



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114853903 A

(43) 申请公布日 2022. 08. 05

(21) 申请号 202210348320.0

(22) 申请日 2016.06.29

(30) 优先权数据

62/187,105 2015.06.30 US

(62) 分案原申请数据

201680049768.5 2016.06.29

(71) 申请人 桑福德伯纳姆普利斯医学发现研究  
所

地址 美国加利福尼亚州

申请人 辉瑞有限公司

(72) 发明人 C·F·韦尔 J·赛迪 T·艾维茜  
B·米勒 N·K·克莱林

(74) 专利代理机构 北京安信方达知识产权代理  
有限公司 11262

专利代理师 王玮玮 郑霞

(51) Int.Cl.

C07K 19/00 (2006.01)

A61K 38/17 (2006.01)

A61P 37/02 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

权利要求书1页 说明书29页  
序列表17页 附图19页

(54) 发明名称

BTLA融合蛋白激动剂及其用途

(57) 摘要

本申请涉及BTLA融合蛋白激动剂及其用途。本发明基于BTLA激动剂融合蛋白调节免疫反应的开创性发现。具体而言,本发明提供结合BTLA增强BTLA信号传导的融合蛋白。本发明进一步提供了用本文所描述的BTLA激动剂融合蛋白治疗癌症以及免疫和炎症疾病和病症的方法。

1. 一种包含非天然存在的HVEM蛋白和Fc蛋白的融合蛋白,其中所述融合蛋白包含所述HVEM蛋白的胞外结构域和Fc蛋白。

2. 权利要求1的所述融合蛋白,其中所述融合蛋白是BTLA激动剂。

3. 权利要求1所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白包含所述HVEM蛋白中的至少一个突变。

4. 权利要求3所述的融合蛋白,其中所述突变选自S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A及其组合。

5. 权利要求4所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白进一步包含所述HVEM蛋白中的至少一个突变,所述突变选自S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A及其组合。

6. 权利要求1所述的融合蛋白,其中所述融合蛋白包含所述HVEM蛋白中选自下组的至少一个突变:

- a) S58R;
- b) S58K;
- c) S58Q;
- d) L70D;
- e) L70E;
- f) L70N;
- g) L90A;
- h) S58R和L90A;
- i) S58R和G68T;
- j) S58R和L70W;
- k) S58R、L70D和L90A;
- l) S58R、G68T和L90A;
- m) S58R、L70W和L90A;
- n) S58R、G68T、L70D和L90A;以及
- o) S58R、G68T、L70W和L90A。

7. 权利要求1所述的融合蛋白,其中所述Fc蛋白选自下组: IgA、IgG、IgD、IgE和IgM。

8. 权利要求7所述的融合蛋白,其中所述Fc蛋白选自下组: IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。

9. 权利要求7所述的融合蛋白,其中所述IgG Fc蛋白是人的。

10. 一种包含融合蛋白以及药学上可接受的载体的药物组合物,所述融合蛋白包含非天然存在的HVEM蛋白和Fc蛋白。

## BTLA融合蛋白激动剂及其用途

[0001] 本申请是申请日为2016年06月29日,申请号为201680049768.5,发明名称为“BTLA融合蛋白激动剂及其用途”的申请的分案申请。

[0002] 对相关申请的交叉引用

[0003] 本申请根据35U.SC§119(e)要求于2015年6月30日提交的美国申请序列号62/187,105的权益。在先申请的公开内容被认为是本申请的一部分并且通过引用整体并入本申请的公开内容。

[0004] 序列表的并入

[0005] 所附的序列表中的材料在此通过引用并入本申请中。所附的序列表文本文件,名称为BURN1680\_1W0\_Sequence\_Listing,于2016年6月29日创建,且为19kb。该文件可在使用Windows操作系统的计算机上使用Microsoft Word访问。

