



## (12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111465614 A

(43)申请公布日 2020.07.28

(21)申请号 201880046184.1

(22)申请日 2018.07.09

(30)优先权数据

62/530,454 2017.07.10 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.01.10

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2018/068532 2018.07.09

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/011852 EN 2019.01.17

(71)申请人 先天制药公司

地址 法国马赛

(72)发明人 S·科纳 B·罗西 N·瓦格曼

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司 11245

代理人 张全信

(51)Int.Cl.

C07K 16/28(2006.01)

A61P 39/00(2006.01)

A61K 39/00(2006.01)

权利要求书3页 说明书69页

序列表84页 附图16页

(54)发明名称

使用人SIGLEC-9抗体和人NKG2A抗体治疗癌症的组合疗法

(57)摘要

本发明涉及试剂,其结合在免疫细胞中具有抑制活性的人Siglec,并且中和此类Siglec的所述抑制活性。此类试剂可以用于治疗癌症。

1. 一种中和人Siglec-9的抑制活性的试剂,其用于治疗人类患者的癌症,所述治疗包括向所述患者施用有效量的以下中的每一种:(a)中和人NKG2A的抑制活性的试剂,任选地抗体,和(b)中和人Siglec-9的抑制活性的试剂,任选地抗体。

2. 根据权利要求1所述的试剂,其中中和人Siglec-9的抑制活性的所述试剂包括抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段能够结合人Siglec-9多肽,并且中和由人NK细胞表达的Siglec-9多肽的抑制活性。

3. 一种结合人Siglec-7和/或Siglec-9的N末端V集Ig样结构域的抗体,其中所述抗体中和人Siglec-7和/或Siglec-9多肽的抑制活性,所述抗体用于治疗人类患者的癌症,其中所述抗Siglec抗体与中和人NKG2A的抑制活性的试剂,任选地抗体组合施用。

4. 根据权利要求1到3所述的试剂,其中中和人Siglec的抑制活性的所述试剂包括抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段以彼此相当的结合亲和力特异性结合人Siglec-7多肽和人Siglec-9多肽。

5. 根据上述权利要求中任一项所述的试剂,其中中和人Siglec的抑制活性的试剂包括抗体或抗体片段,所述抗体或抗体片段用于结合人Siglec-7多肽和人Siglec-9多肽的EC<sub>50</sub>相差不超过1个对数,如通过流式细胞术对结合于在其表面表达彼此相当水平的Siglec-7或Siglec-9的细胞所确定的。

6. 根据上述权利要求中任一项所述的试剂,其中在标准的4小时体外<sup>51</sup>Cr释放细胞毒性测定中,中和人Siglec-9的抑制活性的所述试剂增强和/或恢复NK细胞的细胞毒性,在所述细胞毒性测定中将表达Siglec-9的NK细胞从人类供体纯化,并且与表达Siglec-9的唾液酸配体的靶细胞一起温育。

7. 根据上述权利要求中任一项所述的试剂,其中中和人Siglec的抑制活性的所述试剂包括抗体,所述抗体能够中和由人moDC表达的Siglec-7和/或-9多肽的抑制活性,所述人moDC在其表面处带有与唾液酸以顺式相互作用进行接合的Siglec-7和/或-9多肽。

8. 根据上述权利要求中任一项所述的试剂,其中中和人NKG2A的抑制活性的所述试剂和中和Siglec的抑制活性的所述试剂被调配为分开施用,并且并列或依次施用。

9. 根据权利要求1到7中任一项所述的试剂,其中中和人NKG2A的抑制活性的所述试剂和中和Siglec的抑制活性的所述试剂以单一调配物同时施用。

10. 根据上述权利要求中任一项所述的试剂,其中中和人NKG2A的抑制活性的所述试剂和中和Siglec的抑制活性的所述试剂在同一天施用。

11. 根据上述权利要求中任一项所述的试剂,其中所述癌症的特征在于在其表面处带有HLA-E多肽的恶性细胞。

12. 根据上述权利要求中任一项所述的试剂,其中所述癌症的特征在于在其表面处带有Siglec-7和/或Siglec-9的唾液酸配体的恶性细胞。

13. 根据上述权利要求中任一项所述的试剂,其中所述癌症选自由以下组成的组:肺癌、头颈癌、肾细胞癌(RCC)、黑素瘤、结肠直肠癌和卵巢癌。

14. 根据上述权利要求中任一项所述的试剂,其中中和NKG2A的抑制活性的抗体包括具有SEQ ID NO:171-175中的任一个中列出的序列的重链的CDR1、CDR2和CDR3结构域和具有SEQ ID NO:176中列出的序列的轻链的CDR1、CDR2和CDR3结构域。

15. 根据上述权利要求中任一项所述的试剂,其中中和NKG2A的抑制活性的所述抗体是

非消耗性抗体。

16. 根据上述权利要求中任一项所述的试剂,其中中和人Siglec-9的抑制活性的所述抗体是非消耗性抗体。

17. 根据权利要求15或16所述的试剂,其中所述非消耗性抗体缺乏Fc结构域或包括经过修饰以减少Fc结构域与Fc $\gamma$ 受体之间的结合的所述Fc结构域。

18. 根据权利要求15或16所述的试剂,其中所述非消耗性抗体是抗体片段。

19. 根据上述权利要求中任一项所述的试剂,其中中和Siglec-9的抑制活性的所述试剂包括结合以下的抗体:(a) 包括SEQ ID NO:2的氨基酸序列的Siglec-9多肽,和(b) 包括SEQ ID NO:160的氨基酸序列的Siglec-9多肽。

20. 根据上述权利要求中任一项所述的试剂,其中中和Siglec-9和/或Siglec-7的抑制活性的试剂基本上不结合另外的人CD33相关的Siglec多肽,任选地其中所述抗体以低于结合第三人CD33相关的Siglec多肽至少100倍的KD结合所述Siglec-7和/或Siglec-9,任选地其中所述第三人CD33相关的Siglec选自以下组成的组:Siglec-3、-5、-6、-8、-10、-11和-12。

21. 根据上述权利要求中任一项所述的试剂,其中所述第三人CD33相关的Siglec多肽是Siglec-12。

22. 根据上述权利要求中任一项所述的试剂,其中当使所述NK细胞与在所述靶细胞表面上带有所述Siglec的配体的靶人类细胞接触时,所述抗Siglec抗体在从人类供体纯化的Siglec 7和/或9表达性NK细胞中引起细胞毒性和/或与细胞毒性相关联的标志物增加。

23. 根据上述权利要求中任一项所述的试剂,其中所述抗Siglec抗体的特征在于与结合到SEQ ID NO:2的野生型Siglec-9多肽相比,其与以下的结合减少:

在残基N78、P79、A80、R81、A82和/或V83处具有突变;在残基N77、D96、H98和/或T99处具有突变和/或在残基W84、E85、E86和/或R88处具有突变的Siglec-9多肽;

在残基S47、H48、G49、W50、I51、Y52、P53和/或G54处具有突变的Siglec-9多肽;

在残基P55、H58、E122、G124、S125和/或K127处具有突变的Siglec-9多肽;

在残基K131和/或H132处具有突变的Siglec-9多肽;和/或

在残基R63、A66、N67、T68、D69、Q70和/或D71处具有突变的Siglec-9多肽;

其中氨基酸残基是参考SEQ ID NO:2的Siglec-9多肽来指示的。

24. 根据上述权利要求中任一项所述的试剂,其中所述试剂包括抗体,所述抗体与选自由以下组成的组的抗体竞争结合Siglec-9:

(a) 单克隆抗体,其包括(i) 重链和(ii) 轻链,所述重链包括SEQ ID NO:15的重链可变区的CDR 1、2和3,所述轻链包括SEQ ID NO:16的轻链可变区的CDR 1、2和3;

(b) 单克隆抗体,其包括(i) 重链和(ii) 轻链,所述重链包括SEQ ID NO:17的重链可变区的CDR 1、2和3,所述轻链包括SEQ ID NO:18的轻链可变区的CDR 1、2和3;

(c) 单克隆抗体,其包括(i) 重链和(ii) 轻链,所述重链包括SEQ ID NO:19的重链可变区的CDR 1、2和3,所述轻链包括SEQ ID NO:20的轻链可变区的CDR 1、2和3;

(d) 单克隆抗体,其包括(i) 重链和(ii) 轻链,所述重链包括SEQ ID NO:21的重链可变区的CDR 1、2和3,所述轻链包括SEQ ID NO:22的轻链可变区的CDR 1、2和3;

(e) 单克隆抗体,其包括(i) 重链和(ii) 轻链,所述重链包括SEQ ID NO:23的重链可变

区的CDR 1、2和3,所述轻链包括SEQ ID NO:24的轻链可变区的CDR 1、2和3;以及

(f) 单克隆抗体,其包括(i) 重链和(ii) 轻链,所述重链包括SEQ ID NO:25的重链可变区的CDR 1、2和3,所述轻链包括SEQ ID NO:26的轻链可变区的CDR 1、2和3。

25. 根据上述权利要求中任一项所述的试剂,其中所述试剂包括抗体,所述抗体与选自由以下组成的组的抗体竞争结合Siglec-7和/或Siglec-9:

(a) 单克隆抗体,其包括(i) 重链和(ii) 轻链,所述重链包括SEQ ID NO:3的重链可变区的CDR 1、2和3,所述轻链包括SEQ ID NO:4的轻链可变区的CDR 1、2和3;

(b) 单克隆抗体,其包括(i) 重链和(ii) 轻链,所述重链包括SEQ ID NO:5的重链可变区的CDR 1、2和3,所述轻链包括SEQ ID NO:6的轻链可变区的CDR 1、2和3;

(c) 单克隆抗体,其包括(i) 重链和(ii) 轻链,所述重链包括SEQ ID NO:7的重链可变区的CDR 1、2和3,所述轻链包括SEQ ID NO:8的轻链可变区的CDR 1、2和3;

(d) 单克隆抗体,其包括(i) 重链和(ii) 轻链,所述重链包括SEQ ID NO:9的重链可变区的CDR 1、2和3,所述轻链包括SEQ ID NO:10的轻链可变区的CDR 1、2和3;

(e) 单克隆抗体,其包括(i) 重链和(ii) 轻链,所述重链包括SEQ ID NO:11的重链可变区的CDR 1、2和3,所述轻链包括SEQ ID NO:12的轻链可变区的CDR 1、2和3;以及

(f) 单克隆抗体,其包括(i) 重链和(ii) 轻链,所述重链包括SEQ ID NO:13的重链可变区的CDR 1、2和3,所述轻链包括SEQ ID NO:14的轻链可变区的CDR 1、2和3。

26. 一种药物组合物,其包括中和NKG2A的抑制活性的试剂,任选地抗体,和中和Siglec-9的抑制活性的试剂,任选地抗体,以及药学上可接受的载剂。

27. 一种试剂盒,其包括:(a) 一定剂量的中和NKG2A的抑制活性的试剂,任选地抗体,和(b) 一定剂量的中和Siglec-9的抑制活性的试剂,任选地抗体。

28. 一种试剂盒,其包括:(a) 多个包装的含有有效量的中和NKG2A的抑制活性的抗体的单剂量药物组合物和(b) 多个包装的含有有效量的中和Siglec-9的抑制活性的抗体的单剂量药物组合物。

29. 一种用于调节个体中的NKG2A+Siglec+淋巴细胞,任选地NK细胞,任选地CD8+T细胞的方法,所述方法包括向所述个体施用有效量的根据权利要求26所述的试剂。

30. 一种用于调节NKG2A+Siglec+淋巴细胞,任选地NK细胞,任选地CD8+T细胞的活性的体外方法,其包括使在其表面表达NKG2A和Siglec-9的淋巴细胞与中和NKG2A的抑制活性的抗体和中和Siglec-9的抑制活性的抗体接触。

31. 一种中和Siglec-9的抑制活性的试剂,其用于治疗或预防个体癌症,所述治疗包括:

- a) 确定患有癌症的所述个体中的恶性细胞的HLA-E多肽状态,以及
- b) 在确定HLA-E多肽由恶性细胞(例如在其表面上)表达后,向所述个体施用中和人NKG2A多肽的抑制活性的试剂和抑制人Siglec-9多肽的试剂。

32. 根据权利要求26所述的组合物,其用于治疗癌症。

33. 根据权利要求31或32所述的组合物或试剂,其中所述癌症是实体瘤。

34. 根据权利要求31或32所述的组合物或试剂,其中所述癌症是血液肿瘤。

35. 根据权利要求31到34所述的组合物或试剂,其中所述癌症的特征在于在其表面处带有Siglec-7和/或Siglec-9的唾液酸配体的恶性细胞。

## 使用人SIGLEC-9抗体和人NKG2A抗体治疗癌症的组合疗法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2017年7月10日提交的美国临时申请第62/530,454号的权益,所述申请通过引用以其整体并入本文,包含任何附图和序列列表。

[0003] 序列列表参考

[0004] 本申请与电子格式的序列列表一起提交。序列列表以2018年7月3日创建的名为“Sig793 PCT\_ST25 txt”的文件提供,其大小为156KB。序列列表的电子格式的信息通过引用以其整体并入本文。

### 技术领域

[0005] 本发明涉及试剂,其结合在NK和/或其它免疫细胞中具有抑制活性的人Siglec蛋白,并且中和此类Siglec的抑制活性。此类试剂可以用于治疗癌症。

### 背景技术

[0006] NK细胞是在来自淋巴样祖细胞的骨髓中发育的单核细胞,并且形态学特征和生物学特性通常包含簇决定簇(CD) CD16、CD56和/或CD57的表达;细胞表面上不存在 $\alpha/\beta$ 或 $\gamma/\delta$  TCR复合物;结合并杀死不能表达“自身”主要组织相容性复合体(MHC)/人类白细胞抗原(HLA)蛋白的靶细胞的能力;以及杀死表达活化NK受体的配体的肿瘤细胞或其它患病细胞的能力。NK细胞的特征在于它们能够结合并杀死几种类型的肿瘤细胞系,而无需事先免疫或活化。NK细胞还可以释放可溶蛋白和细胞因子,从而对免疫系统产生调节作用;并且可以经历多轮细胞分裂,并且产生具有与亲代细胞类似的生物学特性的子代细胞。正常、健康的细胞受到NK细胞的裂解保护。

[0007] 基于它们的生物学特性,本领域已经提出了依赖于NK细胞的调节的各种治疗和疫苗策略。然而,NK细胞活性受到涉及刺激和抑制信号两者的复杂机制的调节。简而言之,NK细胞的裂解活性受到各种细胞表面受体的调节,所述表面受体在与靶细胞上的配体相互作用后转导阳性或阴性细胞内信号。通过这些受体传递的正信号与负信号之间的平衡决定了NK细胞是否裂解(杀死)了靶细胞。NK细胞刺激信号可以由天然细胞毒性受体(NCR),如NKp30、NKp44和NKp46;以及NKG2C受体、NKG2D受体、某些活化的杀伤性Ig样受体(KIR)和其它活化的NK受体介导(Lanier,《免疫学年度评审(Annual Review of Immunology)》2005; 23:225-74)。NK细胞抑制信号可以由受体如CD94/NKG2-A,以及某些抑制KIR介导,其识别主要组织相容性复合体(MHC) I类-分子(Wagtmann等人(1995)《免疫力(Immunity)》5:439-449)。这些抑制性受体结合其它细胞上存在的MHC I类分子(包含HLAI类)的多晶型决定簇,并且抑制NK细胞介导的裂解。

[0008] NK细胞的裂解活性也可以由siglec多肽调节。Siglecs(与唾液酸结合的免疫球蛋白样凝集素)是结合唾液聚糖的I型凝集素的亚群,并且主要以依赖于细胞类型和分化的方式在造血系统的细胞上表达。鉴于唾液酸无处不在地表达,通常在糖蛋白和脂质的末端位置处,而单独的Siglec受体仅识别非常特定的独特的唾液聚糖结构,这取决于同一性和与

亚末端碳水化合物部分的连接。Siglecs仅对含有N-乙酰神经氨酸 (Neu5Ac)  $\alpha$ 2-6和 $\alpha$ 2-3键的常见哺乳动物唾液酸结构的一般亲和力低。

[0009] Siglecs通常分为两组,第一个亚群由Siglec-1、Siglec-2、Siglec-4和Siglec-15组成,并且CD33相关的Siglecs组包含Siglec-3、Siglec-5、Siglec-6、Siglec-7、Siglec-8、Siglec-9、Siglec-10、Siglec-11、Siglec-12、Siglec-14和Siglec-16。CD33相关的Siglecs的特征尤其在于低进化保守性和通过多种机制快速进化的序列。

[0010] Siglec-7 (CD328) 是一种1型跨膜蛋白,于1999年由意大利热那亚的Moretta组首次克隆和表征,并且属于人CD33相关的Siglec受体,其特征在于唾液酸结合N末端V集Ig结构域、两个C2集Ig结构域和胞质内区域,所述胞质内区域含有一个基于免疫受体酪氨酸的抑制性基序 (ITIM) 和一个ITIM样基序。Siglec-7在NK细胞、树突细胞、单核细胞和嗜中性粒细胞上组成性表达。此受体的细胞外结构域优先结合 (2,8)-连接的二唾液酸和分支的 $\alpha$ 2,6-唾液酸残基,如由神经节苷脂GD3展示的那些残基。

[0011] Siglec-9 (CD329) 在2000年由Varki组表征 (参见,例如Angata等人《生物化学杂志 (J Biol Chem)》2000;275:22127-22135),并且在单核细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、CD34+细胞和NK细胞上表达。已经发现Siglec-9 (以及Siglec-8) 对含有唾液酸和硫酸盐两者的唾液酸配体具有不同的特异性,其中硫酸盐的位置是特异性的一个重要决定因素。已经发现Siglec-9结合在癌细胞上过表达的MUC16。与Siglec-7一样,Siglec 9也含有唾液酸结合N末端V集Ig结构域、两个C2集Ig结构域和胞质内区域,所述胞质内区域含有一个基于免疫受体酪氨酸的抑制性基序 (ITIM) 和一个ITIM样基序。人Siglec-9的N末端V集Ig结构域与人Siglec-7的N末端V集Ig结构域共有约77%的总体氨基酸序列同一性,并且这两个siglecs显示不同的唾液酸结合特异性。

[0012] 结合测定已经报道,与Siglec-7类似,Siglec-9在半乳糖的 $\alpha$ 2,3-或 $\alpha$ 2,6-糖苷键上识别唾液酸。使用Siglec-9特异性mAb,Zhang等人 ((2000)《生物化学杂志 (J.Biol.Chem.)》第275卷,第29期:22121-22126) 报道发现Siglec-9以高或中间水平由单核细胞、嗜中性粒细胞和CD16+、CD56-细胞的小群表达。然而,观察到~50%的B细胞和NK细胞以及CD8+T细胞和CD4+T细胞的亚群表达较弱。作者得出的结论是,尽管Siglec-7和Siglec-9具有高度的序列相似性,但是它们具有不同的表达谱。

[0013] 尽管Siglec-9在NK和其它免疫细胞上有有趣的表达谱,并且在中和Siglec-9方面具有潜在的治疗意义,但是迄今为止,尚未开发出或提议专门中和Siglec-9的候选治疗剂用于治疗用途。据报道,由肿瘤相关的唾液酸配体接合在髓单核细胞系的细胞上的Siglec-9会抑制NK细胞以及嗜中性粒细胞的免疫监视和肿瘤细胞杀伤作用,所述嗜中性粒细胞是识别并直接杀死微生物的专门粒细胞 (Laubli等人 (2014)《美国国家科学院院报 (Proc.Nat.Acad.Sci.USA)》111 (39):14211-14216)。Carlin等人 ((2009)《血液 (Blood)》113:3333-3336) 报道了宿主唾液酸化聚糖的模拟允许细菌病原体以接合嗜中性粒细胞的Siglec-9并且抑制先天性免疫应答。Carlin等人描述了抗Siglec-9抗体191240 (R&D Systems, Inc.) 与Siglec-9上的唾液酸结合位点结合并且抑制与唾液酸的相互作用。Carlin等人进一步报道,与非阻断性抗体 (克隆E10-286, BD生物科学有限公司) 不同,克隆191240增强了嗜中性粒细胞对细菌细胞的活化。类似地,Laubli等人 (2014),如上文所述,报道了与克隆E10-286不能增强嗜中性粒细胞对肿瘤细胞的杀伤相比,抗Siglec-9抗体克

隆191240能够增强嗜中性粒细胞对肿瘤细胞的杀伤。

[0014] 抗Siglec-7抗体已经描述于欧洲专利1238282B1 (Moretta等人) 和Vitale等人 ((1999)《美国国家科学院院报 (Proc.Nat.Acad.Sci.96 (26) :15091-96), 是指鼠抗siglec-7抗体QA79, 以及Falco等人 (1999)《实验医学期刊 (J.Exp.Med.)》190:793-801报道了抗Siglec-7抗体Z176。

[0015] Hudak等人 (2014)《自然化学生物学 (Nat.Chem.Biol.)》10:69-77报道了阻断性抗Siglec-7抗体抑制了对肿瘤靶细胞免于NK细胞裂解的Siglec-7介导的保护。然而, 当转向Siglec-9时, 抗Siglec-9抗体 (使用克隆191240) 不能抑制对肿瘤靶细胞免于从人类供体中纯化的NK细胞裂解的Siglec-9介导的保护 (参见, Hudak等人 (2014)), 尽管具有增强嗜中性粒细胞杀死肿瘤细胞的能力 (参见, Laubli等人 (2014))。Laubli等人 (2014) 中报道为非阻断性并且不增强嗜中性粒细胞对肿瘤细胞的杀伤的二价结合抗体克隆E10-286也未能抑制对肿瘤靶细胞免于原代NK细胞裂解的Siglec-9介导的保护 (Jandus等人 (2014)《临床研究期刊 (J.Clin.Invest.)》124 (4) :1810-18020)。

[0016] 尽管对Siglec-7和-9感兴趣, 但是尚未开发出靶向这些受体的治疗剂。因此, 需要靶向这些受体的试剂, 以用于治疗疾病, 如癌症。

## 发明内容

[0017] 一方面, 本发明源于对高亲和力结合剂抗体的发现, 与嗜中性粒细胞和/或其它细胞相比, 所述高亲和力结合剂抗体充当人Siglecs的有效中和剂, 特别是在表达较低水平的细胞表面Siglec的NK细胞上, 并且在效应淋巴细胞中充当抑制性细胞表面受体 (Siglec-7、Siglec-9)。

[0018] 另一个方面, 本发明源于以下发现: 当与中和人NKG2A多肽的活性的试剂组合使用时, 结合并且中和人Siglec-9的抑制活性 (并且任选地进一步结合并且中和人Siglec-7的抑制活性) 的抗体表现出高度增加的引起靶细胞 (例如, 肿瘤细胞、感染细胞) 的免疫介导的 (例如NK细胞介导的) 消除的能力。具体地, 本发明人已经观察到当中和NKG2A的抑制活性时, Siglec多肽抑制NKG2A表达性NK细胞对HLA-E表达性肿瘤细胞的细胞毒性活性。

[0019] 在一个实施例中, 本公开提供了抑制Siglec-9多肽 (例如, 在细胞的表面表达的Siglec-9) 的活性的试剂, 其包含是Siglec-9的竞争性和非竞争性抑制剂的试剂 (例如抗体试剂)。相应的试剂在中和Siglec的抑制活性方面具有特别高的效力, 无论是否基本上阻断Siglec与其唾液酸配体之间的相互作用。在一个实施例中, 提供了一种治疗患有癌症或传染病的个体的方法, 所述方法包括向个体组合施用抑制Siglec-9和/或Siglec-7的试剂以及中和人NKG2A多肽的抑制活性的试剂。在一个实施例中, 提供了一种抑制Siglec-9和/或Siglec-7的试剂, 其用于治疗或预防癌症或传染病, 任选地, 其中癌症或传染病的特征在于表达HLA-E的细胞 (例如肿瘤细胞、感染细胞), 任选地其中将抑制Siglec-9和/或Siglec-7的试剂与中和人NKG2A多肽的抑制活性的试剂组合施用。在一个实施例中, 抑制Siglec-9和/或Siglec-7的试剂是中和Siglec-9多肽 (和任选地另外的Siglec-7多肽) 的抑制活性的抗体试剂。在一个实施例中, 提供了一种中和Siglec-9多肽 (和任选地另外的Siglec-7多肽) 的抑制活性的试剂 (例如抗体试剂) 与一种中和人NKG2A多肽的抑制活性的试剂 (例如抗体试剂) 组合的用途, 任选地用于治疗癌症或传染病。在一个实施例中, 提供了一种抑制

Siglec-9和/或Siglec-7的试剂,其用于增强中和人NKG2A多肽的抑制活性的试剂(例如抗体)的治疗活性。在一个实施例中,提供了一种中和人NKG2A多肽的抑制活性的试剂(例如抗体),其用于治疗或预防癌症或传染病,任选地,其中癌症或传染病的特征在于表达Siglec-9和/或Siglec-7的唾液酸配体(例如包括Neu5Aca2-3Galb1-4GlcNAcb结构的唾液酸)的细胞(例如肿瘤细胞、感染细胞),任选地其中中和人NKG2A多肽的抑制活性的试剂与Siglec-9和/或Siglec-7的抑制剂组合施用。在一个实施例中,提供了一种中和人NKG2A多肽的抑制活性的试剂(例如抗体),其用于增强Siglec-9和/或Siglec-7的抑制剂的治疗活性。在一个实施例中,中和人NKG2A多肽的抑制活性的试剂是结合NKG2A多肽并且中和人NKG2A多肽的抑制活性的抗体。在一个实施例中,中和人NKG2A多肽的抑制活性的试剂是结合HLA-E,并且抑制NKG2A与HLA-E之间的相互作用,从而中和人NKG2A多肽的抑制活性的抗体。

[0020] 在一个实施例中,本公开提供了一种治疗患有癌症或传染病的个体的方法,所述方法包括向个体组合施用中和Siglec-9多肽(和任选地另外的Siglec-7多肽)的抑制活性的试剂以及中和人NKG2A多肽的抑制活性的试剂。在一个实施例中,中和Siglec-9多肽的抑制活性的试剂是具有如本文进一步描述的特性的抗体。在一个实施例中,提供了一种用于治疗或预防个体癌症的方法,所述方法包括向个体施用:(a) 治疗活性量的抑制人NKG2A多肽的试剂,和(b) 治疗活性量的抑制人Siglec-9和/或Siglec-7多肽的试剂。在一个实施例中,癌症是实体瘤。在一个实施例中,癌症是血液肿瘤。在一个实施例中,癌症包括在其表面表达HLA-E的恶性细胞。在一个实施例中,抑制人NKG2A多肽的试剂是中和NKG2A的抑制活性的抗体。在一个实施例中,抑制人Siglec-9多肽的试剂是中和Siglec-9的抑制活性的抗Siglec-9抗体。可以将个人指定为人类。

[0021] 在一个实施例中,提供了活化或增强个体中肿瘤浸润淋巴细胞(例如NK细胞)的活性的方法,所述方法包括向个体施用:(a) 治疗活性量的抑制人NKG2A多肽的试剂,和(b) 治疗活性量的抑制人Siglec-9多肽的试剂。在一个实施例中,提供了活化或增强个体中肿瘤浸润NK细胞的活性的方法,所述方法包括向个体施用:(a) 治疗活性量的抑制人NKG2A多肽的试剂,和(b) 治疗活性量的抑制人Siglec-9多肽的试剂。在一个实施例中,提供了增加个体中NK细胞(例如NKG2A表达性NK细胞)引起HLA-E表达性细胞(例如癌细胞;感染的细胞)死亡的能力的方法,所述方法包括向个体施用:(a) 治疗活性量的抑制人NKG2A多肽的试剂,和(b) 治疗活性量的抑制人Siglec-9多肽的试剂。

[0022] 一方面,提供了一种组合物,其包括抑制人NKG2A多肽的试剂(例如抗体)和抑制人Siglec-9多肽的试剂(例如抗体)。

[0023] 一方面,本文的组合物和方法用于治疗或预防癌症,任选地实体瘤,任选地血液恶性肿瘤,任选地HLA-E阳性肿瘤,例如,其特征在于在其表面带有HLA-E的肿瘤细胞。在一个实施例中,癌症是晚期和/或难治性实体瘤。在一个非限制性实施例中,癌症选自以下组成的组:头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)、非小细胞肺癌(NSCLC)、肾癌、胰腺癌或食道腺癌、乳腺癌、肾细胞癌(RCC)、黑素瘤、结肠直肠癌和卵巢癌。

[0024] 在一个实施例中,以导致中和人个体中人Siglec-9的抑制活性的量(体内)施用抗Siglec-9抗体,例如,导致中和人个体中NK细胞上人Siglec-9的抑制活性的量,任选地在施用抗Siglec-9抗体后,持续至少一周、两周、三周或一个月。在一个实施例中,以导致中和人个体中人CD94/NKG2A的抑制活性的量(体内)施用抗NKG2A抗体,例如,导致中和人个体中NK



细胞上人CD94/NKG2A的抑制活性的量,任选地在施用抗NKG2A抗体后,持续至少一周、两周、三周或一个月。

[0025] 在一个实施例中,Siglec抑制剂(抑制Siglec-9多肽的试剂)是包括特异性结合人Siglec-9蛋白的免疫球蛋白抗原结合结构域的蛋白,例如抗体或抗体片段,或包括此类蛋白的蛋白。在一个实施例中,Siglec抑制剂特异性结合人Siglec-9蛋白,而不结合人Siglec-7和/或表1的其它人Siglec(由mAbsA、-B、-C、-D、-E和-F例证)。在一个实施例中,Siglec抑制剂特异性结合人Siglec-9蛋白和人Siglec-7蛋白,任选地进一步不结合表1的其它人Siglec(由mAbs4、-5、-6例证)。在一个实施例中,Siglec抑制剂是特异性结合人Siglec-9蛋白、人Siglec-7蛋白和人Siglec-12蛋白的抗体或抗体片段,任选地进一步不结合表1的其它人Siglec(由mAbs1、-2和-3例证)。在一个实施例中,Siglec抑制剂是能够二价结合人Siglec-9蛋白的抗体或抗体片段(抑制剂包括两个抗原结合结构域,所述每个抗原结合结构域都能够结合人Siglec-9蛋白)。

[0026] 在一个实施例中,结合人Siglec-9蛋白的抗体是分离的抗体或抗体片段,其特异性结合人Siglec-9多肽,并且中和Siglec-9多肽的抑制活性,任选地其中抗体或抗体片段基本上不阻断Siglec-9多肽与其唾液酸配体之间的相互作用(由mAbs 1、2和3例证,参见实例10),任选地其中抗体或抗体片段阻断Siglec-9多肽与其唾液酸配体之间的相互作用(由mAbs A、B和C例证,参见实例10)。任选地,Siglec-9多肽在细胞,例如,效应淋巴细胞,NK细胞,例如,原代NK细胞,来自人个体的CD56<sup>嗜</sup>NK细胞的表面表达。任选地,Siglec-9多肽在单核细胞来源的树突细胞的表面表达。在一个实施例中,抗体进一步结合人Siglec-7多肽,并且中和Siglec-7多肽的抑制活性,任选地进一步,其中抗体基本上不阻断Siglec-7多肽与其唾液酸配体之间的相互作用。任选地,Siglec-7多肽在细胞,例如单核细胞来源的树突细胞的表面表达。在另一个实施例中,抗体不结合人Siglec-7多肽。

[0027] 一方面,特异性结合人Siglec-9的抗体增强NK细胞(例如原代NK细胞)对带有唾液酸配体的靶细胞的活性(例如细胞毒性)。与仅可以在嗜中性粒细胞、Siglec转染子和/或在其细胞表面表达或被制备成表达高水平的Siglec-9的其它细胞中增强细胞毒性的一些抗体不同,本文所述的抗体即使在表达低水平的Siglec-9的细胞,如人类的NK细胞(例如CD56<sup>嗜</sup>NK细胞)中也具有功能性。增强此类Siglec-9低表达性NK细胞的细胞毒性的能力具有能够额外动员此细胞群体抵抗疾病靶细胞,例如肿瘤细胞和/或细菌细胞的优势。

[0028] 在一个实施例中,结合人Siglec-9蛋白的抗体是抗体或抗体片段(或包括此类片段的蛋白),其特异性结合人Siglec-9,并且在标准4小时体外细胞毒性测定中增强和/或恢复NK细胞(原代NK细胞)的细胞毒性,在所述细胞毒性测定中将表达Siglec-9的NK细胞与表达Siglec-9的唾液酸配体的靶细胞一起温育。在一个实施例中,在添加NK细胞之前,用<sup>51</sup>Cr标记靶细胞,并且然后将杀伤(细胞毒性)估计为与<sup>51</sup>Cr从细胞向培养基的释放成比例。任选地,可以根据本文实例中的方法进行测定,参见例如实例8。在一个实施例中,抗体或抗体片段能够将表达Siglec-9的NK细胞的细胞毒性恢复到至少通过不表达Siglec-9的NK细胞观察到的水平(例如,如根据本文实例的方法确定的)。

[0029] 在一个实施例中,在细胞毒性测定(例如,CD137表达测定)中,在结合并且中和NKG2A的抑制活性的抗体的存在下,结合人Siglec-9的抗体增强和/或恢复NK细胞(原代NK细胞;NKG2A表达性细胞)的细胞毒性,其中表达Siglec-9的NK细胞与表达Siglec-9的唾液

酸配体的靶细胞一起温育。

[0030] 在本文的任何方面,NK细胞(例如原代NK细胞)可以被指定为从供体纯化的新鲜NK细胞,任选地在使用之前在37℃下温育过夜。在本文的任何方面,NK细胞或原代NK细胞可以被指定为Siglec-9表达,例如,用于细胞可以在Siglec-9上通过流式细胞术进行门控的测定中。参见,例如如本文实例8所描述的NK细胞。在本文的任何方面,NK细胞或原代NK细胞可以被指定为NKG2A表达,例如,用于细胞可以在NKG2A上通过流式细胞术进行门控的测定中。

[0031] 在另一个实施例中,结合人Siglec-9蛋白的抗体是抗体或抗体片段(或包括此类片段的蛋白),其特异性结合人Siglec-9,并且中和单核细胞来源的树突细胞(moDC)中的Siglec-9多肽的抑制活性。在一个实施例中,moDC在其表面带有Siglec-9的唾液酸配体。在一个实施例中,moDC在其表面带有Siglec-9多肽,所述多肽与唾液酸以顺式相互作用进行接合。在一个实施例中,抗体增加moDC中的活化或信号传导。在一个实施例中,抗体中和带有Siglec-9的唾液酸配体的moDC中Siglec-9多肽的抑制活性,其中moDC是用神经氨酸酶处理moDC以除去唾液酸配体降低EC<sub>50</sub>,以使抗体与moDC结合的细胞。

[0032] 任选地,抗Siglec-9抗体可以以彼此相当的亲和力结合Siglec-7和Siglec-9多肽两者。此类抗体具有有利的药理特性。如本文所示,NK细胞可以表达抑制性Siglec-7和抑制性Siglec-9蛋白两者,但是Siglec-7和Siglec-9跨不同细胞群体也可以具有不同的表达谱。更进一步,已经表明肿瘤细胞可以表达Siglec-7和Siglec-9的天然配体(聚糖)。因此,抑制一种Siglec但是不抑制另一种的治疗剂在中和NK和/或其它免疫细胞群(例如,髓样来源的树突细胞)的活性的Siglec介导的限制方面可能不是最大有效的。因此抑制Siglec 7和9两者可能是有利的。然而,Siglec-9与人Siglec-7的N末端V集Ig结构域共有仅约77%的总氨基酸序列同一性。而且,这两个siglec显示出不同的唾液酸结合特异性。在一个实施例中,结合人Siglec-7(除了Siglec-9以外)的抗体或抗体片段(或包括此类片段的蛋白)中和嗜中性粒细胞的Siglec-7多肽的抑制活性;在一个实施例中,抗体或抗体片段增强和/或恢复嗜中性粒细胞对表达Siglec-7的唾液酸配体的靶细胞的细胞毒性。在一个实施例中,结合人Siglec-7(除了Siglec-9以外)的抗体或抗体片段(或包括此类片段的蛋白)中和单核细胞来源的树突细胞(moDC)中的Siglec-7多肽的抑制活性。在一个实施例中,moDC在其表面带有Siglec-7的唾液酸配体。在一个实施例中,moDC在其表面带有Siglec-7多肽,所述多肽与唾液酸以顺式相互作用进行接合。在一个实施例中,抗体增加moDC中的活化或信号传导。在一个实施例中,抗体中和带有Siglec-7的唾液酸配体的moDC中Siglec-7多肽的抑制活性,其中moDC是用神经氨酸酶处理moDC以除去唾液酸配体降低EC<sub>50</sub>,以使抗体与moDC结合的细胞。

[0033] 一方面,中和Siglec-7和Siglec-9的抑制活性的抗体能够以彼此相当的亲和力特异性结合抑制性人Siglec-7多肽和人Siglec-9多肽。例如,在某些实施例中,以彼此相当的亲和力结合Siglec-7和Siglec-9的抗体可以具有增强的能力,以阻断Siglec中的每一个与其一个或多个唾液酸配体之间的相互作用(由mAbs4、5和6例证,参见实例6)。在其它实施例中,结合Siglec-9的抗体可以表征为中和Siglec-9的抑制活性,而基本上不阻断Siglec-9与其一种或多种唾液酸配体,特别是包括Neu5Aca2-3Galb1-4GlcNAcb结构的唾液酸之间的相互作用(由mAbs1、2和3例证,参见实例9)。

[0034] 如本文所示,人Siglec-9结合Sia1(Neu5Aca2-3Galb1-4GlcNAcb)和Sia2(6'-唾液

乳糖)两者,而Siglec-7仅结合Sia2。一方面,抗体能够阻断此类一个或多个Siglec多肽,Siglec-9和Siglec-7两者的唾液酸配体的相互作用,例如Sia2唾液酸。在一个实施例中,唾液酸是唾液酸化的三糖。在一个实施例中,唾液酸包括6'-唾液酸乳糖结构。

[0035] 另一个方面,抗体结合人Siglec-9多肽,并且中和其抑制活性,其中抗体能够阻断Sia1 (Neu5Aca2-3Galb1-4GlcNAcb) 和Sia2 (6'-唾液乳糖) 两者与Siglec-9多肽的相互作用(由mAbs1、2和3例证,参见实例9)。

[0036] 在一个实施例中,能够结合Siglec-7和Siglec-9的抗体用于结合人Siglec-7多肽的EC<sub>50</sub>与其用于结合人Siglec-9多肽的EC<sub>50</sub>相差小于1个对数,如通过流式细胞术对结合于在其表面表达Siglec-7或Siglec-9的细胞(例如,用相应的Siglec中的一个转染但是不表达另一个Siglec的CHO细胞)所确定的。在一个实施例中,抗体用于结合人Siglec-7多肽和人Siglec-9多肽的EC<sub>50</sub>相差不超过0.5个对数,0.3个对数,0.2个对数或0.1个对数,如通过流式细胞术对结合于在其表面表达Siglec-7或Siglec-9的细胞所确定的。在其表面表达Siglec-7或Siglec-9的细胞可以表征为以彼此相当的表达水平表达各自的siglec。

[0037] 在一个实施例中,抗体进一步以与人Siglec-9彼此相当的亲和力结合非人灵长类动物Siglec。在一个实施例中,抗体用于结合人Siglec-9多肽和非人灵长类动物Siglec的EC<sub>50</sub>相差不超过1个对数,0.5个对数,0.3个对数,0.2个对数或0.1个对数,如通过流式细胞术对结合于在其表面表达相应的siglec多肽的细胞(例如,用相应的Siglec转染的CHO细胞)所确定的。

[0038] 在一个实施例中,中和人Siglec-9的活性的抗体用于结合人Siglec-9多肽和非人灵长类动物Siglec的EC<sub>50</sub>相差不超过1个对数,0.5个对数,0.3个对数,0.2个对数或0.1个对数,如通过流式细胞术对结合于在其表面表达Siglec-9的细胞(例如,用Siglec转染的CHO细胞)所确定的。

[0039] 在一个实施例中,抗体用于结合人Siglec-7多肽和人Siglec-9多肽(以及任选地进一步非人灵长类动物Siglec)的结合亲和力的KD相差不超过10倍、5倍、3倍或2倍,如通过例如表面等离子体共振 (SPR) 筛选(如通过用BIAcore™SPR分析装置分析)确定的)。

[0040] 在一个实施例中,抗体的KD为约 $1 \times 10^{-8}$ M到约 $1 \times 10^{-10}$ M,或约 $1 \times 10^{-9}$ M到约 $1 \times 10^{-11}$ M,用于结合到人类人Siglec-9多肽(和任选地另外的人Siglec-7多肽和/或非人灵长类动物Siglec)。在一个实施例中,抗Siglec-9抗体的KD为约 $1 \times 10^{-8}$ M到约 $1 \times 10^{-10}$ M、或约 $1 \times 10^{-9}$ M到约 $1 \times 10^{-11}$ M,用于结合(例如,单价亲和力)到人类人Siglec-9多肽,其中抗体与人Siglec-7多肽不具有实质结合。

[0041] 在一个实施例中,抗体更进一步基本上不结合人Siglec-3、-5、-6、-8、-10、-11和-12中的任一个。在一个实施例中,抗体更进一步基本上不结合Siglec-14和-16中的任一个。在一个实施例中,抗体更进一步基本上不结合人Siglec-6。在一个实施例中,抗体更进一步基本上不结合人Siglec-12。

[0042] 在本文实施例的任一个中,抗Siglec抗体的特征可以在于结合在细胞的表面上表达的多肽(例如NK细胞、制备成表达Siglec-7和/或Siglec-9的细胞,例如制备成在其表面表达Siglec-7和/或Siglec-9的重组CHO宿主细胞,如实例中所示),并且任选地进一步其中抗体以高亲和力结合,如通过流式细胞术确定的。例如,如通过流式细胞术确定的抗体的特征可以在于EC<sub>50</sub>不超过5μg/ml,任选地不超过1μg/ml,不超过0.5μg/ml,不超过0.2μg/ml或

不超过0.1 $\mu$ g/ml,用于结合原代NK细胞(例如,从来自人个体或供体的生物样品中纯化的NK细胞),任选地结合CD56<sup>暗</sup> NK细胞。可以例如根据实例9的方法确定EC<sub>50</sub>,例如,经过测试的4个或更多个健康的人类供体,在BD FACS Canto II上采集的染色并且使用FlowJo软件进行分析,以及使用4参数逻辑拟合计算EC<sub>50</sub>。

[0043] 另一个方面,特异性结合人Siglec-7和/或-9多肽的抗体或抗体片段(例如,抗原结合结构域或包括此类的蛋白)能够中和此类一个或多个Siglec在免疫细胞中的抑制活性,并且能够阻断此类一个或多个Siglec多肽与其唾液酸配体的相互作用。在一个实施例中,唾液酸是唾液酸化的三糖。在一个实施例中,唾液酸包括Neu5Aca2-3Galb1-4GlcNAcb结构。在一个实施例中,唾液酸包括6'-唾液酸乳糖结构。在一个实施例中,抗体或抗体片段特异性结合人Siglec-7和/或-9多肽,并且能够中和人NK细胞(例如人原代NK细胞;CD56<sup>暗</sup> NK细胞)、单核细胞、人树突细胞、人巨噬细胞(特别是免疫抑制或M2巨噬细胞)、CD8T细胞和/或人嗜中性粒细胞中的此类一个或多个Siglec的抑制活性。在一个实施例中,抗体或抗体片段特异性结合人Siglec-7和/或-9多肽,并且能够中和来自人类供体的免疫抑制巨噬细胞(例如M2巨噬细胞)中的此类一个或多个Siglec的抑制活性,其中抗体或抗体片段降低了巨噬细胞的免疫抑制活性或能力。

[0044] 如所讨论的,人Siglec-9结合Sia1 (Neu5Aca2-3Galb1-4GlcNAcb) 和Sia2 (6'-唾液乳糖) 两者,而Siglec-7仅结合Sia2。在某些方面,抗体能够阻断一个或多个Siglec-9多肽与是Siglec-9而不是Siglec-7的配体的唾液酸的相互作用,例如Sia1唾液酸。在一个实施例中,唾液酸是唾液酸化的三糖。在一个实施例中,唾液酸包括Neu5Aca2-3Galb1-4GlcNAcb结构。在一个实施例中,抗体基本上不阻断一个或多个Siglec-7多肽与是Siglec-7而不是Siglec-9的配体的唾液酸的相互作用,例如含6'-唾液乳糖的唾液酸。

[0045] 也可以根据本文的方法使用此类抗体的片段和衍生物。在一个实施例中,抗体包括能够结合人Siglec-7多肽和/或人Siglec-9多肽的抗原结合结构域(例如,单个抗原结合结构域、由重链可变结构域和轻链可变结构域组成的结构域等)。在一个实施例中,抗原结合结构域结合人Siglec-9多肽,并且不结合人Siglec-7多肽(由mAbsA、-B、-C、-D、-E和-F例证)。在一个实施例中,抗原结合结构域结合人Siglec-9多肽和人Siglec-7多肽两者(由mAbs1、-2、-3、-4、-5和-6例证)。在一个实施例中,提供了编码此类抗原结合结构域的蛋白质(例如抗体、多聚体和/或多特异性蛋白质)或核酸。

[0046] 在一个实施例中,中和性抗Siglec抗体减轻了由Siglec-7和/或-9在免疫细胞中发挥的抑制活性,增强了淋巴细胞有效识别和/或消除表达Siglec-7的唾液酸配体和/或Siglec-9的唾液酸配体的癌细胞的能力。抗体(或抗体片段)由于一种或其它类型的配体的表达而降低了癌细胞逃避裂解的能力,并且因此它们增强了免疫系统对肿瘤的监视。在NK隔室中,Siglec-9主要表达于CD56<sup>暗</sup> NK细胞上,而siglec-7表达于CD56<sup>暗</sup>和CD56<sup>明</sup> NK细胞上。CD56<sup>暗</sup> NK细胞(CD56<sup>暗</sup> CD16<sup>+</sup> KIR<sup>+</sup>) 约占外周血和脾NK细胞的90%,表达穿孔素和颗粒酶,并且是主要的细胞毒性亚群,而CD56<sup>明</sup> NK细胞(CD56<sup>明</sup> CD16<sup>暗</sup> /<sup>-</sup> KIR<sup>-</sup>) 构成淋巴结和扁桃体中大部分NK细胞,并且在活化后主要对细胞因子产生反应。在一个实施例中,提供了一种抗体或抗体片段,其特异性结合人Siglec-9,并且减轻由Siglec-9在人NK细胞(例如,人原代NK细胞;CD56<sup>暗</sup> NK细胞)中发挥的抑制活性,增强NK细胞有效识别和/或消除表达Siglec-9的唾液酸配体的癌细胞的能力。在一个实施例中,提供了一种抗体或抗体片段,其

特异性结合人Siglec-7和Siglec-9,并且减轻由Siglec-7和Siglec-9在人NK细胞(例如,人原代NK细胞;CD56<sup>暗淡</sup>NK细胞)中发挥的抑制活性,增强NK细胞有效识别和/或消除表达Siglec-7和Siglec-9的唾液酸配体的癌细胞的能力。

[0047] 在任何实施例中,抗Siglec抗体可以结合Siglec-7和Siglec-9两者,并且可以中和Siglec-7和Siglec-9两者介导的对淋巴细胞(例如,NK细胞、CD8<sup>+</sup>T细胞)细胞毒性的抑制。一方面,抗体在靶细胞(例如,表达Siglec-7的配体和/或Siglec-9的配体的细胞、肿瘤细胞)的存在下增加淋巴细胞活化。在一个实施例中,抗体增加NK细胞的细胞毒性,如在标准体外细胞毒性测定中评估的,在所述细胞毒性测定中将表达Siglec-9的NK细胞从人类供体纯化,并且与表达Siglec-9的唾液酸配体的靶细胞一起温育。在一个实施例中,通过细胞毒性/细胞毒性潜能的标志物,例如CD107和/或CD137表达(动员)的增加来评估细胞毒性抑制的增加的活化或中和。在一个实施例中,通过<sup>51</sup>Cr释放测定中<sup>51</sup>Cr释放的增加来评估细胞毒性抑制的增加的活化或中和。Siglec-7可以包括SEQ ID NO:1的氨基酸序列。Siglec-9可以包括SEQ ID NO:2的氨基酸序列。在另一个实施例中,Siglec-9包括SEQ ID NO:160的氨基酸序列。

[0048] 在任何实施例中,抗体能够结合包括SEQ ID NO:2的氨基酸序列的Siglec-9多肽(在位置100处带有赖氨酸,代表约49%的群体)和包括SEQ ID NO:160的氨基酸序列的Siglec-9多肽两者(在对应于SEQ ID NO:2的残基100的位置处带有谷氨酸),代表约36%的群体)。在任何实施例中,本公开的抗体或抗体片段可以被指定为能够中和表达(或其细胞表达)包括SEQ ID NO:2的氨基酸序列的Siglec-9多肽的个体中以及表达(或其细胞表达)包括SEQ ID NO:160的氨基酸序列的Siglec-9多肽的个体中Siglec-9的抑制活性。

[0049] 在任何实施例中,抗Siglec-9抗体可以能够中和包括SEQ ID NO:2的氨基酸序列的Siglec-9多肽和包括SEQ ID NO:160的氨基酸序列的Siglec-9多肽两者的抑制活性。在一个实施例中,抗体或抗体片段(或包括此类片段的蛋白质)结合人Siglec-9多肽,并且能够中和表达包括SEQ ID NO:2的氨基酸序列的Siglec-9多肽的NK细胞中和表达包括SEQ ID NO:160的氨基酸序列的Siglec-9多肽的NK细胞中Siglec-9多肽的抑制活性。在一个实施例中,抗体增加NK细胞的细胞毒性,如在标准体外细胞毒性测定中评估的,在所述细胞毒性测定中将表达特定Siglec-9的NK细胞从人类供体纯化,并且与表达Siglec-9的唾液酸配体的靶细胞一起温育。

[0050] 一方面,抗Siglec抗体是四聚体(例如,全长、F(ab)<sup>2</sup>片段)抗体或抗体片段,其能够以二价方式结合存在于Siglec的细胞外结构域上的表位。以二价方式结合Siglec的抗体或抗体片段可以包括两个抗原结合结构域,每个抗原结合结构域能够结合Siglec-9多肽,或者每个抗原结合结构域能够结合存在于Siglec-7和Siglec-9多肽两者上的表位。在本文实施例的任一个的另一个方面,抗体以单价方式结合到Siglec,并且在每个Siglec,例如Siglec-7和/或Siglec-9处缺乏激动剂活性。在一个实施例中,以单价方式结合Siglec的抗体是Fab片段。在本文实施例的任一个中,以单价或二价方式结合到Siglec的抗体在Siglec9处不含激动剂活性。对于治疗用途,抗体优选地是非消耗性抗体。任选地,抗体包括能够由人新生儿Fc受体(FcRn)结合,但是基本上缺乏通过其Fc结构域与人Fc $\gamma$ R的结合的Fc结构域,(例如,CD16',任选地人CD16A、CD16B、CD32A、CD32B和/或CD64多肽中的一个或多个或每一个)。任选地,抗体包括IgG4同种型的人IgG1、IgG2、IgG3的Fc结构域,所述结构域

包括降低抗体对人CD16A、CD16B、CD32A、CD32B和/或CD64多肽中的一个或多个或每一个的结合亲和力的氨基酸修饰(例如,一个或多个取代)。

[0051] 在一个实施例中,抗体包括一个或多个(例如,两个)结合Siglec-9,任选地进一步结合Siglec-7的抗原结合结构域。在一个特定实施例中,抗体是四聚体,任选地全长抗体,其包括两个相同的抗原结合结构域(任选地,两个重链和轻链可变区对),并且结合并中和Siglec-9,任选地进一步Siglec-7的抑制活性,包括能够由人类新生儿Fc受体(FcRn)结合的Fc结构域,并且基本上缺乏与人Fc $\gamma$ R的结合(例如,CD16;任选地人CD16A、CD16B、CD32A、CD32B和/或CD64多肽中的一个或多个或每一个)。

