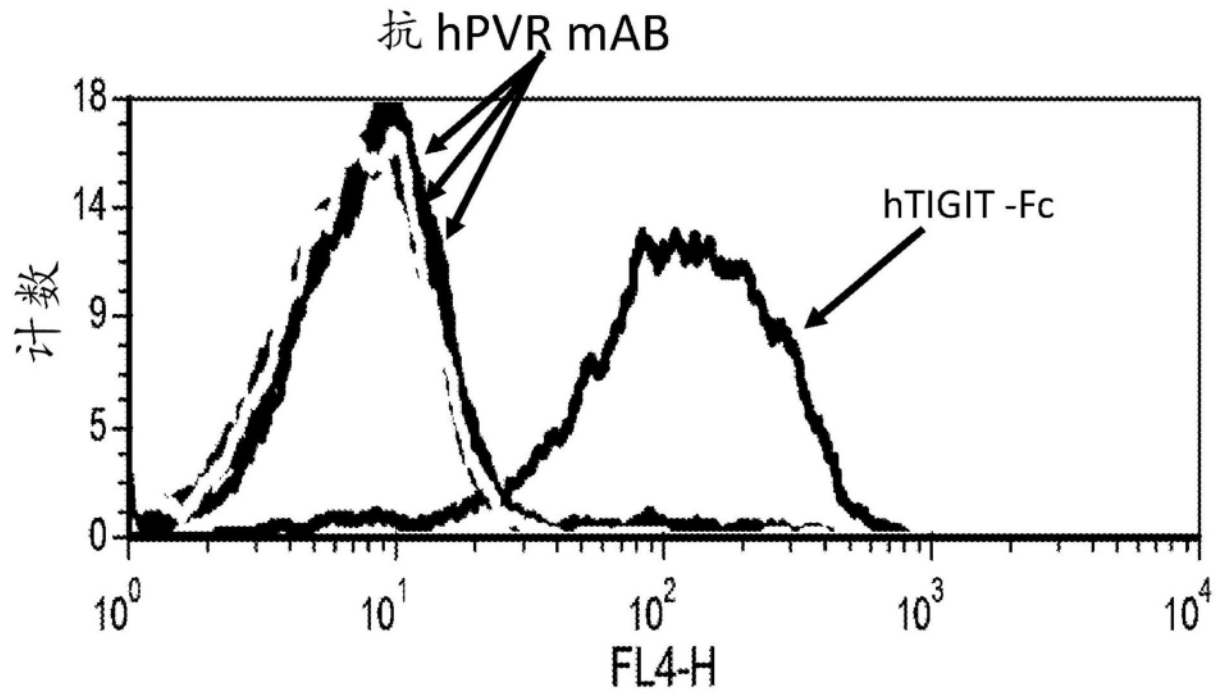


图9

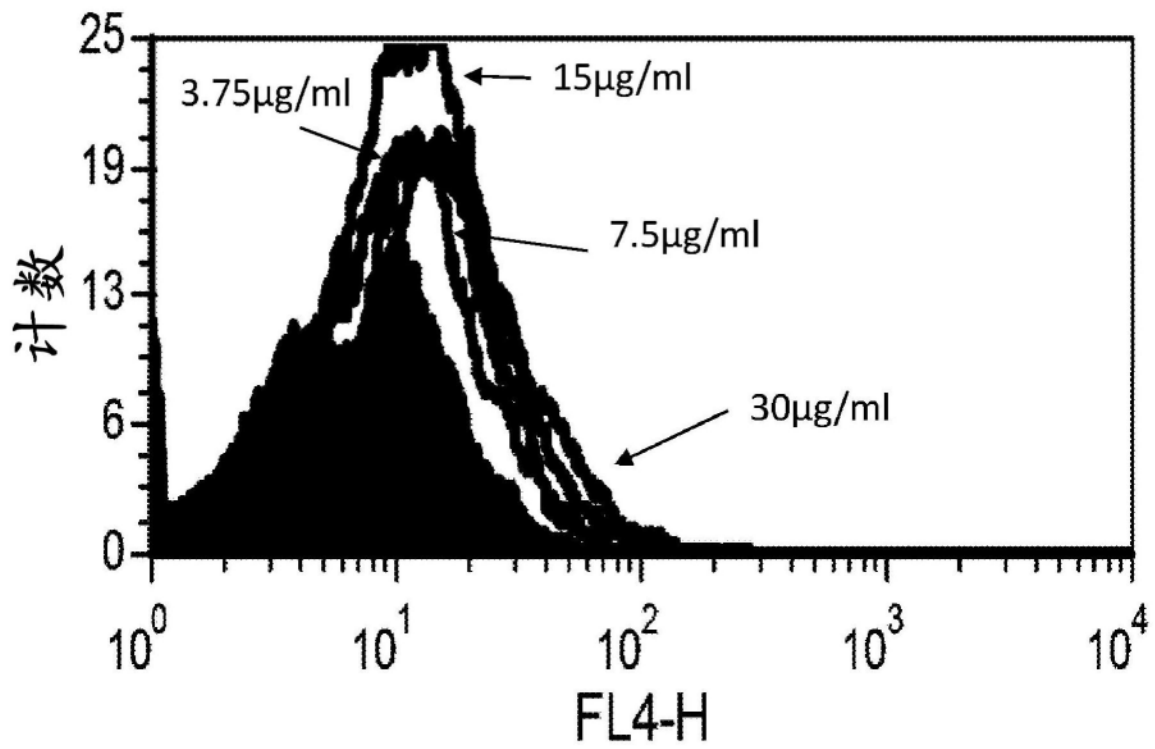