### 发明领域

[0006] 本发明一般涉及融合蛋白,更具体地涉及BTLA激动剂融合蛋白的开发和用途及其调节免疫响应和治疗疾病和病症的用途。

[0007] 发明背景

[0008] 肿瘤坏死因子(TNF)受体疱疹病毒进入介体(HVEM;TNFRSF14)是用于通过病毒病原体的操作以及癌症和自身免疫中的突变的焦点。在人中,HVEM与TNF超家族细胞因子、LIGHT和淋巴毒素 $\alpha$ 以及含有受体B和T淋巴细胞弱化物(BTLA)和CD160的免疫球蛋白(Ig)家族相互作用。膜相关的LIGHT、BTLA和CD160,均在受体接合后激活HVEM的下游NF- $\kappa$ B信号传导,而HVEM激活受体BTLA和CD160,导致相邻细胞之间的双向信号传导。细胞共表达的HVEM和BTLA或CD160还可形成这些蛋白质的细胞-内在复合物,其由于空间位阻而阻止这些受体接近细胞外配体。

[0009] 已经显示BTLA介导的抑制调节许多不同的细胞途径,包括T和B细胞中的抗原受体信号传导。在T细胞中,首次显示BTLA涉及抑制性信号传导途径,包括含有SH2结构域的蛋白酪氨酸磷酸酶(SHP)-1和2的激活。最近已显示BTLA调节树突细胞中的tol1样受体信号传导以及 $\gamma$  $\delta$ T细胞中的IL-7信号传导。然而,在人自然杀伤(NK)细胞中,HVEM还可通过CD160促进细胞溶解和促炎途径,作为对人巨细胞病毒(HCMV)的宿主对抗措施。另外,描述在小鼠中CD160缺陷的最近工作证实了其在NK细胞中的促炎功能。

[0010] 对于经设计以抑制患有免疫介导的病理(如移植物抗宿主病或自身免疫性疾病)的患者中的淋巴细胞活性的新型疗法存在很大的未满足的需要。在这些疾病的许多类型中,存在有限量的经批准的治疗方法,或者对可用治疗不响应一些个体。作为新型疗法的有吸引力的目标是由致病性淋巴细胞表达的抑制性受体的对抗性激活,所述致病性淋巴细胞是自身免疫性疾病的原因。尽管在动物模型中取得了有希望的结果,开发经设计以激活人抑制性受体的基于抗体的疗法的尝试已经在很大程度上遇到失败。

[0011] 发明概述

[0012] 本发明基于BTLA激动剂融合蛋白调节免疫响应的开创性发现。具体而言,本发明

提供结合BTLA增强BTLA信号传导的融合蛋白。本发明进一步提供了用本文所描述的BTLA激动剂融合蛋白治疗癌症以及免疫和炎症疾病和病症的方法。

[0013] 在一个实施方案中,本发明提供包括非天然存在的HVEM蛋白和Fc蛋白的融合蛋白,其中所述融合蛋白包括所述HVEM蛋白的胞外结构域和Fc蛋白。在一个方面,所述融合蛋白是BTLA激动剂。在另一个方面,所述融合蛋白包括在所述HVEM蛋白中的至少一个突变。在又一个方面,所述突变是S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A或其组合。在一个方面,所述融合蛋白进一步包括在所述HVEM蛋白中的至少一个突变,例如S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A或其组合。在另一个方面,所述融合蛋白包括HVEM蛋白质中的至少两个、三个、四个或更多个突变,例如S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A或其组合。在某些方面,所述融合蛋白包括在所述HVEM蛋白中的至少一个突变,如S58R;S58K;S58Q;L70D;L70E;L70N;L90A;S58R和L90A;S58R和G68T;S58R和L70W;S58R、L70D和L90A;S58R、G68T和L90A;S58R、L70W和L90A;S58R、G68T、L70D和L90A;或S58R、G68T、L70W和L90A。在一个方面,所述Fc蛋白是IgA、IgG、IgD、IgE或IgM。在另一个方面,所述Fc蛋白是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在一个特定的方面,所述IgG Fc蛋白是人的。

