



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 109952318 B

(45) 授权公告日 2022.12.02

(21) 申请号 201780069389.7
 (22) 申请日 2017.11.16
 (65) 同一申请的已公布的文献号
 申请公布号 CN 109952318 A
 (43) 申请公布日 2019.06.28
 (30) 优先权数据
 16199620.2 2016.11.18 EP
 (85) PCT国际申请进入国家阶段日
 2019.05.09
 (86) PCT国际申请的申请数据
 PCT/EP2017/079429 2017.11.16
 (87) PCT国际申请的公布数据
 W02018/091580 EN 2018.05.24
 (73) 专利权人 豪夫迈·罗氏有限公司
 地址 瑞士巴塞尔
 (72) 发明人 J·菲舍尔 M·马吉蒂
 S·登格尔 G·蒂芬塔勒
 S·克洛斯特曼 C·科尔斯滕法德
 E·柯尼赛伯格 F·罗斯
 (74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
 专利代理师 岑晓东
 (51) Int. Cl.
 C07K 16/28 (2006.01)
 (56) 对比文件
 CN 1718588 A, 2006.01.11
 WO 2016094566 A2, 2016.06.16
 CN 104203982 A, 2014.12.10
 US 2005163770 A1, 2005.07.28
 CN 1308675 A, 2001.08.15
 EP 2264067 A1, 2010.12.22
 A Bensussan 等. "Detection of
 membrane-bound HLA-G translated products
 (54) 发明名称
 抗HLA-G抗体及其用途

with a specific monoclonal antibody".
 《PNAS》.1995,第92卷(第22期),
 Catherine Menier 等. "MICA triggering
 signal for NK cell tumor lysis is
 counteracted by HLA-G1-mediated
 inhibitory signal".《Int J Cancer》.2002,第
 100卷(第1期),
 Catherine Menier 等. "Characterization
 of monoclonal antibodies recognizing HLA-
 G or HLA-E: new tools to analyze the
 expression of nonclassical HLA class I
 molecules".《Human Immunology》.2003,第64卷
 (第3期),
 Naonori Hara 等. "Altered Expression
 of Human Leukocyte Antigen G (HLA-G) on
 Extravillous Trophoblasts in
 Preeclampsia: Immunohistological
 Demonstration With Anti-HLA-G Specific
 Antibody "87G" and Anti-cytokeratin
 Antibody "CAM5.2"".《AJRI》.1996,第36卷(第8
 期),
 陆盛军 等. "抗HLA-G单克隆抗体G11E5的制
 备".《细胞与分子免疫学杂志》.2006,第22卷(第
 2期),
 阮嫣赟 等. "HLA-G与肿瘤研究进展".《生命
 科学》.2012,第24卷(第3期),
 Stoel,M.等. "immunoglobulin heavy
 chain variable region, partial [Rattus
 norvegicus]".《genbank》.2016,
 Shore,D.A.等. "Chain B, Yts 105.18
 Antigen Binding Region Heavy Chain".
 《genbank》.2013,
 审查员 蒲恒
 权利要求书1页 说明书47页
 序列表29页 附图14页

(57) 摘要
 本发明涉及抗HLA-G抗体及其使用方法。

CN 109952318 B

1. 一种分离的结合人HLA-G的抗体,其中该抗体包含
 - A) (a) 如SEQ ID NO:1的氨基酸序列所示的HVR-H1; (b) 如SEQ ID NO:2的氨基酸序列所示的HVR-H2; (c) 如SEQ ID NO:3的氨基酸序列所示的HVR-H3; (d) 如SEQ ID NO:4的氨基酸序列所示的HVR-L1; (e) 如SEQ IDNO:5的氨基酸序列所示的HVR-L2; 和(f) 如SEQ ID NO:6的氨基酸序列所示的HVR-L3; 或
 - B) (a) 如SEQ ID NO:9的氨基酸序列所示的HVR-H1; (b) 如SEQ ID NO:10的氨基酸序列所示的HVR-H2; (c) 如SEQ ID NO:11的氨基酸序列所示的HVR-H3; (d) 如SEQ ID NO:12的氨基酸序列所示的HVR-L1; (e) 如SEQ ID NO:13的氨基酸序列所示的HVR-L2; 和(f) 如SEQ ID NO:14的氨基酸序列所示的HVR-L3。
2. 依照权利要求1的抗体,其中该抗体
 - A)
 - i) 包含SEQ ID NO:7的VH序列和SEQ ID NO:8的VL序列; 或
 - ii) i) 下的抗体的VH和VL的人源化变体; 或
 - B)
 - iii) 包含SEQ ID NO:15的VH序列和SEQ ID NO:16的VL序列; 或
 - iv) iii) 下的抗体的VH和VL的人源化变体。
3. 依照权利要求1或2的抗体,其中该抗体是IgG1同种型的。
4. 依照权利要求3的抗体,其中该抗体是具有突变L234A,L235A和P329G的IgG1同种型的,编号依照Kabat的EU索引。
5. 一种分离的核酸,其编码依照权利要求1-4任一项的抗体。
6. 一种宿主细胞,其包含权利要求5的核酸。
7. 一种生成抗体的方法,其包括培养权利要求6的宿主细胞,使得该抗体生成。
8. 权利要求7的方法,其进一步包括自该宿主细胞回收该抗体。
9. 一种药物配制剂,其包含依照权利要求1至4任一项的抗体和药学可接受载剂。
10. 依照权利要求1至4任一项的抗体在制造用于治疗表达HLA-G的癌症的药物中的用途。

抗HLA-G抗体及其用途

发明领域

[0001] 本发明涉及抗HLA-G抗体及其使用方法。

[0002] 发明背景

[0003] 人主要组织相容性复合物, I类, 6, 也称作人白细胞抗原G (HLA-G), 是一种在人中由HLA-G基因编码的蛋白质。HLA-G属于HLA非经典I类重链种内同源物(paralogue)。这种I类分子是由重链和轻链(β 2微球蛋白)组成的异二聚体。重链锚定在膜中但也能脱落/分泌。

[0004] • 重链由三个域组成: α 1, α 2和 α 3。 α 1和 α 2域形成肽结合沟, 侧翼是两个 α 螺旋。小肽(大约9聚物)能像其它MHC I蛋白质那样结合这个沟。

[0005] • 第二链是 β 2微球蛋白, 与其它MHC I蛋白质类似地结合重链。

[0006] 对于HLA-G, 存在7种同等型, 3种分泌的和4种膜结合的形式(如图1中示意性显示的)。

[0007] HLA-G能形成功能有活性的复杂寡聚结构(Kuroki, K. et al., Eur J Immunol. 37 (2007) 1727-1729)。在两个HLA-G分子的Cys42之间形成二硫化物连接的二聚体(Shiroishi, M. et al., J Biol Chem 281 (2006) 10439-10447)。三聚体和四聚体复合物也已经有描述(例如Kuroki, K. et al., Eur J Immunol. 37 (2007) 1727-1729; Allan, D. S. et al., J Immunol Methods 268 (2002) 43-50和Gonen-Gross, T. et al., J Immunol 171 (2003) 1343-1351)。

[0008] HLA-G主要在胎盘中的细胞滋养层上表达。数种肿瘤(包括胰腺, 乳腺, 皮肤, 结肠直肠, 胃和卵巢)表达HLA-G(Lin, A. et al., Mol Med. 21 (2015) 782-791; Amiot, L. et al., Cell Mol Life Sci. 68 (2011) 417-431)。还已经报告表达与病理学状态有关, 像炎症疾病, GvHD和癌症。已经报告HLA-G的表达与癌症中较差的预后有关。肿瘤细胞经由HLA-G表达通过诱导免疫耐受/遏制来逃避宿主免疫监视。

HLA家族多态性概览			
[0009]	• HLA-A:	2579种序列	经典I类MHC
	• HLA-B:	3283种序列	
	• HLA-C:	2133种序列	
	• HLA-E:	15种序列	非经典I类MHC
	• HLA-F:	22种序列	
	• HLA-G:	50种序列	

[0010] HLA-G与其它MHC I分子分享高同源性(>98%), 因此难以生成没有对其它MHC I分子的交叉反应性的真正HLA-G特异性抗体。

[0011] 先前描述了某些以不同方式与HLA-G相互作用的抗体:Tissue Antigens 55 (2000) 510-518涉及单克隆抗体, 例如87G, 和MEM-G/9; Neoplasma 50 (2003) 331-338涉及某些识别完整HLA-G寡聚复合物(例如87G和MEM-G9)以及无HLA-G的重链(例如4H84, MEM-G/1和MEM-G/2)二者的单克隆抗体; Hum Immunol. 64 (2003) 315-326涉及数种在HLA-G表达性

JEG3肿瘤细胞上测试的抗体(例如, MEM-G/09和-G/13唯独与天然HLA-G1分子反应。MEM-G/01识别(与4H84单抗相似)变性的所有同等型的HLA-G重链,而MEM-G/04选择性识别变性的HLA-G1, -G2, 和-G5同等型);Wiendl et al., Brain(2003) 176-85涉及不同单克隆HLA-G抗体, 例如87G, 4H84, MEM-G/9。

[0012] 上述出版物报告了结合人HLA-G或人HLA-G/ β 2M MHC复合物的抗体。然而, 由于HLA家族的高多态性和高同源性, 大多数抗体缺乏真正特异性的HLA-G结合特性且常常还与其它HLA家族成员(或是作为与 β 2M的MHC复合物或是处于它的无 β 2M的形式)结合或交叉反应, 或者它们根本不抑制HLA-G β 2M MHC复合物对它的受体ILT2和/或ILT4的结合(且认为是非拮抗性抗体)。因而, 需要生成和/或选择进一步改良的, 真正HLA-G特异性的具有受体阻断特性的抗体。

[0013] 发明概述

[0014] 本发明提供量身定做的嵌合抗原和/或严格的筛选测定法, 用于在众多候选者中鉴定HLA-G特异性抗体(避免与其它MHC I类复合物分子的交叉反应性并在相同时间选择HLA-G受体(诸如ILT2)阻断性抗体)。

[0015] 本发明提供一种试剂盒, 有

[0016] • 包含SEQ ID NO:25的单体野生型人HLA-G β 2M MHC I复合物; 和

[0017] • 包含SEQ ID NO:26的单体修饰的HLA-G β 2M MHC I复合物, 其中HLA-G特异性氨基酸已经用所有HLA-A的HLA共有氨基酸替换; 和

[0018] • ILT2

[0019] • ILT4,

[0020] 用于筛选人HLA-G β 2M MHC复合物特异性抗体, 其显示没有与其它HLA-A家族蛋白质的交叉反应性且抑制HLA-G对它的受体ILT2和/或ILT4之一的结合。

[0021] 本发明提供一种分离的结合人HLA-G的抗体, 其中该抗体特异性结合人HLA-G, 其中该抗体结合包含SEQ ID NO:25的人HLA-G β 2M MHC I复合物。

[0022] 在一个优选的实施方案中, 该抗HLA-G抗体抑制ILT2结合单体HLA-G β 2M MHC I复合物。

[0023] 在另一个优选的实施方案中, 该抗HLA-G抗体将ILT2结合单体HLA-G β 2M MHC I复合物抑制超过50%(当与没有抗体的情况中的结合比较时)。

[0024] 在一个实施方案中, 该抗HLA-G抗体将ILT2结合单体和/或二聚体和/或三聚体HLA-G β 2M MHC I复合物抑制超过70%(当与没有抗体的情况中的结合比较时)。

[0025] 在另一个优选的实施方案中, 本发明的抗HLA-G抗体结合JEG3细胞上的人HLA-G且抑制ILT2结合JEG3细胞上的HLA-G(超过50%)(当与没有抗体的情况中的结合比较时)。

[0026] 在一个实施方案中, 该抗HLA-G抗体并不与包含SEQ ID NO:26的修饰的人HLA-G β 2M MHC I复合物交叉反应(并不特异性结合)。

[0027] 在一个实施方案中, 该抗HLA-G抗体并不与包含SEQ ID NO:27的小鼠H2Kd β 2M MHC I复合物交叉反应(并不特异性结合)和/或并不与包含SEQ ID NO:29的大鼠RT1A β 2M MHC I复合物交叉反应(并不特异性结合)。

[0028] 在一个实施方案中, 该抗HLA-G抗体并不与包含SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:19的人HLA-A2 β 2M MHC I复合物交叉反应(并不特异性结合)。

[0029] 本发明的一个实施方案是一种分离的结合人HLA-G的抗体,其中该抗体包含

[0030] A) (a) 包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1; (b) 包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2; (c) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3; (d) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1; (e) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2; 和 (f) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3; 或

[0031] B) (a) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1; (b) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2; (c) 包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3; (d) 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1; (e) 包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2; 和 (f) 包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。

[0032] 本发明的一个实施方案是一种分离的结合人HLA-G的抗体,其中该抗体包含

[0033] A) (a) 如下的VH域,该VH域包含 (i) 包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1, (ii) 包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (iii) 包含选自SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3; 和 (b) 如下的VL域,该VL域包含 (i) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1, (ii) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2, 和 (iii) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3; 或

[0034] B) (a) 如下的VH域,该VH域包含 (i) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1, (ii) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (iii) 包含选自SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3; 和 (b) 如下的VL域,该VL域包含 (i) 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1, (ii) 包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2, 和 (iii) 包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。

[0035] 本发明的一个实施方案是一种分离的结合人HLA-G的抗体,其中该抗体

[0036] A)

[0037] i) 包含SEQ ID NO:7的VH序列和SEQ ID NO:8的VL序列; 或

[0038] ii) i) 下的抗体的VH和VL的人源化变体; 或

[0039] B)

[0040] i) 包含SEQ ID NO:15的VH序列和SEQ ID NO:16的VL序列; 或

[0041] ii) i) 下的抗体的VH和VL的人源化变体。

[0042] 在一个实施方案中,该抗HLA-G抗体是IgG1同种型的。

[0043] 在一个实施方案中,该抗HLA-G抗体是具有突变L234A, L235A和P329G (编号依照Kabat的EU索引)的IgG1同种型的。

[0044] 在一个实施方案中,依照本发明的抗HLA-G抗体为单克隆抗体。

[0045] 在一个实施方案中,依照本发明的抗HLA-G抗体为人,人源化,或嵌合抗体。

[0046] 在一个实施方案中,依照本发明的抗HLA-G抗体为结合HLA-G的抗体片段。

[0047] 在一个实施方案中,依照本发明的抗HLA-G抗体为Fab片段。

[0048] 本发明提供一种分离的核酸,其编码依照前述实施方案任一项的抗体。

[0049] 本发明提供一种宿主细胞,其包含此类核酸。

[0050] 本发明提供一种生成抗体的方法,其包括培养该宿主细胞,使得该抗体生成。

[0051] 本发明提供此类生成抗体的方法,其进一步包括自该宿主细胞回收该抗体。

[0052] 本发明提供一种药物配制剂,其包含本文中描述的抗体和药学可接受载剂。

[0053] 本发明提供本文中描述的抗体,其用作药物。

[0054] 本发明提供本文中描述的抗体,其用于治疗癌症。

[0055] 本发明提供本文中描述的抗体在制造药物中的用途。在一个实施方案中,该药物用于治疗癌症。

[0056] 本发明提供一种治疗具有癌症的个体的方法,其包括对该个体施用有效量的本文中描述的抗体。

[0057] 凭借依照本发明的筛选方法,选择新的抗HLA-G抗体。这些抗体显示高度有价值的特性,像强烈抑制ILT2结合JEG3细胞上表达的HLA-G或抑制ILT2结合单体和/或二聚体和/或三聚体HLA-G β 2M MHC I复合物。而且,依照本发明的抗体能够恢复受到遏制的免疫应答,即恢复与HLA-G表达性细胞共培养物中单核细胞的由LPS诱导的TNF α 生成。另外,该抗体是高度特异性的且并不显示与HLA-A MHC I复合物或来自小鼠或大鼠起源的MHC I复合物的交叉反应性。

[0058] 附图简述

[0059] 图1:HLA-G的不同同型

[0060] 图2:图2A:HLA-G的示意图,其中分子与 β 2M联合

[0061] 图2B:与某些受体联合的HLA-G分子的结构:与给定受体诸如ILT4和KIR2DL1复合的HLA-G结构。ILT4结构(PDB代码:2DYP)。KIR2DL1结构取自PDB代码:1IM9(KIR2DL1:HLA-Cw4复合物结构)且通过HLA-Cw4和HLA-G结构的叠加而放置在HLA-G上。受体以带展示来显示,HLA-G以分子表面展示来显示。在其它HLA种内同源基因(para log)中独特或保守的HLA-G残基分别着白色和灰色。在嵌合抗原中独特表面残基用HLA共有序列替换。

[0062] 图3:HLA-G抗体HLA-G-0032至HLA-G-0037对重组HLA-G(SEQ ID NO:25)和对照修饰的人HLA-G β 2M MHC I类复合物(其中HLA-G特异性氨基酸已经用HLA-A共有氨基酸替换(=去嫁接的HLA-G,SEQ ID NO:26)的结合的SPR传感图:

[0063] 图3A:HLA-G-0032和HLA-G-0033

[0064] 图3B:HLA-G-0036和HLA-G-0037

[0065] 图4:抑制(或刺激)HLA-G与ILT2和ILT4相互作用/结合的HLA-G抗体:

[0066] 图4A:ILT2抑制

[0067] 图4B:ILT4抑制

[0068] 图5:在JEG3(天然表达HLA-G的细胞),SKOV-3细胞(野生型(wt)对HLA-G转染细胞(HLA-G+)),和PA-TU-8902细胞(野生型(wt)对HLA-G转染细胞(HLA-G+))上使用HLA-G抗体的HLA-G的细胞表面表达的流式细胞术分析:

[0069] 图5A:HLA-G-0032(#0032);图5B:HLA-G-0033(#0033);

[0070] 图5C:HLA-G-0036(#0036);图5D:HLA-G-0037(#0037)

[0071] 图6:图6A:抗HLA-G抗体阻断/调控人ILT2Fc嵌合物与JEG3细胞上表达的HLA-G的相互作用:

[0072] 通过使用缀合有Alexa488的抗大鼠IgG二抗来评估新颖的抗HLA-G抗体对细胞表面HLA-G的染色(a)。FACS柱形图中显示的是用单独的二抗染色的细胞(灰色虚线)和用抗HLA-G抗体染色的细胞(黑色实线)。在下部行(b)中描绘结合至JEG3细胞上的HLA-G的人ILT2-Fc(黑色虚线),与用单独的二抗染色的细胞(灰色虚线)比较。能看出将JEG3细胞与

HLA-G抗体一起预温育对ILT2Fc嵌合物结合的影响(黑色实线):HLA-G-0032和HLA-G-0037显示几乎完全抑制ILT2-Fc嵌合物对JEG3细胞的结合。

[0073] 图6B:商品化/参照抗HLA-G抗体对ILT2Fc嵌合物结合JEG3细胞上的HLA-G的影响:

[0074] 通过使用缀合有Alexa488的物种特异性二抗来评估商品化/参照抗HLA-G抗体对细胞表面HLA-G的染色(a)。FACS柱形图中显示的是用单独的二抗染色的细胞(灰色虚线)和用抗HLA-G抗体染色的细胞(黑色实线)。在下部行(b)中描绘结合至JEG3细胞上的HLA-G的人ILT2Fc嵌合物(黑色虚线),与用单独的二抗染色的细胞(灰色虚线)比较。能看出将JEG3细胞与参照抗体一起预温育对ILT2Fc嵌合物结合的影响(黑色实线)。测试的参照抗体无一能阻断ILT2Fc嵌合物与JEG3细胞上的细胞表面HLA-G的相互作用。

[0075] 图7:在两名供体#中用抑制性抗HLA-G抗体阻断HLA-G对TNF α 生成恢复的影响。

[0076] 图7A:供体#1

[0077] 图7B:供体#2

[0078] 发明详述

[0079] 在本文中使用时,术语“HLA-G”,“人HLA-G”指HLA-G人主要组织相容性复合物,I类,G,也称作人白细胞抗原G(HLA-G)(例示性的SEQ ID NO:17)。典型地,HLA-G与 β 2微球蛋白(β 2M或 β 2m)一起形成MHC I类复合物。在一个实施方案中,HLA-G指HLA-G和 β 2微球蛋白的MHC I类复合物。

[0080] 如本文中使用的,“结合人HLA-G”,“特异性结合人HLA-G”的抗体或“抗HLA-G抗体”指以 K_D 值为 5.0×10^{-8} mol/l或更低,在一个实施方案中, K_D 值为 1.0×10^{-9} mol/l或更低,在一个实施方案中, K_D 值为 5.0×10^{-8} mol/l至 1.0×10^{-13} mol/l的结合亲和力特异性结合人HLA-G抗原或其胞外域(ECD)的抗体。结合亲和力是用标准结合测定法,诸如表面等离子共振技术(BIAcore[®], GE-Healthcare Uppsala, Sweden),例如使用包含HLA-G胞外域(例如处于它的天然发生三维结构)的构建物测定的。在一个实施方案中,结合亲和力是使用包含SEQ ID NO:25的包含MHC I类复合物的例示性可溶性HLA-G用标准结合测定法测定的。

[0081] HLA-G具有规则的MHC I折叠且由两条链组成:链1由三个域组成: α 1, α 2和 α 3。 α 1和 α 2域形成肽结合沟,侧翼是两个 α 螺旋。小肽(大约9聚物)能像其它MHC I蛋白质那样结合这个沟。链2是与多种其它MHC I蛋白质分享的 β 2微球蛋白。

[0082] HLA-G能形成功能有活性的复杂寡聚结构(Kuroki,K.et al.,Eur J Immunol.37(2007)1727-1729)。在两个HLA-G分子的Cys42之间形成二硫化物连接的二聚体(Shiroishi,M.et al.,J Biol Chem 281(2006)10439-10447)。三聚体和四聚体复合物也已经有描述(例如Kuroki,K.et al.,Eur J Immunol.37(2007)1727-1729;Allan,D.S.et al.,J Immunol Methods 268(2002)43-50和Gonen-Gross,T.et al.,J Immunol 171(2003)1343-1351)。不像大多数其它MHC I类分子,HLA-G具有数个游离半胱氨酸残基。报告了重组可溶性形式的HLA-G5能以分子间Cys42-Cys42二硫键形成二硫化物连接的二聚体(Boyson et al.,Proc Nat Acad Sci USA,99:16180(2002))。另外,膜结合形式的HLA-G1也能在内源表达HLA-G的Jeg3细胞系的细胞表面上形成二硫化物连接的二聚体。还已经在滋养层细胞的细胞表面上找到二硫化物连接的二聚体形式的HLA-G1和HLA-G5(Apps,R.,Tissue Antigens,68:359(2006))。

[0083] HLA-G主要在胎盘中的细胞滋养层上表达。数种肿瘤(包括胰腺,乳腺,皮肤,结肠

直肠,胃和卵巢)表达HLA-G(Lin,A.et al.,Mol Med.21(2015)782-791;Amiot,L.et al.,Cell Mol Life Sci.68(2011)417-431)。还已经报告表达与病理学状态有关,像炎症疾病,GvHD和癌症。已经报告HLA-G的表达与癌症中较差的预后有关。肿瘤细胞经由HLA-G表达通过诱导免疫耐受/遏制来逃避宿主免疫监视。

[0084] 对于HLA-G,存在7种同等型,3种分泌的和4种膜结合的形式(如图1中示意性显示的)。HLA-G的最重要的功能性同等型包括b2-微球蛋白联合的HLA-G1和HLA-G5。然而,这些同等型的耐受原性免疫学效果是不同的且取决于配体的形式(单体,二聚体)和配体-受体相互作用的亲和力。

[0085] HLA-G蛋白质可使用标准分子生物学技术来生成。HLA-G同等型的核酸序列是本领域已知的。见例如GENBANK登录号AY359818。

[0086] 各HLA-G同等型形式经由ILT,特别是ILT2,ILT4,或其组合促进信号转导。

[0087] ILT:ILT代表Ig类型的牵涉调节免疫细胞激活和控制免疫细胞功能的激活性和抑制性受体(Borges,L.et al.,Curr Top Microbial Immunol,244:123-136(1999))。ILT分成三组:(i)抑制性的,那些含有胞质免疫受体基于酪氨酸的抑制性基序(ITIM)且转导抑制性信号的(ILT2,ILT3,ILT4,ILT5,和LIR8);(ii)激活性的,那些含有短胞质尾和跨膜域中的带电荷氨基酸残基(ILT1,ILT7,ILT8,和LIR6 α)且经由Fc受体的联合共同 γ 链的胞质免疫受体基于酪氨酸的激活性基序(ITAM)投递激活性信号的;和(iii)缺乏跨膜域的可溶性分子ILT6。一些最新的研究已经突显抗原呈递细胞(APC)的表面上的ILT的免疫调节作用。表征最多的免疫抑制性受体,ILT2,ILT3,和ILT4受体主要在髓样和浆细胞样DC上表达。ILT3和ILT4因未成熟DC暴露于已知的免疫遏制性因子,包括IL-10,维生素D3,或抑制性CD8T细胞而上调(Chang,C.C.et al.,Nat Immunol,3:237-243(2002))。DC上ILT的表达受到炎症刺激,细胞因子,和生长因子的紧密控制,而且在DC激活后下调(Ju,X.S.et al.,Gene,331:159-164(2004))。ILT2和ILT4受体的表达受到组蛋白乙酰化高度调节,这有助于唯独在髓样谱系的细胞中严格控制基因表达(Nakajima,H.,J Immunol,171:6611-6620(2003))。

[0088] 抑制性受体ILT2和ILT4的啮合改变单核细胞的细胞因子和趋化因子分泌概况且能抑制Fc受体信号传导(Colonna,M.et al.,J Leukoc Biol,66:375-381(1999))。Suciu-Foca小组已经精确描述了ILT3在DC上的作用和功能(Suciu-Foca,N.,Int Immunopharmacol,5:7-11(2005))。虽然ILT3的配体是未知的,但是已知ILT4结合HLA I类分子(HLA-A,HLA-B,HLA-C,和HLA-G)的第三域,与CD8竞争MHC I类结合(Shiroishi,M.,Proc Natl Acad Sci USA,100:8856-8861(2003))。数种抑制性ILT受体的优先配体是HLA-G。HLA-G在母体-胎儿耐受中和在肿瘤细胞逃避免疫识别和破坏的机制中发挥潜在作用(Hunt,J.S.et al.,Faseb J,19:681-693(2005))。最有可能的是通过HLA-G-ILT相互作用调节DC功能是DC的生物学中的一种重要途径。已经确定高度表达ILT2和ILT4受体的人单核细胞衍生的DC在用HLA-G处理并用同种异体T细胞刺激时仍然维持稳定的耐受原性样表型(CD80低,CD86低,HLA-DR低),具有诱导T细胞无反应性的潜力(Ristich,V.et al.,Eur J Immunol,35:1133-1142(2005))。此外,HLA-G与高度表达ILT2和ILT4受体的DC的相互作用导致数种牵涉MHC II类呈递途径的基因下调。由专业性APC丰富表达的溶酶体硫醇还原酶IFN- γ 诱导型溶酶体硫醇还原酶(GILT)在HLA-G修饰的DC中大大降低。引发的CD4+T细胞的

全集可受到GILT的DC表达影响,因为在靶向基因破坏后在缺乏GILT的动物中降低了针对选定抗原的体内T细胞应答 (Marie, M. et al., Science, 294:1361-1365 (2001))。DC上的HLA-G/ILT相互作用干扰MHC II类分子的组装和转运至细胞表面,这可能导致结构上异常的MHC II类分子的呈递或表达不太有效。确定了HLA-G显著降低高度表达ILT抑制性受体的人单核细胞衍生的DC上不变链(CD74),HLA-DMA,和HLA-DMB基因的转录 (Ristich, V. et al., Eur J Immunol, 35:1133-1142 (2005))。

[0089] HLA-G的另一种受体是KIR2DL4,因为KIR2DL4结合表达HLA-G的细胞 (US2003232051; Cantoni, C. et al., Eur J Immunol 28 (1998) 1980; Rajagopalan, S. and E.O. Long, [published erratum appears in J Exp Med 191 (2000) 2027] J Exp Med 189 (1999) 1093; Ponte, M. et al., PNAS USA 96 (1999) 5674)。KIR2DL4 (也称作2DL4) 是一个KIR家族成员 (也称作CD158d), 与激活性和抑制性受体二者分享结构特征 (Selvakumar, A. et al., Tissue Antigens 48 (1996) 285)。2DL4具有胞质ITIM (提示抑制性功能), 和跨膜区中的带正电荷氨基酸 (激活性KIR典型的一个特征)。不像其它克隆分布的KIR, 2DL4由所有NK细胞转录 (Valiante, N.M. et al., Immunity 7 (1997) 739; Cantoni, C. et al., Eur J Immunol 28 (1998) 1980; Rajagopalan, S. and E.O. Long, [published erratum appears in J Exp Med 191 (2000) 2027] J Exp Med 189 (1999) 1093)。

[0090] 如本文中使用的,与包含SEQ ID NO:26的修饰的人HLA-Gβ2M MHC I复合物,包含SEQ ID NO:27的小鼠H2Kdβ2M MHC I复合物,包含SEQ ID NO:29的大鼠RT1Aβ2M MHC I复合物,包含SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:19的人HLA-A2β2M MHC I复合物“并不交叉反应”或“并不特异性结合”的抗HLA-G抗体指实质性并不结合任何这些反抗原的抗HLA-G抗体。在一个实施方案中,与包含SEQ ID NO:26的修饰的人HLA-Gβ2M MHC I复合物,包含SEQ ID NO:27的小鼠H2Kdβ2M MHC I复合物,包含SEQ ID NO:29的大鼠RT1Aβ2M MHC I复合物,和/或包含SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:19的人HLA-A2β2M MHC I复合物“并不交叉反应”或“并不特异性结合”的抗HLA-G抗体指仅仅以KD值为 5.0×10^{-6} mol/l或更高 (直至不再能检测到结合亲和力的) 的结合亲和力显示非特异性结合的抗HLA-G抗体。结合亲和力是用标准结合测定法,诸如表面等离子共振技术 (BIAcore®, GE-Healthcare Uppsala, Sweden), 用各自抗原: 包含SEQ ID NO:26的修饰的人HLA-Gβ2M MHC I复合物,包含SEQ ID NO:27的小鼠H2Kdβ2M MHC I复合物,包含SEQ ID NO:29的大鼠RT1Aβ2M MHC I复合物,和/或包含SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:19的人HLA-A2β2M MHC I复合物测定的。测定法设置以及抗原的构建/制备在实施例中描述。

[0091] 出于本文中的目的,“受体人框架”指包含自人免疫球蛋白框架或如下文定义的人共有框架衍生的轻链可变域 (VL) 框架或重链可变域 (VH) 框架的氨基酸序列的框架。自人免疫球蛋白框架或人共有框架“衍生”的受体人框架可以包含其相同的氨基酸序列,或者它可以含有氨基酸序列变化。在一些实施方案中,氨基酸变化的数目是10或更少,9或更少,8或更少,7或更少,6或更少,5或更少,4或更少,3或更少,或2或更少。在一些实施方案中,VL受体人框架与VL人免疫球蛋白框架序列或人共有框架序列在序列上相同。(定义种系,如果适宜的话)