[0052] 在本文实施例的任一个中,在与人类淋巴细胞上的Siglec结合后,单克隆抗体具有增强或重构在靶细胞表面上带有Siglec的唾液酸配体的靶人细胞的裂解的能力,和/或当所述靶细胞与所述淋巴细胞,例如效应淋巴细胞,来自人个体的NK或CD8+T细胞,例如CD56<sup>暗</sup>NK细胞接触时,具有增强淋巴细胞活化的能力(例如,如通过淋巴细胞上CD107和/或CD137表达中的增加所确定的)。在一个实施例中,提供了一种抗体,其中和由淋巴细胞的第一亚群表达的第一Siglec(例如,CD56<sup>暗</sup>NK细胞上表达的Siglec-9),以及中和由淋巴细胞的第二亚群表达的第二Siglec(CD56<sup>明</sup>NK细胞上表达的Siglec-7)。人类淋巴细胞的第一和第二亚群(例如,NK细胞、CD8+T细胞、单核细胞、树突细胞、巨噬细胞、免疫抑制或M2巨噬细胞)的特征可以在于例如不同的细胞表面标志物或不同的功能特性或裂解或识别不同的靶细胞的能力(例如被不同的靶细胞活化)。在一个实施例中,抗体减少(阻断)Siglec与其唾液酸配体(例如,存在于肿瘤细胞上的配体)的结合。

[0053] 在本文实施例的任一个中,Siglec的唾液酸或唾液酸配体是天然配体,例如,已知唾液酸配体(包括唾液酸的配体)与抗体结合的Siglec多肽结合。唾液酸是九个碳的酸性单糖家族,通常被发现是N-聚糖、O-聚糖和糖脂的末端分支。Siglec被认为识别唾液酸分子的许多方面,像来自位置2的唾液酸键、唾液酸的布置和它们的呈现方式。在本文实施例的任一个中,Siglec的配体包括主要5-N-乙酰神经氨酸(Neu5Ac)衍生物,并且可以包括其它的唾液酸衍生物,像5-N-羟乙酰神经氨酸(Neu5Gc)衍生物。在一个实施例中,Siglec-9和/或Siglec-7的配体是存在于糖蛋白(例如,粘蛋白)或糖脂上的唾液酸。在一个实施例中,Siglec-7的配体包括存在于b系列神经节苷脂上的 $\alpha$ 2,8-连接的二唾液酸,例如GD2、GD3和GT1b。在一个实施例中,Siglec-7的配体包括内部分支的 $\alpha$ 2,6-连接的二唾液酸神经节苷脂,例如,DSGb5。在一个实施例中,Siglec-9的配体是存在于或包括粘蛋白,例如MUC1上的配体。在一个实施例中,Siglec-9的配体是含有唾液酸和硫酸盐两者的唾液酸聚糖配体。

[0054] 一方面,抗体结合存在于第一和第二人CD33相关的Siglec的细胞外结构域上的共同决定簇。在本文任何实施例的一方面,抗体结合存在于Siglec-9上,但是不存在于Siglec-7上的决定簇。在本文任何实施例的一方面,抗体结合存在于Siglec-7上和Siglec-9上的共同决定簇。任选地,由抗体结合的决定簇不存在于一个或多个其它Siglec上,例如,Siglec-3、-5、-6、-8、-10、-11和-12中的一个或多个(或全部)。

[0055] 在本文实施例的任一个中,抗体结合Siglec的细胞外结构域。在本文的某些实施例中,特别是在抗体阻断Siglec与其唾液酸配体之间的相互作用的情况下,抗体可以至少部分地在Siglec的唾液酸结合结构域内或附近结合。在本文的其它实施例中,特别是在抗体不阻断Siglec与其唾液酸配体之间的相互作用的情况下,抗体可以在Siglec的唾液酸结

合结构域外部结合。

[0056] 在本文实施例的任一个中,在结合到人淋巴细胞(例如原代NK细胞)上的Siglec后,当靶细胞与所述淋巴细胞接触时,单克隆抗体具有使带有所述靶细胞表面上的Siglec的唾液酸配体的靶人类细胞的裂解重构的能力。

[0057] 在本文实施例的任一个中,抗Siglec抗体的KD(例如,用于单价结合,如根据这里的实例中公开的方法确定的)小于 $10^{-8}$ M,优选地小于 $10^{-9}$ M,用于结合到Siglec多肽(例如,人Siglec-7和/或人Siglec-9)。只要Siglec-7和-9结合位点被认为通常由于与大量表达低亲和力的唾液酸的顺式相互作用而掩蔽在细胞表面,则反式相互作用可以与表达比与顺式竞争的配体更高的亲和力的抗体一起发生。在一个实施例中,中和性抗Siglec抗体能够置换唾液酸配体与Siglec(例如,Siglec-7和/或Siglec-9)的结合。

[0058] 抗Siglec抗体可以单独或以任何合适的组合具有前述性质中的任一种的人或人源化抗体或抗体片段或其衍生物。

[0059] 抗Siglec抗体可以竞争结合由mAb-A、-B、-C、-D、-E和/或-F结合的Siglec-9上的表位(例如,其与具有重链和轻链CDR或mAb-A、-B、-C、-D、-E和/或-F中任一个的可变区的抗体竞争结合Siglec-9多肽上的表位)。

[0060] 抗Siglec抗体可以竞争结合由mAbs-1、-2、-3、-4、-5和/或-6结合的Siglec-7和/或Siglec-9上的表位(例如,其与具有重链和轻链CDR或mAbs-1、-2、-3、-4、-5或-6中任一个的可变区的抗体竞争结合Siglec-7和/或Siglec-9多肽上的表位)。

[0061] 一方面,抗Siglec抗体已经减少了与在残基N82、P83、A84、R85、A86和/或V87处具有突变的Siglec-7多肽的结合(例如,如表3中列出的突变)。一方面,抗Siglec-7抗体已经减少了与在残基N81、D100、H102和/或T103处具有突变的Siglec-7多肽的结合(例如,如表3中列出的突变)。一方面,抗Siglec-7抗体已经减少了与在残基W88、E89、E90、R92处具有突变的Siglec-7多肽的结合(例如,如表3中列出的突变)。突变的残基位置参考SEQ ID NO:1的Siglec-7多肽。任选地,抗体不失去对表3的一种或多种其它突变体Siglec-7多肽的结合,例如突变体M6、M8、M15或M16中的一种或多种(或所有)。

[0062] 一方面,抗Siglec抗体已经减少了与在残基N78、P79、A80、R81、A82和/或V83处具有突变的Siglec-9多肽的结合(例如,如表3中列出的突变)。一方面,抗Siglec-9抗体已经减少了与在残基N77、D96、H98和/或T99处具有突变的Siglec-9多肽的结合(例如,如表3中列出的突变)。一方面,抗Siglec-9抗体已经减少了与在残基W84、E85、E86和/或R88处具有突变的Siglec-9多肽的结合(例如,如表3中列出的突变)。突变的残基位置参考SEQ ID NO:2的Siglec-9多肽。任选地,抗体不失去对表3的一种或多种其它突变体Siglec-9多肽的结合,例如突变体M6、M8、M15或M16中的一种或多种(或所有)。

[0063] 一方面,抗Siglec抗体已经减少了与在残基S47、H48、G49、W50、I51、Y52、P53和/或G54处具有突变的Siglec-9多肽的结合(例如,如表3中列出的突变)。突变的残基位置参考SEQ ID NO:2的Siglec-9多肽。任选地,抗体不失去对表3的一种或多种其它突变体Siglec-9多肽的结合,例如突变体9、10和/或11,或突变体M7或M8中的一种或多种(或所有)。

[0064] 一方面,抗Siglec抗体已经减少了与在残基P55、H58、E122、G124、S125和/或K127处具有突变的Siglec-9多肽的结合(例如,如表3中列出的突变)。突变的残基位置参考SEQ ID NO:2的Siglec-9多肽。任选地,抗体不失去对表3的一种或多种其它突变体Siglec-9多

肽的结合,例如突变体9、10和/或11。

[0065] 一方面,抗Siglec抗体已经减少了与在残基K131和/或H132处具有突变的Siglec-9多肽的结合(例如,如表3中列出的突变)。突变的残基位置参考SEQ ID NO:2的Siglec-9多肽。任选地,抗体不失去对表3的一种或多种其它突变体Siglec-9多肽的结合,例如突变体9、10和/或11,或突变体M8或M15中的一种或多种(或所有)。

[0066] 一方面,抗Siglec抗体已经减少了与在残基R63、A66、N67、T68、D69、Q70和/或D71处具有突变的Siglec-9多肽的结合(例如,如表3中列出的突变)。突变的残基位置参考SEQ ID NO:2的Siglec-9多肽。任选地,抗体不失去对表3的一种或多种其它突变体Siglec-9多肽的结合,例如突变体9、10和/或11,或突变体M6、M15或M16中的一种或多种(或所有)。

[0067] 抗Siglec抗体可以包括选自以下组成的组的抗体的重链和轻链CDR1、2和3,或结合相同的表位和/或与选自以下组成的组的抗体竞争结合Siglec-7和/或Siglec-9多肽:

[0068] (a) 单克隆抗体,其包括(i)重链和(ii)轻链,所述重链包括SEQ ID NO:3的重链可变区的CDR 1、2和3,所述轻链包括SEQ ID NO:4的轻链可变区的CDR 1、2和3;

[0069] (b) 单克隆抗体,其包括(i)重链和(ii)轻链,所述重链包括SEQ ID NO:5的重链可变区的CDR 1、2和3,所述轻链包括SEQ ID NO:6的轻链可变区的CDR 1、2和3;

[0070] (c) 单克隆抗体,其包括(i)重链和(ii)轻链,所述重链包括SEQ ID NO:7的重链可变区的CDR 1、2和3,所述轻链包括SEQ ID NO:8的轻链可变区的CDR 1、2和3;

[0071] (d) 单克隆抗体,其包括(i)重链和(ii)轻链,所述重链包括SEQ ID NO:9的重链可变区的CDR 1、2和3,所述轻链包括SEQ ID NO:10的轻链可变区的CDR 1、2和3;

[0072] (e) 单克隆抗体,其包括(i)重链和(ii)轻链,所述重链包括SEQ ID NO:11的重链可变区的CDR 1、2和3,所述轻链包括SEQ ID NO:12的轻链可变区的CDR 1、2和3;以及

[0073] (f) 单克隆抗体,其包括(i)重链和(ii)轻链,所述重链包括SEQ ID NO:13的重链可变区的CDR 1、2和3,所述轻链包括SEQ ID NO:14的轻链可变区的CDR 1、2和3。

[0074] (g) 单克隆抗体,其包括(i)重链和(ii)轻链,所述重链包括SEQ ID NO:15的重链可变区的CDR 1、2和3,所述轻链包括SEQ ID NO:16的轻链可变区的CDR 1、2和3;

[0075] (h) 单克隆抗体,其包括(i)重链和(ii)轻链,所述重链包括SEQ ID NO:17的重链可变区的CDR 1、2和3,所述轻链包括SEQ ID NO:18的轻链可变区的CDR 1、2和3;

[0076] (i) 单克隆抗体,其包括(i)重链和(ii)轻链,所述重链包括SEQ ID NO:19的重链可变区的CDR 1、2和3,所述轻链包括SEQ ID NO:20的轻链可变区的CDR 1、2和3;

[0077] (j) 单克隆抗体,其包括(i)重链和(ii)轻链,所述重链包括SEQ ID NO:21的重链可变区的CDR 1、2和3,所述轻链包括SEQ ID NO:22的轻链可变区的CDR 1、2和3;

[0078] (k) 单克隆抗体,其包括(i)重链和(ii)轻链,所述重链包括SEQ ID NO:23的重链可变区的CDR 1、2和3,所述轻链包括SEQ ID NO:24的轻链可变区的CDR 1、2和3;以及

[0079] (l) 单克隆抗体,其包括(i)重链和(ii)轻链,所述重链包括SEQ ID NO:25的重链可变区的CDR 1、2和3,所述轻链包括SEQ ID NO:26的轻链可变区的CDR 1、2和3。

[0080] 抗Siglec抗体可以具有重链和轻链,所述重链具有选自以下组成的组的抗体的重链的一个、两个或三个CDR:抗体mAb-A、-B、-C、-D、-E和-F;所述轻链具有选自以下组成的组的相应抗体的轻链的一个、两个或三个CDR:抗体mAb-A、-B、-C、-D、-E和-F。



[0081] 抗Siglec抗体可以包括:包括氨基酸序列SYWMH (SEQ ID NO:75) 的重链CDR1;包括氨基酸序列EINPSNGHTNYNEKFES (SEQ ID NO:78) 的重链CDR2;包括氨基酸序列GVESYDFDDALDY (SEQ ID NO:80) 的重链CDR3;包括氨基酸序列RASQDINNYLN (SEQ ID NO:83) 的轻链CDR1;包括氨基酸序列YTSRLHS (SEQ ID NO:57) 的轻链CDR2;包括氨基酸序列QQGNTLPFT (SEQ ID NO:86) 的轻链CDR3;以及人类重链和轻链框架序列。

[0082] 抗Siglec抗体可以包括:包括氨基酸序列SYWMH (SEQ ID NO:75) 的重链CDR1;包括氨基酸序列EINPSNGHTNYNEKFKT (SEQ ID NO:90) 的重链CDR2;包括氨基酸序列GVETYDFDDAMDY (SEQ ID NO:92) 的重链CDR3;包括氨基酸序列RASQDINNYLN (SEQ ID NO:83) 的轻链CDR1;包括氨基酸序列FTSRLHS (SEQ ID NO:95) 的轻链CDR2;包括氨基酸序列QQGDTFPFT (SEQ ID NO:96) 的轻链CDR3;以及人类重链和轻链框架序列。

[0083] 抗Siglec抗体可以包括:包括氨基酸序列NYEMN (SEQ ID NO:98) 的重链CDR1;包括氨基酸序列WINTYTGESTYADDFK (SEQ ID NO:101) 的重链CDR2;包括氨基酸序列DDYGRSYGFAY (SEQ ID NO:103) 的重链CDR3;包括氨基酸序列RASESVDSYGNSFMH (SEQ ID NO:106) 的轻链CDR1;包括氨基酸序列LASKLES (SEQ ID NO:109) 的轻链CDR2;包括氨基酸序列HQNNEDPPWT (SEQ ID NO:110) 的轻链CDR3;以及人类重链和轻链框架序列。

[0084] 抗Siglec抗体可以包括:包括氨基酸序列DYSMH (SEQ ID NO:112) 的重链CDR1;包括氨基酸序列WIITETGEPTYADDFRG (SEQ ID NO:115) 的重链CDR2;包括氨基酸序列DFDGY (SEQ ID NO:117) 的重链CDR3;包括氨基酸序列RASENIYSYLA (SEQ ID NO:119) 的轻链CDR1;包括氨基酸序列NAKTLTE (SEQ ID NO:122) 的轻链CDR2;包括氨基酸序列QHGYGFPWT (SEQ ID NO:123) 的轻链CDR3;以及人类重链和轻链框架序列。

[0085] 抗Siglec抗体可以包括:包括氨基酸序列TFGMH (SEQ ID NO:125) 的重链CDR1;包括氨基酸序列YISSGSNAIYYADTVKG (SEQ ID NO:128) 的重链CDR2;包括氨基酸序列PGYGAWFAY (SEQ ID NO:130) 的重链CDR3;包括氨基酸序列RASSSVSSAYLH (SEQ ID NO:133) 的轻链CDR1;包括氨基酸序列STSNLAS (SEQ ID NO:136) 的轻链CDR2;包括氨基酸序列QQYSAYPYT (SEQ ID NO:137) 的轻链CDR3;以及人类重链和轻链框架序列。

[0086] 抗Siglec抗体可以包括:包括氨基酸序列DYSMH (SEQ ID NO:112) 的重链CDR1;包括氨基酸序列VISTYNGNTNYNQKFKG (SEQ ID NO:139) 的重链CDR2;包括氨基酸序列RGYYGSSWFGY (SEQ ID NO:141) 的重链CDR3;包括氨基酸序列KASQNVGTDVA (SEQ ID NO:144) 的轻链CDR1;包括氨基酸序列SASYRYS (SEQ ID NO:147) 的轻链CDR2;包括氨基酸序列QQYNSFPYT (SEQ ID NO:148) 的轻链CDR3;以及人类重链和轻链框架序列。

[0087] 抗Siglec抗体可以具有重链和/或轻链,所述重链和/或轻链具有选自由以下组成的组的抗体的相应重链和/或轻链中的一个、两个或三个CDR:抗体mAbs-1、-2、-3、-4、-5和-6。

[0088] 在实施例中的任一个的一方面,与Siglec的结合可以被指定为与细胞Siglec的结合,其中Siglec在细胞的表面处表达,例如天然或经过修饰的细胞Siglec、由重组宿主细胞表达的Siglec、由NK细胞、CD8 T细胞等表达的Siglec。

[0089] 抑制NKG2A多肽的化合物(抗NKG2A试剂)的特征可以是增加NKG2A表达性NK细胞和/或T细胞引起HLA-E表达性细胞(例如表达HLA-E的肿瘤细胞)的死亡的能力的化合物。任选地,抑制NKG2A多肽的化合物是结合NKG2A多肽的多肽,任选地抗体(例如单克隆抗体)。

[0090] 在一个实施例中,抗NKG2A试剂通过阻断其配体HLA-E的结合而降低了NKG2A的抑制活性,即,抗NKG2A试剂干扰了HLA-E对NKG2A的结合。具有SEQ ID NO:171-175中任一个的重链和SEQ ID NO:176的轻链的抗体是此类抗体的实例。在一个实施例中,抗NKG2A试剂降低了NKG2A的抑制活性,而不阻断其配体HLA-E的结合,即,抗NKG2A试剂是非竞争性拮抗剂,并且不干扰HLA-E对NKG2A的结合。分别具有SEQ ID NO:177和178的重链和轻链可变区的抗体是此类抗体的实例。

[0091] 在一个实施例中,抗NKG2A试剂以比结合一种或多种活化性NKG2受体明显更高的亲和力结合NKG2A。例如,在一个实施例中,试剂是以比结合NKG2C明显更高的亲和力结合NKG2A的抗体。在额外或替代性实施例中,试剂是以比结合NKG2E明显更高的亲和力结合NKG2A的抗体。在额外或替代性实施例中,试剂是以比结合NKG2H明显更高的亲和力结合NKG2A的抗体。

[0092] 在一个实施例中,抗NKG2A试剂与具有包括SEQ ID NO:171-175中任一个的氨基酸序列的重链可变区和包括SEQ ID NO:176的氨基酸序列的轻链可变区的抗体,或分别具有SEQ ID NO:177和178的重链和轻链可变区的抗体竞争结合CD94/NKG2A。试剂可以是例如人或人源化的抗NKG2A抗体,例如莫纳珠单抗(IPH2201, Innate Pharma)。

[0093] 在一个实施例中,抗NKG2A抗体是人源化抗体,其分别具有SEQ ID NO:171-175中任一个的重链中的任一个的重链CDR和SEQ ID NO:176的轻链的轻链CDR。在一个实施例中,抗NKG2A抗体是人源化抗体,其分别具有SEQ ID NO:171-175中任一个的重链中的任一个的重链可变区和SEQ ID NO:176的轻链的轻链可变区。

[0094] 在本发明的实施例中的任一个的一方面,提供了结合Siglec-9多肽,并且进一步结合人NKG2A多肽,并且中和NKG2A多肽的抑制活性的蛋白(例如,根据本文实施例中的任一个的抗体或抗体片段)。此类蛋白的实例包含例如多特异性(例如双特异性、三特异性)抗体。

[0095] 本公开还涉及编码具有任何前述性质的人或人源化抗体或抗体片段的核酸,包括此类核酸的载体,包括此类载体的细胞以及根据本公开产生抗体的方法。还提供了组合物,如药学上可接受的组合物和试剂盒,其包括此类蛋白质、核酸、载体和/或细胞,以及通常可以是促进调配、递送、稳定性或组合物的其它特性(例如,各种载剂)的活性成分或非活性成分的一种或多种另外的成分。本发明进一步涉及制备和使用此类抗体、核酸、载体、细胞、生物和/或组合物的各种新的和有用的方法,如在Siglec介导的生物活性的调节中,例如在治疗与其相关的疾病,特别是癌症和传染病中。

[0096] 在本文提供的本发明的描述中将更加充分地描述这些方面,并且额外的方面、特征和优点将是显而易见的。

## 附图说明

[0097] 图1示出了抗Siglec抗体与NK细胞的结合。SiglecMFI:荧光强度的平均值。很大一部分(约44%)NK细胞表达Siglec-7和Siglec-9两者,表明很大比例的NK细胞可以被这些受体中的每一个(或两者)抑制,作为存在于例如肿瘤细胞上的聚糖配体的函数。

[0098] 图2示出了例如抗体结合Siglec-7但是不结合Siglec-9或猕猴Siglec(右图),结合Siglec-7、Siglec-9和猕猴Siglec中的每一个(中图),以及结合Siglec-9,但是不结合

Siglec-7或猕猴Siglec(左图)的流式细胞术的代表性结果。

[0099] 图3示出了通过流式细胞术滴定抗体mAbA、mAbC和mAbD与moDC(左图)和经过神经氨酸酶处理的moDC(右图)的结合,以及它们相应的EC<sub>50</sub>值。在神经氨酸酶处理之后,EC<sub>50</sub>高度增强(10倍),表明在神经氨酸酶处理之前,在moDC上表达的Siglec-9与其唾液酸配体以顺式相互作用进行接合。然而,平台期水平未改变,表明抗体可以结合细胞表面上的所有Siglec-9(结合和未结合)构象,并且抑制monoDC以及其它细胞类型(例如单核细胞和巨噬细胞M1和M2)中的顺式相互作用和信号传导。

[0100] 图4示出了在Siglec-7和-9交叉反应抗体中(图4B)和在Siglec-9单特异性(非Siglec-7结合)抗体中(图4A) YTS Siglec-9\*细胞毒性的增加的剂量依赖性诱导。

[0101] 图5示出了使用原代NK细胞(如从供体中纯化的新鲜NK细胞)和HT29大肠癌细胞,在经典的<sup>51</sup>Cr释放测定中,由两个不同的人类供体(供体D1(左图)和D2(右图))中的抗体mAbA、mAbC、mAbD、mAbE和mAbF介导的原代NK细胞细胞毒性的增加。

[0102] 图6示出了在一个人类供体中,在HT29肿瘤细胞的存在下,由几种抗Siglec-9和抗Siglec-7/9抗体mAbA、mAbB、mAbF、mAb6和mAb4介导的表达CD137的Siglec-9阳性NK细胞的%的增加。抗Siglec-9抗体将Siglec-9表达性原代人NK细胞的细胞毒性完全恢复到在同一供体的Siglec-9阴性原代人NK细胞中观察到的水平。

[0103] 图7示出了抗体mAbA和mAbI诱导Siglec-9阳性CD137+NK细胞(%)增加(中图),而不诱导Siglec-9阴性CD137+NK细胞(%)增加(右图)。左图示出了在不存在抗体的情况下表达CD137的NK的%。

[0104] 图8示出了在存在抗体的情况下,Siglec-9-Fc蛋白与Ramos细胞的结合(上图)。抗Siglec/9mAbs mAbA、mAbB、mAbC和mAbD各自抑制Siglec-9-Fc蛋白与Ramos细胞的结合,而mAbE示出部分抑制,并且mAbF不抑制结合。下图示出了在抗体的存在下,Siglec-9-Fc蛋白与K562细胞的结合。抗Siglec/9mAbs mAbA、mAbB、mAbC和mAbD各自抑制Siglec-9-Fc蛋白与Ramos细胞的结合,而mAbE和mAbF两者示出部分抑制。

[0105] 图9和10示出了使用ELISA测定,测试通过抗Siglec-7/9抗体,Siglec-7和-9与唾液酸化的配体之间的相互作用的阻断。图9示出了mAb 1、2、4、5和6阻断Siglec-7与Sia2的相互作用,但是mAb3却没有。图10示出所有mAb都阻断Siglec-9与Sia2的相互作用,而mAb1、mAb2和mAb3示出低的抑制Siglec-9与Sia1的相互作用的能力,并且因此基本上不阻断Sia1相互作用。

[0106] 图11-14示出了人Siglec-9蛋白。图11示出了Siglec-9 N末端V集Ig样结构域的结构,其中在Siglec-9突变体M9、M10和M11中取代的残基以深色阴影示出。图12示出了Siglec-9 N末端V集Ig样结构域的结构,其中在Siglec-9突变体M6和M7中取代的残基以深色阴影示出。图13示出了Siglec-9 N末端V集Ig样结构域的结构,其中在Siglec-9突变体M16中取代的残基以深色阴影示出。图14示出了Siglec-9 N末端V集Ig样结构域的结构,其中在Siglec-9突变体M8中取代的残基以深色阴影示出。在图11-14的每一个中,以浅色阴影示出了唾液酸配体结合位点。

[0107] 图15示出了抗Siglec抗体(mAbA)诱导了Siglec-9+NK细胞中CD137阳性细胞的增加,但是未诱导Siglec-9-NK细胞中CD137阳性细胞的增加,并且抗NKG2A抗体增强了Siglec-9-和Siglec-9+NK细胞两者对HLA-E阳性肿瘤靶细胞的细胞毒性(如通过CD137表达

的增加来评估), Siglec-9- (阴性) 细胞中CD137表达的增加更大, 表明Siglec-9在存在NKG2A阻断的情况下限制了NKG2A表达性NK细胞的细胞毒性。抗Siglec抗体的添加恢复了NKG2A表达性NK细胞中的CD137表达/细胞毒性。

## 具体实施方式

### [0108] 定义

[0109] 如说明书中所用, “一”或“一个”可能表示一个或多个。如一个或多个权利要求中所用, 当与单词“包括”结合使用时, 单词“一”或“一个”可以表示一个或多于一个。如本文所用, “另一个”可以表示至少第二个或更多个。

[0110] 当使用“包括”时, 这可以任选地由“基本上由……组成”或“由……组成”替换。

[0111] 人Siglec-7 (示出在基因库登录号NP\_055200.1中, 其全部公开内容通过引用并入本文) 是CD33相关的Siglec家族的成员 (Angata和Varki, 《糖生物学 (Glycobiology)》10 (4), 431-438 (2000))。人Siglec-7包括467个氨基酸, 具有以下氨基酸序列:

[0112] mllllllplll wgrervegqk snrkdysltm qssvtvqegm cvhvrcsfy pvdsqtdsdp  
vhgywfragn diswkapvat nnpawavqee trdrfhllgd pqtknctlsi rdarmsdagr  
yffrmekgni kwnykydqls vnvthaltrp nilipgtles gcfqnltsv pwaceqgtp  
miswmgtsvs plhpsttrss vltlipqpqh hgtsltcqvt lpgagvttnr tiqlnvsypp  
qnlvtvtfqg egtastalgn ssslsvlegq slrlvcavds npparlswtw rsltlypsqp  
snplvlelqv hlgdegeftc raqnsllsqh vslnslsqe ytgkmpvsg vllgavggag  
atalvflsfc vifivvrscr kksarpaadv gdigmkdant irgsasqgnl teswaddnpr  
hhglaahssg eereiyyapl sfhkgepqdl sgqeatnney seikipk (SEQ ID NO: 1)。

[0113] 人Siglec-9 (示出在基因库登录号NP055256.1中, 其全部公开内容通过引用并入本文) 是CD33相关的Siglec家族的成员 (Angata和Varki, 《生物化学杂志 (J. Biol. Chem.)》275 (29), 22127-22135 (2000))。人Siglec-9包括463个氨基酸, 具有以下氨基酸序列:

[0114] MLLLLLPLLLW GRERAEGQTS KLLTMQSSVT VQEGLCVHVP CSFSYP SHGW IYPGPVVHGY  
WFREGANTDQ DAPVATNNPA RAVWEETRDR FHLLGDPHTK NCTLSIRDAR RSDAGRYFFR  
MEKGSIKWNY KHHRLSVNVT ALTHRPNILI PGTLESGCPQ NLTCSPWAC EQGTPPMISW  
IGTSVSPLDP STTRSSVLTL IPQPQDHGTS LTCQVTFPGA SVTTNKTVHL NVSYPPQNL  
MTVFQGDGTV STVLGNGSSL SLPEGQSLRL VCAVDAVDSN PPARLSLSWR GLTLCPSQPS  
[0115] NPGVLELPWV HLRDAAEFTC RAQNPLGSQQ VYLNVSLSK ATSGVTQGVV GGAGATALVF  
LSFCVIFVVV RSCRKKSARP AAGVGDTGIE DANAVRG SAS QGPLTEPWAE DSPPDQPPA  
SARSSVGEGE LQYASLSFQM VKPWDSRGQE ATDTEYSEIK IHR (SEQ ID NO: 2)。

[0116] 在本公开的上下文中, “中和NK细胞细胞毒性的Siglec介导的抑制”、“中和T细胞细胞毒性的Siglec介导的抑制”或“中和Siglec的抑制活性”是指一个过程, 其中Siglec (例如, Siglec-7、Siglec-9) 负面影响细胞内过程的能力受到抑制, 导致淋巴细胞反应, 如细胞因子释放和细胞毒性反应。这可以例如在基于标准NK或T细胞的细胞毒性测定中测量, 其中测量治疗性化合物刺激通过Siglec阳性淋巴细胞杀死唾液酸配体阳性细胞的能力。在一个实施例中, 抗体试剂使Siglec限制的淋巴细胞的细胞毒性增加至少10%, 使淋巴细胞细胞

毒性增加至少40%或50%，或任选地使NK细胞毒性增加至少70%，并且参考所述的细胞毒性测定。在一个实施例中，抗体制剂通过Siglec限制的淋巴细胞使细胞因子释放增加至少10%，任选地使细胞因子释放增加至少40%或50%，或任选地使细胞因子释放增加至少70%，并且参考所述的细胞毒性测定。在一个实施例中，抗体制剂通过Siglec限制的淋巴细胞使细胞毒性的标志物(例如，CD107和/或CD137)的细胞表面表达增加至少10%，任选地增加至少40%或50%，或任选地使细胞毒性的标志物(例如，CD107和/或CD137)的细胞表面表达增加至少70%。

[0117] 抗Siglec抗体“阻断”Siglec分子与唾液酸配体的结合的能力意味着在使用可溶性或细胞表面相关的Siglec和唾液酸分子的测定中，抗体可以以剂量依赖性方式可检测地减少Siglec分子与唾液酸分子的结合，其中在不存在抗体的情况下，Siglec分子可检测地结合唾液酸分子。

[0118] NKG2A (OMIM 161555,其全部公开内容通过引用并入本文)是NKG2转录物组的成员(Houchins等人(1991)《实验医学期刊(J.Exp.Med.)》173:1017-1020)。NKG2A由跨越25kb的7个外显子编码，示出一些差异剪接。NKG2A与CD94一起形成异源二聚体抑制受体CD94/NKG2A,存在于NK细胞、 $\alpha$ /BT细胞、 $\gamma$ / $\delta$ T细胞和NKT细胞亚群的表面上。与抑制性KIR受体类似，它在其胞质结构域中具有ITIM。如本文所用，“NKG2A”是指NKG2A基因或编码的蛋白质的任何变体、衍生物或同种型。人NKG2A在3个结构域中包括233个氨基酸，胞质结构域包括以下序列的残基1-70，跨膜区域包括以下序列的残基71-93，并且胞外区域包括以下序列的残基94-233：

[0119] MDNQGVIIYSDLNLPNPKRQQRKPKGNKSSILATEQEITYAELNLQKASQDFQGNDKTYHCKDLPSAP  
EKLIVGILGIICLILMASVVTIVVIPSTLIQRHNSSLNTRTQKARHCGHCPEEWITYSNSCYIIGKERRTWEESL  
LACTSKNSSLLSIDNEEEMKFLSIISPSSWIGVFRNSSHPWVTMNGLAFKHEIKSDNAELNCAVLQVNRKLSAQ  
CGSSIIYHCKHKL (SEQ ID NO:170)。

[0120] NKG2C (OMIM 602891,其全部公开内容通过引用并入本文)和NKG2E (OMIM 602892,其全部公开内容通过引用并入本文)是NKG2转录物组的两个其它成员(Gilenke等人(1998)《免疫遗传学(Immunogenetics)》48:163-173)。CD94/NKG2C和CD94/NKG2E受体是在如NK细胞和T细胞等淋巴细胞的亚群表面上发现的活化受体。

[0121] HLA-E (OMIM 143010,其全部公开内容通过引用并入本文)是非经典MHC分子，其在细胞表面上表达，并且受肽的结合所调节，例如，如衍生自其它MHC I类分子的信号序列的片段。还已经识别了HLA-E的可溶性版本。HLA-E除了其T细胞受体结合特性以外，还通过特异性结合CD94/NKG2A、CD94/NKG2B和CD94/NKG2C而结合自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T细胞(NKT)和T细胞( $\alpha$ / $\beta$ 和 $\gamma$ / $\delta$ )的亚群(参见，例如Braud等人(1998)《自然(Nature)》391:795-799,其全部公开内容通过引用并入本文)。HLA-E的表面表达保护靶细胞免受CD94/NKG2A+ NK、T或NKT细胞克隆的裂解。如本文所用，“HLA-E”是指HLA-E基因或编码的蛋白质的任何变体、衍生物或同种型。

[0122] 在本公开的上下文中，“NKG2A”或“CD94/NKG2A阳性淋巴细胞”是指在细胞表面上表达CD94/NKG2A的淋巴谱系的细胞(例如，NK细胞、NKT细胞和T细胞)，其可以通过例如使用特异性识别CD94和NKG2A上的组合表位或单独的NKG2A上的表位的抗体的流式细胞术来检测。“NKG2A阳性淋巴细胞”还包含淋巴来源(例如NKL、NK-92)的永生细胞系。

[0123] 在本公开的上下文中,“降低NKG2A的抑制活性”、“中和NKG2A”或“中和NKG2A的抑制活性”是指其中抑制CD94/NKG2A负面影响细胞内过程的能力的过程,导致淋巴细胞反应,如细胞因子释放和细胞毒性反应。这可以例如在基于NK或T细胞的细胞毒性测定中测量,其中测量治疗性化合物刺激通过CD94/NKG2A阳性淋巴细胞杀死HLA-E阳性细胞的能力。在一个实施例中,抗体制剂使CD94/NKG2A限制的淋巴细胞的细胞毒性增加至少10%,使淋巴细胞细胞毒性增加至少40%或50%,任选地使NK细胞毒性增加至少70%,并且参考所述的细胞毒性测定。如果抗NKG2A抗体减少或阻断CD94/NKG2A与HLA-E的相互作用,则可能增加CD94/NKG2A限制的淋巴细胞的细胞毒性。这可以例如在标准的4小时体外细胞毒性测定中,使用例如表达CD94/NKG2A的NK细胞和表达HLA-E的靶细胞进行评估。此类NK细胞不能有效地杀死表达HLA-E的靶标,因为CD94/NKG2A识别HLA-E,从而导致引发和传播阻止淋巴细胞介导的细胞溶解的抑制性信号传导。此类体外细胞毒性测定可以通过本领域众所周知的标准方法进行,如例如在Coligan等人编辑的《免疫学实验指南 (Current Protocols in Immunology)》,格林出版协会和纽约州威利国际科学(1992,1993)中所述。用于评估抗体刺激淋巴细胞杀死靶细胞,如P815、K562细胞或合适的肿瘤细胞的能力的铬释放和/或其它参数还公开于Sivori等人,《实验医学杂志 (J. Exp. Med.)》1997;186:1129-1136;Vitale等人,《实验医学杂志 (J. Exp. Med.)》1998;187:2065-2072;Pessino等人《实验医学杂志 (J. Exp. Med.)》1998;188:953-960;Neri等人《临床和诊断实验室免疫学 (Clin. Diag. Lab. Immun.)》2001;8:1131-1135;Pende等人《实验医学杂志 (J. Exp. Med.)》1999;190:1505-1516,所述文献中的每一个的全部内容通过引用并入本文。在添加NK细胞之前,用<sup>51</sup>Cr标记靶细胞,并且然后由于杀伤,将杀伤估计为与<sup>51</sup>Cr从细胞向培养基的释放成比例。添加防止CD94/NKG2A与HLA-E结合的抗体导致阻止抑制信号通过CD94/NKG2A的引发和传播。因此,添加此类试剂导致淋巴细胞介导的靶细胞杀伤的增加。因此,此步骤识别了通过例如阻断配体结合来防止CD94/NKG2A诱导的负信号转导的试剂。在特定的<sup>51</sup>Cr释放细胞毒性测定中,CD94/NKG2A表达性NK效应细胞可以杀死HLA-E-阴性LCL 721.221靶细胞,但是不能很好地杀死HLA-E表达性LCL 721.221-Cw3对照细胞。相反,缺乏CD94/NKG2A的YTS效应细胞有效杀死两种细胞系。因此,由于通过CD94/NKG2A的HLA-E诱导的抑制信号传导,NK效应细胞杀死HLA-E<sup>+</sup>LCL 721.221-Cw3细胞的效率较低。在此类<sup>51</sup>Cr释放细胞毒性测定中,在将NK细胞与阻断性抗CD94/NKG2A抗体进行预温育时,可以以抗体浓度依赖性方式更有效地杀死HLA-E表达性LCL 721.221-Cw3细胞。抗NKG2A抗体的抑制活性(即,提高细胞毒性的潜力)也可以以许多其它方式中的任一种来评估,例如,通过其对细胞内游离钙的作用,如所述,例如,在Sivori等人,《实验医学杂志 (J. Exp. Med.)》1997;186:1129-1136,所述文献中的每一个的全部内容通过引用并入本文。例如,可以通过测量细胞因子产生(例如IFN- $\gamma$ 产生)或细胞毒性标记物(例如CD107或CD137动员)的增加来评估NK细胞细胞毒性的活化。在示例性方案中,培养4天之后,通过细胞表面和胞浆内染色评估从PBMC产生的IFN- $\gamma$ ,并且通过流式细胞术分析。简而言之,以5 $\mu$ g/ml的终浓度添加布雷菲德菌素A (Sigma Aldrich),持续培养最后4小时。然后在通透化之前,将细胞与抗CD3和抗CD56 mAb一起温育 (IntraPrep<sup>TM</sup>; Beckman Coulter),并且用PE-抗IFN- $\gamma$ 或PE-IgG1 (Pharmingen)染色。使用ELISA (GM-CSF: DuoSet Elisa, R&D Systems, Minneapolis, MN, IFN- $\gamma$ : OptE1A set, Pharmingen),在上清液中测量从多克隆活化的NK细胞产生的GM-CSF和IFN- $\gamma$ 。

[0124] 每当在整个说明书中参考抗Siglec结合剂(例如抗体)提及“癌症的治疗”等时,均表示:(a)癌症的治疗方法,所述方法包括以下步骤:向需要此类治疗的个体、哺乳动物,尤其是人施用(对于至少一种治疗而言)抗Siglec结合剂(优选地在药学上可接受的载剂材料中),其剂量允许治疗癌症(治疗有效量),优选地如本文指定的剂量(量);(b)抗Siglec结合剂在治疗癌症中的用途,或用于所述治疗中(特别是在人类中)的抗Siglec结合剂;(c)抗Siglec结合剂在制造用于治疗癌症的药物制剂中的用途,使用抗Siglec结合剂制造用于治疗癌症的药物制剂的方法,所述方法包括使抗Siglec结合剂与药学上可接受的载剂,或包括有效剂量的适用于癌症治疗的抗Siglec结合剂的药物制剂混合;或(d)a)、b)和c)的任何组合,根据在提交本申请的国家允许专利申请的主题。

[0125] 如本文所用,术语“抗原结合结构域”是指包括能够免疫特异性结合到表位的三维结构的结构域。因此,在一个实施例中,所述结构域可以包括高变区,任选地抗体链的VH和/或VL结构域,任选地至少VH结构域。在另一个实施例中,结合结构域可以包括抗体链的至少一个互补性决定区(CDR)。在另一个实施例中,结合结构域可以包括来自非免疫球蛋白支架的多肽结构域。

[0126] 如本文可互换使用,术语“抗体”或“免疫球蛋白”包含完整抗体和其任何抗原结合片段或单链。典型的抗体包括通过二硫键互连的至少两条重(H)链和两条轻(L)链。每个重链由重链可变区(V<sub>H</sub>)和重链恒定区构成。重链恒定区由三个结构域CH1、CH2和CH3构成。每个轻链由轻链可变区(V<sub>L</sub>)和轻链恒定区构成。轻链恒定区由一个结构域CL构成。示例性免疫球蛋白(抗体)结构单元包括四聚体。每个四聚体由两对相同的多肽链构成,每对具有一个“轻”(约25kDa)和一个“重”链(约50-70kDa)。每条链的N末端限定了约100个到110个或更多氨基酸的可变区,其主要负责抗原识别。术语可变轻链(V<sub>L</sub>)和可变重链(V<sub>H</sub>)分别指这些轻链和重链。对应于不同类免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为“α”、“δ”、“ε”、“γ”和“μ”。这些中的几个进一步分为亚类或同种型,如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4等。不同类免疫球蛋白的亚基结构和三维构型是众所周知的。IgG是本文使用的示例性抗体类别,因为它们是最常见的抗体,并且因为它们最容易在实验室环境中制备。任选地,抗体是单克隆抗体。抗体的具体实例是人源化、嵌合、人或其它人类合适的抗体。“抗体”还包含任何本文所述抗体的任何片段或衍生物。

[0127] “交叉反应”抗Siglec抗体是以特异性和/或亲和力结合多于一个Siglec分子的抗体。例如,单克隆抗体可以与Siglec-7和Siglec-9交叉反应。

[0128] 术语“特异性结合”意指抗体可以优选地在竞争性结合测定中结合到结合配偶体,例如Siglec-7、Siglec-9,如使用蛋白质、其中表位的重组形式,或存在于隔离的靶细胞的表面上的天然蛋白质所评估的。用于确定特异性结合的竞争性结合测定和其它方法在下文进一步描述,并且是本领域熟知的。

[0129] 当谈及一种抗体与一种特定的单克隆抗体“竞争”时,意味着抗体使用重组Siglec或表面表达的Siglec分子在结合测定中与单克隆抗体竞争。例如,如果测试抗体在结合测定中降低参考抗体与Siglec多肽或Siglec表达性细胞的结合,则称抗体相应地与参考抗体“竞争”。

[0130] 如本文所用,术语“亲和力”是指抗体与表位结合的程度。抗体的亲和力由解离常数K<sub>d</sub>给出,定义为 $[Ab] \times [Ag] / [Ab-Ag]$ ,其中[Ab-Ag]是抗体-抗原复合物的摩尔浓度,[Ab]

是未结合的抗体的摩尔浓度,并且[Ag]是未结合的抗原的摩尔浓度。亲和力常数 $K_a$ 由 $1/K_d$ 定义。用于确定mAb的亲和力的方法可以在以下中找到:Harlow等人,《抗体:实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual)》,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),冷泉港(Cold Spring Harbor),纽约,1988),Coligan等人编辑,《免疫学实验指南(Current Protocols in Immunology)》,格林出版协会和Wiley Interscience,纽约,(1992,1993)以及Muller,《酶学方法(Meth.Enzymol.)》92:589-601(1983),所述参考通过引用全部并入本文。本领域熟知的用于确定mAb的亲和力的一种标准方法是使用表面等离子共振(SPR)筛选(如通过用BIAcore™ SPR分析装置分析)。

[0131] 在本文的上下文中,“决定簇”表示与多肽相互作用或结合的位点。

[0132] 术语“表位”是指抗原决定簇,并且是抗体结合的抗原上的区域或区域。蛋白质表位可以包括直接参与结合的氨基酸残基以及被特异性抗原结合抗体或肽有效阻断的氨基酸残基,即抗体的“足迹”内的氨基酸残基。它是复杂抗原分子上最简单的形式或最小的结构区域,其可以与例如抗体或受体组合。表位可以是线性的或构象的/结构的。术语“线性表位”定义为由氨基酸的线性序列(一级结构)上连续的氨基酸残基构成的表位。术语“构象或结构表位”定义为由不完全连续的氨基酸残基构成的表位,并且因此代表通过折叠分子而彼此接近的氨基酸的线性序列的分开部分(二级、三级和/或四级结构)。构象表位取决于3维结构。因此,术语‘构象’通常与‘结构’可互换使用。

[0133] 关于表达Siglec的细胞(例如Siglec-7或Siglec-9表达性淋巴细胞)的术语“消耗(deplete)”或“消耗(depleting)”是指导致杀死、消除、裂解或诱导此类杀伤、消除或裂解,从而负面影响样品或受试者中存在的此类Siglec表达性细胞的数量量的过程、方法或化合物。关于过程、方法或化合物的“非消耗性的”是指过程、方法或化合物未耗尽。

[0134] 术语“试剂”在本文中用于表示化学化合物,化学化合物、生物大分子或由生物材料制成的提取物的混合物。术语“治疗剂”是指具有生物活性的药剂。

[0135] 出于本文的目的,“人源化”或“人”抗体是指其中一种或多种人免疫球蛋白的恒定和可变框架区与动物免疫球蛋白的结合区,例如CDR融合的抗体。设计此类抗体以维持衍生结合区的非人抗体的结合特异性,但是避免针对非人抗体的免疫反应。此类抗体可以从转基因小鼠或已经被“工程化”以响应抗原攻击产生特异性人抗体的其它动物中获得(参见,例如,Green等人(1994)《自然遗传学(Nature Genet)》7:13;Lonberg等人(1994)《自然(Nature)》368:856;Taylor等人(1994)《国际免疫药理学(Int Immun)》6:579,所述文献的全部教导通过引用并入本文)。完全人抗体也可以通过遗传或染色体转染方法以及噬菌体展示技术构建,所有这些都是本领域已知的(参见,例如,McCafferty等人(1990)《自然(Nature)》348:552-553)。人抗体也可以由体外活化的B细胞产生(参见,例如,美国专利第5,567,610号和第5,229,275号,所述专利通过引用以其整体并入)。

[0136] “嵌合抗体”是抗体分子,其中(a)恒定区或其部分被改变、替换或交换,使得抗原结合位点(可变区)连接到不同或改变的类、效应功能和/或物种、或赋予嵌合抗体新特性的完全不同的分子,例如酶、毒素、激素、生长因子、药物等的恒定区;或(b)可变区或其部分被具有不同或改变的抗原特异性的可变区改变、替换或交换。

[0137] 当在本文中使用时,术语“高变区”是指抗体中负责抗原结合的氨基酸残基。高变区通常包括来自“互补决定区”或“CDR”的氨基酸残基(例如,轻链可变结构域中的残基24-



34 (L1)、50-56 (L2) 和89-97 (L3) 以及重链可变结构域中的31-35 (H1)、50-65 (H2) 和95-102 (H3);Kabat等人1991) 和/或来自“高变环”的那些残基(例如,轻链可变结构域中的残基26-32 (L1)、50-52 (L2) 和91-96 (L3) 以及重链可变结构域中的26-32 (H1)、53-55 (H2) 和96-101 (H3);Chothia和Lesk,《分子生物学杂志(J.Mol.Biol)》1987;196:901-917),或用于确定负责抗原结合的必需氨基酸的类似系统。通常,此区域中氨基酸残基的编号通过Kabat等人,同上所述的方法进行。如“Kabat位置”、“如Kabat中的可变结构域残基编号”和“根据Kabat”等短语在本文中是指用于重链可变结构域或轻链可变结构域的此编号系统。使用Kabat编号系统,肽的实际线性氨基酸序列可以含有较少或额外的氨基酸,对应于可变结构域的FR或CDR的缩短或插入。例如,重链可变结构域可以包含在CDR H2的残基52之后的单个氨基酸插入物(根据Kabat的残基52a)和在重链FR残基82之后的插入残基(例如,根据Kabat的残基82a、82b和82c等)。通过将抗体序列的同源区域与“标准”Kabat编号序列比对,可以确定给定抗体的Kabat残基编号。

[0138] 如本文所用,“框架”或“FR”残基是指除了定义为CDR的那些区域之外的抗体可变结构域的区域。每个抗体可变结构域框架可以进一步细分为由CDR分开的连续区域(FR1、FR2、FR3和FR4)。

[0139] 术语“Fc结构域”、“Fc部分”和“Fc区”是指抗体重链的C末端片段,例如,来自人 $\gamma$  ( $\gamma$ ) 重链的约氨基酸(aa) 230到约aa 450,或其其它类型的抗体重链中的对应序列(例如,人抗体的 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 和 $\mu$ ),或其天然存在的同种异型。除非另有说明,否则在本公开全文中使用免疫球蛋白的普遍接受的Kabat氨基酸编号(参见Kabat等人(1991)《免疫学目的蛋白质的序列》,第5版,美国公共卫生局,美国国立卫生研究院,马里兰州,贝塞斯达)。

[0140] 术语“隔离的”、“纯化的”或“生物学上纯的”是指基本上或基本上不含在其天然状态下发现的通常伴随其的组分材料。纯度和均匀性通常使用分析化学技术,如聚丙烯酰胺凝胶电泳或高效液相色谱法确定。作为制剂中存在的主要物质的蛋白质是基本上纯化的。

[0141] 术语“多肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可互换使用,指氨基酸残基的聚合物。术语适用于氨基酸聚合物,以及天然存在的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物,其中一个或多个氨基酸残基是对应天然存在的氨基酸的人工化学模拟物。

[0142] 当与参考例如细胞、或核酸、蛋白质或载体一起使用时,术语“重组”表示已经通过引入异源核酸或蛋白质、或对天然核酸或蛋白质的改变修饰了细胞、核酸、蛋白质或载体,或细胞衍生自如此修饰的细胞。因此,例如,重组细胞表达在天然(非重组)形式的细胞内未发现的基因,或表达以其它方式异常表达、表达不足或根本不表达的天然基因。

[0143] 在本文的上下文中,术语“结合”多肽或表位的抗体表示以特异性和/或亲和力结合所述决定簇的抗体。

[0144] 当在两个或更多个多肽的序列之间的关系中使用时,术语“同一性”或“相同的”是指多肽之间的序列相关性程度,如通过两个或更多个氨基酸残基的串之间的匹配数测定的。“同一性”测量两个或更多个序列中较小的序列之间相同匹配的百分比,其中间隙比对(如果有的话)由特定数学模型或计算机程序(即“算法”)解决。通过已知方法可以容易地计算相关多肽的同一性。此类方法包含但不限于以下中描述的那些:《计算分子生物学(Computational Molecular Biology)》,Lesk,A.M.编辑,牛津大学出版社,纽约,1988;《生

物计算:信息学和基因组计划(Biocomputing:Informatics and Genome Projects)》,Smith,D.W.编辑,学术出版社,纽约,1993;《序列数据的计算机分析(Computer Analysis of Sequence Data)》,第1部分,Griffin,A.M.和Griffin,H.G.编辑,Humana Press,新泽西,1994;《分子生物学中的序列分析(Sequence Analysis in Molecular Biology)》,von Heinje,G.,学术出版社,1987;《序列分析引物(Sequence Analysis Primer)》,Gribskov,M.和Devereux,J.编辑,M.Stockton Press,纽约,1991;和Carillo等人,《工业与应用数学学会应用数学杂志(SIAM J.Applied Math.)》48,1073(1988)。

[0145] 设计用于确定同一性的方法以给出测试序列之间的最大匹配。在公开可用的计算机程序中描述了确定同一性的方法。用于确定两个序列之间的同一性的计算机程序方法包含GCG程序包,包含GAP(Devereux等人,《核酸研究(Nucl.Acid.Res.)》12,387(1984);遗传学计算机组,威斯康星大学,麦迪逊,威斯康星州),BLASTP、BLASTN和FASTA(Altschul等人,《分子生物学杂志(J.Mol.)》215,403-410(1990))。BLASTX程序可从国家生物技术信息中心(NCBI)和其它来源公开获得(BLAST Manual,Altschul等人,NCB/NLM/NIH Bethesda,Md.20894;Altschul等人,同上)。众所周知的Smith Waterman算法也可以用于确定同一性。

[0146] 治疗剂的生产

[0147] 抑制Siglec的试剂

[0148] 可用于治疗疾病(例如癌症、传染病)的抗Siglec剂结合人Siglec-9蛋白的细胞外部分(并且任选地进一步结合人Siglec-7蛋白,有或没有进一步的Siglec-12结合)并且降低在Siglec阳性免疫细胞的表面上表达的人Siglec的抑制活性。在一个实施例中,试剂抑制唾液酸分子通过嗜中性粒细胞、树突细胞、巨噬细胞、M2巨噬细胞、NK细胞和/或CD8+T细胞中的Siglec引起抑制性信号传导的能力。