图10A

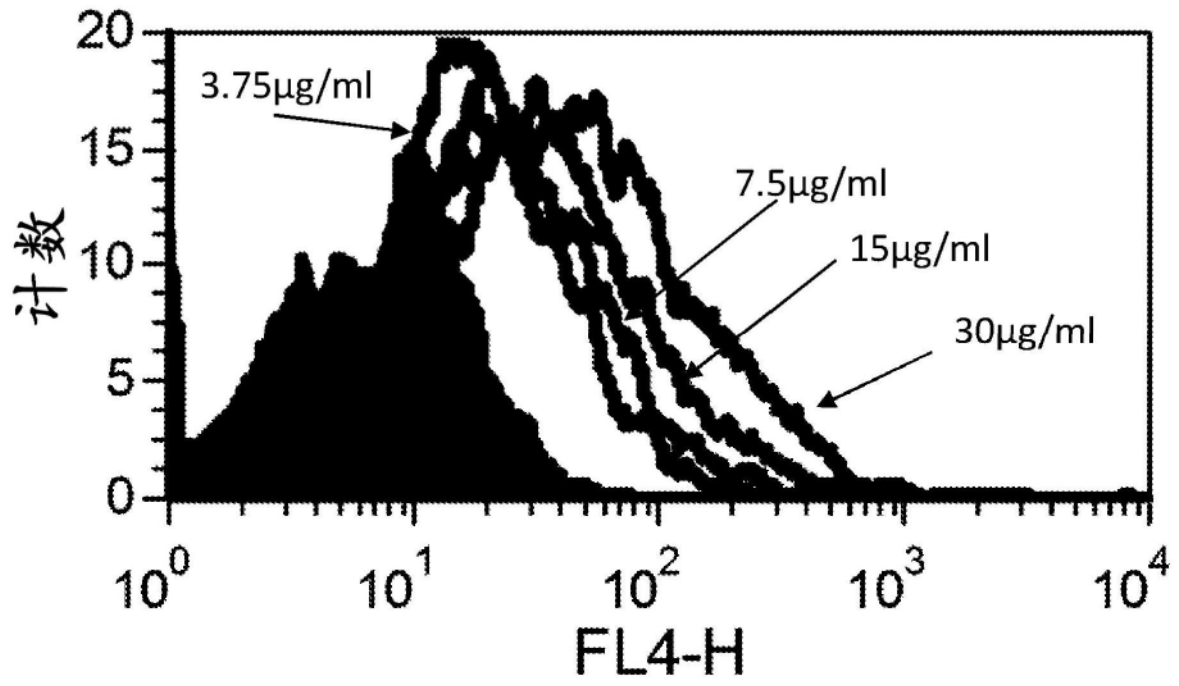


图10B

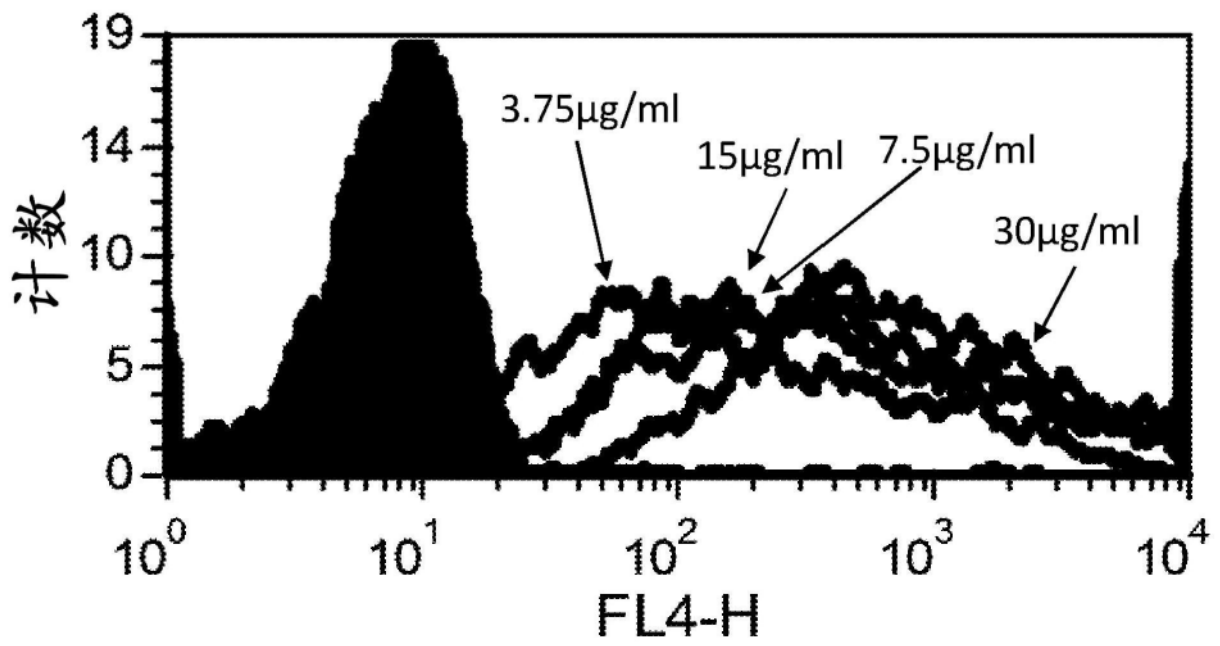