[0092] 本文中的术语“抗体”以最广义使用,并且涵盖各种抗体结构,包括但不限于单克隆抗体,多克隆抗体,多特异性抗体 (例如双特异性抗体), 和抗体片段,只要它们展现出期

望的抗原结合活性。

[0093] “抗体片段”指与完整抗体不同的分子,其包含完整抗体中与完整抗体结合的抗原结合的部分。抗体片段的例子包括但不限于Fv,Fab,Fab',Fab'-SH,F(ab')₂;双抗体;线性抗体;单链抗体分子(例如scFv);和自抗体片段形成的多特异性抗体。

[0094] 与参照抗体“结合相同表位的抗体”指在竞争测定法中将参照抗体对其抗原的结合阻断50%或更多的抗体,且相反,参照抗体在竞争测定法中将该抗体对其抗原的结合阻断50%或更多。本文中提供了一种例示性竞争测定法。

[0095] 术语“嵌合”抗体指其中的重和/或轻链的一部分自特定来源或物种衍生,而重和/或轻链的剩余部分自不同来源或物种衍生的抗体。

[0096] 抗体的“类”指其重链拥有的恒定域或恒定区的类型。抗体有5大类:IgA,IgD,IgE,IgG,和IgM,并且这些中的几种可以进一步分成亚类(同种型),例如,IgG₁,IgG₂,IgG₃,IgG₄,IgA₁,和IgA₂。与不同类免疫球蛋白对应的重链恒定域分别称作 α , δ , ϵ , γ ,和 μ 。

[0097] 如本文中使用的,术语“细胞毒剂”指抑制或阻止细胞功能和/或引起细胞死亡或破坏的物质。细胞毒剂包括但不限于放射性同位素(例如At²¹¹,I¹³¹,I¹²⁵,Y⁹⁰,Re¹⁸⁶,Re¹⁸⁸,Sm¹⁵³,Bi²¹²,P³²,Pb²¹²和Lu的放射性同位素);化疗剂或化疗药物(例如甲氨蝶呤(methotrexate),阿霉素(adriamicin),长春花生物碱类(vinca alkaloids)(长春新碱(vincristine),长春碱(vinblastine),依托泊苷(etoposide)),多柔比星(doxorubicin),美法仑(melphalan),丝裂霉素(mitomycin)C,苯丁酸氮芥(chlorambucil),柔红霉素(daunorubicin)或其它嵌入剂);生长抑制剂;酶及其片段,诸如溶核酶;抗生素;毒素,诸如小分子毒素或者细菌,真菌,植物或动物起源的酶活性毒素,包括其片段和/或变体;及下文公开的各种抗肿瘤或抗癌剂。

[0098] 药剂(例如药物配制剂)的“有效量”指在必需的剂量和时段上有效实现期望的治疗或预防结果的量。

[0099] 本文中的术语“Fc区”用于定义免疫球蛋白重链中至少含有恒定区一部分的C端区域。该术语包括天然序列Fc区和变体Fc区。在一个实施方案中,人IgG重链Fc区自Cys226,或自Pro230延伸至重链的羧基端。然而,Fc区的C端赖氨酸(Lys447),或C端甘氨酸(Gly446)和C端赖氨酸(Lys447)可以存在或不存在。除非本文中另有规定,Fc区或恒定区中的氨基酸残基的编号方式依照EU编号系统,又称作EU索引,如记载于Kabat,E.A.et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th ed.,Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD(1991)NIH Publication 91-3242。

[0100] “框架”或“FR”指除高变区(HVR)残基外的可变域残基。一般地,可变域的FR由4个FR域组成:FR1,FR2,FR3,和FR4。因而,HVR和FR序列在VH(或VL)中一般以如下顺序出现:FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

[0101] 术语“全长抗体”,“完整抗体”,和“全抗体”在本文中可互换使用,指与天然抗体结构具有基本上类似的结构或者具有含有本文中定义的Fc区的重链的抗体。

[0102] 术语“宿主细胞”,“宿主细胞系”,和“宿主细胞培养物”可互换使用,并且指已经导入有外源核酸的细胞,包括此类细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“经转化的细胞”,其包括原代的经转化的细胞及自其衍生的后代而不考虑传代的次数。后代在核酸内容物上可以与亲本细胞不完全相同,而是可以含有突变。本文中包括具有与在初始转化细胞中筛选

或选择的功能或生物学活性相同的功能或生物学活性的突变体后代。

[0103] “人抗体”指拥有与由人或人细胞生成的或利用人抗体全集或其它人抗体编码序列自非人来源衍生的抗体的氨基酸序列对应的氨基酸序列的抗体。人抗体的此定义明确排除包含非人抗原结合残基的人源化抗体。

[0104] “人共有框架”指代表人免疫球蛋白VL或VH框架序列选集中最常存在的氨基酸残基的框架。通常，人免疫球蛋白VL或VH序列选集来自可变域序列亚组。通常，序列亚组是如Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Bethesda MD (1991), NIH Publication 91-3242, Vols. 1-3中的亚组。在一个实施方案中，对于VL，亚组是如Kabat等，见上文中的亚组卡帕I。在一个实施方案中，对于VH，亚组是如Kabat等，见上文中的亚组III。

[0105] “人源化”抗体指包含来自非人HVR的氨基酸残基和来自人FR的氨基酸残基的嵌合抗体。在某些实施方案中，人源化抗体会包含至少一个，通常两个基本上整个可变域，其中所有或基本上所有HVR (例如CDR) 对应于非人抗体的那些，且所有或基本上所有FR对应于人抗体的那些。任选地，人源化抗体可以至少包含自人抗体衍生的抗体恒定区的一部分。抗体 (例如非人抗体) 的“人源化形式”指已经经历人源化的抗体。

[0106] 如本文中使用的，术语“高变区”或“HVR”指抗体可变域中在序列上高变的 (“互补决定区”或“CDR”) 和/或形成结构上定义的环的 (“高变环”) 和/或含有抗原接触残基的 (“抗原接触”) 每一个区域。一般地，抗体包含6个HVR；三个在VH中 (H1, H2, H3)，且三个在VL中 (L1, L2, L3)。本文中的例示性HVR包括：

[0107] (a) 高变环，其存在于氨基酸残基26-32 (L1)，50-52 (L2)，91-96 (L3)，26-32 (H1)，53-55 (H2)，和96-101 (H3) (Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))；

[0108] (b) CDR，其存在于氨基酸残基24-34 (L1)，50-56 (L2)，89-97 (L3)，31-35b (H1)，50-65 (H2)，和95-102 (H3) (Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991))；

[0109] (c) 抗原接触，其存在于氨基酸残基27c-36 (L1)，46-55 (L2)，89-96 (L3)，30-35b (H1)，47-58 (H2)，和93-101 (H3) (MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262:732-745 (1996))；和

[0110] (d) (a)，(b)，和/或(c)的组合，包括HVR氨基酸残基46-56 (L2)，47-56 (L2)，48-56 (L2)，49-56 (L2)，26-35 (H1)，26-35b (H1)，49-65 (H2)，93-102 (H3)，和94-102 (H3)。

[0111] 除非另有指示，可变域中的HVR残基和其它残基 (例如FR残基) 在本文中依照Kabat等，见上文编号。

[0112] “免疫缀合物”指与一种或多种异源分子 (包括但不限于细胞毒剂) 缀合的抗体。

[0113] “个体”或“受试者”指哺乳动物。哺乳动物包括但不限于驯养的动物 (例如牛，绵羊，猫，犬，和马)，灵长类 (例如人和非人灵长类，诸如猴)，家兔，和啮齿类 (例如小鼠和大鼠)。在某些实施方案中，个体或受试者指人。

[0114] “分离的”抗体指已经与其天然环境的成分分开的抗体。在一些实施方案中，抗体纯化至大于95%或99%的纯度，如通过例如电泳 (例如SDS-PAGE，等电聚焦 (IEF)，毛细管电泳) 或层析 (例如离子交换或反相HPLC) 测定的。关于用于评估抗体纯度的方法的综述参见例如Flatman, S. et al., J. Chromatogr. B 848:79-87 (2007)。

[0115] “分离的”核酸指已经与其天然环境的成分分开的核酸分子。分离的核酸包括通常含有核酸分子的细胞中含有的核酸分子,但是核酸分子在染色体外或在与其天然染色体位置不同的染色体位置处存在。

[0116] “编码抗HLA-G抗体的分离的核酸”指编码抗体重和轻链(或其片段)的一种或多种核酸分子,包括单一载体或分开的载体中的此类核酸分子,和存在于宿主细胞中的一个或多个位置的此类核酸分子。

[0117] 如本文中使用的,术语“单克隆抗体”指从一群基本上同质的抗体获得的抗体,即构成群体的各个抗体是相同的和/或结合相同表位,除了例如含有天然存在的突变或在单克隆抗体制备物的生成期间发生的可能的变体抗体外,此类变体一般以极少量存在。与通常包含针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制备物不同,单克隆抗体制备物的每个单克隆抗体对抗原上的单一决定簇。如此,修饰语“单克隆”指示抗体自一群基本上同质的抗体获得的特征,而不应解释为要求通过任何特定方法来生成抗体。例如,可以通过多种技术来生成要依照本发明使用的单克隆抗体,包括但不限于杂交瘤方法,重组DNA方法,噬菌体展示方法,和利用含有整个或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法,本文中描述了用于生成单克隆抗体的此类方法和其它例示性方法。

[0118] “裸抗体”指未与异源模块(例如细胞毒性模块)或放射性标记物缀合的抗体。裸抗体可以存在于药物配制剂中。

[0119] “天然抗体”指具有不同结构的天然存在的免疫球蛋白分子。例如,天然IgG抗体是约150,000道尔顿的异四聚糖蛋白,由二硫键合的两条相同轻链和两条相同重链构成。从N至C端,每条重链具有一个可变区(VH),又称作可变重域或重链可变域,接着是三个恒定域(CH1,CH2,和CH3)。类似地,从N至C端,每条轻链具有一个可变区(VL),又称作可变轻域或轻链可变域,接着是一个恒定轻(CL)域。根据其恒定域氨基酸序列,抗体轻链可归入两种型中的一种,称作卡帕(κ)和拉姆达(λ)。

[0120] 术语“包装插页”用于指治疗产品的商业包装中通常包含的用法说明书,其含有关于涉及此类治疗产品应用的适应症,用法,剂量,施用,联合疗法,禁忌症和/或警告的信息。

[0121] 关于参照多肽序列的“百分比(%)氨基酸序列同一性”定义为比对序列并在必要时引入缺口以实现最大百分比序列同一性后,且不将任何保守替代视为序列同一性的一部分时,候选序列中与参照多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分率。为测定百分比氨基酸序列同一性目的的对比可以以本领域技术范围内的多种方式实现,例如使用公众可得到的计算机软件,诸如BLAST,BLAST-2,ALIGN或Megalign(DNASTAR)软件。本领域技术人员能决定用于比对序列的适宜参数,包括对所比较序列全长实现最大对比需要的任何算法。然而,为了本发明的目的,%氨基酸序列同一性值是使用序列比较计算机程序ALIGN-2产生的。ALIGN-2序列比较计算机程序由Genentech公司编写,并且源代码已经连同用户文档一起提交给美国版权局(Washington D.C.,20559),在那里其以美国版权注册号TXU510087注册。公众自Genentech公司(South San Francisco,California)可获得ALIGN-2程序,或者可以从源代码编译。ALIGN-2程序应当编译成在UNIX操作系统(包括数码UNIX V4.0D)上使用。所有序列比较参数由ALIGN-2程序设定且不变。

[0122] 在采用ALIGN-2来比较氨基酸序列的情况中,给定氨基酸序列A相对于(to),与(with),或针对(against)给定氨基酸序列B的%氨基酸序列同一性(或者可表述为具有或

包含相对于,与,或针对给定氨基酸序列B的某一%氨基酸序列同一性的给定氨基酸序列A)如下计算:

[0123] 分数X/Y乘100,

[0124] 其中X是由序列比对程序ALIGN-2在该程序的A和B比对中评分为相同匹配的氨基酸残基的数目,且其中Y是B中的氨基酸残基的总数。应当领会,在氨基酸序列A的长度与氨基酸序列B的长度不相等的情况下,A相对于B的%氨基酸序列同一性会不等于B相对于A的%氨基酸序列同一性。除非另有明确说明,本文中使用的所有%氨基酸序列同一性值都是依照上一段所述,使用ALIGN-2计算机程序获得的。

[0125] 术语“药物配制剂”指所处形式使得允许其中含有的活性组分的生物学活性是有效的,且不含对会接受配制剂施用的受试者具有不可接受的毒性的别的成分的制剂。

[0126] “药学可接受载剂”指药物配制剂中与活性成分不同,且对受试者无毒的组分。药学可接受载剂包括但不限于缓冲剂,赋形剂,稳定剂,或防腐剂。

[0127] 如本文中使用的,“治疗/处理”(及其语法变型)指试图改变所治疗个体的天然过程的临床干预,并且可以为了预防或者在临床病理学的过程期间实施。期望的治疗效果包括但不限于预防疾病的发生或再发生,减轻症状,减轻/减少疾病的任何直接或间接病理后果,预防转移,降低疾病进展速率,改善或减轻疾病状态,和消退或改善的预后。在一些实施方案中,使用本发明的抗体来延迟疾病的形成或减缓疾病的进展。

[0128] 术语“可变区”或“可变域”指抗体重或轻链中牵涉抗体结合抗原的域。天然抗体的重链和轻链可变域(分别为VH和VL)一般具有类似的结构,其中每一个域包含4个保守的框架区(FR)和3个高变区(HVR)(参见例如Kindt,T.J.et al.,Kuby Immunology,6th ed.,W.H.Freeman and Co.,N.Y.(2007),page 91)。单个VH或VL域可能足以赋予抗原结合特异性。此外,可以分别使用来自结合抗原的抗体的VH或VL域筛选互补VL或VH域的文库来分离结合特定抗原的抗体。参见例如Portolano,S.et al.,J.Immunol.150:880-887(1993);Clarkson,T.et al.,Nature 352:624-628(1991))。

[0129] 如本文中使用的,术语“载体”指能够增殖与其连接的另一种核酸的核酸分子。该术语包括作为自身复制型核酸结构的载体以及并入接受其导入的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导与其可操作连接的核酸表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。

[0130] I. 组合物和方法

[0131] 一方面,本发明部分基于下述发现,本发明的选定抗HLA-G抗体结合HLA-G的某些表位,而且有能力抑制ILT2和/或ILT4结合HLA-G。它们抑制例如ILT2结合HLA-G且通过适宜刺激后升高的免疫调控性细胞因子(像TNF α)的分泌来恢复HLA-G介导的免疫遏制。

[0132] 在某些实施方案中,提供了结合HLA-G的抗体。本发明的抗体对于例如癌症的诊断或治疗是有用的。

[0133] A. 例示性抗HLA-G抗体

[0134] 在一个方面,本发明提供分离的结合人HLA-G的抗体(抗HLA-G抗体)。

[0135] 在某些实施方案中,提供了一种分离的特异性结合人HLA-G的抗体,其中该抗体结合包含SEQ ID NO:25的人HLA-G β 2M MHC I复合物(见实施例3)。

[0136] 在某些实施方案中,提供了一种分离的特异性结合人HLA-G的抗体,其中该抗体结合包含SEQ ID NO:25的人HLA-G β 2M MHC I复合物,且其中该抗体抑制ILT2结合单体HLA-G β

2M MHC I复合物(见例如实施例4a和4b)。

[0137] 在某些实施方案中,提供了一种分离的特异性结合人HLA-G的抗体,其中该抗体结合人HLA-G β 2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:25),且其中该抗体将ILT2结合单体HLA-G β 2M MHC I复合物抑制超过50%(当与没有抗体的情况中的结合比较时)(见例如实施例4b)。

[0138] 在某些实施方案中,提供了一种分离的特异性结合人HLA-G的抗体,其中该抗体结合人HLA-G β 2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:25),且其中该抗体将ILT2结合单体和/或二聚体和/或三聚体HLA-G β 2M MHC I复合物抑制超过50%(在一个实施方案中超过70%)(当与没有抗体的情况中的结合比较时)(见例如实施例4b)。

[0139] 在某些实施方案中,提供了一种分离的特异性结合人HLA-G的抗体,其中该抗体结合人HLA-G β 2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:25),且其中该抗体将ILT2结合单体和/或二聚体和/或三聚体HLA-G β 2M MHC I复合物抑制超过60%(当与没有抗体的情况中的结合比较时)将ILT4结合二聚体和/或三聚体HLA-G β 2M MHC I复合物抑制超过50%(当与没有抗体的情况中的结合比较时)(见例如实施例4b)。

[0140] 在某些实施方案中,提供了一种分离的特异性结合人HLA-G的抗体,其中该抗体结合包含SEQ ID NO:25的人HLA-G β 2M MHC I复合物;且其中该抗体抑制ILT2和ILT4结合HLA-G β 2M MHC I复合物(见实施例4)。

[0141] 在某些实施方案中,提供了一种分离的特异性结合人HLA-G的抗体,其中该抗体结合人HLA-G β 2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:25),且其中该抗体抑制ILT2结合JEG3细胞(ATCC编号HTB36)(上的HLA-G)(超过50%(在一个实施方案中超过80%))(当与没有抗体的情况中的结合比较时)(见实施例6)。

[0142] 在某些实施方案中,提供了一种分离的特异性结合人HLA-G的抗体,其中该抗体结合JEG3细胞(ATCC编号HTB36)(上的HLA-G)(见实施例5),且其中该抗体抑制ILT2结合JEG3细胞(ATCC编号HTB36)上的HLA-G(超过50%(在一个实施方案中超过80%))(当与没有抗体的情况中的结合比较时)(见实施例6)。

[0143] 在某些实施方案中,本文中描述的抗HLA-G抗体并不与包含SEQ ID NO:26的修饰的人HLA-G β 2M MHC I复合物交叉反应(并不特异性结合)。

[0144] 在某些实施方案中,本文中描述的抗HLA-G抗体并不与包含SEQ ID NO:27的小鼠H2Kd β 2M MHC I复合物交叉反应(并不特异性结合)和/或并不与包含SEQ ID NO:29的大鼠RT1A β 2M MHC I复合物交叉反应(并不特异性结合)。

[0145] 在某些实施方案中,本文中描述的抗HLA-G抗体并不与包含SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:19的人HLA-A2 β 2M MHC I复合物交叉反应(并不特异性结合)。

[0146] 本发明的一个实施方案是一种分离的结合人HLA-G的抗体,其中该抗体包含

[0147] A) (a) 包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1; (b) 包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2; (c) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3; (d) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1; (e) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2; 和 (f) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3; 或

[0148] B) (a) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1; (b) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2; (c) 包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3; (d) 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1; (e) 包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2; 和 (f) 包含SEQ ID NO:

14的氨基酸序列的HVR-L3。

[0149] 本发明的一个实施方案是一种分离的结合人HLA-G的抗体,其中该抗体包含

[0150] A) (a) 如下的VH域,该VH域包含 (i) 包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1, (ii) 包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2,和 (iii) 包含选自SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和 (b) 如下的VL域,该VL域包含 (i) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1, (ii) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2,和 (iii) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;或

[0151] B) (a) 如下的VH域,该VH域包含 (i) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1, (ii) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2,和 (iii) 包含选自SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和 (b) 如下的VL域,该VL域包含 (i) 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1, (ii) 包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2,和 (iii) 包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。

[0152] 本发明的一个实施方案是一种分离的结合人HLA-G的抗体,其中该抗体包含

[0153] A)

[0154] i) 包含SEQ ID NO:7的VH序列和SEQ ID NO:8的VL序列;或

[0155] ii) i) 下的抗体的VH和VL的人源化变体;或

[0156] B)

[0157] i) 包含SEQ ID NO:15的VH序列和SEQ ID NO:16的VL序列;或

[0158] ii) i) 下的抗体的VH和VL的人源化变体。

[0159] 本发明的一个实施方案是如本文中描述的抗HLA-G抗体,其中该抗体独立地特征在于下述特性:该抗HLA-G抗体

[0160] a) 与包含具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的VL的抗HLA-G抗体竞争结合HLA-G,和/或

[0161] b) 与包含具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的VH和具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的VL的抗HLA-G抗体结合相同表位,和/或

[0162] c) 结合包含SEQ ID NO:25的人HLA-Gβ2M MHC I复合物;和/或

[0163] d) 并不与包含SEQ ID NO:26的修饰的人HLA-Gβ2M MHC I复合物交叉反应(并不特异性结合);和/或

[0164] e) 并不与包含SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:19的人HLA-A2β2MMHC I复合物交叉反应(并不特异性结合);和/或

[0165] f) 并不与包含SEQ ID NO:27的小鼠H2Kdβ2M MHC I复合物交叉反应(并不特异性结合);和/或

[0166] g) 并不与包含SEQ ID NO:29的大鼠RT1Aβ2M MHC I复合物交叉反应(并不特异性结合);和/或

[0167] h) 抑制ILT2结合单体HLA-Gβ2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:25);和/或

[0168] i) 将ILT2结合单体HLA-Gβ2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:25)抑制超过50%(在一个实施方案中超过70%)(当与没有抗体的情况中的结合比较时);和/或

[0169] j) 将ILT2结合单体和/或二聚体和/或三聚体HLA-Gβ2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:25)抑制超过50%(在一个实施方案中超过70%)(当与没有抗体的情况中的结合比较

时);和/或

[0170] k) 抑制ILT2结合JEG3细胞(ATCC编号HTB36)(上的HLA-G)(超过50%(在一个实施方案中超过80%))(当与没有抗体的情况中的结合比较时)(见实施例6);和/或

[0171] l) 其中该抗体结合JEG3细胞(ATCC编号HTB36)(上的HLA-G)(见实施例5),且其中该抗体抑制ILT2结合JEG3细胞(ATCC编号HTB36)(上的HLA-G)(超过50%(在一个实施方案中超过80%))(当与没有抗体的情况中的结合比较时)(见实施例6);和/或

[0172] m) 其中该抗体结合人HLA-Gβ2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:25),且其中该抗体将ILT2结合单体和/或二聚体和/或三聚体HLA-Gβ2M MHC I复合物抑制超过60%(当与没有抗体的情况中的结合比较时)将ILT4结合二聚体和/或三聚体HLA-Gβ2M MHC I复合物抑制超过50%(当与没有抗体的情况中的结合比较时)(见例如实施例4b)。

[0173] 本发明的一个实施方案是一种分离的结合人HLA-G的抗体,其中该抗体包含

[0174] A) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i) 包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1,(ii) 包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii) 包含选自SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3;和(b) 如下的VL域,该VL域包含(i) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1,(ii) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3;或

[0175] B) (a) 如下的VH域,该VH域包含(i) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1,(ii) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2,和(iii) 包含选自SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3;和(b) 如下的VL域,该VL域包含(i) 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1,(ii) 包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2,和(iii) 包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3;

[0176] 且其中A)或B)下的抗体独立地特征在于下述特性:该抗HLA-G抗体

[0177] a) 结合包含SEQ ID NO:25的人HLA-Gβ2M MHC I复合物;和/或

[0178] b) 并不与包含SEQ ID NO:26的修饰的人HLA-Gβ2M MHC I复合物交叉反应(并不特异性结合);和/或

[0179] c) 并不与包含SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:19的人HLA-A2β2M MHC I复合物交叉反应(并不特异性结合);和/或

[0180] d) 并不与包含SEQ ID NO:27的小鼠H2Kdβ2M MHC I复合物交叉反应(并不特异性结合);和/或

[0181] e) 并不与包含SEQ ID NO:29的大鼠RT1Aβ2M MHC I复合物交叉反应(并不特异性结合);和/或

[0182] f) 抑制ILT2结合单体HLA-Gβ2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:25);和/或

[0183] g) 将ILT2结合单体HLA-Gβ2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:25)抑制超过50%(在一个实施方案中超过70%)(当与没有抗体的情况中的结合比较时);和/或

[0184] h) 将ILT2结合单体和/或二聚体和/或三聚体HLA-Gβ2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:25)抑制超过50%(在一个实施方案中超过70%)(当与没有抗体的情况中的结合比较时);和/或

[0185] i) 抑制ILT2结合JEG3细胞(ATCC编号HTB36)上的HLA-G(超过50%(在一个实施方案中超过80%))(当与没有抗体的情况中的结合比较时)(见实施例6);和/或

[0186] j) 其中该抗体结合JEG3细胞(ATCC编号HTB36)上的人HLA-G(见实施例5),且其中该抗体抑制ILT2结合JEG3细胞(ATCC编号HTB36)上的HLA-G(超过50%(在一个实施方案中超过80%))(当与没有抗体的情况中的结合比较时)(见实施例6);和/或

[0187] k) 其中该抗体结合人HLA-Gβ2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:25),且其中该抗体将ILT2结合单体和/或二聚体和/或三聚体HLA-Gβ2M MHC I复合物抑制超过60%(当与没有抗体的情况中的结合比较时)将ILT4结合二聚体和/或三聚体HLA-Gβ2M MHC I复合物抑制超过50%(当与没有抗体的情况中的结合比较时)(见例如实施例4b)。

[0188] 在本发明的一个实施方案中,该抗体是IgG1同种型的。在本发明的一个实施方案中,该抗体是具有突变L234A,L235A和P329G(编号依照Kabat的EU索引)的IgG1同种型的。

[0189] 在又一个方面,依照上述实施方案任一的抗HLA-G抗体可以单一地或组合地并入下文1-7节描述的任何特征:

[0190] 1. 抗体亲和力

[0191] 在某些实施方案中,本文中提供的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$, $\leq 100\text{nM}$, $\leq 10\text{nM}$, $\leq 1\text{nM}$, $\leq 0.1\text{nM}$, $\leq 0.01\text{nM}$,或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更少,例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ,例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M)的解离常数KD。

[0192] 在一个优选实施方案中,KD是使用表面等离子共振测定法使用BIACORE®于25°C使用固定化抗原CM5芯片在约10个响应单位(RU)测量的。简言之,依照供应商的用法说明书用盐酸N-乙基-N'-(3-二甲基氨基丙基)-碳二亚胺(EDC)和N-羟基琥珀酰亚胺(NHS)活化羧甲基化右旋糖苷生物传感器芯片(CM5,BIACORE,Inc.)。将抗原用10mM乙酸钠pH 4.8稀释至5μg/ml(约0.2μM),然后以5μl/分钟的流速注射以获得约10个响应单位(RU)的偶联蛋白质。注入抗原后,注入1M乙醇胺以封闭未反应基团。为了动力学测量,于25°C以约25μl/分钟的流速注入在含0.05%聚山梨酯20(TWEEN-20™)表面活性剂的PBS(PBST)中两倍连续稀释的Fab(0.78nM至500nM)。使用简单对一朗格缪尔(Langmuir)结合模型(BIACORE® Evaluation软件版本3.2)通过同时拟合结合和解离传感图计算结合速率(k_{on} 或 k_a)和解离速率(k_{off} 或 k_d)。平衡解离常数(KD)以比率 k_d/k_a ($k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$)计算。参见例如Chen et al., J.Mol.Biol.293:865-881(1999)。如果根据上文表面等离子共振测定法,结合速率超过 $10^6\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$,那么可使用荧光淬灭技术来测定结合速率,即根据分光计诸如配备了断流装置的分光光度计(Aviv Instruments)或8000系列SLM-AMINCO™分光光度计(ThermoSpectronic)中用搅拌比色杯进行的测量,在存在浓度渐增的抗原的情况下,测量PBS pH 7.2中20nM抗抗原抗体(Fab形式)于25°C的荧光发射强度(激发=295nm;发射=340nm,16nm带通)的升高或降低。

[0193] 2. 抗体片段

[0194] 在某些实施方案中,本文中提供的抗体是抗体片段。抗体片段包括但不限于Fab,Fab',Fab'-SH, $F(ab')_2$,Fv,和scFv片段,及下文描述的其它片段。关于某些抗体片段的综述,参见Hudson,P.J.et al.,Nat.Med.9:129-134(2003)。关于scFv片段的综述,参见例如Plueckthun,A.,In:The Pharmacology of Monoclonal Antibodies,Vol.113,Rosenburg and Moore(eds.),Springer-Verlag,New York(1994),pp.269-315;还可参见W0 93/16185;及美国专利No.5,571,894和No.5,587,458。关于包含补救受体结合表位残基且具有延长的体内半衰期的Fab和 $F(ab')_2$ 片段的讨论,参见美国专利No.5,869,046。

[0195] 双抗体是具有两个抗原结合位点的抗体片段,其可以是二价的或双特异性的。参见例如EP 0 404 097;WO 1993/01161;Hudson,P.J.et al.,*Nat.Med.*9:129-134(2003);及Holliger,P.et al.,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*90:6444-6448(1993)。三抗体和四抗体也记载于Hudson,P.J.et al.,*Nat.Med.*9:129-134(2003)。

[0196] 单域抗体是包含抗体的整个或部分重链可变域或整个或部分轻链可变域的抗体片段。在某些实施方案中,单域抗体是人单域抗体(Domantis,Inc.,Waltham,MA;参见例如美国专利No.6,248,516B1)。

[0197] 可以通过多种技术,包括但不限于对完整抗体的蛋白水解消化及重组宿主细胞(例如大肠杆菌或噬菌体)的生成来生成抗体片段,如本文中所描述的。

[0198] 3. 嵌合抗体和人源化的抗体

[0199] 在某些实施方案中,本文中提供的抗体是嵌合抗体。某些嵌合抗体记载于例如美国专利No.4,816,567;及Morrison,S.L.et al.,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 81:6851-6855(1984)。在一个例子中,嵌合抗体包含非人可变区(例如自小鼠,大鼠,仓鼠,家兔,或非人灵长类,诸如猴衍生的可变区)和人恒定区。在又一个例子中,嵌合抗体是“类转换的”抗体,其中类或亚类已经自亲本抗体的类或亚类改变。嵌合抗体包括其抗原结合片段。

[0200] 在某些实施方案中,嵌合抗体是人源化抗体。通常,将非人抗体人源化以降低对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。一般地,人源化抗体包含一个或多个可变域,其中HVR,例如CDR(或其部分)自非人抗体衍生,而FR(或其部分)自人抗体序列衍生。任选地,人源化抗体还会至少包含人恒定区的一部分。在一些实施方案中,将人源化抗体中的一些FR残基用来自非人抗体(例如衍生HVR残基的抗体)的相应残基替代,例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0201] 人源化抗体及其生成方法综述于例如Almagro,J.C.and Fransson,J.,*Front.Biosci.*13:1619-1633(2008),并且进一步记载于例如Riechmann,I.et al.,*Nature* 332:323-329(1988);Queen,C.et al.,*Proc.Nat'l Acad.Sci.USA*86:10029-10033(1989);美国专利No.5,821,337,No.7,527,791,No.6,982,321,和No.7,087,409;Kashmiri,S.V.et al.,*Methods* 36:25-34(2005)(记载SDR(a-CDR)嫁接);Padlan,E.A.,*Mol.Immunol.*28:489-498(1991)(记载“重修表面”);Dall'Acqua,W.F.et al.,*Methods* 36:43-60(2005)(记载“FR改组”);Osborn,J.et al.,*Methods* 36:61-68(2005)及Klimka,A.et al.,*Br.J.Cancer* 83:252-260(2000)(记载FR改组的“引导选择”办法)。