[0014] 在又一个实施方案中,本发明提供一种包括融合蛋白如非天然存在的HVEM蛋白和Fc蛋白以及药学上可接受的载体的药物组合物。在一个方面,所述融合蛋白是BTLA激动剂。在另一个方面,所述融合蛋白包括HVEM蛋白的胞外结构域和Fc蛋白。在另一个方面,所述融合蛋白包括在所述HVEM蛋白中的至少一个突变。在又一个方面,所述突变是S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A或其组合。在又一个方面,所述融合蛋白进一步包括在所述HVEM蛋白中的至少一个突变,例如S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A或其组合。在另一个方面,所述融合蛋白包括HVEM蛋白质中的至少两个、三个、四个或更多个突变,例如S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A或其组合。在某些方面,所述融合蛋白包括在所述HVEM蛋白中的至少一个突变,如S58R;S58K;S58Q;L70D;L70E;L70N;L90A;S58R和L90A;S58R和G68T;S58R和L70W;S58R、L70D和L90A;S58R、G68T和L90A;S58R、L70W和L90A;S58R、G68T、L70D和L90A;或S58R、G68T、L70W和L90A。在一个方面,所述Fc蛋白是IgA、IgG、IgD、IgE或IgM。在另一个方面,所述Fc蛋白是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在具体的方面,所述IgG Fc蛋白是人的。

[0015] 在一个实施方案中,本发明提供一种治疗BTLA相关病症的方法,包括将融合蛋白如非天然存在的HVEM蛋白和Fc蛋白向需要其的受试者施用,由此治疗所述BTLA相关病症。在一个方面,所述BTLA相关病症是癌症或自身免疫性疾病或病症。在又一个方面,所述自身免疫性疾病或病症是阿狄森氏病(Addison's disease)、肌萎缩性侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis)、克罗恩氏病(Crohn's disease)、库兴氏综合征(Cushing's Syndrome)、1型糖尿病、移植物抗宿主病、格雷夫斯氏病(Graves' disease)、归-伯二氏综合征(Guillain-Barré syndrome)、红斑狼疮、多发性硬化症、牛皮癣、牛皮癣关节炎、类风湿性关节炎、肉样瘤病、硬皮病、系统性红斑狼疮、移植排斥或血管炎。在另一个方面,所述癌症是前列腺癌、结肠癌、腹部癌、骨癌、乳腺癌、消化系统癌、肝癌、胰腺癌、腹膜癌、内分泌腺癌(肾上腺癌、甲状旁腺癌、垂体瘤、睾丸癌、卵巢癌、胸腺癌、甲状腺癌)、眼癌、头颈癌、神经(中枢和外周)癌、淋巴系统癌、盆腔癌、皮肤癌、软组织癌、脾癌、胸癌或泌尿生殖道癌。在另一个方面,BTLA信号传导是增加的。在另一个方面,所述融合蛋白是BTLA激动

剂。

[0016] 在一个方面,所述融合蛋白包括所述HVEM蛋白的胞外结构域和Fc蛋白。在另一个方面,所述融合蛋白包括SEQ ID NO:2的氨基酸残基39-161和Fc蛋白。在另一个方面,所述Fc蛋白是IgA、IgG、IgD、IgE或IgM。在某些方面,所述Fc蛋白是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在具体的方面,所述IgG Fc蛋白是人的。在一个方面,所述融合蛋白包括在所述HVEM蛋白中的至少一个突变。在另一个方面,所述突变是S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A或其组合。在一个方面,所述融合蛋白进一步包括在所述HVEM蛋白中的至少一个突变,例如S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A或其组合。在另一个方面,所述融合蛋白包括HVEM蛋白质中的至少两个、三个、四个或更多个突变,例如S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A或其组合。在某些方面,所述融合蛋白包括在所述HVEM蛋白中的至少一个突变,如S58R;S58K;S58Q;L70D;L70E;L70N;L90A;S58R和L90A;S58R和G68T;S58R和L70W;S58R、L70D和L90A;S58R、G68T和L90A;S58R、L70W和L90A;S58R、G68T、L70D和L90A;或S58R、G68T、L70W和L90A。