图10C

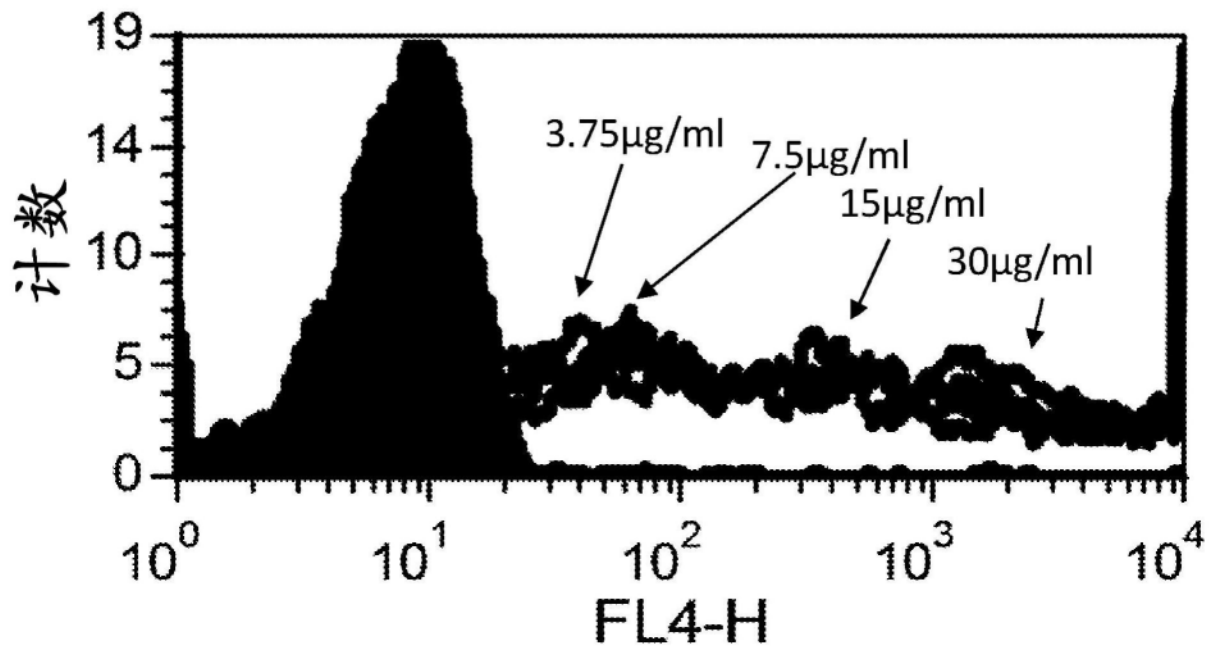


图10D