[0202] 可以用于人源化的人框架区包括但不限于:使用“最佳拟合(best-fit)”方法选择的框架区(见例如Sims,M.J.等,*J.Immunol.*151:2296-2308(1993));自轻或重链可变区的特定亚组的人抗体的共有序列衍生的框架区(见例如Carter,P.等,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA*,89:4285-4289(1992);及Presta,L.G.等,*J.Immunol.*,151:2623-2632(1993));人成熟的(体细胞突变的)框架区或人种系框架区(见例如Almagro,J.C.和Fransson,J.,*Front.Biosci.*13:1619-1633(2008));和通过筛选FR文库衍生的框架区(见例如Baca,M.等,*J.Biol.Chem.*272:10678-10684(1997)及Rosok,M.J.等,*J.Biol.Chem.*271:22611-22618(1996))。

[0203] 4. 人抗体

[0204] 在某些实施方案中,本文中提供的抗体是人抗体。可以使用本领域中已知的多种

技术来生成抗体。一般地,人抗体记载于van Dijk,M.A.and van de Winkel,J.G.,*Curr.Opin.Pharmacol.*5:368-374(2001)及Lonberg,N.,*Curr.Opin.Immunol.*20:450-459(2008)。

[0205] 可以通过对转基因动物施用免疫原来制备人抗体,所述转基因动物已经修饰为响应抗原性攻击而生成完整人抗体或具有人可变区的完整抗体。此类动物通常含有整个或部分人免疫球蛋白基因座,其替换内源免疫球蛋白基因座,或者其在染色体外存在或随机整合入动物的染色体中。在此类转基因小鼠中,一般已经将内源免疫球蛋白基因座灭活。关于自转基因动物获得人抗体的方法的综述参见Lonberg,N.,*Nat.Biotech.*23:1117-1125(2005)。还可参见例如美国专利No.6,075,181和No.6,150,584,其描述了XENOMOUSE™技术;美国专利No.5,770,429,其描述了HUMAB®技术;美国专利No.7,041,870,其描述了K-MOUSE®技术,和美国专利申请公开文本No.US 2007/0061900,其描述了VELOCIMOUSE®技术。可以例如通过与不同人恒定区组合进一步修饰来自此类动物生成的完整抗体的人可变区。

[0206] 也可以通过基于杂交瘤的方法生成抗体。已经描述了用于生成人单克隆抗体的人骨髓瘤和小鼠-人异源骨髓瘤细胞系(参见例如Kozbor,D.,*J.Immunol.*133:3001-3005(1984);Brodeur,B.R.et al.,*Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*,Marcel Dekker,Inc.,New York(1987),pp.51-63;及Boerner,P.et al.,*J.Immunol.*147:86-95(1991))。经由人B细胞杂交瘤技术生成的人抗体也记载于Li,J.et al.,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 103:3557-3562(2006)。其它方法包括那些记载于例如美国专利No.7,189,826(其描述了自杂交瘤细胞系生成单克隆人IgM抗体)及Ni,J.,*Xiandai Mianyixue* 26:265-268(2006)(其描述了人-人杂交瘤)的。人杂交瘤技术(Trioma技术)也记载于Vollmers,H.P.and Brandlein,S.,*Histology and Histopathology* 20:927-937(2005)及Vollmers,H.P.and Brandlein,S.,*Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 27:185-191(2005)。

[0207] 也可以如下生成抗体,即分离自人衍生的噬菌体展示文库选择的Fv克隆可变域序列。然后,可以将此类可变域序列与期望的人恒定域组合。下文描述了自抗体文库选择人抗体的技术。

[0208] 5. 文库衍生的抗体

[0209] 可以通过对组合文库筛选具有期望的一种或多种活性的抗体来分离本发明的抗体。例如,用于生成噬菌体展示文库及对此类文库筛选拥有期望结合特征的抗体的多种方法是本领域中已知的。此类方法综述于例如Hoogenboom,H.R.et al.,*Methods in Molecular Biology* 178:1-37(2001),并且进一步记载于例如McCafferty,J.et al.,*Nature* 348:552-554(1990);Clackson,T.et al.,*Nature* 352:624-628(1991);Marks,J.D.et al.,*J.Mol.Biol.*222:581-597(1992);Marks,J.D.and Bradbury,A.,*Methods in Molecular Biology* 248:161-175(2003);Sidhu,S.S.et al.,*J.Mol.Biol.*338:299-310(2004);Lee,C.V.et al.,*J.Mol.Biol.*340:1073-1093(2004);Fellouse,F.A.,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 101:12467-12472(2004);及Lee,C.V.et al.,*J.Immunol.Methods* 284:119-132(2004)。

[0210] 在某些噬菌体展示方法中,将VH和VL基因的全集分别通过聚合酶链式反应(PCR)

克隆,并在噬菌体文库中随机重组,然后可以对所述噬菌体文库筛选抗原结合噬菌体,如记载于Winter,G.et al.,Ann.Rev.Immunol.12:433-455(1994)。噬菌体通常以单链Fv(scFv)片段或以Fab片段展示抗体片段。来自经免疫来源的文库提供针对免疫原的高亲和力抗体,而不需要构建杂交瘤。或者,可以(例如自人)克隆未免疫全集以在没有任何免疫的情况中提供针对一大批非自身和还有自身抗原的抗体的单一来源,如由Griffiths,A.D.et al.,EMBO J,12:725-734(1993)描述的。最后,也可以通过自干细胞克隆非重排的V基因区段,并使用含有随机序列的PCR引物编码高度可变的CDR3区并在体外实现重排来合成生成未免疫文库,如由Hoogenboom,H.R.and Winter,G.,J.Mol.Biol.227:381-388(1992)所描述的。描述人抗体噬菌体文库的专利公开文本包括例如:美国专利No.5,750,373及美国专利公开文本No.2005/0079574,2005/0119455,2005/0266000,2007/0117126,2007/0160598,2007/0237764,2007/0292936和2009/0002360。

[0211] 认为自人抗体文库分离的抗体或抗体片段是本文中的人抗体或人抗体片段。

[0212] 6.多特异性抗体

[0213] 在某些实施方案中,本文中提供的抗体是多特异性抗体,例如双特异性抗体。多特异性抗体是对至少两种不同位点具有结合特异性的单克隆抗体。在某些实施方案中,结合特异性之一针对HLA-G,而另一种针对任何其它抗原。在某些实施方案中,双特异性抗体可结合HLA-G上的两种不同表位。也可以使用双特异性抗体来将细胞毒剂定位于表达HLA-G的细胞。双特异性抗体可以以全长抗体或抗体片段制备。

[0214] 用于生成多特异性抗体的技术包括但不限于具有不同特异性的两对免疫球蛋白重链-轻链的重组共表达(参见Milstein,C.and Cuello,A.C.,Nature 305:537-540(1983);WO 93/08829;及Traunecker,A.et al.,EMBO J.10:3655-3659(1991)),和“节-入-穴”工程化(参见例如美国专利No.5,731,168)。也可以通过用于生成抗体Fc-异二聚体分子的工程化静电操纵效应(WO 2009/089004);交联两种或更多种抗体或片段(参见例如美国专利No.4,676,980及Brennan,M.et al.,Science 229:81-83(1985));使用亮氨酸拉链来生成双特异性抗体(参见例如Kostelny,S.A.et al.,J.Immunol.148:1547-1553(1992));使用用于生成双特异性抗体片段的“双抗体”技术(参见例如Holliger,P.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993));及使用单链Fv(sFv)二聚体(参见例如Gruber,M.et al.,J.Immunol.152:5368-5374(1994));及制备三特异性抗体(如例如Tutt,A.et al.,J.Immunol.147:60-69(1991)中所描述的)来生成多特异性抗体。

[0215] 本文中还包括具有三个或更多个功能性抗原结合位点的工程化改造抗体,包括“章鱼抗体”(参见例如US 2006/0025576)。

[0216] 本文中的抗体或片段还包括包含结合HLA-G及另一种不同抗原的抗原结合位点的“双重作用Fab”或“DAF”(参见例如US 2008/0069820)。

[0217] 本文中的抗体或片段还包括WO 2009/080251,WO 2009/080252,WO 2009/080253,WO 2009/080254,WO 2010/112193,WO 2010/115589,WO 2010/136172,WO 2010/145792,及WO 2010/145793,WO 2011/117330,WO 2012/025525,WO 2012/025530,WO 2013/026835,WO 2013/026831,WO 2013/164325,或WO 2013/174873中记载的多特异性抗体。

[0218] 7.抗体变体

[0219] 在某些实施方案中,涵盖本文中提供的抗体的氨基酸序列变体。例如,可能期望改

善抗体的结合亲和力和/或其它生物学特性。可以通过将适宜的修饰引入编码抗体的核苷酸序列中,或者通过肽合成来制备抗体的氨基酸序列变体。此类修饰包括例如对抗体的氨基酸序列内的残基的删除,和/或插入和/或替代。可以进行删除,插入,和替代的任何组合以得到最终的构建体,只要最终的构建体拥有期望的特征,例如抗原结合。

[0220] a) 替代,插入,和删除变体

[0221] 在某些实施方案中,提供具有一处或多处氨基酸替代的抗体变体。替代诱变感兴趣的位点包括HVR和FR。例示性变化在表1中在“例示性替代”的标题下提供,并且如下文参照氨基酸侧链类别进一步描述的。保守替代在表1中在“优选的替代”的标题下显示。可以将氨基酸替代引入感兴趣的抗体中,并且对产物筛选期望的活性,例如保留/改善的抗原结合,降低的免疫原性,或改善的ADCC或CDC。

[0222] 表1

初始残基	例示性替代	优选的替代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp; Lys; Arg	Gln
[0223] Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正亮氨酸	Leu
Leu (L)	正亮氨酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
[0224] Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正亮氨酸	Leu

[0225] 依照共同的侧链特性,氨基酸可以如下分组:

[0226] (1) 疏水性的: 正亮氨酸, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

[0227] (2) 中性, 亲水性的: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

[0228] (3) 酸性的:Asp,Glu;

[0229] (4) 碱性的:His,Lys,Arg;

[0230] (5) 影响链取向的残基:Gly,Pro;

[0231] (6) 芳香族的:Trp,Tyr,Phe。

[0232] 非保守替代会需要用这些类别之一的成员替换另一个类别的。

[0233] 一类替代变体牵涉替代亲本抗体(例如人源化或人抗体)的一个或多个高变区残基。一般地,为进一步研究选择的所得变体相对于亲本抗体会具有某些生物学特性的改变(例如改善)(例如升高的亲和力,降低的免疫原性)和/或会基本上保留亲本抗体的某些生物学特性。一种例示性替代变体是亲和力成熟抗体,其可以例如使用基于噬菌体展示的亲和力成熟技术诸如本文中所述的那些技术来方便地生成。简言之,将一个或多个HVR残基突变,并将变体抗体在噬菌体上展示,并对其筛选特定的生物学活性(例如结合亲和力)。

[0234] 可以在HVR中做出变化(例如替代),例如以改善抗体亲和力。可以在HVR“热点”中,即由在体细胞成熟过程期间以高频率经历突变的密码子编码的残基(参见例如Chowdhury, P.S., *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008)), 和/或SDR(a-CDR)做出此类变化,对所得变体VH或VL测试结合亲和力。通过次级文库的构建和再选择进行的亲和力成熟已经记载于例如Hoogenboom, H.R. et al., in *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (2002)。在亲和力成熟的一些实施方案中,通过多种方法(例如易错PCR,链改组,或寡核苷酸指导的诱变)任一将多样性引入为成熟选择的可变基因。然后,创建次级文库。然后,筛选文库以鉴定具有期望亲和力的任何抗体变体。另一种引入多样性的方法牵涉HVR指导的办法,其中将数个HVR残基(例如一次4-6个残基)随机化。可以例如使用丙氨酸扫描诱变或建模来特异性鉴定牵涉抗原结合的HVR残基。特别地,经常靶向CDR-H3和CDR-L3。

[0235] 在某些实施方案中,可以在一个或多个HVR内发生替代,插入,或删除,只要此类变化不实质性降低抗体结合抗原的能力。例如,可以在HVR中做出保守变化(例如保守替代,如本文中提供的),其没有实质性降低结合亲和力。此类变化可以在HVR“热点”或SDR以外。在上文提供的变体VH和VL序列的某些实施方案中,每个HVR或是未改变的,或是含有不多于1, 2或3处氨基酸替代。

[0236] 一种可用于鉴定抗体中可作为诱变靶位的残基或区域的方法称作“丙氨酸扫描诱变”,如记载于Cunningham, B.C. and Wells, J.A., *Science*, 244:1081-1085 (1989)。在这种方法中,鉴定一个残基或一组靶残基(例如带电荷的残基,诸如arg, asp, his, lys, 和glu), 并用中性或带负电荷的氨基酸(例如丙氨酸或多丙氨酸)替换以测定抗体与抗原的相互作用是否受到影响。可以在对初始替代表明功能敏感性的氨基酸位置引入进一步的替代。或者/另外,利用抗原-抗体复合物的晶体结构来鉴定抗体与抗原之间的接触点。作为替代的候选,可以靶向或消除此类接触残基和邻近残基。可以筛选变体以确定它们是否含有期望特性。

[0237] 氨基酸序列插入包括长度范围为1个残基至含有100或更多个残基的多肽的氨基和/或羧基末端融合,以及单个或多个氨基酸残基的序列内插入。末端插入的例子包括具有N端甲硫氨酰基残基的抗体。抗体分子的其它插入变体包括抗体的N或C端与酶(例如对于ADEPT)或延长抗体的血清半衰期的多肽的融合物。

[0238] b) Fc区变体

[0239] 在某些实施方案中,可以将一处或多处氨基酸修饰引入本文中提供的抗体的Fc区中,由此生成Fc区变体。Fc区变体可以包含在一个或多个氨基酸位置包含氨基酸修饰(例如替代)的人Fc区序列(例如人IgG1,IgG2,IgG3或IgG4Fc区)。

[0240] 具有降低的效应器功能的抗体包括那些具有Fc区残基238,265,269,270,297,327和329中的一个或多个的替代的(美国专利No.6,737,056)。此类Fc突变体包括在氨基酸位置265,269,270,297和327中的两处或更多处具有替代的Fc突变体,包括残基265和297替代成丙氨酸的所谓的“DANA”Fc突变体(美国专利No.7,332,581)。

[0241] 描述了具有改善的或降低的对FcR的结合的某些抗体变体(参见例如美国专利No.6,737,056;WO 2004/056312;及Shields,R.L.et al.,J.Biol.Chem.276:6591-6604(2001))。

[0242] 在本发明的一个实施方案中,此类抗体是具有突变L234A和L235A或具有突变L234A,L235A和P329G的IgG1,在另一个实施方案中,或具有突变S228P和L235E或S228P,L235E或和P329G的IgG4(编号方式依照Kabat et al,Kabat et al.,Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD,1991的EU索引)。

[0243] 具有延长的半衰期和改善的对新生儿Fc受体(FcRn)的结合的抗体记载于US 2005/0014934,新生儿Fc受体(FcRn)负责将母体IgG转移至胎儿(Guyer,R.L.et al.,J.Immunol.117:587-593(1976)及Kim,J.K.et al.,J.Immunol.24:2429-2434(1994))。那些抗体包含其中具有改善Fc区对FcRn的结合的一处或多处替代的Fc区。此类Fc变体包括那些在Fc区残基238,256,265,272,286,303,305,307,311,312,317,340,356,360,362,376,378,380,382,413,424或434中的一处或多处具有替代,例如Fc区残基434的替代的(美国专利No.7,371,826)。

[0244] 还可参见Duncan,A.R.and Winter,G.,Nature 322:738-740(1988);US 5,648,260;US 5,624,821;及WO 94/29351,其关注Fc区变体的其它例子。

[0245] c) 经半胱氨酸工程化改造的抗体变体

[0246] 在某些实施方案中,可能期望创建经半胱氨酸工程化改造的抗体,例如“thioMab”,其中抗体的一个或多个残基用半胱氨酸残基替代。在特定实施方案中,替代的残基存在于抗体的可接近位点。通过用半胱氨酸替代那些残基,反应性硫醇基团由此定位于抗体的可接近位点,并且可以用于将抗体缀合至其它模块,诸如药物模块或接头-药物模块,以创建免疫缀合物,如本文中进一步描述的。在某些实施方案中,可以用半胱氨酸替代下述残基之任一个或多个:轻链的V205(Kabat编号方式);重链的A118(EU编号方式);和重链Fc区的S400(EU编号方式)。可以如例如美国专利No.7,521,541所述生成经半胱氨酸工程化改造的抗体。

[0247] d) 抗体衍生物

[0248] 在某些实施方案中,可以进一步修饰本文中提供的抗体以含有本领域知道的且易于获得的另外的非蛋白质性质模块。适合于抗体衍生化的模块包括但不限于水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性例子包括但不限于聚乙二醇(PEG),乙二醇/丙二醇共聚物,羧甲基纤维素,右旋糖苷,聚乙烯醇,聚乙烯吡咯烷酮,聚-1,3-二氧戊环,聚-1,3,6-三噁烷,乙烯/马来酸酐共聚物,聚氨基酸(均聚物或随机共聚物),和右旋糖苷或聚(n-乙烯吡咯烷

酮) 聚乙二醇, 丙二醇均聚物, 环氧丙烷/环氧乙烷共聚物, 聚氧乙烯化多元醇(例如甘油), 聚乙烯醇, 及其混合物。由于其在水中的稳定性, 聚乙二醇丙醛在生产中可能具有优势。聚合物可以是任何分子量, 而且可以是分支的或不分支的。附着至抗体的聚合物的数目可以变化, 而且如果附着了多于一个聚合物, 那么它们可以是相同或不同的分子。一般而言, 可根据下述考虑来确定用于衍生化的聚合物的数目和/或类型, 包括但不限于抗体要改进的具体特性或功能, 抗体衍生物是否会用于指定条件下的治疗, 等。

[0249] 在另一个实施方案中, 提供抗体和可以通过暴露于辐射而选择性加热的非蛋白质性质模块的缀合物。在一个实施方案中, 非蛋白质性质模块是碳纳米管(Kam, N.W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102:11600-11605 (2005))。辐射可以是任何波长的, 而且包括但不限于对普通细胞没有损害, 但是将非蛋白质性质模块加热至抗体-非蛋白质性质模块附近的细胞被杀死的温度的波长。

[0250] B. 重组方法和组合物

[0251] 可使用重组方法和组合物来生成抗体, 例如如记载于美国专利No. 4,816,567的。在一个实施方案中, 提供编码本文所述抗HLA-G抗体的分离的核酸。此类核酸可编码包含抗体VL的氨基酸序列和/或包含抗体VH的氨基酸序列(例如抗体的轻和/或重链)。在又一个实施方案中, 提供包含此类核酸的一种或多种载体(例如表达载体)。在又一个实施方案中, 提供包含此类核酸的宿主细胞。在一个此类实施方案中, 宿主细胞包含(例如已经用下述各项转化): (1) 包含核酸的载体, 所述核酸编码包含抗体VL的氨基酸序列和包含抗体VH的氨基酸序列, 或(2) 第一载体和第二载体, 所述第一载体包含编码包含抗体VL的氨基酸序列的核酸, 所述第二载体包含编码包含抗体VH的氨基酸序列的核酸。在一个实施方案中, 宿主细胞是真核的, 例如中国仓鼠卵巢(CHO)细胞, HEK293细胞或淋巴样细胞(例如Y0, NS0, Sp20细胞)。在一个实施方案中, 提供生成抗HLA-G抗体的方法, 其中该方法包括在适合于抗体表达的条件下培养包含编码抗体的核酸的宿主细胞, 如上文提供的, 并任选自宿主细胞(或宿主细胞培养液)回收抗体。

[0252] 对于抗HLA-G抗体的重组生成, 分离编码抗体的核酸(例如如上文所描述的), 并插入一种或多种载体中, 用于在宿主细胞中进一步克隆和/或表达。可使用常规规程将此类核酸容易地分离并测序(例如通过使用寡核苷酸探针来进行, 所述寡核苷酸探针能够特异性结合编码抗体重和轻链的基因)。

[0253] 适合于克隆或表达编码抗体的载体的宿主细胞包括本文所述原核或真核细胞。例如, 可以在细菌中生成抗体, 特别是在不需要糖基化和Fc效应器功能时。对于抗体片段和多肽在细菌中的表达, 参见例如US 5,648,237; US 5,789,199; 及US 5,840,523。还可参见Charlton, K.A., In: Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254, 其描述抗体片段在大肠杆菌中的表达。表达后, 可以在可溶性级分中自细菌细胞浆分离抗体, 并可以进一步纯化。

[0254] 在原核生物之外, 真核微生物诸如丝状真菌或酵母也是适合于编码抗体的载体的克隆或表达宿主, 包括其糖基化途径已经“人源化”, 导致生成具有部分或完全人的糖基化样式的抗体的真菌和酵母菌株。参见Gerngross, T.U., Nat. Biotech. 22:1409-1414 (2004); 及Li, H. et al., Nat. Biotech. 24:210-215 (2006)。

[0255] 适合于表达糖基化抗体的宿主细胞也是自多细胞生物体(无脊椎动物和脊椎动

物) 衍生的。无脊椎动物细胞的例子包括植物和昆虫细胞。已经鉴定出许多杆状病毒株, 其可以与昆虫细胞联合使用, 特别是用于转染草地夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 细胞。

[0256] 也可利用植物细胞培养物作为宿主。参见例如美国专利No.5,959,177;No.6,040,498;No.6,420,548;No.7,125,978;及No.6,417,429(其描述用于在转基因植物中生成抗体的PLANTIBODIES™技术)。

[0257] 也可使用脊椎动物细胞作为宿主。例如, 适应悬浮生长的哺乳动物细胞系可能是有用的。有用哺乳动物宿主细胞系的其它例子有经SV40转化的猴肾CV1系(COS-7); 人胚肾系(293或293细胞, 如记载于例如Graham,F.L.et al., *J.Gen Virol.* 36:59-74(1977)); 幼仓鼠肾细胞(BHK); 小鼠塞托利(*sertoli*) 细胞(TM4细胞, 如记载于例如Mather,J.P., *Biol.Reprod.* 23:243-252(1980)); 猴肾细胞(CV1); 非洲绿猴肾细胞(VERO-76); 人宫颈癌细胞(HELA); 犬肾细胞(MDCK); 牛鼠(*buffalo rat*) 肝细胞(BRL 3A); 人肺细胞(W138); 人肝细胞(Hep G2); 小鼠乳房肿瘤(MMT 060562); TRI细胞, 如记载于例如Mather,J.P.et al., *Annals N.Y.Acad.Sci.* 383:44-68(1982); MRC 5细胞; 和F54细胞。其它有用哺乳动物宿主细胞系包括中国仓鼠卵巢(CHO) 细胞, 包括DHFR⁻CHO细胞(Urlaub,G.et al., *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 77:4216-4220(1980)); 和骨髓瘤细胞系诸如Y0, NS0和Sp2/0。关于适合于抗体生成的某些哺乳动物宿主细胞系的综述参见例如Yazaki,P.and Wu,A.M., *Methods in Molecular Biology*, Vol.248, Lo,B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa,NJ (2004), pp.255-268。

[0258] C. 测定法

[0259] 可通过本领域已知的多种测定法对本文中提供的抗HLA-G抗体鉴定, 筛选, 或表征其物理/化学特性和/或生物学活性。

[0260] 1. 结合测定法和其它测定法

[0261] 一方面, 对本发明的抗体测试其抗原结合活性, 例如通过已知方法诸如ELISA, Western印迹, 等。

[0262] 另一方面, 可使用竞争测定法来鉴定与HLA-G-0032(包含VH序列SEQ ID NO:7和VL序列SEQ ID NO:8) 竞争对HLA-G的结合的抗体。本发明的一个实施方案是与包含VH序列SEQ ID NO:7的所有3种HVR和VL序列SEQ ID NO:8的所有3种HVR的抗HLA-G抗体竞争对人HLA-G的结合的抗体。在某些实施方案中, 此类竞争性抗体结合与抗HLA-G抗体HLA-G-0032所结合表位相同的表位(例如线性或构象表位)。在一个实施方案中, 提供与包含VH序列SEQ ID NO:7和VL序列SEQ ID NO:8的抗体结合HLA-G上相同表位的抗HLA-G抗体。另一方面, 可使用竞争测定法来鉴定与HLA-G-0037(包含VH序列SEQ ID NO:15和VL序列SEQ ID NO:16) 竞争对HLA-G的结合的抗体。本发明的一个实施方案是与包含VH序列SEQ ID NO:15的所有3种HVR和VL序列SEQ ID NO:16的所有3种HVR的抗HLA-G抗体竞争对人HLA-G的结合的抗体。在某些实施方案中, 此类竞争性抗体结合与抗HLA-G抗体HLA-G-0037所结合表位相同的表位(例如线性或构象表位)。在一个实施方案中, 提供与包含VH序列SEQ ID NO:15和VL序列SEQ ID NO:16的抗体结合HLA-G上相同表位的抗HLA-G抗体。用于定位抗体所结合表位的详细例示性方法参见Morris,G.E. (ed.) (1996) "Epitope Mapping Protocols," in *Methods in Molecular Biology*, vol.66 (Humana Press, Totowa,NJ)。

[0263] 在一种例示性竞争测定法中, 在包含第一经标记抗体(其结合HLA-G, 例如抗HLA-G

抗体HLA-G-0032或HLA-G.0037) 和第二未标记抗体(其要测试与第一抗体竞争对HLA-G的结合的能力)的溶液中温育固定化HLA-G。第二抗体可存在于杂交瘤上清液中。作为对照,在包含第一经标记抗体但不包含第二未标记抗体的溶液中温育固定化HLA-G。在允许第一抗体结合HLA-G的条件下温育后,除去过量的未结合抗体,并测量与固定化HLA-G联合的标记物的量。如果测试样品中与固定化HLA-G联合的标记物的量相对于对照样品实质性减少,那么这指示第二抗体与第一抗体竞争对HLA-G的结合。参见Harlow, E. and Lane, D., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Chapter 14, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY (1988)。另一种例示性竞争测定法见实施例2(表位作图ELISA/结合竞争测定法)。

[0264] 2. 活性测定法

[0265] 一方面,提供了用于鉴定具有生物学活性的抗HLA-G抗体的测定法。生物学活性可包括例如增强不同免疫细胞,包括T细胞的活化和/或增殖的能力。例如,它们增强免疫调控性细胞因子(例如干扰素伽马($IFN\ \gamma$)和/或肿瘤坏死因子阿尔法($TNF\ \alpha$))的分泌。增强或能增强的其它免疫调控性细胞因子有例如 $IL1\ \beta$, $IL6$, $IL12$, 粒酶B,等。对不同细胞类型的结合。还提供了在体内和/或在体外具有此类生物学活性的抗体。

[0266] 在某些实施方案中,对本发明的抗体测试此类生物学活性,如记载于例如下文实施例。

[0267] D. 免疫缀合物(仅癌症或为靶标修饰)

[0268] 本发明还提供包含本文中的抗HLA-G抗体的免疫缀合物,该抗体与一种或多种细胞毒剂诸如化疗剂或药物,生长抑制剂,毒素(例如蛋白质毒素,细菌,真菌,植物,或动物起源的酶活性毒素,或其片段),或放射性同位素缀合。

[0269] 在一个实施方案中,免疫缀合物是抗体-药物缀合物(ADC),其中抗体与一种或多种药物缀合,包括但不限于美登木生物碱(maytansinoid)(参见US 5,208,020,US 5,416,064和EP 0 425 235 B1);auristatin诸如单甲基auristatin药物模块DE和DF(MMAE和MMAF)(参见US 5,635,483,US 5,780,588,及US 7,498,298);多拉司他汀(dolastatin);加利车霉素(calicheamicin)或其衍生物(参见US 5,712,374,US 5,714,586,US 5,739,116,US 5,767,285,US 5,770,701,US 5,770,710,US 5,773,001,和US 5,877,296;Hinman, L.M.等人,Cancer Res.53:3336-3342(1993);及Lode,H.N.等人,Cancer Res.58:2925-2928(1998));蒽环类抗生素诸如道诺霉素(daunomycin)或多柔比星(doxorubicin)(参见Kratz,F.等人,Current Med.Chem.13:477-523(2006);Jeffrey,S.C.等人,Bioorg Med.Chem.Letters16:358-362(2006);Torgov,M.Y.等人,Bioconjug.Chem.16:717-721(2005);Nagy,A.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 97:829-834(2000);Dubowchik,G.M.等人,Bioorg.&Med.Chem.Letters 12:1529-1532(2002);King,H.D.等人,J.Med.Chem.45:4336-4343(2002);及美国专利No.6,630,579);甲氨蝶呤;长春地辛(vindesine);紫杉烷诸如多西他赛(docetaxel),帕利他赛(paclitaxel),larotaxel,tesetaxel,和ortataxel;单端孢菌素(trichothecene);和CC1065。

[0270] 在另一个实施方案中,免疫缀合物包含本文所述抗体,该抗体与酶活性毒素或其片段缀合,包括但不限于白喉毒素A链,白喉毒素的非结合活性片段,外毒素A链(来自铜绿假单胞菌*Pseudomonas aeruginosa*),蓖麻毒蛋白(ricin)A链,相思豆毒蛋白(abrin)A链,

蒴莲根毒蛋白 (modeccin) A链, α -帚曲霉素 (sarcin), 油桐 (*Aleurites fordii*) 毒蛋白, 香石竹 (dianthin) 毒蛋白, 美洲商陆 (*Phytolaca americana*) 毒蛋白 (PAPI, PAPII和PAP-S), 苦瓜 (*Momordica charantia*) 抑制物, 麻疯树毒蛋白 (curcin), 巴豆毒蛋白 (crotonin), 肥皂草 (*sapaonaria officinalis*) 抑制物, 白树毒蛋白 (gelonin), 丝林霉素 (mitogellin), 局限曲菌素 (restrictocin), 酚霉素 (phenomycin), 依诺霉素 (enomycin) 和单端孢菌素 (tricothecenes)。

[0271] 在另一个实施方案中, 免疫缀合物包含本文所述抗体, 该抗体与放射性原子缀合以形成放射缀合物。多种放射性同位素可用于生成放射缀合物。实例包括 At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} 和Lu的放射性同位素。在将放射缀合物用于检测时, 它可包含放射性原子用于闪烁照相研究, 例如 Tc^{99m} 或 I^{123} , 或自旋标记物用于核磁共振 (NMR) 成像 (也称为磁共振成像, MRI), 诸如再一次的碘-123, 碘-131, 铟-111, 氟-19, 碳-13, 氮-15, 氧-17, 钆, 锰或铁。