[0017] 在一个方面,所述方法还包括施用免疫响应调节剂或化学治疗剂。在另一个方面,所述免疫响应调节剂是类花生酸类物质、细胞因子、前列腺素、白细胞介素、趋化因子、检查点调节剂、TNF超家族成员、TNF受体超家族成员和/或干扰素。在另一个方面,免疫响应调节剂是CXCL-8、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL11、CXCL10、IL1、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12、IL13、IL15、IL17、IL17、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\epsilon$ 、IFN- $\gamma$ 、G-CSF、TNF- $\alpha$ 、CTLA4、CD20、PD1、PD1L1、PD1L2、ICOS、CD200、CD52、LT $\alpha$ 、LT $\alpha\beta$ 、LIGHT、CD27L、41BBL、FasL、Ox40L、April、TL1A、CD30L、TRAIL、RANKL、BAFF、TWEAK、CD40L、EDA1、EDA2、APP、NGF、TNFR1、TNFR2、LT $\beta$ R、HVEM、CD27、4-1BB、Fas、Ox40、AITR、DR3、CD30、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、BAFFR、TACI、BCMA、Fn14、CD40、EDAR XEDAR、DR6、DcR3、NGFR-p75和/或Taj。在某些方面,所述免疫响应调节剂是托珠单抗(Actemra)、CDP870(Cimzia)、Entercept(Enbrel)、阿达木单抗(Humira)、Kineret、阿巴西普(abatacept)(Orencia)、英夫利昔单抗(类克(Remicade))、利妥昔单抗(美罗华(Rituxan))、戈利木单抗(golimumab)(辛普尼(Simponi))、干扰素 $\beta$ -1a粉针剂(Avonex)、利比(Rebif)、ReciGen、Plegridy、倍泰龙(Betaseron)、醋酸格拉替雷(Copaxone)、Novatrone、那他珠单抗(Tysabri)、芬戈莫德(Gilenya)、特立氟胺(Aubagio)、BG12、Tecfidera和/或阿仑单抗(Campath、Lemtrada)。

[0018] 在另一方面,所述化学治疗剂是放线菌素、阿扎胞苷、硫唑嘌呤、博来霉素、硼替佐米、卡铂、卡培他滨、顺铂、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、阿糖胞苷(Cytarabine)、柔红霉素(Daunorubicin)、多西他赛、去氧氟尿苷、多柔比星(Daunorubicin)、表柔比星、埃坡霉素、依托泊苷、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、伊达比星(Idarubicin)、伊马替尼、伊立替康、二氮环己烷、硫嘌呤、甲氨喋呤、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇、培美曲塞、替尼泊苷、硫鸟嘌呤(Tioguanine)、拓扑替康、戊柔比星(Valrubicin)、长春碱(Vinblastine)、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨、panitumumab、爱必妥(西妥昔单抗(cetuximab))、马妥珠单抗(matuzumab)、IMC-IIIF 8、TheraCIM hR3、狄诺塞麦、阿瓦斯汀(贝伐单抗)、修美乐(阿达木单抗)、赫塞汀(Herceptin)(曲妥单抗(trastuzumab))、类克(Remicade)(英夫利昔单抗(infliximab))、利妥昔单抗、Synagis(帕利珠单抗)、吉妥单抗(Mylotarg)(吉姆单抗奥佐米星(gemtuzumab oxogamicin))、瑞体肤(Raptiva)(依法利珠单抗(efalizumab))、

Tysabri (那他珠单抗)、赛尼哌 (Zenapax) (达昔单抗)、NeutroSpec (Technetium (99mTc) fanolesomab)、托珠单抗 (Actemra)、ProstaScint (铟-111标记的卡罗单抗喷地肽 (Indium-111 labeled Capromab Pendetide))、Bexxar (托西莫单抗)、替伊莫单抗 Zevalin (缀合至钇90的替伊莫单抗 (IDEC-Y2B8) (ibritumomab tiuxetan (IDEC-Y2B8) conjugated to yttrium 90))、Xolair (奥马珠单抗)、美罗华 (利妥昔单抗)、ReoPro (阿昔单抗)、MabCampath (阿仑单抗)、Simulect (巴利昔单抗)、LeukoScan (硫索单抗)、CEA-Scan (阿西莫单抗)、Verluma (nofetumomab)、Panorex (依决洛单抗 (Edrecolomab))、阿仑单抗、CDP 870 和/或那他珠单抗。在一个方面, ERK1/2和/或ZAP70/Syk的磷酸化是减少的。在另一个方面, 总细胞磷酸化和SHP2的磷酸化是经诱导的。