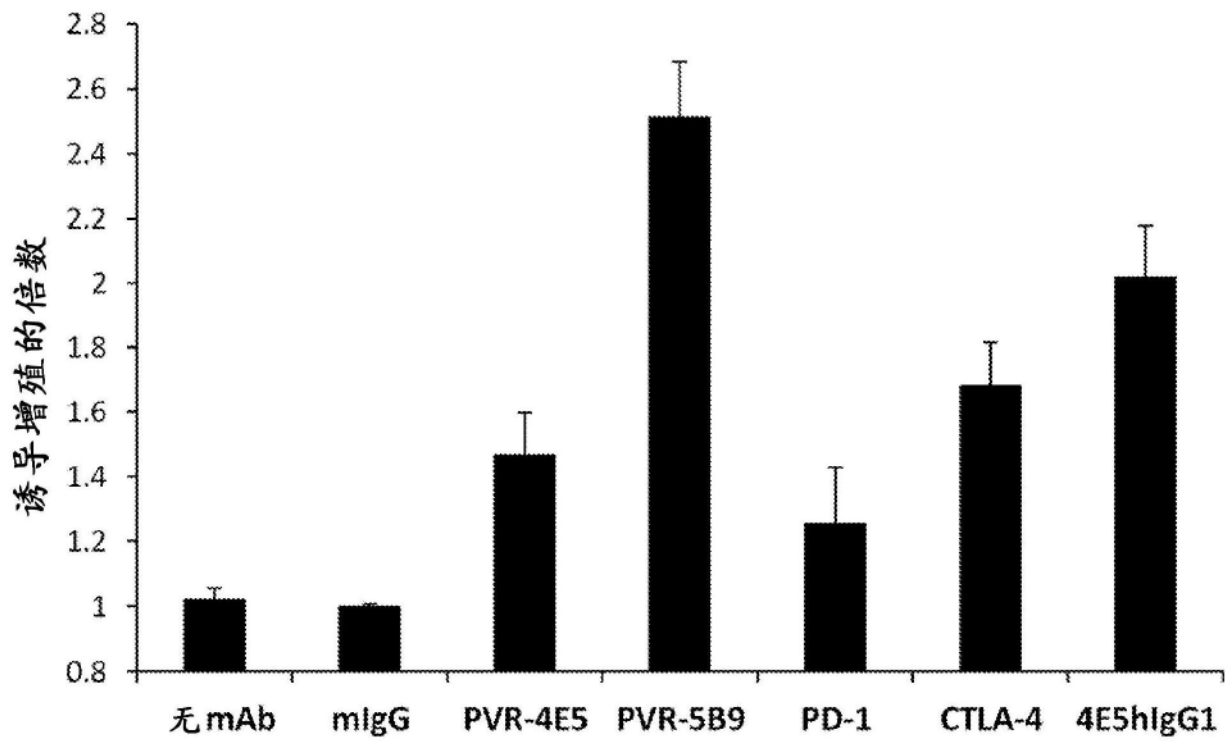


图11

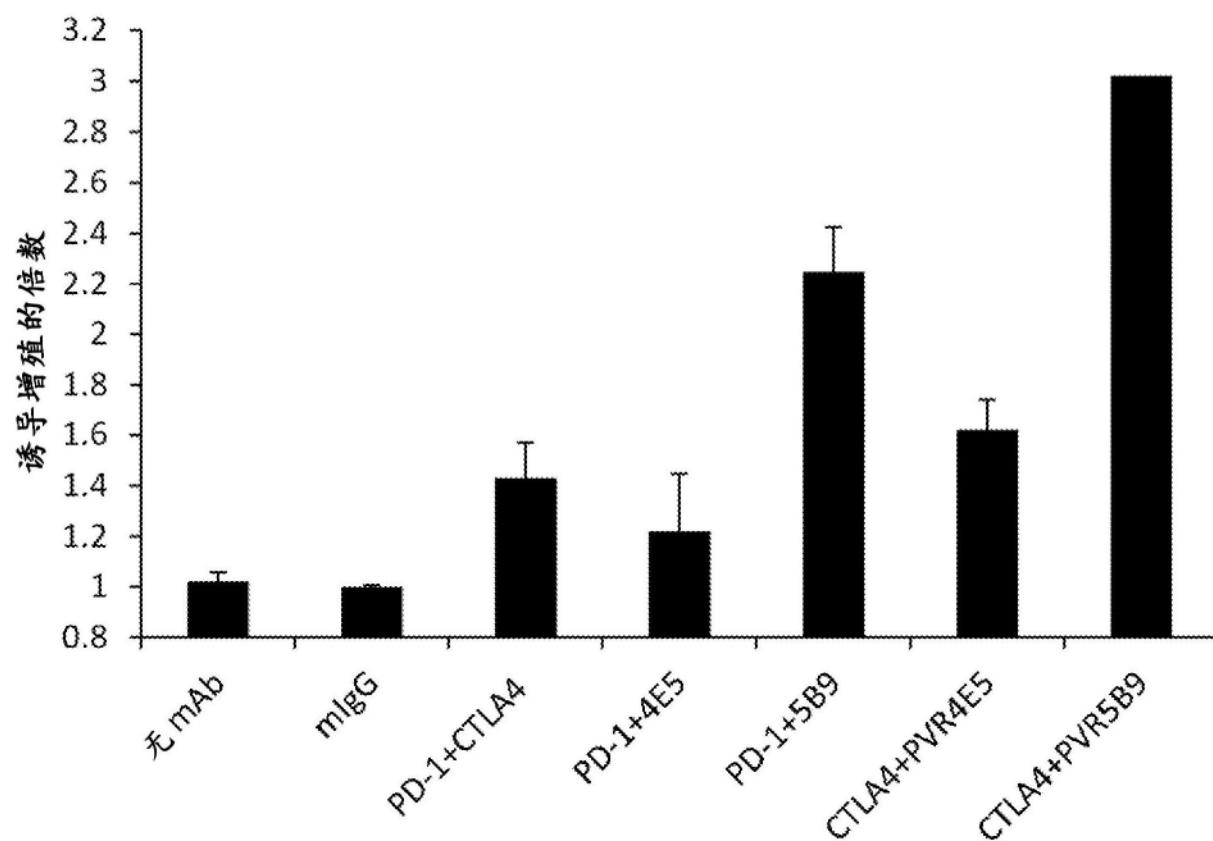


图12