[0149] 在一个实施例中,本文所述的抗Siglec剂可以用于增加人体中或来自人类供体的NK细胞和/或嗜中性粒细胞对带有Siglec的配体的靶细胞(例如癌细胞)的细胞毒性。NK细胞和嗜中性粒细胞是识别并且直接杀死微生物和癌细胞的专门的粒细胞。示出肿瘤细胞的表面处表达的唾液酸降低了NK细胞对肿瘤细胞的细胞毒性。抗体可以用于增强NK细胞的细胞毒性,例如将细胞毒性的水平恢复到基本上在其表面不表达特定Siglec的NK细胞或嗜中性粒细胞中观察到的所述水平。

[0150] 唾液酸还在树突细胞上高表达,并且已经被描述为调节几种DC功能,包含对TLR刺激的响应性。唾液酸合成的阻断降低了用于TLR刺激的moDC的活化阈值,并且Siglec-E缺失增强了树突细胞对几种微生物TLR配体的反应。Siglec-9是小鼠中Siglec-E的最接近的人类直系同源成员,阻断性的抗Siglec-9抗体可以增强树突细胞的活化并且调节DC-T相互作用。用唾液酸修饰抗原调节抗原特异性调节性T(Treg)细胞的产生,并且防止通过树突细胞形成效应CD4+和CD8+T细胞。树突细胞的吞噬能力还可以通过2,6-唾液酸缺乏来改善。

[0151] Siglec-7和-9两者都在M1和M2型巨噬细胞上表达,并且Siglec-9的敲低已经被描述为调节各种表面表达标志物(例如CCR7和CD200R),暗示Siglec-9对巨噬细胞功能的调节。实际上,在巨噬细胞系中转染了各种Siglec-9突变体(ITIM结构域中的突变),并且证明Siglec-9增强了抗炎细胞因子IL-10的产生。Siglec-9与可溶性配体的结合还可以诱导巨噬细胞显示肿瘤相关的巨噬细胞样表型,增加检查点配体PD-L1的表达。

[0152] 在一个实施例中,试剂与唾液酸分子竞争结合Siglec,即,试剂阻断Siglec与其唾

液酸配体之间的相互作用。

[0153] 在本发明的一方面,试剂是选自全长抗体、抗体片段和合成或半合成抗体衍生分子的抗体。

[0154] 在本发明的一方面,试剂是选自完全人抗体、人源化抗体和嵌合抗体的抗体。

[0155] 在本发明的一方面,试剂是选自IgA、IgD、IgG、IgE和IgM抗体的抗体的片段。

[0156] 在本发明的一方面,试剂是包括选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的恒定结构域的抗体的片段。

[0157] 在本发明的一方面,试剂是选自以下的抗体片段:Fab片段、Fab'片段、Fab'-SH片段、F(ab)2片段、F(ab')2片段、Fv片段、重链Ig(美洲驼或骆驼Ig)、V<sub>H</sub>H片段、单结构域FV和单链抗体片段。

[0158] 在本发明的一方面,试剂是合成或半合成抗体衍生的分子,其选自scFV、dsFV、微抗体、双抗体、三抗体、κ体、IgNAR和多特异性抗体。

[0159] 一方面,抗体或抗原结合结构域以比另外的人Siglec,例如Siglecs-3、-5、-6、-8、-10、-11和/或-12低至少100倍的结合亲和力(例如KD)结合Siglec-7和/或-9。一方面,抗体或抗原结合结构域结合Siglec-9,但是不结合Siglec-7;在一个实施例中,抗体以比人Siglec-7多肽低至少100倍的结合亲和力(例如,KD)结合人Siglec-9多肽。另一个方面,抗体以彼此相差不大于1个对数的结合亲和力(例如KD)结合人Siglec-9多肽和人Siglec-7多肽两者,并且其中所述Siglec-7和Siglec-9的结合亲和力比另外的人Siglec,例如Siglec-3、-5、-6、-8、-10、-11和/或-12低至少100倍。亲和力可以例如通过表面等离子体共振确定,以结合重组Siglec多肽。

[0160] 一方面,抗体呈纯化或至少部分纯化的形式。在本发明的一方面,抗体基本上呈隔离的形式。

[0161] 可以通过本领域已知的多种技术产生抗体。典型地,通过用包括Siglec多肽,优选地人Siglec多肽的免疫原免疫非人动物,优选地小鼠产生它们。Siglec多肽可以包括人Siglec-9和/或Siglec-7多肽,或其片段或衍生物,通常是免疫原性片段的全长序列,即,包括暴露于表达Siglec多肽的细胞的表面上的表位的多肽的一部分。此类片段通常含有成熟多肽序列的至少约7个连续氨基酸,甚至更优选地其至少约10个连续氨基酸。片段通常基本上衍生自受体的细胞外结构域。在一个实施例中,免疫原包括脂质膜中的野生型人Siglec多肽,通常在细胞表面。在具体实施例中,免疫原包括任选地处理或裂解的完整细胞,特别是完整的人细胞。在另一个实施例中,多肽是重组Siglec多肽。

[0162] 用抗原免疫非人哺乳动物的步骤可以以本领域熟知的任何方式进行,用于刺激小鼠中抗体的产生(参见,例如,E.Harlow和D.Lane,《抗体:实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual.)》,纽约冷泉港冷泉港实验室出版社,(1988),其全部公开内容通过引用并入本文)。将免疫原悬浮或溶解在缓冲液中,任选地与佐剂,如完全或不完全的弗氏佐剂一起。用于确定免疫原的量、缓冲液的类型和佐剂的量的方法是本领域技术人员众所周知的,并且不以任何方式进行限制。对于不同的免疫原,这些参数可能有所不同,但是很容易阐明。

[0163] 类似地,足以刺激抗体产生的免疫位置和频率也是本领域众所周知的。在典型的免疫方案中,非人动物在第1天和约一周后再次腹膜内注射抗原。随后在第20天左右召回抗

原注射,任选地与如不完全弗氏佐剂等佐剂一起注射。召回注射是静脉内进行的,并且可以连续数天重复进行。随后在第40天,通常在没有佐剂的情况下静脉内或腹膜内加强注射。此方案导致约40天之后产生产生抗原特异性抗体的B细胞。也可以使用其它方案,只要它们导致产生表达针对免疫中所用抗原的抗体的B细胞即可。

[0164] 在替代性实施例中,分离来自非免疫非人类哺乳动物的淋巴细胞,使其在体外生长,并且然后在细胞培养物中暴露于免疫原。然后收集淋巴细胞,并且进行下述融合步骤。

[0165] 对于单克隆抗体,下一个步骤是从免疫的非人类哺乳动物中分离脾细胞,并且随后将这些脾细胞与永生化细胞融合,以形成产生抗体的杂交瘤。从非人类哺乳动物中分离脾细胞是本领域众所周知的,并且通常涉及从麻醉的非人类哺乳动物中除去脾脏,将其切割成小块,并且通过细胞过滤网的尼龙网,将来自脾脏的脾细胞挤压到合适的缓冲液中,以产生单个细胞悬浮液。将细胞洗涤、离心并且重悬于裂解任何红细胞的缓冲液中。再次离心溶液,并且最后将沉淀中剩余的淋巴细胞重悬于新鲜缓冲液中。

[0166] 一旦分离并且存在于单细胞悬浮液中,淋巴细胞可以融合到永生细胞系。尽管本领域已知许多其它可用于产生杂交瘤的永生细胞系,但是这通常是小鼠骨髓瘤细胞系。鼠类骨髓瘤细胞系包含但不限于可从美国圣地亚哥的Salk研究所细胞分配中心获得的MOPC-21和MPC-11小鼠肿瘤,可从美国马里兰州罗克维尔市的美国典型培养物收集获得的X63 Ag8653和SP-2细胞衍生的那些。使用聚乙二醇等进行融合。然后,使所得杂交瘤在含有抑制未融合的亲代骨髓瘤细胞的生长或存活的一种或多种物质的选择性培养基中生长。例如,如果亲代骨髓瘤细胞缺乏次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖基转移酶(HGPRT或HPRT),则杂交瘤的培养基通常将包含次黄嘌呤、氨基蝶呤和胸苷(HAT培养基),所述物质阻止HGPRT缺陷型细胞的生长。

[0167] 杂交瘤通常生长于巨噬细胞的饲养层上。巨噬细胞优选地来自用于分离脾细胞的非人类哺乳动物的同窝幼虫,并且通常在铺板杂交瘤之前几天,用不完全弗氏佐剂等引发。融合方法描述于Goding,“单克隆抗体:原理和实践(Monoclonal Antibodies:Principles and Practice)”,第59-103页(学术出版社,1986),所述文献的公开内容通过引用并入本文。

[0168] 使细胞在选择培养基中生长足够的时间,以用于菌落形成和抗体产生。这通常介于约7天到约14天之间。

[0169] 然后测定杂交瘤菌落产生特异性结合Siglec多肽基因产物的抗体。测定通常是比色ELISA型测定,尽管可以采用可以适合杂交瘤生长的孔的任何测定。其它测定包含放射免疫测定法或荧光活化细胞分选。检查所需抗体产生阳性的孔,以确定是否存在一个或多个不同的菌落。如果存在多于一个菌落,则可以将细胞重新克隆并且生长,以确保仅单个细胞已经产生了产生所需抗体的菌落。通常,还将测试抗体结合Siglec多肽,例如Siglec表达性细胞的能力。

[0170] 可以在适当的培养基,如DMEM或RPMI-1640中大量生长已证实产生单克隆抗体的杂交瘤。替代性地,杂交瘤细胞可以在动物中作为腹水肿瘤在体内生长。

[0171] 在充分生长以产生所需的单克隆抗体之后,将含有单克隆抗体(或腹水)的生长培养基与细胞分离,并且纯化其中存在的单克隆抗体。纯化通常是通过凝胶电泳、渗析、使用蛋白A或蛋白G琼脂糖或连接固相支持物,如琼脂糖或琼脂糖珠的抗小鼠Ig色谱法来实现的

(全部描述于例如《抗体纯化手册 (Antibody Purification Handbook)》中, 生物科学, 出版号18-1037-46, AC版, 所述文献的公开内容通过引用并入本文)。通常通过使用低pH缓冲液 (pH等于或小于3.0的甘氨酸或乙酸盐缓冲液) 从蛋白A/蛋白G柱上洗脱结合抗体, 立即中和含抗体的馏分。根据需要将这些馏分合并、透析和浓缩。

[0172] 通常重新克隆和重新测定具有单个表观菌落的阳性孔, 以确保仅检测和产生一种单克隆抗体。

[0173] 抗体也可以通过选择免疫球蛋白的组合文库产生, 例如在 (Ward等人《自然 (Nature)》, 341 (1989) 第544页, 其全部公开内容通过引用并入本文) 中所公开。

[0174] 可以在Siglec上滴定抗体, 以获得达到与Siglec多肽最大结合所需的浓度。关于结合Siglec多肽 (或表达此类的细胞) 的“EC50”是指有效浓度的抗Siglec抗体, 其相对于结合Siglec多肽 (或表达此类的细胞) 产生其最大应答或效应的50%。

[0175] 一旦标识出能够结合Siglec和/或具有其它所需特性的抗体, 通常还将使用包含本文所述的那些的标准方法评估它们结合其它多肽, 包含其它Siglec多肽和/或无关多肽的能力。理想地, 抗体仅以实质亲和力结合Siglec, 例如人Siglec-7和/或人Siglec-9, 并且不以显著水平结合无关多肽, 特别是除CD33相关的Siglec以外的多肽或除所需Siglec以外的Siglec (例如, Siglec-7和/或Siglec-9)。然而, 可以理解, 只要Siglec的亲和力比其它Siglec和/或其它无关多肽的亲和力基本上大 (例如, 5倍、10倍、50倍、100倍、500倍、1000倍、10,000倍、或更多), 然后抗体适用于本方法中。

[0176] 抗Siglec抗体可以制备为非消耗性抗体, 使得它们已经减少或基本上缺乏特异性结合人Fc $\gamma$ 受体。此类抗体可以包括已知不结合或与Fc $\gamma$ 受体具有低结合亲和力的各种重链的恒定区。一个此类实例是人IgG4恒定区。替代性地, 不包括恒定区的抗体片段, 如Fab或F(ab')<sub>2</sub>片段, 可以用于避免Fc受体结合。可以根据本领域已知的方法评估Fc受体结合, 包含例如在BIAcore测定中测试抗体与Fc受体蛋白的结合。而且, 可以使用任何抗体同种型, 其中Fc部分被修饰, 以最小化或消除与Fc受体的结合 (参见, 例如, W003101485, 其公开内容通过引用并入本文)。如例如基于细胞的测定等用于评估Fc受体结合的测定在本领域中是公知的, 并且描述于, 例如W003101485中。

[0177] 从杂交瘤中分离编码结合Siglec多肽上存在的表位的抗体的DNA, 并且将其置于合适的表达载体中, 以转染到合适的宿主中。然后, 将宿主用于重组产生抗体或其变体, 如所述单克隆抗体的人源化形式、抗体的活性片段、包括抗体的抗原识别部分的嵌合抗体、或包括可检测部分的形式。

[0178] 编码单克隆抗体的DNA可以容易地分离, 并且使用常规方法测序 (例如, 通过使用能够特异性地结合到编码鼠抗体的重链和轻链的基因的寡核苷酸探针)。分离后, 可以将DNA置于表达载体中, 然后将其转染到宿主细胞中, 如大肠杆菌细胞、猿猴COS细胞、中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞或不以其它方式产生免疫球蛋白的骨髓瘤细胞, 以获得重组宿主细胞中单克隆抗体的合成。如本说明书中其它地方所述, 可以修饰此类DNA序列用于任何大量目的, 例如用于人源化抗体、产生片段或衍生物、或用于修饰抗体的序列, 例如在抗原结合位点中, 以优化抗体的结合特异性。编码抗体的DNA在细菌中的重组表达是本领域熟知的 (参见, 例如, Skerra等人, 《免疫学最新观点 (Curr. Opinion in Immunol.)》第5期, 第256页 (1993); 以及Pluckthun, 《免疫学 (Immunol.)》第130期, 第151页, (1992))。

[0179] “共同决定簇”表示由人类抑制性Siglec受体,特别是CD33相关的Siglec的几种基因产物所共有的决定簇或表位。抗体可以结合至少由Siglec-7和Siglec-9共有的共同决定簇。在一个实施例中,在CD33相关的Siglec中的一个或多个或全部上,特别是Siglec-3、-5、-6、-8、-10、-11和-12任选地不存在共同决定簇。在一个实施例中,在Siglec-3、-5、-6、-8、-10、-11和-12上不存在共同决定簇。

[0180] 可以使用其中可以评估抗体竞争的多种免疫学筛查测定中的任一种,轻松确定对结合siglec多肽(例如,Siglec-7和/或Siglec-9,特别是与单克隆抗体mAbsA、-B、-C、-D、-E或-F(Siglec-9特异性)或mAbs1、-2、-3、-4、-5或-6(Siglec-7/9特异性)基本上或本质上相同的表位)的一种或多种抗体的识别。许多此类测定是常规实践的,并且在本领域中是众所周知的(参见,例如,美国专利第5,660,827号,所述专利通过引用并入本文)。应当理解,实际上确定本文所述的抗体结合的表位并不需要以任何方式识别结合与本文所述的单克隆抗体相同或实质上相同的表位的抗体。

[0181] 例如,在从不同的来源动物获得待检测的测试抗体,或者甚至是不同的Ig同种型的情况下,可以使用简单的竞争测定,其中混合(或预先吸附)对照(例如,mAbA、-B、-C、-D、-E或-F或mAb1、-2、-3、-4、-5或-6)和测试抗体,并且施加到含有Siglec多肽的样品上。基于蛋白质印迹的方案和BIAcore分析的使用适用于此类竞争研究。

[0182] 在某些实施例中,在应用于Siglec抗原样品之前,将对照抗体(例如,mAbA、-B、-C、-D、-E或-F或mAb1、-2、-3、-4、-5或-6)与不同量的测试抗体(例如,约1:10或约1:100)预混合一段时间。在其它实施例中,可以在暴露于Siglec抗原样品期间,简单地混合对照和不同量的测试抗体。只要可以区分结合的抗体和游离的抗体(例如,通过使用分离或洗涤技术消除未结合的抗体)以及区分mAbA、-B、-C、-D、-E、-F、-1、-2、-3、-4、-5或-6和测试抗体(例如,通过使用物种特异性或同种型特异性二抗,或通过用可检测标记特异性标记mAbA、-B、-C、-D、-E、-F、-1、-2、-3、-4、-5或-6),可以确定测试抗体是否减少了mAbA、-B、-C、-D、-E、-F、-1、-2、-3、-4、-5或-6与抗原的结合,表示测试抗体竞争结合和/或将Siglec上的共同结合位点识别为mAb1、mAbA、-B、-C、-D、-E、-F、-1、-2、-3、-4、-5或-6。在不存在完全不相关的抗体的情况下,(标记的)对照抗体的结合可以作为对照高值。通过将标记的(mAbA、-B、-C、-D、-E、-F、-1、-2、-3、-4、-5或-6)抗体与完全相同类型的未标记抗体(mAbA、-B、-C、-D、-E、-F、-1、-2、-3、-4、-5或-6)一起温育获得对照低值,其中将发生竞争并且降低标记抗体的结合。在测试测定中,在存在测试抗体的情况下标记抗体反应性的显著降低表明测试抗体识别Siglec上的基本相同区域,并且与标记的抗体(mAbA、-B、-C、-D、-E、-F、-1、-2、-3、-4、-5或-6)“交叉反应”或竞争。以介于约1:10与约1:100之间mAbA、-B、-C、-D、-E、-F、-1、-2、-3、-4、-5或-6:测试抗体的任何比率,将mAbA、-B、-C、-D、-E、-F、-1、-2、-3、-4、-5或-6与Siglec抗原的结合减少至少约50,如至少约60%,或更优选地,至少约80%或90%(例如约65%-100%)的任何测试抗体被认为是与相应的mAbA、-B、-C、-D、-E、-F、-1、-2、-3、-4、-5或-6竞争的抗体。优选地,此类测试抗体将相应的mAbA、-B、-C、-D、-E、-F、-1、-2、-3、-4、-5或-6与Siglec抗原的结合降低至少约90%(例如,约95%)。

[0183] 还可以通过例如流式细胞术测试评估竞争。在此类测试中,携带一种或多种给定Siglec多肽的细胞可以首先与mAbA、-B、-C、-D、-E、-F、-1、-2、-3、-4、-5或-6一起温育,例如,并且然后与用荧光染料或生物素标记的测试抗体一起温育。如果与饱和量的mAbA、-B、-

C、-D、-E、-F、-1、-2、-3、-4、-5或-6一起预温育获得的结合是通过未与相应的mAbA、-B、-C、-D、-E、-F、-1、-2、-3、-4、-5或-6一起预温育的抗体获得的结合(如通过荧光的平均值测定)的约80%、优选地约50%、约40%或更低(例如,约30%、20%或10%),则称抗体与mAbA、-B、-C、-D、-E、-F、-1、-2、-3、-4、-5或-6竞争。替代性地,如果在与饱和量的测试抗体一起预温育的细胞上用相应的标记的mAbA、-B、-C、-D、-E、-F、-1、-2、-3、-4、-5或-6抗体(通过荧光染料或生物素)获得的结合是未与测试抗体一起预温育获得的结合的约80%、优选地约50%、40%或更少(例如,约30%、20%或10%),则称抗体与mAbA、-B、-C、-D、-E、-F、-1、-2、-3、-4、-5或-6竞争。

[0184] 还可以使用简单的竞争测定,其中测试抗体被预吸附,并且以饱和浓度施加到其上固定Siglec抗原的表面。简单竞争测定中的表面优选地是BIAcore芯片(或适用于表面等离子共振分析的其它介质)。然后使对照抗体(例如,mAbA、-B、-C、-D、-E、-F、-1、-2、-3、-4、-5或-6)以Siglec饱和浓度与表面接触,并且测量Siglec和对照抗体的表面结合。在不存在测试抗体的情况下,将对照抗体的此结合与对照抗体与含Siglec表面的结合进行比较。在测试测定中,在存在测试抗体的情况下,对照抗体对含Siglec的表面的结合显著降低,这表明测试抗体竞争结合,并且因此可以识别Siglec上与对照抗体相同的区域,从而使测试抗体与对照抗体“交叉反应”。使对照(如mAbA、-B、-C、-D、-E、-F、-1、-2、-3、-4、-5或-6)抗体与Siglec抗原的结合降低至少约30%或更多,优选地约40%的任何测试抗体可以被认为是竞争结合作为对照的Siglec的抗体(例如,相应的mAbA、-B、-C、-D、-E、-F、-1、-2、-3、-4、-5或-6)。优选地,此类测试抗体将使对照抗体(例如,mAbA、-B、-C、-D、-E、-F、-1、-2、-3、-4、-5或-6)与Siglec抗原的结合降低至少约50%(例如,至少约60%、至少约70%或更多)。应当理解,对照抗体和测试抗体的顺序可以颠倒:即,可以首先使对照抗体结合到表面,并且然后在竞争测定中使测试抗体与表面接触。优选地,对Siglec抗原具有较高亲和力的抗体首先结合表面,因为预期第二抗体所见的结合降低(假设抗体交叉反应)将具有更大的量级。此类测定的另外实例提供于例如Saunal (1995)《免疫法杂志(J. Immunol. Methods)》183:33-41,其公开内容通过引用并入本文。

[0185] 确定抗体是否在表位区内结合可以以本领域技术人员已知的方式进行。作为此类作图/表征方法的一个实例,抗Siglec抗体的表位区可以通过使用Siglec蛋白中暴露的胺/羧基的化学修饰的表位“足印”确定。此类足印技术的一个具体实例是使用HXMS(通过质谱法检测的氢-氘交换),其中发生受体和配体蛋白酰胺质子的氢/氘交换、结合和反向交换,其中参与蛋白质结合的主链酰胺基受到保护免于反向交换,并且因此将保持氘代。此时,可以通过消化蛋白水解、快速微孔高效液相色谱分离和/或电喷雾电离质谱法标识相关区域。参见,例如,Ehring H,《分析生物化学 (Analytical Biochemistry)》,第267卷,(第2期)第252-259页(1999)Engen, J.R. 和Smith, D.L. (2001)《分析化学 (Anal.)》73,256A-265A。合适的表位标识技术的另一个实例是核磁共振表位作图(NMR),其中通常比较游离抗原和与抗原结合肽复合的抗原,如抗体的二维NMR谱中信号的位置。通常用<sup>15</sup>N选择性地同位素标记抗原,使得在NMR谱中仅看到对应于抗原的信号,并且看不到来自抗原结合肽的信号。源自参与与抗原结合肽相互作用的氨基酸的抗原信号通常将在复合物的光谱中与游离抗原的光谱相比移位,并且可以以所述方式标识参与结合的氨基酸。参见,例如,Ernst Schering Res Found Workshop. 2004; (44):149-67;Huang等人,《分子生物学期刊(Journal of

Molecular Biology)》第281卷(第1期)第61-67页(1998);以及Saito和Patterson,《方法(Methods)》1996年6月;9(3):516-24。

[0186] 也可以使用质谱法进行表位作图/表征。参见,例如,Downard,《质谱学杂志(J Mass Spectrom.)》2000年4月;35(4):493-503以及Kiselar和Downard,《分析化学(Anal Chem.)》1999年5月1日;71(9):1792-1801。蛋白酶消化技术也可以用于表位作图和标识。抗原决定簇相关区域/序列可以通过蛋白酶消化确定,例如通过以约1:50的比率使用胰蛋白酶与Siglec或在pH 7-8下消化o/n,随后进行用于肽标识的质谱(MS)分析。随后可以通过将经历胰蛋白酶消化的样品和与抗体一起温育,并且然后通过例如胰蛋白酶消化的样品进行比较,标识通过抗Siglec结合剂保护免受胰蛋白酶切割的肽(从而揭示粘合剂的足迹)。其它酶如胰凝乳蛋白酶、胃蛋白酶等也可以或替代性地用于类似的表位表征方法中。此外,酶促消化可以提供用于分析潜在的抗原决定簇序列是否在Siglec多肽的未表面暴露的区域内的快速方法,并且因此,在免疫原性/抗原性方面最可能不相关。

[0187] 定点诱变是可用于阐明结合表位的另一种技术。例如,在“丙氨酸扫描”中,蛋白质区段内的每个残基用丙氨酸残基取代,并且测量结合亲和力的结果。如果突变导致结合亲和力显著降低,则很可能参与结合。对结构表位特异的单克隆抗体(即,不结合未折叠蛋白质的抗体)可以用于验证丙氨酸取代不影响蛋白质的总体折叠。参见,例如,Clackson和Wells,《科学(Science)》1995;267:383-386;以及Wells,《美国国家科学院院报(Proc Natl Acad Sci USA)》1996;93:1-6。

[0188] 电子显微镜也可以用于表位“足印”。例如,Wang等人,《自然(Nature)》1992;355:275-278使用冷冻电镜术、三维图像重建和X射线晶体学的协调应用,以确定Fab片段在天然豇豆花叶病毒的衣壳表面上的物理足迹。

[0189] 用于表位评估的其它形式的“无标记”测定包含表面等离子共振(SPR,BIACORE)和反射干涉光谱(RifS)。参见,例如,Fägerstam等人,《分子识别杂志(Journal Of Molecular Recognition)》1990;3:208-14;Nice等人,《色谱期刊(J.Chromatogr.)》1993;646:159-168;Leipert等人,《应用化学国际版(Angew.Chem.Int.Ed.)》1998;37:3308-3311;Kröger等人,《生物传感器和生物电子学(Biosensors and Bioelectronics)》2002;17:937-944。

[0190] 还应注意,可以在本文所述的示例性竞争测定中的一种或多种测定中,标识结合与本发明的抗体相同或基本相同的表位的抗体。

[0191] 交叉阻断测定也可以用于评估测试抗体是否影响天然或非天然唾液酸配体与人Siglec(例如,Siglec-7和/或Siglec-9)的结合。例如,为了确定人源化的抗Siglec抗体制剂是否减少或阻断了Siglec-7与唾液酸的相互作用,可以进行以下测试:将一定剂量范围的抗人Siglec-9 Fab与固定剂量的人Siglec-Fc(例如,Siglec-7 Fc和/或Siglec-9 Fc)在室温下共温育30分钟,然后加入表达细胞系的唾液酸配体,持续1h。在染色缓冲液中洗涤细胞两次之后,将在染色缓冲液中稀释的PE偶联的山羊抗小鼠IgG Fc片段二抗添加到细胞中,并且将平板在4℃下再温育30分钟。将细胞洗涤两次,并且在配备有HTFC酶标仪的AccuryC6流式细胞仪上进行分析。在不存在测试抗体的情况下,Siglec-Fc结合细胞。在与阻断Siglec与唾液酸的结合的Siglec-Fc(例如,Siglec-7 Fc和/或Siglec-9 Fc)预先温育的抗体制剂的存在下,Siglec-Fc与细胞的结合减少。然而,应该理解,可以直接评估NK细胞



对唾液酸配体表达性靶细胞的裂解活性的重建,而无需评估对Siglec唾液酸配体相互作用的阻断。

[0192] 任选地,抗体可以被指定为除了抗体E10-286 (BD Biosciences公司)、欧洲专利1238282B1中公开的克隆191240、QA79 (Moretta等人,热那亚大学)或Falco等人(1999)《实验医学期刊(J.Exp.Med.)》190:793-801中引用的Z176,或前述的衍生物中的任何一种或多种以外的抗体,例如,其全部或部分包括抗原结合区或重链和/或轻链CDR。任选地,可以将本公开的抗体指定为除了于2015年9月9日提交的PCT申请第PCT/EP2015/070550号中公开的抗体3A11、1H9和2B4中的任何一种或多种以外的抗体 (Innate Pharma)。在其它实施例中,上述抗体可以根据抗体的性质被修饰,以便具有本公开的抗体的特性。

[0193] 本文提供了抗体,其结合细胞外结构域,例如N末端V集结构域或人Siglec-9的Ig样C2型结构域1或2,例如结合本文实例中示出的表位的抗体。

[0194] 一方面,抗体结合与抗体mAb1、-2、-3、-4、-5、-6、-A、-B、-C、-D、-E或-F基本上相同的表位。在一个实施例中,抗体结合Siglec-9和/或Siglec-7的表位,其至少部分地与抗体mAb1、-2、-3、-4、-5、-6、-A、-B、-C、-D、-E或-F结合的表位重叠,或包含其中的至少一个残基。可以将抗体结合的残基指定为存在于Siglec-9和/或Siglec-7多肽的表面上,例如在细胞表面上表达的Siglec-9或Siglec-7多肽中。在由抗体结合的Siglec-9和/或Siglec-7上的氨基酸残基可以例如选自表3中列出的残基组成的组。

[0195] 可以测量抗Siglec抗体与用Siglec-9突变体转染的细胞的结合,并且与抗Siglec抗体结合野生型Siglec-9多肽(例如,SEQ ID NO:2)。对于另外结合Siglec-7的抗体,可以另外或替代性地使用用(例如表3的)Siglec-7突变体转染了的细胞进行抗Siglec抗体的结合,并且与抗Siglec抗体结合野生型Siglec-7多肽(例如,SEQ ID NO:1)。抗Siglec抗体与突变体Siglec-9和/或Siglec-7多肽(例如,表3的突变体Siglec-9或Siglec-7)之间的结合降低意味着结合亲和力降低(例如,如通过已知方法,如表达特定突变体的细胞的FACS测试,或通过结合突变体多肽的Biacore™ (SPR) 测试所测量)和/或抗Siglec抗体的总结合能力的降低(例如,如通过抗Siglec抗体浓度对多肽浓度的图中Bmax的降低所证明)。结合的显著降低表明,当抗Siglec抗体结合Siglec-9时,突变残基直接参与抗Siglec抗体的结合或与结合蛋白紧密接近。

[0196] 在一些实施例中,结合的显著降低意指相对于抗体与野生型Siglec-9多肽之间的结合,抗Siglec抗体与突变体Siglec-9多肽之间的结合亲和力和/或能力降低大于40%、大于50%、大于55%、大于60%、大于65%、大于70%、大于75%、大于80%、大于85%、大于90%或大于95%。在某些实施例中,结合降低到可检测限度以下。在一些实施例中,当抗Siglec抗体与突变体Siglec-9多肽的结合小于抗Siglec抗体与野生型Siglec-9多肽之间观察到的结合的50%(例如,小于45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%或10%)时,证明结合显著降低。

[0197] 在一些实施例中,提供了抗Siglec抗体,其表现出对突变体Siglec-9和/或Siglec-7多肽的结合显著降低,其中包括通过抗体mAb1、-2、-3、-A、-B、-C、-D、-E或-F结合的氨基酸残基的区段中的残基被不同的氨基酸取代。在一个实施例中,与结合野生型Siglec多肽(例如,SEQ ID NO:2的Siglec-9多肽)相比,突变体是选自表3的突变体M6、M8、M9、M10、M11、M15和M16的突变体。在一个实施例中,与结合野生型Siglec-7多肽(例如,SEQ

ID NO:1的多肽)相比,突变体是选自表3的突变体M6、M8、M9、M10、M11、M15和M16的突变体。

[0198] 一方面,抗Siglec抗体结合人Siglec-9上的表位,其包括选自由以下组成的组的残基中的一个、两个、三个、四个、五个或六个:N78、P79、A80、R81、A82和/或V83(参考SEQ ID NO:2)。

[0199] 一方面,抗Siglec抗体结合人Siglec-9上的表位,其包括选自由以下组成的组的残基中的一个、两个、三个或四个:N77、D96、H98和/或T99(参考SEQ ID NO:2)。

[0200] 一方面,抗Siglec抗体结合人Siglec-9上的表位,其包括选自由以下组成的组的残基中的一个、两个、三个或四个:W84、E85、E86和/或R88(参考SEQ ID NO:2)。

[0201] 一方面,抗Siglec抗体结合人Siglec-9上的表位,其包括选自由以下组成的组的残基中的一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个或八个:S47、H48、G49、W50、I51、Y52、P53和/或G54(参考SEQ ID NO:2)。

[0202] 一方面,抗Siglec抗体结合人Siglec-9上的表位,其包括残基K131和/或H132中的一个或两个(参考SEQ ID NO:2)。

[0203] 一方面,抗Siglec抗体结合人Siglec-9上的表位,其包括选自由以下组成的组的残基中的一个、两个、三个、四个、五个、六个或七个:R63、A66、N67、T68、D69、Q70和/或D71(参考SEQ ID NO:2)。

[0204] 一方面,抗Siglec抗体结合人Siglec-9上的表位,其包括选自由以下组成的组的残基中的一个、两个、三个、四个、五个或六个:P55、H58、E122、G124、S125和/或K127(参考SEQ ID NO:2)。

[0205] 一方面,抗Siglec抗体结合人Siglec-7上的表位,其包括选自由以下组成的组的残基中的一个、两个、三个、四个、五个或六个:N82、P83、A84、R85、A86和/或V87(参考SEQ ID NO:1)。

[0206] 一方面,抗Siglec抗体结合人Siglec-7上的表位,其包括选自由以下组成的组的残基中的一个、两个、三个或四个:N81、D100、H102和/或T103(参考SEQ ID NO:1)。

[0207] 一方面,抗Siglec抗体结合人Siglec-7上的表位,其包括选自由以下组成的组的残基中的一个、两个、三个或四个:W88、E89、E90、R92(参考SEQ ID NO:1)。

[0208] 一旦获得了具有Siglecs所需结合的抗原结合化合物,就可以评估其抑制Siglec(例如,Siglec-7和/或Siglec-9)的能力。例如,如果抗Siglec抗体降低或阻断由唾液酸配体诱导的Siglec活化(例如,如存在于细胞上),则它可以增加Siglec-限制的淋巴细胞的细胞毒性。这可以通过典型的细胞毒性测定来评估,其实例如下所述。

[0209] 可以使用例如表达Siglec-7或Siglec-9的NK细胞和表达相应Siglec的唾液酸配体的靶细胞,在标准的4小时体外细胞毒性测定中测试抗体减少Siglec介导的信号传导的能力。此类NK细胞不能有效地杀死表达唾液酸配体的靶标,因为Siglec-7或-9识别唾液酸配体,从而导致引发和传播阻止淋巴细胞介导的细胞溶解的抑制性信号传导。可以根据本文实例中的方法进行此类测定,例如参见实例8,使用原代NK细胞作为从供体中纯化的新鲜NK细胞,在使用之前在37°C下温育过夜。此类体外细胞毒性测定可以通过本领域众所周知的标准方法进行,如例如在Coligan等人编辑的《免疫学实验指南(Current Protocols in Immunology)》,格林出版协会和纽约州威利国际科学(1992,1993)中所述。在添加NK细胞之前,用<sup>51</sup>Cr标记靶细胞,并且然后由于杀伤,将杀伤估计为与<sup>51</sup>Cr从细胞向培养基的释放成

比例。添加防止Siglec-7和/或-9与唾液酸配体结合的抗体导致阻止抑制信号通过Siglec的引发和传播。因此,添加此类试剂导致淋巴细胞介导的靶细胞杀伤的增加。因此,此步骤识别了通过例如阻断配体结合来防止Siglec-7或-9诱导的负信号转导的试剂。在特定的<sup>51</sup>Cr释放细胞毒性测定中,Siglec-7或-9表达性NK效应细胞可以杀死唾液酸配体阴性靶细胞(例如,经唾液酸酶处理的细胞),但是不能很好地杀死唾液酸配体表达性对照细胞。因此,由于通过特定的Siglec唾液酸诱导的抑制信号传导,NK效应细胞杀死唾液酸配体阳性细胞的效率较低。在此类<sup>51</sup>Cr释放细胞毒性测定中,在将NK细胞与阻断性抗Siglec抗体进行预温育时,可以以抗体浓度依赖性方式更有效地杀死唾液酸配体表达性细胞。可以针对每个Siglec,例如,Siglec-7和Siglec-9分别进行测定。

[0210] 抗体的抑制活性(即,提高细胞毒性的潜力)也可以以许多其它方式中的任一种来评估,例如,通过其对细胞内游离钙的作用,如所述,例如,在Sivori等人,《实验医学杂志(J.Exp.Med.)》1997;186:1129-1136中,其公开内容通过引用并入本文,或通过对NK细胞细胞毒性活化的标志物,如脱粒标志物CD107或CD137表达的作用。NK、T或NKT细胞活性也可以使用任何基于细胞的细胞毒性测定进行评估,例如,测量任何其它参数以评估抗体刺激NK细胞杀死靶细胞,如P815、K562细胞或合适的肿瘤细胞的能力,如Sivori等人,《实验医学杂志(J.Exp.Med.)》1997;186:1129-1136;Vitale等人,《实验医学杂志(J.Exp.Med.)》1998;187:2065-2072;Pessino等人《实验医学杂志(J.Exp.Med.)》1998;188:953-960;Neri等人《临床和诊断实验室免疫学(Clin.Diag.Lab.Immun.)》2001;8:1131-1135;Pende等人《实验医学杂志(J.Exp.Med.)》1999;190:1505-1516,所述文献中的每一个的全部内容通过引用并入本文。

[0211] 在一个实施例中,抗体制剂使Siglec限制的淋巴细胞的细胞毒性增加至少10%,优选地使NK细胞毒性增加至少40%或50%,或更优选地使NK细胞毒性增加至少70%。

[0212] 细胞毒性淋巴细胞的活性也可以使用细胞因子释放测定来解决,其中将NK细胞与抗体一起温育,以刺激NK细胞的细胞因子产生(例如IFN- $\gamma$ 和TNF- $\alpha$ 产生)。在示例性方案中,培养4天之后,通过细胞表面和胞浆内染色评估从PBMC产生的IFN- $\gamma$ ,并且通过流式细胞术分析。简而言之,以5 $\mu$ g/ml的终浓度添加布雷菲德菌素A(Sigma Aldrich),持续培养最后4小时。然后在通透化之前,将细胞与抗CD3和抗CD56 mAb一起温育(IntraPrep<sup>TM</sup>;Beckman Coulter),并且用PE-抗IFN- $\gamma$ 或PE-IgG1(PharMingen)染色。使用ELISA(GM-CSF:DuoSet Elisa,R&D Systems,Minneapolis,MN,IFN- $\gamma$ :OptEIA set,PharMingen),在上清液中测量从多克隆活化的NK细胞产生的GM-CSF和IFN- $\gamma$ 。

[0213] 抗体的片段和衍生物(其被本申请中使用的术语“抗体(antibody)”或“抗体(antibodies)”涵盖,除非另有说明或上下文明显矛盾)可以通过本领域已知的技术产生。“片段”包括完整抗体的一部分,通常是抗原结合位点或可变区。抗体片段的实例包含Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>和Fv片段;双抗体;任何抗体片段,其具有由一个不间断的连续氨基酸残基序列组成的一级结构的多肽(在本文中称为“单链抗体片段”或“单链多肽”),包含但不限于(1)单链Fv分子(2)仅含有一个轻链可变结构域的单链多肽,或含有轻链可变结构域的三个CDR,无相关的重链部分的其片段和(3)仅含有一个重链可变区的单链多肽,或含有重链可变区的三个CDR,无相关的轻链部分的其片段;和由抗体片段形成的多特异性(例如,双特异性)抗体。尤其包含纳米抗体、结构域抗体、单结构域抗体或“dAb”。

[0214] 在某些实施例中,可以在插入到表达载体中之前,修饰产生抗体的杂交瘤的DNA,例如,通过用编码序列取代人重链和轻链恒定结构域代替同源非人类序列(例如,Morrison等人,《美国国家科学院院刊(PNAS)》pp.6851(1984)),或通过共价连接免疫球蛋白编码序列全部或部分非免疫球蛋白多肽的编码序列。以所述方式,制备具有原始抗体的结合特异性的“嵌合”或“杂合”抗体。通常,此类非免疫球蛋白多肽取代抗体的恒定结构域。

[0215] 任选地,抗体是人源化的。“人源化”形式的抗体是特异性嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白链或其片段(如Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>或抗体的其它抗原结合子序列),其含有衍生自鼠免疫球蛋白的最小序列。在大多数情况下,人源化抗体是人免疫球蛋白(受体抗体),其中来自受体的互补决定区(CDR)的残基被来自原始抗体(供体抗体)的CDR的残基替换,同时维持原始抗体所需的特异性、亲和力和能力。

[0216] 在一些情况下,人免疫球蛋白的Fv框架残基可以被对应的非人残基替换。更进一步,人源化抗体可以包括在受体抗体或导入的CDR或框架序列中未发现的残基。进行这些修饰以进一步改进和优化抗体性能。通常,人源化抗体将包括基本上全部至少一个、并且通常两个可变结构域,其中所有或基本上所有CDR区对应于原始抗体的那些,并且所有或基本上所有FR区是人免疫球蛋白共有序列中的那些。人源化抗体最佳地还将包括免疫球蛋白恒定区(Fc)的至少一部分,通常是人免疫球蛋白恒定区的至少一部分。另外的细节参见Jones等人,《自然(Nature)》,321,第522页(1986);Reichmann等人,《自然(Nature)》,332,第323页(1988);Presta,《结构生物学评论(Curr.Op.Struct.Biol.)》,2,第593页(1992);Verhoeyen等人,《科学(Science)》,239,第1534页;以及美国专利第4,816,567号,所述专利的全部公开内容通过引用并入本文。)用于人源化抗体的方法是本领域熟知的。

[0217] 用于制备人源化抗体的人可变结构域,轻链和重链两者的选择对于降低抗原性非常重要。根据所谓的“最佳拟合”方法,针对已知人可变结构域序列的整个文库,筛选抗体的可变结构域的序列。然后接受最接近小鼠的人序列作为人源化抗体的人框架(FR)(Sims等人,《免疫学杂志(J.Immunol.)》第151期,第2296页(1993);Chothia和Lesk,《分子生物学杂志(J.Mol.)》第196期,1987,第901页)。另一种方法使用来自特定轻链或重链亚组的所有人抗体的共有序列的特定框架。相同的框架可以用于几种不同的人源化抗体(Carter等人,《美国国家科学院院刊(PNAS)》89,第4285页,(1992);Presta等人,《免疫学杂志(J.Immunol.)》,151,第2623页(1993))。

[0218] 更重要的是,抗体被人源化,保留对Siglec受体的高亲和力和其它有利的生物学特性。为了实现此目标,根据一种方法,通过使用亲代和人源化序列的三维模型分析亲代序列和各种概念性人源化产物的过程,制备人源化抗体。三维免疫球蛋白模型通常是可获得的,并且是本领域技术人员熟悉的。可获得计算机程序,其说明和显示所选候选免疫球蛋白序列的可能的三维结构。检查这些显示允许分析残基在候选免疫球蛋白序列的功能中的可能作用,即,分析影响候选免疫球蛋白结合其抗原的能力的残基。以此方式,可以从共有序列和输入序列中选择并组合FR残基,从而实现所需的抗体特性,如对于一个或多个靶抗原的亲和力增加。通常,CDR残基直接且最实质地参与影响抗原结合。

[0219] 制备“人源化”单克隆抗体的另一种方法是使用转基因鼠(XenoMouse)(Abgenix,Fremont,CA)作为用于免疫的小鼠。转基因鼠是一种小鼠宿主,根据其免疫球蛋白基因被功能性人免疫球蛋白基因替换。因此,由此小鼠或由此小鼠的B细胞制备的杂交瘤产生的抗体

已经人源化。转基因鼠描述于美国专利第6,162,963号中,其通过引用以其整体并入本文。

[0220] 人抗体也可以根据各种其它技术产生,如通过使用已经被工程化以表达人抗体库的其它转基因动物用于免疫(Jakobovitz等人,《自然(Nature)》362(1993)255),或通过使用噬菌体展示方法从抗体库选择。此类技术是本领域技术人员已知的,并且可以从本申请公开的单克隆抗体开始实施。

[0221] 在一个实施例中,抗Siglec抗体可以制备成使得它们与人Fc $\gamma$ 受体不具有实质性的特异性结合,例如,CD16A、CD16B、CD32A、CD32B和/或CD64中的任何一个或多个)。此类抗体可以包括已知缺乏或与Fc $\gamma$ 受体具有低结合的各种重链的恒定区。替代性地,不包括(或包括部分)恒定区的抗体片段,如F(ab')<sub>2</sub>片段,可以用于避免Fc受体结合。可以根据本领域已知的方法评估Fc受体结合,包含例如在BIAcore测定中测试抗体与Fc受体蛋白的结合。而且,通常可以使用任何抗体IgG同种型,其中Fc部分被修饰(例如,通过引入1个、2个、3个、4个、5个或更多个氨基酸取代),以最小化或消除与Fc受体的结合(参见,例如,W0 03/101485,其公开内容通过引用并入本文)。如基于细胞的测定等用于评估Fc受体结合的测定在本领域中是公知的,并且描述于,例如W0 03/101485中。

[0222] 在一个实施例中,抗体可以在Fc区中包括一个或多个特定突变,其导致与效应细胞具有最小相互作用的“Fc沉默”抗体。沉默的效应功能可以通过抗体的Fc区中的突变获得,并且已经在本领域中描述:N297A突变、LALA突变(Strohl, W., 2009,《生物技术当前述评(Curr.Opin.Biotechnol.)》第20卷,第6期:685-691);和D265A(Baudino等人,2008,《免疫学杂志(J.Immunol.)》181:6664-69)还参见Heusser等人,W02012/065950,其公开内容通过引用并入本文。在一个实施例中,抗体在铰链区中包括一个、两个、三个或更多个氨基酸取代。在一个实施例中,抗体是IgG1或IgG2,并且在残基233-236,任选地233-238(EU编号)处包括一个、两个或三个取代。在一个实施例中,抗体是IgG4,并且在残基327、330和/或331(EU编号)处包括一个、两个或三个取代。沉默Fc IgG1抗体的实例是在IgG1 Fc氨基酸序列中包括L234A和L235A突变的LALA突变体。Fc沉默突变的另一个实例是残基D265或D265和P329处的突变,例如在IgG1抗体中用作DAPA(D265A,P329A)突变(US 6,737,056)。另一种沉默IgG1抗体包括残基N297处的突变(例如,N297A、N297S突变),其产生非糖基化/非糖基化抗体。其它沉默突变包含:在残基L234和G237(L234A/G237A)处的取代;在残基S228、L235和R409(S228P/L235E/R409K、T、M、L)处的取代;在残基H268、V309、A330和A331(H268Q/V309L/A330S/A331S)处的取代;在残基C220、C226、C229和P238(C220S/C226S/C229S/P238S)处的取代;在残基C226、C229、E233、L234和L235(C226S/C229S/E233P/L234V/L235A)处的取代;在残基K322、L235和L235(K322A/L234A/L235A)处的取代;在残基L234、L235和P331(L234F/L235E/P331S)处的取代;在残基234、235和297处的取代;在残基E318、K320和K322(L235E/E318A/K320A/K322A)处的取代;在残基(V234A、G237A、P238S)处的取代;在残基243和264处的取代;在残基297和299处的取代;使得由EU编号系统定义的残基233、234、235、237和238的取代包括选自PAAAP、PAAAS和SAAAS的序列(参见W02011/066501)。

[0223] 在一个实施例中,抗体可以在Fc区中包括一个或多个特定突变,其导致本公开的抗体的稳定性提高,例如,包括多个芳香族氨基酸残基和/或具有高疏水性。例如,此类抗体可以包括人IgG1起源的Fc结构域,包括一个或多个Kabat残基234、235、237、330和/或331处的突变。此类Fc结构域的一个实例包括Kabat残基L234、L235和P331(例如,L234A/L235E/

P331S或(L234F/L235E/P331S)处的取代。此类Fc结构域的另一个实例包括Kabat残基L234、L235、G237和P331(例如,L234A/L235E/G237A/P331S)处的取代。此类Fc结构域的另一个实例包括Kabat残基L234、L235、G237、A330和P331(例如,L234A/L235E/G237A/A330S/P331S)处的取代。在一个实施例中,抗体包括任选地人IgG1同种型的Fc结构域,其包括:L234X<sub>1</sub>取代、L235X<sub>2</sub>取代和P331X<sub>3</sub>取代,其中X<sub>1</sub>是除亮氨酸之外的任何氨基酸残基,X<sub>2</sub>是除亮氨酸之外的任何氨基酸残基,并且X<sub>3</sub>是除脯氨酸之外的任何氨基酸残基;任选地,其中X<sub>1</sub>是丙氨酸或苯丙氨酸或其保守取代;任选地,其中X<sub>2</sub>是谷氨酸或其保守取代;任选地,其中X<sub>3</sub>是丝氨酸或其保守取代。在另一个实施例中,抗体包括任选地人IgG1同种型的Fc结构域,其包括:L234X<sub>1</sub>取代、L235X<sub>2</sub>取代、G237X<sub>4</sub>取代和P331X<sub>4</sub>取代,其中X<sub>1</sub>是除亮氨酸之外的任何氨基酸残基,X<sub>2</sub>是除亮氨酸之外的任何氨基酸残基,X<sub>3</sub>是除甘氨酸之外的任何氨基酸残基,并且X<sub>4</sub>是除脯氨酸之外的任何氨基酸残基;任选地,其中X<sub>1</sub>是丙氨酸或苯丙氨酸或其保守取代;任选地,其中X<sub>2</sub>是谷氨酸或其保守取代;任选地,X<sub>3</sub>是丙氨酸或其保守取代;任选地,X<sub>4</sub>是丝氨酸或其保守取代。在另一个实施例中,抗体包括任选地人IgG1同种型的Fc结构域,其包括:L234X<sub>1</sub>取代、L235X<sub>2</sub>取代、G237X<sub>4</sub>取代、G330X<sub>4</sub>取代和P331X<sub>5</sub>取代,其中X<sub>1</sub>是除亮氨酸之外的任何氨基酸残基,X<sub>2</sub>是除亮氨酸之外的任何氨基酸残基,X<sub>3</sub>是除甘氨酸之外的任何氨基酸残基,X<sub>4</sub>是除丙氨酸之外的任何氨基酸残基,并且X<sub>5</sub>是除脯氨酸之外的任何氨基酸残基;任选地,其中X<sub>1</sub>是丙氨酸或苯丙氨酸或其保守取代;任选地,其中X<sub>2</sub>是谷氨酸或其保守取代;任选地,X<sub>3</sub>是丙氨酸或其保守取代;任选地,X<sub>4</sub>是丝氨酸或其保守取代;任选地,X<sub>5</sub>是丝氨酸或其保守取代。在此使用的简写符号中,格式为:野生型残基:多肽中的位置:突变残基,其中残基位置根据Kabat的EU编号表示。

[0224] 在一个实施例中,抗体包括重链恒定区,所述重链恒定区包括下文的氨基酸序列,或与其至少90%、95%或99%相同但保留Kabat位置234、235和331处的氨基酸残基的氨基酸序列(下划线):

A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P  
E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V  
V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S  
C D K T H T C P P C P A P E AE G G P S V F L F P P K P K D T L M I S  
R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K  
[0225] T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K  
V S N K A L P A S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E  
E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N  
Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S  
C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (SEQ ID NO: 166)。

[0226] 在一个实施例中,抗体包括重链恒定区,所述重链恒定区包括下文的氨基酸序列,或与其至少90%、95%或99%相同但保留Kabat位置234、235和331处的氨基酸残基的氨基酸序列(下划线):

[0227] A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P  
E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V  
V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S  
C D K T H T C P P C P A P E FE G G P S V F L F P P K P K D T L M I S  
R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K  
T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K  
V S N K A L P A S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E  
[0228] E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N  
Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S  
C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (SEQ ID NO: 167)。

[0229] 在一个实施例中,抗体包括重链恒定区,所述重链恒定区包括下文的氨基酸序列,或与其至少90%、95%或99%相同但保留Kabat位置234、235、237、330和331处的氨基酸残基的氨基酸序列(下划线):

[0230] A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P  
E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V  
V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S  
C D K T H T C P P C P A P E AE G A P S V F L F P P K P K D T L M I S  
R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K  
T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K  
V S N K A L P SS I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E E  
M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N Y  
K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S C  
S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (SEQ ID NO: 168)。

[0231] 在一个实施例中,抗体包括重链恒定区,所述重链恒定区包括下文的氨基酸序列,或与其至少90%、95%或99%相同但保留Kabat位置234、235、237和331处的氨基酸残基的序列(下划线):