[0272] 可使用多种双功能蛋白质偶联剂来制备抗体和细胞毒剂的缀合物, 诸如N-琥珀酰亚氨基-3-(2-吡啶基二硫代) 丙酸酯 (SPDP), 琥珀酰亚氨基-4-(N-马来酰亚氨基甲基) 环己烷-1-羧酸酯 (SMCC), 亚氨基硫烷 (IT), 亚氨酸酯 (诸如盐酸己二酰亚氨酸二甲酯), 活性酯类 (诸如辛二酸二琥珀酰亚氨基酯), 醛类 (诸如戊二醛), 双叠氮化合物 (诸如双(对-叠氮苯甲酰基) 己二胺), 双重氮衍生物 (诸如双(对-重氮苯甲酰基) 乙二胺), 二异氰酸酯 (诸如甲苯2,6-二异氰酸酯), 和双活性氟化合物 (诸如1,5-二氟-2,4-二硝基苯) 的双功能衍生物。例如, 可如Vitetta, E.S.等, *Science* 238:1098-1104 (1987) 中所述制备蓖麻毒蛋白免疫毒素。碳-14标记的1-异硫氰酸苯甲基-3-甲基二亚乙基三胺五乙酸 (MX-DTPA) 是用于将放射性核苷酸与抗体缀合的例示性螯合剂。参见WO 94/11026。接头可以是便于在细胞中释放细胞毒药物的“可切割接头”。例如, 可使用酸不稳定接头, 肽酶敏感接头, 光不稳定接头, 二甲基接头, 或含二硫化物接头 (Chari, R.V.等, *Cancer Res.* 52:127-131 (1992); 美国专利 No. 5,208,020)。

[0273] 本文中的免疫缀合物或ADC明确涵盖但不限于用下列交联剂制备的此类缀合物, 包括但不限于: 商品化 (如购自Pierce Biotechnology Inc., Rockford, IL, U.S.A) 的BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, 和sulfo-SMPB, 和SVSB (琥珀酰亚胺基-(4-乙烯基苄) 苯甲酸酯)。

[0274] E. 用于诊断和检测的方法和组合物

[0275] 在某些实施方案中, 本文中提供的任何抗HLA-G抗体对于检测生物学样品中HLA-G的存在是有用的。如本文中使用的, 术语“检测”涵盖定量或定性检测。在某些实施方案中, 生物学样品包括细胞或组织, 诸如免疫细胞或T细胞浸润物和/或肿瘤细胞。

[0276] 在一个实施方案中, 提供在诊断或检测方法中使用的抗HLA-G抗体。在又一方面, 提供检测生物学样品中HLA-G的存在的方法。在某些实施方案中, 该方法包括在允许抗HLA-G抗体结合HLA-G的条件下使生物学样品与本文所述抗HLA-G抗体接触, 并检测是否在抗HLA-G抗体与HLA-G之间形成复合物。此类方法可以是体外或体内方法。在一个实施方案中, 使用抗HLA-G抗体来选择适合用抗HLA-G抗体治疗的受试者, 例如其中HLA-G是一种用于选择患者的生物标志物。

[0277] 在某些实施方案中,提供经标记的抗HLA-G抗体。标记物包括但不限于直接检测的标记物或模块(诸如荧光,发色,电子致密,化学发光,和放射性标记物),以及例如经由酶促反应或分子相互作用间接检测的模块,诸如酶或配体。例示性标记物包括但不限于放射性同位素³²P,¹⁴C,¹²⁵I,³H,和¹³¹I,荧光团诸如稀土螯合物或荧光素及其衍生物,罗丹明(rhodamine)及其衍生物,丹酰,伞形酮,萤光素酶例如萤火虫萤光素酶和细菌萤光素酶(美国专利No.4,737,456),萤光素,2,3-二氢酞嗪二酮,辣根过氧化物酶(HRP),碱性磷酸酶, β -半乳糖苷酶,葡糖淀粉酶,溶菌酶,糖氧化酶例如葡萄糖氧化酶,半乳糖氧化酶,和葡萄糖-6-磷酸脱氢酶,杂环氧化酶诸如尿酸酶和黄嘌呤氧化酶(其与采用过氧化氢氧化染料前体的酶诸如HRP偶联),乳过氧化物酶,或微过氧化物酶,生物素/亲合素,自旋标记物,噬菌体标记物,稳定的自由基,等等。

[0278] F. 药物配制剂

[0279] 通过混合具有期望纯度的本文所述抗HLA-G抗体与一种或多种任选的药学可接受载体来制备此类抗体的药物配制剂(Remington's Pharmaceutical Sciences,16th edition,Osol,A.(ed.)(1980)),处于冻干配制剂或水性溶液形式。一般地,药学可接受载体在所采用的剂量和浓度对接受者是无毒的,而且包括但不限于:缓冲剂,诸如磷酸盐,柠檬酸盐,和其它有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血酸和甲硫氨酸;防腐剂(诸如氯化十八烷基二甲基苄基铵;氯化己烷双胺;苯扎氯铵;苄索氯铵;酚,丁醇或苯甲醇;对羟基苯甲酸烷基酯,诸如对羟基苯甲酸甲酯或丙酯;邻苯二酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,诸如血清清蛋白,明胶,或免疫球蛋白;亲水性聚合物,诸如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,诸如甘氨酸,谷氨酰胺,天冬酰胺,组氨酸,精氨酸,或赖氨酸;单糖,二糖,和其它碳水化合物,包括葡萄糖,甘露糖,或糊精;螯合剂,诸如EDTA;糖,诸如蔗糖,甘露醇,海藻糖或山梨醇;成盐反荷离子,诸如钠;金属复合物(例如Zn-蛋白质复合物);和/或非离子表面活性剂,诸如聚乙二醇(PEG)。本文中的例示性药学可接受载体进一步包括间质药物分散剂,诸如可溶性中性活性透明质酸酶糖蛋白(sHASEGP),例如人可溶性PH-20透明质酸酶糖蛋白,诸如rhuPH20(HYLENEX®,Baxter International,Inc.)。某些例示性sHASEGP和使用方法(包括rhuPH20)记载于美国专利公开文本No.2005/0260186和No.2006/0104968。在一方面,将sHASEGP与一种或多种别的糖胺聚糖酶诸如软骨素酶组合。

[0280] 例示性冻干抗体配制剂记载于美国专利No.6,267,958。水性抗体配制剂包括那些记载于美国专利No.6,171,586和WO 2006/044908的,后一种配制剂包含组氨酸-乙酸盐缓冲液。

[0281] 本文中的配制剂还可含有所治疗具体适应症所必需的多于一种活性组分,优选活性互补且彼此没有不利影响的那些。例如,可能想要进一步提供。合适的是,此类活性组分以对于预定目的有效的量组合存在。

[0282] 活性组分可包载于例如通过凝聚技术或通过界面聚合制备的微胶囊中(例如分别是羟甲基纤维素或明胶微胶囊和聚(甲基丙烯酸甲酯)微胶囊),在胶状药物投递系统中(例如脂质体,清蛋白微球体,微乳剂,纳米颗粒和纳米胶囊)或在粗滴乳状液中。此类技术披露于例如Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition,Osol,A.(ed.)(1980)。

[0283] 可制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适例子包括含有抗体的固体疏水性聚合物的半透性基质,该基质为成形制品形式,例如膜或微胶囊。

[0284] 用于体内施用的配制剂一般是无菌的。无菌性可容易地实现,例如通过穿过无菌滤膜过滤。

[0285] G. 治疗性方法和组合物

[0286] 本文中提供的任何抗HLA-G抗体(或抗原结合蛋白)可用于治疗方法。

[0287] 一方面,提供了抗HLA-G抗体,其用作药物。又一些方面,提供了抗HLA-G抗体,其用于治疗癌症。在某些实施方案中,提供了抗HLA-G抗体,其用于治疗癌症。在某些实施方案中,本发明提供抗HLA-G抗体,其用于治疗具有癌症的个体的方法,包括对该个体施用有效量的抗HLA-G抗体。

[0288] 在又一些实施方案中,本发明提供抗HLA-G抗体,其用作免疫调控剂/用于直接或间接诱导免疫细胞的增殖,激活(例如通过分泌免疫刺激性细胞因子,像TNF α (TNF α)和IFN γ (IFN γ)或进一步募集。在某些实施方案中,本发明提供抗HLA-G抗体,其用于在个体中免疫调控剂/用于直接或间接诱导免疫细胞的增殖,激活(例如通过分泌免疫刺激性细胞因子,像TNF α 和IFN γ)或进一步募集的方法,包括对该个体施用有效量的该抗HLA-G抗体从而免疫调控或直接或间接诱导免疫细胞的增殖,激活(例如通过分泌免疫刺激性细胞因子,像TNF α 和IFN γ)或进一步募集。

[0289] 在又一些实施方案中,本发明提供抗HLA-G抗体,其用作免疫刺激剂和/或用于刺激肿瘤坏死因子 α (TNF α)分泌。在某些实施方案中,本发明提供抗HLA-G抗体,其用于在个体中免疫调控用于直接或间接诱导免疫细胞的增殖,激活(例如通过分泌免疫刺激性细胞因子,像TNF α 和IFN γ)或进一步募集的方法,包括对该个体施用有效量的该抗HLA-G抗体从而免疫调控以直接或间接诱导免疫细胞的增殖,激活(例如通过分泌免疫刺激性细胞因子,像TNF α 和IFN γ)或进一步募集。

[0290] 依照任何上述实施方案,“个体”优选为人。又一方面,本发明提供抗HLA-G抗体在制造或制备药物中的用途。在一个实施方案中,该药物用于治疗癌症。在又一个实施方案中,该药物用于治疗癌症的方法,包括对具有癌症的个体施用有效量的药物。在又一个实施方案中,该药物用于诱导细胞介导的癌细胞裂解。在又一个实施方案中,该药物用于在罹患癌症的个体中诱导细胞介导的癌细胞裂解的方法,包括对该个体施用有效量的药物以诱导癌细胞凋亡和/或抑制癌细胞增殖。依照任何上述实施方案,“个体”可以为“人”。

[0291] 又一方面,本发明提供用于治疗癌症的方法。在一个实施方案中,该方法包括对具有癌症的个体施用有效量的抗HLA-G抗体。依照任何上述实施方案,“个体”可以为“人”。

[0292] 又一方面,本发明提供用于在罹患癌症的个体中诱导细胞介导的癌细胞裂解的方法。在一个实施方案中,该方法包括对该个体施用有效量的抗HLA-G抗体以在罹患癌症的个体中诱导细胞介导的癌细胞裂解。在一个实施方案中,“个体”为人。

[0293] 又一方面,本发明提供包含本文中提供的任何抗HLA-G抗体的药物配制剂,其用于例如任何上述治疗方法。在一个实施方案中,药物配制剂包含本文中提供的任何抗HLA-G抗体和药学可接受载体。

[0294] 可以通过任何合适手段,包括胃肠外,肺内,和鼻内,及若期望用于局部治疗的话,损伤内施用来施用本发明的抗体(和任何别的治疗剂)。胃肠外输注包括肌肉内,静脉内,动脉内,腹膜内,或皮下施用。部分根据施用是短暂的还是长期的,剂量给药可以通过任何合适路径(例如通过注射,诸如静脉内或皮下注射)进行。本文中涵盖各种剂量给药日程表,包

包括但不限于单次施用或在多个时间点的多次施用,推注施用,和脉冲输注。

[0295] 本发明的抗体应当以一种与较好医学实践一致的方式配制,定剂量,和施用。关于这一点考虑的因素包括所治疗的具体病症,所治疗的具体哺乳动物,患者个体的临床状态,病症的起因,药剂递送部位,施用方法,施用日程表,及医学从业人员知道的其它因素。抗体无需但任选与一种或多种当前用于预防或治疗所讨论病症的药剂一起配制。此类其它药剂的有效量取决于配制剂中存在的抗体的量,病症或治疗的类型,及上文讨论的其它因素。这些通常以与本文所述相同的剂量和施用路径,或者以本文所述剂量的约1-99%,或者以凭经验/在临床上确定为适宜的任何剂量和任何路径使用。

[0296] 对于疾病的预防或治疗,本发明的抗体(当单独地或与一种或多种其它别的治疗剂组合地使用)的适宜剂量会取决于要治疗的疾病的类型,抗体的类型,疾病的严重性和病程,施用抗体是出于预防还是治疗目的,之前的疗法,患者的临床史和对抗体的响应,及主治医师的判断。抗体恰当地以一次或一系列治疗施用于患者。取决于疾病的类型和严重性,约1 μ g/kg至15mg/kg(例如0.5mg/kg至10mg/kg)的抗体可作为施用于患者的初始候选剂量,无论是例如通过一次或多次分开的施用或是通过连续输注。取决于上文所述因素,一个典型日剂量的范围可以为约1 μ g/kg至100mg/kg或更多。对于几天或更长时间的重复施用,取决于状况,治疗一般会持续直至出现疾病症状的期望遏制。抗体的一种例示性剂量会在约0.05mg/kg至约10mg/kg的范围中。如此,可以对患者施用一剂或多剂约0.5mg/kg,2.0mg/kg,4.0mg/kg或10mg/kg(或其任意组合)。此类剂量可间歇施用,例如每周或每三周(例如使得患者接受约2剂至约20剂,或例如约6剂抗体)。可施用一个较高的初始加载剂量,接着是一个或多个较低的剂量。一种例示性剂量给药方案包括施用约4mg/kg的初始加载剂量,接着是约2mg/kg抗体的每周一次维持剂量。然而,其它剂量摄生法可能是有用的。这种疗法的进展易于通过常规技术和测定方法来监测。

[0297] 应当理解,可使用本发明的免疫缀合物实施任何上述配制剂或治疗性方法,作为抗HLA-G抗体的替代或补充。

[0298] 应当理解,可使用本发明的免疫缀合物实施任何上述配制剂或治疗性方法,作为抗HLA-G抗体的替代或补充。

[0299] II. 制品

[0300] 在本发明的另一方面,提供一种制品,其包含对于治疗,预防和/或诊断上文所述病症有用的材料。制品包括容器和容器上或与容器联合的标签或包装插页。合适的容器包括例如瓶,管形瓶,注射器,IV溶液袋,等。容器可以自多种材料诸如玻璃或塑料形成。容器装有单独或与另一种组合物组合有效治疗,预防和/或诊断疾患的组合物,并且可具有无菌存取口(例如,容器可以是具有由皮下注射针可刺穿的塞子的管形瓶或静脉内溶液袋)。组合物中的至少一种活性剂是本发明的抗体。标签或包装插页指示使用组合物来治疗选择的状况。此外,制品可包括(a)其中装有组合物的第一容器,其中该组合物包含本发明的抗体;和(b)其中装有组合物的第二容器,其中该组合物包含别的细胞毒性或其它方面治疗性的药剂。在本发明的这个实施方案中的制品可进一步包括包装插页,其指示可使用组合物来治疗特定状况。或者/另外,制品可进一步包括第二(或第三)容器,其装有药学可接受缓冲液,诸如抑菌性注射用水(BWFI),磷酸盐缓冲盐水,林格(Ringer)氏溶液和右旋糖溶液。它可进一步包括从商业和用户立场看期望的其它材料,包括其它缓冲液,稀释剂,滤器,针,和

注射器。

[0301] 提供下面的实施例和附图来帮助理解本发明,其真实范围在所附权利要求书中列出。理解的是,可以在不背离本发明的精神的情况下在列出的规程中进行修饰。

[0302] 氨基酸序列的描述

[0303] SEQ ID NO:1 重链HVR-H1,HLA-G-0032

[0304] SEQ ID NO:2 重链HVR-H2,HLA-G-0032

[0305] SEQ ID NO:3 重链HVR-H3,HLA-G-0032

[0306] SEQ ID NO:4 轻链HVR-L1,HLA-G-0032

[0307] SEQ ID NO:5 轻链HVR-L2,HLA-G-0032

[0308] SEQ ID NO:6 轻链HVR-L3,HLA-G-0032

[0309] SEQ ID NO:7 重链可变域VH,HLA-G-0032

[0310] SEQ ID NO:8 轻链可变域VL,HLA-G-0032

[0311] SEQ ID NO:9 重链HVR-H1,HLA-G-0037

[0312] SEQ ID NO:10 重链HVR-H2,HLA-G-0037

[0313] SEQ ID NO:11 重链HVR-H3,HLA-G-0037

[0314] SEQ ID NO:12 轻链HVR-L1,HLA-G-0037

[0315] SEQ ID NO:13 轻链HVR-L2,HLA-G-0037

[0316] SEQ ID NO:14 轻链HVR-L3,HLA-G-0037

[0317] SEQ ID NO:15 重链可变域VH,HLA-G-0037

[0318] SEQ ID NO:16 轻链可变域VL,HLA-G-0037

[0319] SEQ ID NO:17 例示性人HLA-G

[0320] SEQ ID NO:18 例示性人HLA-G胞外域(ECD)

[0321] SEQ ID NO:19 例示性人 β 2M

[0322] SEQ ID NO:20 修饰的人HLA-G(其中HLA-G特异性氨基酸已经用HLA-A共有氨基酸替换(=去嫁接的HLA-G还见图1)ECD)

[0323] SEQ ID NO:21 例示性人HLA-A2

[0324] SEQ ID NO:22 例示性人HLA-A2ECD

[0325] SEQ ID NO:23 例示性小鼠H2Kd ECD

[0326] SEQ ID NO:24 例示性大鼠RT1A ECD

[0327] SEQ ID NO:25 例示性人HLA-G β 2M MHC I类复合物

[0328] SEQ ID NO:26 例示性修饰的人HLA-G β 2M MHC I类复合物(其中HLA-G特异性氨基酸已经用HLA-A共有氨基酸替换(=去嫁接的HLA-G)还见图1)

[0329] SEQ ID NO:27 例示性小鼠H2Kd β 2M MHC I类复合物

[0330] SEQ ID NO:28 例示性人HLA-G/小鼠H2Kd β 2M MHC I类复合物,其中对人HLA-G特异性的位置嫁接到小鼠H2Kd框架上

[0331] SEQ ID NO:29 例示性大鼠RT1A β 2M MHC I类复合物

[0332] SEQ ID NO:30 例示性人HLA-G/大鼠RT1A β 2M MHC I类复合物,其中对人HLA-G特异性的位置嫁接到大鼠RT1A框架上

[0333] SEQ ID NO:31 接头和His标签

[0334] SEQ ID NO:32 肽

[0335] SEQ ID NO:33 人 κ 轻链恒定区

[0336] SEQ ID NO:34 人 λ 轻链恒定区

[0337] SEQ ID NO:35 自IgG1衍生的人重链恒定区

[0338] SEQ ID NO:36 自IgG1衍生的具有突变L234A,L235A和P329G的人重链恒定区

[0339] SEQ ID NO:37 自IgG4衍生的人重链恒定区

[0340] SEQ ID NO:38 重链可变域VH,HLA-G-0033

[0341] SEQ ID NO:39 轻链可变域VL,HLA-G-0033

[0342] 下面列出本发明的具体实施方案:

[0343] 1. 一种分离的特异性结合人HLA-G的抗体,其中该抗体结合包含SEQ ID NO:25的人HLA-G β 2M MHC I复合物。

[0344] 2. 依照实施方案1的抗体,其中该抗体抑制ILT2结合单体HLA-G β 2M MHC I复合物。

[0345] 3. 依照实施方案2的抗体,其中该抗体将ILT2结合单体HLA-G β 2M MHC I复合物抑制超过50%(当与没有抗体的情况中的结合比较时)。

[0346] 4. 依照实施方案2的抗体,其中该抗体将ILT2结合单体和/或二聚体和/或三聚体HLA-G β 2M MHC I复合物抑制超过50%(在一个实施方案中超过70%)(当与没有抗体的情况中的结合比较时)。

[0347] 5. 依照实施方案1至4任一项的抗体,其中该抗体抑制ILT2结合JEG3细胞(ATCC编号HTB36)(上的人HLA-G)(超过50%(在一个实施方案中超过80%)(如在流式细胞术测定法中测量的(使用荧光激活细胞分选)(FACS测定法))(当与没有抗体的情况中的结合比较时)。

[0348] 6. 一种分离的特异性结合人HLA-G的抗体,其中该抗体结合JEG3细胞(ATCC编号HTB36)(上的人HLA-G),且其中该抗体将ILT2结合JEG3细胞(ATCC编号HTB36)(上的人HLA-G)抑制超过50%(在一个实施方案中超过80%)(如在流式细胞术测定法中测量的(使用荧光激活细胞分选)(FACS测定法))(当与没有抗体的情况中的结合比较时)。

[0349] 7. 依照实施方案1至6任一项的抗体,其中该抗体并不与包含SEQ ID NO:26的修饰的人HLA-G β 2M MHC I复合物交叉反应(并不特异性结合)。

[0350] 8. 依照实施方案1至7任一项的抗体,其中该抗体并不与包含SEQ ID NO:27的小鼠H2Kd β 2M MHC I复合物交叉反应(并不特异性结合)和/或并不与包含SEQ ID NO:29的大鼠RT1A β 2M MHC I复合物交叉反应(并不特异性结合)。

[0351] 9. 依照实施方案1至8任一项的抗体,其中该抗体并不与包含SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:19的人HLA-A2 β 2M MHC I复合物交叉反应(并不特异性结合)。

[0352] 10. 一种分离的结合人HLA-G的抗体,其中该抗体包含

[0353] A) (a) 包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1; (b) 包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2; (c) 包含SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3; (d) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1; (e) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2; 和 (f) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3; 或

[0354] B) (a) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1; (b) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2; (c) 包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3; (d) 包含SEQ ID NO:12的氨

氨基酸序列的HVR-L1; (e) 包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2; 和 (f) 包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。

[0355] 11. 一种分离的结合人HLA-G的抗体, 其中该抗体包含

[0356] A) (a) 如下的VH域, 该VH域包含 (i) 包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列的HVR-H1, (ii) 包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (iii) 包含选自SEQ ID NO:3的氨基酸序列的HVR-H3; 和 (b) 如下的VL域, 该VL域包含 (i) 包含SEQ ID NO:4的氨基酸序列的HVR-L1, (ii) 包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列的HVR-L2, 和 (iii) 包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列的HVR-L3; 或

[0357] B) (a) 如下的VH域, 该VH域包含 (i) 包含SEQ ID NO:9的氨基酸序列的HVR-H1, (ii) 包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列的HVR-H2, 和 (iii) 包含选自SEQ ID NO:11的氨基酸序列的HVR-H3; 和 (b) 如下的VL域, 该VL域包含 (i) 包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列的HVR-L1, (ii) 包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列的HVR-L2, 和 (iii) 包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列的HVR-L3。

[0358] 12. 一种分离的结合人HLA-G的抗体, 其中该抗体

[0359] A)

[0360] i) 包含SEQ ID NO:7的VH序列和SEQ ID NO:8的VL序列; 或

[0361] ii) i) 下的抗体的VH和VL的人源化变体; 或

[0362] B)

[0363] i) 包含SEQ ID NO:15的VH序列和SEQ ID NO:16的VL序列; 或

[0364] ii) i) 下的抗体的VH和VL的人源化变体。

[0365] 13. 一种分离的结合人HLA-G的抗体, 其中该抗体

[0366] a) 与包含SEQ ID NO:7的VH序列和SEQ ID NO:8的VL序列的抗体结合相同表位; 或

[0367] b) 与包含SEQ ID NO:15的VH序列和SEQ ID NO:16的VL序列的抗体结合相同表位。

[0368] 14. 依照实施方案10至13任一项的抗HLA-G抗体, 其中该抗体独立地特征在于下述特性: 该抗HLA-G抗体

[0369] a) 并不与包含SEQ ID NO:26的修饰的人HLA-Gβ2M MHC I复合物交叉反应(并不特异性结合); 和/或

[0370] b) 并不与包含SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:19的人HLA-A2β2M MHC I复合物交叉反应(并不特异性结合); 和/或

[0371] c) 并不与包含SEQ ID NO:27的小鼠H2Kdβ2M MHC I复合物交叉反应(并不特异性结合); 和/或

[0372] d) 并不与包含SEQ ID NO:29的大鼠RT1Aβ2M MHC I复合物交叉反应(并不特异性结合); 和/或

[0373] e) 抑制ILT2结合单体HLA-Gβ2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:25); 和/或

[0374] f) 将ILT2结合单体HLA-Gβ2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:25)抑制超过50% (在一个实施方案中超过70%) (当与没有抗体的情况中的结合比较时); 和/或

[0375] g) 将ILT2结合单体和/或二聚体和/或三聚体HLA-Gβ2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:25)抑制超过50% (在一个实施方案中超过70%) (当与没有抗体的情况中的结合比较时); 和/或

- [0376] h) 抑制ILT2结合JEG3细胞(ATCC编号HTB36)(上的人HLA-G)(超过50%(在一个实施方案中超过80%))(当与没有抗体的情况中的结合比较时)(见实施例6);和/或
- [0377] i) 其中该抗体结合JEG3细胞(ATCC编号HTB36)(上的人HLA-G)(见实施例5),且其中该抗体抑制ILT2结合JEG3细胞(ATCC编号HTB36)(上的人HLA-G)(超过50%(在一个实施方案中超过80%))(当与没有抗体的情况中的结合比较时)(见实施例6);和/或
- [0378] j) 其中该抗体结合人HLA-G β 2M MHC I复合物(包含SEQ ID NO:25),且其中该抗体将ILT2结合单体和/或二聚体和/或三聚体HLA-G β 2M MHC I复合物抑制超过60%(当与没有抗体的情况中的结合比较时)将ILT4结合二聚体和/或三聚体HLA-G β 2M MHC I复合物抑制超过50%(当与没有抗体的情况中的结合比较时)(见例如实施例4b)。
- [0379] 15. 依照前述实施方案任一项的抗体,其中该抗体是IgG1同种型的。
- [0380] 16. 依照实施方案15的抗体,其中该抗体是具有突变L234A,L235A和P329G(编号依照Kabat的EU索引)的IgG1同种型的。
- [0381] 17. 一种分离的核酸,其编码依照前述实施方案任一项的抗体。
- [0382] 18. 一种宿主细胞,其包含实施方案17的核酸。
- [0383] 19. 一种生成抗体的方法,其包括培养实施方案18的宿主细胞,使得该抗体生成。
- [0384] 20. 实施方案19的方法,其进一步包括自该宿主细胞回收该抗体。
- [0385] 21. 一种药物配制剂,其包含依照实施方案1至16任一项的抗体和药学可接受载剂。
- [0386] 22. 依照实施方案1至16任一项的抗体,其用作药物。
- [0387] 23. 依照实施方案1至16任一项的抗体,其用于治疗癌症。
- [0388] 24. 依照实施方案1至16任一项的抗体在制造药物中的用途。
- [0389] 25. 实施方案24的用途,其中该药物用于治疗癌症。
- [0390] 26. 一种治疗具有癌症的个体的方法,其包括对该个体施用有效量的实施方案1,6或10至13的抗体。
- [0391] 27. 一种用于选择抗HLA-G抗体(例如依照实施方案1至4的)的方法,其包括下述步骤:
- [0392] a) 通过表面等离子共振测定法测定抗HLA-G抗体对包含SEQ ID NO:25的人HLA-G β 2M MHC I复合物的结合;
- [0393] b) 测定各自抗HLA-G抗体对ILT2结合单体和/或二聚体和/或三聚体HLA-G β 2M MHC I复合物的抑制;并
- [0394] c) 选择将ILT2结合单体HLA-G β 2M MHC I复合物抑制超过50%(在一个实施方案中超过80%)(当与没有抗体的情况中的结合比较时)的抗HLA-G抗体,或选择将ILT2结合单体和/或二聚体和/或三聚体HLA-G β 2M MHC I复合物抑制超过50%(在一个实施方案中超过70%)(当与没有抗体的情况中的结合比较时)的抗HLA-G抗体。
- [0395] 28. 一种用于选择抗HLA-G抗体(例如依照实施方案6的)的方法,其包括下述步骤:
- [0396] a) 在流式细胞术测定法中(使用荧光激活细胞分选)(FACS测定法)测定抗HLA-G抗体对JEG3细胞(ATCC编号HTB36)的结合;
- [0397] b) 在流式细胞术测定法中(使用荧光激活细胞分选)(FACS测定法)测定各自抗HLA-G抗体对ILT2结合JEG3细胞(ATCC编号HTB36)的抑制;并

[0398] c) 选择结合JEG3 (ATCC编号HTB36) 细胞且当与没有抗体的情况中的结合比较时将ILT2结合JEG3细胞 (ATCC编号HTB36) 抑制超过50% (在一个实施方案中超过80%) 的抗HLA-G抗体。

实施例

[0399] 重组DNA技术

[0400] 使用标准方法来操作DNA, 如Sambrook, J. et al., Molecular cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989中所述。依照制造商的说明书使用分子生物学试剂。

[0401] 基因和寡核苷酸合成

[0402] 在Geneart GmbH (Regensburg, Germany) 通过化学合成制备期望的基因区段。将合成的基因片段克隆入大肠杆菌质粒进行繁殖/扩增。通过DNA测序来检验亚克隆的基因片段的DNA序列。或者, 通过化学合成的寡核苷酸的退火或经由PCR来组装短合成DNA片段。由metabion GmbH (Planegg-Martinsried, Germany) 制备各自寡核苷酸。

[0403] 基本/标准哺乳动物表达质粒的描述

[0404] 为了表达期望的基因/蛋白质 (例如全长抗体重链, 全长抗体轻链, 或MHC I类分子, 例如HLA-G, 或与肽和 β 2-微球蛋白融合的MHC I类分子, 例如与HLA-G结合肽和/或 β 2-微球蛋白融合的HLA-G), 使用包含下述功能性元件的转录单元:

[0405] - 来自人巨细胞病毒 (P-CMV) 的立即早期增强子和启动子, 包括内含子A, - 人重链免疫球蛋白5' - 非翻译区 (5' UTR),

[0406] - 鼠免疫球蛋白重链信号序列,

[0407] - 要表达的基因/蛋白质 (例如全长抗体重链或MHC I类分子), 和

[0408] - 牛生长激素聚腺苷酸化序列 (BGH pA)。

[0409] 在包括要表达的期望的基因的表达单元/盒以外, 基本/标准哺乳动物表达质粒含有

[0410] - 来自载体pUC18的复制起点, 其容许这种质粒在大肠杆菌中复制, 和

[0411] - β -内酰胺酶基因, 其在大肠杆菌中赋予氨苄青霉素抗性。

[0412] 蛋白质测定

[0413] 使用基于多肽的氨基酸序列计算的摩尔消化系数, 通过测定280nm处的光密度 (OD) 来测定纯化的多肽的蛋白质浓度。

[0414] 实施例1

[0415] 用于筛选和反筛选的HLA-G嵌合分子的生成

[0416] 由于与其它MHC I分子的高同源性 (>98%), 免疫接种HLA-G分子导致生成由MHC-I交叉反应性抗体以及真正HLA-G特异性抗体的混合物构成的多克隆血清。