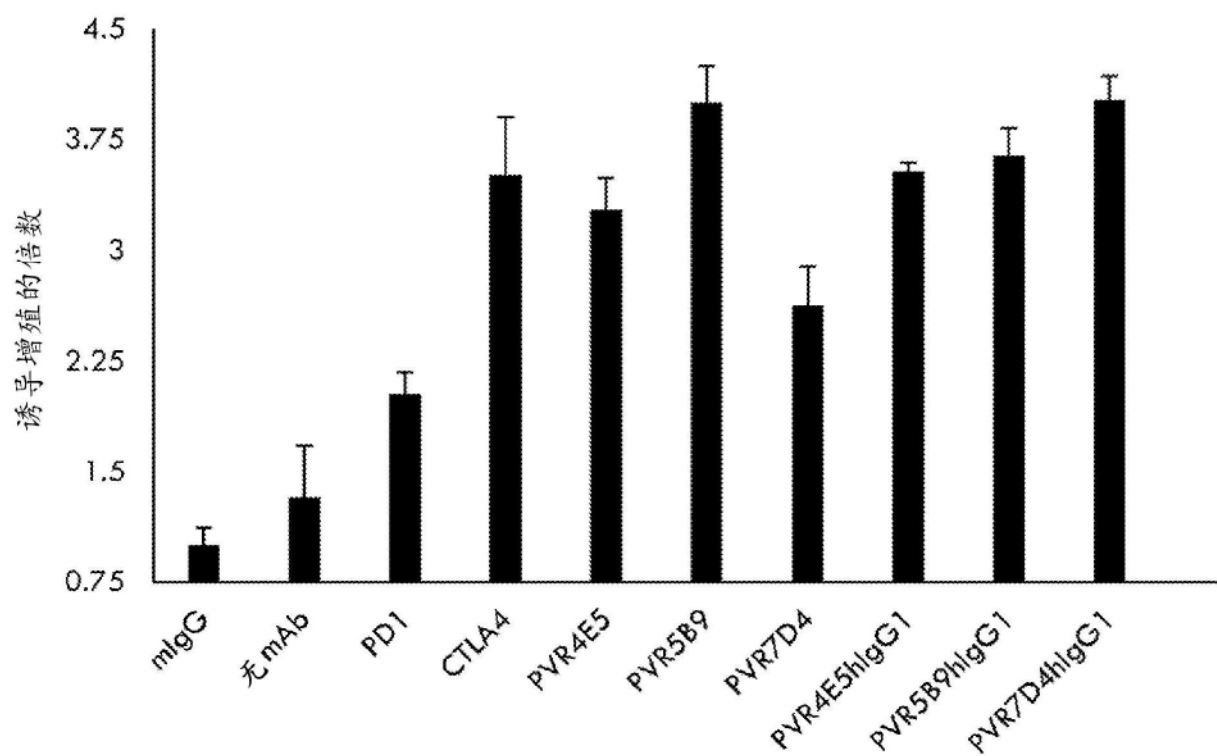


图13

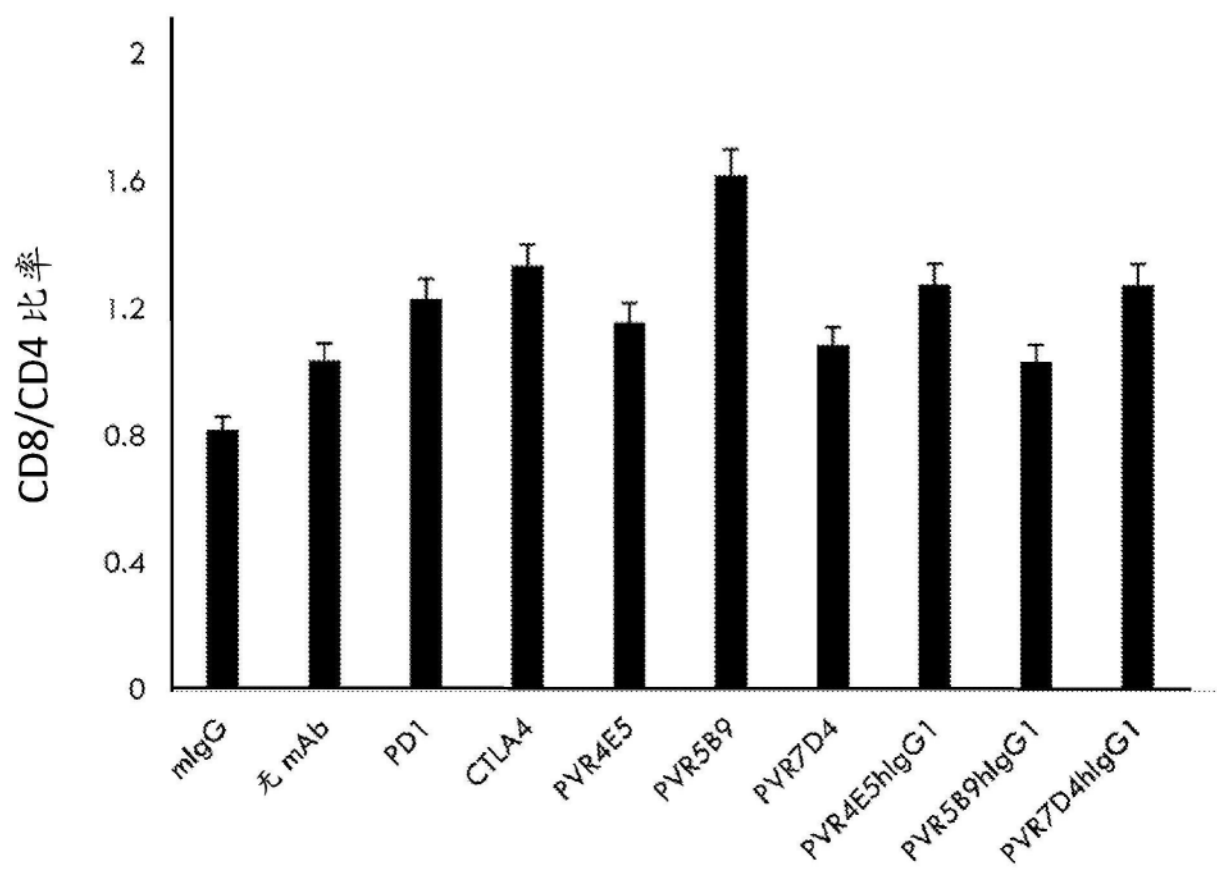