[0232] A S T K G P S V F P L A P S S K S T S G G T A A L G C L V K D Y F P  
E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L Y S L S S V  
V T V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D K R V E P K S  
C D K T H T C P P C P A P E AE G A P S V F L F P P K P K D T L M I S  
R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V D G V E V H N A K  
T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D W L N G K E Y K C K  
V S N K A L P A S I E K T I S K A K G Q P R E P Q V Y T L P P S R E  
E M T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V E W E S N G Q P E N N  
Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V D K S R W Q Q G N V F S  
[0233] C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P G K (SEQ ID NO: 169)。

[0234] Fc沉默抗体导致无或低ADCC活性,这意味着Fc沉默抗体表现出低于50%特异性细胞裂解的ADCC活性。优选地,抗体基本上缺乏ADCC活性,例如,Fc沉默抗体表现出低于5%或

低于1%的ADCC活性(特异性细胞裂解)。Fc沉默抗体也可以导致在细胞(例如,NK细胞、T细胞、单核细胞、树突细胞、巨噬细胞)的表面处缺乏Siglec-9和/或Siglec-7的Fc $\gamma$ R-介导的交联。

[0235] 在一个实施例中,抗体在选自以下组成的组的残基中的任何一个、两个、三个、四个、五个或更多个处的重链恒定区中具有取代:220、226、229、233、234、235、236、237、238、243、264、268、297、298、299、309、310、318、320、322、327、330、331和409(重链恒定区中残基的编号根据根据Kabat的EU编号)。在一个实施例中,抗体在残基234、235和322处包括取代。在一个实施例中,抗体在残基234、235和331处具有取代。在一个实施例中,抗体在残基234、235、237和331处具有取代。在一个实施例中,抗体在残基234、235、237、330和331处具有取代。在一个实施例中,Fc结构域是由人IgG1亚型构成的。氨基酸残基根据根据Kabat的EU编号指示。

[0236] 抗体CDR序列

[0237] 抗体mAb1、-2、-3、-4、-5、-6、-A、-B、-C、-D、-E和-F的重链和轻链可变区的氨基酸序列示出在表B中。在具体实施例中,提供了一种抗体,其结合与单克隆抗体mAb1、-2、-3、-4、-5、-6、-A、-B、-C、-D、-E或-F基本上相同的表位或决定簇;任选地抗体包括抗体mAb1、-2、-3、-4、-5、-6、-A、-B、-C、-D、-E或-F的高变区。在本文实施例的任一个中,抗体mAb1、-2、-3、-4、-5、-6、-A、-B、-C、-D、-E或-F的特征可以在于氨基酸序列和/或编码其的核酸序列。在一个实施例中,单克隆抗体包括VH和/或VL,或mAb1、-2、-3、-4、-5、-6、-A、-B、-C、-D、-E或-F的Fab或F(ab')<sub>2</sub>部分。还提供了包括mAb1的重链可变区的单克隆抗体。根据一个实施例,单克隆抗体包括mAb1、-2、-3、-4、-5、-6、-A、-B、-C、-D、-E或-F的重链可变区的三个CDR。还提供了单克隆抗体,其进一步包括相应mAb1、-2、-3、-4、-5、-6、-A、-B、-C、-D、-E或-F的可变轻链可变区或相应mAb1、-2、-3、-4、-5、-6、-A、-B、-C、-D、-E或-F的轻链可变区的CDR中的一个、两个或三个。任选地,所述轻链或重链CDR中的任何一个或多个可以含有一个、两个、三个、四个或五个或更多个氨基酸修饰(例如,取代、插入或缺失)。任选地,提供了一种抗体,其中包括抗体mAb1的部分或全部抗原结合区的轻链和/或重链可变区中的任一个与人IgG型的免疫球蛋白恒定区,任选地人恒定区,任选地人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4同种型融合,任选地进一步包括氨基酸取代,以减少效应子功能(结合人Fc $\gamma$ 受体)。

[0238] 示例性的抗体包括:mAb1的HCDR1区,其包括如表A-1中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAb1的HCDR2区,其包括如表A-1中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAb1的HCDR3区,其包括如表A-1中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAb1的LCDR1区,其包括如表A-1中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAb1的LCDR2区,其包括如表A-1中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAb1的LCDR3区,其包括如表A-1中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其



中这些氨基酸中的一个或多个可以被缺失或被不同的氨基酸取代。

[0239] 表A-1

mAb	CDR 定义	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		SEQ ID	序列	SEQ ID	序列	SEQ ID	序列
mAb1	Kabat	27	GGFAWN	30	YIGYGGSTSYNPSLNS	32	GDYLFAY
	Chotia	28	GYSITGGF		YGG	33	DYLFA
	IMGT	29	GYSITGGFA	31	IGYGGST	34	ARGDYLFAY
mAb	CDR 定义	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		SEQ ID	序列	SEQ ID	序列	SEQ ID	序列
mAb1	Kabat	35	KASQDVNTA VA	38	SASYRYT	39	QQHYSTPRT
	Chotia	36	SQDVNTA		SAS	40	HYSTPR
	IMGT	37	QDVNTA		SAS	39	QQHYSTPRT

[0241] 另一个示例性的抗体包括:mAb3的HCDR1区,其包括如表A-3中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAb3的HCDR2区,其包括如表A-3中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAb3的HCDR3区,其包括如表A-3中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAb3的LCDR1区,其包括如表A-3中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAb3的LCDR2区,其包括如表A-3中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAb3的LCDR3区,其包括如表A-3中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被缺失或被不同的氨基酸取代。

[0242] 表A-3

mAb	CDR 定义	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		SEQ ID	序列	SEQ ID	序列	SEQ ID	序列
mAb3	Kabat	27	GGFAWN	30	YIGYGGSTSYNPSLNS	32	GDYLFAY
	Chotia	28	GYSITGGF		YGG	33	DYLFA
	IMGT	29	GYSITGGFA	31	IGYGGST	34	ARGDYLFAY
mAb	CDR 定义	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		SEQ ID	序列	SEQ ID	序列	SEQ ID	序列
mAb3	Kabat	41	RASGNIHNYLA	44	NAKTLAD	45	QHFWSTPRT
	Chotia	42	SGNIHNY		NAK	46	FWSTPR
	IMGT	43	GNIHNY		NAK	45	QHFWSTPRT

[0244] 另一个示例性的抗体包括:mAb4的HCDR1区,其包括如表A-4中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAb4的HCDR2区,其包括如表A-4中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAb4的HCDR3区,其包括如表A-4中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些

氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAb4的LCDR1区,其包括如表A-4中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAb4的LCDR2区,其包括如表A-4中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAb4的LCDR3区,其包括如表A-4中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被缺失或被不同的氨基酸取代。

[0245] 表A-4

mAb	CDR 定义	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		SEQ ID	序列	SEQ ID	序列	SEQ ID	序列
mAb4	Kabat	47	SYDMS	50	HIGSGGGNIYYPDTVKG	52	LIFTTGFYGM DY
	Chotia	48	GFAFSSY		S GGG	53	IFTTGFYGM D
	IMGT	49	GFAFSSYD	51	IGSGGGNI	54	ARLIFTTGFYGM DY
mAb	CDR 定义	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		SEQ ID	序列	SEQ ID	序列	SEQ ID	序列
mAb4	Kabat	55	RASQDISSYLN	58	YTSRLHS	59	QQGNALPWT
	Chotia	56	SQDISSY		YTS	60	GNALPW
	IMGT	57	QDISSY		YTS	59	QQGNALPWT

[0247] 另一个示例性的抗体包括:mAb5的HCDR1区,其包括如表A-5中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAb5的HCDR2区,其包括如表A-5中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAb5的HCDR3区,其包括如表A-5中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAb5的LCDR1区,其包括如表A-5中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAb5的LCDR2区,其包括如表A-5中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAb5的LCDR3区,其包括如表A-5中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被缺失或被不同的氨基酸取代。

[0248] 表A-5

mAb	CDR 定义	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		SEQ ID	序列	SEQ ID	序列	SEQ ID	序列
mAb5	Kabat	61	DYNMN	64	NIDPYYGATSYNQRFKG	66	GDSL FAY
	Chotia	62	GYSFSDY		PYYG	67	DSLFA
	IMGT	63	GYSFSDYN	65	IDPYYGAT	68	ARGDSL FAY
mAb	CDR 定义	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		SEQ ID	序列	SEQ ID	序列	SEQ ID	序列
mAb5	Kabat	69	KASQNVGTNVA	72	SASSRYS	73	QQYITYPYT
	Chotia	70	SQNVGTN		SAS	74	YITYPY
	IMGT	71	QNVGTN		SAS	73	QQYITYPYT

[0250] 另一个示例性的抗体包括:mAbA的HCDR1区,其包括如表A-7中列出的氨基酸序列

或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAbA的HCDR2区,其包括如表A-7中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAbA的HCDR3区,其包括如表A-7中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAbA的LCDR1区,其包括如表A-7中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAbA的LCDR2区,其包括如表A-7中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAbA的LCDR3区,其包括如表A-7中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被缺失或被不同的氨基酸取代。

[0251] 表A-7

[0252]

mAb	CDR 定义	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		SEQ ID	序列	SEQ ID	序列	SEQ ID	序列
mAbA	Kabat	75	SYWMH	78	EINPSNGHTNYNEKFES	80	GVESYDFD DALDY
	Chotia	76	YFTFTSY		PSNG	81	VESYDFD DALD
	IMGT	77	YFTFTSYW	79	INPSNGHT	82	ANGVESYDFD DALDY
mAb	CDR 定义	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		SEQ ID	序列	SEQ ID	序列	SEQ ID	序列
mAbA	Kabat	83	RASQDINNY LN	58	YTSRLHS	86	QQGNTLPFT
	Chotia	84	SQDINNY		YTS	87	GNTLPF
	IMGT	85	QDINNY		YTS	86	QQGNTLPFT

[0253] 另一个示例性的抗体包括:mAbB的HCDR1区,其包括如表A-8中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAbB的HCDR2区,其包括如表A-8中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAbB的HCDR3区,其包括如表A-8中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAbB的LCDR1区,其包括如表A-8中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAbB的LCDR2区,其包括如表A-8中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAbB的LCDR3区,其包括如表A-8中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被缺失或被不同的氨基酸取代。

[0254] 表A-8

[0255]

mAb	CDR 定义	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		SEQ ID	序列	SEQ ID	序列	SEQ ID	序列
mAbB	Kabat	75	SYWMH	90	EINPSNGHTNYNEKFKT	92	GVETYDFDDAMDY
	Chotia	88	VYTFTSY		PSNG	93	VETYDFDDAMD
	IMGT	89	VYTFTSYW	91	INPSNGHT	94	ANGVETYDFDDA MDY
mAb	CDR 定义	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		SEQ ID	序列	SEQ ID	序列	SEQ ID	序列
mAbB	Kabat	83	RASQDINNYLN	95	FTSRLHS	96	QQGDTFPFT
	Chotia	84	SQDINNY		YTS	97	GDTFPF
	IMGT	85	QDINNY		FTS	96	QQGDTFPFT

[0256] 另一个示例性的抗体包括:mAbC的HCDR1区,其包括如表A-9中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAbC的HCDR2区,其包括如表A-9中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAbC的HCDR3区,其包括如表A-9中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAbC的LCDR1区,其包括如表A-9中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAbC的LCDR2区,其包括如表A-9中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAbC的LCDR3区,其包括如表A-9中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被缺失或被不同的氨基酸取代。

[0257] 表A-9

[0258]

mAb	CDR 定义	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		SEQ ID	序列	SEQ ID	序列	SEQ ID	序列
mAbC	Kabat	98	NYEMN	101	WINTYTGESTYADDFK	103	DDYGRSYGFAY
	Chotia	99	GYTFTNY		TYTG	104	DYGRSYGFA
	IMGT	100	GYTFTNYYE	102	INTYTGES	105	VRDDYGRSYG FAY
mAb	CDR 定义	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		SEQ ID	序列	SEQ ID	序列	SEQ ID	序列
mAbC	Kabat	106	RASESVDSYGN SFMH	109	LASKLES	110	HQNNEDPPWT
	Chotia	107	SESVDSYGN SF		LAS	111	NNEDPPW
	IMGT	108	ESVDSYGN SF		LAS	110	HQNNEDPPWT

[0259] 另一个示例性的抗体包括:mAbD的HCDR1区,其包括如表A-10中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAbD的HCDR2区,其包括如表A-10中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAbD的HCDR3区,其包括如表A-10中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAbD的LCDR1区,其包括如表A-10中列出

的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAbD的LCDR2区,其包括如表A-10中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAbD的LCDR3区,其包括如表A-10中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被缺失或被不同的氨基酸取代。

[0260] 表A-10

mAb	CDR 定义	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		SEQ ID	序列	SEQ ID	序列	SEQ ID	序列
mAbD	Kabat	112	DYSMH	115	WIITETGEPTYADDFRG	117	DFDGY
	Chotia	113	GYTFTDY		TETG		FDG
	IMGT	114	GYTFTDYS	116	IITETGEP	118	ARDFDGY
mAb	CDR 定义	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		SEQ ID	序列	SEQ ID	序列	SEQ ID	序列
mAbD	Kabat	119	RASENIYSYLA	122	NAKTLTE	123	QHHYGFPWT
	Chotia	120	SENIYSY		NAK	124	HYGFPW
	IMGT	121	ENIYSY		NAK	123	QHHYGFPWT

[0262] 另一个示例性的抗体包括:mAbE的HCDR1区,其包括如表A-11中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAbE的HCDR2区,其包括如表A-11中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAbE的HCDR3区,其包括如表A-11中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAbE的LCDR1区,其包括如表A-11中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAbE的LCDR2区,其包括如表A-11中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAbE的LCDR3区,其包括如表A-11中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被缺失或被不同的氨基酸取代。

[0263] 表A-11

mAb	CDR 定义	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		SEQ ID	序列	SEQ ID	序列	SEQ ID	序列
mAbE	Kabat	125	TFGMH	128	YISSGSNAIYYADTVKG	130	PGYGAWFAY
	Chotia	126	GFTFSTF		SGSN	131	YGAWFA
	IMGT	127	GFTFSTFG	129	ISSGSNAI	132	ASPGYGAWFAY
mAb	CDR 定义	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		SEQ ID	序列	SEQ ID	序列	SEQ ID	序列
mAbE	Kabat	133	RASSSVSSAYLH	136	STSNLAS	137	QQYSAYPYT
	Chotia	134	SSSVSSAY		STS	138	YSAYPY
	IMGT	135	SSVSSAY		STS	137	QQYSAYPYT

[0265] 另一个示例性的抗体包括:mAbF的HCDR1区,其包括如表A-12中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中

的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAbF的HCDR2区,其包括如表A-12中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAbF的HCDR3区,其包括如表A-12中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAbF的LCDR1区,其包括如表A-12中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAbF的LCDR2区,其包括如表A-12中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被不同的氨基酸取代;mAbF的LCDR3区,其包括如表A-12中列出的氨基酸序列或其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,任选地其中这些氨基酸中的一个或多个可以被缺失或被不同的氨基酸取代。

[0266] 表A-12

mAb	CDR 定义	HCDR1		HCDR2		HCDR3	
		SEQ ID	序列	SEQ ID	序列	SEQ ID	序列
mAbF	Kabat	112	DYSMH	139	VISTYNGNTNYNQKFKG	141	RGYYGSSSWFGY
	Chotia	113	GYTFTDY		TYNG	142	GYYGSSSWFG
	IMGT	114	GYTFTDYS	140	ISTYNGNT	143	ARRGYYGSSSWFGY
mAb	CDR 定义	LCDR1		LCDR2		LCDR3	
		SEQ ID	序列	SEQ ID	序列	SEQ ID	序列
mAbF	Kabat	144	KASQNVGTDVA	147	SASYRYS	148	QQYNSFPYT
	Chotia	145	SQNVGTD		SAS	149	YNSFPY
	IMGT	146	QNVGTD		SAS	148	QQYNSFPYT

[0268] 在本文实施例中的任一个中,可以任选地将HCDR1、2、3和LCDR1、2、3序列中的任一个指定为Kabat编号系统中的所有那些(或各自独立地)(如表A-1到A-12中针对每个CDR所示),Chotia编号系统中的那些(如表A-1到A-12中针对每个CDR所示),IMGT编号系统中的那些(如表A-1到A-12中针对每个CDR所示)或任何其它合适的编号系统。

[0269] 在另一个方面,mAbA、mAbB、mAbC、mAbD、mAbE、mAbF、mAb1、mAb2、mAb3、mAb4、mAb5或mAb6的重链和轻链的CDR 1、2和3中的任一个的特征可以在于其至少4个、5个、6个、7个、8个、9个或10个连续氨基酸的序列,和/或具有与特定CDR或对应SEQ ID NO中列出的CDR集共有至少50%、60%、70%、80%、85%、90%或95%序列同一性的氨基酸序列。

[0270] 在抗体中的任一个中,例如,mAbA、mAbB、mAbC、mAbD、mAbE、mAbF、mAb1、mAb2、mAb3、mAb4、mAb5或mAb6,指定的可变区和CDR序列可以包括序列修饰,例如,取代(1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个或更多个序列修饰)。在一个实施例中,重链和轻链的CDR 1、2和/或3包括一个、两个、三个或更多个氨基酸取代,其中被取代的残基是人源序列中存在的残基。在一个实施例中,取代是保守修饰。保守序列修饰是指不会显著影响或改变含有氨基酸序列的抗体的结合特性的氨基酸修饰。此类保守修饰包含氨基酸取代、添加和缺失。可以通过本领域已知的标准技术,将修饰引入到本发明的抗体中,如定点诱变和PCR介导的诱变。保守氨基酸取代通常是其中氨基酸残基被具有具有类似的理化性质的侧链的氨基酸残基替换的那些氨基酸取代。指定的可变区和CDR序列可以包括一个、两个、三个、四个或更多个氨基酸插入、缺失或取代。在进行取代的情况下,优选的取代将是保守修饰。具有类似侧链的

氨基酸残基家族已经在本领域中定义。这些家族包含具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸),具有酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸、谷氨酸),具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸),具有非极性侧链的氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸),具有 $\beta$ 支链侧链的氨基酸(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳香族侧链的氨基酸(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,本发明的抗体的CDR区内的一个或多个氨基酸残基可以被来自相同侧链家族的其他氨基酸残基替换,并且可以使用本文所述的测定,测试改变的抗体的保留功能(即,本文列出的性质)。

[0271] 根据IMGT、Kabat和Chothia定义系统,CDR的序列总结在表A-1到A-12中。下表B列出了根据本发明的抗体的可变区的序列。在本文的任何实施例中,可以指定或编号VL或VH序列,以进一步包括或缺乏信号肽或其任何部分。

[0272] 在一个实施例中,抗体是保留其结合和/或功能特性的抗体片段。

[0273] 表B

	SEQ ID NO:	氨基酸序列
[0274] mAb1 VH	3	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYISITGGFAWNWIRQFPGNTLEWMGYIGYGGSTSYNPSLNSRISITRDTSKNHFFLQFNSVTTDDSATYYCARGDYLFAYWGQGTlVTVSA
mAb1 VL	4	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVNTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVPDRFTGSGSGTDFtFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSTPRTFGGGTKLEIK

[0275]

mAb2 VH	5	EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITGGFAWNWIRQFPGNTLEWMGYIGYGGSTSYNPSLNSRISITRDTSKNHFFLQFNSVTTEDSATYYCARGDYLFAIWGQGTLLTVSA
mAb2 VL	6	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVNTAVAWYQQKPGQSPKLLIYSASYRYTGVDPDRFTGSGSGTDFTFTISSVQAEDLAVYYCQQHYSTPRTFGGGTKEIK
mAb3 VH	7	EVQLLETGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITGGFAWNWIRQFPGNTLEWMGYIGYGGSTSYNPSLNSRISITRDTSKNHFFLQFNSVTTEDSATYYCARGDYLFAIWGQGTLLTVSA
mAb3 VL	8	DILMTQSPASLSASVGETVSITCRASGNIHNYLAWYLQRQKSPQLLVYNAKTLADGVPSRFSGTSGGTQFSLKINSLOPEDFGSYQCQHFWSPTPRTFGGGTKEIK
mAb4 VH	9	DVQLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFAFSSYDMSWVRQSPPEKRLIEWIAHIGSGGGNIYYPDTVKGRFTISRDNKNTLYLQMRSLKSEDTAMYCARLIFFTGFYGM DYWGQGSTSVTVSS
mAb4 VL	10	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISSYLNWYQQKPDGTIKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLDQDDIATYFCQQGNALPWTFGGGTKEIK
mAb5 VH	11	EIQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFSDYNMNVWQSNKGSLEWIGNIDPYYGATSYNQRFK GKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARGDSLFAIWGHGTLTVSA
mAb5 VL	12	DIVMTQSQEFMSTSLGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALLYSASSRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYITYPYTFGGGTKEIK
mAb6 VH	13	EIQLQQSGPELEKPGASVKISCKASGYSFSDYNMNVWQSNKGSLEWIGNIDPYYGATSYNQRFK GKATLTVDKSSSTAYMQLKSLTSEDSAVYYCARGDSLFAIWGQGTLLTVSA
mAb6 VL	14	DIVMTQSQEFMSTSLGDRVSVTCKASQNVGTNVAWYQQKPGQSPKALLYSASSRYSGVPDRFTGSGSGTDFTLTINNMQSEDLAEYFCQQYITYPYTFGGGTKEIK
mAbA VH	15	QVQLQPPGAELVKPGSPVKLSCKASYFTFTSYWMHWVRQRPQGGLWEIGIEINPSNGHTNYNEKFESKATLTVDRSSSTAYMQLSSLTSEDSAVFYCANGVESYDFDDALDYWGQGSTSVTVSS
mAbA VL	16	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDINNLYLNWYQQKPDGTIKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTINNLEQEDIATYFCQQGNTLPFTFGGGTKEIK
mAbB VH	17	QVQLQPPGAELVKPGASVKLSCKASVYFTFTSYWMHWVRQRPQGGLWEIGIEINPSNGHTNYNEKFETKAKLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVFYCANGVETYDFDDAMDYWGQGSTSVTVSS
mAbB VL	18	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDINNLYLNWYQQKPDGTVKLLIYFTSRLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGDTFTFTFGGGTKEIK
mAbC VH	19	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTNYEMNVWKEAPGKGLKWMGWINTYTGESTYADDFKGRFAFSLETSASTVYLQINNLDKEDVATYFCVRDDYGRSYGFAYWGQGTLLTVSA
mAbC VL	20	NIVLTQSPASLTVSLGQRANISCRASESVDSYGNSFMHWYQQKPGQPPLLIYLASKLESGLVPARFSGSGSRDFTLTIDPVEDDAATYYCHQNNEDPPWTFGGGTKEIK
mAbD VH	21	QIQLVQSGPELKKPGETVKISCKASGYTFTDYSMHVWKQAPGKGLKWMGWIIITETGETYADDFRGRFAFSLETSANTAYLQINNLDKEDTATYFCARDFDGYWGQGTLLTVSS
mAbD VL	22	DILMTQSPASLSASVGETVTITCRASENIYSYLAWYQQKRGKSPQFLVYNAKTLTEGVPSRFSGSGSGTQFSLKINSLOPEDFGTYQCQHHYGFPTFGGGTKEIK
mAbE VH	23	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSAASGFTFTFGMHVWRQAPKGLWEVAYISSGSNAIYYADTVKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDTAMYCASPGYGAWFAYWGQGTLLTVSA
mAbE VL	24	ENVLTQSPAISASPGKVTMTCRASSSVSSAYLHWYQQKSGASPKLWIYSTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSEAEADAATYYCQQYSAYPYTFGGGTKEIK
mAbF VH	25	QVQLQQSGPEVVRPGVSVKISCKGSGYFTFTDYSMHVWKQSHAKSLEWIGVISTYNGNTNYNQKFKGKATMTVDKSSSTAYMELARLTSEDSAIYYCARRGYGSSSWFGYWGQGTLLTVSA

[0276]

mAbF VL	26	DIVMTQSQKFMSTSVGDRVSVTCKASQNVGTDVAWYQQKPGQSPKALLYSASYRYSGVPDRFTGSGSGADFTLTISNVQSEDLAEYFCQQYNSFPYTFGGGTKEIK
------------	----	--

[0277] NKG2A抑制

[0278] 人NKG2A多肽的抑制活性的中和可以通过抑制NK细胞和/或T细胞中HLA-E介导的NKG2A的活化来实现。中和人NKG2A多肽的抑制活性的试剂的实例包含结合HLA-E并且抑制NKG2A与HLA-E之间的相互作用的抗体。替代性地,抗体可以结合人CD94/NKG2A受体的细胞外部分,并且降低在CD94/NKG2A阳性淋巴细胞的表面上表达的人CD94/NKG2A受体的抑制活



性。在一个实施例中, NKG2A结合剂与HLA-E竞争结合CD94/NKG2A, 即试剂阻断CD94/NKG2A与其配体HLA-E之间的相互作用。在另一个实施例中, 试剂在结合CD94/NKG2A方面不与HLA-E竞争; 即试剂能够与HLA-E同时结合CD94/NKG2A。此类抗体可以结合CD94和NKG2A上的组合表位或单独和NKG2A上的表位结合。

[0279] 一方面, 抗NKG2A试剂是选自完全人抗体、人源化抗体和嵌合抗体的抗体。一方面, 试剂包括衍生自人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗体的恒定结构域。一方面, 试剂是选自IgA、IgD、IgG、IgE和IgM抗体的抗体的片段。一方面, 试剂是选自以下的抗体片段: Fab片段、Fab'片段、Fab'-SH片段、F(ab)2片段、F(ab')2片段、Fv片段、重链Ig(美洲驼或骆驼Ig)、V<sub>H</sub>片段、单结构域FV和单链抗体片段。一方面, 试剂是合成或半合成抗体衍生的分子, 其选自scFV、dsFV、微抗体、双抗体、三抗体、 $\kappa$ 体、IgNAR和多特异性抗体。

[0280] 替代性地, 抗NKG2A抗体没有表现出显著的特异性结合人Fc $\gamma$ 受体, 例如CD16。此类抗体可以包括已知没有或与人Fc受体具有低结合的各种重链的恒定区。一个此类实例是人IgG4恒定区。在一个实施例中, IgG4抗体包括修饰以防止体内形成半抗体(Fab臂交换), 例如, 抗体包括IgG4重链, 所述重链在残基241, 对应于根据EU索引的位置228中包括脯氨酸突变的丝氨酸(Kabat等人, “具有免疫学意义的蛋白质的序列(Sequences of proteins of immunological interest)”, 第5版, NIH, 贝塞斯达, MD, 1991)。此类经过修饰的IgG4抗体将在体内保持完整, 并且保持与NKG2A的二价(高亲和力)结合, 这与天然IgG4在体内进行Fab臂交换而使其以可以改变结合亲和力的单价方式结合NKG2A相反。替代性地, 不包括恒定区的抗体片段, 如Fab或F(ab')2片段, 可以用于避免Fc受体结合。可以根据本领域已知的方法评估Fc受体结合, 包含例如在BIACORE测定中测试抗体与Fc受体蛋白的结合。而且, 可以使用任何人抗体类型(IgG1、IgG2、IgG3或IgG4), 其中Fc部分被修饰, 以最小化或消除与Fc受体的结合(参见, 例如, W003101485, 其公开内容通过引用并入本文)。如例如基于细胞的测定等用于评估Fc受体结合的测定在本领域中是公知的, 并且描述于, 例如W003101485中。

[0281] 因此, 本发明涉及结合NKG2A的抗体或其它试剂。一方面, 抗体以比人NKG2C和/或NKG2E低至少100倍的KD结合NKG2A。

[0282] 在本发明的一方面, 通过例如干扰NKG2A与HLA-E的结合, 预防或诱导CD94/NKG2A受体中的构象性变化和/或影响CD94/NKG2A受体的二聚化和/或聚集, 试剂通过干扰CD94/NKG2A信号传导, 从而降低CD94/NKG2A介导的CD94/NKG2A表达性淋巴细胞的抑制。

[0283] 一方面, 试剂以比NKG2C低至少100倍的KD结合到NKG2A的细胞外部分。在另外优选的方面, 试剂以比NKG2C低至少150倍、200倍、300倍、400倍、或10,000倍的KD结合到NKG2A的细胞外部分。在本发明的另一个方面, 试剂以比NKG2C、NKG2E和/或NKG2H分子低至少100倍的KD结合到NKG2A的细胞外部分。在另外优选的方面, 试剂以比NKG2C、NKG2C和/或NKG2H分子低至少150倍、200倍、300倍、400倍或10,000倍的KD结合到NKG2A的细胞外部分。例如, 这可以在BiaCore实验中进行测量, 在所述实验中, 测量了试剂结合固定的CD94/NKG2A(例如, 从表达CD94/NKG2的细胞中纯化的或在生物系统中产生的)的细胞外部分的能力, 并且在同一测定中, 将试剂与类似产生的CD94/NKG2C和/或其它CD94/NKG2变体的结合进行比较。替代性地, 可以测量试剂与天然表达或过表达(例如在瞬时或稳定转染之后)CD94/NKG2A的细胞的结合, 并且将表达CD94/NKG2C和/或其它CD94/NKG2变体的细胞的结合进行比较。抗NKG2A抗体可以任选地结合NKG2B, 所述NKG2B是与CD94一起形成抑制受体的NKG2A剪接变

体。在一个实施例中,可以使用美国专利第8,206,709号中公开的方法来测量亲和力,例如通过评估Biacore与共价固定的NKG2A-CD94-Fc融合蛋白的结合,如美国专利第8,206,709号的实例8所示,所述专利的公开内容通过引用并入本文。

[0284] 抗NKG2A抗体可以是人源化抗体,例如包括来自人受体序列的VH人受体框架,所述人受体序列选自例如VH1\_18、VH5\_a、VH5\_51、VH1\_f和VH1\_46,以及JH6 J区段或本领域已知的其它人种系VH框架序列。VL区人受体序列可以是例如VKI\_02/JK4。

[0285] 在一个实施例中,抗体是基于抗体Z270的人源化抗体。不同的人源化Z270VH链示出于SEQ ID NO:171-175中(带下划线的可变区结构域残基)。HumZ270VH6 (SEQ ID NO:171) 基于VH5\_51;HumZ270VH1 (SEQ ID NO:172) 基于VH1\_18;humZ270VH5 (SEQ ID NO:173) 基于VH5\_a;humZ270VH7 (SEQ ID NO:174) 基于VH1\_f;并且humZ270VH8 (SEQ ID NO:175) 基于VH1\_46;全部带有JH6 J区段。这些抗体中的每一种均保留与NKG2A的高亲和力结合,针对抗体的宿主免疫应答的可能性较低,因为人源化构建体中的每一个的Kabat CDR-H2的6个C末端氨基酸残基均与人受体框架相同。使用比对程序VectorNTI,获得humZ270VH1与humZ270VH5、-6、-7和-8之间的以下序列同一性:78,2% (VH1与VH5)、79,0% (VH1与VH6)、88,7% (VH1与VH7) 和96,0% (VH1与VH8)。

[0286] 一方面,试剂包括(i) SEQ ID NO:177-181中任一个的重链可变区,或与其至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%或99%相同的氨基酸序列,和(ii) SEQ ID NO:182的轻链可变区,或与其至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%或99%相同的氨基酸序列。一方面,试剂包括(i) 重链和(ii) 轻链,所述重链包括SEQ ID NO:171-175中任一个的氨基酸序列,或与其至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%或99%相同的氨基酸序列,所述轻链包括SEQ ID NO:176的轻链可变区,或与其至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%或99%相同的氨基酸序列。具有SEQ ID NO:171-175中任一个的重链和SEQ ID NO:176的轻链的抗体中和了NKG2A的抑制活性,但是基本上不结合活化受体NKG2C、NKGE或NKG2H。此抗体更进一步与HLA-E竞争结合细胞的表面上的NKG2A。一方面,试剂包括衍生自具有SEQ ID NO:171-175中任一个的氨基酸序列的重链的HCDR1、HCDR2和/或HCDR3序列。在本发明的一方面,试剂包括衍生自具有SEQ ID NO:176的氨基酸序列的轻链的LCDR1、LCDR2和/或LCDR3序列。

[0287] 重链

[0288] VH6:

[0289] EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYSPSFQGQVT  
ISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGGYDFDVGTLYWFFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSES  
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVDKRV  
ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQ  
FNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF  
YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSLGK

[0290] (SEQ ID NO:171)

[0291] VH1:

[0292] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYAQKLQGRV  
TMTTDTSTSTAYMELRSLRSDDTAVYYCARGGYDFDVGTLYWFFDVWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS

ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVD  
KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP  
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTC  
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS  
LSLGK (SEQ ID NO:172)

[0293] VH5:

[0294] EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFTSYWMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYSPSFQGHV  
TISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGGYDFDVGTLYWFFDVGWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS  
ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVD  
KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP  
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTC  
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS  
LSLGK (SEQ ID NO:173)

[0295] VH7:

[0296] EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTSYWMNWVQQAPGKGLEWMGRIDPYDSETHYAEKFQGRV  
TITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCATGGYDFDVGTLYWFFDVGWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS  
ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVD  
KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP  
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTC  
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS  
LSLGK (SEQ ID NO:174)

[0297] VH8:

[0298] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYAKKFQGRV  
TMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARGGYDFDVGTLYWFFDVGWGQGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS  
ESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTKVD  
KRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKP  
REEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLTC  
LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLS  
SLGK (SEQ ID NO:175)

[0299] 轻链

[0300] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKAPKLLIYNAKTLAEGVPSRFSGSGSG  
TDFTLTISSLQPEDFATYYCQHHYGTPTFTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNFPYPREA  
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC (SEQ  
ID NO:176)

[0301] 重链可变区

[0302] VH6:

[0303] EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYSPSFQGGVT  
ISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGGYDFDVGTLYWFFDVGWGQGTTVTVS

[0304] (SEQ ID NO:177)

[0305] VH1:

[0306] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYAQKLQGRV  
TMTTDTSTSTAYMELRSLRSDTAVYYCARGGYDFDVGTLTYWFFDVWGQGTTVTVS (SEQ ID NO:178)

[0307] VH5:

[0308] EVQLVQSGAEVKKPGESLRISCKGSGYSFTSYWMNWVRQMPGKGLEWMGRIDPYDSETHYSPSFQGHV  
TISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGGYDFDVGTLTYWFFDVWGQGTTVTVS (SEQ ID NO:179)

[0309] VH7:

[0310] EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTSYWMNWVQQAPGKGLEWMGRIDPYDSETHYAEKFQGRV  
TITADTSTDTAYMELSSLRSEDVAVYYCATGGYDFDVGTLTYWFFDVWGQGTTVTVS (SEQ ID NO:180)

[0311] VH8:

[0312] QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYWMNWVRQAPGQGLEWMGRIDPYDSETHYAQKFQGRVT  
MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCARGGYDFDVGTLTYWFFDVWGQGTTVTVS

[0313] (SEQ ID NO:181)

[0314] 轻链可变区

[0315] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASENIYSYLAWYQQKPGKAPKLLIYNKTLAEGVPSRFSGS GS  
GTDFTLTISSLQPEDFATYYCQHHYGTPTFTGGGTKVEIK (SEQ ID NO:182)

[0316] 一方面,抗NKG2A抗体是包括对应于SEQ ID NO:171-175的残基31-35的CDR-H1,对应于SEQ ID NO:171-175的残基50-60的CDR-H2 (任选地当包含人种起源的氨基酸时50-66) 和对应于SEQ ID NO:171-175的残基99-114 (根据Kabat的95-102) 的CDR-H3的抗体。在一个实施例中,CDR-H2对应于SEQ ID NO:171-175的残基50-66。任选地,CDR可以包括一个、两个、三个、四个或更多个氨基酸取代。

[0317] 一方面,抗NKG2A抗体是包括对应于SEQ ID NO:176的残基24-34的CDR-L1,对应于SEQ ID NO:176的残基50-56的CDR-L2和对应于SEQ ID NO:176的残基89-97的CDR-L3的抗体。任选地,CDR可以包括一个、两个、三个、四个或更多个氨基酸取代。

[0318] 一方面,抗NKG2A抗体是包括对应于SEQ ID NO:171-175的残基31-35的CDR-H1,对应于SEQ ID NO:171-175的残基50-60 (任选地50-66) 的CDR-H2和对应于SEQ ID NO:171-175的残基99-114 (根据Kabat的95-102) 的CDR-H3,对应于SEQ ID NO:176的残基24-34的CDR-L1,对应于SEQ ID NO:176的残基50-56的CDR-L2和对应于SEQ ID NO:176的残基89-97的CDR-L3的抗体。

[0319] 一方面,试剂包括衍生自具有SEQ ID NO:183的氨基酸序列的VH的HCDR1、HCDR2和/或HCDR3序列。在本发明的一方面,试剂包括衍生自具有SEQ ID NO:184的氨基酸序列的VL的LCDR1、LCDR2和/或LCDR3序列。一方面,试剂包括衍生自具有SEQ ID NO:183的氨基酸序列的VH的HCDR1、HCDR2和/或HCDR3序列,以及衍生自具有SEQ ID NO:184的氨基酸序列的VL的LCDR1、LCDR2和/或LCDR3序列。具有SEQ ID NO:183的重链和SEQ ID NO:184的轻链的抗体中和NKG2A的抑制活性,并且还结合活化受体NKG2C、NKG2E或NKG2H。抗体不与HLA-E竞争结合细胞的表面上的NKG2A (即,它是NKG2A的非竞争性拮抗剂)。

[0320] EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSYAMSWVRQSPEKRLEWVAEISSGGSYTYYPDTVTGRF  
TISRDNKNTLYLEISSLRSEDVAVYYCTRHDYPRFFDVWGAGTTVTVSS (SEQ ID NO:183)。

[0321] QIVLTQSPALMSASPGEKVTMTCSASSSVSYIYWYQQKPRSSPKWIYLTSLASGVPARFSGSGSGTS

YSLTISSMEAEDAATYYCQQWSGNPYTFGGGTKLEIK

[0322] (SEQ ID NO:184)。

[0323] 一方面,试剂包括可变重(V<sub>H</sub>)结构域(SEQ ID NO:183)的氨基酸残基31-35、50-60、62、64、66和99-108以及可变轻(V<sub>L</sub>)结构域(SEQ ID NO:184)的氨基酸残基24-33、49-55和88-96,任选地具有一个、两个、三个、四个或更多个氨基酸取代。

[0324] 一方面,试剂是针对上述抗体中的任一个结合的CD94/NKG2A表位的完整人抗体。

[0325] 一方面,试剂是具有SEQ ID NO:178的重链可变区和SEQ ID NO:182的轻链可变区的抗NKG2A抗体,或具有SEQ ID NO:172的重链和SEQ ID NO:176的轻链的抗体。例如,试剂可以是莫纳珠单抗(Innate Pharma SA, Medimmune和AstraZeneca)。

[0326] 可以理解,尽管可以使用前述抗体,但是其它抗体可以识别并且针对NKG2A多肽的任何部分产生抗体,只要抗体引起NKG2A的抑制活性的中和即可。例如,NKG2A,优选地但是非排他地人NKG2A的片段,或NKG2A片段的任何组合可以用作产生抗体的免疫原,并且抗体可以识别NKG2A多肽内任何位置处的表位,只要它们可以如本文所述对表达NKG2A的NK细胞进行此操作。任选地,表位是被具有SEQ ID NO:171-175中任一个的重链和SEQ ID NO:176的轻链的抗体特异性识别的表位。

[0327] 一方面,试剂与美国专利第8,206,709号(其公开内容通过引用并入本文)中公开的humZ270抗体竞争结合人CD94/NKG2A受体的细胞外部分。竞争性结合可以例如在BiaCore实验中进行测量,在所述实验中,测量了试剂结合用humZ270饱和的固定的CD94/NKG2A受体(例如,从表达CD94/NKG2的细胞中纯化的或在生物系统中产生的)的细胞外部分的能力。替代性地,测量试剂与细胞的结合,所述细胞天然表达或过表达(例如在瞬时或稳定转染之后)CD94/NKG2A受体,并且已经与饱和剂量的Z270预温育。在一个实施例中,可以使用美国专利第8,206,709号中公开的方法来测量竞争性结合,例如通过如美国专利第8,206,709号的实例15中所示的流式细胞术评估与Ba/F3-CD94-NKG2A细胞的结合,所述专利的公开内容通过引用并入本文。

[0328] 抗体调配物

[0329] 抗体可以掺入药物调配物中,所述药物调配物包括1mg/ml到500mg/ml的浓度,其中所述调配物的pH为2.0到10.0。调配物可以进一步包括缓冲系统、一种或多种防腐剂、一种或多种张力剂、一种或多种螯合剂、稳定剂和表面活性剂。在一个实施例中,药物调配物是含水调配物,即包括水的调配物。此类调配物通常是溶液或悬浮液。在另外的实施例中,药物调配物是水溶液。术语“含水调配物”定义为包括至少50%w/w水的调配物。同样,术语“水溶液”定义为包括至少50%w/w水的溶液,并且术语“水性悬浮液”定义为包括至少50%w/w水的悬浮液。

[0330] 在另一个实施例中,药物调配物是冻干调配物,医师或患者在使用之前加入溶剂和/或稀释剂。

[0331] 在另一个实施例中,药物调配物是干燥调配物(例如,冷冻干燥或喷雾干燥),无需任何预先溶解即可使用。

[0332] 另一方面,药物调配物包括此类抗体的水溶液和缓冲液,其中抗体以1mg/ml或更高的浓度存在,并且其中所述调配物的pH为约2.0到约10.0。

[0333] 在另一个实施例中,调配物的pH处于选自由以下组成的列表的范围内:约2.0到约

10.0、约3.0到约9.0、约4.0到约8.5、约5.0到约8.0、和约5.5到约7.5。

[0334] 在另外的实施例中,缓冲剂选自由以下组成的组:乙酸钠、碳酸钠、柠檬酸盐、甘氨酸、组氨酸、赖氨酸、精氨酸、磷酸二氢钠、磷酸氢二钠、磷酸钠和三(羟甲基)-氨基甲烷、二羟乙甘氨酸、三甲基甘氨酸、羟基丁二酸、琥珀酸、马来酸、富马酸、酒石酸、天冬氨酸或其混合物。这些特定缓冲液中的每一种构成本发明的替代性实施例。

[0335] 在另外的实施例中,调配物进一步包括药学上可接受的防腐剂。在另外的实施例中,调配物进一步包括等渗剂。在另外的实施例中,调配物还包括螯合剂。在本发明的另外的实施例中,调配物进一步包括稳定剂。在另外的实施例中,调配物进一步包括表面活性剂。为方便起见,参考《雷明顿:药学技术与实践(Remington:The Science and Practice of Pharmacy)》,第19版,1995。

[0336] 本发明的肽药物调配物中可能存在其它成分。此类附加成分可以包含润湿剂、乳化剂、抗氧化剂、填充剂、张力调节剂、螯合剂、金属离子、油质媒剂、蛋白质(例如人血清白蛋白、明胶或蛋白质)和两性离子(例如氨基酸,如甜菜碱、牛磺酸、精氨酸、甘氨酸、赖氨酸和组氨酸)。当然,此类额外的成分不应对本发明的药物调配物的总体稳定性产生不利影响。

[0337] 含有根据本发明的抗体的药物组合物可以在几个部位施用于需要此类治疗的患者,例如,在局部部位,例如皮肤和粘膜部位,在旁路吸收的部位,例如,在动脉中、静脉中、心脏和涉及吸收的部位施用,例如,在皮肤、皮下、肌肉或腹部施用。根据本发明的药物组合物的施用可以通过几种施用途径,例如皮下、肌肉内、腹膜内、静脉内、舌、舌下、口腔、口中、口服、胃和肠、鼻、肺,例如,通过细支气管和肺泡或其组合,表皮、真皮、透皮、阴道、直肠、眼,例如通过结膜、尿道和肠胃外给需要此类治疗的患者。

[0338] 也可以通过检查其它已经开发的治疗性单克隆抗体的经验确定合适的抗体调配物。已经证明几种单克隆抗体在临床情况下是有效的,如美罗华(利妥昔单抗)、赫赛汀(曲妥珠单抗)、索雷尔(奥马珠单抗)、百克沙(托西莫单抗)、坎帕斯(阿仑单抗)、泽娃灵、Oncolym和类似的调配物可以与本发明的抗体一起使用。例如,可以在100mg (10mL) 或500mg (50mL) 一次性小瓶中以10mg/mL的浓度供应单克隆抗体,调配用于在9.0mg/mL氯化钠、7.35mg/mL柠檬酸钠二水合物、0.7mg/mL聚山梨醇酯80和无菌注射用水中IV施用。将pH调节到6.5。在另一个实施例中,以包括约20mM柠檬酸钠、约150mM NaCl的调配物供应抗体,pH为约6.0。

[0339] 还提供了试剂盒,其包含含有适用于前述方法中的有效量的抗NKG2A抗体和抗Siglec-9(任选地另外的抗Siglec-7)抗体以及药学上可接受的载剂的药物组合物。试剂盒任选地还可以包含说明书,例如包括施用方案,以允许从业者(例如医师、护士或患者)施用其中含有的组合物,以向患有癌症(例如实体瘤)的患者施用组合物。试剂盒还可以包含注射器。

[0340] 任选地,试剂盒包含多个包装的单剂量药物组合物,每个包装含有有效量的抗NKG2A和/或抗Siglec-9抗体,用于根据上述提供的方法进行单次施用。试剂盒中还可以包含施用一种或多种药物组合物所必需的仪器或装置。例如,试剂盒可以提供一个或多个预先填充的注射器,其含有一定量的抗NKG2A、抗Siglec-9抗体。

[0341] 在一个实施例中,本发明提供了一种用于治疗人类患者的癌症的试剂盒,试剂盒

包括：

[0342] (a) 一定剂量的抗Siglec-9抗体，所述抗体包括mAbA、mAbB、mAbC、mAbD、mAbE、mAbF、mAb1、mAb2、mAb3、mAb4、mAb5或mAb6中任一个的重链的CDR1、CDR2和CDR3结构域；以及相应的mAbA、mAbB、mAbC、mAbD、mAbE、mAbF、mAb1、mAb2、mAb3、mAb4、mAb5或mAb6的轻链的CDR1、CDR2和CDR3结构域；

[0343] (b) 一定剂量的NKG2A抗体；和

[0344] (c) 任选地，在本文所述的方法中的任一种中，使用抗NKG2A抗体和抗Siglec-9抗体的说明书。

[0345] 在一个实施例中，本发明提供了一种用于治疗人类患者的癌症的试剂盒，试剂盒包括：

[0346] (a) 一定剂量的抗NKG2A抗体，其包括具有本文列出的序列的重链的CDR1、CDR2和CDR3结构域，以及具有本文列出的序列的轻链的CDR1、CDR2和CDR3结构域；

[0347] (b) 一定剂量的Siglec-9抗体；和

[0348] (c) 任选地，在本文所述的方法中的任一种中，使用抗NKG2A抗体和抗Siglec-9抗体的说明书。

[0349] 恶性肿瘤的诊断和治疗

[0350] 还提供了通过抑制Siglec-9和NKG2A（例如，使用如本文所述的抗Siglec抗体和抗NKG2A抗体）来治疗个体，特别是人类患者的方法。在一个实施例中，本发明提供了如本文所述的抗体或抗体片段在制备用于施用于人类患者的药物组合物中的用途。通常，患者患有癌症或传染病，例如，细菌性疾病或病毒性疾病或具有其风险。

[0351] 例如，一方面，本发明提供了一种增强有需要的患者中个体（例如患有癌症或传染病）的Siglec-7和/或-9限制的免疫细胞的活性的方法，其包括向所述个体施用(i) 中和性抗Siglec-7和/或-9抗体和(ii) NKG2A中和性抗体的步骤。抗体可以是例如人或人源化的抗Siglec-7和/或-9抗体，所述抗体减少或阻止唾液酸介导的Siglec-7和/或-9受体的活化。在一个实施例中，方法涉及增加患有其中增加的淋巴细胞（例如NK和/或CD8+T细胞）活性是有益的疾病的患者中此类淋巴细胞的活性，其涉及、影响或由易由NK或CD8+T细胞裂解的细胞引起，或由NK或CD8+T细胞活性不足引起或表征，如癌症或传染病。例如，一方面，本发明提供了一种增强有需要的患者中Siglec-7和/或-9限制的免疫细胞，例如NK细胞（例如CD56<sup>明亮</sup>细胞）、T细胞、单核细胞、树突细胞、巨噬细胞（例如免疫抑制或M2巨噬细胞）的活性（例如细胞活化、抗肿瘤免疫或活性、细胞因子产生、增殖）的方法，其包括向所述患者施用本公开的中性抗Siglec-7和/或-9抗体的步骤。

[0352] 在一个实施例中，本公开的抗体用于治疗由表达ST3GAL6和/或ST3GAL1酶（或例如高水平的ST3GAL6和/或ST3GAL1酶活性），任选地过表达ST3GAL6酶（与在健康个体中的例如健康组织中的表达相比）表征的肿瘤。

[0353] 更具体地说，本文的方法和组合物用于治疗多种癌症和其它增殖性疾病。因为这些方法通过阻断淋巴细胞上的抑制性受体来增强免疫反应，因此适用于非常广泛的癌症。在一个实施例中，用本公开的抗Siglec抗体治疗的人患者患有肝癌、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、头颈癌（例如头颈部鳞状细胞癌）、乳腺癌、肺癌、非小细胞肺癌（NSCLC）、去势抵抗性前列腺癌（CRPC）、黑色素瘤、子宫癌、结肠癌、直肠癌、肛门癌、胃癌、睾丸癌、子宫癌、输卵管癌、子

宫内膜癌、子宫颈癌、阴道癌、外阴癌、非霍奇金氏淋巴瘤、食管癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、儿童实体瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾癌或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统肿瘤 (CNS)、原发性CNS淋巴瘤、肿瘤血管生成、脊髓轴肿瘤、脑干胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西氏肉瘤、表皮样癌、鳞状细胞癌、环境诱发的癌症,包含由石棉诱发的那些癌症,血液学恶性肿瘤,包含例如多发性骨髓瘤、B细胞淋巴瘤、霍奇金氏淋巴瘤/原发性纵隔B细胞淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、急性髓性淋巴瘤、慢性髓性白血病、慢性淋巴细胞白血病、滤泡性淋巴瘤、弥漫性大B细胞淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、免疫母细胞性大细胞淋巴瘤、前体B淋巴母细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病、蕈样真菌病、间变性大细胞淋巴瘤、T细胞淋巴瘤和前体T淋巴母细胞淋巴瘤、以及所述癌症的任何组合。本发明还适用于转移性癌症的治疗。可以在治疗之前、期间或之后,测试或选择患者的上述临床属性中的一种或多种。

[0354] 基于抗Siglec抗体的治疗也可以用于治疗或预防传染病,优选地包含由病毒、细菌、原生动物、霉菌或真菌感染引起的任何感染。此类病毒感染生物包含但不限于甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、流感、水痘、腺病毒、单纯疱疹I型 (HSV-1)、单纯疱疹2型 (HSV-2)、牛瘟、鼻病毒、回声病毒、轮状病毒、呼吸道合胞病毒、乳头瘤病毒、乳头瘤病毒、巨细胞病毒、棘皮病毒、虫媒病毒、亨达病毒、柯萨奇病毒、腮腺炎病毒、麻疹病毒、风疹病毒、脊髓灰质炎病毒和人类I型或2型免疫缺陷病毒 (HIV-1、HIV-2)。细菌构成另一类优选的传染性生物,包含但不限于以下:葡萄球菌;链球菌,包含化脓性链球菌;肠球菌;芽孢杆菌,包含炭疽芽孢杆菌和乳杆菌;李斯特菌;白喉杆菌;加氏菌,包含阴道加氏菌;诺卡氏菌;链霉菌;寻常热放线菌;Treponema;弯曲杆菌,假单胞菌,包含铜绿假单胞菌;军团菌;奈瑟菌,包含淋病奈瑟菌和脑膜炎奈瑟菌;黄杆菌,包含F.脑膜炎和F.odoratum;布鲁切拉;博德特氏菌,包含百日咳杆菌和支气管败血杆菌;大肠杆菌,包含大肠杆菌,克雷伯菌;肠杆菌,沙雷氏菌,包含S.marcescens和S.liquefaciens;爱德华氏菌;变形杆菌,包含奇异假单胞菌和寻常假单胞菌;链球菌;立克次体,包含R.ficketttsfi,衣原体,包含C.psittaci和C.trachomatis;分枝杆菌,包含结核分枝杆菌,胞内分枝杆菌,folluiturn分枝杆菌,拉普拉分枝杆菌,鸟分枝杆菌,牛分枝杆菌,非洲分枝杆菌,堪萨斯分枝杆菌,胞内分枝杆菌和麻风分枝杆菌;和诺卡氏菌。原生动物可以包含但不限于利什曼原虫、科奇齐亚虫和锥虫。寄生虫包含但不限于衣原体和立克次体。