[0417] 迄今没有提供选择没有对其它人MHC-I (例如HLA-A) 的交叉反应性的真正HLA-G特异性抗体, 和进一步选择具有受体阻断功能的那些的工具。

[0418] 我们鉴定出独特HLA-G位置, 与结构一致性 (conformity) 和受体相互作用 (ILT2/4和KIR2DL4) 必需的位置组合。

[0419] 然后将人HLA-G的独特和近端位置“嫁接”到来自不同啮齿动物物种 (诸如大鼠

RT1A和小鼠H2kd)的MHC I类复合物分子上以生成“嵌合”免疫原/筛选抗原。

[0420] 将生成的抗体提交针对结合/特异性(和分别是对反抗原无结合/特异性)的严格筛选。

[0421] 筛选抗原:

[0422] -作为包含SEQ ID NO:25的人HLA-G β 2M MHC复合物表达的重组HLA-G

[0423] -嫁接到大鼠RT-1和小鼠H2kd上的HLA-G特异性序列(SEQ ID NO:28:人HLA-G/小鼠H2Kd β 2M MHC I类复合物,其中人HLA-G特异性的位置嫁接到小鼠H2Kd框架上和SEQ ID NO:30:人HLA-G/大鼠RT1A β 2M MHC I类复合物,其中人HLA-G特异性的位置嫁接到大鼠RT1A框架上)

[0424] -天然HLA-G MHC I类复合物表达性细胞(例如Jeg3细胞),或人HLA-G转染细胞系SKOV3HLA-G⁺和PA-TU-8902HLA-G⁺

[0425] 筛选反抗原:

[0426] -其它HLA-A序列(用HLA-A共有序列去嫁接的HLA-A2和HLA-G)与不同肽组合的反抗原(MHC I类复合物)(见例如SEQ ID NO 22(HLA-A2)和SEQ ID NO:26(HLA-G框架上的HLA-A共有序列)

[0427] -来自其它物种诸如大鼠RT-1和小鼠H2kd的反抗原(MHC I类复合物)(SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:29)

[0428] -未修饰的肿瘤细胞系SKOV3和PA-TU-8902,其特征在于HLA-G表达缺失。

[0429] 用于免疫接种和筛选HLA特异性抗体生成的嵌合HLA-G抗原(见图1)的设计

[0430] 用于免疫接种野生型(wt)和转基因大鼠,或家兔和小鼠等,和/或用于筛选测定法的携带HLA-G独特位置的嵌合大鼠MHC I分子(RT1-A)(SEQ ID NO:30)的设计:

[0431] 通过比对来自IMGT(如2014年2月6日可得的)的2579种HLA-A,3283种HLA-B,2133种HLA-C,15种HLA-E,22种HLA-F,和50种HLA-G序列鉴定出HLA-G独特位置。将HLA-G中在3个序列集合(HLA-A,HLA-B,和HLA-C+HLA-E+HLA-F组合集)任一的少于1%(大多~0%)的序列中发生的那些残基称作HLA-G独特位置。

[0432] 4个核心HLA-G独特位置(α 1中的2个和 α 3中的2)显示在HLA-G序列集中没有多态性且其它HLA基因无一在这些位置含有HLA-G特异性残基(HLA-A对于M100一次,HLA-B对于Q103一次,和HLA-C对于Q103一次除外)。

[0433] 将大鼠RT1-A的晶体结构(Rudolph,M.G.et al.,J.Mol.Biol.324:975-990(2002);PDB代码:1KJM)叠加到人HLA-G的晶体结构(Clements,C.S.et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 102:3360-3365(2005);PDB代码:1YDP)上。 α 链和联合的 β 2-微球蛋白的总体结构是保守的。

[0434] 通过序列比较和结构比对在RT1-A结构中鉴定出HLA-G独特位置。第一步,鉴定出在HLA-G和RT1-A的分子表面上暴露,因而对抗体可及的独特HLA-G位置。将在蛋白质折叠内埋藏的独特位置排除在改造之外。第二步,鉴定出也需要交换以使得相应的区域成为“HLA-G样”(即生成含有独特位置的真实HLA-G表位而非生成会成为伪像的HLA-G/大鼠RT1-A嵌合表位)的结构上近端的残基。对如此为突变选择的所有位置分析来自HLA-G的各自残基的结构拟合以避免突变后分子结构的可能的局部扰乱。

[0435] 类似地生成用于免疫接种和/或用于筛选测定法的携带HLA-G独特位置的嵌合小

鼠MHC I分子(H2Kd)(SEQ ID NO:28)。

[0436] 通过HLA-G独特位置朝向HLA-A共有序列的“去嫁接”在筛选中用作反抗原的基于HLA-A的反抗原(SEQ ID NO:26)的设计

[0437] 在人HLA-G的晶体结构(PDB代码:1YDP)中分析自多序列比对衍生的独特位置。第一,将没有在HLA-G表面上暴露,因而对抗体不可及的位置排除在改造之外。第二,对表面暴露残基分析氨基酸交换的可行性(即排除有关位置突变后分子结构的可能的局部扰动)。为交换验证了总共14个位置。朝向自下载自IMGT(如2014年2月6日可得的)的2579种HLA-A序列的多序列比对衍生的HLA-A共有序列突变验证位置中的氨基酸。

[0438] 用于可溶性经典和非经典MHC I类分子的表达质粒的生成

[0439] 重组MHC I类基因编码:N端延伸融合分子,由已知受到各自MHC I类分子结合的肽, β 2-微球蛋白,和各自MHC I类分子组成。

[0440] 在可溶性MHC I类分子表达盒以外,用于瞬时表达可溶性MHC I类分子的表达质粒包含来自载体pUC18的复制起点(其容许这种质粒在大肠杆菌中复制),和 β -内酰胺酶基因(其在大肠杆菌中赋予氨苄青霉素抗性)。

[0441] 可溶性MHC I类分子的转录单元包含下述功能性元件:

[0442] -来自人巨细胞病毒(P-CMV)的立即早期增强子和启动子,包括内含子A,

[0443] -人重链免疫球蛋白5'-非翻译区(5' UTR),

[0444] -鼠免疫球蛋白重链信号序列,

[0445] -N端截短的金黄色葡萄球菌(*S.aureus*)分选酶A编码核酸,和

[0446] -牛生长激素聚腺苷酸化序列(BGH pA)。

[0447] 自各种物种衍生的成熟可溶性MHC I类分子的氨基酸序列是:

[0448] SEQ ID NO:25:例示性人HLA-G β 2M MHC I类复合物

[0449] SEQ ID NO:26:例示性修饰的人HLA-G β 2M MHC I类复合物(其中HLA-G特异性氨基酸已经用HLA共有氨基酸替换(=去嫁接的HLA-G),还见图1)

[0450] SEQ ID NO:27:例示性小鼠H2Kd β 2M MHC I类复合物

[0451] SEQ ID NO:28:例示性人HLA-G/小鼠H2Kd β 2M MHC复合物,其中人HLA-G特异性的位置嫁接到小鼠H2Kd框架上

[0452] SEQ ID NO:29:例示性大鼠RT1A β 2M MHC I类复合物

[0453] SEQ ID NO:30:例示性人HLA-G/大鼠RT1A β 2M MHC复合物,其中人HLA-G特异性的位置嫁接到大鼠RT1A框架上

[0454] 对于筛选中使用的例示性HLA-A2 β 2M MHC I类复合物,使用下述构件,在大肠杆菌中表达复合物并纯化。

[0455] MHC I复合物HLA-A2/b2M(SEQ ID NO:22和19)(均具有另外的N端甲硫氨酸)+VLDFAPPGA肽(SEQ ID NO:32)+接头和His标签(SEQ ID NO:31)

[0456] 实施例2

[0457] 免疫接种计划

[0458] a. 嵌合蛋白(用于针对非特异性MHC-I/HLA的耐受和对独特HLA-G位置的指向)

[0459] 使用自Charles River Laboratories International, Inc.获得的Balb/C小鼠进行免疫接种。在AAALACi认可的动物设施中依照附录A“动物住宿和护理指南”饲养动物。所

有动物免疫接种方案和实验得到上巴伐利亚州政府批准(许可证号55.2-1-54-2531-19-10和55.2-1-54-2532-51-11)并依照德国动物福利方案和欧洲议会和理事会的指令2010/63实施。

[0460] 6-8周龄Balb/C小鼠(n=5)在4周过程里接受5轮嵌合H2Kd/HLA-G分子(SEQ ID NO:28 (“HLA-G-0006”))免疫接种。每次免疫接种前,用氧和异氟烷的气体混合物麻醉小鼠。对于第一次免疫接种,混合在20mM His/HisCl,140mM NaCl,pH 6.0中溶解的15μg蛋白质与等体积的CFA(BD Difco,#263810)并沿着小鼠的背部,皮下(s.c.)施用于引流淋巴结近端的六个部位,两个部位在颈背处和两个部位在腹股沟和小腿两侧。将在RIBI佐剂(Sigma-Aldrich,#S6322)中乳化的另外15μg蛋白质施用于沿着腹部的六个并列部位,两个部位每个在腋窝,腹股沟,和大腿两侧。以相似方式在第7(10μg),14(5μg),21(5μg),和28(5μg)天给予递减抗原剂量的强化免疫接种,只是始终使用RIBI佐剂,而且仅仅沿着腹部。最终的免疫接种后3天,对小鼠处以安乐死,无菌分离两侧腭,浅表腹股沟,腋窝,和鳃(branchial)淋巴结,并为生成杂交瘤做好准备。第三次和第五次免疫接种后通过ELISA对血清测试重组人HLA-G和免疫原特异性总IgG抗体生成。

[0461] 另一组6-8周龄Balb/C小鼠(n=5)在3个月过程里接受三次嵌合H2Kd/HLA-G分子(HLA-G-0006)免疫接种。对于第一次免疫接种,混合在20mM His/HisCl,140mM NaCl,pH 6.0中溶解的100μg蛋白质与等体积的CFA(BD Difco,#263810)并腹膜内(i.p.)施用。以相似方式在第28和56天给予强化免疫接种,只是使用不完全弗氏佐剂(IFA来自BD Difco,#DIFC263910)。最后一次免疫接种后4-5周,小鼠静脉内(i.v.)接受无菌PBS中的大约25μg免疫原,72小时后无菌收获脾,并为生成杂交瘤做好准备。第三次免疫接种后通过ELISA对血清测试重组人HLA-G(SEQ ID NO:25 (“HLA-G-0003”)),和免疫原特异性嵌合H2Kd/HLA-G分子(SEQ ID NO:28 (“HLA-G-0006”))并用具有共有HLA-A特异性位置的“去嫁接的”人HLA-G(SEQ ID NO:26 (“HLA-G-0007”))和鼠H2kd蛋白质(SEQ ID NO:27 “HLA-G-0009”))反筛选总IgG抗体生成。

[0462] b.wt HLA-G蛋白质

[0463] 使用自Charles River Laboratories International,Inc.获得的CD大鼠进行免疫接种。在AAALACi认可的动物设施中依照附录A“动物住宿和护理指南”饲养动物。所有动物免疫接种方案和实验得到上巴伐利亚州政府批准(许可证号55.2-1-54-2532-51-11)并依照德国动物福利方案和欧洲议会和理事会的指令2010/63实施。

[0464] 6-8周龄CD大鼠(n=4)在4个月过程里接受4次重组人HLA-G蛋白质(SEQ ID NO:25 (“HLA-G-0003”))免疫接种。对于第一次免疫接种,混合在20mM His/HisCl,140mM NaCl,pH 6.0中溶解的100μg蛋白质与等体积的CFA(BD Difco,#263810)并腹膜内施用。以相似方式在第28,56和84天给予强化免疫接种,只是始终使用不完全弗氏佐剂(IFA来自BD Difco,#DIFC263910)。最后一次免疫接种后3-4周,大鼠静脉内接受无菌PBS中的大约75μg免疫原,72小时后无菌收获脾,并为生成杂交瘤做好准备。第三次和第四次免疫接种后通过ELISA对血清测试重组HLA-G(SEQ ID NO:25 (“HLA-G-0003”))特异性IgG1,IgG1a,IgG2b和IgG2c抗体生成并用具有共有HLA-A特异性位置的“去嫁接的”人HLA-G(SEQ ID NO:26 (“HLA-G-0007”))反筛选。

[0465] c.JEG3细胞(ATCC编号HTB36)(天然表达HLA-G)

[0466] 使用自Charles River Laboratories International, Inc.获得的CD大鼠进行免疫接种。在AAALACi认可的动物设施中依照附录A“动物住宿和护理指南”饲养动物。所有动物免疫接种方案和实验得到上巴伐利亚州政府批准(许可证号AZ.55.2-1-54-2531-83-13)并依照德国动物福利方案和欧洲议会和理事会的指令2010/63实施。

[0467] 两组6-8周龄CD大鼠(n=2)分别在5个月(A)至7个月(B)过程里接受5次(A组)或7次(B组)使用JEG-3细胞(ATCC HTB36)的免疫接种。对于第一次免疫接种,混合在无菌PBS中溶解的 1×10^7 个细胞与等体积的CFA(BD Difco, #263810)并腹膜内施用。以相似方式在第28, 56, 84, 112, 140(仅B)和168(仅B)天对A和B给予强化免疫接种,只是始终使用不完全弗氏佐剂(IFA来自BD Difco, #DIFC263910)。最后一次免疫接种后3周,大鼠静脉内接受无菌PBS中的100 μ g重组人HLA-G蛋白质(SEQ ID NO:25 (“HLA-G-0003”)), 72小时后无菌收获脾,并为生成杂交瘤做好准备。分别在第三次,第五次和第七次免疫接种后通过ELISA对血清测试重组HLA-G(SEQ ID NO:25 (“HLA-G-0003”))特异性IgG1, IgG1a, IgG2b和IgG2c抗体生成特异性IgG1, IgG2a, IgG2b和IgG2c抗体生成并用具有共有HLA-A特异性位置的“去嫁接的”人HLA-G(SEQ ID NO:26 (“HLA-G-0007”))反筛选。

[0468] d. JEG3/DNA IMS (用于强化效应)

[0469] 使用自Charles River Laboratories International, Inc.获得的CD大鼠进行免疫接种。在AAALACi认可的动物设施中依照附录A“动物住宿和护理指南”饲养动物。所有动物免疫接种方案和实验得到上巴伐利亚州政府批准(许可证号AZ.55.2-1-54-2531-83-13)并依照德国动物福利方案和欧洲议会和理事会的指令2010/63实施。

[0470] 6-8周龄CD大鼠(n=5)在3个月过程里以交替方案接受质粒DNA和基于细胞的免疫接种。为此目的分别使用编码作为单链分子的人HLA-G的质粒DNA HLA-G-0030(p17747)以及天然HLA-G表达性JEG-3细胞(ATCC HTB36)。

[0471] 对于第一次免疫接种,用异氟烷麻醉动物并皮内(i.d.)免疫接种无菌H2O中的100 μ g质粒DNA,应用于剃毛背部处,靠近动物的尾的一个点。皮内应用后,在ECM 830电穿孔系统(BTX Harvard Apparatus)上使用下述参数对点进行电穿孔:两次1000V/cm,每次0.1ms,由125ms的间隔分开,继以四次287.5V/cm,持续10ms,也以125ms的间隔分开。对于第14天的第二次免疫接种,动物接受与等体积的CFA(BD Difco, #263810)混合的在无菌PBS中溶解的 1×10^7 个细胞,并在生成稳定的乳状液后,腹膜内施用。以相似方式在第28(DNA), 42(细胞), 56(DNA), 70(细胞)天给予强化免疫接种,只是始终使用不完全弗氏佐剂(IFA来自BD Difco, #DIFC263910)进行细胞免疫接种。最后一次免疫接种后4周,大鼠静脉内接受无菌PBS中的100 μ g可溶性重组人HLA-G MHC I类蛋白质(SEQ ID NO:25 (“HLA-G-0003”)), 72小时后无菌收获脾,并为生成杂交瘤做好准备。分别在第三次,第五次和第六次免疫接种后通过ELISA对血清测试可溶性重组人HLA-G MHC I类蛋白质(SEQ ID NO:25 (“HLA-G-0003”))特异性IgG1, IgG2a, IgG2b和IgG2c抗体生成并用具有共有HLA-A特异性位置的“去嫁接的”人HLA-G(SEQ ID NO:26 (“HLA-G-0007”))反筛选。

[0472] 在所有免疫接种策略中诱导了高度多反应性体液免疫应答,识别HLA-G以及用于反筛选的蛋白质(例如重组“去嫁接的”人HLA-G,嵌合H2Kd/HLA-G分子或相关人HLA-A2分子),如使用来自免疫接种动物的多克隆血清以ELISA格式分析的(未显示数据)。

[0473] 如下面的实施例中所述测定获得的抗HLA-G特异性抗体的结合特性和生物学活性

并与已知的参照抗体比较。

[0474] 实施例3

[0475] A) 抗HLA-G抗体对可溶性人HLA-G,可溶性具有HLA-A特异性序列的去嫁接的人HLA-G,人HLA-A2,和/大鼠小鼠H2-Kd的结合

[0476] 对自免疫接种获得的抗体筛选它们对人,大鼠和小鼠HLA-G,嵌合的,去嫁接的HLA-G和HLA-A的结合特性。下文描述了各自测定法。对于人HLA-G的测试,使用单体,以及二聚体和三聚体形式(见下文制备)。

[0477] 人HLA-G MHC I类蛋白质的二聚化/三聚化

[0478] 使用ÄKTA-FPLC于室温以0.2ml/min的流速将含有单体带His标签的可溶性人HLA-G MHC I类蛋白质(SEQ ID NO:23)的上清液加载到有5ml Ni-Sepharose的HisTrap HP柱(GE Healthcare#17-5248-02)上过夜。然后用含有0.5M咪唑(Merck#8.14223.025)的2% DPBS清洗柱直至达到基线。然后用含有0.5M咪唑的2% DPBS中的10mM DTT平衡柱并于室温温育30分钟。用PBS/10mM咪唑自柱清洗掉DTT并以含0.5mM咪唑的2-100% DPBS的梯度洗脱蛋白质。使用Amicon-Ultra 15M/Ultracel 10K浓缩洗出液后,将蛋白质于室温温育24小时,继以4°C 48小时以容许二聚化/多聚化。然后在Superdex 200HiLoad 16/60(GE Healthcare#17-5175-01)中使用SEC实施二聚体和三聚体的分离并用0.5M NaOH清洗过夜。用PBS平衡柱,继以用10mg/ml BSA饱和。然后收集二聚体(级分A9)和三聚体(级分A8),等分并贮存于-80°C直至进一步使用。

[0479] 人wt HLA-G结合ELISA

[0480] 以250ng/ml的浓度用25µl/孔生物素化人wt HLA-G包被链霉亲和素包被板(Nunc, MicroCoat#11974998001)并于4°C温育过夜。清洗(3x90µl/孔,PBST缓冲液)后,添加25µl抗HLA-G样品(在OSEP缓冲液中1:3稀释)或参照抗体(G233,Thermo/Pierce#MA1-19449,500ng/ml)并于室温温育1小时。清洗(3x90µl/孔,PBST缓冲液)后,添加25µl/孔山羊抗小鼠H+L-POD(Biorad#170-6561,OSEP中1:2000)或驴抗家兔IgG POD(GE#NA9340V,OSE中1:5000)并在摇床中于室温温育1小时。为了检测大鼠IgG,添加山羊抗大鼠IgG1-POD(Bethyl#A110-106P),山羊抗大鼠IgG2a-POD(Bethyl#A110-109P)和山羊抗大鼠IgG2b-POD(Bethyl#A110-111P)的混合物(OSEP中1:10000)并在摇床上于室温温育1小时。清洗(6x90µl/孔,PBST缓冲液)后,添加25µl/孔TMB底物(Roche,11835033001)并温育直至OD 2-3。在Tecan Safire 2仪器上于370/492nm进行测量。

[0481] 具有HLA-A特异性序列的人去嫁接的HLA-G结合ELISA

[0482] 以250ng/ml的浓度用25µl/孔生物素化人去嫁接的HLA-G包被链霉亲和素包被板(Nunc, MicroCoat#11974998001)并于4°C温育过夜。清洗(3x90µl/孔,PBST缓冲液)后,添加25µl抗HLA-G样品(在OSEP缓冲液中1:3稀释)或大鼠血清(在OSEP中1:600稀释)并于室温温育1小时。清洗(3x90µl/孔,PBST缓冲液)后,添加25µl/孔山羊抗大鼠IgG1-POD(Bethyl#A110-106P),山羊抗大鼠IgG2a-POD(Bethyl#A110-109P)和山羊抗大鼠IgG2b-POD(Bethyl#A110-111P)的混合物(OSEP中1:10000)并在摇床上于室温温育1小时。清洗(6x90µl/孔,PBST缓冲液)后,添加25µl/孔TMB底物(Roche,11835033001)并温育直至OD 2-3。在Tecan Safire 2仪器上于370/492nm进行测量。

[0483] 大鼠MHC I (RT1-A) 结合ELISA

[0484] 以250ng/ml的浓度用25 μ l/孔生物素化大鼠MHC I (RT1-A) 包被链霉亲和素包被板 (Nunc, MicroCoat#11974998001) 并于4 $^{\circ}$ C温育过夜。清洗(3x90 μ l/孔, PBST缓冲液) 后, 添加25 μ l抗HLA-G样品(在OSEP缓冲液中1:3稀释) 或大鼠血清(在OSEP中1:600稀释) 并于室温温育1小时。清洗(3x90 μ l/孔, PBST缓冲液) 后, 添加25 μ l/孔山羊抗大鼠IgG1-POD (Bethyl# A110-106P), 山羊抗大鼠IgG2a-POD (Bethyl#A110-109P) 和山羊抗大鼠IgG2b-POD (Bethyl# A110-111P) 的混合物(OSEP中1:10000) 并在摇床上于室温温育1小时。清洗(6x90 μ l/孔, PBST缓冲液) 后, 添加25 μ l/孔TMB底物 (Roche, 11835033001) 并温育直至OD 2-3。在Tecan Safire 2仪器上于370/492nm进行测量。

[0485] HLA-A2结合ELISA

[0486] 以250ng/ml的浓度用25 μ l/孔生物素化人HLA-A2包被链霉亲和素包被板 (Nunc, MicroCoat#11974998001) 并于4 $^{\circ}$ C温育过夜。清洗(3x90 μ l/孔, PBST缓冲液) 后, 添加25 μ l抗HLA-G样品(在OSEP缓冲液中1:3稀释) 或大鼠血清(在OSEP中1:600稀释) 并于室温温育1小时。清洗(3x90 μ l/孔, PBST缓冲液) 后, 添加25 μ l/孔山羊抗大鼠IgG1-POD (Bethyl#A110-106P), 山羊抗大鼠IgG2a-POD (Bethyl#A110-109P) 和山羊抗大鼠IgG2b-POD (Bethyl#A110-111P) 的混合物(OSEP中1:10000) 并在摇床上于室温温育1小时。清洗(6x90 μ l/孔, PBST缓冲液) 后, 添加25 μ l/孔TMB底物 (Roche, 11835033001) 并温育直至OD 2-3。在Tecan Safire 2仪器上于370/492nm进行测量。

[0487] 抗HLA-G抗体的结合动力学

[0488] 使用BIACORE T200仪器 (GE Healthcare) 通过表面等离子共振调查抗HLA-G抗体对人HLA-G, 去嫁接的人HLA-G和人HLA-A2的结合动力学。于25 $^{\circ}$ C实施所有实验, 使用PBS缓冲液 (pH 7.4+0.05% Tween20) 作为运行缓冲液和PBS缓冲液 (+0.1% BSA) 作为稀释缓冲液。通过使用由GE Healthcare供应的胺偶联试剂盒于pH 5.0在S系列CM5传感器芯片 (GE Healthcare) 上固定化抗人Fc (JIR009-005-098, Jackson) 或抗大鼠Fc (JIR112-005-071, Jackson) 或抗小鼠Fc (JIR115-005-071, Jackson) 抗体。在表面上捕捉抗HLA-G抗体, 导致50-200RU的捕捉响应。以30 μ l/min以2.5至800nM的浓度 (2x1:2和4x1:3稀释系列) 将HLA-G分子注射到表面上达180秒 (结合期)。通过用运行缓冲液清洗来监测解离期达300-600秒。通过注射H3P04 (0.85%) 达60+30秒 (用于抗人Fc捕捉抗体), 甘氨酸pH 1.5达60秒和甘氨酸pH 2.0达60秒 (用于抗大鼠Fc捕捉抗体), H3P04 (0.85%) 达80+60秒 (用于抗小鼠Fc捕捉抗体) 来再生表面。通过减去自模拟表面获得的响应来修正本体 (bulk) 折射率差异。减去空白注射 (双重参照)。使用BIAevaluation软件将派生的曲线拟合1:1朗格缪尔结合模型。

[0489] 抗HLA-G抗体的交叉阻断

[0490] 使用BIACORE T200或B4000仪器 (GE Healthcare) 通过表面等离子共振调查抗HLA-G抗体结合人HLA-G的交叉阻断实验。于25 $^{\circ}$ C实施所有实验, 使用PBS缓冲液 (pH 7.4+0.05% Tween20) 作为运行缓冲液。

[0491] 依照供应商的方案在S系列CM5传感器芯片 (GE Healthcare) 上固定化抗人Fab (GE-Healthcare, 28-9583-25) 抗体以捕捉来自OMT大鼠的含有人Ck域的抗体。以15 μ g/ml的浓度捕捉抗HLA-G抗体达70秒。以500或1000nM的浓度注射wt HLA-G (30 μ l/min) 达60秒。以30 μ g/ml的浓度注射wt大鼠抗体达90秒。通过用运行缓冲液清洗来监测解离期达60或240秒。通过注射甘氨酸pH1.5达60秒和另外的90秒的稳定化时段来再生表面。

[0492] 在另一种测定法设置中,依照供应商的方案在S系列CM5传感器芯片(GE Healthcare)上固定化抗人Fab(GE-Healthcare,28-9583-25)抗体以捕捉来自OMT大鼠的含有人Ck域的抗体。以30 μ g/ml的浓度捕捉抗HLA-G抗体达90秒。通过以500 μ g/ml的浓度和30 μ l/min的流速4x120秒注射人IgG(JIR009-000-003)来封闭捕捉抗体上未占据的结合位点。以500nM的浓度注射wt HLA-G(30 μ l/min)达90秒。然后以30 μ g/ml的浓度注射来自OMT大鼠的第二抗体(人Ck域)达90秒。通过用运行缓冲液清洗来监测解离期达240秒。通过注射甘氨酸pH 1.5达60秒和另外的90秒的稳定化时段来再生表面。

[0493] 表:HLA-G抗体对处于它的单体,二聚体和三聚体形式的重组可溶性HLA-G MHC I类复合物的结合(ELISA)

抗体	HLA-G单体 EC ₅₀ [nM]	HLA-G二聚体 EC ₅₀ [nM]	HLA-G三聚体 EC ₅₀ [nM]
[0494] HLA-G-0032	3.59	1.36	1.76
HLA-G-0033	4.94	1.98	1.54
HLA-G-0036	6.33	4.74	5.66
HLA-G-0037	4.95	2.01	2.50

[0495] 上表汇总自wt蛋白质IMS推导的,不同大鼠抗人HLA-G单克隆抗体的结合。显示的是对重组wt单体,二聚体和三聚体HLA-G蛋白质的各自结合的相对EC₅₀值[ng/ml],如通过ELISA评估的。ELISA是如下设置的,即将生物素化wt HLA-G抗原包被至链霉亲和素板。温育和清洗步骤后,各自抗体在10-0 μ g的浓度范围中以1:2稀释台阶结合。通过抗Fc-抗体-POD缀合物进行对结合的抗体的检测。在产生半最大信号的抗体浓度自所得结合曲线确定EC₅₀值。在非生物素化HLA-G二聚体和三聚体抗原的情况下,通过测定板上的随机包被进行固定化。

[0496] HLA-G抗体对重组HLA-G(SEQ ID NO:25)和对照修饰的人HLA-GB2M MHC I类复合物(其中HLA-G特异性氨基酸已经用HLA-A共有氨基酸替换(=去嫁接的HLA-G,SEQ ID NO:26)的结合亲和力(“-”指示检测不到结合)

抗体	wt HLA-G (SEQ ID NO: 25) (单体)				HLA-G去嫁接物上的 HLA-A共有 (SEQ ID NO: 26)			
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	t1/2 (min)	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	t1/2 (min)	KD (M)
[0497] HLA-G-0032	5.12E +04	7.60E -04	15	1.49E -08	-	-	-	-
HLA-G-0033	5.23E +04	1.65E -03	7	3.15E -08	9.54E +06	3.45E -02	0.3	3.62E -09
HLA-G-0036	5.60E +04	1.95E -02	1	3.48E -07	-	-	-	-
HLA-G-0037	1.31E +05	8.82E -04	13	6.75E -09	5.47E +04	1.16E -01	0.1	2.12E -06

[0498] 上表汇总针对wt和去嫁接的HLA-G的抗体亲和力和t1/2值,如通过表面等离子共振(Biacore)分析评估的。

[0499] 使用BIACORE T200仪器(GE Healthcare)通过表面等离子共振调查抗HLA-G抗体对人HLA-G,去嫁接的人HLA-G和人HLA-A2结合动力学。于25°C实施所有实验,使用PBS缓冲液(pH 7.4+0.05%Tween20)作为运行缓冲液和PBS缓冲液(+0.1%BSA)作为稀释缓冲液。通过使用由GE Healthcare供应的胺偶联试剂盒于pH 5.0在S系列CM5传感器芯片(GE Healthcare)固定化抗人Fc(JIR009-005-098, Jackson)或抗大鼠Fc(JIR112-005-071, Jackson)或抗小鼠Fc(JIR115-005-071, Jackson)抗体。在表面上捕捉抗HLA-G抗体,导致50-200RU的捕捉响应。以30 μ l/min以2.5至800nM的浓度(2x1:2和4x1:3稀释系列)将HLA-G分子注射到表面上达180秒(结合期)。通过用运行缓冲液清洗来监测解离期达300-600秒。通过注射H3P04(0.85%)达60+30秒(用于抗人Fc捕捉抗体),甘氨酸pH 1.5达60秒和甘氨酸pH 2.0达60秒(用于抗大鼠Fc捕捉抗体),H3P04(0.85%)达80+60秒(用于抗小鼠Fc捕捉抗体)来再生表面。通过减去自模拟表面获得的响应来修正本体(bulk)折射率差异。减去空白注射(双重参照)。使用BIAevaluation软件将派生的曲线拟合1:1朗格缪尔结合模型。(上表中的-指示检测不到结合)。

[0500] 对应的SPR传感图在图3中。

[0501] 在又一项实验中,对下述参照抗体(自不同供应商获得)比较对单体人HLA-G MHC I(SEQ ID NO:23(“HLA-G-0003”))和具有共有HLA-A特异性位置的“去嫁接的”人HLA-G(SEQ ID NO:24(“HLA-G-0007”))的结合:MEM/G9,87G,G233,2A12,4H84,5A6G7,6D463,9-1F10, MEM-G/1, MEM-G/11, MEM-G/2和MEM-G/4(“-”指示检测不到结合)。