图14

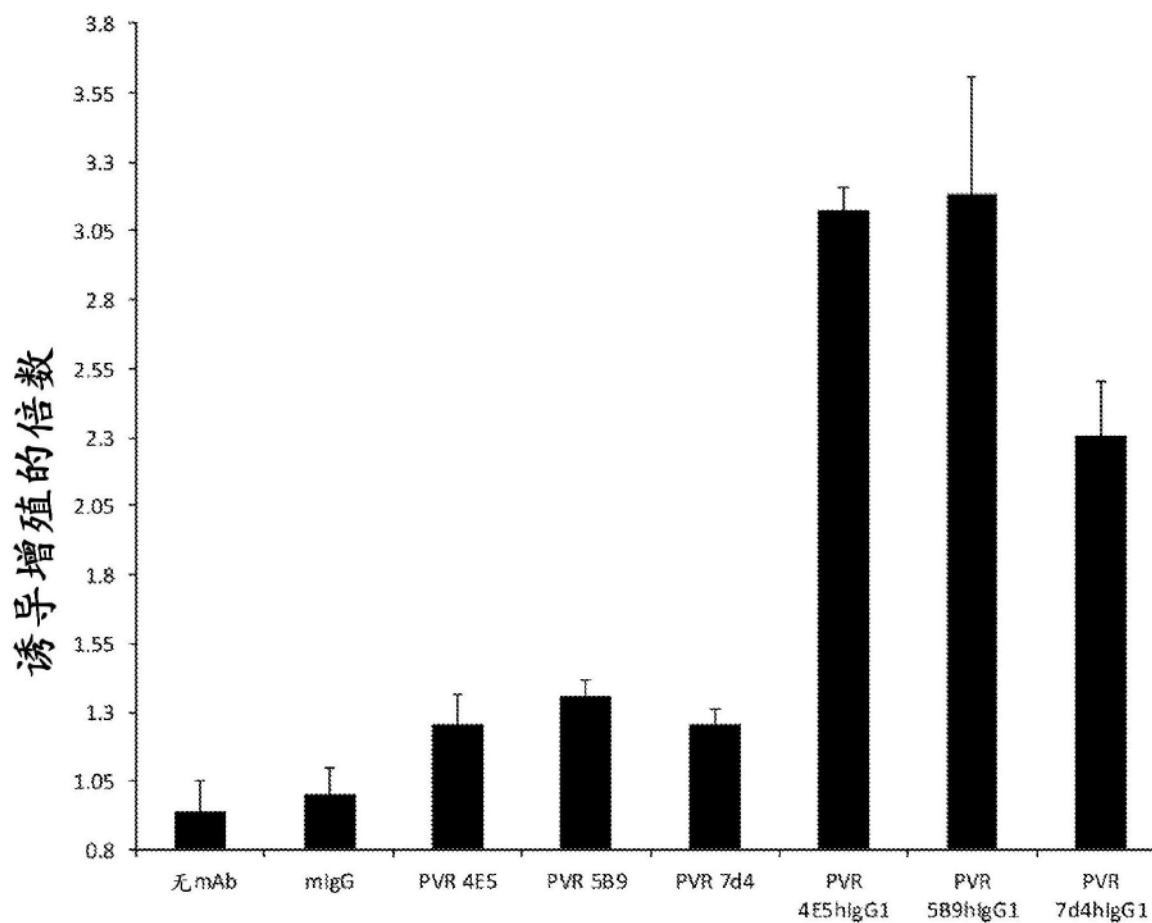


图15

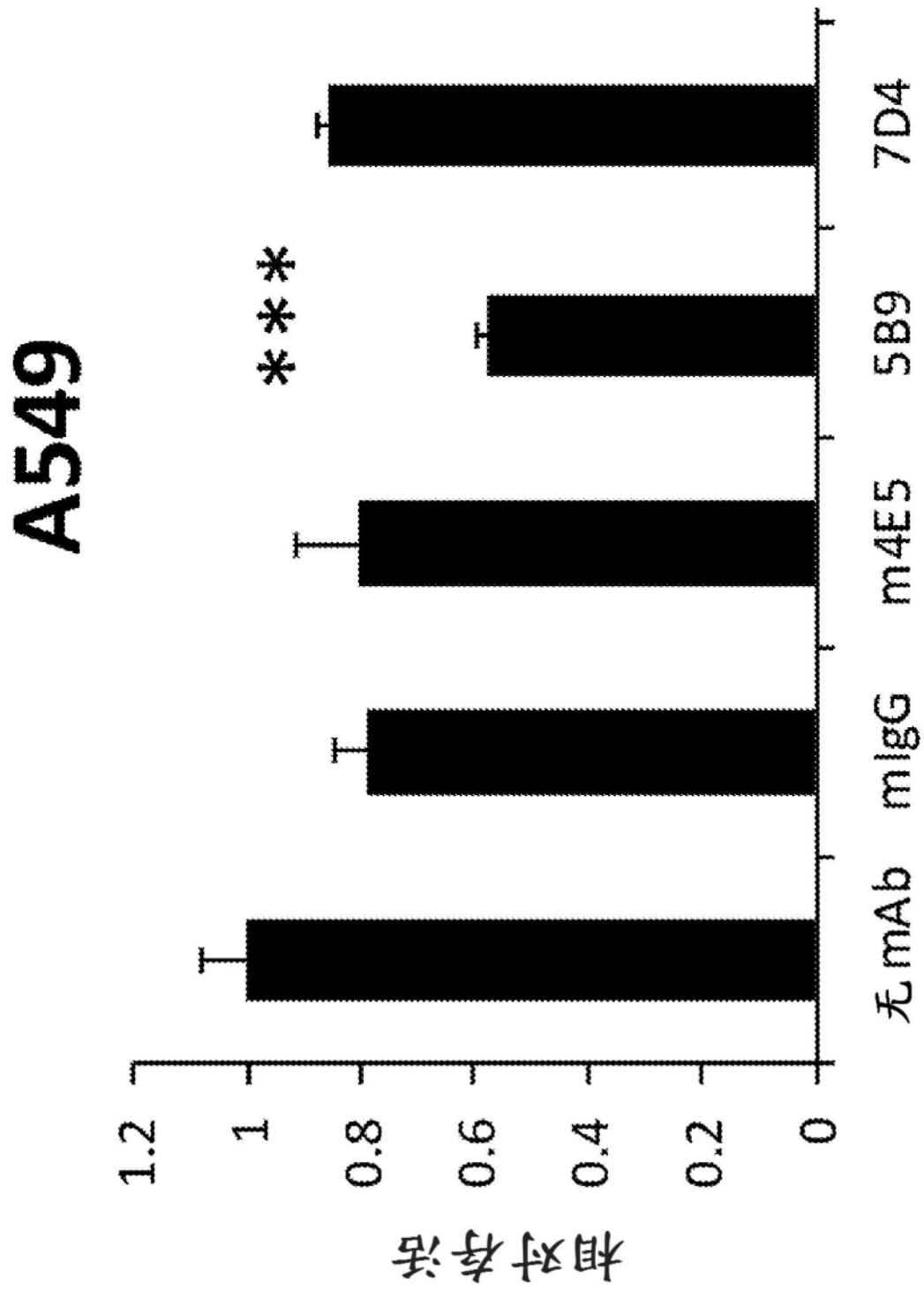