[0355] 抗体组合物可以用于治疗个体,无论由个体表达的等位基因中Siglec-9中的位置100 (参考SEQ ID NO:2) 或Siglec-7中的位置104 (参考SEQ ID NO:1) 处存在的残基如何。在位置100处带有赖氨酸的Siglec-9 (例如SEQ ID NO:2) 代表约49%的群体,而在位置100处带有谷氨酸的Siglec-9 (例如SEQ ID NO:160) 代表约36%的群体。在一个实施例中,抗体组合物用于治疗在Siglec-9中的位置100处具有赖氨酸的个体 (参考SEQ ID NO:2) 和在Siglec-9中的位置100处具有谷氨酸的个体。在一个实施例中,相同的施用方案用于治疗其细胞 (例如NK细胞、嗜中性粒细胞等) 在Siglec-9中的位置100处表达赖氨酸的个体 (参考SEQ ID NO:2) 和其细胞在Siglec-9中的位置100处表达谷氨酸的个体。在一个实施例中,施用方案包括相同的施用方式、相同的剂量和相同的施用频率,而与个体中表达的Siglec-7和/或-9的特定等位基因无关。

[0356] 抗体组合物可以与一种或多种其它另外的治疗剂一起用于联合治疗中,包含通常



用于施用抗体的特定治疗目的的试剂。另外的治疗剂通常以针对所治疗的特定疾病或病症的单一疗法中通常用于所述试剂的量和治疗方案施用。此类治疗剂包含但不限于抗癌剂和化学治疗剂。

[0357] 在治疗方法中,抗Siglec-9试剂和NKG2A-中和性试剂可以分开、一起或依次施用、或以混合物形式施用。在一些实施例中,在施用NKG2A-中和性试剂之前施用抗原结合化合物。例如,可以在施用NKG2A-中和性试剂之前约0天到30天施用抗Siglec-9试剂。在一些实施例中,在施用NKG2A-中和性试剂之前约30分钟到约2周、约30分钟到约1周、约1小时到约2小时、约2小时到约4小时、约4小时到约6小时、约6小时到约8小时、约8小时到1天、或约1天到5天,施用抗Siglec-9试剂。在一些实施例中,抗Siglec-9试剂与治疗剂的施用并列施用。在一些实施例中,在施用NKG2A-中和性试剂之后,施用抗Siglec-9试剂。例如,可以在施用NKG2A-中和性试剂之后约0天到30天施用抗Siglec-9试剂。在一些实施例中,在施用NKG2A-中和性试剂之后约30分钟到约2周、约30分钟到约1周、约1小时到约2小时、约2小时到约4小时、约4小时到约6小时、约6小时到约8小时、约8小时到1天、或约1天到5天,施用抗Siglec-9试剂。

[0358] 在其它方面,提供了用于识别Siglec-7+和/或Siglec-9+NK细胞和/或T细胞,例如CD8<sup>+</sup> T细胞、CD56<sup>明亮</sup> NK细胞、CD56<sup>暗炎</sup> NK细胞的方法,任选地在每种情况下,其中细胞是NKG2A表达性细胞。评估NK细胞和/或T细胞上Siglec-7和/或Siglec-9的共表达可以用于诊断或预后方法中。例如,可以从个体(例如,从血液样品,从癌症患者获得的癌症或癌症邻近组织)获得生物学样品,并且分析Siglec-7和/或Siglec-9+NK和/或T细胞的存在。Siglec-9在此类细胞上的表达可以例如用于识别具有NK和/或T细胞的个体,例如被Siglec-9多肽抑制的肿瘤浸润性NK和/或T细胞,任选地NKG2A表达性细胞。Siglec-7和Siglec-9两者在此类细胞上的表达可以例如用于识别具有NK和/或T细胞的个体,例如被Siglec多肽和NKG2A多肽两者抑制的肿瘤浸润性NK和/或T细胞。方法例如可以用作对用中和Siglec-9的试剂和中和NKG2A的试剂进行的治疗的反应的预后。Siglec-9(和任选地另外的NKG2A)在此类细胞上的表达可以指示适合用本公开的抗体治疗的个体。

[0359] 在某些方面,提供了增强和/或调节有需要的受试者中淋巴细胞(例如,NK细胞、CD8<sup>+</sup> T细胞)活性的活性的方法,例如通过调节CD56<sup>暗炎</sup> NK细胞(主要的细胞毒性亚群)和任选地另外的CD56<sup>明亮</sup> NK细胞(淋巴结和扁桃体中的大部分NK细胞,并且在活化后,主要对细胞因子产生反应)来增强NK细胞活性的方法,所述方法包括向受试者施用有效量的如本文所述的抗Siglec-9试剂和NKG2A中和性试剂。在一个实施例中,受试者是患有癌症的患者。例如,患者可能患有造血系统癌症,例如急性髓性白血病、慢性髓性白血病、多发性骨髓瘤或非霍奇金氏淋巴瘤。替代性地,患者可能患有实体瘤,例如结肠直肠癌、头颈癌、肾癌、卵巢癌、肺癌、乳腺癌或恶性黑素瘤。在另一个实施例中,受试者是患有传染病的患者。

[0360] 在某些任选的方面,通过评估来自个体的肿瘤样品中HLA-E的存在(例如肿瘤组织和/或肿瘤邻近组织),任选地进一步评估Siglec-9(和任选地另外的Siglec-7)的配体的存在,可以将个体识别为用NKG2A中和性试剂和Siglec-9-(任选地另外的Siglec-7-)中和性试剂治疗。

[0361] 在某些任选的方面,通过评估来自个体的肿瘤样品(例如肿瘤组织和/或肿瘤邻近组织)中Siglec-9的存在(例如在肿瘤环境中髓样来源的树突细胞和/或嗜中性粒细胞上),

可以将个体识别为用NKG2A中和性试剂和Siglec-9- (任选地另外的Siglec-7-) 中和性试剂治疗。在某些任选的方面,通过评估来自个体的肿瘤样品 (例如肿瘤组织和/或肿瘤邻近组织) 中Siglec-7的存在 (例如在肿瘤环境中例如在髓样来源的树突细胞和/或嗜中性粒细胞上), 可以将个体识别为用NKG2A中和性试剂和Siglec-7-和Siglec-9-中和性试剂治疗。

[0362] 在某些任选的方面,通过评估来自个体的肿瘤样品 (例如肿瘤组织和/或肿瘤邻近组织) 中HLA-E的存在 (例如在肿瘤细胞上) 和任选地另外的Siglec-9和/或Siglec-7的存在 (例如在肿瘤环境中例如在髓样来源的树突细胞和/或嗜中性粒细胞上), 可以将个体识别为用NKG2A中和性试剂和Siglec-9- (任选地另外的Siglec-7-) 中和性试剂治疗。

[0363] 在本文的治疗用途或癌症治疗或预防方法中的任一个的一个实施例中,个体中癌症的治疗或预防包括:

[0364] a) 确定来自患有癌症的个体的肿瘤组织或肿瘤邻近组织中的免疫细胞 (例如髓样来源的树突细胞、嗜中性粒细胞、NK细胞、T细胞) 的Siglec-7和/或Siglec-9多肽状态, 以及

[0365] b) 在确定Siglec-7和/或Siglec-9多肽由来自个体的肿瘤组织或肿瘤邻近组织中的细胞 (例如,在其表面上) 表达时,向所述个体施用中和人NKG2A多肽的抑制活性的试剂和抑制人Siglec-9 (以及任选地另外的Siglec-7) 多肽的试剂。

[0366] 在一个实施例中,确定生物学样品 (例如,包括肿瘤细胞、肿瘤组织和/或肿瘤邻近组织的样品) 显著表达HLA-E多肽 (如通过评估HLA-E核酸或多肽来评估) 表明个体患有可以用抑制NKG2A的试剂与抑制人Siglec-9 (和任选地另外的Siglec-7) 多肽的试剂组合治疗的癌症。

[0367] 在本文的治疗用途或癌症治疗或预防方法中的任一个的一个实施例中,个体中癌症的治疗或预防包括:

[0368] a) 确定患有癌症的所述个体中的恶性细胞的HLA-E多肽状态, 以及

[0369] b) 在确定HLA-E多肽由恶性细胞 (例如肿瘤细胞) (例如在其表面上) 表达后,向所述个体施用中和人NKG2A多肽的抑制活性的试剂和抑制人Siglec-9 (以及任选地另外的Siglec-7) 多肽的试剂。

[0370] 在方法中的任一种的一个实施例中,在步骤(a) 中确定HLA-E多肽状态或确定表达的水平包括确定生物学样品中恶性细胞的HLA-E核酸或多肽的表达水平,并且将水平与参考水平 (例如,值、弱或强的细胞表面染色等) 进行比较。参考水平可以,例如,对应于健康个体,对应于从用NKG2A中和性抗体 (任选地与抑制人Siglec-9多肽的试剂组合) 的治疗中未获得/获得低临床益处的个体,或对应于从用NKG2A中和性抗体 (任选地与抑制人Siglec-9多肽的试剂组合) 的治疗中获得实质性临床益处的个体。确定生物学样品以升高的水平 (例如,高值、强表面染色、对应于从用NKG2A中和性抗体的治疗中获得实质性临床益处的个体的水平,高于对应于从用NKG2A中和性抗体的治疗中未获得/获得低临床益处的个体的水平等) 表达HLA-E核酸或多肽表明个体患有可以用抗NKG2A抗体与抑制人Siglec-9多肽的试剂组合治疗的癌症,例如根据本文所述的治疗方法。

[0371] 在一个实施例中,提供了一种用于识别患有癌症的个体的方法,所述个体适合用抗NKG2A试剂治疗,所述方法包括:

[0372] a) 确定来自个体的肿瘤浸润淋巴细胞 (例如NK细胞) 的NKG2A和Siglec-9多肽状态,和

[0373] b) 其中确定NKG2A和Siglec-9多肽在来自个体的显著比例的肿瘤浸润淋巴细胞(例如NK细胞)的表面上,任选地预定子群(例如CD8<sup>+</sup> T细胞、NK细胞)的TIL表达表明用中和人NKG2A多肽的抑制活性的试剂和抑制人Siglec-9多肽的试剂进行治疗适合个体。

[0374] 实例

[0375] 实例1:共表达Siglec-7和Siglec-9两者的人NK细胞亚群

[0376] 在CD33相关的Siglec中,Siglec-7 (CD328) 和Siglec-9 (CD329) 共有与唾液酸结合的特性,包含由癌细胞过表达的聚糖,并且被认为在表达它们的免疫细胞中起抑制性受体的作用。为了研究Siglec在淋巴细胞上的表达,研究了Siglec-7和Siglec-9在人NK细胞上的分布。

[0377] 通过流式细胞术,在从人类供体纯化的新鲜NK细胞上确定NK细胞上的Siglec-7和Siglec-9表达。NK群体被确定为CD3-CD56<sup>+</sup>细胞(抗CD3太平洋蓝-BD Pharmingen#558124;抗CD56-PE-Vio770-Milteny#130 100 676)。使用了抗Siglec-7抗体(克隆194211-IgG1 APC-R&D Systems#FAB11381A)、抗Siglec-9抗体(克隆191240-IgG2A PE-R&D Systems#FAB1139P)和同种型对照IgG1 APC和IgG2A APC。将NK细胞与50ul染色Ab混合物一起温育30分钟,用染色缓冲液洗涤两次,并且用Canto II (HTS) 显示荧光。

[0378] 结果示出在图1中。示出了代表性的结果.MFI:荧光强度的平均值。很大一部分(约44%)NK细胞表达Siglec-7和Siglec-9两者,表明很大比例的NK细胞可以被这些受体中的每一个(或两者)抑制,作为存在于例如肿瘤细胞上的聚糖配体的函数。

[0379] 实例2:抗Siglec抗体的产生

[0380] 为了获得抗人Siglec-7和Siglec-9抗体,用人Siglec-7 Fc和人Siglec-9 Fc细胞外结构域重组蛋白免疫Balb/c小鼠。进行了两种不同的免疫。

[0381] 在用Siglec-7 Fc和Siglec-9 Fc蛋白进行的首次免疫中,小鼠腹膜内接收了2注射剂30μg每种蛋白质的乳液和完全弗氏佐剂。然后,对小鼠静脉注射7.5μg每种蛋白质的加强免疫。进行了两种不同的融合(融合1和2)。免疫脾细胞在与X63.Ag8.653永生化B细胞促进之后3天融合,并且在照射脾细胞的存在下培养。将杂交瘤铺在含有半固体甲基纤维素的培养基中,并且使用clonepix 2设备(分子装置)挑取生长的克隆。

[0382] 再次用Siglec-7 Fc和Siglec-9 Fc蛋白进行第二次免疫。小鼠腹膜内接收了3注射剂30μg每种蛋白质的乳液和完全弗氏佐剂。然后,对小鼠静脉注射5μg每种蛋白质的加强免疫。进行了三种不同的融合(融合3、4和5)。免疫脾细胞在与X63.Ag8.653永生化B细胞促进之后3天融合,并且在照射脾细胞的存在下培养。将杂交瘤铺在P96中的培养基中。在CHO细胞中产生用于此免疫(以及在下文的实例中)的Siglec-7 Fc和Siglec-9 Fc蛋白。Siglec-7 Fc蛋白具有以下氨基酸序列:

[0383] QKSNRKDYSLTMQSSVTVQEGMCVHVRCFSYPVDSQTDSDPVHGYWFRAGNDISWKAPVATNNPAWAVQEETDRFRHLLGDPQTKNCTLSIRDARMSDAGRYFFRMEKGNIKWNYKYDQLSVNVTALTHRPNILIPGTLESGCFQNLTCSPWACEQGTPPMISWMGTSVSPLHPSTTRSSVLTLPQPQHHGTS LTCQVTLPAGVTTNRTIQLNVSYPQNLTVTVFQGGEGTASTALGNSSSLSVLEGQSLRLVCAVDSNPPARLSWTWRSLTLYPSQPSNPLVLELQVHLGDEGEFTCRAQNSLGSHVSLNLSLQQEYTGKMRPVSGVLLGAVGGGGSSPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTP

VLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:164)。

[0384] Siglec-9 Fc蛋白具有以下氨基酸序列:

[0385] QTSKLLTMQSSVTVQEGLCVHVPCSFSPSHGWIYPGPVVHGYWFREGANTDQDAPVATNNPARAVWE  
ETDRDFHLLGDPHTKNCTLSIRDARRSDAGRYFFRMEKGSIKWNYKHHRLSVNVTALTHRPNILIPGTLESGCPQN  
LTCSVPWACEQGTTPMISWIGTSVSPLDPSTTRSSVLTLIPQPQDHGTS LTCQVTFPGASVTTNKT VHLNVSYP PQ  
NLTMTVFQGDGT VSTVLGNGSSLSLPEGQSLRLVCAVDAVDSNPPARLSLSWRGLTLCPSQPSNPGVLELPWVHLR  
DAAEFTCRAQNPLGSQQVYLVNLSLQSKATSGVTQGGGGSSPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM  
ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKAL  
PAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF  
FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:165)。

[0386] 初次筛选:使用亲代和huSiglec-7、huSiglec-9和cynoSiglec表达性CHO细胞系,通过流式细胞术,在初次筛选中测试两种免疫的生长克隆的上清液(SN)。将HuSiglec-7、-和cynoSiglec表达性CHO分别用0.5μM和0.05μM CFSE染色。对于流式细胞术筛选,所有细胞均匀混合,并且用alexa fluor 647标记的山羊抗小鼠多克隆抗体(pAb)揭示上清液中反应抗体的存在。

[0387] 结果:在分别结合融合物1、2和3/4/5中的人Siglec-7和/或Siglec-9和/或Siglec-cyno的相应融合物中,选择了20种、19种和多于80种抗体。克隆了来自3种不同融合物中的不同交叉反应性抗Siglec-7、Siglec-9和Siglec-Cyno抗体以及抗Siglec-9抗体(不结合Siglec-7),并且生产了具有重链N297Q(Kabat EU编号)的嵌合人IgG1抗体突变,导致缺少N-联糖基化,并且减少与Fcγ受体的结合。

[0388] 图2示出了例如抗体结合Siglec-7但是不结合Siglec-9或猕猴Siglec(右图),结合Siglec-7、Siglec-9和猕猴Siglec中的每一个(中图),以及结合Siglec-9,但是不结合Siglec-7或猕猴Siglec(左图)的流式细胞术的代表性结果。

[0389] 表1:Siglec序列

[0390]

名称	NCBI 参考序列	序列 (AA)
人 Siglec-7	NM_014385.3; NP_055200.1	QKSNRKDYSLTMQSSVTVQEGMCMVHVRCSFSYPVDSQTDSDPVHGYWFRAGNDISWKAPVATNNPAWAVQEETDRDRFHLLGDPQTKNCTLSIRDARMSDAGRYFFRMEKGNKWNKYDQLSVNVTALTHRPNILIPGTLESGCFQNLTCVWPWACEQGTTPMISWMGTSSVPLHPSTTRSSVLTLPQPQHHTSLTCQVTLPAGAVTTNRTIQLNVSYPPQNLTVTVFQGEGETASTALGNSSSLSVLEGQSLRLVCAVDSNPPARLSWTWRSRLTLYPSQPSNPLVLELQVHLGDEGEFTCRAQNSLGSQHVSLNLSLQQEYTGKMRPVSGVLLGAVGGAGATALVFLSFCVIFIVVRSCRKKSARPAADVGDIGMKDANTIRGSASQGNLTESWADDNPRHHGLAAHSSGEEREIQYAPLSFHKGEPPQDLGSGQEATNNEYSEIKIPK (SEQ ID NO: 150)
人 Siglec-9	NM_014441.2; NP_055256.1	QTSKLLTMQSSVTVQEGLCVHVPCSFSYPSHGWYIPGPVVHGYWFEREGANTDQDAPVATNNPARAVWEETDRDRFHLLGDPHTKNCTLSIRDARRSDAGRYFFRMEKGSIKWNKYKHHRLSVNVTALTHRPNILIPGTLESGCPQNLTCVWPWACEQGTTPMISWIGTSSVPLDPSTTRSSVLTLPQPQDHGTSLTCQVTFPGASVTTNKTVHLNVSYPPQNLTMTVFQGDGTSTVLGNGSSSLPEGQSLRLVCAVDAVDSNPPARLSLSWRGLTLCPSQPSNPGVLELPWVHLRDAAEFTCRAQNPLGSQQVYLVNLSLQSKATSGVTQGVVGGAGATALVFLSFCVIFVVVRSCRKKSARPAAGVGDGTGEDANAVRGSASQGPLTEPWAEDSPPDQPPASARSSVGEGELQYASLSFQMVKPWDSRGQEATDTEYSEIKIHR (SEQ ID NO: 151)
人 Siglec-3	NM_001772.3; NP_001763.3	DPNFWLQVQESVTVQEGLCVLPCTFFHPIPIYYDKNSPVHGYWFREGAHSGDSPVATNKLDEVEQEEQGRFRLLDGDPNRNCSLSIVDARRDNGSYFFRMERGSTKYSYKSPQLSVHVTDLTHRPKILIPGTLEPGH SKNLTCVSWWACEQGTTPIFSWLSAAPTSLGPRTTTHSSVLIITPRQDHTNLTCQVKFAGAGVTTERTIQLNVTYVPQNPTTGIFPGDGSQKQETRAGVVHGAIGGAGVTALLALCLCLIFFIVKTHRRKAARTAVGRNDTHPTTGSASPKHQKSKLHGPTETSSCSGAAPTVMDEELHYASLNFHGMNPSKDTSTEYSEVRTQ (SEQ ID NO: 152)
人 Siglec-5	NM_003830.3	EKPVYELQVQKSVTVQEGLCVLPVPCSFSYPWRSWYSSPLYVYWFRDGEIPYYAEVVATNNPDRRVKQGRFRLLDGVQKKNCSSLSIGDARMEDTGSYFFRVERGRDVKYSYQQNKLNLVLTALIEKPDHIFLEPLESGRPTRLSCSLPGSCEAGPPLTFSWTGNALSPLDPETTRSSSELTTPRPEDHGTNLTCQMKRQGAQVTTERTVQLNVSYAPQTITIFRNGIALEILQNTSYLPVLEGQALRLLCDAPSNPPAHLWSWFQGPALNATPISNTGILELRRVRSAAEEGGFTCRAQHPLGFLQIFLNLSVYSLPQLLGPSCSWEA EGLHCRCSFRARPAPSLCWRLEEKPLEGNSSQGSFKVNSSSAGPWA NSSLILHGGGLSSDLKVSCAWNIYGSQSGSVLLLQGRSNLGTGVVPAALGGAGVMALLCICLCLIFFLIVKARRKQAAGRPEKMDDEDPIMGITSGSRKKPWDPSPGDQASPPGDAPPLEEQKELHYASLSFSEMKSREP KDQEAPSTTEYSEIKTSK (SEQ ID NO: 153)

[0391]

人 Siglec-6	NM_198845.4	QERRFQLEGPESLTVQEGLCVLVPCRLPTTLPASYYGYGYWFLGA DVPVATNDPDEEVQEETRGRFHLLWDPRRKNCSLSIRDARRRDNA YFFRLKSKWMKYGYTSSKLSVRVMALTRPNISIPGTLESGHPSNLT CSVPWVCEQGTPIFSWMSAAPTSLGPRTTQSSVLTITPRQDHSTNL TCQVTFPGAGVTMERTIQLNVSSFKILQNTSSLPVLEGQALRLLCD DGNPPAHLWSFQGFALNATPISNTGVLELPQVGSAAEGDFTCRAQH PLGSLQISLSLFVHWKPEGRAGGVLGAVWGASITTLVFLCVCFIFRV KTRRKAAQPVQNTDDVNPVMVSGSRGHQHGFQTGIVSDHPAEAG PISEDEQELHYAVLHFHKVQPQEPKVTDTEYSEIKIHK (SEQ ID NO: 154)
人 Siglec-8	NM_014442.2	MEGDRQYGDGYLLQVQELVTVQEGLCVHVPCSFSPQDGWTDSDP VHGYWFRAGDRPYQDAPVATNNPDREVQAEQGRFQLLDIWSND CSLSIRDARKRDKGSYFFRLERGSMKWSYKSQLNYKTKLSVFTVA LTHRPDILILGTLESGHSRNLTCVPWACKQGTTPMISWIGASVSSPG PTTARSSVLTLPKPDHGTSLTCQVTLPGTGVTTTSTVRLDVSYPP WNLTMTVFQGDASTALGNGSSLSVLEGQSLRLVCVNSNPPARLS WTRGSLTLCPSRSSNPGLLELPRVHVRDEGEFTCRAQNAQGSQHISL SLSLQNEGTGTSRPVSQVTLAAVGGAGATALAFLSFCIIFIIVRSCRKK SARPAAGVGDGTGMDAKAIRGSASQGPLETESWKDGNPLKKPPPAVA PSSGEEGELHYATLSFHKVKPQDPQGEATDSEYSEIKIHKRETAETQ ACLRNHNPPSSKEVRG (SEQ ID NO: 155)
人 Siglec-10	NM_033130.4	MDGRFWIRVQESVMVPEGLCISVPCSFSPQDWTGSTPAYGYWFK AVTETTKGAPVATNHQSREVEMSTRGRFQLTGDPKGNCSLVIRDA QMDESEQYFFRVERGSYVRYNFMNDGFFLKVTALTQKPDVYIPETL EPGQPVTVICVFNWAFEECPSPSFSWTGAALSSQGTPTTSHFVLSF TPRPQDHNTDLTCHVDFSRKGVSVQRTVRLRVAYAPRDLVISIRDN TPALEPQPQGNVPYLEAQKGQFLRLCAADSQPPATLSWVLQNRVL SSSHPWGPRPLGLELPGVKAGDSGRYTCRAENRLGSQQRALDLSVQ YPENLRVMVMSQANRTVLENLNGTSLPVLEGQSLCLVCVTHSSPPA RLSWTQRGQVLSPSQSPDPGVLELPRVQVEHEGEFTCHARHPLGSQ HVSLSLSVHYSKLLGPSCSWEAEGHLCSCSSQASPAPSLRWLGE ELLEGNSSQDSFEVTPSSAGPWANSSLSLHGGLSSGLRLRCEAWN HGAQSGSILQLPDKKGLISTAFSNGAFLGIGITALFLCLALIMKILPK RRTQTETPRPRFSRHSTILDYINVVPTAGPLAQKRNQKATPNSPRTPL PPGAPSPESKKNQKKQYQLPSFPEPKSSTQAPESQESQEELHYATLNF PGVRPRPEARMPKGTQADYAEVKFQ (SEQ ID NO: 156)
人 Siglec-11	NM_052884.2	NKDPSYSLQVQRQVPVPEGLCVIVSCNLSYPRDGWDESTAAYGYW FKGRTSPKTGAPVATNNQSREVEMSTRDRFQLTGDPGKGSCSLVIRD AQREDEAWYFFRVERGSVRHSFSLNAFFLKVTALTCKPDVYIPETL EPGQPVTVICVFNWAFKKCPAPSFSWTGAALSPRRTRPSTSHFVLSF TPSPQDHNTDLTCHVDFSRKGVSAQRTVRLRVAYAPKDLIISHDNT SALELQGNVIYLEVQKGQFLRLCAADSQPPATLSWVLQDRVLSSSH PWGPRTLGLELRGVRAGDSGRYTCRAENRLGSQQQALDLSVQYPP ENLRVMVMSQANRTVLENLNGTSLPVLEGQSLRLVCVTHSSPPARLS WTRWGQTVGPSQSPDPGVLELPPIQMEHEGEFTCHAQHPLGSQHVS LSLSVHYPPQLLGPSCSWEAEGHLCSCSSQASPAPSLRWLGEELLE GNSSQGSFEVTPSSAGPWANSSLSLHGGLSSGLRLRCKAWN VHGAQ SGSVFQLLPKLEHGGGLGLGAALGAGVAALLAFCSCLVFRVKIC RKEARKRAAAEQDVPSTLGPISQGHQHECSAGSSQDHPPGAATYT PGKGEEQELHYASLSFQGLRLWEPADQEAPSTTEYSEIKIHTGQPLR GPGFGLQLEREMSGMVPK (SEQ ID NO: 157)

[0392]

人 Siglec-12	NM_053003.3	KEQKDYLLTMQKSVTVQEGLCVSVLCSFSYPQNGWTASDPVHGYW FRAGDHVSRNIPVATNNPARAVQEETDRFRHLLGDPQNKDCTLISIRD TRES DAGTYVFCVERGNMKWNYKYDQLSVNVTASQDLLSRYRLE VPESVTVQEGLCVSVPCSVLYPHYNWTASSPVYGSWFKEGADIPWD IPVATNTPSGKVQEDTHGRFLLGDPQTNNCSLSIRDARKGDSGKYY FQVERGSRKWNYIYDKLSVHVTALHMTPTFSIPGTLESGHPRNLTC VPWACEQGTPTITWMGASVSSLDPTITRSSMLSLIPQPDHGTSLTC QVTLPGAGVTMTRAVRLNISYPQNLMTMTVFQGDGTASTTLRNGSA LSVLEGQSLHLVCAVDSNPPARLSWTWGSLSLTPSQSSNLGVLELPR VHVKDEGEFTCRAQNPLGSQHISLSLSLQNEYTGKMRPISGVTLGAF GGAGATALVFLYFCIFVVRSCRKKSARPAVGVDGTGMEDANAVR GSASQGPLIESPADDSPPHHAPPALATPSPEGEIQYASLSFHKARPQY PQEQAIGYEYSEINIPK (SEQ ID NO: 158)
猕猴 Siglec	XM_005590087.1	QRNNQKNYPLTMQESVTVQQGLCVHVLCFSYPWYGWISSDPVHG YWFRAGAHTDRDAPVATNNPARAVREDTRDRFHLGDPQTKNCTL SIRDARSSDAGTYFFRVETGKTKWNYKYAPLSVHVTALHTRPNILIP GTLESGCPRNLTCSPWACEQGTAPMISWMGTSVSPLDPSTTRSSVL TLIPQPDHGTSLTCQVTFFGASVTTNKTIHLNVSYPPQNLMTMTVFQ GNDTVSIVLGNSSSVSPEGPSRLVCAVDSNPPARLSLSWGGLTLC PSQPSNPGVLELPRVHLRDEEFTCRAQNLLGSQQVSLNVSLQSKAT SGLTQGA VGAGATALVFLSFCVIFVVP (SEQ ID NO: 159)
人 Siglec-9 K100E/A 315E 等位基因		QTSKLLTMQSSVTVQEGLCVHVPCSFSYPSHGWYIPGPVVHGYWFR EGANTDQDAPVATNNPARAVWEETDRFRHLLGDPHTENCTLSIRDA RRSDAGRYFFRMEKGSIKWNYKHHRLSVNVTALHTRPNILIPGTLES GCPQNLTCSPWACEQGTTPMISWIGTSVSPLDPSTTRSSVLTLIPQP QDHGTSLTCQVTFFGASVTTNKTVHLNVSYPPQNLMTMTVFQGDGT STVLGNSSLSLPEGQSLRLVCAVDAVDSNPPARLSLSWRGLTLCPS QPSNPGVLELPWVHLRDEAEFTCRAQNPLGSQQVYLNVSLSQSKATS GVTQGVVGGAGATALVFLSFCVIFVVRSCRKKSARPAAGVGTGI EDANAVRGSASQGPLTEPWAEDSPDQPPASARSSVGEGELQYASL SFQMKPWDSRGQEATDTEYSEIKIHR (SEQ ID NO: 160)
人 Siglec-9 N 末端 V 集 Ig 样结 构域		MEWSWVFLFFLSVTTGVHSGKPIPNPLLGLDSTQTSKLLTMQSSVT VQEGLCVHVPCSFSYPSHGWYIPGPVVHGYWFREGANTDQDAPVA TNNPARAVWEETDRFRHLLGDPHTKNCTLSIRDARRSDAGRYFFRM EKGSIKWNYKHHRLSVNVTAAATSGVTQGVVGGAGATALVFLSFCVI FVVRSCRKKSARPAAGVGTGIEDANAVRGSASQGPLTEPWAEDS PPDQPPASARSSVGEGELQYASLSFQMKPWDSRGQEATDTEYSEI KIHR (SEQ ID NO: 161)
人 Siglec-9Ig 样 C2 型 结构域 1		MEWSWVFLFFLSVTTGVHSGKPIPNPLLGLDSTLTHRPNILIPGTLES GCPQNLTCSPWACEQGTTPMISWIGTSVSPLDPSTTRSSVLTLIPQP QDHGTSLTCQVTFFGASVTTNKTVHLNVSYPPQNLMTMTVFQGDGT ATSGVTQGVVGGAGATALVFLSFCVIFVVRSCRKKSARPAAGVGD TGIEDANAVRGSASQGPLTEPWAEDSPDQPPASARSSVGEGELQY ASLSFQMKPWDSRGQEATDTEYSEIKIHR (SEQ ID NO: 162)

[0393]

人 Siglec-9Ig 样 C2 型 结构域 2		MEWSWVFLFFLSVTTGVHSGKPIPNPLLGLDSTSTVLGNSSLSLPE GQSLRLVCAVDAVDSNPPARLSLSWRGLTLCPSQPSNPGVLELPWVH LRDAAEFTCRAQNPLGSQQVYLNVSLSQSKATSGVTQGVVGGAGAT ALVFLSFCVIFVVRSCRKKSARPAAGVGTGIEDANAVRGSASQGP LTPWAEDSPDQPPASARSSVGEGELQYASLSFQMKPWDSRGQ EATDTEYSEIKIHR (SEQ ID NO: 163)
------------------------------------	--	--

[0394] 实例3:结合到CD33相关的Siglec

[0395] 与Siglec-7和-9共有序列相似性的CD33相关的Siglec通常分为两组,第一个亚群由Siglec-1、-2、-4和-15组成,并且CD33相关的Siglecs组包含Siglec-3、-5、-6、-7、-8、-9、-10、-11、-12、-14和-16。由于其它CD33相关的Siglecs具有不同的生物学功能和/或被认

为不参与肿瘤监测,因此进一步筛选抗体以评估是否有可能获得不结合其它CD33相关的Siglecs的交叉反应性Siglec-7/9抗体。

[0396] 产生表达Siglec-3、-5、-6、-8、-10、-11和-12的细胞,并且交叉反应性的Siglec-7/9抗体的代表亚群通过流式细胞术测试与细胞的结合。氨基酸序列和对本文所用的不同Siglec的基因库引用示出于下表1中。

[0397] 简要地,使用HuSiglec表达性CHO细胞系(表达Siglecs中的一种)。对于流式细胞术筛选,将抗体与每种HuSiglec表达性CHO细胞系(CHO HuSiglec-3细胞系、CHO HuSiglec-5细胞系、CHO HuSiglec-6细胞系、CHO HuSiglec-8细胞系、CHO HuSiglec-10细胞系、CHO HuSiglec-11细胞系、CHO HuSiglec-12细胞系)一起温育1小时,在染色缓冲液中洗涤两次,用标记有PE的山羊抗小鼠多克隆抗体(pAb)显露,用染色缓冲液洗涤两次,并且在HTFC细胞仪上获得染色,并且使用FlowJo软件进行分析。

[0398] 结果示出,抗Siglec-9抗体mAbA、mAbB、mAbC、mAbD、mAbE和mAbF均未与Siglecs-3、-5、-6、-7、-8、-10、-11或-12中的任一个结合。

[0399] 结果示出,除了Siglec-7和-9以外,一些交叉反应性的Siglec-7/9抗体还可以结合Siglec-12或Siglec-6。除了Siglec-7和-9以外,mAb1、mAb2和mAb3还结合Siglec-12,而mAb3、mAb4、mAb5和mAb6不结合Siglec-12。示例性抗体mAb1、mAb2、mAb3、mAb4、mAb5或mAb6均未与Siglecs-3、-5、-6、-8、-10或-11中的任一个结合。

[0400] 实例4:滴定抗体以结合Siglec

[0401] 通过流式细胞术在用人Siglec-7和人Siglec-9和猕猴Siglec-9转染的CHO细胞上,通过滴定实验来测试抗体在人Siglec-7、人Siglec-9和猕猴Siglec-9上的结合。将细胞在染色缓冲液(SB)中与20ug/ml的一抗和一系列1:5的稀释液一起温育1小时。将它们用SB洗涤三次,然后与山羊F(ab')<sup>2</sup>抗人IgG(Fc)PE(Beckman Coulter#IM05510)一起温育30分钟,并且用SB洗涤两次。用HTFC Intellicyt细胞仪显示荧光。

[0402] 发现来自2次免疫中的5种融合物的以下示出的六种抗体对如通过细胞表达的人Siglec-7和人Siglec-9具有彼此相当的结合亲和力,并且更进一步对猕猴Siglec具有可比较的结合亲和力。用于结合每个抗体的EC<sub>50</sub>值(μg/ml)如下所示。

[0403]	EC <sub>50</sub> (μg/ml)		mAb1	mAb2	mAb3	mAb4	mAb5	mAb6
		Siglec-7	0.21	0.17	0.22	0.17	0.22	0.33
		Siglec-9	0.11	0.08	0.23	0.28	0.26	0.31
		Siglec-Cyno	0.67	0.53	0.85	0.17	0.14	0.17

[0404] 实例5:通过表面等离子体共振 (SPR) 的Siglec-9结合亲和力

[0405] Biacore™T100一般程序和试剂

[0406] SPR测量在25℃的Biacore™T200设备(Biacore™GE Healthcare)上进行。在所有Biacore™实验中,HBS-EP+(Biacore™GE Healthcare)和NaOH 10mM分别用作运行缓冲液和再生缓冲液。用Biacore™T200评估软件对传感器图进行分析。人siglec-9和-7多聚体蛋白是在Innate Pharma克隆、生产和纯化的。

[0407] 蛋白质-A的固定

[0408] 将蛋白质共价固定在Sensor Chip CM5上的葡聚糖层中的羧基上。用EDC/NHS(N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)碳二酰胺盐酸盐和N-羟基琥珀酰亚胺(Biacore™,GE Healthcare)活化芯片表面。在偶联缓冲液(10mM乙酸盐,pH 4.2和5.0)中将蛋白质稀释到



10 $\mu$ g/ml, 并且注入直至达到合适的固定水平 (即600RU到2000RU)。使用100mM乙醇胺pH 8 (Biacore™, GE Healthcare) 进行剩余活化基团的失活。

[0409] 亲和力研究

[0410] 亲和力研究是根据由制造商推荐的标准动力学规程 (Biacore™GE Healthcare动力学向导) 进行的。将处于600nM到0.975nM范围的抗Siglec-9和-7/9抗体Fab片段的系列稀释液依次注入固定的Siglec-9 Fc和Siglec-7 Fc蛋白上, 并且在再生之前解离10分钟。使用1:1动力学结合模型, 拟合整个传感器图集。单价亲和力以及动力学缔合和解离速率常数如下表2所示。

[0411] 表2

[0412]	Siglec-9 Fc 蛋白上的 Fab 结合		
	FAB	KD (nM) (1:1 结合)	Koff <sup>(10-3)</sup> 1/S
	Fab.A (mAbA 的 Fab)	0.04	0.025
	Fab.B (mAbB 的 Fab)	0.37	0.31
	Fab.C (mAbC 的 Fab)	0.55	0.43
	Fab.D (mAbD 的 Fab)	4.12	0.11
	Fab.E (mAbE 的 Fab)	1	1.9
	Fab.F (mAbF 的 Fab)	1	0.46
	Fab1 (mAb1 的 Fab)	0.4	0.16
	Fab2 (mAb2 的 Fab)	0.8	0.17
	Siglec-7 Fc 蛋白上的 Fab 结合		
	Fab	KD (nM) (1:1 结合)	Koff <sup>(10-3)</sup> 1/S
	Fab1	0.06	0.04
	Fab2	0.07	0.04

[0413] 实例6: 单核细胞来源的树突细胞上的滴定

[0414] 单核细胞来源的树突细胞 (moDC) 的产生:

[0415] 单核细胞来源的树突细胞由外周血单核细胞产生。PBMC是从健康供体获得的血沉棕黄层中分离出来的。使用试剂盒单核细胞分离试剂盒II (Miltenyi Biotec) 纯化单核细胞, 并且在补充了10%灭活FBS (GIBCO)、谷氨酰胺 (GIBCO)、MEM NEAA (GIBCO)、丙酮酸钠 (GIBCO)、IL-4 (20ng/ml) (Peprotech) 和GM-CSF (400ng/ml) (Miltenyi Biotec) 的RPMI培养基 (GIBCO) 中, 在moDC中分化总共6天。将细胞在37℃的潮湿CO2培养箱中培养, 并且在第4天更新细胞因子。

[0416] 用25mU神经氨酸酶 (Roche Diagnostics) 将moDC去唾液酸化2小时。在神经氨酸酶处理之前和之后: 将moDC细胞在染色缓冲液 (SB) 中与小鼠Siglec-7Fc (IPH) 和小鼠Siglec-9 Fc重组蛋白 (IPH) 以10 $\mu$ g/ml一起温育1h, 用SB洗涤两次, 与山羊F(ab')<sub>2</sub>抗小鼠IgG (Fc) PE (Jackson ImmunoResearch) 一起温育30分钟, 用SB洗涤两次, 并且用Canto II (HTS) 显露荧光, 控制去唾液酸化。

[0417] 滴定

[0418] 通过流式细胞术, 在滴定实验中测试了对moDC和经过神经氨酸酶处理的moDC的结合。将细胞在染色缓冲液 (SB) 中与10 $\mu$ g/ml的一抗和一系列1:10的稀释液一起温育1小时。将它们用SB洗涤两次, 然后与山羊F(ab')<sub>2</sub>抗人IgG (Fc) PE (Jackson ImmunoResearch) 一起

温育30分钟,并且用SB洗涤两次。用HTFC Intellicyt细胞仪显示荧光。

[0419] 结果

[0420] 在神经氨酸酶处理之后,EC<sub>50</sub>高度增强(10倍),表明在神经氨酸酶处理之前,在moDC上表达的Siglec-9与其唾液酸配体以顺式相互作用进行接合。然而,平台期水平未改变,表明高亲和力抗体可以结合细胞表面上的所有Siglec-9(结合和未结合)构象,并且抑制monoDC以及其它细胞类型(例如,NK细胞、CD8<sup>+</sup> T细胞、单核细胞和巨噬细胞M1和M2)中的顺式相互作用和信号传导。图3中示出了代表性抗体mAbA、mAbC和mAbD在moDC(左图)和经过神经氨酸酶处理的moDC(右图)中的结果,以及它们相应的EC<sub>50</sub>值。

[0421] 实例7:评估抗体中和NK细胞中Siglec活性的能力

[0422] 在第一次和第二次免疫中测试的抗Siglec-7/9抗体在NK细胞活化测定中,使用原代NK细胞(从人类供体中纯化的新鲜NK细胞,在使用之前,在37℃下温育过夜)测试了Siglec活性的阻断。在24小时内增加CD137表达与包含NK细胞的几种淋巴细胞的活化相关(Kohrt等人(2011)《血液(Blood)》117(8):2423-2432)。通过流式细胞术分析CD137在NK细胞上的表达,确定了抗Siglec-7/9抗体和靶细胞去唾液酸化对NK细胞活化的影响。抗Siglec-7/9mAb mAb1、mAb2、mAb3、mAb4、mAb5和mAb6中的每一个诱导24小时处CD137表达的增加。

[0423] 然后,通过细胞毒性测定(Cr<sup>51</sup>),以YTS Siglec-9\*效应细胞系(用人Siglec-9转染的人NK细胞系YTS)作为效应细胞,并且Ramos细胞系作为靶,研究了抗Siglec-7/9抗体的作用。此测试通过直接定量<sup>51</sup>Cr加载的靶细胞裂解来测量YTS Siglec-9\*细胞系的细胞毒性。简而言之,首先用放射性<sup>51</sup>Cr同位素标记靶细胞,并且然后在37℃与效应细胞共温育4小时。在此时间期间,裂解对YTS细胞敏感的靶细胞,将<sup>51</sup>Cr释放到培养基中。通过液体闪烁计数,测量回收的上清液中的<sup>51</sup>Cr。获得的结果允许评估NK细胞对靶细胞的裂解百分比。测定是在96U孔板中以完整RPMI,200μL终/孔,E:T比为5/1完成的。以10ug/ml和一系列1:10的稀释度添加抗Siglec-7/9抗体和同种型对照。

[0424] 抗Siglec-7/9mAb mAb1、mAb2、mAb3、mAb4、mAb5和mAb6中的每一个均以剂量依赖性方式诱导YTS Siglec-9\*细胞毒性的增加。作为对照,未在野生型YTS细胞系上观察到此作用(无Siglec-9表达)。类似地,抗Siglec-9mAb mAbA、mAbB、mAbC、mAbD、mAbE和mAbF中的每一个以剂量依赖性方式诱导YTS Siglec-9\*细胞毒性的增加。图4示出了在Siglec-7和-9交叉反应抗体中(图4B)和在Siglec-9单特异性(非Siglec-7结合)抗体中(图4A) YTS Siglec-9\*细胞毒性的增加的剂量依赖性诱导。

[0425] 实例8:原代人NK细胞中Siglec-9中和的详细研究(低Siglec-9表达)

[0426] 我们认为,例如,与嗜中性粒细胞和在其表面处表达更高水平的Siglec-9的其它细胞以及在不同的NK细胞亚群中表达的Siglec-7相比,先前的抗体无法中和NK细胞中的Siglec-9的可能性可能与原代NK细胞中Siglec-9表达的差异有关。为了研究是否可以获得中和NK细胞中Siglec-9的抗体,我们研究并选择了来自许多人类供体的原代NK细胞中的抗体,并且通过流式细胞术对Siglec-9进行门控。通过在经典的<sup>51</sup>Cr释放测定中评估肿瘤细胞裂解来通过细胞毒性,并且通过评估NK细胞上CD137表面的表达来通过活化测定来研究抗Siglec-9抗体的作用。在每种情况下,将原代NK细胞(作为从供体中纯化的新鲜NK细胞)用作效应细胞,并且将HT29结肠直肠癌细胞系用作靶标。

[0427] 部分1:细胞毒性测定:在两个人类供体中纯化的NK与HT29肿瘤细胞

[0428] 细胞毒性测定通过直接定量<sup>51</sup>Cr加载的靶细胞裂解来测量NK细胞的细胞毒性。简而言之,首先用放射性<sup>51</sup>Cr同位素标记靶细胞,并且然后在37℃与效应细胞共温育4小时。在此时间期间,裂解对NK细胞敏感的靶细胞,将<sup>51</sup>Cr释放到培养基中。通过液体闪烁计数,测量回收的上清液中的<sup>51</sup>Cr。获得的结果允许评估NK细胞对靶细胞的裂解百分比。测定是在96U孔板中以完整RPMI,200μL终/孔,E:T比为8/1完成的。以10ug/ml添加抗Siglec-9抗体和同种型对照。

[0429] 抗Siglec9抗体mAbA、mAbB、mAbC、mAbD、mAbE和mAbF以及抗Siglec7/9抗体mAb1、mAb2、mAb3、mAb4、mAb5和mAb6中的每一个引起NK细胞细胞毒性的增加。图5是代表性图,示出了在两种不同的人类供体(供体D1(左图)和D2(右图))中由抗体mAbA、mAbC、mAbD、mAbE和mAbF介导的原代NK细胞细胞毒性的增加。

[0430] 部分2:活化测定(CD137):单个人类供体中纯化的NK与HT29、mAb的比较

[0431] 通过流式细胞术分析Siglec-9阳性NK细胞上的CD137表达来确定抗Siglec-7/9和抗Siglec-9抗体对NK细胞活化的作用。效应细胞是原代NK细胞(从供体中纯化的新鲜NK细胞,在使用之前在37℃下温育过夜)并且靶细胞(HT29细胞系)以1:1的比例混合。CD137测定是在96U孔板中以完整RPMI,200μL终/孔完成的。将抗体与效应细胞在37℃下预温育30分钟,并且然后将靶细胞在37℃下共温育过夜。以下步骤是:以500g旋转3分钟;用染色缓冲液(SB)洗涤两次;加入50μL染色Ab混合物(抗CD3太平洋蓝-BD Pharmingen;抗CD56-PE-Vio770(Miltenyi);抗CD137-APC(Miltenyi),抗Siglec-9 K8-PE(Biolegend);在4℃下温育30分钟;用SB洗涤两次;用SB重悬沉淀物;并且用Canto II(HTS)显示荧光。

[0432] 阴性对照是NK细胞与单独的HT29,并且存在同种型对照。图6是代表性图,其示出了表达由几种抗Siglec-9和抗Siglec-7/9抗体mAbA、mAbB、mAbF、mAb6和mAb4介导的CD137的Siglec-9阳性NK细胞%的增加。作为对照,表达CD137的Siglec-9阴性NK细胞的%不受这些抗体的影响。从图中可以看出,抗Siglec-9抗体将Siglec-9表达性原代人NK细胞的细胞毒性完全恢复到同一供体的Siglec-9阴性原代人NK细胞中观察到的水平。

[0433] 部分3:活化测定(CD137):在6个人类供体中纯化的NK与HT29、mAbA和mAb1

[0434] 通过使用一种抗Siglec-9(mAb.A)和一种抗Siglec-7/9(mAb1)对6个供体进行了实验复制。在不存在抗体的情况下(“培养基”设置),表达CD137的NK的%在供体的6%与27%之间变化(参见(图7,左图))。将数据归一化为与来自每个实验的对照培养基值相比的相对变化: $(X - X_{\text{培养基}}) / X_{\text{培养基}} (\%)$ 。如图7所示,mAbA和mAb1诱导了Siglec-9+CD137+NK%的增加(图7,中图),而不是Siglec-9-CD137+NK%的增加(图7,右图)。

[0435] 实例9:在原代NK细胞上的滴定

[0436] 通过流式细胞术的滴定实验测试了抗体在新鲜纯化的人NK细胞上的结合。将细胞在染色缓冲液(SB)中与10ug/ml的一抗和一系列1:10的稀释液一起温育1小时。将它们用SB洗涤三次,然后与山羊F(ab')<sup>2</sup>抗人IgG(Fc)PE(Jackson ImmunoResearch)一起温育30分钟。在BD FACS Canto II上获得染色,并且使用FlowJo软件进行分析。下表中以μg/ml示出EC<sub>50</sub>值(使用4参数逻辑拟合计算)。

[0437]

	平均 EC50 (μg/ml) -4 个供体
mAb1	0.05
mAb2	0.07
mAb3	0.19
mAb4	0.61
mAb5	1.27
mAb6	1.30
mAbA	0.08
mAbB	0.10
mAbC	0.09
mAbE	0.01
mAbF	0.30

[0438] 实例10:Siglec与唾液酸配体结合的阻断

[0439] 部分A:通过流式细胞术对Siglec-9与表达肿瘤细胞的唾液酸的结合的阻断

[0440] 将一定剂量范围的抗人Siglec-9 Fab与固定剂量的人Siglec-9 Fc融合重组蛋白在室温下共温育30分钟,然后加入各种表达唾液酸的细胞系K562 E6(用人HLA-E转染的K562细胞系)和Ramos,持续1小时。在染色缓冲液中洗涤细胞两次之后,将在染色缓冲液中稀释的PE偶联的山羊抗小鼠IgG Fc片段二抗(Jackson ImmunoResearch)添加到细胞中,并且将平板在4℃下再温育30分钟。将细胞洗涤两次,并且在配备有HTFC酶标仪的Accury C6流式细胞仪上进行分析。将Fab和Siglec-9 Fc融合重组蛋白的荧光平均值相对于比率绘制在图上。

[0441] 结果示出在图8中。在上图上,示出了在抗体的存在下,Siglec-9-Fc蛋白与Ramos细胞的结合。抗Siglec/9mAb mAbA、mAbB、mAbC和mAbD各自抑制Siglec-9-Fc蛋白与Ramos细胞的结合,而mAbE示出部分抑制Siglec-9-Fc蛋白与Ramos细胞结合的能力,并且mAbF并未显著抑制Siglec-9-Fc蛋白与Ramos细胞的结合。在图8的下图,示出了在抗体的存在下,Siglec-9-Fc蛋白与K562细胞的结合。抗Siglec/9mAb mAbA、mAbB、mAbC和mAbD各自抑制Siglec-9-Fc蛋白与Ramos细胞的结合,而mAbE和mAbF两者均示出部分抑制Siglec-9-Fc蛋白与K562细胞结合的能力,并且仅在明显更高的抗体浓度下。总之,抗体mAbA、mAbB、mAbC和mAbD完全阻断了Siglec-9与其在肿瘤细胞上的唾液酸配体的结合,而抗体mAbE的阻断依赖于表达唾液酸的细胞系,并且mAbF并不阻断结合。

[0442] 部分B:通过ELISA测定对Siglec-7和-9与唾液酸化配体的结合的阻断

[0443] 唾液酸是糖基化蛋白质和脂质上形成的九碳羧化单糖。包含唾液酸转移酶(催化其生物合成)和唾液酸酶的几种酶也称为神经氨酸酶(催化其裂解)调节它们在哺乳动物系统中的发生。在癌症中,改变的唾液酸谱起着增强肿瘤生长、转移和逃避免疫监视的主导作用,从而导致癌细胞存活(Bork等人,《药学科学杂志(J Pharm Sci.)》2009年10月;98(10):3499-508)。已经报道了几种癌症中唾液酸化的增加以及调节唾液酸化的酶谱的改变。ST3GAL6酶在多发性骨髓瘤细胞系和患者中过表达,并且在体外与多发性骨髓瘤细胞表面上α-2,3-连接的唾液酸的表达有关。在体内,ST3GAL6的敲低与多发性骨髓瘤细胞向骨髓壁的归巢和移植减少、肿瘤负担减轻和存活延长有关(Glavey等人,《血液(Blood)》2014年9月11日;124(11):1765-76)。胶质瘤中高ST3GAL1酶表达与间充质分子分类的更高肿瘤等级相