	抗原	抗体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	t1/2 (Min)	KD (M)
[0502]	wt HLA-G (SEQ ID NO: 25) (单体)	MEM/G9	1.5E+05	1.1E-03	10	7.7E-09
		87G	-	-	-	-
		G233	1.8E+05	3.7E-03	3	2.0E-08
		2A12	-	-	-	-
		4H84	-	-	-	-
		5A6G7	-	-	-	-
		6D463	-	-	-	-

[0503]	9-1F10	-	-	-	-
	MEM-G/1	-	-	-	-
	MEM-G/11	7.4E+04	8.5E-04	14	1.2E-08
	MEM-G/2	-	-	-	-
	MEM-G/4	-	-	-	-

	抗原	抗体	ka (1/Ms)	kd (1/s)	t1/2 (Min)	KD (M)
[0504]	HLA-G去嫁接物上的 HLA-A共有 (SEQ ID NO: 26)	MEM/G9	1.2E+05	3.6E-02	0.3	3.0E-07
		87G	-	-	-	-
		G233	-	-	-	-
		2A12	-	-	-	-
		4H84	-	-	-	-
		5A6G7	-	-	-	-
		6D463	-	-	-	-
		9-1F10	-	-	-	-
		MEM-G/1	-	-	-	-
		MEM-G/11	8.9E+04	1.2E-03	10	1.3E-08
		MEM-G/2	-	-	-	-
		MEM-G/4	-	-	-	-

[0505] 有趣的是,大多数测量的抗体并不显示任何对单体人HLA-G MHC I (SEQ ID NO:25 (“HLA-G-0003”)) 的特异性结合,也包括抗体87G。文献中描述的对寡聚体形式的HLA-G的结合可能是由寡聚体形式的增多的结合位点驱动的亲合力。

[0506] 只有具有 $7.7E^{-09}M$ 的KD值的结合亲合力的抗体MEM/G9,具有 $2.0E^{-08}M$ 的KD值的抗体G233和具有 $1.2E^{-08}M$ 的KD值的结合亲和力的MEM-G/11显示对单体wt人HLA-G MHC I复合物的结合。然而,这些抗体之一MEM-G/11还显示一些对HLA-G去嫁接物上的HLA-A共有 (SEQ ID NO:26) 的结合/交叉反应性。另外,另一种抗体 (MEM/G9) 还显示更强的对HLA-G去嫁接物上

的HLA-A共有 (SEQ ID NO:26) 的非特异性结合。

[0507] 实施例4

[0508] 受体阻断 (用单体, 二聚体和三聚体HLA-G)

[0509] a) 抗HLA-G抗体关于它们的ILT2和-4阻断特性的生化比较

[0510] 以500ng/ml的浓度用25 μ l/孔生物素化人wt HLA-G包被链霉亲合素包被板 (Nunc, MicroCoat#11974998001) 并于4 $^{\circ}$ C温育过夜。清洗 (3x90 μ l/孔, PBST缓冲液) 后, 以始于8 μ g/ml, 然后以1:3台阶稀释的递减浓度添加25 μ l抗HLA-G样品并于室温温育1小时。清洗 (3x90 μ l/孔, PBST缓冲液) 后, 以150ng/ml的浓度添加25 μ l/孔带c-myc标签的重组ILT-2受体并于室温温育1小时。清洗 (3x90 μ l/孔, PBST缓冲液) 后, 添加25 μ l/孔山羊抗c-myc-POD (Bethyl# A190-104P, OSE中1:7000) 并在摇床上于室温温育1小时。清洗 (6x90 μ l/孔, PBST缓冲液) 后, 添加25 μ l/孔TMB底物 (Roche, 11835033001) 并温育直至OD 2-3。在Tecan Safire 2仪器上以370/492nm进行测量。

[0511] HLA-G抗体中和HLA-G-ILT2/4受体啮合 (IC_{50} [nM])

候选者	%抑制ILT2 (3 μ g/ml抗体)	IC_{50} ILT2 [nM]			%抑制ILT4	IC_{50} ILT4 [nM]		
		M	D	T		M	D	T
[0512] HLA-G-0032	86.84	8.4	1.3	0.4	42.99	n.d.	50.3	71.3
HLA-G-0033	85.28	8	1.2	0.5	44.62	n.d.	31.3	61.5
HLA-G-0036	84.23	3.3	1.5	0.4	40.52	n.d.	61.9	51.3
HLA-G-0037	82.91	13	0.8	0.1	41.05	n.d.	n.d.	>200

[0513] 上表汇总对重组HLA-G蛋白质 (单体和寡聚体) 与它的受体ILT2和ILT4之间的相互作用的阻断, 如通过ELISA评估的。显示的是对HLA-G/受体相互作用的%抑制 (对于ILT2和ILT4) 以及中和HLA-G/受体相互作用的相对 IC_{50} 值 [nM] (在使用单体 (M), 二聚体 (D) 或三聚体 (T) HLA-G蛋白质的情况下)。不太突出的ILT4抑制取决于这种受体的主要 β 2M依赖性相互作用。

[0514] ELISA是如下设置的, 即将生物素化抗原wt HLA-G包被到链霉亲合素板上。温育和清洗步骤后, 各自抗体在8-0 μ g的浓度范围中以1:3稀释台阶结合。将带c-myc标签的ILT-2或-4受体添加至HLA-G-抗体复合物。温育和清洗步骤后, 通过抗cmyc-抗体-POD缀合物进行对结合的受体的检测。在产生半最大抑制的抗体浓度自所得抑制曲线确定 IC_{50} 值。在非生物素化HLA-G二聚体和三聚体抗原的情况下, 通过测定板上的随机包被进行固定化。

[0515] b) 使用一种不同测定法设置, 抗HLA-G抗体关于它们的ILT2和-4阻断特性的生化比较

[0516] 如下设置ELISA, 即分别将带Fc标签的ILT2和ILT4包被到Maxisorp微量滴定板上。温育和清洗步骤后, 以100nM的浓度添加各自抗体。将可溶性带His标签的单体, 二聚体或三聚体HLA-G添加至各孔。温育和清洗步骤后, 通过抗His抗体-POD缀合物进行对结合的受体的检测。与自有ILT2/4+HLA-G (单体, 二聚体, 或三聚体) 没有抗HLA-G或ILT2/4抗体的孔获得的值 (100%结合=0%抑制) 比较来计算百分比抑制 (%)。

[0517]	候选者	%抑制ILT2			%抑制ILT4		
		M	D	T	M	D	T
	HLA-G-0032	75	95	93	12	62	68
	HLA-G-0033	75	95	93	14	70	71
	HLA-G-0036	71	94	93	23	60	70
	HLA-G-0037	73	96	93	1	61	67

[0518] 上表汇总对重组HLA-G蛋白质(单体和寡聚体)与它的受体ILT2和ILT4之间的相互作用的阻断,如通过ELISA评估的。显示的是对HLA-G/受体相互作用的%抑制(对于ILT2和ILT4)。不太突出的ILT4抑制取决于这种受体的主要 β 2M依赖性相互作用。

[0519] 下面的条形图显示与商品化抗体比较,由描述的抗HLA-G抗体实现的%抑制,如图中显示的。商品化HLA-G抗体87G, MEM/G09和G233并不像描述的抗体那样有效地阻断HLA-G/ILT2或ILT4相互作用。而且,商品化抗体在一些情况中在结合后引起HLA-G对ILT2或ILT4的结合升高。

[0520] 实施例5

[0521] 抗HLA-G抗体对细胞的结合

[0522] a) 细胞表面HLA-G结合ELISA

[0523] 将25 μ l/孔JEG3细胞(天然表达HLA-G, 20000个细胞/孔), Skov-3细胞或在细胞表面上表达重组HLA-G的Skov-3细胞(均为10000个细胞/孔)接种入组织培养物处理的384孔板(Corning, 3701)并于37 $^{\circ}$ C温育过夜。次日,添加12.5 μ l抗HLA-G样品(最终稀释度1:3)并于4 $^{\circ}$ C温育2小时。通过添加50 μ l/孔戊二醛至0.05%的终浓度(Sigma目录号G5882;批号056K5318)来固定细胞。清洗(3x90 μ l/孔,用PBST缓冲液)后,添加25 μ l/孔山羊抗小鼠H+L-POD(Biorad#170-6561, OSEP中1:2000)或驴抗家兔IgG POD(GE#NA9340V, OSE中1:5000)并在摇床上于室温温育1小时。为了检测大鼠IgG,添加山羊抗大鼠IgG1-POD(Bethyl#A110-106P),山羊抗大鼠IgG2a-POD(Bethyl#A110-109P)和山羊抗大鼠IgG2b-POD(Bethyl#A110-111P)的混合物(OSEP中1:10000)并在摇床上于室温温育1小时。清洗(4x90 μ l/孔, PBST缓冲液)后,添加25 μ l/孔TMB底物(Roche, 11835033001)并温育直至OD 2-3。在Tecan Safire 2仪器上于370/492nm进行测量。

[0524]	抗体	Jeg3	wt	HLA-G ⁺	wt	HLA-G ⁺
			Skov3	Skov3	PA-TU-8902	PA-TU-8902
	HLA-G-0032	+++	-	+++	-	+++
	HLA-G-0033	+++	+	+++	-	+++
	HLA-G-0036	+	-	++	-	+
	HLA-G-0037	+++	+	+++	-	+++

[0525] 上表汇总不同大鼠抗人HLA-G单克隆抗体对不同细胞和细胞系上表达的HLA-G的结合,如通过FACS分析评估的。描述对天然HLA-G表达性JEG3肿瘤细胞或Skov3或PA-TU-8902转染子和各自亲本,未转染细胞的结合。

[0526] b) HLA-G抗体对细胞上表达的天然或重组HLA-G的结合(如通过FACS分析评估的)

[0527] 为了流式细胞术分析,将细胞用抗HLA-G单抗于4℃染色。简言之,将25μl/孔每种细胞悬浮液(5x10⁴个细胞/孔)转移入聚丙烯96孔V底板并在冰箱中于5℃预冷却10分钟。将抗HLA-G样品在染色缓冲液中稀释至80μg/ml的2倍起始浓度。实施抗体的4倍连续稀释并将25μl/孔抗体溶液添加至制备的细胞并于5℃温育1小时。将细胞用200μl/孔染色缓冲液清洗两次并以300g离心3分钟。为了检测,将荧光标记的抗物种抗体(缀合有Alexa 488的山羊抗大鼠IgG(H+L),Life technologies#A11006;或山羊抗小鼠IgG(H+L),Life technologies#A11001)在染色缓冲液中稀释至20μg/ml并在50μl/孔检测抗体中重悬浮细胞团粒。于5℃温育1小时后,再次将细胞用染色缓冲液清洗两次,在70μl染色缓冲液中重悬浮并在FACS Canto II上测量。

[0528] 克隆HLA-G#0032至0037的一种例示性FACS染色在图5的FACS叠加中给出。

[0529] 实施例6

[0530] 抗HLA-G抗体抑制/调控重组ILT2与JEG3细胞上天然表达的HLA-G的相互作用

[0531] 对于分析,有或没有与不同抗HLA-G抗体的预温育的情况下,将JEG3细胞(ATCC HTB36)用ILT2-Fc融合蛋白染色(对照=无抑制)。对于与抗HLA-G抗体的预温育,将25μl/孔细胞悬浮液转移入聚丙烯96孔V底板中并于4℃预冷却10分钟。将抗HLA-G抗体或参照抗体(G233, MEM-G/9或87G)在染色缓冲液中稀释至20μg/ml的2倍浓度并将25μl/孔抗体溶液添加至制备的细胞并于5℃温育1小时。将细胞用200μl/孔染色缓冲液及300g离心3分钟清洗两次,最终在25μl/孔染色缓冲液中重悬浮。

[0532] 对a)与抗HLA-G单抗预温育的JEG3细胞或b)作为参照的未处理的JEG3细胞如下测定人ILT2-Fc嵌合蛋白(RD#2017-T2-050)的检测:简言之,将ILT2-Fc或对照人IgG(Jackson-Immuno-Research#009-000-003)在染色缓冲液中稀释至20μg/ml(ILT2)的2倍浓度并将25μl/孔ILT2-Fc蛋白质溶液添加至制备的细胞并于5℃温育2小时。再次将细胞用200μl/孔染色缓冲液清洗两次。以染色缓冲液中10μg/ml的稀释度用荧光标记的抗人IgG Fc-γ特异性抗体(F(ab')₂片段山羊抗人IgG, Fc γ片段特异性-FITC, Jackson-Immuno-Research#109-096-008)检测人ILT2-Fc蛋白质。在50μl/孔检测抗体中重悬浮细胞团粒。于5℃温育1小时后,将细胞用染色缓冲液清洗两次,在70μl中重悬浮并在FACS Canto II上测量以测定结合至JEG3细胞的ILT2。

[0533] 作为对照,通过以10μg/ml的浓度使用抗物种抗体(缀合有Alexa 488的山羊抗大鼠IgG(H+L)(Life technologies#A11006),或山羊抗小鼠IgG(H+L)-Alexa 488(Life technologies,#A11001))检测结合至JEG3预温育的细胞的抗HLA-G抗体。

[0534] 图6中的图显示不同HLA-G抗体改变重组ILT2对JEG3肿瘤细胞上天然表达的HLA-G的相互作用和结合的各自能力。

[0535] 下表汇总来自各实验的结果。抗HLA-G抗体对JEG3细胞的结合描绘为+=弱结合至+++ =强结合。抗HLA-G抗体抑制/阻断或提高ILT2对HLA-G表达性JEG3细胞的结合的能力。在最后一栏中,显示/量化重组ILT2对细胞的结合或其抑制/阻断(将在抗HLA-G抗体缺失下的ILT2-Fc的染色设为100%结合,其等于0%抑制,负值指示结合甚至升高;低于5%的染色信号差异是不显著的,归类为无影响):

抗体	JEG-3细胞上的结合	HLA-G:ILT2相互作用	ILT2结合Jeg3细胞的抑制
无单抗(对照)	-	-	0%抑制=100%结合
HLA-G-0032	+++	抑制ILT2的结合	98.1%抑制
HLA-G-0033	+++	略微 提高 ILT2的结合	-9.3% (=提高/刺激ILT2结合)
[0536] HLA-G-0036	+	无显著影响	2.3%抑制
HLA-G-0037	+++	抑制ILT2的结合	96.5%抑制
87G	++	无显著影响	2.3%抑制
MEM-G/9	+++	抑制ILT2的结合	-27.9% (=提高/刺激 ILT2结合)
G223	+++	抑制ILT2的结合	-55.8% (=提高/刺激ILT2结合)

[0537] 实施例7

[0538] 单核细胞细胞因子恢复测定法(在HLA-G介导的遏制之后)

[0539] 使用下述HLA-G表达性细胞与单核细胞的共培养物测定法在功能上表征不同大鼠抗人HLA-G单克隆抗体。自健康供体的血液分离外周人单核细胞。简言之,在装有抗凝剂的管中收集血液并在PBS中1:2稀释。为了分离外周血单个核细胞(PBMC),将30ml混合物转移至每个预装分离介质的Leucosep管。离心12分钟(1200xg,无中断)后收集PBMC特异性条带,用PBS清洗三次并以300xg离心10分钟。最后,在来自Miltenyi的MACS缓冲液中重悬浮细胞团粒并用来自Miltenyi的人单核细胞分离试剂盒II(#130-091-153)依照制造商的说明书(负选择)经由磁分离自PBMC分离人单核细胞。以 5×10^5 个细胞/ml的密度在原代细胞培养基(RPMI 1640, PAN#P04-17500, 补充有10%FCS, Gibco#10500; 2mM L-谷氨酰胺, Sigma#G7513; 1mM丙酮酸钠, Gibco#11360; MEM非必需氨基酸, Gibco#11140; 0.1mM 2-巯基乙醇, Gibco#31350; MEM维生素, Gibco#11120; 青霉素/链霉素, Gibco#15140)中重悬浮分离的单核细胞。通过流式细胞术监测CD14⁺CD16⁺细胞的富集并分析细胞的ILT2和ILT4表达。对于富集的单核细胞与HLA-G表达性细胞的共培养物测定法,在测定法前1天在100 μ l JEG-3培养基(具有EBSS和L-谷氨酰胺的MEM Eagle, PAN#P04-00509, 补充有10%FCS, Gibco#10500; 1mM丙酮酸钠, Gibco#11360; MEM非必需氨基酸, Gibco#11140)中以 8×10^3 个细胞/孔在96孔平底组织培养板中接种JEG-3细胞以在测定法那天形成汇合层。将贴壁JEG-3细胞在原代细胞培养基中与抗HLA-G抗体的4倍连续稀释液一起预温育。因此,取出来自贴壁JEG-3细胞的上清液并添加50 μ l/孔制备的抗体溶液并在增湿气氛中于37 $^{\circ}$ C和5%CO₂温育1小时。在50 μ l原代细胞培养基中以 2.5×10^4 个人单核细胞/孔将人单核细胞添加至抗HLA-G抗体预温育的JEG-3细胞并将共培养物在增湿气氛中于37 $^{\circ}$ C和5%CO₂温育过夜(大约18-20小时)。次日用50ng/ml LPS实施LPS刺激达7小时,之后收获共培养物的上清液。使用来自eBioscience的人TNF α ELISA Ready-SET-Go![®](#88-7346-88)测定共培养物上清液的TNF α 的浓度。

[0540] 下表汇总给定HLA-G抗体候选者的功能特征。

[0541] 功能性抗HLA-G抗体能够恢复受到遏制的免疫应答,即恢复与HLA-G表达性细胞的共培养物中单核细胞的由LPS诱导的TNF α 生成。

	抗体	HLA-G-0032 (#32)	HLA-G-0033 (#33)	HLA-G-0036 (#36)	HLA-G-0037 (#37)
	供体				
	1	++	-	-	+++
[0542]	2	+	-	-	++
	3	(+)	-	-	(+)
	4	(+)	-	-	++
	7	+	-	n.t.	+++
	8	+	-	n.t.	++

- [0001] 序列表
- [0002] <110> 豪夫迈·罗氏有限公司(F. Hoffmann-La Roche AG)
- [0003] <120> 抗HLA-G抗体及其用途
- [0004] <130> P33980-WO
- [0005] <150> EP16199620.2
- [0006] <151> 2016-11-18
- [0007] <160> 39
- [0008] <170> PatentIn version 3.5
- [0009] <210> 1
- [0010] <211> 5
- [0011] <212> PRT
- [0012] <213> 大鼠
- [0013] <400> 1
- [0014] Ser Tyr Asp Met His
- [0015] 1 5
- [0016] <210> 2
- [0017] <211> 17
- [0018] <212> PRT
- [0019] <213> 大鼠
- [0020] <400> 2
- [0021] Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe Asn
- [0022] 1 5 10 15
- [0023] Gly
- [0024] <210> 3
- [0025] <211> 12
- [0026] <212> PRT
- [0027] <213> 大鼠
- [0028] <400> 3
- [0029] Pro Thr Val Ala Thr Arg Tyr Asn Trp Phe Ala Tyr
- [0030] 1 5 10
- [0031] <210> 4
- [0032] <211> 10
- [0033] <212> PRT
- [0034] <213> 大鼠
- [0035] <400> 4
- [0036] Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met His
- [0037] 1 5 10
- [0038] <210> 5

[0039] <211> 7
 [0040] <212> PRT
 [0041] <213> 大鼠
 [0042] <400> 5
 [0043] Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser
 [0044] 1 5
 [0045] <210> 6
 [0046] <211> 10
 [0047] <212> PRT
 [0048] <213> 大鼠
 [0049] <400> 6
 [0050] Gln Gln Trp Ser Ser Asn Leu Pro Ile Thr
 [0051] 1 5 10
 [0052] <210> 7
 [0053] <211> 121
 [0054] <212> PRT
 [0055] <213> 大鼠
 [0056] <400> 7
 [0057] Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ser
 [0058] 1 5 10 15
 [0059] Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Pro Ser Tyr
 [0060] 20 25 30
 [0061] Asp Met His Trp Ile Lys Gln Gln Pro Gly Asn Gly Leu Glu Trp Ile
 [0062] 35 40 45
 [0063] Gly Trp Ile Tyr Pro Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Asn Gln Lys Phe
 [0064] 50 55 60
 [0065] Asn Gly Lys Ala Ser Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 [0066] 65 70 75 80
 [0067] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 [0068] 85 90 95
 [0069] Ala Lys Pro Thr Val Ala Thr Arg Tyr Asn Trp Phe Ala Tyr Trp Gly
 [0070] 100 105 110
 [0071] Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 [0072] 115 120
 [0073] <210> 8
 [0074] <211> 107
 [0075] <212> PRT
 [0076] <213> 大鼠
 [0077] <400> 8

[0078] Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Met Ser Ala Ser Pro Gly
 [0079] 1 5 10 15
 [0080] Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Asn Tyr Met
 [0081] 20 25 30
 [0082] His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Arg Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr
 [0083] 35 40 45
 [0084] Leu Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 [0085] 50 55 60
 [0086] Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Thr Met Glu Ala Glu
 [0087] 65 70 75 80
 [0088] Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Leu Pro Ile
 [0089] 85 90 95
 [0090] Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 [0091] 100 105
 [0092] <210> 9
 [0093] <211> 5
 [0094] <212> PRT
 [0095] <213> 大鼠
 [0096] <400> 9
 [0097] Thr Tyr Ser Val Ser
 [0098] 1 5
 [0099] <210> 10
 [0100] <211> 16
 [0101] <212> PRT
 [0102] <213> 大鼠
 [0103] <400> 10
 [0104] Ala Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys Ser
 [0105] 1 5 10 15
 [0106] <210> 11
 [0107] <211> 12
 [0108] <212> PRT
 [0109] <213> 大鼠
 [0110] <400> 11
 [0111] Met Asn Asn Lys Phe Gly Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu
 [0112] 1 5 10
 [0113] <210> 12
 [0114] <211> 11
 [0115] <212> PRT
 [0116] <213> 大鼠

[0117] <400> 12
 [0118] Arg Ala Ser Glu Thr Val Ser Thr Met Leu His
 [0119] 1 5 10
 [0120] <210> 13
 [0121] <211> 7
 [0122] <212> PRT
 [0123] <213> 大鼠
 [0124] <400> 13
 [0125] Leu Ala Ser His Leu Glu Ser
 [0126] 1 5
 [0127] <210> 14
 [0128] <211> 9
 [0129] <212> PRT
 [0130] <213> 大鼠
 [0131] <400> 14
 [0132] Gln Gln Thr Trp Asn Asp Pro Leu Thr
 [0133] 1 5
 [0134] <210> 15
 [0135] <211> 120
 [0136] <212> PRT
 [0137] <213> 大鼠
 [0138] <400> 15
 [0139] Gln Val Gln Leu Lys Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
 [0140] 1 5 10 15
 [0141] Thr Leu Ser Leu Thr Cys Ser Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Thr Tyr
 [0142] 20 25 30
 [0143] Ser Val Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 [0144] 35 40 45
 [0145] Gly Ala Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys
 [0146] 50 55 60
 [0147] Ser Arg Leu Arg Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Ser Gln Val Leu Leu
 [0148] 65 70 75 80
 [0149] Lys Met Asn Ser Leu Gln Thr Glu Asp Arg Ala Met Tyr Phe Cys Val
 [0150] 85 90 95
 [0151] Arg Met Asn Asn Lys Phe Gly Tyr Trp Tyr Phe Asp Leu Trp Gly Pro
 [0152] 100 105 110
 [0153] Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
 [0154] 115 120
 [0155] <210> 16

[0156] <211> 106
 [0157] <212> PRT
 [0158] <213> 大鼠
 [0159] <400> 16
 [0160] Asp Thr Val Leu Thr Gln Ser Pro Thr Leu Ala Val Ser Pro Gly Glu
 [0161] 1 5 10 15
 [0162] Lys Ile Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Thr Val Ser Thr Met Leu
 [0163] 20 25 30
 [0164] His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Gln Pro Lys Leu Leu Ile Ser
 [0165] 35 40 45
 [0166] Leu Ala Ser His Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Thr Gly Ser
 [0167] 50 55 60
 [0168] Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Ala Asp
 [0169] 65 70 75 80
 [0170] Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Trp Asn Asp Pro Leu Thr
 [0171] 85 90 95
 [0172] Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 [0173] 100 105
 [0174] <210> 17
 [0175] <211> 314
 [0176] <212> PRT
 [0177] <213> 人(homo sapiens)
 [0178] <400> 17
 [0179] Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Ser Ala Ala Val Ser Arg Pro Gly
 [0180] 1 5 10 15
 [0181] Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Met Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln
 [0182] 20 25 30
 [0183] Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ser Ala Cys Pro Arg Met Glu Pro Arg
 [0184] 35 40 45
 [0185] Ala Pro Trp Val Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Glu Thr
 [0186] 50 55 60
 [0187] Arg Asn Thr Lys Ala His Ala Gln Thr Asp Arg Met Asn Leu Gln Thr
 [0188] 65 70 75 80
 [0189] Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Ser Ser His Thr Leu Gln
 [0190] 85 90 95
 [0191] Trp Met Ile Gly Cys Asp Leu Gly Ser Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly
 [0192] 100 105 110
 [0193] Tyr Glu Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Leu Ala Leu Asn Glu
 [0194] 115 120 125

[0195]	Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Gln Ile Ser Lys
[0196]	130 135 140
[0197]	Arg Lys Cys Glu Ala Ala Asn Val Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr Leu
[0198]	145 150 155 160
[0199]	Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu His Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys
[0200]	165 170 175
[0201]	Glu Met Leu Gln Arg Ala Asp Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His
[0202]	180 185 190
[0203]	Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe
[0204]	195 200 205
[0205]	Tyr Pro Ala Glu Ile Ile Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln
[0206]	210 215 220
[0207]	Thr Gln Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr
[0208]	225 230 235 240
[0209]	Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg
[0210]	245 250 255
[0211]	Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Met Leu
[0212]	260 265 270
[0213]	Arg Trp Lys Gln Ser Ser Leu Pro Thr Ile Pro Ile Met Gly Ile Val
[0214]	275 280 285
[0215]	Ala Gly Leu Val Val Leu Ala Ala Val Val Thr Gly Ala Ala Val Ala
[0216]	290 295 300
[0217]	Ala Val Leu Trp Arg Lys Lys Ser Ser Asp
[0218]	305 310
[0219]	<210> 18
[0220]	<211> 274
[0221]	<212> PRT
[0222]	<213> 人(homo sapiens)
[0223]	<400> 18
[0224]	Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Ser Ala Ala Val Ser Arg Pro Gly
[0225]	1 5 10 15
[0226]	Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Met Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln
[0227]	20 25 30
[0228]	Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ser Ala Cys Pro Arg Met Glu Pro Arg
[0229]	35 40 45
[0230]	Ala Pro Trp Val Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Glu Thr
[0231]	50 55 60
[0232]	Arg Asn Thr Lys Ala His Ala Gln Thr Asp Arg Met Asn Leu Gln Thr
[0233]	65 70 75 80

[0234]	Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Ser Ser His Thr Leu Gln
[0235]	85 90 95
[0236]	Trp Met Ile Gly Cys Asp Leu Gly Ser Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly
[0237]	100 105 110
[0238]	Tyr Glu Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Leu Ala Leu Asn Glu
[0239]	115 120 125
[0240]	Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Gln Ile Ser Lys
[0241]	130 135 140
[0242]	Arg Lys Cys Glu Ala Ala Asn Val Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr Leu
[0243]	145 150 155 160
[0244]	Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu His Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys
[0245]	165 170 175
[0246]	Glu Met Leu Gln Arg Ala Asp Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His
[0247]	180 185 190
[0248]	Pro Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe
[0249]	195 200 205
[0250]	Tyr Pro Ala Glu Ile Ile Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln
[0251]	210 215 220
[0252]	Thr Gln Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr
[0253]	225 230 235 240
[0254]	Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg
[0255]	245 250 255
[0256]	Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Met Leu
[0257]	260 265 270
[0258]	Arg Trp
[0259]	<210> 19
[0260]	<211> 99
[0261]	<212> PRT
[0262]	<213> 人(homo sapiens)
[0263]	<400> 19
[0264]	Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu
[0265]	1 5 10 15
[0266]	Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro
[0267]	20 25 30
[0268]	Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys
[0269]	35 40 45
[0270]	Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu
[0271]	50 55 60
[0272]	Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys

[0273]	65	70	75	80
[0274]	Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp			
[0275]		85	90	95
[0276]	Arg Asp Met			
[0277]	<210> 20			
[0278]	<211> 275			
[0279]	<212> PRT			
[0280]	<213> 人工的			
[0281]	<220>			
[0282]	<223> 经修饰的人HLA-G			
[0283]	其中HLA-G特异性氨基酸已经用HLA-A共有氨基酸替换			
[0284]	(=去嫁接的HLA-G)			
[0285]	ECD			
[0286]	<400> 20			
[0287]	Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Ser Ala Ala Val Ser Arg Pro Gly			
[0288]	1	5	10	15
[0289]	Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Met Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln			
[0290]		20	25	30
[0291]	Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Pro Arg Met Glu Pro Arg			
[0292]		35	40	45
[0293]	Ala Pro Trp Val Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Glu Glu Thr			
[0294]		50	55	60
[0295]	Arg Asn Thr Lys Ala His Ala Gln Thr Asp Arg Val Asn Leu Gly Thr			
[0296]	65	70	75	80
[0297]	Leu Arg Gly Cys Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Leu Gln			
[0298]		85	90	95
[0299]	Trp Met Ile Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly			
[0300]		100	105	110
[0301]	Tyr Glu Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Leu Ala Leu Asn Glu			
[0302]		115	120	125
[0303]	Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Gln Ile Ser Lys			
[0304]		130	135	140
[0305]	Arg Lys Cys Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr Leu			
[0306]	145	150	155	160
[0307]	Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys			
[0308]		165	170	175
[0309]	Glu Thr Leu Gln Arg Ala Asp Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His			
[0310]		180	185	190
[0311]	Pro Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe			

[0312]	195	200	205
[0313]	Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln		
[0314]	210	215	220
[0315]	Thr Gln Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr		
[0316]	225	230	235
[0317]	Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg		
[0318]	245	250	255
[0319]	Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Thr Leu		
[0320]	260	265	270
[0321]	Arg Trp Lys		
[0322]	275		
[0323]	<210> 21		
[0324]	<211> 341		
[0325]	<212> PRT		
[0326]	<213> 人(homo sapiens)		
[0327]	<400> 21		
[0328]	Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Phe Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly		
[0329]	1	5	10
[0330]	Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln		
[0331]	20	25	30
[0332]	Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg		
[0333]	35	40	45
[0334]	Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr		
[0335]	50	55	60
[0336]	Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln Thr His Arg Val Asp Leu Gly Thr		
[0337]	65	70	75
[0338]	Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Val Gln		
[0339]	85	90	95
[0340]	Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly		
[0341]	100	105	110
[0342]	Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu		
[0343]	115	120	125
[0344]	Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala Gln Thr Thr Lys		
[0345]	130	135	140
[0346]	His Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu		
[0347]	145	150	155
[0348]	Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys		
[0349]	165	170	175
[0350]	Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys Thr His Met Thr His His		