图16A

U373

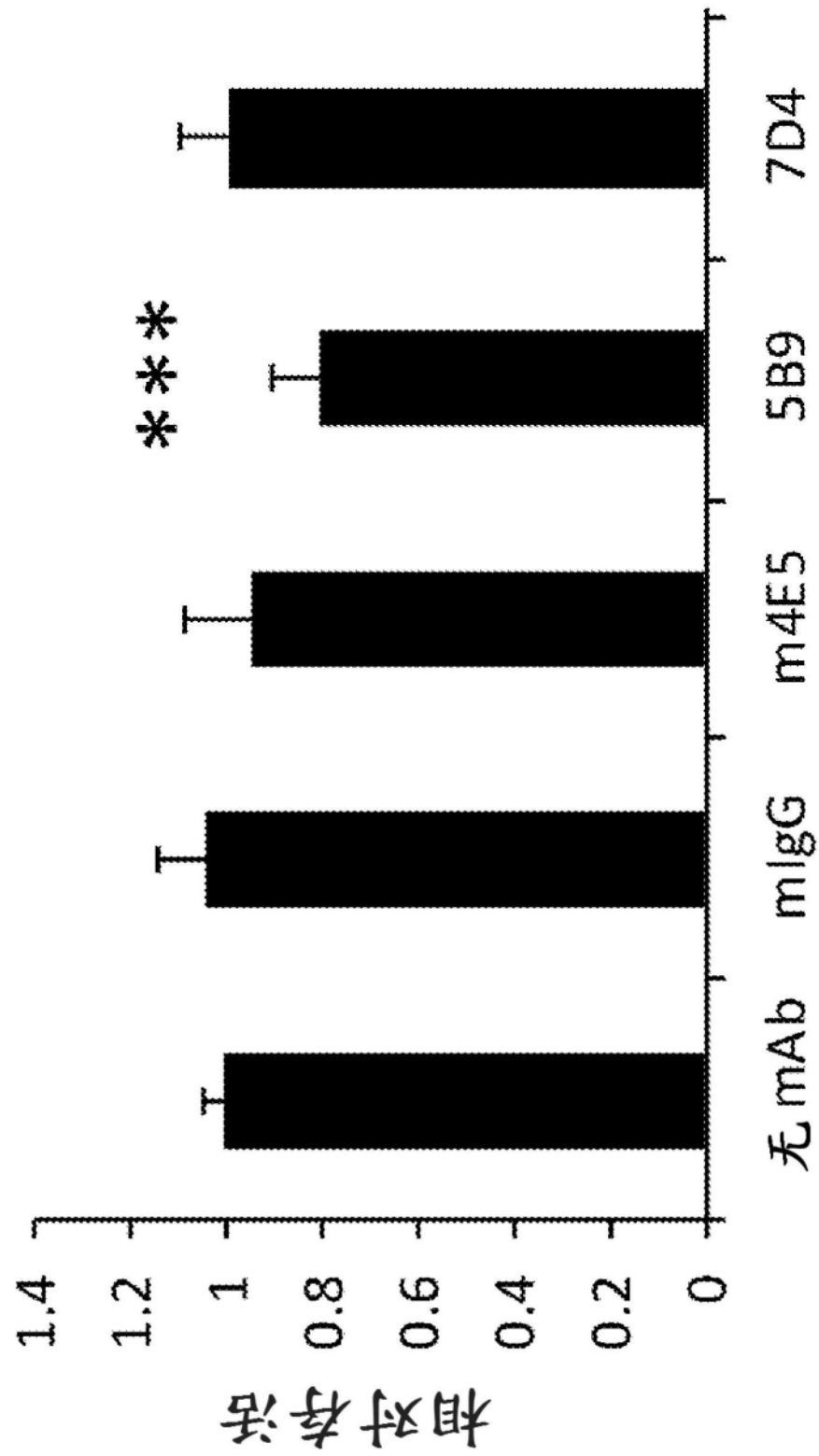


图16B

HCT116