关(Chong等人,《国家癌症研究所期刊(Natl Cancer Inst.)》2015年11月7日;108(2))。异常启动子甲基化在癌症中几种唾液酸转移酶表达的调节中起作用(Vojta等人,《生物化学与生物物理学报(Biochim Biophys Acta.)》2016年1月12日)。在膀胱癌中,异常的ST6GAL1启动子甲基化诱导ST6Gal1表达缺失(Antony等人,《BMC癌症(BMC Cancer)》2014年12月2日;14:901)。

[0444] Siglec-7和Siglec-9结合各种唾液酸键。印在芯片上的唾液酸文库识别了几种Siglec和一个选择性Siglec-7配体共有的唾液酸配体(Rillahan等人,《ACS化学生物学杂志(ACS Chem Biol.)》2013年7月19日;8(7):1417-22)。考虑到Siglec-7和Siglec-9可能对唾液酸有不同的识别,鉴于各种唾液酸转移酶和唾液酸,将Siglec-7和-9两者靶向免疫细胞可以靶向多种癌症类型。

[0445] 在ELISA测定中测试了抗Siglec-7/9抗体对Siglec-7和-9与唾液酸化的配体之间的相互作用的阻断。Siglec蛋白是Siglec-7人Fc和Siglec-9人Fc重组蛋白,并且配体是具有唾液酸化三糖的生物素化聚合物(Neu5Aca2-3Galb1-4GlcNAcb-PAA-生物素Glycotech#01-077称为“Sia1”和6'-唾液乳糖-PAA-生物素Glycotech#01-039(称为“Sia2”)。简而言之,将蛋白A在4℃下包被在ELISA板上过夜。洗涤3次并且饱和之后,在室温下以0.8μg/孔添加Siglec-7 Fc和Siglec-9 Fc,持续1小时30分钟。洗涤3次之后,以20ug/ml和一系列1:5的稀释度添加mAb。洗涤3次之后,在室温下加入生物素化的唾液酸化聚合物,持续3小时。洗涤3次之后,以1:1000加入链霉亲和素-过氧化物酶(Beckman)。最后,通过在黑暗室温下添加TMB(Interchim)来揭示唾液酸化的聚合物在Siglec-7和-9蛋白上的结合,并且通过添加H2SO4终止反应。在450nm处读取吸光度。

[0446] 结果示出在图9和10中。mAb1、2、4、5和6阻断了Siglec-7与Sia2的相互作用,但mAb3并不阻断(图9)。所有mAb都阻断了Siglec-9与Sia2的相互作用(图10),然而mAb1、mAb2和mAb3示出抑制Siglec-9与Sia1的相互作用的能力很低(图10),并且因此基本上没有阻断Sia1相互作用。mAb5和mAb6阻断了Siglec-9与Sia1的相互作用,并且mAb4具有阻断Siglec-9与Sia1相互作用的中间能力。对Siglec-9的阻断作用取决于唾液酸类型。总体上,用抗Siglec-9抗体mAbA、mAbB、mAbC和mAbD观察到最完全的抑制,其基本上实现了完全抑制Siglec-9与唾液酸的相互作用。

[0447] 实例11:使用点突变体的抗Siglec抗体的表位

[0448] 为了定义抗Siglec-9抗体的表位,我们首先通过用HEK293T细胞中的标记V5表达每个单独的Siglec-9结构域(V集Ig样结构域、Ig样C2型结构域1和Ig样C2型结构域2),并且测试抗体与每种蛋白质的结合来识别我们的抗体的结合结构域。

[0449] 然后我们设计了Siglec-9突变体,其通过暴露于N末端V集Ig样结构域的表面上的分子表面的氨基酸取代来定义。Siglec-9的结构尚未解析,并且在可用的Siglec结构中,Siglec-7是最接近的成员(与Siglec-9氨基酸序列的同一性超过80%)。因此,我们使用Siglec-7结构设计了Siglec-9突变体。SEQ ID NO:2的多肽的天然Siglec-9肽前导被取代前导序列和V5标记(示出在表1中的Siglec-9结构域蛋白V集Ig样结构域、Ig样C2型结构域1和Ig样C2型结构域2中)替换,随后是表1的Siglec-9氨基酸序列,其中并入表3中列出的氨基酸取代。蛋白在HEK293T细胞系中表达。

[0450] 所有附图(图11-14)对应于SIGLEC-7结构107V的N末端V集Ig样结构域,如上文

Alphey等人(2003)所述。图以浅色阴影示出了包含精氨酸124的配体结合区域,所述精氨酸是所有Siglecs中保存的关键残基,用于与末端唾液酸糖上的羧基和在Siglec-7与Siglec-9之间保存的周围残基W132、K131、K135和N133相互作用,并且也被描述为唾液酸结合所必需的。W132提供与唾液酸的甘油部分的疏水性相互作用。表3中的靶向氨基酸突变是在Siglec-7和-9两者中存在的残基,并且使用对于Siglec-7的SEQ ID NO:1或对于Siglec-9的SEQ ID NO:2的编号示出(野生型Siglec-9中的残基/残基的位置/突变体中的残基)。

[0451] 表3

参考	参考 SEQ ID NO: 1 的 Siglec-7 的突变	参考 SEQ ID NO: 2 的 Siglec-9 的突变
M1	Q19A-T20A-S21N-K22A	Q18A-T19A-S20N-K21A
M2	L27T-T29A-S47A-S49A-K104N	L22T-T24A-S42A-S44A-K100N
M3	Q31E-S33K-T35V	Q26E-S28K-T30V
M5	H43L-P45A-H96F-L98S-N105D-T107A-S109A	H38L-P40A-H92F-L94S-N101D-T103A-S105A
M6	S52L-H53T-G54D-W55S-I56A-Y57A-P58A-G59S	S47L-H48T-G49D-W50S-I51A-Y52A-P53A-G54S
M7	P60S-H62A-E126A-G128S-S129K-K131A	P55S-H58A-E122A-G124S-S125K-K127A
[0452] M8	R67A-A70T-N71A-T72R-D73R-Q74K-D75A	R63A-A66T-N67A-T68R-D69R-Q70K-D71A
M9	N82A-P83S-A84S-R85S-A86K-V87S	N78A-P79S-A80S-R81S-A82K-V83S
M10	N81A-D100A-H102W-T103R	N77A-D96A-H98W-T99R
M11	W88V-E89K-E90A-R92A	W84V-E85K-E86A-R88A
M12	D93A-R94A-R111S-D112A-R114A	D89A-R90A-R107S-D108A-R110A
M13	E38A-R115A-S116K-N142V-T144A-A118S	E33A-R111A-S112K-N138V-T140A-A114S
M14	R124A-W132Y-N133A	R120A-W128Y-N129A
M15	H137D-R138A-R120S-S32R	H133D-R134A-R116S-S27R
M16	K135M-H136W	K131M-H132W

[0453] 突变体的产生

[0454] 通过PCR产生Siglec-9突变体。扩增的序列在琼脂糖凝胶上电泳,并且使用Macherey Nagel PCR Clean-Up Gel Extraction试剂盒纯化。然后用ClonTech InFusion™系统将每种突变体生成的纯化的PCR产物连接到表达载体中。将含有突变序列的载体制备成Miniprep并且测序。测序之后,使用Promega PureYield™质粒Midiprep系统,将含有突变序列的载体制备成Midiprep™。HEK293T细胞在DMEM培养基(Invitrogen)中生长,使用Invitrogen的Lipofectamine™2000用载体转染,并且在测试转基因表达之前,在37℃下在CO<sub>2</sub>培养箱中温育24或48小时。

[0455] 流式细胞术分析抗Siglec-9与HEK293T转染的细胞的结合

[0456] 抗体mAb4、mAb5和mAb6结合Ig样C2型结构域1,而mAbA、mAbB、mAbC、mAbD、mAbE、mAbF、mAb1、mAb2和mAb3结合N末端V集Ig样结构域。通过流式细胞术测试了V集Ig样结构域结合抗体与突变体1-16中的每一个的结合。进行第一实验,以确定在一个浓度下失去与一个或几个突变体结合的抗体。为了确认结合的失去,对似乎受Siglec-9突变影响结合的抗体进行了抗体滴定。结果示出在下文表4中。

[0457] 抗体未失去与突变体M2的结合,所述突变体包含在群体中变化的残基K100(参考SEQ ID NO:2的Siglec-9)或K104(参考SEQ ID NO:1的Siglec-7)处的变体;因此,抗体将结合表1中所示的Siglec-9等位基因(SEQ ID NO:160)。

[0458] 抗Siglec-7和-9特异性抗体mAb1、mAb2和mAb3以及Siglec-9特异性抗体mAbE和mAbF都失去了与Siglec-9的突变体M9、M10和M11的结合,但是没有失去与任何其它突变体的结合。突变体9在残基N78、P79、A80、R81、A82和V83(参考Siglec-9)处含有氨基酸取代,表明突变体的残基中的一个或多个或所有残基对这些抗体的核心表位很重要。突变体10在残基N77、D96、H98和T99处含有氨基酸取代,表明突变体的残基中的一个或多个或所有残基对这些抗体的核心表位很重要。突变体11在残基W84、E85、E86和R88处含有氨基酸取代,表明突变体的残基中的一个或多个或所有残基对这些抗体的核心表位很重要。如图11所示,发现在M9、M10和M11中取代的残基位于N末端V集Ig样结构域的一侧(深色阴影),远离含有唾液酸结合位点的一面(浅色阴影)。值得注意,抗体不会失去与M8的结合,所述M8在C-C'环结构域中具有突变,所述突变限定了Siglecs的唾液酸配体特异性(参见,例如,Alphey等人,2003《生物化学杂志(J.Biol.Chem.)》278(5):3372-3377),也不会失去与部分地覆盖配体结合区的M16的M15的结合。因此,抗体在不结合唾液酸接触区或结合位点或C-C'环的情况下,在阻断Siglec-9方面实现很高的效力。

[0459] 抗Siglec-9特异性抗体mAbD失去与突变体M6的结合,但是未降低与任何其它突变体的结合。突变体6在残基S47、H48、G49、W50、I51、Y52、P53和G54(参考Siglec-9)处含有氨基酸取代,表明突变体的残基中的一个或多个或所有残基对抗体的核心表位很重要。如图12所示,在含有唾液酸结合位点但是在配体结合位点之外的N末端V集Ig样结构域表面(浅色阴影)的顶部发现了在M6中取代的残基(深色阴影)。mAbD未失去与M7的结合,但是确实示出与此突变体M7的结合部分降低;M7含有可能部分地重叠到配体结合区中的残基(在浅色阴影下)。M7在残基P55、H58、E122、G124、S125和K127(参考Siglec-9)处包含氨基酸取代。因此,尽管M7的残基对于抗体的核心表位并不重要。抗体不会失去与在C-C'环结构域中具有突变的M8或与部分地覆盖配体结合区的M16的M15的结合。因此,抗体在不结合唾液酸接触区或结合位点或C-C'环的情况下,在阻断Siglec-9方面实现很高的效力。

[0460] 抗Siglec-9特异性抗体mAbA和mAbB两者失去了与Siglec-9的突变体M16的结合,但是没有失去与任何其它突变体的结合。突变体16在残基K131和H136(参考Siglec-9)处含有氨基酸取代,表明突变体的残基中的一个或多个或所有残基对这些抗体的核心表位很重要。有趣的是,虽然M16在Siglec-9的唾液酸配体接触位点附近或之内(对于图13),但是抗体并未失去与M8的结合(C-C'环结构域突变体,也未失去与M15的结合)。因此,抗体在阻断Siglec-9方面以及此外在唾液酸接触区域内均具有高效力,但是不结合C-C'环。

[0461] 另一个方面,抗体mAbC失去与Siglec-9的突变体M8的结合(即在C-C'环内),但是未失去与M15或M16的结合,也未失去与M6、M7或M8或M9、M10或M11的结合(也未失去与任何其它突变体的结合),尽管与M15和M16的结合部分降低。在M8中突变的残基示出在图14中。突变体8在残基R63、A66、N67、T68、D69、Q70和D71(参考Siglec-9)处含有氨基酸取代,表明突变体的残基中的一个或多个或所有残基对这些抗体的核心表位很重要。因此,抗体结合限定Siglecs的唾液酸特异性的C-C'环结构域中的残基。

[0462] 实例12:抗Siglec抗体增强人类供体纯化的NK细胞中NKG2A阻断的活性

[0463] 研究了发现恢复了原代人NK细胞的细胞毒性活性的本文公开的抗Siglec抗体,以评估在NKG2A+NK细胞亚群的表面的Siglec是否正在限制这些NKG2A+细胞的细胞毒性活性。因此测试了抗Siglec抗体,以评估它们是否在NKG2A阻断性抗体莫纳珠单抗(也称为

IPH2201)的存在下显示出增强来自人类供体的原代NK细胞的活性的能力。

[0464] CD137表达

[0465] 在24小时内增加CD137表达与包含NK细胞的几种淋巴细胞的活化相关 (Kohrt等人 (2011)《血液 (Blood)》117 (8):2423-2432)。通过流式细胞术分析Siglec-9阳性NK细胞上的CD137表达来确定抗Siglec-7/9和抗Siglec-9抗体对NK细胞活化的作用。效应细胞 (从供体中纯化的新鲜NK细胞,在使用之前在37℃下温育过夜)和K562 E6肿瘤靶细胞 (用于表达HLA-E的K562细胞)以1:1的比例混合。CD137测定是在96U孔板中以完整RPMI,200μL终/孔完成的。将抗体与效应细胞在37℃下预温育30分钟,并且然后将靶细胞在37℃下共温育过夜。以下步骤是:以500g旋转3分钟;用染色缓冲液 (SB)洗涤两次;加入50μL染色Ab混合物 (抗CD3太平洋蓝-BD Pharmingen#558124;抗CD56-PE-Vio770-Milteny#130 100 676;抗CD137-APC-Milteny#130 094 821-抗Siglec-9 K8 PE-Biolegend#351504);在4℃下温育30分钟;用SB洗涤两次;用SB重悬沉淀物;并且用Canto II (HTS)显示荧光。

[0466] 阴性对照是NK细胞与单独的K562 E6 (用于表达HLA-E的K562细胞),并且存在同种型对照。

[0467] 实验在10位人类供体上进行。在不存在抗体的情况下 (“培养基”条件),表达CD137的NK的%在供体的5%与24%之间变化。将数据归一化为与来自每个实验的对照培养基值相比的相对变化:  $((X - X_{\text{培养基}}) / X_{\text{培养基}}) (\%)$ 。

[0468] 如图15所示,抗Siglec-9抗体 (mAbA)诱导了Siglec-9+ NK细胞中CD137阳性细胞的增加,但是并未诱导Siglec-9- NK细胞中CD137阳性细胞的增加。尽管抗NKG2A抗体 (IPH2201,也称为莫纳珠单抗;具有SEQ ID NO:172的VH和SEQ ID NO:176的VL的抗体)增强了Siglec-9-和Siglec-9+ NK细胞两者对K562 E6靶细胞的细胞毒性 (如CD137表达增加中所评估),Siglec-9- (阴性)细胞中CD137表达的增加更大,这表明在存在NKG2A阻断的情况下, Siglec-9限制了这些表达NK细胞的NKG2A的细胞毒性。抗Siglec抗体的添加恢复了NKG2A表达性NK细胞中的CD137表达/细胞毒性。结果表明,抗Siglec抗体增强中和性抗NKG2A抗体的细胞毒性增强作用。

[0469] <sup>51</sup>Cr测定

[0470] 细胞毒性测定通过直接定量<sup>51</sup>Cr加载的靶细胞K562-HLA-E\* (通过HLA-E转导的K562)裂解来测量NK细胞系KHYG-1Siglec-9\* (通过Siglec-9转导的NK细胞系)的细胞毒性。简而言之,首先用放射性<sup>51</sup>Cr同位素标记靶细胞,并且然后在37℃与效应细胞共温育4小时。在此时间期间,裂解对KHYG-1Siglec-9\*细胞敏感的靶细胞,将<sup>51</sup>Cr释放到培养基中。通过液体闪烁计数,测量回收的上清液中的<sup>51</sup>Cr。获得的结果允许评估NK细胞对靶细胞的裂解百分比。测定是在96U孔板中以完整RPMI,200μL终/孔,E:T比为5/1完成的。将一定剂量范围的抗Siglec-9、交叉反应的抗Siglec-7/9抗体和同种型对照与固定剂量的中和性抗NKG2A抗体 (10ug/ml)组合添加。

[0471] 抗Siglec9抗体mAbA、mAbB、mAbC、mAbD、mAbE和mAbF以及抗Siglec7/9抗体mAb1、mAb2、mAb3、mAb4、mAb5和mAb6中的每一个与抗NKG2A抗体组合一起引起NK细胞细胞毒性的增加。

[0472] 表4



突变体→	M1	M2	M3	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M14	M15	M16
抗体													
[0473] mAb1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
mAb2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
mAb3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
mAb.A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
mAb.B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
[0474] mAb.C	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+/-	+/-
mAb.D	+	+	+	+	-	+/-	+	+	+	+	+	+	+
mAb.E	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+
mAb.F	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+

[0475] 本文引用的所有参考文献,包含出版物、专利申请和专利均通过引用以其整体在此并入,其程度如同每个参考文献被单独且具体地指出通过引用并入,并且在本文中完整地阐述(在法律允许的最大范围内),不论是否单独提供了本文其它地方参考的特定文件的并入。

[0476] 除非另有说明,否则本文提供的所有精确值均代表对应的近似值(例如,关于特定因子或测量提供的所有确切示例性值可以被视为还提供对应的近似测量,由“约”修饰,在适当的情况下)。

[0477] 本发明使用如“包括”、“具有”、“包含”或“含有”等术语的本文对任何方面或实施例的描述旨在提供对本发明的“由所述一个或多个特定元素组成”、“基本上由所述一个或多个特定元素组成”或“基本上包括所述一个或多个特定元素”的类似方面或实施例的支持,除非另有说明或明确与上下文矛盾(例如,本文描述的包括特定元素的组合物应理解为还描述由所述元素组成的组合物,除非另有说明或明确与上下文矛盾)。

[0478] 除非另外声明,否则本文提供的任何和所有实例或示例性语言(例如,“如”)的使用仅旨在更好地阐明本发明,并且不对本发明的范围构成限制。本说明书中的任何语言都不应被解释为将任何未要求保护的元件指示为实践本发明所必须的。

## 序列表

&lt;110&gt; INNATE PHARMA

&lt;120&gt; 癌症治疗方案

&lt;130&gt; Sig793

&lt;150&gt; US 62/530,454

&lt;151&gt; 2017-07-10

&lt;160&gt; 184

&lt;170&gt; PatentIn版本3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 467

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人(homo sapiens)

&lt;400&gt; 1

```

Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Gly Arg Glu Arg Val
1           5           10           15
Glu Gly Gln Lys Ser Asn Arg Lys Asp Tyr Ser Leu Thr Met Gln Ser
          20           25           30
Ser Val Thr Val Gln Glu Gly Met Cys Val His Val Arg Cys Ser Phe
          35           40           45
Ser Tyr Pro Val Asp Ser Gln Thr Asp Ser Asp Pro Val His Gly Tyr
          50           55           60
Trp Phe Arg Ala Gly Asn Asp Ile Ser Trp Lys Ala Pro Val Ala Thr
65           70           75           80
Asn Asn Pro Ala Trp Ala Val Gln Glu Glu Thr Arg Asp Arg Phe His
          85           90           95
Leu Leu Gly Asp Pro Gln Thr Lys Asn Cys Thr Leu Ser Ile Arg Asp
          100          105          110
Ala Arg Met Ser Asp Ala Gly Arg Tyr Phe Phe Arg Met Glu Lys Gly
          115          120          125
Asn Ile Lys Trp Asn Tyr Lys Tyr Asp Gln Leu Ser Val Asn Val Thr
          130          135          140
Ala Leu Thr His Arg Pro Asn Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu Ser
145          150          155          160
Gly Cys Phe Gln Asn Leu Thr Cys Ser Val Pro Trp Ala Cys Glu Gln
          165          170          175
Gly Thr Pro Pro Met Ile Ser Trp Met Gly Thr Ser Val Ser Pro Leu
          180          185          190
His Pro Ser Thr Thr Arg Ser Ser Val Leu Thr Leu Ile Pro Gln Pro

```

195	200	205
Gln His His Gly Thr Ser Leu Thr Cys Gln Val Thr Leu Pro Gly Ala		
210	215	220
Gly Val Thr Thr Asn Arg Thr Ile Gln Leu Asn Val Ser Tyr Pro Pro		
225	230	235
Gln Asn Leu Thr Val Thr Val Phe Gln Gly Glu Gly Thr Ala Ser Thr		240
245	250	255
Ala Leu Gly Asn Ser Ser Ser Leu Ser Val Leu Glu Gly Gln Ser Leu		
260	265	270
Arg Leu Val Cys Ala Val Asp Ser Asn Pro Pro Ala Arg Leu Ser Trp		
275	280	285
Thr Trp Arg Ser Leu Thr Leu Tyr Pro Ser Gln Pro Ser Asn Pro Leu		
290	295	300
Val Leu Glu Leu Gln Val His Leu Gly Asp Glu Gly Glu Phe Thr Cys		
305	310	315
Arg Ala Gln Asn Ser Leu Gly Ser Gln His Val Ser Leu Asn Leu Ser		
325	330	335
Leu Gln Gln Glu Tyr Thr Gly Lys Met Arg Pro Val Ser Gly Val Leu		
340	345	350
Leu Gly Ala Val Gly Gly Ala Gly Ala Thr Ala Leu Val Phe Leu Ser		
355	360	365
Phe Cys Val Ile Phe Ile Val Val Arg Ser Cys Arg Lys Lys Ser Ala		
370	375	380
Arg Pro Ala Ala Asp Val Gly Asp Ile Gly Met Lys Asp Ala Asn Thr		
385	390	395
Ile Arg Gly Ser Ala Ser Gln Gly Asn Leu Thr Glu Ser Trp Ala Asp		
405	410	415
Asp Asn Pro Arg His His Gly Leu Ala Ala His Ser Ser Gly Glu Glu		
420	425	430
Arg Glu Ile Gln Tyr Ala Pro Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Pro Gln		
435	440	445
Asp Leu Ser Gly Gln Glu Ala Thr Asn Asn Glu Tyr Ser Glu Ile Lys		
450	455	460
Ile Pro Lys		
465		
<210> 2		
<211> 463		
<212> PRT		
<213> 智人(homo sapiens)		

&lt;400&gt; 2

Met	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Trp	Gly	Arg	Glu	Arg	Ala	Glu
1				5					10					15	
Gly	Gln	Thr	Ser	Lys	Leu	Leu	Thr	Met	Gln	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Gln
				20				25					30		
Glu	Gly	Leu	Cys	Val	His	Val	Pro	Cys	Ser	Phe	Ser	Tyr	Pro	Ser	His
			35				40					45			
Gly	Trp	Ile	Tyr	Pro	Gly	Pro	Val	Val	His	Gly	Tyr	Trp	Phe	Arg	Glu
			50				55				60				
Gly	Ala	Asn	Thr	Asp	Gln	Asp	Ala	Pro	Val	Ala	Thr	Asn	Asn	Pro	Ala
65					70				75					80	
Arg	Ala	Val	Trp	Glu	Glu	Thr	Arg	Asp	Arg	Phe	His	Leu	Leu	Gly	Asp
				85				90						95	
Pro	His	Thr	Lys	Asn	Cys	Thr	Leu	Ser	Ile	Arg	Asp	Ala	Arg	Arg	Ser
			100				105					110			
Asp	Ala	Gly	Arg	Tyr	Phe	Phe	Arg	Met	Glu	Lys	Gly	Ser	Ile	Lys	Trp
			115				120					125			
Asn	Tyr	Lys	His	His	Arg	Leu	Ser	Val	Asn	Val	Thr	Ala	Leu	Thr	His
			130				135					140			
Arg	Pro	Asn	Ile	Leu	Ile	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Ser	Gly	Cys	Pro	Gln
145				150					155					160	
Asn	Leu	Thr	Cys	Ser	Val	Pro	Trp	Ala	Cys	Glu	Gln	Gly	Thr	Pro	Pro
			165					170						175	
Met	Ile	Ser	Trp	Ile	Gly	Thr	Ser	Val	Ser	Pro	Leu	Asp	Pro	Ser	Thr
			180				185					190			
Thr	Arg	Ser	Ser	Val	Leu	Thr	Leu	Ile	Pro	Gln	Pro	Gln	Asp	His	Gly
			195				200					205			
Thr	Ser	Leu	Thr	Cys	Gln	Val	Thr	Phe	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Thr	Thr
			210				215				220				
Asn	Lys	Thr	Val	His	Leu	Asn	Val	Ser	Tyr	Pro	Pro	Gln	Asn	Leu	Thr
225				230					235					240	
Met	Thr	Val	Phe	Gln	Gly	Asp	Gly	Thr	Val	Ser	Thr	Val	Leu	Gly	Asn
			245					250					255		
Gly	Ser	Ser	Leu	Ser	Leu	Pro	Glu	Gly	Gln	Ser	Leu	Arg	Leu	Val	Cys
			260				265					270			
Ala	Val	Asp	Ala	Val	Asp	Ser	Asn	Pro	Pro	Ala	Arg	Leu	Ser	Leu	Ser
			275				280					285			
Trp	Arg	Gly	Leu	Thr	Leu	Cys	Pro	Ser	Gln	Pro	Ser	Asn	Pro	Gly	Val
			290				295					300			

Leu	Glu	Leu	Pro	Trp	Val	His	Leu	Arg	Asp	Ala	Ala	Glu	Phe	Thr	Cys
305					310					315					320
Arg	Ala	Gln	Asn	Pro	Leu	Gly	Ser	Gln	Gln	Val	Tyr	Leu	Asn	Val	Ser
			325						330					335	
Leu	Gln	Ser	Lys	Ala	Thr	Ser	Gly	Val	Thr	Gln	Gly	Val	Val	Gly	Gly
			340						345					350	
Ala	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Val	Phe	Leu	Ser	Phe	Cys	Val	Ile	Phe	Val
			355					360						365	
Val	Val	Arg	Ser	Cys	Arg	Lys	Lys	Ser	Ala	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Val
			370				375				380				
Gly	Asp	Thr	Gly	Ile	Glu	Asp	Ala	Asn	Ala	Val	Arg	Gly	Ser	Ala	Ser
385					390					395					400
Gln	Gly	Pro	Leu	Thr	Glu	Pro	Trp	Ala	Glu	Asp	Ser	Pro	Pro	Asp	Gln
				405					410					415	
Pro	Pro	Pro	Ala	Ser	Ala	Arg	Ser	Ser	Val	Gly	Glu	Gly	Glu	Leu	Gln
			420						425					430	
Tyr	Ala	Ser	Leu	Ser	Phe	Gln	Met	Val	Lys	Pro	Trp	Asp	Ser	Arg	Gly
			435					440					445		
Gln	Glu	Ala	Thr	Asp	Thr	Glu	Tyr	Ser	Glu	Ile	Lys	Ile	His	Arg	
			450				455					460			
<210> 3															
<211> 116															
<212> PRT															
<213> 小家鼠 (Mus musculus)															
<400> 3															
Asp	Val	Gln	Leu	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser	Gln
1				5					10					15	
Ser	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Thr	Gly	Tyr	Ser	Ile	Thr	Gly	Gly
			20					25					30		
Phe	Ala	Trp	Asn	Trp	Ile	Arg	Gln	Phe	Pro	Gly	Asn	Thr	Leu	Glu	Trp
			35				40					45			
Met	Gly	Tyr	Ile	Gly	Tyr	Gly	Gly	Ser	Thr	Ser	Tyr	Asn	Pro	Ser	Leu
			50				55				60				
Asn	Ser	Arg	Ile	Ser	Ile	Thr	Arg	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	His	Phe	Phe
65					70					75					80
Leu	Gln	Phe	Asn	Ser	Val	Thr	Thr	Asp	Asp	Ser	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys
					85				90					95	
Ala	Arg	Gly	Asp	Tyr	Leu	Phe	Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val
					100				105					110	

Thr Val Ser Ala

115

<210> 4

<211> 107

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 4

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala

20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

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

50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala

65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg

85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105

<210> 5

<211> 116

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 5

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

1 5 10 15

Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Gly Gly

20 25 30

Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Thr Leu Glu Trp

35 40 45

Met Gly Tyr Ile Gly Tyr Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu

50 55 60

Asn Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn His Phe Phe

65 70 75 80

Leu Gln Phe Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Asp Tyr Leu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val

100	105	110
Thr Val Ser Ala		
115		
<210> 6		
<211> 107		
<212> PRT		
<213> 小家鼠 (Mus musculus)		
<400> 6		
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly		
1 5 10 15		
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala		
20 25 30		
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile		
35 40 45		
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly		
50 55 60		
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala		
65 70 75 80		
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg		
85 90 95		
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
100 105		
<210> 7		
<211> 116		
<212> PRT		
<213> 小家鼠 (Mus musculus)		
<400> 7		
Glu Val Gln Leu Leu Glu Thr Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln		
1 5 10 15		
Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr Gly Gly		
20 25 30		
Phe Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Thr Leu Glu Trp		
35 40 45		
Met Gly Tyr Ile Gly Tyr Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu		
50 55 60		
Asn Ser Arg Ile Ser Ile Thr Arg Asp Thr Ser Lys Asn His Phe Phe		
65 70 75 80		
Leu Gln Phe Asn Ser Val Thr Thr Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Tyr Cys		
85 90 95		

Ala Arg Gly Asp Tyr Leu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
 100 105 110  
 Thr Val Ser Ala  
 115

<210> 8

<211> 107

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 8

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

<210> 9

<211> 121

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 9

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



	85		90		95
Ala Arg Leu Ile Phe Thr Thr Gly Phe Tyr Gly Met Asp Tyr Trp Gly					
	100		105		110
Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser					
	115		120		
<210> 10					
<211> 107					
<212> PRT					
<213> 小家鼠 (Mus musculus)					
<400> 10					
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly					
1	5		10		15
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr					
	20		25		30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Ile Lys Leu Leu Ile					
	35		40		45
Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly					
	50		55		60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Asp Gln					
65	70		75		80
Asp Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asn Ala Leu Pro Trp					
	85		90		95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys					
	100		105		
<210> 11					
<211> 116					
<212> PRT					
<213> 小家鼠 (Mus musculus)					
<400> 11					
Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala					
1	5		10		15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr					
	20		25		30
Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile					
	35		40		45
Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Ala Thr Ser Tyr Asn Gln Arg Phe					
	50		55		60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr					
65	70		75		80

Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
                             85                            90                            95  
 Ala Arg Gly Asp Ser Leu Phe Ala Tyr Trp Gly His Gly Thr Leu Val  
                             100                            105                            110  
 Thr Val Ser Ala  
                             115

<210> 12

<211> 107

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 12

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

<210> 13

<211> 116

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 13

Glu Ile Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala  
 1                            5                            10                            15  
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr  
                             20                            25                            30  
 Asn Met Asn Trp Val Lys Gln Ser Asn Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile  
                             35                            40                            45  
 Gly Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Ala Thr Ser Tyr Asn Gln Arg Phe  
                             50                            55                            60  
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65	70	75	80
Met Gln Leu Lys Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Gly Asp Ser Leu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val			
	100	105	110
Thr Val Ser Ala			
	115		
<210> 14			
<211> 107			
<212> PRT			
<213> 小家鼠 (Mus musculus)			
<400> 14			
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Glu Phe Met Ser Thr Ser Leu Gly			
1	5	10	15
Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn			
	20	25	30
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ala Leu Leu			
	35	40	45
Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly			
	50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Met Gln Ser			
65	70	75	80
Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Ile Thr Tyr Pro Tyr			
	85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys			
	100	105	
<210> 15			
<211> 122			
<212> PRT			
<213> 小家鼠 (Mus musculus)			
<400> 15			
Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ser			
1	5	10	15
Pro Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Tyr Phe Thr Phe Thr Ser Tyr			
	20	25	30
Trp Met His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
	35	40	45
Gly Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe			
	50	55	60

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Pro	Gly	Ala	Glu	Leu	Val	Lys	Pro	Gly	Ala
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Leu	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Val	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25					30		
Trp	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Arg	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			
Gly	Glu	Ile	Asn	Pro	Ser	Asn	Gly	His	Thr	Asn	Tyr	Asn	Glu	Lys	Phe

50	55	60
Lys Thr Lys Ala Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys		80
	85	90
Ala Asn Gly Val Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Asp Ala Met Asp Tyr Trp		95
	100	105
Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser		110
	115	120
<210> 18		
<211> 107		
<212> PRT		
<213> 小家鼠 (Mus musculus)		
<400> 18		
Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly		
1	5	10
Asp Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr		15
	20	25
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile		30
	35	40
Tyr Phe Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly		45
	50	55
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Asn Leu Glu Gln		60
65	70	75
Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Phe Cys Gln Gln Gly Asp Thr Phe Pro Phe		80
	85	90
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		95
	100	105
<210> 19		
<211> 120		
<212> PRT		
<213> 小家鼠 (Mus musculus)		
<400> 19		
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu		
1	5	10
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr		15
	20	25
Glu Met Asn Trp Val Lys Glu Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met		30
	35	40
		45

Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Val Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asp Glu Asp Val Ala Thr Tyr Phe Cys  
 85 90 95  
 Val Arg Asp Asp Tyr Gly Arg Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln  
 100 105 110  
 Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala  
 115 120

<210> 20

<211> 112

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 20

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

<210> 21

<211> 114

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 21

Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu  
 1 5 10 15  
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
 20 25 30  
 Ser Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met

35	40	45
Gly Trp Ile Ile Thr Glu Thr	Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe	
50	55	60
Arg Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr		
65	70	75
Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys		
85	90	95
Ala Arg Asp Phe Asp Gly Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val		
100	105	110
Ser Ser		
<210> 22		
<211> 107		
<212> PRT		
<213> 小家鼠 (Mus musculus)		
<400> 22		
Asp Ile Leu Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly		
1	5	10
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr		
20	25	30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Arg Gly Lys Ser Pro Gln Phe Leu Val		
35	40	45
Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Thr Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Arg Gly		
50	55	60
Ser Gly Ser Gly Thr Gln Phe Ser Leu Lys Ile Asn Ser Leu Gln Pro		
65	70	75
Glu Asp Phe Gly Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Phe Pro Trp		
85	90	95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys		
100	105	
<210> 23		
<211> 118		
<212> PRT		
<213> 小家鼠 (Mus musculus)		
<400> 23		
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Phe		
20	25	30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val		

Gln	Val	Gln	Leu	Gln	Gln	Ser	Gly	Pro	Glu	Val	Val	Arg	Pro	Gly	Val
1				5					10					15	
Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Asp	Tyr
			20					25					30		



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

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小家鼠 (Mus musculus)

&lt;400&gt; 26

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

&lt;210&gt; 27

&lt;211&gt; 6

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小家鼠 (Mus musculus)

&lt;400&gt; 27

Gly Gly Phe Ala Trp Asn  
 1 5

&lt;210&gt; 28

<211> 8  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 28  
Gly Tyr Ser Ile Thr Gly Gly Phe  
1 5  
<210> 29  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 29  
Gly Tyr Ser Ile Thr Gly Gly Phe Ala  
1 5  
<210> 30  
<211> 16  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 30  
Tyr Ile Gly Tyr Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Asn Pro Ser Leu Asn Ser  
1 5 10 15  
<210> 31  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 31  
Ile Gly Tyr Gly Gly Ser Thr  
1 5  
<210> 32  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 32  
Gly Asp Tyr Leu Phe Ala Tyr  
1 5  
<210> 33  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 33

Asp Tyr Leu Phe Ala

1 5

<210> 34

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 34

Ala Arg Gly Asp Tyr Leu Phe Ala Tyr

1 5

<210> 35

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 35

Lys Ala Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala Val Ala

1 5 10

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 36

Ser Gln Asp Val Asn Thr Ala

1 5

<210> 37

<211> 6

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 37

Gln Asp Val Asn Thr Ala

1 5

<210> 38

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 38

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr

1 5

<210> 39

<211> 9

<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 39  
Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Arg Thr  
1 5  
<210> 40  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 40  
His Tyr Ser Thr Pro Arg  
1 5  
<210> 41  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 41  
Arg Ala Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr Leu Ala  
1 5 10  
<210> 42  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 42  
Ser Gly Asn Ile His Asn Tyr  
1 5  
<210> 43  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 43  
Gly Asn Ile His Asn Tyr  
1 5  
<210> 44  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 44  
Asn Ala Lys Thr Leu Ala Asp

1 5  
<210> 45  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 45  
Gln His Phe Trp Ser Thr Pro Arg Thr  
1 5  
<210> 46  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 46  
Phe Trp Ser Thr Pro Arg  
1 5  
<210> 47  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 47  
Ser Tyr Asp Met Ser  
1 5  
<210> 48  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 48  
Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr  
1 5  
<210> 49  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 49  
Gly Phe Ala Phe Ser Ser Tyr Asp  
1 5  
<210> 50  
<211> 17  
<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 50

His Ile Gly Ser Gly Gly Gly Asn Ile Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys

1

5

10

15

Gly

<210> 51

<211> 8

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 51

Ile Gly Ser Gly Gly Gly Asn Ile

1

5

<210> 52

<211> 12

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 52

Leu Ile Phe Thr Thr Gly Phe Tyr Gly Met Asp Tyr

1

5

10

<210> 53

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 53

Ile Phe Thr Thr Gly Phe Tyr Gly Met Asp

1

5

10

<210> 54

<211> 14

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 54

Ala Arg Leu Ile Phe Thr Thr Gly Phe Tyr Gly Met Asp Tyr

1

5

10

<210> 55

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 55

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr Leu Asn

1	5	10
---	---	----

<210> 56  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 56  
Ser Gln Asp Ile Ser Ser Tyr  
1 5  
<210> 57  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 57  
Gln Asp Ile Ser Ser Tyr  
1 5  
<210> 58  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 58  
Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser  
1 5  
<210> 59  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 59  
Gln Gln Gly Asn Ala Leu Pro Trp Thr  
1 5  
<210> 60  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 60  
Gly Asn Ala Leu Pro Trp  
1 5  
<210> 61  
<211> 5  
<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 61

Asp Tyr Asn Met Asn

1 5

<210> 62

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 62

Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr

1 5

<210> 63

<211> 8

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 63

Gly Tyr Ser Phe Ser Asp Tyr Asn

1 5

<210> 64

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 64

Asn Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Ala Thr Ser Tyr Asn Gln Arg Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 65

<211> 8

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 65

Ile Asp Pro Tyr Tyr Gly Ala Thr

1 5

<210> 66

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 66

Gly Asp Ser Leu Phe Ala Tyr



1 5  
<210> 67  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 67  
Asp Ser Leu Phe Ala  
1 5  
<210> 68  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 68  
Ala Arg Gly Asp Ser Leu Phe Ala Tyr  
1 5  
<210> 69  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 69  
Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala  
1 5 10  
<210> 70  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 70  
Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn  
1 5  
<210> 71  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 71  
Gln Asn Val Gly Thr Asn  
1 5  
<210> 72  
<211> 7  
<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 72  
Ser Ala Ser Ser Arg Tyr Ser  
1 5  
<210> 73  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 73  
Gln Gln Tyr Ile Thr Tyr Pro Tyr Thr  
1 5  
<210> 74  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 74  
Tyr Ile Thr Tyr Pro Tyr  
1 5  
<210> 75  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 75  
Ser Tyr Trp Met His  
1 5  
<210> 76  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 76  
Tyr Phe Thr Phe Thr Ser Tyr  
1 5  
<210> 77  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 77  
Tyr Phe Thr Phe Thr Ser Tyr Trp  
1 5

<210> 78

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 78

Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Glu

1 5 10 15

Ser

<210> 79

<211> 8

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 79

Ile Asn Pro Ser Asn Gly His Thr

1 5

<210> 80

<211> 13

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 80

Gly Val Glu Ser Tyr Asp Phe Asp Asp Ala Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 81

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 81

Val Glu Ser Tyr Asp Phe Asp Asp Ala Leu Asp

1 5 10

<210> 82

<211> 15

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 82

Ala Asn Gly Val Glu Ser Tyr Asp Phe Asp Asp Ala Leu Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 83

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 83  
Arg Ala Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr Leu Asn  
1 5 10  
<210> 84  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 84  
Ser Gln Asp Ile Asn Asn Tyr  
1 5  
<210> 85  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 85  
Gln Asp Ile Asn Asn Tyr  
1 5  
<210> 86  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 86  
Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Phe Thr  
1 5  
<210> 87  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 87  
Gly Asn Thr Leu Pro Phe  
1 5  
<210> 88  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 88  
Val Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr  
1 5

<210> 89

<211> 8

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 89

Val Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp

1 5

<210> 90

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 90

Glu Ile Asn Pro Ser Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Thr

<210> 91

<211> 8

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 91

Ile Asn Pro Ser Asn Gly His Thr

1 5

<210> 92

<211> 13

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 92

Gly Val Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Asp Ala Met Asp Tyr

1 5 10

<210> 93

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 93

Val Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Asp Ala Met Asp

1 5 10

<210> 94

<211> 15

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 94

Ala Asn Gly Val Glu Thr Tyr Asp Phe Asp Asp Ala Met Asp Tyr

1 5 10 15

<210> 95

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 95

Phe Thr Ser Arg Leu His Ser

1 5

<210> 96

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 96

Gln Gln Gly Asp Thr Phe Pro Phe Thr

1 5

<210> 97

<211> 6

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 97

Gly Asp Thr Phe Pro Phe

1 5

<210> 98

<211> 5

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 98

Asn Tyr Glu Met Asn

1 5

<210> 99

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 99

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

1 5

<210> 100

<211> 8

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 100

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Glu

1 5

<210> 101

<211> 16

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 101

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys

1 5 10 15

<210> 102

<211> 8

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 102

Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Ser

1 5

<210> 103

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 103

Asp Asp Tyr Gly Arg Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 104

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 104

Asp Tyr Gly Arg Ser Tyr Gly Phe Ala

1 5

<210> 105

<211> 13

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 105

Val Arg Asp Asp Tyr Gly Arg Ser Tyr Gly Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 106

<211> 15

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 106

Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe Met His

1 5 10 15

<210> 107

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 107

Ser Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe

1 5 10

<210> 108

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 108

Glu Ser Val Asp Ser Tyr Gly Asn Ser Phe

1 5 10

<210> 109

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 109

Leu Ala Ser Lys Leu Glu Ser

1 5

<210> 110

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 110

His Gln Asn Asn Glu Asp Pro Pro Trp Thr

1 5 10

<210> 111



<211> 7  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 111  
Asn Asn Glu Asp Pro Pro Trp  
1 5  
<210> 112  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 112  
Asp Tyr Ser Met His  
1 5  
<210> 113  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 113  
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr  
1 5  
<210> 114  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 114  
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Ser  
1 5  
<210> 115  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 115  
Trp Ile Ile Thr Glu Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Arg  
1 5 10 15  
Gly  
<210> 116  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 116

Ile Ile Thr Glu Thr Gly Glu Pro

1 5

<210> 117

<211> 5

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 117

Asp Phe Asp Gly Tyr

1 5

<210> 118

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 118

Ala Arg Asp Phe Asp Gly Tyr

1 5

<210> 119

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 119

Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr Leu Ala

1 5 10

<210> 120

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 120

Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr

1 5

<210> 121

<211> 6

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 121

Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr

1 5

<210> 122

<211> 7  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 122  
Asn Ala Lys Thr Leu Thr Glu  
1 5  
<210> 123  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 123  
Gln His His Tyr Gly Phe Pro Trp Thr  
1 5  
<210> 124  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 124  
His Tyr Gly Phe Pro Trp  
1 5  
<210> 125  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 125  
Thr Phe Gly Met His  
1 5  
<210> 126  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 126  
Gly Phe Thr Phe Ser Thr Phe  
1 5  
<210> 127  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 127

Gly Phe Thr Phe Ser Thr Phe Gly

1 5

<210> 128

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 128

Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Asn Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 129

<211> 8

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 129

Ile Ser Ser Gly Ser Asn Ala Ile

1 5

<210> 130

<211> 9

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 130

Pro Gly Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr

1 5

<210> 131

<211> 7

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 131

Gly Tyr Gly Ala Trp Phe Ala

1 5

<210> 132

<211> 11

<212> PRT

<213> 小家鼠 (Mus musculus)

<400> 132

Ala Ser Pro Gly Tyr Gly Ala Trp Phe Ala Tyr

1 5 10

<210> 133

<211> 12  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 133  
Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ala Tyr Leu His  
1 5 10  
<210> 134  
<211> 8  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 134  
Ser Ser Ser Val Ser Ser Ala Tyr  
1 5  
<210> 135  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 135  
Ser Ser Val Ser Ser Ala Tyr  
1 5  
<210> 136  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 136  
Ser Thr Ser Asn Leu Ala Ser  
1 5  
<210> 137  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 137  
Gln Gln Tyr Ser Ala Tyr Pro Tyr Thr  
1 5  
<210> 138  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 138

Tyr Ser Ala Tyr Pro Tyr

1 5

<210> 139

<211> 17

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 139

Val Ile Ser Thr Tyr Asn Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 140

<211> 8

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 140

Ile Ser Thr Tyr Asn Gly Asn Thr

1 5

<210> 141

<211> 12

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 141

Arg Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Ser Trp Phe Gly Tyr

1 5 10

<210> 142

<211> 10

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 142

Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Ser Trp Phe Gly

1 5 10

<210> 143

<211> 14

<212> PRT

<213> 小家鼠 (*Mus musculus*)

<400> 143

Ala Arg Arg Gly Tyr Tyr Gly Ser Ser Ser Trp Phe Gly Tyr

1 5 10

<210> 144

<211> 11  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 144  
Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asp Val Ala  
1 5 10  
<210> 145  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 145  
Ser Gln Asn Val Gly Thr Asp  
1 5  
<210> 146  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 146  
Gln Asn Val Gly Thr Asp  
1 5  
<210> 147  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 147  
Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser  
1 5  
<210> 148  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 148  
Gln Gln Tyr Asn Ser Phe Pro Tyr Thr  
1 5  
<210> 149  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 小家鼠 (Mus musculus)  
<400> 149

Tyr Asn Ser Phe Pro Tyr  
 1 5  
 <210> 150  
 <211> 449  
 <212> PRT  
 <213> 智人(homo sapiens)  
 <400> 150  
 Gln Lys Ser Asn Arg Lys Asp Tyr Ser Leu Thr Met Gln Ser Ser Val  
 1 5 10 15  
 Thr Val Gln Glu Gly Met Cys Val His Val Arg Cys Ser Phe Ser Tyr  
 20 25 30  
 Pro Val Asp Ser Gln Thr Asp Ser Asp Pro Val His Gly Tyr Trp Phe  
 35 40 45  
 Arg Ala Gly Asn Asp Ile Ser Trp Lys Ala Pro Val Ala Thr Asn Asn  
 50 55 60  
 Pro Ala Trp Ala Val Gln Glu Glu Thr Arg Asp Arg Phe His Leu Leu  
 65 70 75 80  
 Gly Asp Pro Gln Thr Lys Asn Cys Thr Leu Ser Ile Arg Asp Ala Arg  
 85 90 95  
 Met Ser Asp Ala Gly Arg Tyr Phe Phe Arg Met Glu Lys Gly Asn Ile  
 100 105 110  
 Lys Trp Asn Tyr Lys Tyr Asp Gln Leu Ser Val Asn Val Thr Ala Leu  
 115 120 125  
 Thr His Arg Pro Asn Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu Ser Gly Cys  
 130 135 140  
 Phe Gln Asn Leu Thr Cys Ser Val Pro Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr  
 145 150 155 160  
 Pro Pro Met Ile Ser Trp Met Gly Thr Ser Val Ser Pro Leu His Pro  
 165 170 175  
 Ser Thr Thr Arg Ser Ser Val Leu Thr Leu Ile Pro Gln Pro Gln His  
 180 185 190  
 His Gly Thr Ser Leu Thr Cys Gln Val Thr Leu Pro Gly Ala Gly Val  
 195 200 205  
 Thr Thr Asn Arg Thr Ile Gln Leu Asn Val Ser Tyr Pro Pro Gln Asn  
 210 215 220  
 Leu Thr Val Thr Val Phe Gln Gly Glu Gly Thr Ala Ser Thr Ala Leu  
 225 230 235 240  
 Gly Asn Ser Ser Ser Leu Ser Val Leu Glu Gly Gln Ser Leu Arg Leu  
 245 250 255



Val Cys Ala Val Asp Ser Asn Pro Pro Ala Arg Leu Ser Trp Thr Trp			
260	265	270	
Arg Ser Leu Thr Leu Tyr Pro Ser Gln Pro Ser Asn Pro Leu Val Leu			
275	280	285	
Glu Leu Gln Val His Leu Gly Asp Glu Gly Glu Phe Thr Cys Arg Ala			
290	295	300	
Gln Asn Ser Leu Gly Ser Gln His Val Ser Leu Asn Leu Ser Leu Gln			
305	310	315	320
Gln Glu Tyr Thr Gly Lys Met Arg Pro Val Ser Gly Val Leu Leu Gly			
325	330	335	
Ala Val Gly Gly Ala Gly Ala Thr Ala Leu Val Phe Leu Ser Phe Cys			
340	345	350	
Val Ile Phe Ile Val Val Arg Ser Cys Arg Lys Lys Ser Ala Arg Pro			
355	360	365	
Ala Ala Asp Val Gly Asp Ile Gly Met Lys Asp Ala Asn Thr Ile Arg			
370	375	380	
Gly Ser Ala Ser Gln Gly Asn Leu Thr Glu Ser Trp Ala Asp Asp Asn			
385	390	395	400
Pro Arg His His Gly Leu Ala Ala His Ser Ser Gly Glu Glu Arg Glu			
405	410	415	
Ile Gln Tyr Ala Pro Leu Ser Phe His Lys Gly Glu Pro Gln Asp Leu			
420	425	430	
Ser Gly Gln Glu Ala Thr Asn Asn Glu Tyr Ser Glu Ile Lys Ile Pro			
435	440	445	

Lys

&lt;210&gt; 151

&lt;211&gt; 446

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人(homo sapiens)

&lt;400&gt; 151

Gln Thr Ser Lys Leu Leu Thr Met Gln Ser Ser Val Thr Val Gln Glu			
1	5	10	15
Gly Leu Cys Val His Val Pro Cys Ser Phe Ser Tyr Pro Ser His Gly			
20	25	30	
Trp Ile Tyr Pro Gly Pro Val Val His Gly Tyr Trp Phe Arg Glu Gly			
35	40	45	
Ala Asn Thr Asp Gln Asp Ala Pro Val Ala Thr Asn Asn Pro Ala Arg			
50	55	60	
Ala Val Trp Glu Glu Thr Arg Asp Arg Phe His Leu Leu Gly Asp Pro			

65	70	75	80
His Thr Lys Asn Cys Thr Leu Ser Ile Arg Asp Ala Arg Arg Ser Asp			
	85	90	95
Ala Gly Arg Tyr Phe Phe Arg Met Glu Lys Gly Ser Ile Lys Trp Asn			
	100	105	110
Tyr Lys His His Arg Leu Ser Val Asn Val Thr Ala Leu Thr His Arg			
	115	120	125
Pro Asn Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu Ser Gly Cys Pro Gln Asn			
	130	135	140
Leu Thr Cys Ser Val Pro Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro Met			
145	150	155	160
Ile Ser Trp Ile Gly Thr Ser Val Ser Pro Leu Asp Pro Ser Thr Thr			
	165	170	175
Arg Ser Ser Val Leu Thr Leu Ile Pro Gln Pro Gln Asp His Gly Thr			
	180	185	190
Ser Leu Thr Cys Gln Val Thr Phe Pro Gly Ala Ser Val Thr Thr Asn			
	195	200	205
Lys Thr Val His Leu Asn Val Ser Tyr Pro Pro Gln Asn Leu Thr Met			
	210	215	220
Thr Val Phe Gln Gly Asp Gly Thr Val Ser Thr Val Leu Gly Asn Gly			
225	230	235	240
Ser Ser Leu Ser Leu Pro Glu Gly Gln Ser Leu Arg Leu Val Cys Ala			
	245	250	255
Val Asp Ala Val Asp Ser Asn Pro Pro Ala Arg Leu Ser Leu Ser Trp			
	260	265	270
Arg Gly Leu Thr Leu Cys Pro Ser Gln Pro Ser Asn Pro Gly Val Leu			
	275	280	285
Glu Leu Pro Trp Val His Leu Arg Asp Ala Ala Glu Phe Thr Cys Arg			
	290	295	300
Ala Gln Asn Pro Leu Gly Ser Gln Gln Val Tyr Leu Asn Val Ser Leu			
305	310	315	320
Gln Ser Lys Ala Thr Ser Gly Val Thr Gln Gly Val Val Gly Gly Ala			
	325	330	335
Gly Ala Thr Ala Leu Val Phe Leu Ser Phe Cys Val Ile Phe Val Val			
	340	345	350
Val Arg Ser Cys Arg Lys Lys Ser Ala Arg Pro Ala Ala Gly Val Gly			
	355	360	365
Asp Thr Gly Ile Glu Asp Ala Asn Ala Val Arg Gly Ser Ala Ser Gln			
	370	375	380