[0468]	65	70	75	80
[0469]	Leu Arg Gly Cys Tyr Asn Gln Ser Glu Gly Gly Ser His Thr Ile Gln			
[0470]		85	90	95
[0471]	Glu Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Gly Ser Leu Leu Arg Gly			
[0472]		100	105	110
[0473]	Tyr Arg Gln Asp Ala Tyr Asp Gly Arg Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu			
[0474]		115	120	125
[0475]	Asp Leu Lys Thr Trp Thr Ala Ala Asp Phe Ala Ala Gln Ile Thr Arg			
[0476]		130	135	140
[0477]	Asn Lys Trp Glu Arg Ala Arg Tyr Ala Glu Arg Leu Arg Ala Tyr Leu			
[0478]		145	150	160
[0479]	Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Ser Arg Tyr Leu Glu Leu Gly Lys			
[0480]		165	170	175
[0481]	Glu Thr Leu Leu Arg Ser Asp Pro Pro Glu Ala His Val Thr Leu His			
[0482]		180	185	190
[0483]	Pro Arg Pro Glu Gly Asp Val Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe			
[0484]		195	200	205
[0485]	Tyr Pro Ala Asp Ile Thr Leu Thr Trp Gln Leu Asn Gly Glu Asp Leu			
[0486]		210	215	220
[0487]	Thr Gln Asp Met Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr			
[0488]		225	230	240
[0489]	Phe Gln Lys Trp Ala Ser Val Val Val Pro Leu Gly Lys Glu Gln Asn			
[0490]		245	250	255
[0491]	Tyr Thr Cys Arg Val Glu His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Ser Gln			
[0492]		260	265	270
[0493]	Arg Trp			
[0494]	<210> 25			
[0495]	<211> 440			
[0496]	<212> PRT			
[0497]	<213> 人(homo sapiens)			
[0498]	<400> 25			
[0499]	Arg Ile Ile Pro Arg His Leu Gln Leu Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly			
[0500]		1	5	10
[0501]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln			
[0502]		20	25	30
[0503]	Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn			
[0504]		35	40	45
[0505]	Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu			
[0506]		50	55	60

[0507]	Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe
[0508]	65 70 75 80
[0509]	Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro
[0510]	85 90 95
[0511]	Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser
[0512]	100 105 110
[0513]	Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp Arg Asp Met Gly Gly Gly Gly Ser
[0514]	115 120 125
[0515]	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
[0516]	130 135 140
[0517]	Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Ser Ala Ala Val Ser Arg Pro Gly Arg
[0518]	145 150 155 160
[0519]	Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Met Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe
[0520]	165 170 175
[0521]	Val Arg Phe Asp Ser Asp Ser Ala Cys Pro Arg Met Glu Pro Arg Ala
[0522]	180 185 190
[0523]	Pro Trp Val Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Glu Thr Arg
[0524]	195 200 205
[0525]	Asn Thr Lys Ala His Ala Gln Thr Asp Arg Met Asn Leu Gln Thr Leu
[0526]	210 215 220
[0527]	Arg Gly Cys Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Ser Ser His Thr Leu Gln Trp
[0528]	225 230 235 240
[0529]	Met Ile Gly Cys Asp Leu Gly Ser Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly Tyr
[0530]	245 250 255
[0531]	Glu Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Leu Ala Leu Asn Glu Asp
[0532]	260 265 270
[0533]	Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Gln Ile Ser Lys Arg
[0534]	275 280 285
[0535]	Lys Cys Glu Ala Ala Asn Val Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr Leu Glu
[0536]	290 295 300
[0537]	Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu His Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu
[0538]	305 310 315 320
[0539]	Met Leu Gln Arg Ala Asp Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His Pro
[0540]	325 330 335
[0541]	Val Phe Asp Tyr Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr
[0542]	340 345 350
[0543]	Pro Ala Glu Ile Ile Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr
[0544]	355 360 365
[0545]	Gln Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe

[0546]	370	375	380
[0547]	Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg Tyr		
[0548]	385	390	395 400
[0549]	Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Met Leu Arg		
[0550]	405	410	415
[0551]	Trp Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp		
[0552]	420	425	430
[0553]	His Glu His His His His His His		
[0554]	435	440	
[0555]	<210> 26		
[0556]	<211> 441		
[0557]	<212> PRT		
[0558]	<213> 人工的		
[0559]	<220>		
[0560]	<223> 例示性的经修饰的HLA-G ?M MHC I类复合物		
[0561]	其中HLA-G特异性氨基酸已经用HLA-A共有氨基酸替换		
[0562]	(=去嫁接的HLA-G)		
[0563]	<400> 26		
[0564]	Arg Ile Ile Pro Arg His Leu Gln Leu Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly		
[0565]	1 5 10 15		
[0566]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln		
[0567]	20 25 30		
[0568]	Val Tyr Ser Arg His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn		
[0569]	35 40 45		
[0570]	Cys Tyr Val Ser Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu		
[0571]	50 55 60		
[0572]	Lys Asn Gly Glu Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe		
[0573]	65 70 75 80		
[0574]	Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro		
[0575]	85 90 95		
[0576]	Thr Glu Lys Asp Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser		
[0577]	100 105 110		
[0578]	Gln Pro Lys Ile Val Lys Trp Asp Arg Asp Met Gly Gly Gly Gly Ser		
[0579]	115 120 125		
[0580]	Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly		
[0581]	130 135 140		
[0582]	Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Ser Ala Ala Val Ser Arg Pro Gly Arg		
[0583]	145 150 155 160		
[0584]	Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Met Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe		

[0585]		165		170		175
[0586]	Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Pro Arg Met Glu Pro Arg Ala					
[0587]		180		185		190
[0588]	Pro Trp Val Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Glu Glu Thr Arg					
[0589]		195		200		205
[0590]	Asn Thr Lys Ala His Ala Gln Thr Asp Arg Val Asn Leu Gly Thr Leu					
[0591]		210		215		220
[0592]	Arg Gly Cys Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Leu Gln Trp					
[0593]		225		230		235
[0594]	Met Ile Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Gly Arg Leu Leu Arg Gly Tyr					
[0595]		245		250		255
[0596]	Glu Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Leu Ala Leu Asn Glu Asp					
[0597]		260		265		270
[0598]	Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Gln Ile Ser Lys Arg					
[0599]		275		280		285
[0600]	Lys Cys Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Arg Arg Ala Tyr Leu Glu					
[0601]		290		295		300
[0602]	Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys Glu					
[0603]		305		310		315
[0604]	Thr Leu Gln Arg Ala Asp Pro Pro Lys Thr His Val Thr His His Pro					
[0605]		325		330		335
[0606]	Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr					
[0607]		340		345		350
[0608]	Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln Thr					
[0609]		355		360		365
[0610]	Gln Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe					
[0611]		370		375		380
[0612]	Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Glu Glu Gln Arg Tyr					
[0613]		385		390		395
[0614]	Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Glu Pro Leu Thr Leu Arg					
[0615]		405		410		415
[0616]	Trp Lys Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu					
[0617]		420		425		430
[0618]	Trp His Glu His His His His His His					
[0619]		435		440		
[0620]	<210> 27					
[0621]	<211> 441					
[0622]	<212> PRT					
[0623]	<213> 小鼠 (mus musculus)					

[0624] <400> 27
 [0625] Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly
 [0626] 1 5 10 15
 [0627] Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Lys Thr Pro Gln Ile Gln
 [0628] 20 25 30
 [0629] Val Tyr Ser Arg His Pro Pro Glu Asn Gly Lys Pro Asn Ile Leu Asn
 [0630] 35 40 45
 [0631] Cys Tyr Val Thr Gln Phe His Pro Pro His Ile Glu Ile Gln Met Leu
 [0632] 50 55 60
 [0633] Lys Asn Gly Lys Lys Ile Pro Lys Val Glu Met Ser Asp Met Ser Phe
 [0634] 65 70 75 80
 [0635] Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Ile Leu Ala His Thr Glu Phe Thr Pro
 [0636] 85 90 95
 [0637] Thr Glu Thr Asp Thr Tyr Ala Cys Arg Val Lys His Asp Ser Met Ala
 [0638] 100 105 110
 [0639] Glu Pro Lys Thr Val Tyr Trp Asp Arg Asp Met Gly Gly Gly Gly Ser
 [0640] 115 120 125
 [0641] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 [0642] 130 135 140
 [0643] Pro His Ser Leu Arg Tyr Phe Val Thr Ala Val Ser Arg Pro Gly Leu
 [0644] 145 150 155 160
 [0645] Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln Phe
 [0646] 165 170 175
 [0647] Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Asp Asn Pro Arg Phe Glu Pro Arg Ala
 [0648] 180 185 190
 [0649] Pro Trp Met Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Glu Glu Gln Thr Gln
 [0650] 195 200 205
 [0651] Arg Ala Lys Ser Asp Glu Gln Trp Phe Arg Val Ser Leu Arg Thr Ala
 [0652] 210 215 220
 [0653] Gln Arg Cys Tyr Asn Gln Ser Lys Gly Gly Ser His Thr Phe Gln Arg
 [0654] 225 230 235 240
 [0655] Met Phe Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Leu Leu Arg Gly Tyr
 [0656] 245 250 255
 [0657] Gln Gln Phe Ala Tyr Asp Gly Arg Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu Asp
 [0658] 260 265 270
 [0659] Leu Lys Thr Trp Thr Ala Ala Asp Thr Ala Ala Leu Ile Thr Arg Arg
 [0660] 275 280 285
 [0661] Lys Trp Glu Gln Ala Gly Asp Ala Glu Tyr Tyr Arg Ala Tyr Leu Glu
 [0662] 290 295 300

[0663]	Gly Glu Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Leu Gly Asn Glu
[0664]	305 310 315 320
[0665]	Thr Leu Leu Arg Thr Asp Ser Pro Lys Ala His Val Thr Tyr His Pro
[0666]	325 330 335
[0667]	Arg Ser Gln Val Asp Val Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr
[0668]	340 345 350
[0669]	Pro Ala Asp Ile Thr Leu Thr Trp Gln Leu Asn Gly Glu Asp Leu Thr
[0670]	355 360 365
[0671]	Gln Asp Met Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe
[0672]	370 375 380
[0673]	Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Leu Gly Lys Glu Gln Asn Tyr
[0674]	385 390 395 400
[0675]	Thr Cys His Val His His Lys Gly Leu Pro Glu Pro Leu Thr Leu Arg
[0676]	405 410 415
[0677]	Trp Lys Gly Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu
[0678]	420 425 430
[0679]	Trp His Glu His His His His His His
[0680]	435 440
[0681]	<210> 28
[0682]	<211> 441
[0683]	<212> PRT
[0684]	<213> 人工的
[0685]	<220>
[0686]	<223> 例示性的经修饰的HLA-G/小鼠H2Kd ?M MHC I类复合物
[0687]	其中将对人HLA-G特异性的位置嫁接到小鼠H2Kd框架上
[0688]	<400> 28
[0689]	Thr Tyr Gln Arg Thr Arg Ala Leu Val Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly
[0690]	1 5 10 15
[0691]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Lys Thr Pro Gln Ile Gln
[0692]	20 25 30
[0693]	Val Tyr Ser Arg His Pro Pro Glu Asn Gly Lys Pro Asn Ile Leu Asn
[0694]	35 40 45
[0695]	Cys Tyr Val Thr Gln Phe His Pro Pro His Ile Glu Ile Gln Met Leu
[0696]	50 55 60
[0697]	Lys Asn Gly Lys Lys Ile Pro Lys Val Glu Met Ser Asp Met Ser Phe
[0698]	65 70 75 80
[0699]	Ser Lys Asp Trp Ser Phe Tyr Ile Leu Ala His Thr Glu Phe Thr Pro
[0700]	85 90 95
[0701]	Thr Glu Thr Asp Thr Tyr Ala Cys Arg Val Lys His Asp Ser Met Ala

[0780]	Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Gly Ser Leu Leu Arg Gly Tyr
[0781]	245 250 255
[0782]	Arg Gln Asp Ala Tyr Asp Gly Arg Asp Tyr Ile Ala Leu Asn Glu Asp
[0783]	260 265 270
[0784]	Leu Lys Thr Trp Thr Ala Ala Asp Phe Ala Ala Gln Ile Thr Arg Asn
[0785]	275 280 285
[0786]	Lys Trp Glu Arg Ala Arg Tyr Ala Glu Arg Leu Arg Ala Tyr Leu Glu
[0787]	290 295 300
[0788]	Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Ser Arg Tyr Leu Glu Leu Gly Lys Glu
[0789]	305 310 315 320
[0790]	Thr Leu Leu Arg Ser Asp Pro Pro Glu Ala His Val Thr Leu His Pro
[0791]	325 330 335
[0792]	Arg Pro Glu Gly Asp Val Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Gly Phe Tyr
[0793]	340 345 350
[0794]	Pro Ala Asp Ile Thr Leu Thr Trp Gln Leu Asn Gly Glu Asp Leu Thr
[0795]	355 360 365
[0796]	Gln Asp Met Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe
[0797]	370 375 380
[0798]	Gln Lys Trp Ala Ser Val Val Val Pro Leu Gly Lys Glu Gln Asn Tyr
[0799]	385 390 395 400
[0800]	Thr Cys Arg Val Glu His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Ser Gln Arg
[0801]	405 410 415
[0802]	Trp Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp
[0803]	420 425 430
[0804]	His Glu His His His His His His
[0805]	435 440
[0806]	<210> 30
[0807]	<211> 440
[0808]	<212> PRT
[0809]	<213> 人工的
[0810]	<220>
[0811]	<223> 例示性的人HLA-G/大鼠RT1A ?M MHC I类复合物
[0812]	其中将对人HLA-G特异性的位置嫁接到大鼠RT1A框架上
[0813]	<400> 30
[0814]	Ala Gln Phe Ser Ala Ser Ala Ser Arg Gly Cys Gly Gly Ser Gly Gly
[0815]	1 5 10 15
[0816]	Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ile Gln Lys Thr Pro Gln Ile Gln
[0817]	20 25 30
[0818]	Val Tyr Ser Arg His Pro Pro Glu Asn Gly Lys Pro Asn Phe Leu Asn

[0858] Pro Ala Glu Ile Ile Leu Thr Trp Gln Leu Asn Gly Glu Asp Leu Thr
 [0859] 355 360 365
 [0860] Gln Asp Val Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr Phe
 [0861] 370 375 380
 [0862] Gln Lys Trp Ala Ser Val Val Val Pro Ser Gly Lys Glu Gln Asn Tyr
 [0863] 385 390 395 400
 [0864] Thr Cys Arg Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Met Leu Arg
 [0865] 405 410 415
 [0866] Trp Gly Ser Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp
 [0867] 420 425 430
 [0868] His Glu His His His His His His
 [0869] 435 440
 [0870] <210> 31
 [0871] <211> 33
 [0872] <212> PRT
 [0873] <213> 人工的
 [0874] <220>
 [0875] <223> 接头和his标签
 [0876] <400> 31
 [0877] Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ser Gly Leu Asn Asp
 [0878] 1 5 10 15
 [0879] Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His Glu His His His His His
 [0880] 20 25 30
 [0881] His
 [0882] <210> 32
 [0883] <211> 9
 [0884] <212> PRT
 [0885] <213> 人工的
 [0886] <220>
 [0887] <223> 肽
 [0888] <400> 32
 [0889] Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala
 [0890] 1 5
 [0891] <210> 33
 [0892] <211> 107
 [0893] <212> PRT
 [0894] <213> 人(homo sapiens)
 [0895] <400> 33
 [0896] Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu

[0897]	1	5	10	15
[0898]	Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe			
[0899]	20	25	30	
[0900]	Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln			
[0901]	35	40	45	
[0902]	Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser			
[0903]	50	55	60	
[0904]	Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu			
[0905]	65	70	75	80
[0906]	Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser			
[0907]	85	90	95	
[0908]	Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys			
[0909]	100	105		
[0910]	<210> 34			
[0911]	<211> 105			
[0912]	<212> PRT			
[0913]	<213> 人(homo sapiens)			
[0914]	<400> 34			
[0915]	Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu			
[0916]	1	5	10	15
[0917]	Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe			
[0918]	20	25	30	
[0919]	Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro Val			
[0920]	35	40	45	
[0921]	Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys			
[0922]	50	55	60	
[0923]	Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser			
[0924]	65	70	75	80
[0925]	His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu			
[0926]	85	90	95	
[0927]	Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser			
[0928]	100	105		
[0929]	<210> 35			
[0930]	<211> 328			
[0931]	<212> PRT			
[0932]	<213> 人(homo sapiens)			
[0933]	<400> 35			
[0934]	Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys			
[0935]	1	5	10	15

[0936]	Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
[0937]	20 25 30
[0938]	Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
[0939]	35 40 45
[0940]	Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
[0941]	50 55 60
[0942]	Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
[0943]	65 70 75 80
[0944]	Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
[0945]	85 90 95
[0946]	Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
[0947]	100 105 110
[0948]	Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
[0949]	115 120 125
[0950]	Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
[0951]	130 135 140
[0952]	Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
[0953]	145 150 155 160
[0954]	Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
[0955]	165 170 175
[0956]	Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
[0957]	180 185 190
[0958]	His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
[0959]	195 200 205
[0960]	Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
[0961]	210 215 220
[0962]	Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
[0963]	225 230 235 240
[0964]	Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
[0965]	245 250 255
[0966]	Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
[0967]	260 265 270
[0968]	Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
[0969]	275 280 285
[0970]	Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
[0971]	290 295 300
[0972]	Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
[0973]	305 310 315 320
[0974]	Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro

[1053]	195	200	205
[1054]	Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
[1055]	210	215	220
[1056]	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys		
[1057]	225	230	235
[1058]	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
[1059]	245	250	255
[1060]	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
[1061]	260	265	270
[1062]	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
[1063]	275	280	285
[1064]	Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser		
[1065]	290	295	300
[1066]	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
[1067]	305	310	315
[1068]	Leu Ser Leu Ser Leu		
[1069]	325		
[1070]	<210> 38		
[1071]	<211> 122		
[1072]	<212> PRT		
[1073]	<213> 大鼠		
[1074]	<400> 38		
[1075]	Glu Val Gln Leu Val Glu Thr Gly Gly Gly Leu Val Gln Ser Gly Arg		
[1076]	1	5	10
[1077]	Ser Leu Lys Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Asp Tyr		
[1078]	20	25	30
[1079]	Trp Met Thr Trp Thr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val		
[1080]	35	40	45
[1081]	Ala Ser Ile Thr Asn Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Leu Asp Ser Val		
[1082]	50	55	60
[1083]	Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ala Gln Asn Thr Leu Tyr		
[1084]	65	70	75
[1085]	Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys		
[1086]	85	90	95
[1087]	Thr Lys Glu Arg Ile Tyr Leu Thr Ala Tyr Trp Phe Phe Asp Phe Trp		
[1088]	100	105	110
[1089]	Gly Pro Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser		
[1090]	115	120	
[1091]	<210> 39		

[1092] <211> 106
 [1093] <212> PRT
 [1094] <213> 大鼠
 [1095] <400> 39
 [1096] Asp Thr Ile Leu Thr Gln Ser Pro Ala Leu Ala Val Ser Pro Gly Glu
 [1097] 1 5 10 15
 [1098] Arg Val Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ser Thr Leu Ile
 [1099] 20 25 30
 [1100] His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Arg Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
 [1101] 35 40 45
 [1102] Leu Ala Ser His Leu Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 [1103] 50 55 60
 [1104] Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asp Pro Val Glu Ala Asp
 [1105] 65 70 75 80
 [1106] Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Trp Asn Glu Pro Arg Thr
 [1107] 85 90 95
 [1108] Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 [1109] 100 105