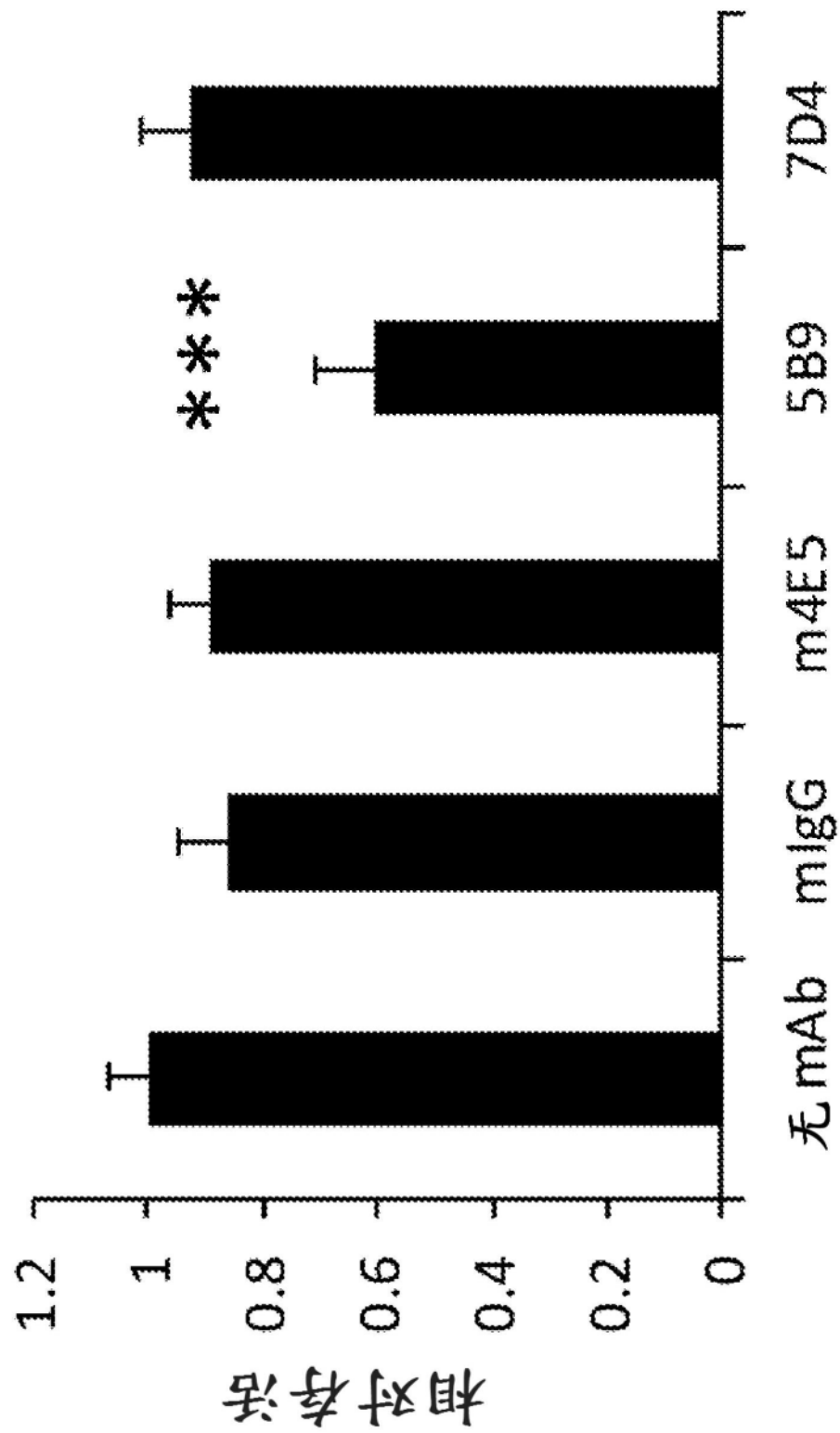


图16C

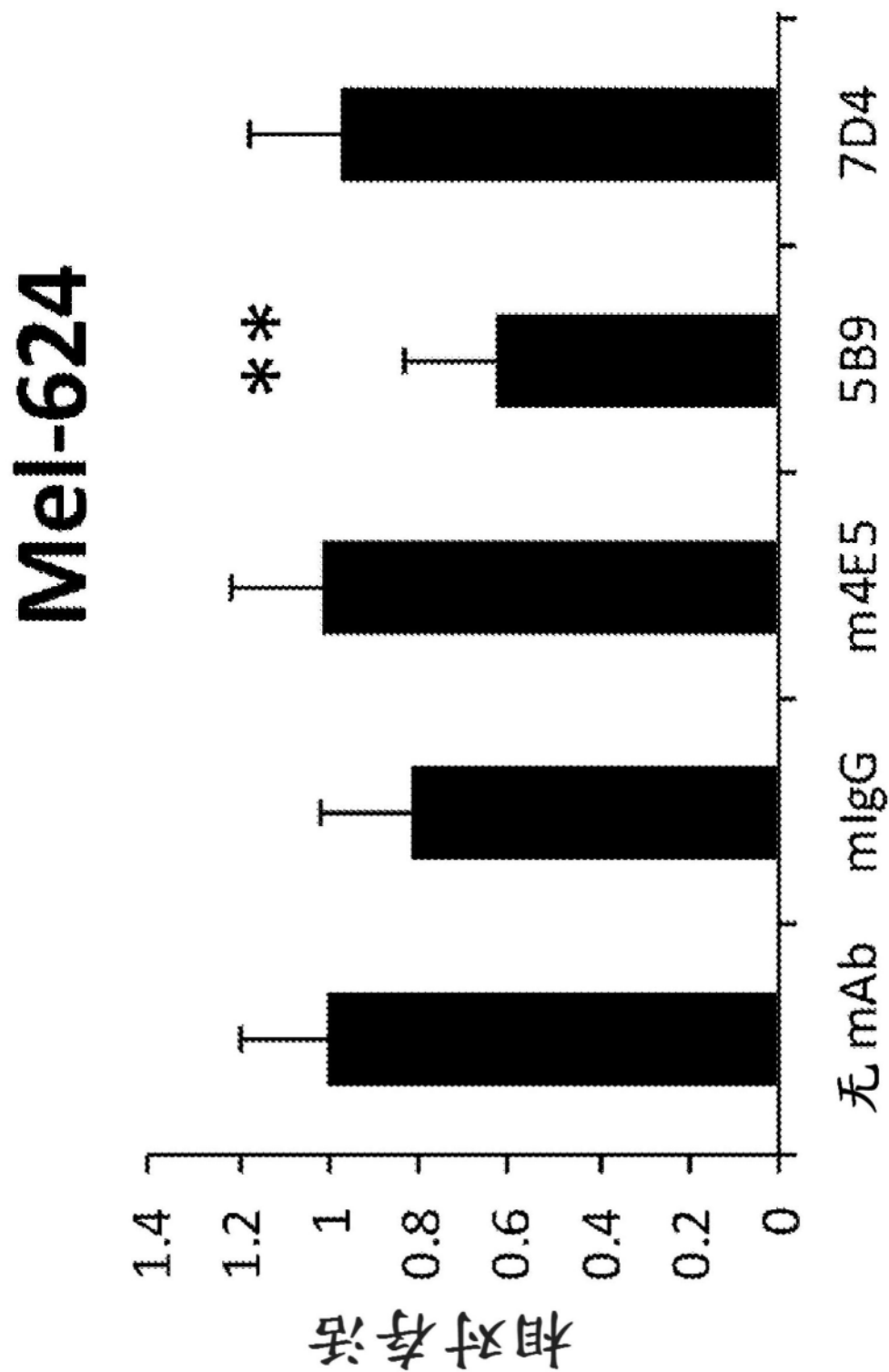


图16D