Gly Pro Leu Thr Glu Pro Trp Ala Glu Asp Ser Pro Pro Asp Gln Pro  
 385 390 395 400  
 Pro Pro Ala Ser Ala Arg Ser Ser Val Gly Glu Gly Glu Leu Gln Tyr  
 405 410 415  
 Ala Ser Leu Ser Phe Gln Met Val Lys Pro Trp Asp Ser Arg Gly Gln  
 420 425 430  
 Glu Ala Thr Asp Thr Glu Tyr Ser Glu Ile Lys Ile His Arg  
 435 440 445  
 <210> 152  
 <211> 347  
 <212> PRT  
 <213> 智人(homo sapiens)  
 <400> 152  
 Asp Pro Asn Phe Trp Leu Gln Val Gln Glu Ser Val Thr Val Gln Glu  
 1 5 10 15  
 Gly Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Thr Phe Phe His Pro Ile Pro Tyr  
 20 25 30  
 Tyr Asp Lys Asn Ser Pro Val His Gly Tyr Trp Phe Arg Glu Gly Ala  
 35 40 45  
 Ile Ile Ser Gly Asp Ser Pro Val Ala Thr Asn Lys Leu Asp Gln Glu  
 50 55 60  
 Val Gln Glu Glu Thr Gln Gly Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asp Pro Ser  
 65 70 75 80  
 Arg Asn Asn Cys Ser Leu Ser Ile Val Asp Ala Arg Arg Arg Asp Asn  
 85 90 95  
 Gly Ser Tyr Phe Phe Arg Met Glu Arg Gly Ser Thr Lys Tyr Ser Tyr  
 100 105 110  
 Lys Ser Pro Gln Leu Ser Val His Val Thr Asp Leu Thr His Arg Pro  
 115 120 125  
 Lys Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu Pro Gly His Ser Lys Asn Leu  
 130 135 140  
 Thr Cys Ser Val Ser Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro Ile Phe  
 145 150 155 160  
 Ser Trp Leu Ser Ala Ala Pro Thr Ser Leu Gly Pro Arg Thr Thr His  
 165 170 175  
 Ser Ser Val Leu Ile Ile Thr Pro Arg Pro Gln Asp His Gly Thr Asn  
 180 185 190  
 Leu Thr Cys Gln Val Lys Phe Ala Gly Ala Gly Val Thr Thr Glu Arg  
 195 200 205

Thr Ile Gln Leu Asn Val Thr Tyr Val Pro Gln Asn Pro Thr Thr Gly			
210	215	220	
Ile Phe Pro Gly Asp Gly Ser Gly Lys Gln Glu Thr Arg Ala Gly Val			
225	230	235	240
Val His Gly Ala Ile Gly Gly Ala Gly Val Thr Ala Leu Leu Ala Leu			
	245	250	255
Cys Leu Cys Leu Ile Phe Phe Ile Val Lys Thr His Arg Arg Lys Ala			
	260	265	270
Ala Arg Thr Ala Val Gly Arg Asn Asp Thr His Pro Thr Thr Gly Ser			
	275	280	285
Ala Ser Pro Lys His Gln Lys Lys Ser Lys Leu His Gly Pro Thr Glu			
	290	295	300
Thr Ser Ser Cys Ser Gly Ala Ala Pro Thr Val Glu Met Asp Glu Glu			
305	310	315	320
Leu His Tyr Ala Ser Leu Asn Phe His Gly Met Asn Pro Ser Lys Asp			
	325	330	335
Thr Ser Thr Glu Tyr Ser Glu Val Arg Thr Gln			
	340	345	
<210> 153			
<211> 535			
<212> PRT			
<213> 智人(homo sapiens)			
<400> 153			
Glu Lys Pro Val Tyr Glu Leu Gln Val Gln Lys Ser Val Thr Val Gln			
1	5	10	15
Glu Gly Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Ser Phe Ser Tyr Pro Trp Arg			
	20	25	30
Ser Trp Tyr Ser Ser Pro Pro Leu Tyr Val Tyr Trp Phe Arg Asp Gly			
	35	40	45
Glu Ile Pro Tyr Tyr Ala Glu Val Val Ala Thr Asn Asn Pro Asp Arg			
	50	55	60
Arg Val Lys Pro Glu Thr Gln Gly Arg Phe Arg Leu Leu Gly Asp Val			
65	70	75	80
Gln Lys Lys Asn Cys Ser Leu Ser Ile Gly Asp Ala Arg Met Glu Asp			
	85	90	95
Thr Gly Ser Tyr Phe Phe Arg Val Glu Arg Gly Arg Asp Val Lys Tyr			
	100	105	110
Ser Tyr Gln Gln Asn Lys Leu Asn Leu Glu Val Thr Ala Leu Ile Glu			
	115	120	125

Lys	Pro	Asp	Ile	His	Phe	Leu	Glu	Pro	Leu	Glu	Ser	Gly	Arg	Pro	Thr
130						135					140				
Arg	Leu	Ser	Cys	Ser	Leu	Pro	Gly	Ser	Cys	Glu	Ala	Gly	Pro	Pro	Leu
145					150					155					160
Thr	Phe	Ser	Trp	Thr	Gly	Asn	Ala	Leu	Ser	Pro	Leu	Asp	Pro	Glu	Thr
				165					170					175	
Thr	Arg	Ser	Ser	Glu	Leu	Thr	Leu	Thr	Pro	Arg	Pro	Glu	Asp	His	Gly
			180					185					190		
Thr	Asn	Leu	Thr	Cys	Gln	Met	Lys	Arg	Gln	Gly	Ala	Gln	Val	Thr	Thr
	195						200					205			
Glu	Arg	Thr	Val	Gln	Leu	Asn	Val	Ser	Tyr	Ala	Pro	Gln	Thr	Ile	Thr
	210					215					220				
Ile	Phe	Arg	Asn	Gly	Ile	Ala	Leu	Glu	Ile	Leu	Gln	Asn	Thr	Ser	Tyr
225				230						235					240
Leu	Pro	Val	Leu	Glu	Gly	Gln	Ala	Leu	Arg	Leu	Leu	Cys	Asp	Ala	Pro
				245					250					255	
Ser	Asn	Pro	Pro	Ala	His	Leu	Ser	Trp	Phe	Gln	Gly	Ser	Pro	Ala	Leu
			260					265						270	
Asn	Ala	Thr	Pro	Ile	Ser	Asn	Thr	Gly	Ile	Leu	Glu	Leu	Arg	Arg	Val
	275						280					285			
Arg	Ser	Ala	Glu	Glu	Gly	Gly	Phe	Thr	Cys	Arg	Ala	Gln	His	Pro	Leu
	290					295					300				
Gly	Phe	Leu	Gln	Ile	Phe	Leu	Asn	Leu	Ser	Val	Tyr	Ser	Leu	Pro	Gln
305					310						315				320
Leu	Leu	Gly	Pro	Ser	Cys	Ser	Trp	Glu	Ala	Glu	Gly	Leu	His	Cys	Arg
				325					330					335	
Cys	Ser	Phe	Arg	Ala	Arg	Pro	Ala	Pro	Ser	Leu	Cys	Trp	Arg	Leu	Glu
			340					345						350	
Glu	Lys	Pro	Leu	Glu	Gly	Asn	Ser	Ser	Gln	Gly	Ser	Phe	Lys	Val	Asn
	355						360					365			
Ser	Ser	Ser	Ala	Gly	Pro	Trp	Ala	Asn	Ser	Ser	Leu	Ile	Leu	His	Gly
	370					375					380				
Gly	Leu	Ser	Ser	Asp	Leu	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Trp	Asn	Ile	Tyr
385				390						395					400
Gly	Ser	Gln	Ser	Gly	Ser	Val	Leu	Leu	Leu	Gln	Gly	Arg	Ser	Asn	Leu
				405					410					415	
Gly	Thr	Gly	Val	Val	Pro	Ala	Ala	Leu	Gly	Gly	Ala	Gly	Val	Met	Ala
			420					425					430		
Leu	Leu	Cys	Ile	Cys	Leu	Cys	Leu	Ile	Phe	Phe	Leu	Ile	Val	Lys	Ala

435	440	445
Arg Arg Lys Gln Ala Ala Gly Arg Pro Glu Lys Met Asp Asp Glu Asp		
450	455	460
Pro Ile Met Gly Thr Ile Thr Ser Gly Ser Arg Lys Lys Pro Trp Pro		
465	470	475
Asp Ser Pro Gly Asp Gln Ala Ser Pro Pro Gly Asp Ala Pro Pro Leu		
485	490	495
Glu Glu Gln Lys Glu Leu His Tyr Ala Ser Leu Ser Phe Ser Glu Met		
500	505	510
Lys Ser Arg Glu Pro Lys Asp Gln Glu Ala Pro Ser Thr Thr Glu Tyr		
515	520	525
Ser Glu Ile Lys Thr Ser Lys		
530	535	
<210> 154		
<211> 411		
<212> PRT		
<213> 智人(homo sapiens)		
<400> 154		
Gln Glu Arg Arg Phe Gln Leu Glu Gly Pro Glu Ser Leu Thr Val Gln		
1	5	10
Glu Gly Leu Cys Val Leu Val Pro Cys Arg Leu Pro Thr Thr Leu Pro		
20	25	30
Ala Ser Tyr Tyr Gly Tyr Gly Tyr Trp Phe Leu Glu Gly Ala Asp Val		
35	40	45
Pro Val Ala Thr Asn Asp Pro Asp Glu Glu Val Gln Glu Glu Thr Arg		
50	55	60
Gly Arg Phe His Leu Leu Trp Asp Pro Arg Arg Lys Asn Cys Ser Leu		
65	70	75
Ser Ile Arg Asp Ala Arg Arg Arg Asp Asn Ala Ala Tyr Phe Phe Arg		
85	90	95
Leu Lys Ser Lys Trp Met Lys Tyr Gly Tyr Thr Ser Ser Lys Leu Ser		
100	105	110
Val Arg Val Met Ala Leu Thr His Arg Pro Asn Ile Ser Ile Pro Gly		
115	120	125
Thr Leu Glu Ser Gly His Pro Ser Asn Leu Thr Cys Ser Val Pro Trp		
130	135	140
Val Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro Ile Phe Ser Trp Met Ser Ala Ala		
145	150	155
Pro Thr Ser Leu Gly Pro Arg Thr Thr Gln Ser Ser Val Leu Thr Ile		

				165						170					175	
Thr	Pro	Arg	Pro	Gln	Asp	His	Ser	Thr	Asn	Leu	Thr	Cys	Gln	Val	Thr	
				180						185					190	
Phe	Pro	Gly	Ala	Gly	Val	Thr	Met	Glu	Arg	Thr	Ile	Gln	Leu	Asn	Val	
				195						200					205	
Ser	Ser	Phe	Lys	Ile	Leu	Gln	Asn	Thr	Ser	Ser	Leu	Pro	Val	Leu	Glu	
				210						215					220	
Gly	Gln	Ala	Leu	Arg	Leu	Leu	Cys	Asp	Ala	Asp	Gly	Asn	Pro	Pro	Ala	
225										230					235	240
His	Leu	Ser	Trp	Phe	Gln	Gly	Phe	Pro	Ala	Leu	Asn	Ala	Thr	Pro	Ile	
				245						250					255	
Ser	Asn	Thr	Gly	Val	Leu	Glu	Leu	Pro	Gln	Val	Gly	Ser	Ala	Glu	Glu	
				260						265					270	
Gly	Asp	Phe	Thr	Cys	Arg	Ala	Gln	His	Pro	Leu	Gly	Ser	Leu	Gln	Ile	
				275						280					285	
Ser	Leu	Ser	Leu	Phe	Val	His	Trp	Lys	Pro	Glu	Gly	Arg	Ala	Gly	Gly	
				290						295					300	
Val	Leu	Gly	Ala	Val	Trp	Gly	Ala	Ser	Ile	Thr	Thr	Leu	Val	Phe	Leu	
305										310					315	320
Cys	Val	Cys	Phe	Ile	Phe	Arg	Val	Lys	Thr	Arg	Arg	Lys	Lys	Ala	Ala	
				325						330					335	
Gln	Pro	Val	Gln	Asn	Thr	Asp	Asp	Val	Asn	Pro	Val	Met	Val	Ser	Gly	
				340						345					350	
Ser	Arg	Gly	His	Gln	His	Gln	Phe	Gln	Thr	Gly	Ile	Val	Ser	Asp	His	
				355						360					365	
Pro	Ala	Glu	Ala	Gly	Pro	Ile	Ser	Glu	Asp	Glu	Gln	Glu	Leu	His	Tyr	
				370						375					380	
Ala	Val	Leu	His	Phe	His	Lys	Val	Gln	Pro	Gln	Glu	Pro	Lys	Val	Thr	
385										390					395	400
Asp	Thr	Glu	Tyr	Ser	Glu	Ile	Lys	Ile	His	Lys						
				405						410						
<210> 155																
<211> 483																
<212> PRT																
<213> 智人(homo sapiens)																
<400> 155																
Met	Glu	Gly	Asp	Arg	Gln	Tyr	Gly	Asp	Gly	Tyr	Leu	Leu	Gln	Val	Gln	
1				5						10				15		
Glu	Leu	Val	Thr	Val	Gln	Glu	Gly	Leu	Cys	Val	His	Val	Pro	Cys	Ser	

20	25	30
Phe Ser Tyr Pro Gln Asp Gly Trp Thr Asp Ser Asp Pro Val His Gly		
35	40	45
Tyr Trp Phe Arg Ala Gly Asp Arg Pro Tyr Gln Asp Ala Pro Val Ala		
50	55	60
Thr Asn Asn Pro Asp Arg Glu Val Gln Ala Glu Thr Gln Gly Arg Phe		
65	70	75
Gln Leu Leu Gly Asp Ile Trp Ser Asn Asp Cys Ser Leu Ser Ile Arg		
85	90	95
Asp Ala Arg Lys Arg Asp Lys Gly Ser Tyr Phe Phe Arg Leu Glu Arg		
100	105	110
Gly Ser Met Lys Trp Ser Tyr Lys Ser Gln Leu Asn Tyr Lys Thr Lys		
115	120	125
Gln Leu Ser Val Phe Val Thr Ala Leu Thr His Arg Pro Asp Ile Leu		
130	135	140
Ile Leu Gly Thr Leu Glu Ser Gly His Ser Arg Asn Leu Thr Cys Ser		
145	150	155
Val Pro Trp Ala Cys Lys Gln Gly Thr Pro Pro Met Ile Ser Trp Ile		
165	170	175
Gly Ala Ser Val Ser Ser Pro Gly Pro Thr Thr Ala Arg Ser Ser Val		
180	185	190
Leu Thr Leu Thr Pro Lys Pro Gln Asp His Gly Thr Ser Leu Thr Cys		
195	200	205
Gln Val Thr Leu Pro Gly Thr Gly Val Thr Thr Thr Ser Thr Val Arg		
210	215	220
Leu Asp Val Ser Tyr Pro Pro Trp Asn Leu Thr Met Thr Val Phe Gln		
225	230	235
Gly Asp Ala Thr Ala Ser Thr Ala Leu Gly Asn Gly Ser Ser Leu Ser		
245	250	255
Val Leu Glu Gly Gln Ser Leu Arg Leu Val Cys Ala Val Asn Ser Asn		
260	265	270
Pro Pro Ala Arg Leu Ser Trp Thr Arg Gly Ser Leu Thr Leu Cys Pro		
275	280	285
Ser Arg Ser Ser Asn Pro Gly Leu Leu Glu Leu Pro Arg Val His Val		
290	295	300
Arg Asp Glu Gly Glu Phe Thr Cys Arg Ala Gln Asn Ala Gln Gly Ser		
305	310	315
Gln His Ile Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gln Asn Glu Gly Thr Gly Thr		
325	330	335



Ser Arg Pro Val Ser Gln Val Thr Leu Ala Ala Val Gly Gly Ala Gly  
 340 345 350  
 Ala Thr Ala Leu Ala Phe Leu Ser Phe Cys Ile Ile Phe Ile Ile Val  
 355 360 365  
 Arg Ser Cys Arg Lys Lys Ser Ala Arg Pro Ala Ala Gly Val Gly Asp  
 370 375 380  
 Thr Gly Met Glu Asp Ala Lys Ala Ile Arg Gly Ser Ala Ser Gln Gly  
 385 390 395 400  
 Pro Leu Thr Glu Ser Trp Lys Asp Gly Asn Pro Leu Lys Lys Pro Pro  
 405 410 415  
 Pro Ala Val Ala Pro Ser Ser Gly Glu Glu Gly Glu Leu His Tyr Ala  
 420 425 430  
 Thr Leu Ser Phe His Lys Val Lys Pro Gln Asp Pro Gln Gly Gln Glu  
 435 440 445  
 Ala Thr Asp Ser Glu Tyr Ser Glu Ile Lys Ile His Lys Arg Glu Thr  
 450 455 460  
 Ala Glu Thr Gln Ala Cys Leu Arg Asn His Asn Pro Ser Ser Lys Glu  
 465 470 475 480  
 Val Arg Gly  
 <210> 156  
 <211> 681  
 <212> PRT  
 <213> 智人(homo sapiens)  
 <400> 156  
 Met Asp Gly Arg Phe Trp Ile Arg Val Gln Glu Ser Val Met Val Pro  
 1 5 10 15  
 Glu Gly Leu Cys Ile Ser Val Pro Cys Ser Phe Ser Tyr Pro Arg Gln  
 20 25 30  
 Asp Trp Thr Gly Ser Thr Pro Ala Tyr Gly Tyr Trp Phe Lys Ala Val  
 35 40 45  
 Thr Glu Thr Thr Lys Gly Ala Pro Val Ala Thr Asn His Gln Ser Arg  
 50 55 60  
 Glu Val Glu Met Ser Thr Arg Gly Arg Phe Gln Leu Thr Gly Asp Pro  
 65 70 75 80  
 Ala Lys Gly Asn Cys Ser Leu Val Ile Arg Asp Ala Gln Met Gln Asp  
 85 90 95  
 Glu Ser Gln Tyr Phe Phe Arg Val Glu Arg Gly Ser Tyr Val Arg Tyr  
 100 105 110  
 Asn Phe Met Asn Asp Gly Phe Phe Leu Lys Val Thr Ala Leu Thr Gln

115	120	125
Lys Pro Asp Val Tyr Ile Pro Glu Thr Leu Glu Pro Gly Gln Pro Val		
130	135	140
Thr Val Ile Cys Val Phe Asn Trp Ala Phe Glu Glu Cys Pro Pro Pro		
145	150	155
Ser Phe Ser Trp Thr Gly Ala Ala Leu Ser Ser Gln Gly Thr Lys Pro		
165	170	175
Thr Thr Ser His Phe Ser Val Leu Ser Phe Thr Pro Arg Pro Gln Asp		
180	185	190
His Asn Thr Asp Leu Thr Cys His Val Asp Phe Ser Arg Lys Gly Val		
195	200	205
Ser Val Gln Arg Thr Val Arg Leu Arg Val Ala Tyr Ala Pro Arg Asp		
210	215	220
Leu Val Ile Ser Ile Ser Arg Asp Asn Thr Pro Ala Leu Glu Pro Gln		
225	230	235
Pro Gln Gly Asn Val Pro Tyr Leu Glu Ala Gln Lys Gly Gln Phe Leu		
245	250	255
Arg Leu Leu Cys Ala Ala Asp Ser Gln Pro Pro Ala Thr Leu Ser Trp		
260	265	270
Val Leu Gln Asn Arg Val Leu Ser Ser Ser His Pro Trp Gly Pro Arg		
275	280	285
Pro Leu Gly Leu Glu Leu Pro Gly Val Lys Ala Gly Asp Ser Gly Arg		
290	295	300
Tyr Thr Cys Arg Ala Glu Asn Arg Leu Gly Ser Gln Gln Arg Ala Leu		
305	310	315
Asp Leu Ser Val Gln Tyr Pro Pro Glu Asn Leu Arg Val Met Val Ser		
325	330	335
Gln Ala Asn Arg Thr Val Leu Glu Asn Leu Gly Asn Gly Thr Ser Leu		
340	345	350
Pro Val Leu Glu Gly Gln Ser Leu Cys Leu Val Cys Val Thr His Ser		
355	360	365
Ser Pro Pro Ala Arg Leu Ser Trp Thr Gln Arg Gly Gln Val Leu Ser		
370	375	380
Pro Ser Gln Pro Ser Asp Pro Gly Val Leu Glu Leu Pro Arg Val Gln		
385	390	395
Val Glu His Glu Gly Glu Phe Thr Cys His Ala Arg His Pro Leu Gly		
405	410	415
Ser Gln His Val Ser Leu Ser Leu Ser Val His Tyr Ser Pro Lys Leu		
420	425	430

Leu Gly Pro Ser Cys Ser Trp	Glu Ala Glu Gly Leu His Cys Ser Cys
435	440 445
Ser Ser Gln Ala Ser Pro Ala Pro Ser Leu Arg Trp Trp Leu Gly Glu	
450	455 460
Glu Leu Leu Glu Gly Asn Ser Ser Gln Asp Ser Phe Glu Val Thr Pro	
465	470 475 480
Ser Ser Ala Gly Pro Trp Ala Asn Ser Ser Leu Ser Leu His Gly Gly	
	485 490 495
Leu Ser Ser Gly Leu Arg Leu Arg Cys Glu Ala Trp Asn Val His Gly	
	500 505 510
Ala Gln Ser Gly Ser Ile Leu Gln Leu Pro Asp Lys Lys Gly Leu Ile	
	515 520 525
Ser Thr Ala Phe Ser Asn Gly Ala Phe Leu Gly Ile Gly Ile Thr Ala	
530	535 540
Leu Leu Phe Leu Cys Leu Ala Leu Ile Ile Met Lys Ile Leu Pro Lys	
545	550 555 560
Arg Arg Thr Gln Thr Glu Thr Pro Arg Pro Arg Phe Ser Arg His Ser	
	565 570 575
Thr Ile Leu Asp Tyr Ile Asn Val Val Pro Thr Ala Gly Pro Leu Ala	
	580 585 590
Gln Lys Arg Asn Gln Lys Ala Thr Pro Asn Ser Pro Arg Thr Pro Leu	
	595 600 605
Pro Pro Gly Ala Pro Ser Pro Glu Ser Lys Lys Asn Gln Lys Lys Gln	
610	615 620
Tyr Gln Leu Pro Ser Phe Pro Glu Pro Lys Ser Ser Thr Gln Ala Pro	
625	630 635 640
Glu Ser Gln Glu Ser Gln Glu Glu Leu His Tyr Ala Thr Leu Asn Phe	
	645 650 655
Pro Gly Val Arg Pro Arg Pro Glu Ala Arg Met Pro Lys Gly Thr Gln	
	660 665 670
Ala Asp Tyr Ala Glu Val Lys Phe Gln	
675	680
<210> 157	
<211> 670	
<212> PRT	
<213> 智人(homo sapiens)	
<400> 157	
Asn Lys Asp Pro Ser Tyr Ser Leu Gln Val Gln Arg Gln Val Pro Val	
1	5 10 15

Pro	Glu	Gly	Leu	Cys	Val	Ile	Val	Ser	Cys	Asn	Leu	Ser	Tyr	Pro	Arg	
20					25					30						
Asp	Gly	Trp	Asp	Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Tyr	Gly	Tyr	Trp	Phe	Lys	Gly	
35					40					45						
Arg	Thr	Ser	Pro	Lys	Thr	Gly	Ala	Pro	Val	Ala	Thr	Asn	Asn	Gln	Ser	
50					55					60						
Arg	Glu	Val	Glu	Met	Ser	Thr	Arg	Asp	Arg	Phe	Gln	Leu	Thr	Gly	Asp	
65					70					75					80	
Pro	Gly	Lys	Gly	Ser	Cys	Ser	Leu	Val	Ile	Arg	Asp	Ala	Gln	Arg	Glu	
85					90					95						
Asp	Glu	Ala	Trp	Tyr	Phe	Phe	Arg	Val	Glu	Arg	Gly	Ser	Arg	Val	Arg	
100					105					110						
His	Ser	Phe	Leu	Ser	Asn	Ala	Phe	Phe	Leu	Lys	Val	Thr	Ala	Leu	Thr	
115					120					125						
Lys	Lys	Pro	Asp	Val	Tyr	Ile	Pro	Glu	Thr	Leu	Glu	Pro	Gly	Gln	Pro	
130					135					140						
Val	Thr	Val	Ile	Cys	Val	Phe	Asn	Trp	Ala	Phe	Lys	Lys	Cys	Pro	Ala	
145					150					155					160	
Pro	Ser	Phe	Ser	Trp	Thr	Gly	Ala	Ala	Leu	Ser	Pro	Arg	Arg	Thr	Arg	
165					170					175						
Pro	Ser	Thr	Ser	His	Phe	Ser	Val	Leu	Ser	Phe	Thr	Pro	Ser	Pro	Gln	
180					185					190						
Asp	His	Asp	Thr	Asp	Leu	Thr	Cys	His	Val	Asp	Phe	Ser	Arg	Lys	Gly	
195					200					205						
Val	Ser	Ala	Gln	Arg	Thr	Val	Arg	Leu	Arg	Val	Ala	Tyr	Ala	Pro	Lys	
210					215					220						
Asp	Leu	Ile	Ile	Ser	Ile	Ser	His	Asp	Asn	Thr	Ser	Ala	Leu	Glu	Leu	
225					230					235					240	
Gln	Gly	Asn	Val	Ile	Tyr	Leu	Glu	Val	Gln	Lys	Gly	Gln	Phe	Leu	Arg	
245					250					255						
Leu	Leu	Cys	Ala	Ala	Asp	Ser	Gln	Pro	Pro	Ala	Thr	Leu	Ser	Trp	Val	
260					265					270						
Leu	Gln	Asp	Arg	Val	Leu	Ser	Ser	Ser	His	Pro	Trp	Gly	Pro	Arg	Thr	
275					280					285						
Leu	Gly	Leu	Glu	Leu	Arg	Gly	Val	Arg	Ala	Gly	Asp	Ser	Gly	Arg	Tyr	
290					295					300						
Thr	Cys	Arg	Ala	Glu	Asn	Arg	Leu	Gly	Ser	Gln	Gln	Gln	Ala	Leu	Asp	
305					310					315					320	
Leu	Ser	Val	Gln	Tyr	Pro	Pro	Glu	Asn	Leu	Arg	Val	Met	Val	Ser	Gln	

				325						330					335		
Ala	Asn	Arg	Thr	Val	Leu	Glu	Asn	Leu	Gly	Asn	Gly	Thr	Ser	Leu	Pro		
				340						345					350		
Val	Leu	Glu	Gly	Gln	Ser	Leu	Arg	Leu	Val	Cys	Val	Thr	His	Ser	Ser		
				355						360					365		
Pro	Pro	Ala	Arg	Leu	Ser	Trp	Thr	Arg	Trp	Gly	Gln	Thr	Val	Gly	Pro		
				370						375					380		
Ser	Gln	Pro	Ser	Asp	Pro	Gly	Val	Leu	Glu	Leu	Pro	Pro	Ile	Gln	Met		
385						390					395				400		
Glu	His	Glu	Gly	Glu	Phe	Thr	Cys	His	Ala	Gln	His	Pro	Leu	Gly	Ser		
				405						410					415		
Gln	His	Val	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Val	His	Tyr	Pro	Pro	Gln	Leu	Leu		
				420						425					430		
Gly	Pro	Ser	Cys	Ser	Trp	Glu	Ala	Glu	Gly	Leu	His	Cys	Ser	Cys	Ser		
				435						440					445		
Ser	Gln	Ala	Ser	Pro	Ala	Pro	Ser	Leu	Arg	Trp	Trp	Leu	Gly	Glu	Glu		
				450						455					460		
Leu	Leu	Glu	Gly	Asn	Ser	Ser	Gln	Gly	Ser	Phe	Glu	Val	Thr	Pro	Ser		
465						470					475				480		
Ser	Ala	Gly	Pro	Trp	Ala	Asn	Ser	Ser	Leu	Ser	Leu	His	Gly	Gly	Leu		
				485							490				495		
Ser	Ser	Gly	Leu	Arg	Leu	Arg	Cys	Lys	Ala	Trp	Asn	Val	His	Gly	Ala		
				500						505					510		
Gln	Ser	Gly	Ser	Val	Phe	Gln	Leu	Leu	Pro	Gly	Lys	Leu	Glu	His	Gly		
				515						520					525		
Gly	Gly	Leu	Gly	Leu	Gly	Ala	Ala	Leu	Gly	Ala	Gly	Val	Ala	Ala	Leu		
				530						535					540		
Leu	Ala	Phe	Cys	Ser	Cys	Leu	Val	Val	Phe	Arg	Val	Lys	Ile	Cys	Arg		
545						550					555				560		
Lys	Glu	Ala	Arg	Lys	Arg	Ala	Ala	Ala	Glu	Gln	Asp	Val	Pro	Ser	Thr		
				565							570				575		
Leu	Gly	Pro	Ile	Ser	Gln	Gly	His	Gln	His	Glu	Cys	Ser	Ala	Gly	Ser		
				580						585					590		
Ser	Gln	Asp	His	Pro	Pro	Pro	Gly	Ala	Ala	Thr	Tyr	Thr	Pro	Gly	Lys		
				595						600					605		
Gly	Glu	Glu	Gln	Glu	Leu	His	Tyr	Ala	Ser	Leu	Ser	Phe	Gln	Gly	Leu		
				610						615					620		
Arg	Leu	Trp	Glu	Pro	Ala	Asp	Gln	Glu	Ala	Pro	Ser	Thr	Thr	Glu	Tyr		
625						630					635				640		

Ser Glu Ile Lys Ile His Thr Gly Gln Pro Leu Arg Gly Pro Gly Phe  
 645 650 655  
 Gly Leu Gln Leu Glu Arg Glu Met Ser Gly Met Val Pro Lys  
 660 665 670  
 <210> 158  
 <211> 577  
 <212> PRT  
 <213> 智人(homo sapiens)  
 <400> 158  
 Lys Glu Gln Lys Asp Tyr Leu Leu Thr Met Gln Lys Ser Val Thr Val  
 1 5 10 15  
 Gln Glu Gly Leu Cys Val Ser Val Leu Cys Ser Phe Ser Tyr Pro Gln  
 20 25 30  
 Asn Gly Trp Thr Ala Ser Asp Pro Val His Gly Tyr Trp Phe Arg Ala  
 35 40 45  
 Gly Asp His Val Ser Arg Asn Ile Pro Val Ala Thr Asn Asn Pro Ala  
 50 55 60  
 Arg Ala Val Gln Glu Glu Thr Arg Asp Arg Phe His Leu Leu Gly Asp  
 65 70 75 80  
 Pro Gln Asn Lys Asp Cys Thr Leu Ser Ile Arg Asp Thr Arg Glu Ser  
 85 90 95  
 Asp Ala Gly Thr Tyr Val Phe Cys Val Glu Arg Gly Asn Met Lys Trp  
 100 105 110  
 Asn Tyr Lys Tyr Asp Gln Leu Ser Val Asn Val Thr Ala Ser Gln Asp  
 115 120 125  
 Leu Leu Ser Arg Tyr Arg Leu Glu Val Pro Glu Ser Val Thr Val Gln  
 130 135 140  
 Glu Gly Leu Cys Val Ser Val Pro Cys Ser Val Leu Tyr Pro His Tyr  
 145 150 155 160  
 Asn Trp Thr Ala Ser Ser Pro Val Tyr Gly Ser Trp Phe Lys Glu Gly  
 165 170 175  
 Ala Asp Ile Pro Trp Asp Ile Pro Val Ala Thr Asn Thr Pro Ser Gly  
 180 185 190  
 Lys Val Gln Glu Asp Thr His Gly Arg Phe Leu Leu Leu Gly Asp Pro  
 195 200 205  
 Gln Thr Asn Asn Cys Ser Leu Ser Ile Arg Asp Ala Arg Lys Gly Asp  
 210 215 220  
 Ser Gly Lys Tyr Tyr Phe Gln Val Glu Arg Gly Ser Arg Lys Trp Asn  
 225 230 235 240

Tyr Ile Tyr Asp Lys Leu Ser Val His Val Thr Ala Leu Thr His Met		
245	250	255
Pro Thr Phe Ser Ile Pro Gly Thr Leu Glu Ser Gly His Pro Arg Asn		
260	265	270
Leu Thr Cys Ser Val Pro Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro Thr		
275	280	285
Ile Thr Trp Met Gly Ala Ser Val Ser Ser Leu Asp Pro Thr Ile Thr		
290	295	300
Arg Ser Ser Met Leu Ser Leu Ile Pro Gln Pro Gln Asp His Gly Thr		
305	310	315
Ser Leu Thr Cys Gln Val Thr Leu Pro Gly Ala Gly Val Thr Met Thr		
325	330	335
Arg Ala Val Arg Leu Asn Ile Ser Tyr Pro Pro Gln Asn Leu Thr Met		
340	345	350
Thr Val Phe Gln Gly Asp Gly Thr Ala Ser Thr Thr Leu Arg Asn Gly		
355	360	365
Ser Ala Leu Ser Val Leu Glu Gly Gln Ser Leu His Leu Val Cys Ala		
370	375	380
Val Asp Ser Asn Pro Pro Ala Arg Leu Ser Trp Thr Trp Gly Ser Leu		
385	390	395
Thr Leu Ser Pro Ser Gln Ser Ser Asn Leu Gly Val Leu Glu Leu Pro		
405	410	415
Arg Val His Val Lys Asp Glu Gly Glu Phe Thr Cys Arg Ala Gln Asn		
420	425	430
Pro Leu Gly Ser Gln His Ile Ser Leu Ser Leu Ser Leu Gln Asn Glu		
435	440	445
Tyr Thr Gly Lys Met Arg Pro Ile Ser Gly Val Thr Leu Gly Ala Phe		
450	455	460
Gly Gly Ala Gly Ala Thr Ala Leu Val Phe Leu Tyr Phe Cys Ile Ile		
465	470	475
Phe Val Val Val Arg Ser Cys Arg Lys Lys Ser Ala Arg Pro Ala Val		
485	490	495
Gly Val Gly Asp Thr Gly Met Glu Asp Ala Asn Ala Val Arg Gly Ser		
500	505	510
Ala Ser Gln Gly Pro Leu Ile Glu Ser Pro Ala Asp Asp Ser Pro Pro		
515	520	525
His His Ala Pro Pro Ala Leu Ala Thr Pro Ser Pro Glu Glu Gly Glu		
530	535	540
Ile Gln Tyr Ala Ser Leu Ser Phe His Lys Ala Arg Pro Gln Tyr Pro		

545	550	555	560
Gln Glu Gln Glu Ala Ile Gly Tyr Glu Tyr Ser Glu Ile Asn Ile Pro			
	565	570	575
Lys			
<210> 159			
<211> 353			
<212> PRT			
<213> 食蟹猴 ( <i>Macaca fascicularis</i> )			
<400> 159			
Gln Arg Asn Asn Gln Lys Asn Tyr Pro Leu Thr Met Gln Glu Ser Val			
1	5	10	15
Thr Val Gln Gln Gly Leu Cys Val His Val Leu Cys Ser Phe Ser Tyr			
	20	25	30
Pro Trp Tyr Gly Trp Ile Ser Ser Asp Pro Val His Gly Tyr Trp Phe			
	35	40	45
Arg Ala Gly Ala His Thr Asp Arg Asp Ala Pro Val Ala Thr Asn Asn			
	50	55	60
Pro Ala Arg Ala Val Arg Glu Asp Thr Arg Asp Arg Phe His Leu Leu			
65	70	75	80
Gly Asp Pro Gln Thr Lys Asn Cys Thr Leu Ser Ile Arg Asp Ala Arg			
	85	90	95
Ser Ser Asp Ala Gly Thr Tyr Phe Phe Arg Val Glu Thr Gly Lys Thr			
	100	105	110
Lys Trp Asn Tyr Lys Tyr Ala Pro Leu Ser Val His Val Thr Ala Leu			
	115	120	125
Thr His Arg Pro Asn Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu Ser Gly Cys			
	130	135	140
Pro Arg Asn Leu Thr Cys Ser Val Pro Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr			
145	150	155	160
Ala Pro Met Ile Ser Trp Met Gly Thr Ser Val Ser Pro Leu Asp Pro			
	165	170	175
Ser Thr Thr Arg Ser Ser Val Leu Thr Leu Ile Pro Gln Pro Gln Asp			
	180	185	190
His Gly Thr Ser Leu Thr Cys Gln Val Thr Phe Pro Gly Ala Ser Val			
	195	200	205
Thr Thr Asn Lys Thr Ile His Leu Asn Val Ser Tyr Pro Pro Gln Asn			
	210	215	220
Leu Thr Met Thr Val Phe Gln Gly Asn Asp Thr Val Ser Ile Val Leu			
225	230	235	240



Gly Asn Gly Ser Ser Val Ser Val Pro Glu Gly Pro Ser Leu Arg Leu  
 245 250 255  
 Val Cys Ala Val Asp Ser Asn Pro Pro Ala Arg Leu Ser Leu Ser Trp  
 260 265 270  
 Gly Gly Leu Thr Leu Cys Pro Ser Gln Pro Ser Asn Pro Gly Val Leu  
 275 280 285  
 Glu Leu Pro Arg Val His Leu Arg Asp Glu Glu Glu Phe Thr Cys Arg  
 290 295 300  
 Ala Gln Asn Leu Leu Gly Ser Gln Gln Val Ser Leu Asn Val Ser Leu  
 305 310 315 320  
 Gln Ser Lys Ala Thr Ser Gly Leu Thr Gln Gly Ala Val Gly Ala Gly  
 325 330 335  
 Ala Thr Ala Leu Val Phe Leu Ser Phe Cys Val Ile Phe Val Val Val  
 340 345 350  
 Pro  
 <210> 160  
 <211> 446  
 <212> PRT  
 <213> 智人(homo sapiens)  
 <400> 160  
 Gln Thr Ser Lys Leu Leu Thr Met Gln Ser Ser Val Thr Val Gln Glu  
 1 5 10 15  
 Gly Leu Cys Val His Val Pro Cys Ser Phe Ser Tyr Pro Ser His Gly  
 20 25 30  
 Trp Ile Tyr Pro Gly Pro Val Val His Gly Tyr Trp Phe Arg Glu Gly  
 35 40 45  
 Ala Asn Thr Asp Gln Asp Ala Pro Val Ala Thr Asn Asn Pro Ala Arg  
 50 55 60  
 Ala Val Trp Glu Glu Thr Arg Asp Arg Phe His Leu Leu Gly Asp Pro  
 65 70 75 80  
 His Thr Glu Asn Cys Thr Leu Ser Ile Arg Asp Ala Arg Arg Ser Asp  
 85 90 95  
 Ala Gly Arg Tyr Phe Phe Arg Met Glu Lys Gly Ser Ile Lys Trp Asn  
 100 105 110  
 Tyr Lys His His Arg Leu Ser Val Asn Val Thr Ala Leu Thr His Arg  
 115 120 125  
 Pro Asn Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu Ser Gly Cys Pro Gln Asn  
 130 135 140  
 Leu Thr Cys Ser Val Pro Trp Ala Cys Glu Gln Gly Thr Pro Pro Met

145	150	155	160
Ile Ser Trp Ile Gly Thr Ser Val Ser Pro Leu Asp Pro Ser Thr Thr			
	165	170	175
Arg Ser Ser Val Leu Thr Leu Ile Pro Gln Pro Gln Asp His Gly Thr			
	180	185	190
Ser Leu Thr Cys Gln Val Thr Phe Pro Gly Ala Ser Val Thr Thr Asn			
	195	200	205
Lys Thr Val His Leu Asn Val Ser Tyr Pro Pro Gln Asn Leu Thr Met			
	210	215	220
Thr Val Phe Gln Gly Asp Gly Thr Val Ser Thr Val Leu Gly Asn Gly			
225	230	235	240
Ser Ser Leu Ser Leu Pro Glu Gly Gln Ser Leu Arg Leu Val Cys Ala			
	245	250	255
Val Asp Ala Val Asp Ser Asn Pro Pro Ala Arg Leu Ser Leu Ser Trp			
	260	265	270
Arg Gly Leu Thr Leu Cys Pro Ser Gln Pro Ser Asn Pro Gly Val Leu			
	275	280	285
Glu Leu Pro Trp Val His Leu Arg Asp Glu Ala Glu Phe Thr Cys Arg			
	290	295	300
Ala Gln Asn Pro Leu Gly Ser Gln Gln Val Tyr Leu Asn Val Ser Leu			
305	310	315	320
Gln Ser Lys Ala Thr Ser Gly Val Thr Gln Gly Val Val Gly Gly Ala			
	325	330	335
Gly Ala Thr Ala Leu Val Phe Leu Ser Phe Cys Val Ile Phe Val Val			
	340	345	350
Val Arg Ser Cys Arg Lys Lys Ser Ala Arg Pro Ala Ala Gly Val Gly			
	355	360	365
Asp Thr Gly Ile Glu Asp Ala Asn Ala Val Arg Gly Ser Ala Ser Gln			
	370	375	380
Gly Pro Leu Thr Glu Pro Trp Ala Glu Asp Ser Pro Pro Asp Gln Pro			
385	390	395	400
Pro Pro Ala Ser Ala Arg Ser Ser Val Gly Glu Gly Glu Leu Gln Tyr			
	405	410	415
Ala Ser Leu Ser Phe Gln Met Val Lys Pro Trp Asp Ser Arg Gly Gln			
	420	425	430
Glu Ala Thr Asp Thr Glu Tyr Ser Glu Ile Lys Ile His Arg			
	435	440	445
<210> 161			
<211> 280			

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人(homo sapiens)

&lt;400&gt; 161

Met	Glu	Trp	Ser	Trp	Val	Phe	Leu	Phe	Phe	Leu	Ser	Val	Thr	Thr	Gly
1				5				10					15		
Val	His	Ser	Gly	Lys	Pro	Ile	Pro	Asn	Pro	Leu	Leu	Gly	Leu	Asp	Ser
			20				25					30			
Thr	Gln	Thr	Ser	Lys	Leu	Leu	Thr	Met	Gln	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Gln
		35				40					45				
Glu	Gly	Leu	Cys	Val	His	Val	Pro	Cys	Ser	Phe	Ser	Tyr	Pro	Ser	His
	50				55			60							
Gly	Trp	Ile	Tyr	Pro	Gly	Pro	Val	Val	His	Gly	Tyr	Trp	Phe	Arg	Glu
65				70				75						80	
Gly	Ala	Asn	Thr	Asp	Gln	Asp	Ala	Pro	Val	Ala	Thr	Asn	Asn	Pro	Ala
			85				90					95			
Arg	Ala	Val	Trp	Glu	Glu	Thr	Arg	Asp	Arg	Phe	His	Leu	Leu	Gly	Asp
		100					105					110			
Pro	His	Thr	Lys	Asn	Cys	Thr	Leu	Ser	Ile	Arg	Asp	Ala	Arg	Arg	Ser
		115				120					125				
Asp	Ala	Gly	Arg	Tyr	Phe	Phe	Arg	Met	Glu	Lys	Gly	Ser	Ile	Lys	Trp
	130				135			140							
Asn	Tyr	Lys	His	His	Arg	Leu	Ser	Val	Asn	Val	Thr	Ala	Ala	Thr	Ser
145				150				155						160	
Gly	Val	Thr	Gln	Gly	Val	Val	Gly	Gly	Ala	Gly	Ala	Thr	Ala	Leu	Val
			165				170					175			
Phe	Leu	Ser	Phe	Cys	Val	Ile	Phe	Val	Val	Val	Arg	Ser	Cys	Arg	Lys
		180					185					190			
Lys	Ser	Ala	Arg	Pro	Ala	Ala	Gly	Val	Gly	Asp	Thr	Gly	Ile	Glu	Asp
	195				200						205				
Ala	Asn	Ala	Val	Arg	Gly	Ser	Ala	Ser	Gln	Gly	Pro	Leu	Thr	Glu	Pro
	210				215						220				
Trp	Ala	Glu	Asp	Ser	Pro	Pro	Asp	Gln	Pro	Pro	Pro	Ala	Ser	Ala	Arg
225				230				235						240	
Ser	Ser	Val	Gly	Glu	Gly	Glu	Leu	Gln	Tyr	Ala	Ser	Leu	Ser	Phe	Gln
			245				250					255			
Met	Val	Lys	Pro	Trp	Asp	Ser	Arg	Gly	Gln	Glu	Ala	Thr	Asp	Thr	Glu
		260					265					270			
Tyr	Ser	Glu	Ile	Lys	Ile	His	Arg								
		275				280									

&lt;210&gt; 162

&lt;211&gt; 265

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人(homo sapiens)

&lt;400&gt; 162

```

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1          5          10          15
Val His Ser Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser
          20          25          30
Thr Leu Thr His Arg Pro Asn Ile Leu Ile Pro Gly Thr Leu Glu Ser
          35          40          45
Gly Cys Pro Gln Asn Leu Thr Cys Ser Val Pro Trp Ala Cys Glu Gln
          50          55          60
Gly Thr Pro Pro Met Ile Ser Trp Ile Gly Thr Ser Val Ser Pro Leu
65          70          75          80
Asp Pro Ser Thr Thr Arg Ser Ser Val Leu Thr Leu Ile Pro Gln Pro
          85          90          95
Gln Asp His Gly Thr Ser Leu Thr Cys Gln Val Thr Phe Pro Gly Ala
          100          105          110
Ser Val Thr Thr Asn Lys Thr Val His Leu Asn Val Ser Tyr Pro Pro
          115          120          125
Gln Asn Leu Thr Met Thr Val Phe Gln Gly Asp Gly Thr Val Ala Thr
          130          135          140
Ser Gly Val Thr Gln Gly Val Val Gly Gly Ala Gly Ala Thr Ala Leu
145          150          155          160
Val Phe Leu Ser Phe Cys Val Ile Phe Val Val Val Arg Ser Cys Arg
          165          170          175
Lys Lys Ser Ala Arg Pro Ala Ala Gly Val Gly Asp Thr Gly Ile Glu
          180          185          190
Asp Ala Asn Ala Val Arg Gly Ser Ala Ser Gln Gly Pro Leu Thr Glu
          195          200          205
Pro Trp Ala Glu Asp Ser Pro Pro Asp Gln Pro Pro Pro Ala Ser Ala
          210          215          220
Arg Ser Ser Val Gly Glu Gly Glu Leu Gln Tyr Ala Ser Leu Ser Phe
225          230          235          240
Gln Met Val Lys Pro Trp Asp Ser Arg Gly Gln Glu Ala Thr Asp Thr
          245          250          255
Glu Tyr Ser Glu Ile Lys Ile His Arg
          260          265

```

&lt;210&gt; 163

&lt;211&gt; 246

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人(homo sapiens)

&lt;400&gt; 163

```

Met Glu Trp Ser Trp Val Phe Leu Phe Phe Leu Ser Val Thr Thr Gly
1           5           10           15
Val His Ser Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser
           20           25           30
Thr Ser Thr Val Leu Gly Asn Gly Ser Ser Leu Ser Leu Pro Glu Gly
           35           40           45
Gln Ser Leu Arg Leu Val Cys Ala Val Asp Ala Val Asp Ser Asn Pro
           50           55           60
Pro Ala Arg Leu Ser Leu Ser Trp Arg Gly Leu Thr Leu Cys Pro Ser
65           70           75           80
Gln Pro Ser Asn Pro Gly Val Leu Glu Leu Pro Trp Val His Leu Arg
           85           90           95
Asp Ala Ala Glu Phe Thr Cys Arg Ala Gln Asn Pro Leu Gly Ser Gln
           100          105          110
Gln Val Tyr Leu Asn Val Ser Leu Gln Ser Lys Ala Thr Ser Gly Val
           115          120          125
Thr Gln Gly Val Val Gly Gly Ala Gly Ala Thr Ala Leu Val Phe Leu
           130          135          140
Ser Phe Cys Val Ile Phe Val Val Val Arg Ser Cys Arg Lys Lys Ser
145          150          155          160
Ala Arg Pro Ala Ala Gly Val Gly Asp Thr Gly Ile Glu Asp Ala Asn
           165          170          175
Ala Val Arg Gly Ser Ala Ser Gln Gly Pro Leu Thr Glu Pro Trp Ala
           180          185          190
Glu Asp Ser Pro Pro Asp Gln Pro Pro Pro Ala Ser Ala Arg Ser Ser
           195          200          205
Val Gly Glu Gly Glu Leu Gln Tyr Ala Ser Leu Ser Phe Gln Met Val
           210          215          220
Lys Pro Trp Asp Ser Arg Gly Gln Glu Ala Thr Asp Thr Glu Tyr Ser
225          230          235          240
Glu Ile Lys Ile His Arg
           245

```

&lt;210&gt; 164

&lt;211&gt; 575

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人(homo sapiens)

&lt;400&gt; 164

Gln	Lys	Ser	Asn	Arg	Lys	Asp	Tyr	Ser	Leu	Thr	Met	Gln	Ser	Ser	Val
1				5					10					15	
Thr	Val	Gln	Glu	Gly	Met	Cys	Val	His	Val	Arg	Cys	Ser	Phe	Ser	Tyr
				20				25						30	
Pro	Val	Asp	Ser	Gln	Thr	Asp	Ser	Asp	Pro	Val	His	Gly	Tyr	Trp	Phe
				35				40						45	
Arg	Ala	Gly	Asn	Asp	Ile	Ser	Trp	Lys	Ala	Pro	Val	Ala	Thr	Asn	Asn
				50				55						60	
Pro	Ala	Trp	Ala	Val	Gln	Glu	Glu	Thr	Arg	Asp	Arg	Phe	His	Leu	Leu
65					70				75					80	
Gly	Asp	Pro	Gln	Thr	Lys	Asn	Cys	Thr	Leu	Ser	Ile	Arg	Asp	Ala	Arg
				85					90					95	
Met	Ser	Asp	Ala	Gly	Arg	Tyr	Phe	Phe	Arg	Met	Glu	Lys	Gly	Asn	Ile
				100					105					110	
Lys	Trp	Asn	Tyr	Lys	Tyr	Asp	Gln	Leu	Ser	Val	Asn	Val	Thr	Ala	Leu
				115				120						125	
Thr	His	Arg	Pro	Asn	Ile	Leu	Ile	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Ser	Gly	Cys
				130				135						140	
Phe	Gln	Asn	Leu	Thr	Cys	Ser	Val	Pro	Trp	Ala	Cys	Glu	Gln	Gly	Thr
145					150				155					160	
Pro	Pro	Met	Ile	Ser	Trp	Met	Gly	Thr	Ser	Val	Ser	Pro	Leu	His	Pro
				165					170					175	
Ser	Thr	Thr	Arg	Ser	Ser	Val	Leu	Thr	Leu	Ile	Pro	Gln	Pro	Gln	His
				180					185					190	
His	Gly	Thr	Ser	Leu	Thr	Cys	Gln	Val	Thr	Leu	Pro	Gly	Ala	Gly	Val
				195				200						205	
Thr	Thr	Asn	Arg	Thr	Ile	Gln	Leu	Asn	Val	Ser	Tyr	Pro	Pro	Gln	Asn
				210				215						220	
Leu	Thr	Val	Thr	Val	Phe	Gln	Gly	Glu	Gly	Thr	Ala	Ser	Thr	Ala	Leu
225					230					235				240	
Gly	Asn	Ser	Ser	Ser	Leu	Ser	Val	Leu	Glu	Gly	Gln	Ser	Leu	Arg	Leu
				245					250					255	
Val	Cys	Ala	Val	Asp	Ser	Asn	Pro	Pro	Ala	Arg	Leu	Ser	Trp	Thr	Trp
				260					265					270	
Arg	Ser	Leu	Thr	Leu	Tyr	Pro	Ser	Gln	Pro	Ser	Asn	Pro	Leu	Val	Leu
				275				280						285	