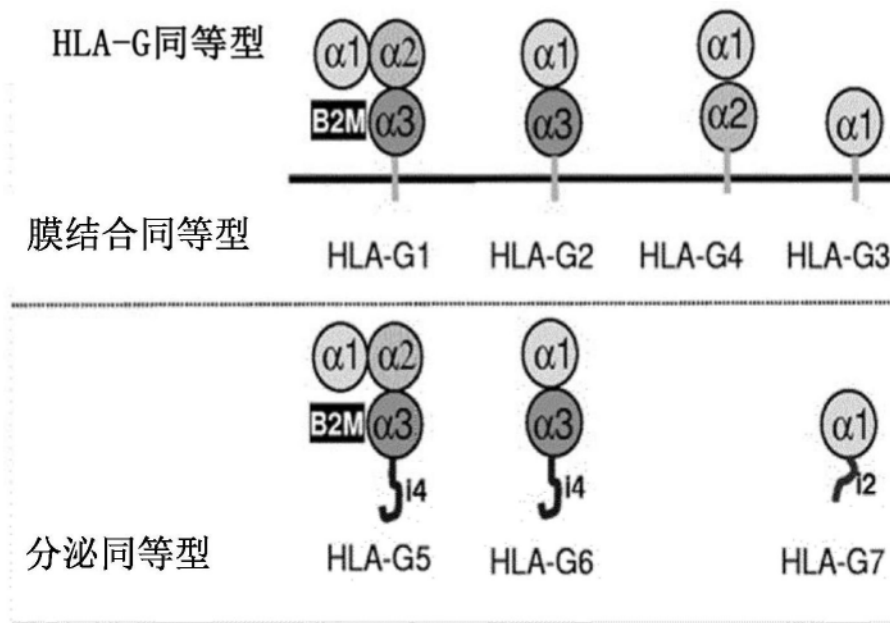


图1

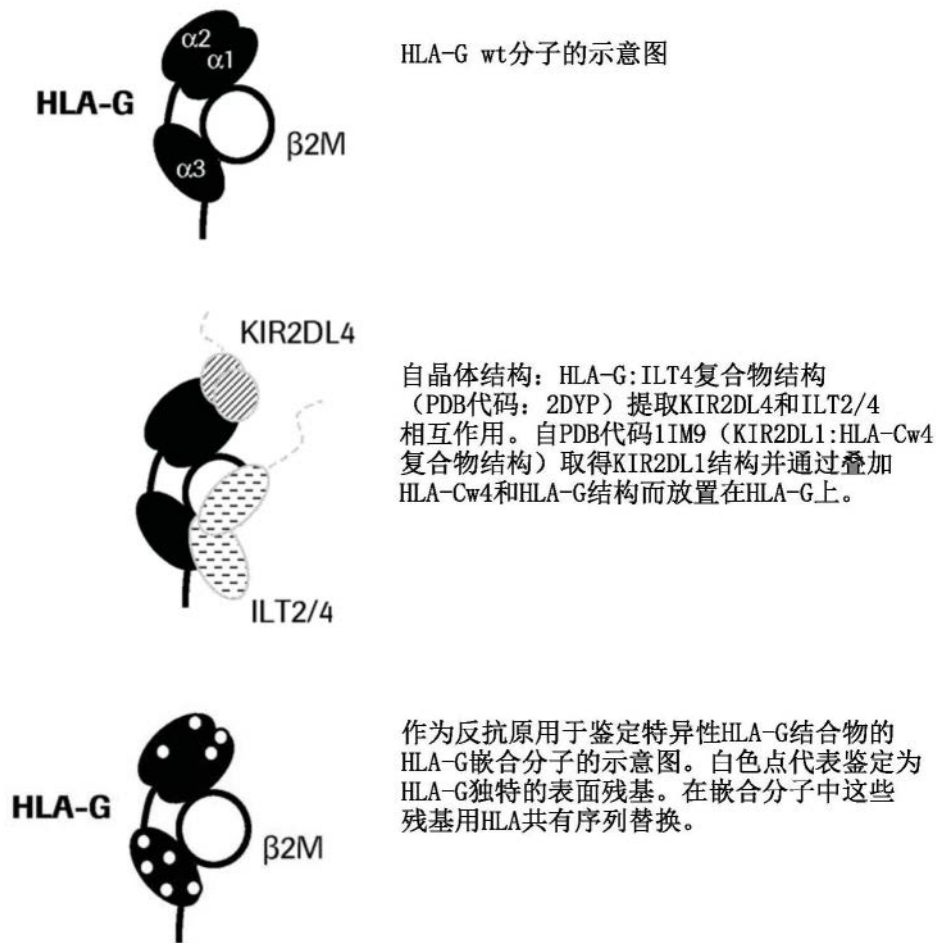


图2A

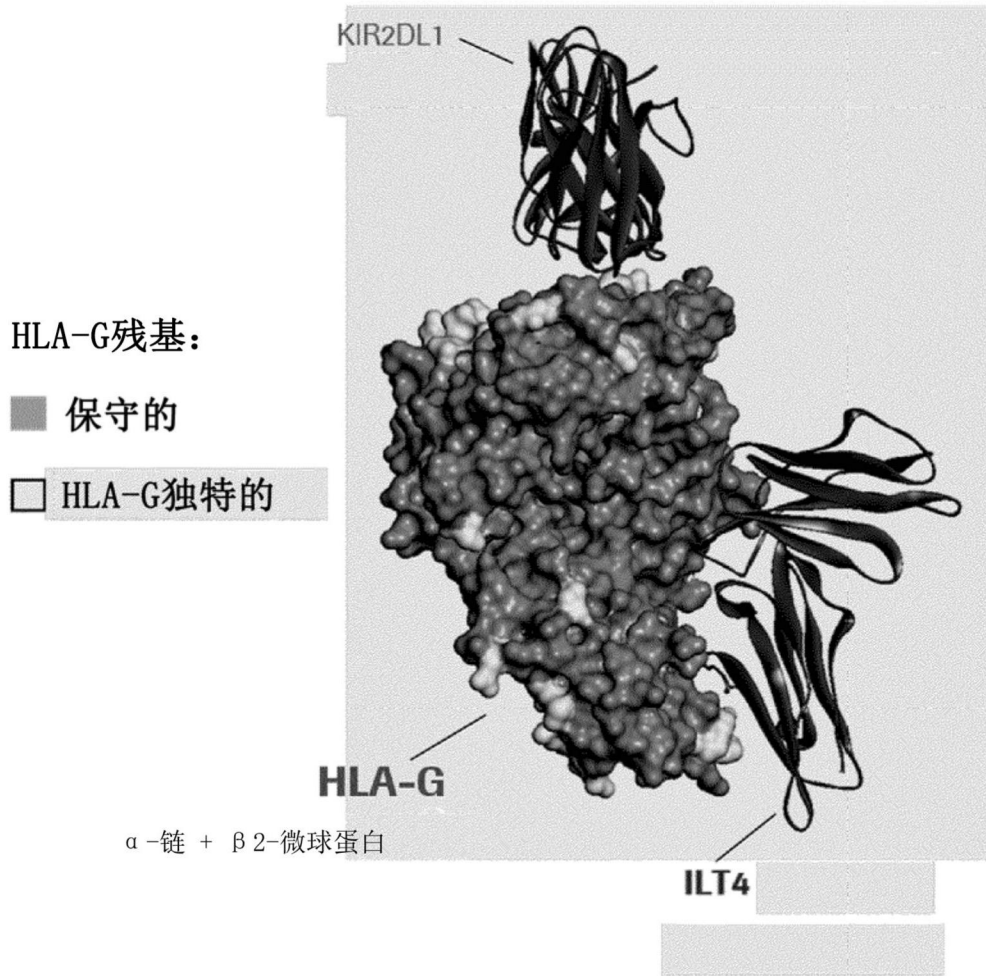


图2B

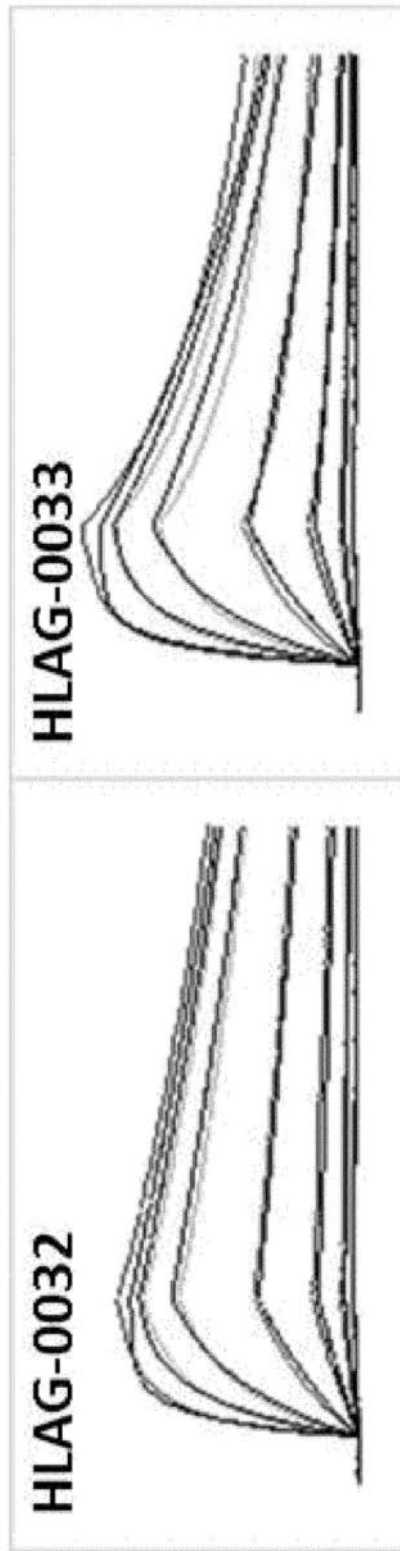


图3A

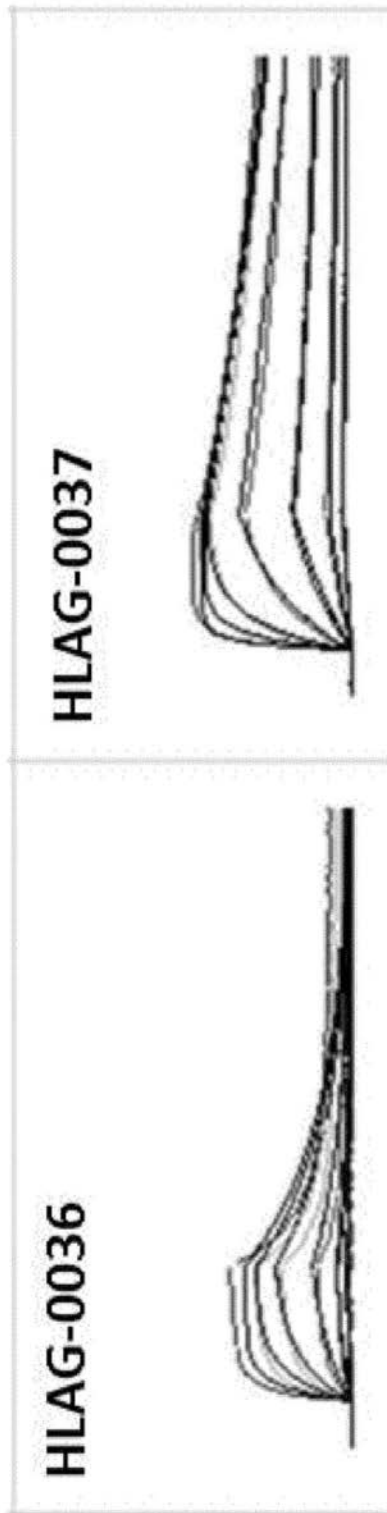


图3B

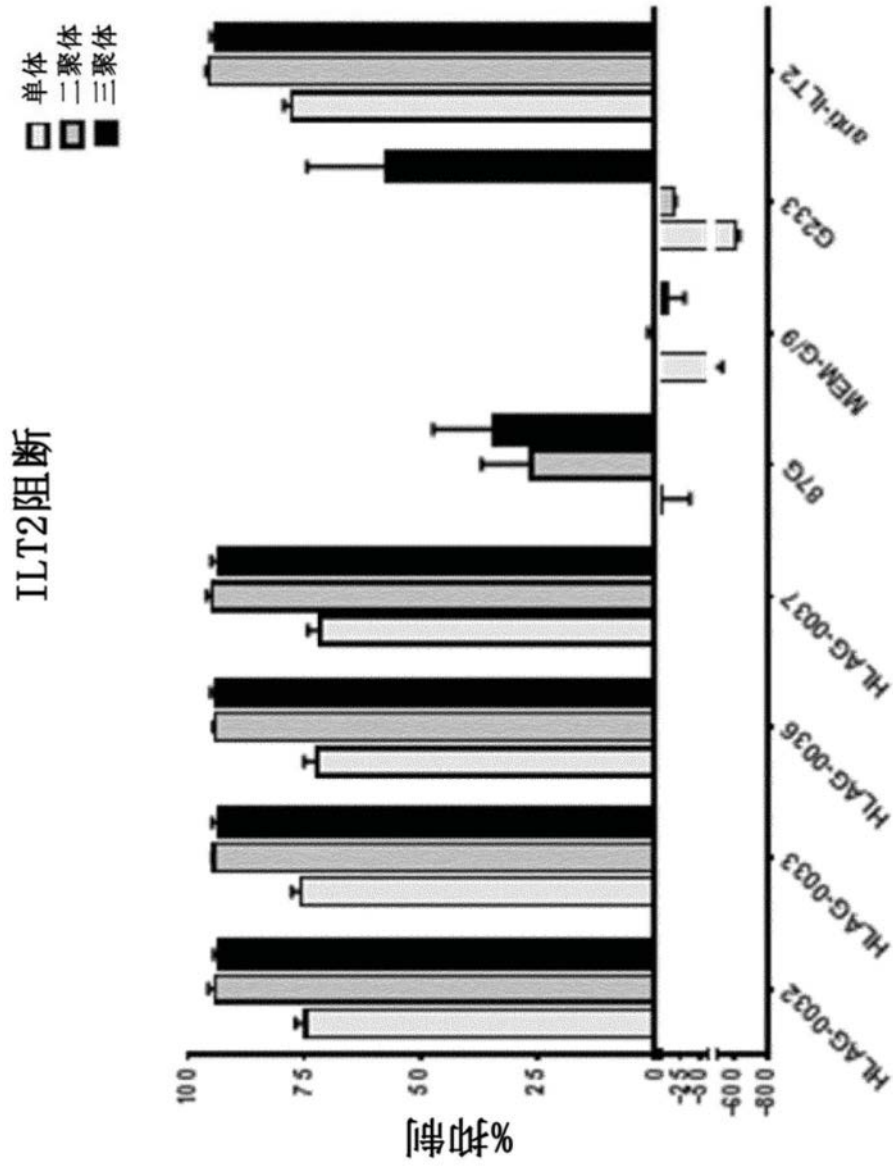


图4A

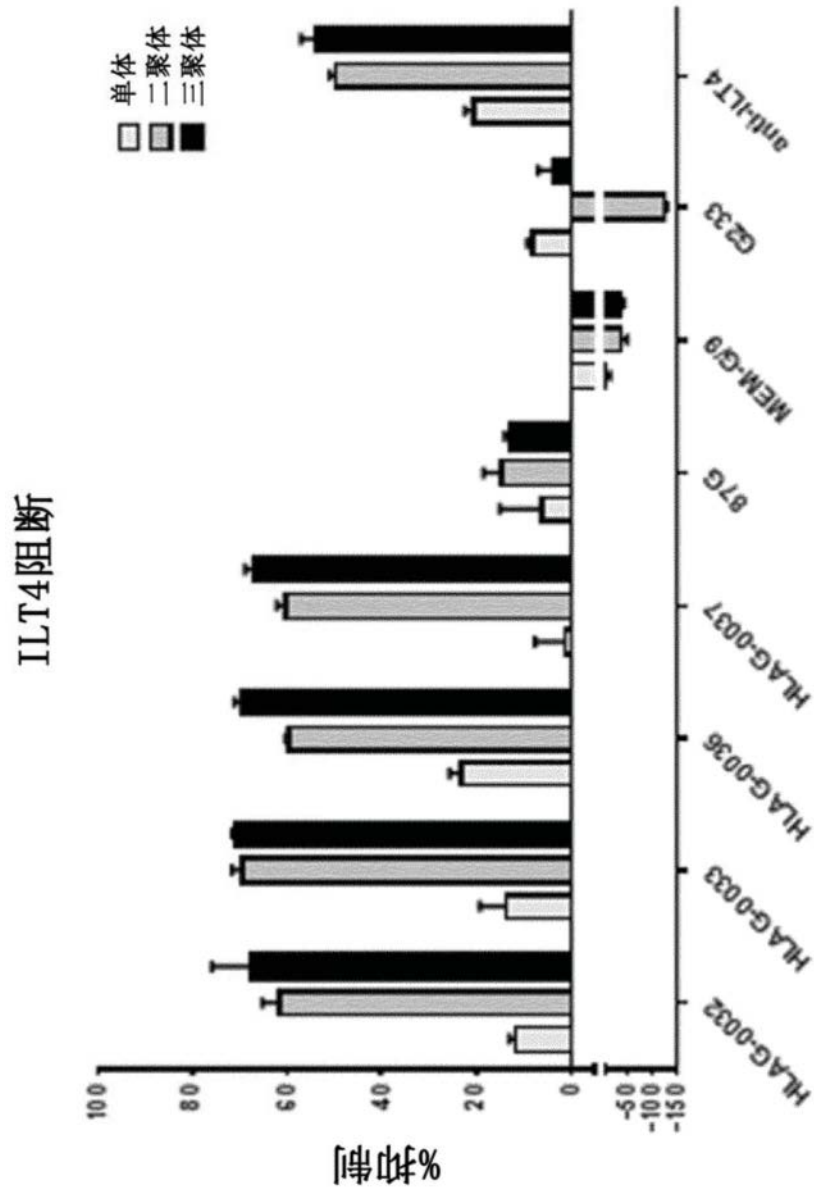


图4B

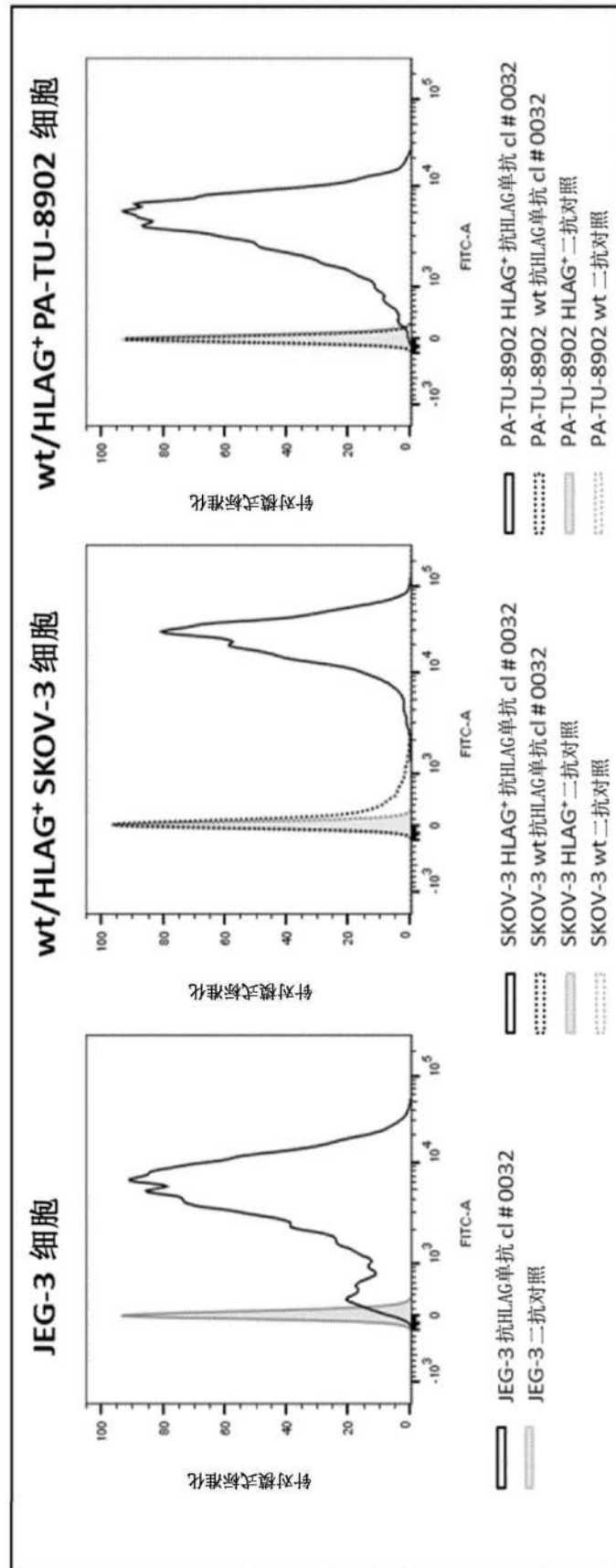


图5A

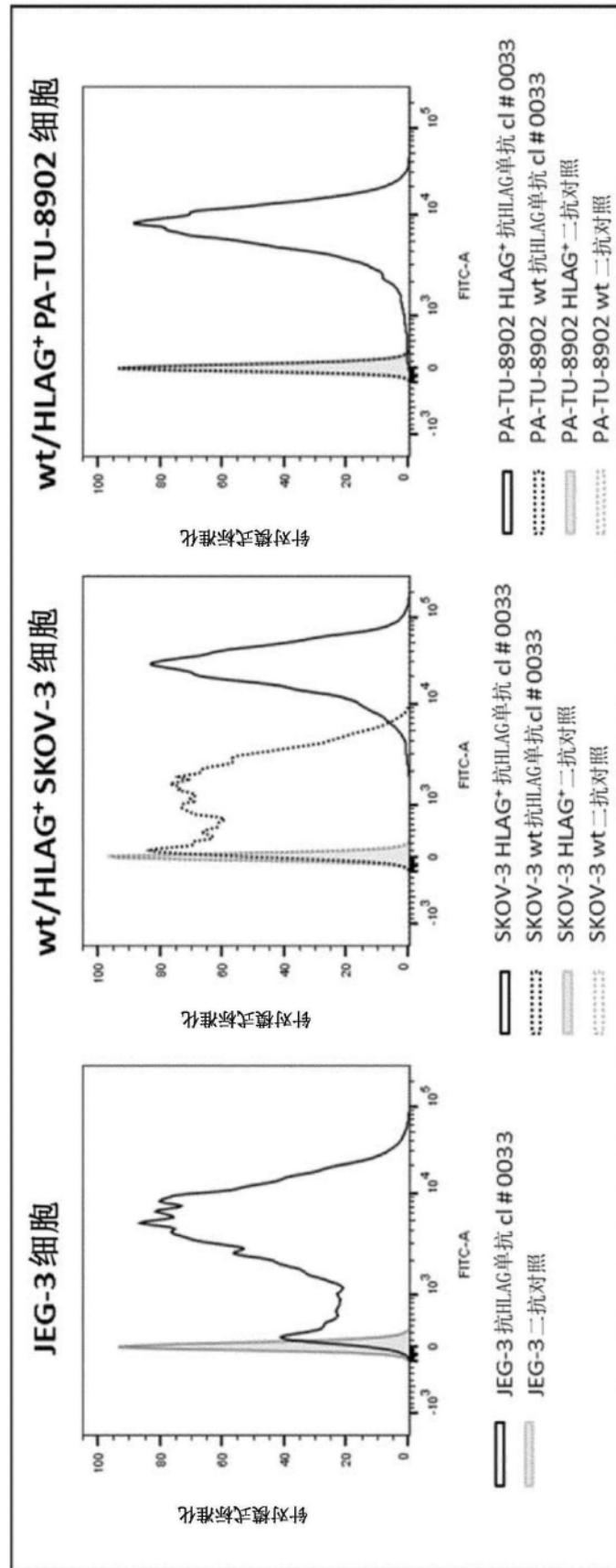


图5B

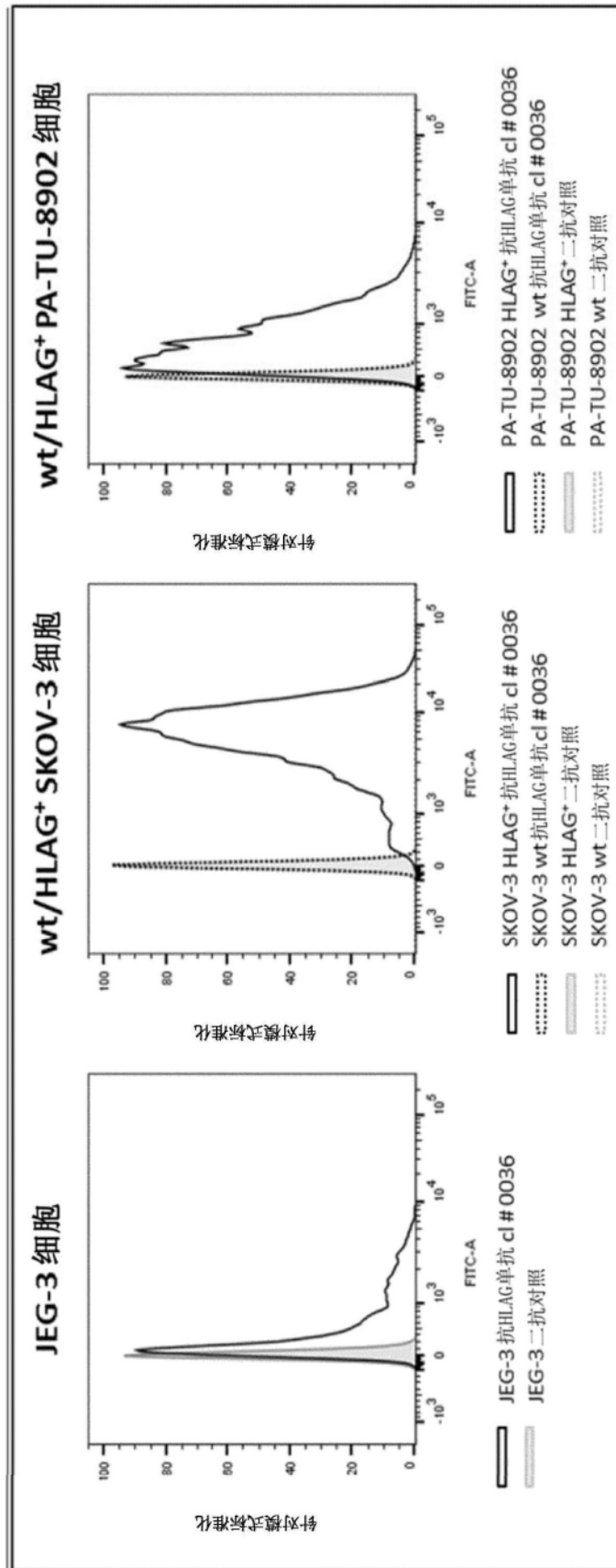


图5C

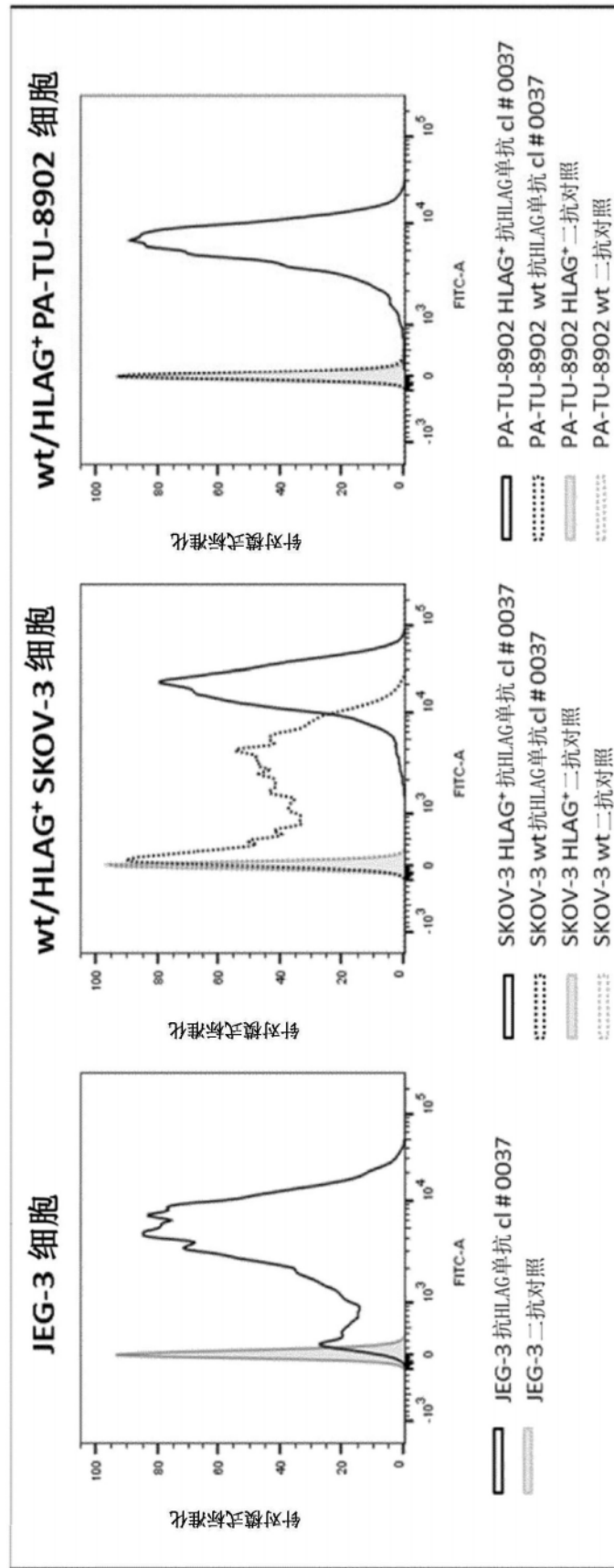


图5D

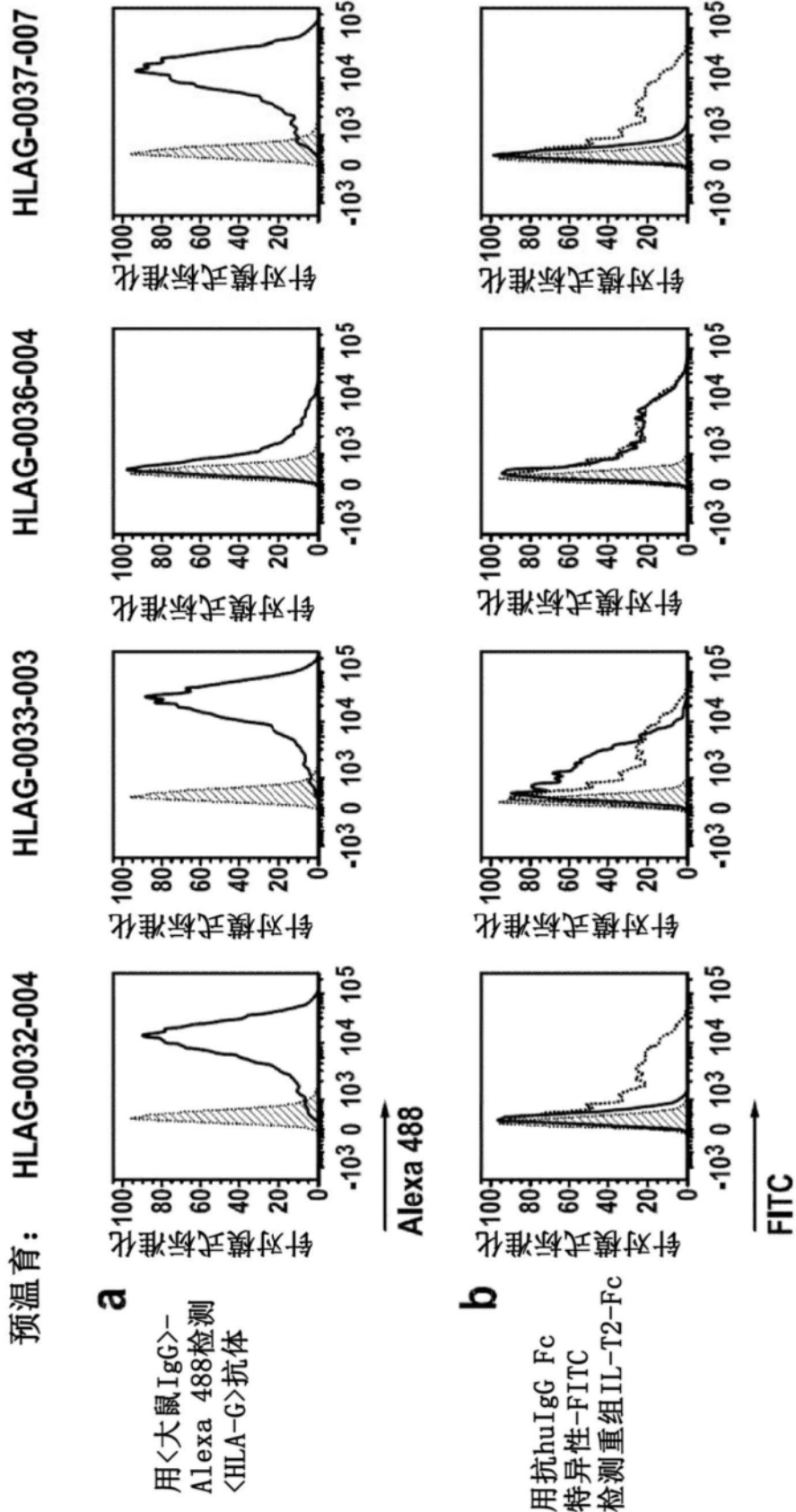


图6A

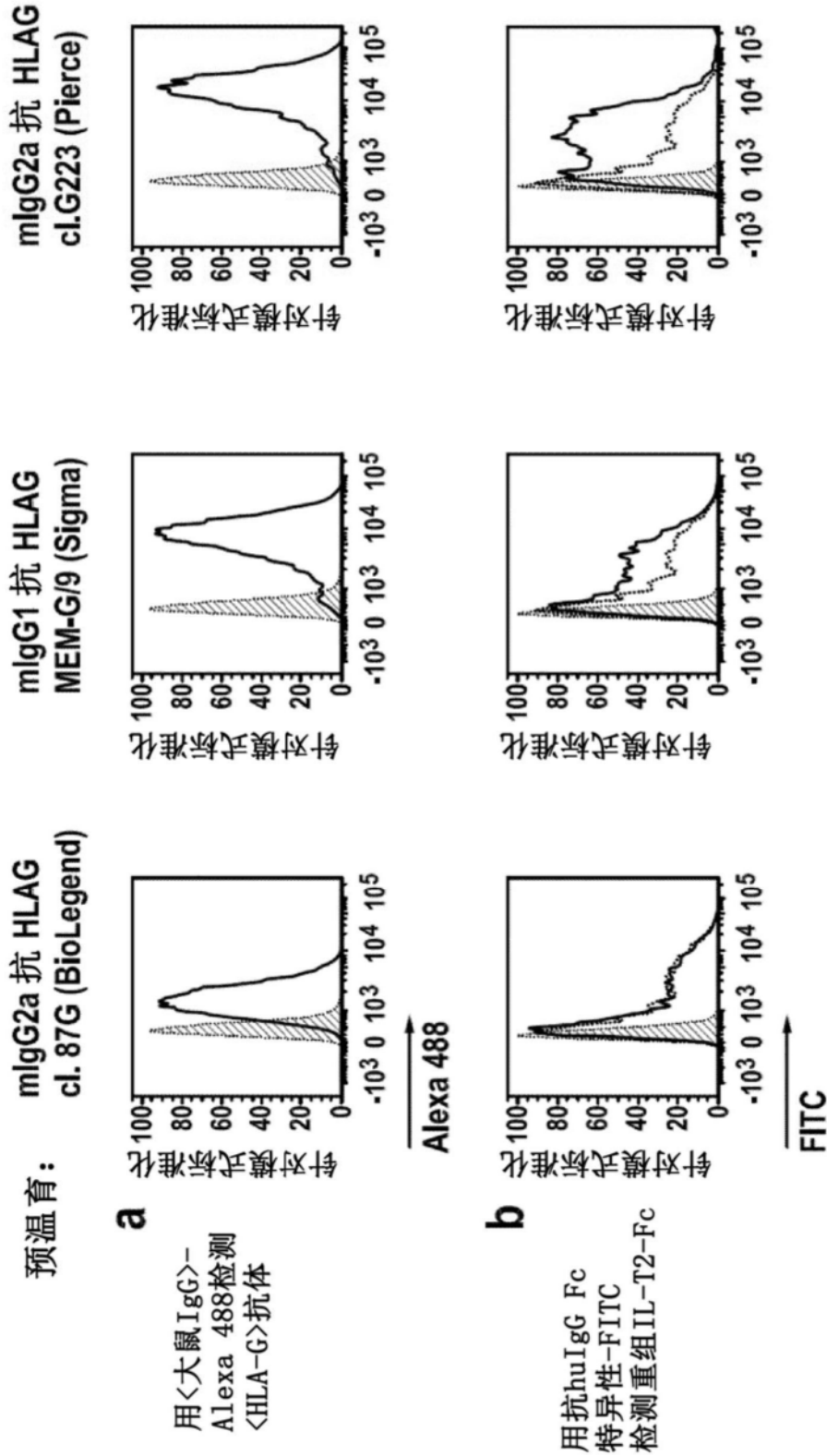


图6B

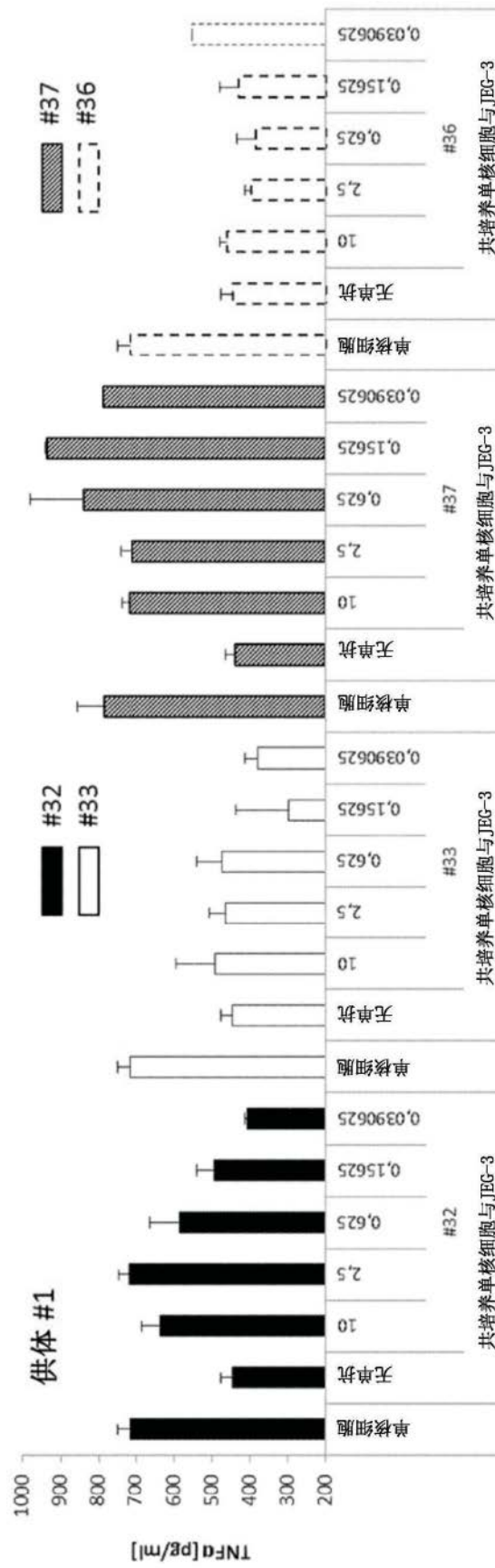


图7A

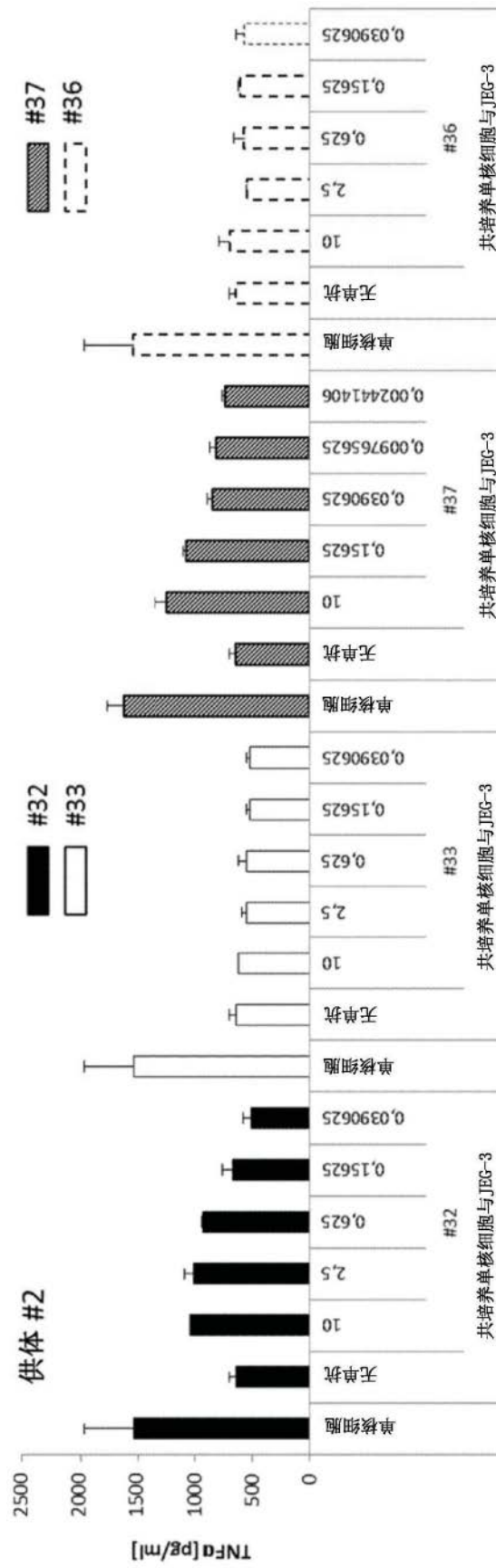


图7B