Glu	Leu	Gln	Val	His	Leu	Gly	Asp	Glu	Gly	Glu	Phe	Thr	Cys	Arg	Ala			
290							295					300						
Gln	Asn	Ser	Leu	Gly	Ser	Gln	His	Val	Ser	Leu	Asn	Leu	Ser	Leu	Gln			
305						310					315				320			
Gln	Glu	Tyr	Thr	Gly	Lys	Met	Arg	Pro	Val	Ser	Gly	Val	Leu	Leu	Gly			
					325					330					335			
Ala	Val	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ser	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His			
					340				345					350				
Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val			
					355				360					365				
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr			
370						375						380						
Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu			
385						390					395				400			
Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys			
					405					410					415			
Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser			
					420					425				430				
Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys			
					435					440				445				
Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile			
450						455					460							
Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro			
465						470					475				480			
Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu			
					485					490					495			
Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn			
					500					505				510				
Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser			
					515					520				525				
Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg			
530						535					540							
Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu			
545						550					555				560			
His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys				
					565					570				575				

&lt;210&gt; 165

&lt;211&gt; 567

&lt;212&gt; PRT

<213> 智人(homo sapiens)

<400> 165

Gln	Thr	Ser	Lys	Leu	Leu	Thr	Met	Gln	Ser	Ser	Val	Thr	Val	Gln	Glu
1				5				10						15	
Gly	Leu	Cys	Val	His	Val	Pro	Cys	Ser	Phe	Ser	Tyr	Pro	Ser	His	Gly
			20					25						30	
Trp	Ile	Tyr	Pro	Gly	Pro	Val	Val	His	Gly	Tyr	Trp	Phe	Arg	Glu	Gly
			35					40						45	
Ala	Asn	Thr	Asp	Gln	Asp	Ala	Pro	Val	Ala	Thr	Asn	Asn	Pro	Ala	Arg
			50					55						60	
Ala	Val	Trp	Glu	Glu	Thr	Arg	Asp	Arg	Phe	His	Leu	Leu	Gly	Asp	Pro
65						70				75					80
His	Thr	Lys	Asn	Cys	Thr	Leu	Ser	Ile	Arg	Asp	Ala	Arg	Arg	Ser	Asp
				85					90						95
Ala	Gly	Arg	Tyr	Phe	Phe	Arg	Met	Glu	Lys	Gly	Ser	Ile	Lys	Trp	Asn
				100					105					110	
Tyr	Lys	His	His	Arg	Leu	Ser	Val	Asn	Val	Thr	Ala	Leu	Thr	His	Arg
				115					120					125	
Pro	Asn	Ile	Leu	Ile	Pro	Gly	Thr	Leu	Glu	Ser	Gly	Cys	Pro	Gln	Asn
						130			135					140	
Leu	Thr	Cys	Ser	Val	Pro	Trp	Ala	Cys	Glu	Gln	Gly	Thr	Pro	Pro	Met
145						150				155					160
Ile	Ser	Trp	Ile	Gly	Thr	Ser	Val	Ser	Pro	Leu	Asp	Pro	Ser	Thr	Thr
				165					170						175
Arg	Ser	Ser	Val	Leu	Thr	Leu	Ile	Pro	Gln	Pro	Gln	Asp	His	Gly	Thr
				180					185					190	
Ser	Leu	Thr	Cys	Gln	Val	Thr	Phe	Pro	Gly	Ala	Ser	Val	Thr	Thr	Asn
				195					200					205	
Lys	Thr	Val	His	Leu	Asn	Val	Ser	Tyr	Pro	Pro	Gln	Asn	Leu	Thr	Met
				210					215					220	
Thr	Val	Phe	Gln	Gly	Asp	Gly	Thr	Val	Ser	Thr	Val	Leu	Gly	Asn	Gly
225						230				235					240
Ser	Ser	Leu	Ser	Leu	Pro	Glu	Gly	Gln	Ser	Leu	Arg	Leu	Val	Cys	Ala
				245					250						255
Val	Asp	Ala	Val	Asp	Ser	Asn	Pro	Pro	Ala	Arg	Leu	Ser	Leu	Ser	Trp
				260					265					270	
Arg	Gly	Leu	Thr	Leu	Cys	Pro	Ser	Gln	Pro	Ser	Asn	Pro	Gly	Val	Leu
				275					280						285
Glu	Leu	Pro	Trp	Val	His	Leu	Arg	Asp	Ala	Ala	Glu	Phe	Thr	Cys	Arg



290	295	300
Ala Gln Asn Pro Leu Gly Ser Gln Gln Val Tyr Leu Asn Val Ser Leu		
305	310	315
Gln Ser Lys Ala Thr Ser Gly Val Thr Gln Gly Gly Gly Ser Ser		
325	330	335
Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro		
340	345	350
Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys		
355	360	365
Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val		
370	375	380
Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp		
385	390	395
Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr		
405	410	415
Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp		
420	425	430
Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu		
435	440	445
Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
450	455	460
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys		
465	470	475
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
485	490	495
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
500	505	510
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
515	520	525
Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser		
530	535	540
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
545	550	555
Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys		
565		

&lt;210&gt; 166

&lt;211&gt; 330

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人(homo sapiens)

&lt;400&gt; 166

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
		35					40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70				75					80	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85					90					95		
Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
		100						105				110			
Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
	115					120					125				
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
	130					135					140				
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150				155					160	
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
			165					170					175		
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
		180						185				190			
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
	195					200					205				
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
	210					215					220				
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
225					230				235					240	
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
			245					250					255		
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
		260						265				270			
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
	275						280					285			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
	290					295					300				

Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
305					310					315					320
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
					325				330						
<210> 167															
<211> 330															
<212> PRT															
<213> 智人(homo sapiens)															
<400> 167															
Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1				5					10					15	
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
			20					25					30		
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
			35				40					45			
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
			50			55				60					
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65					70				75						80
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85					90						95	
Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
			100					105					110		
Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
			115				120					125			
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
			130			135				140					
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145					150					155					160
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
			165						170					175	
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
			180					185					190		
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
			195				200					205			
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
			210				215				220				
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
225					230					235					240

Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
				245					250					255	
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
			260					265				270			
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
		275					280					285			
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
		290				295					300				
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
305					310					315					320
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
			325						330						

<210> 168  
 <211> 330  
 <212> PRT  
 <213> 智人(homo sapiens)  
 <400> 168

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys
1			5					10					15		
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr
		20					25				30				
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser
	35					40					45				
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser
	50					55					60				
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr
65				70					75					80	
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
			85					90					95		
Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys
		100						105					110		
Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Glu	Gly	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
		115					120					125			
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
		130				135					140				
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
145				150					155					160	
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
			165						170					175	

Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
180				185				190							
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
195				200				205							
Lys	Ala	Leu	Pro	Ser	Ser	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
210				215				220							
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu
225				230				235				240			
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
245				250				255							
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
260				265				270							
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
275				280				285							
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
290				295				300							
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
305				310				315				320			
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys						
325				330											

&lt;210&gt; 169

&lt;211&gt; 330

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人(homo sapiens)

&lt;400&gt; 169

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

Pro Ala Pro Glu Ala Glu Gly Ala Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 115 120 125  
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 130 135 140  
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 145 150 155 160  
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
 165 170 175  
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
 180 185 190  
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
 195 200 205  
 Lys Ala Leu Pro Ala Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly  
 210 215 220  
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
 225 230 235 240  
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
 245 250 255  
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn  
 260 265 270  
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
 275 280 285  
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn  
 290 295 300  
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
 305 310 315 320  
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 325 330

&lt;210&gt; 170

&lt;211&gt; 233

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人(homo sapiens)

&lt;400&gt; 170

Met Asp Asn Gln Gly Val Ile Tyr Ser Asp Leu Asn Leu Pro Pro Asn  
 1 5 10 15  
 Pro Lys Arg Gln Gln Arg Lys Pro Lys Gly Asn Lys Ser Ser Ile Leu  
 20 25 30  
 Ala Thr Glu Gln Glu Ile Thr Tyr Ala Glu Leu Asn Leu Gln Lys Ala  
 35 40 45

Ser	Gln	Asp	Phe	Gln	Gly	Asn	Asp	Lys	Thr	Tyr	His	Cys	Lys	Asp	Leu
50						55					60				
Pro	Ser	Ala	Pro	Glu	Lys	Leu	Ile	Val	Gly	Ile	Leu	Gly	Ile	Ile	Cys
65					70					75					80
Leu	Ile	Leu	Met	Ala	Ser	Val	Val	Thr	Ile	Val	Val	Ile	Pro	Ser	Thr
				85					90					95	
Leu	Ile	Gln	Arg	His	Asn	Asn	Ser	Ser	Leu	Asn	Thr	Arg	Thr	Gln	Lys
				100					105					110	
Ala	Arg	His	Cys	Gly	His	Cys	Pro	Glu	Glu	Trp	Ile	Thr	Tyr	Ser	Asn
			115					120					125		
Ser	Cys	Tyr	Tyr	Ile	Gly	Lys	Glu	Arg	Arg	Thr	Trp	Glu	Glu	Ser	Leu
						135					140				
Leu	Ala	Cys	Thr	Ser	Lys	Asn	Ser	Ser	Leu	Leu	Ser	Ile	Asp	Asn	Glu
145					150					155					160
Glu	Glu	Met	Lys	Phe	Leu	Ser	Ile	Ile	Ser	Pro	Ser	Ser	Trp	Ile	Gly
				165						170				175	
Val	Phe	Arg	Asn	Ser	Ser	His	His	Pro	Trp	Val	Thr	Met	Asn	Gly	Leu
				180					185					190	
Ala	Phe	Lys	His	Glu	Ile	Lys	Asp	Ser	Asp	Asn	Ala	Glu	Leu	Asn	Cys
				195					200					205	
Ala	Val	Leu	Gln	Val	Asn	Arg	Leu	Lys	Ser	Ala	Gln	Cys	Gly	Ser	Ser
				210				215						220	
Ile	Ile	Tyr	His	Cys	Lys	His	Lys	Leu							
225						230									
<210>	171														
<211>	452														
<212>	PRT														
<213>	人工(Artificial)														
<220>															
<223>	嵌合														
<400>	171														
Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
1				5					10					15	
Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr
				20				25					30		
Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
				35				40					45		
Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Tyr	Asp	Ser	Glu	Thr	His	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe
				50				55					60		

Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70				75						80
Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
			85						90						95
Ala	Arg	Gly	Gly	Tyr	Asp	Phe	Asp	Val	Gly	Thr	Leu	Tyr	Trp	Phe	Phe
			100					105					110		
Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr
			115					120					125		
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser
			130					135					140		
Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu
145					150					155					160
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His
				165					170						175
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser
			180						185						190
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys
			195						200						205
Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu
			210						215						220
Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu
225					230					235					240
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
				245						250					255
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
			260						265						270
Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
			275						280				285		
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr
			290						295				300		
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
305					310					315					320
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser
				325						330					335
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln
			340						345				350		
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val
			355						360				365		
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val



370	375	380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
385	390	395
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr		400
405	410	415
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		
420	425	430
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		
435	440	445
Ser Leu Gly Lys		
450		
<210> 172		
<211> 452		
<212> PRT		
<213> 人工(Artificial)		
<220>		
<223> 嵌合		
<400> 172		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr		15
20	25	30
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
35	40	45
Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Ala Gln Lys Leu		
50	55	60
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr		
65	70	75
Met Glu Leu Arg Ser Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		80
85	90	95
Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Phe Asp Val Gly Thr Leu Tyr Trp Phe Phe		
100	105	110
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr		
115	120	125
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser		
130	135	140
Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu		
145	150	155
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His		160

				165					170					175			
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser		
				180					185					190			
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys		
				195				200						205			
Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu		
				210				215						220			
Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu		
225						230					235				240		
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu		
				245						250					255		
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser		
				260					265						270		
Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu		
				275					280						285		
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr		
				290					295						300		
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn		
305						310					315				320		
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser		
				325						330					335		
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln		
				340						345					350		
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val		
				355						360					365		
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val		
				370						375					380		
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro		
385						390					395				400		
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr		
				405						410					415		
Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val		
				420						425					430		
Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu		
				435						440					445		
Ser	Leu	Gly	Lys														
				450													
<210>	173																
<211>	452																

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工(Artificial)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 嵌合

&lt;400&gt; 173

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
1				5					10					15	
Ser	Leu	Arg	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25					30		
Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Tyr	Asp	Ser	Glu	Thr	His	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe
	50					55					60				
Gln	Gly	His	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70				75					80	
Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
				85					90				95		
Ala	Arg	Gly	Gly	Tyr	Asp	Phe	Asp	Val	Gly	Thr	Leu	Tyr	Trp	Phe	Phe
		100						105				110			
Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr
	115						120					125			
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser
	130					135					140				
Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu
145					150					155				160	
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His
				165					170				175		
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser
		180						185					190		
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys
	195						200					205			
Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu
	210					215					220				
Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu
225					230					235				240	
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
				245					250				255		
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
		260						265					270		

Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu																	
275																	
Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr																	
290																	
Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn																	
305																	
Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser Ser																	
Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln																	
340																	
Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val																	
355																	
Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val																	
370																	
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro																	
385																	
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr																	
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val																	
420																	
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu																	
435																	
Ser Leu Gly Lys																	
450																	
<210> 174																	
<211> 452																	
<212> PRT																	
<213> 人工(Artificial)																	
<220>																	
<223> 嵌合																	
<400> 174																	
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala																	
1																	
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr																	
Trp Met Asn Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met																	
Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Ala Glu Lys Phe																	
50																	

Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Thr	Ser	Thr	Asp	Thr	Ala	Tyr
65					70					75					80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys
				85					90					95	
Ala	Thr	Gly	Gly	Tyr	Asp	Phe	Asp	Val	Gly	Thr	Leu	Tyr	Trp	Phe	Phe
				100					105					110	
Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr
				115					120					125	
Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Cys	Ser	Arg	Ser	Thr	Ser
				130					135					140	
Glu	Ser	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu
145					150					155					160
Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His
				165					170					175	
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser
				180					185					190	
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys
				195					200					205	
Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu
				210					215					220	
Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu
225					230					235					240
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu
				245					250					255	
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser
				260					265					270	
Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu
				275					280					285	
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr
				290					295					300	
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn
305					310					315					320
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser
				325					330					335	
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln
				340					345					350	
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val
				355					360					365	
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val

370	375	380
Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro		
385	390	395
Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu Thr		400
	405	410
Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val		415
	420	425
Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu		430
	435	440
Ser Leu Gly Lys		445
450		
<210> 175		
<211> 452		
<212> PRT		
<213> 人工(Artificial)		
<220>		
<223> 嵌合		
<400> 175		
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala		
1	5	10
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr		15
	20	25
Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		30
	35	40
Gly Arg Ile Asp Pro Tyr Asp Ser Glu Thr His Tyr Ala Gln Lys Phe		45
	50	55
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val Tyr		60
65	70	75
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		80
	85	90
Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Phe Asp Val Gly Thr Leu Tyr Trp Phe Phe		95
	100	105
Asp Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr		110
	115	120
Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg Ser Thr Ser		125
	130	135
Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu		140
145	150	155
Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His		160

				165					170					175			
Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser		
				180					185					190			
Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Lys	Thr	Tyr	Thr	Cys		
				195				200						205			
Asn	Val	Asp	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Arg	Val	Glu		
				210				215						220			
Ser	Lys	Tyr	Gly	Pro	Pro	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Leu		
225						230					235				240		
Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu		
				245						250					255		
Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser		
				260					265						270		
Gln	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Gln	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu		
				275					280						285		
Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr		
				290					295						300		
Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn		
305						310					315				320		
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Gly	Leu	Pro	Ser	Ser		
				325							330				335		
Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln		
				340							345				350		
Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Gln	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val		
				355											360		
Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val		
				370											375		
Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro		
385						390									395		
Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Arg	Leu	Thr		
				405											410		
Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Glu	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val		
				420											425		
Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu		
				435											440		
Ser	Leu	Gly	Lys														
				450													
<210>	176																
<211>	214																

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工(Artificial)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 嵌合

&lt;400&gt; 176

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Glu Asn Ile Tyr Ser Tyr
          20           25           30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
          35           40           45
Tyr Asn Ala Lys Thr Leu Ala Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
          50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln His His Tyr Gly Thr Pro Arg
          85           90           95
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
          100          105          110
Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
          115          120          125
Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
          130          135          140
Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
          145          150          155          160
Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
          165          170          175
Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
          180          185          190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
          195          200          205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
          210

```

&lt;210&gt; 177

&lt;211&gt; 124

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工(Artificial)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 嵌合



&lt;400&gt; 177

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Glu
1				5					10					15	
Ser	Leu	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Gly	Ser	Gly	Tyr	Ser	Phe	Thr	Ser	Tyr
			20					25					30		
Trp	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Met	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Met
		35					40					45			
Gly	Arg	Ile	Asp	Pro	Tyr	Asp	Ser	Glu	Thr	His	Tyr	Ser	Pro	Ser	Phe
	50					55					60				
Gln	Gly	Gln	Val	Thr	Ile	Ser	Ala	Asp	Lys	Ser	Ile	Ser	Thr	Ala	Tyr
65					70				75					80	
Leu	Gln	Trp	Ser	Ser	Leu	Lys	Ala	Ser	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys
				85				90				95			
Ala	Arg	Gly	Gly	Tyr	Asp	Phe	Asp	Val	Gly	Thr	Leu	Tyr	Trp	Phe	Phe
		100						105				110			
Asp	Val	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser				
		115					120								

&lt;210&gt; 178

&lt;211&gt; 124

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工(Artificial)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 嵌合

&lt;400&gt; 178

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



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

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

&lt;210&gt; 183

&lt;211&gt; 119

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工(Artificial)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 嵌合

&lt;400&gt; 183

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

&lt;210&gt; 184

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; PRT

<213> 人工(Artificial)

<220>

<223> 嵌合

<400> 184

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

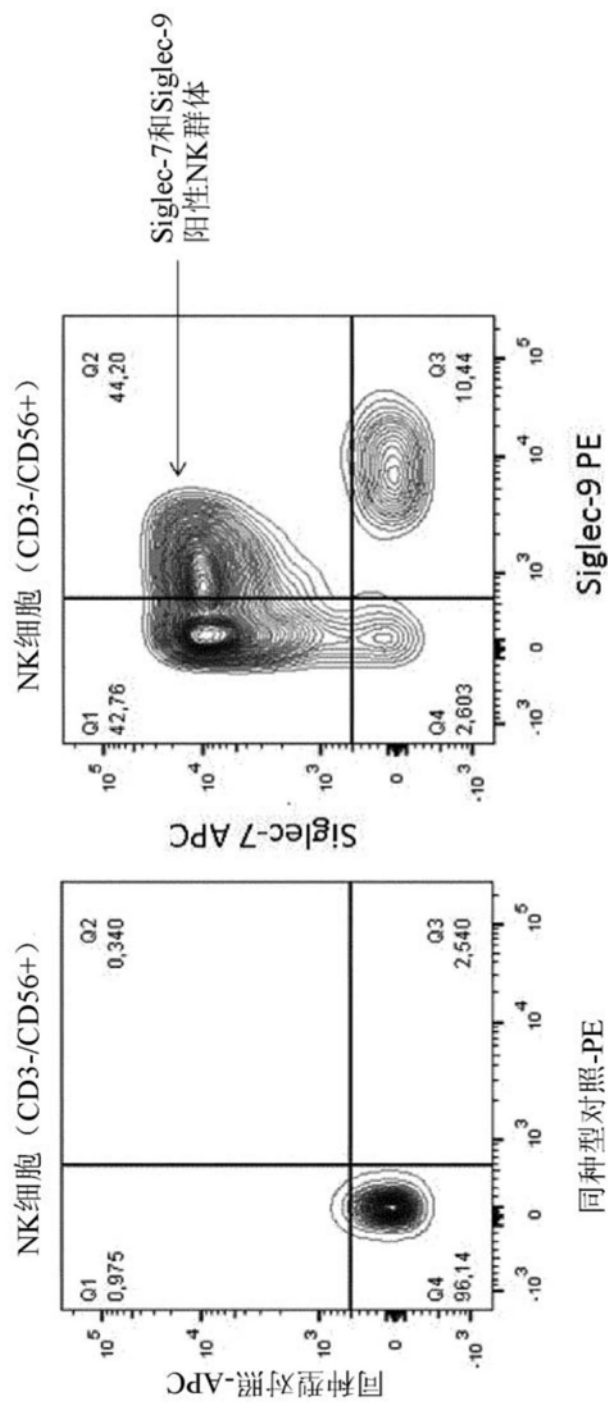


图1

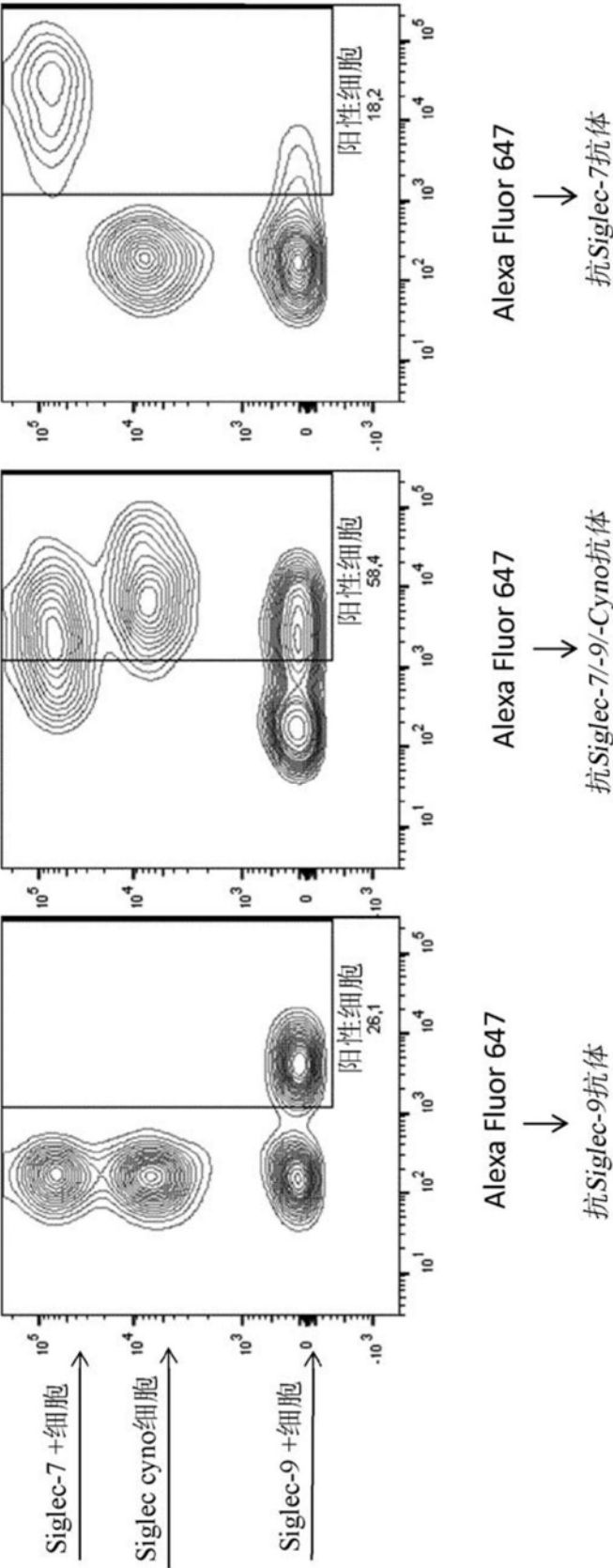


图2

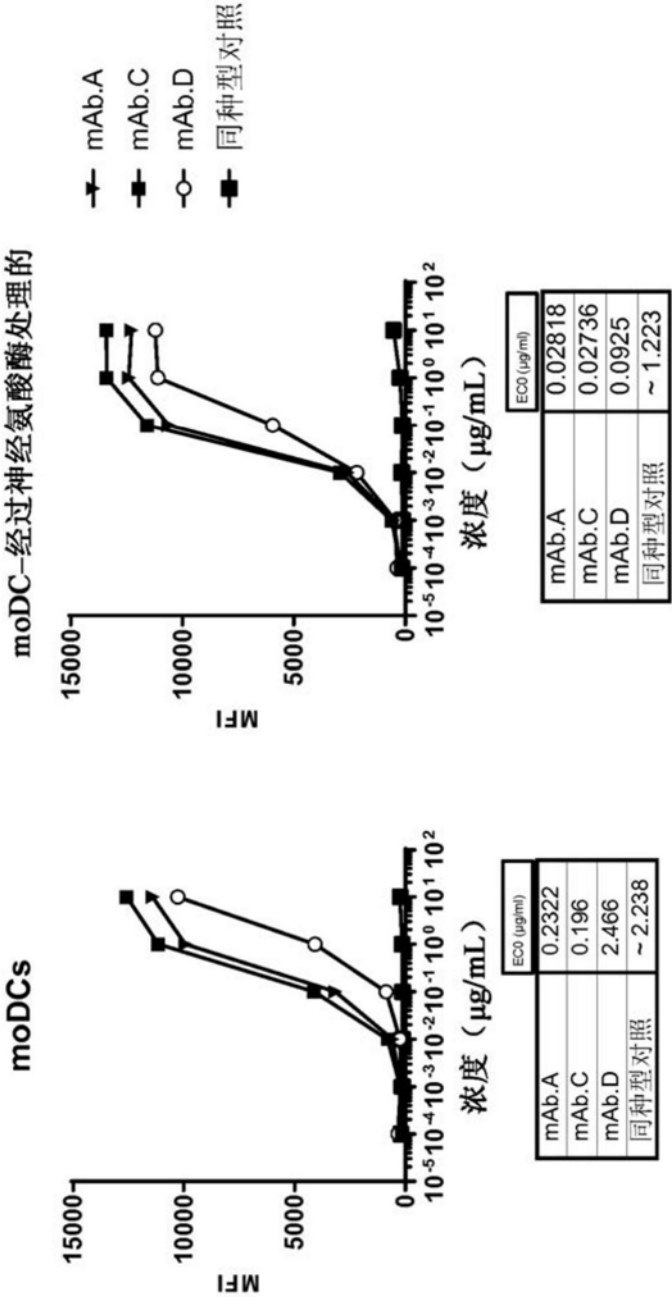


图3



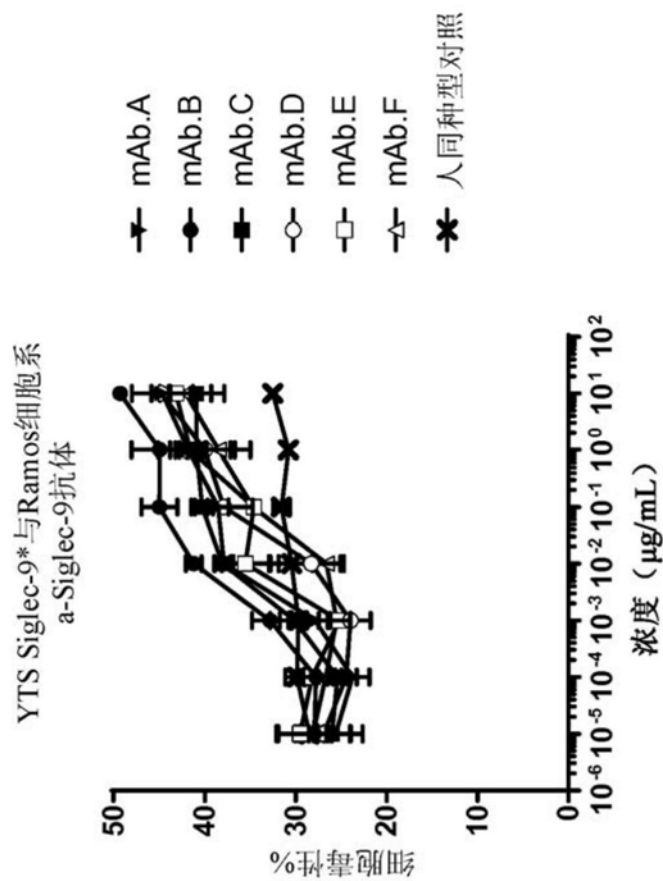


图4A

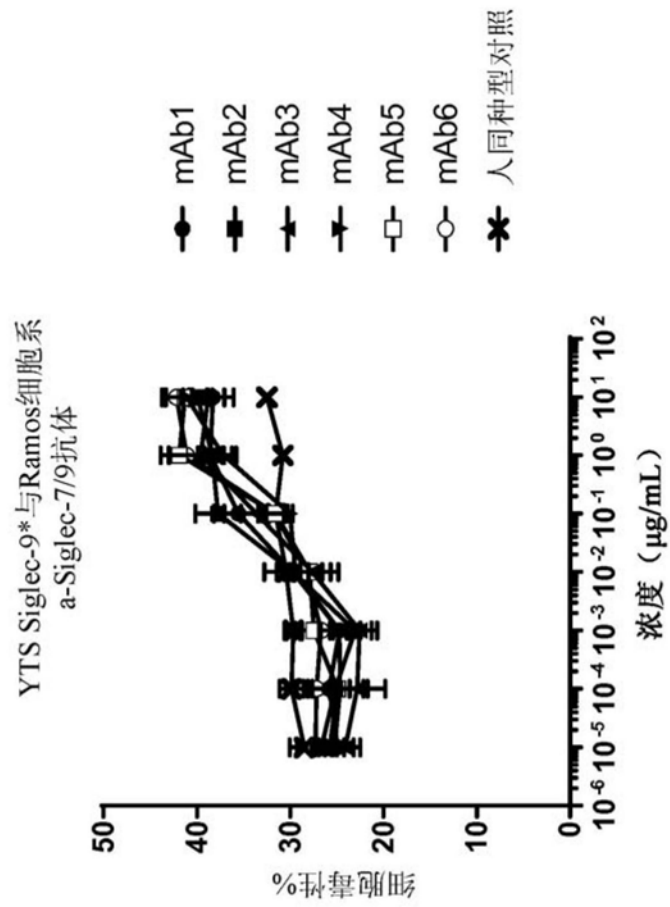


图4B

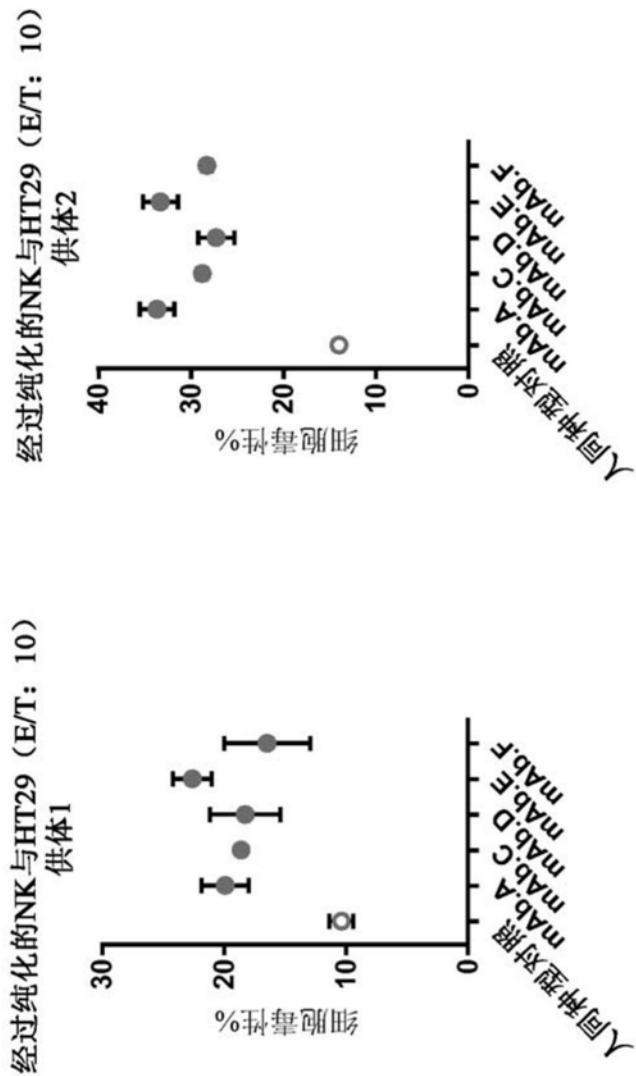


图5

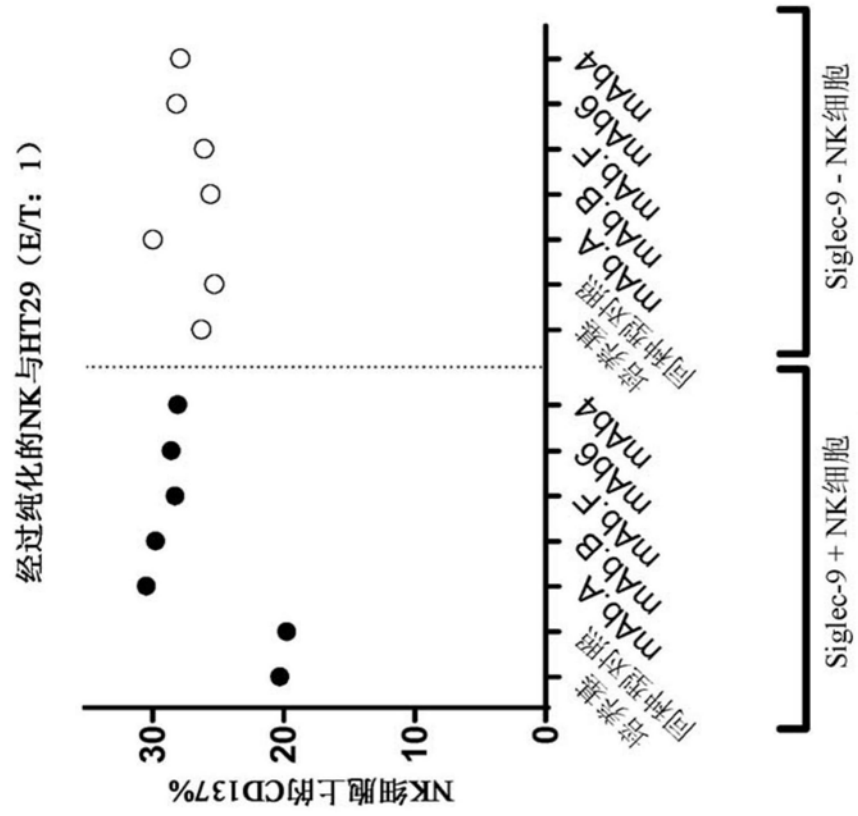


图6



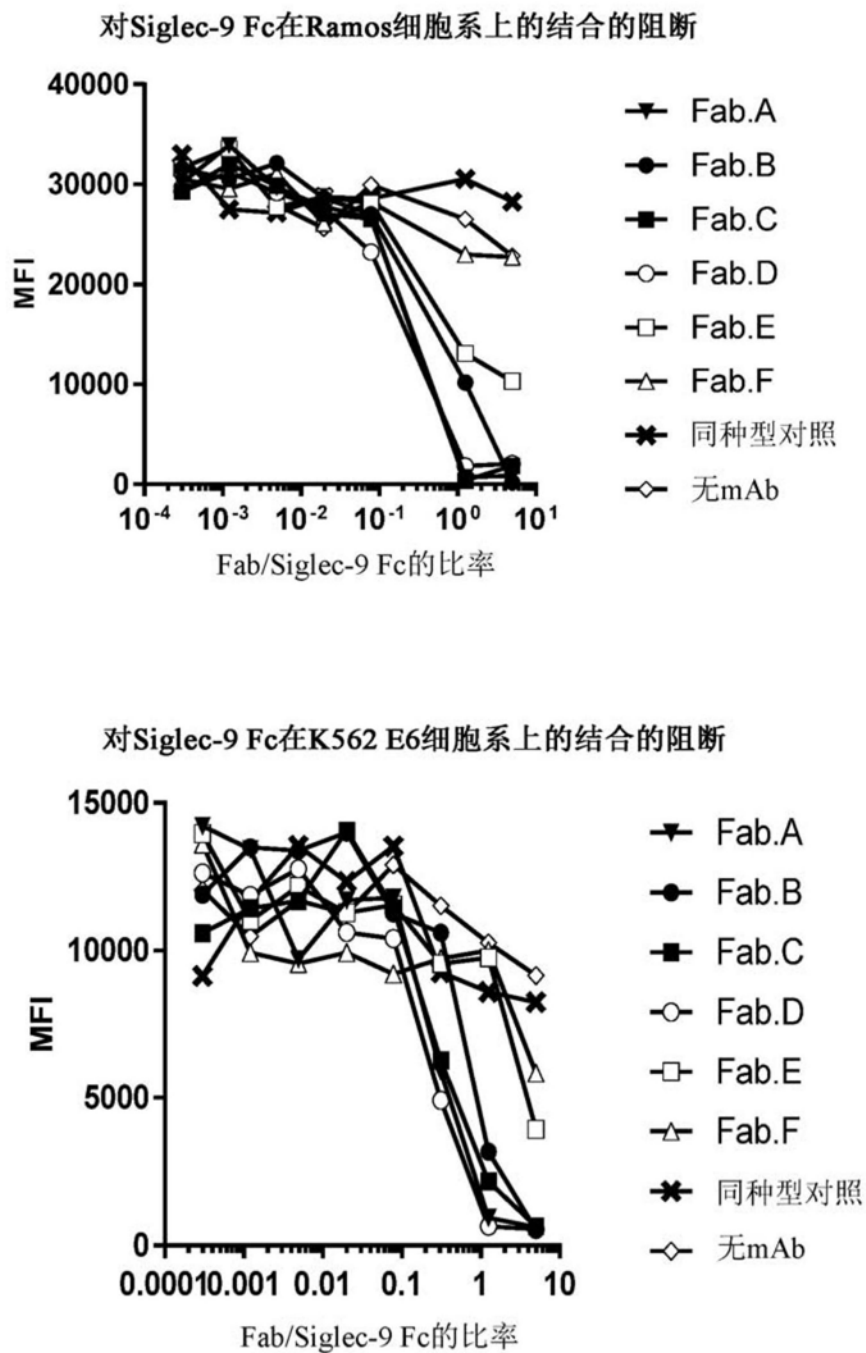


图8

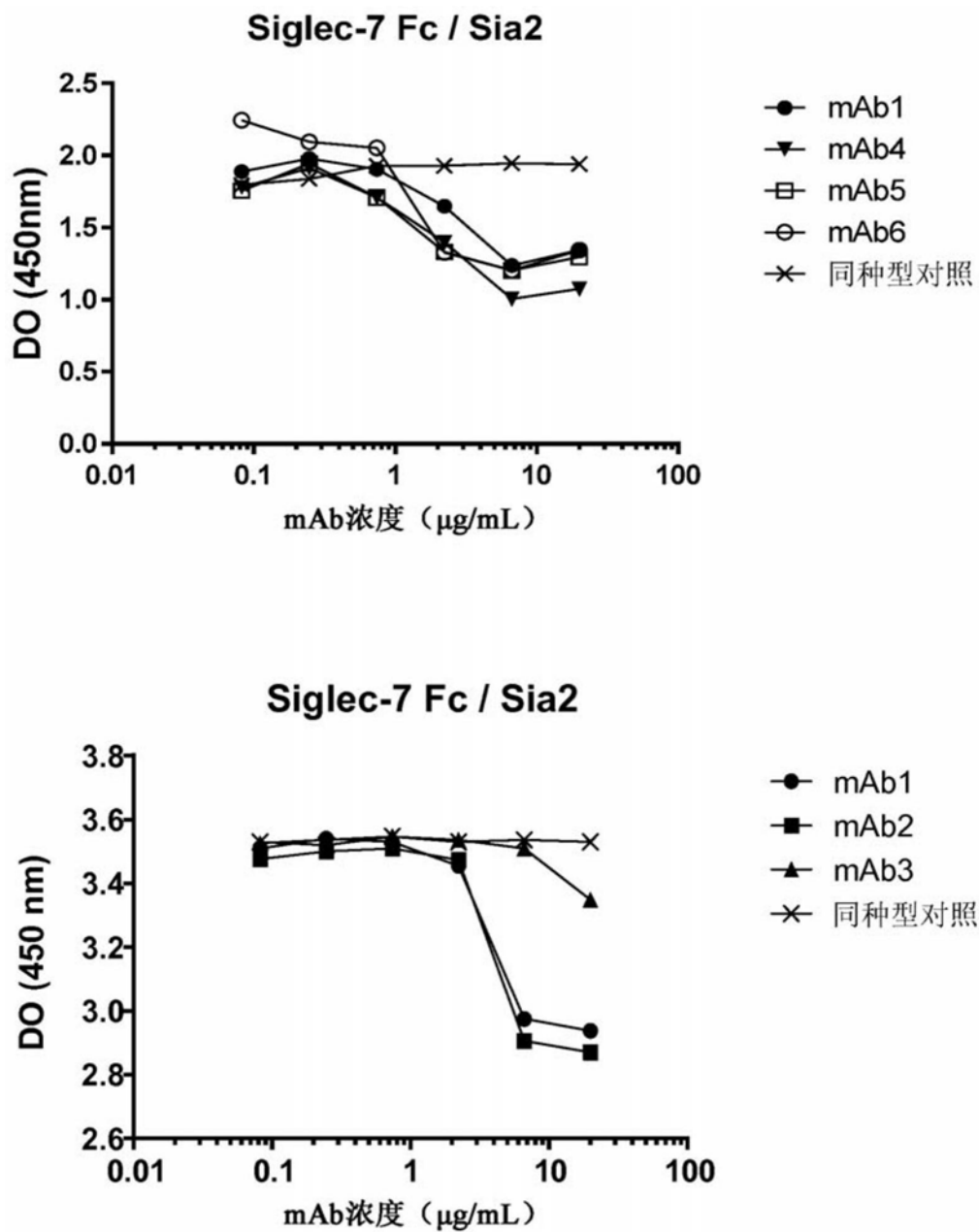


图9

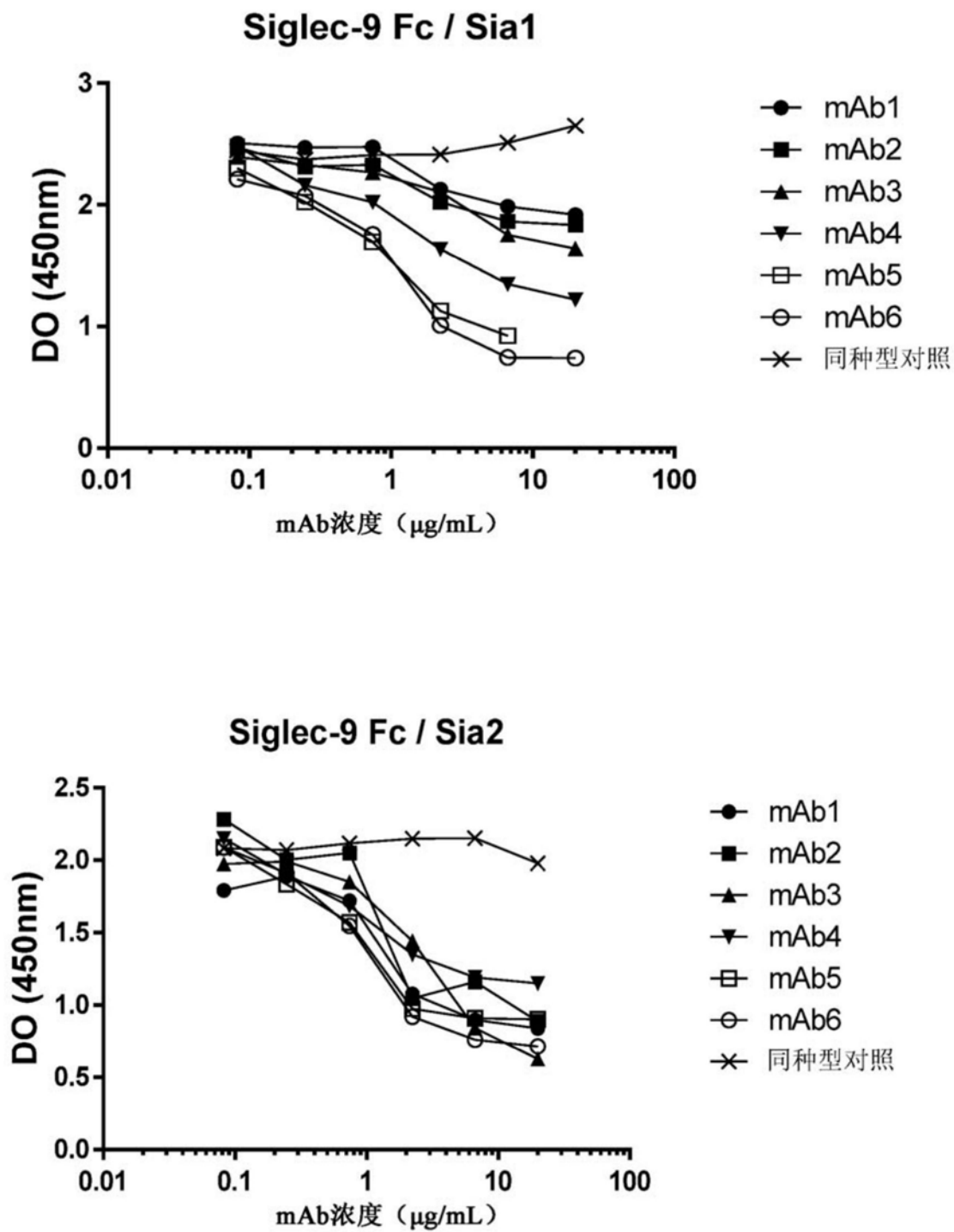


图10



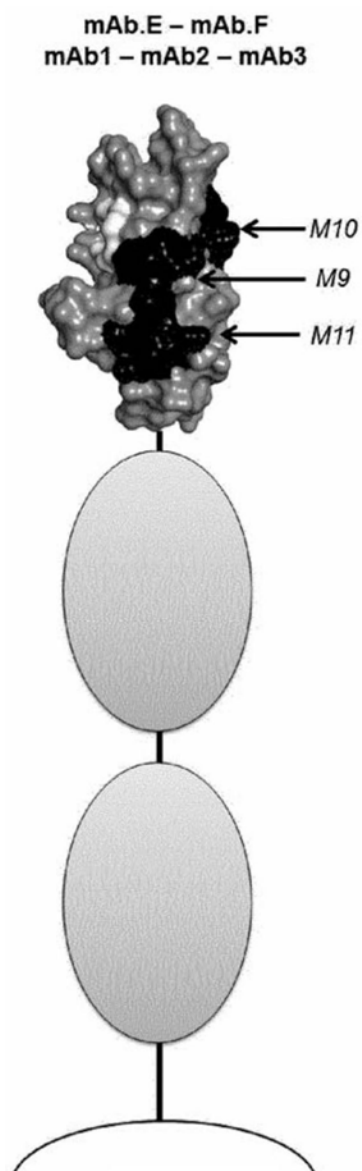


图11

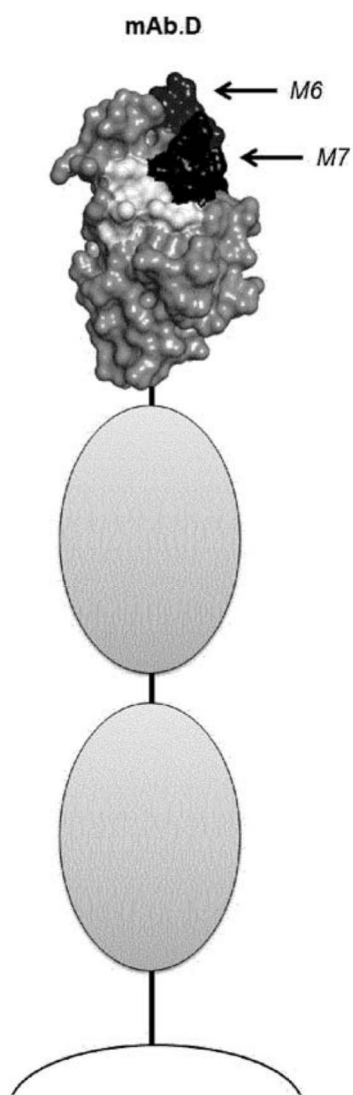


图12

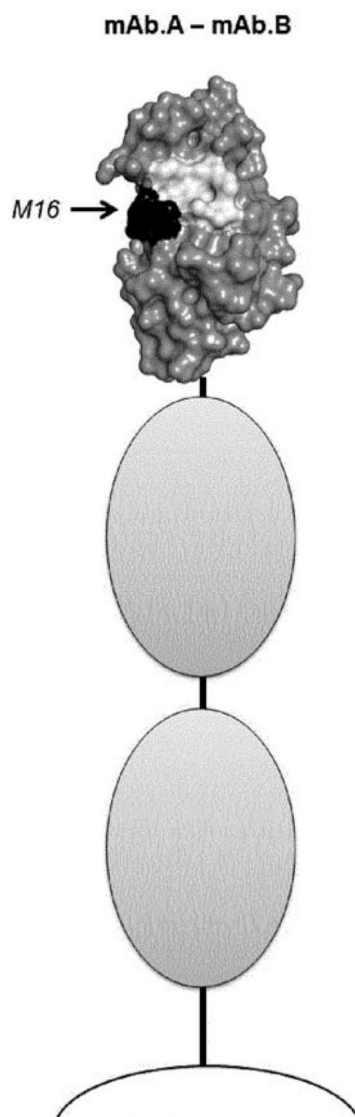


图13

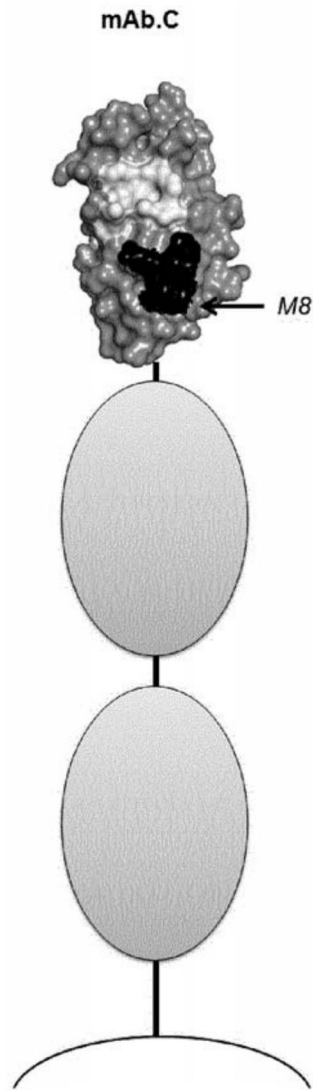


图14

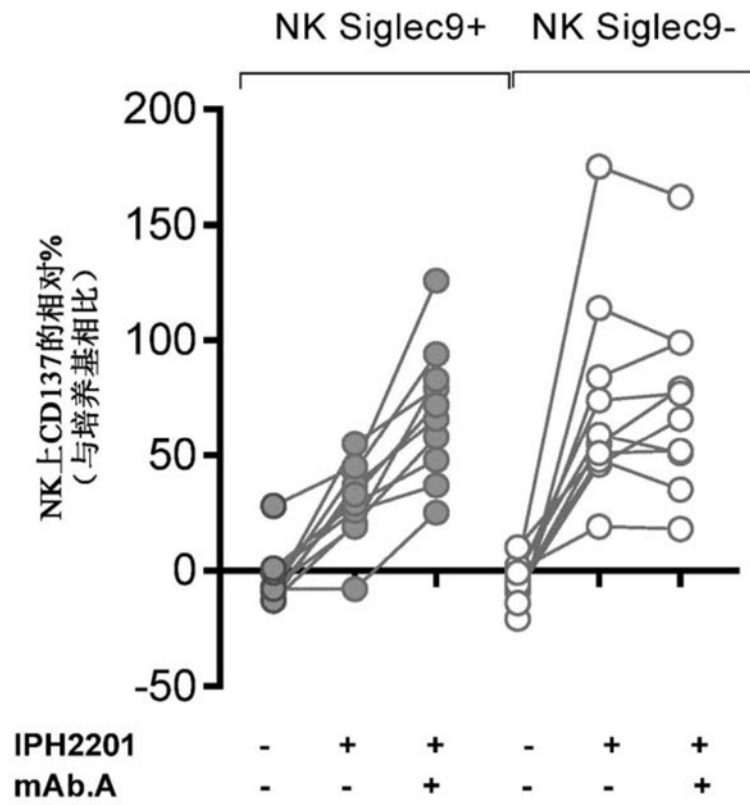


图15