[0019] 在另一个实施方案中, 本发明提供调节受试者中免疫响应的方法, 包括向受试者施用融合蛋白如非天然存在的HVEM蛋白和Fc蛋白, 由此调节免疫响应。在一个方面, 所述融合蛋白是BTLA激动剂。在另一个方面, 所述融合蛋白包括所述HVEM蛋白的胞外结构域和Fc蛋白。在另一个方面, 所述融合蛋白包括在所述HVEM蛋白中的至少一个突变。在又一个方面, 所述突变是S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A或其组合。在又一个方面, 所述融合蛋白进一步包括在所述HVEM蛋白中的至少一个突变, 例如S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A或其组合。在另一个方面, 所述融合蛋白包括HVEM蛋白质中的至少两个、三个、四个或更多个突变, 例如S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A或其组合。在某些方面, 所述融合蛋白包括在所述HVEM蛋白中的至少一个突变, 如S58R; S58K; S58Q; L70D; L70E; L70N; L90A; S58R和L90A; S58R和G68T; S58R和L70W; S58R、L70D和L90A; S58R、G68T和L90A; S58R、L70W和L90A; S58R、G68T、L70D和L90A; 或S58R、G68T、L70W和L90A。在一个方面, 所述Fc蛋白是IgA、IgG、IgD、IgE或IgM。在另一个方面, 所述Fc蛋白是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在具体的方面, 所述IgG Fc蛋白是人的。在一个方面, BTLA信号传导是增加的。在另一个方面, ERK1/2和/或ZAP70/Syk的磷酸化是减少的。在又一个方面, 总细胞磷酸化和SHP2的磷酸化是经诱导的。在另一个方面, 所述受试者患有BTLA相关的疾病或病症。在某些方面, 所述BTLA相关疾病是癌症或自身免疫性疾病或病症。

[0020] 在一个实施方案中, 本发明提供一种调节细胞中BTLA信号传导的方法, 包括将BTLA表达细胞与融合蛋白如非天然存在的HVEM蛋白和Fc蛋白接触, 由此调节BTLA信号传导。在一个方面, BTLA信号传导是增加的。在另一个方面, 所述融合蛋白包括所述HVEM蛋白的胞外结构域和Fc蛋白。在另一个方面, 所述融合蛋白包括在所述HVEM蛋白中的至少一个突变。在另一个方面, 突变是S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A或其组合。在又一个方面, 所述融合蛋白进一步包括在所述HVEM蛋白中的至少一个突变, 例如S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A或其组合。在另一个方面, 所述融合蛋白包括HVEM蛋白质中的至少两个、三个、四个或更多个突变, 例如S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A或其组合。在某些方面, 所述融合蛋白包括在所述HVEM蛋白中的至少一个突变, 如S58R; S58K; S58Q; L70D; L70E; L70N; L90A; S58R和L90A; S58R、L70D和L90A; S58R和G68T; S58R和L70W; S58R、G68T和L90A; S58R、L70W和L90A; S58R、G68T、L70D和L90A; 或S58R、G68T、L70W和L90A。在一个方面, 所述Fc蛋白是IgA、IgG、IgD、IgE或IgM。在另一个方面, 所述Fc蛋白是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在一个具体的方面, 所述IgG Fc蛋白是人的。在一个方面, ERK1/2和/或ZAP70/Syk的磷酸化是减少的。在另一个方面, 总细胞磷酸化和SHP2

的磷酸化是经诱导的。

[0021] 附图简述

[0022] 图1A-1C显示UL144的BTLA结合表面的鉴定。图1A显示人CMV UL144的图像,其指示突变的表面残基。图1B显示所指示的UL144突变体的结合曲线。图1C显示BTLA-Fc结合至UL144蛋白的 $K_d$ 。

[0023] 图2A-2H显示人淋巴瘤中HVEM-配体结合突变体的鉴定。图2A显示人HVEM的图像,其指示突变的表面残基。图2B显示用LIGHT转导的细胞中的HVEM结合。图2C显示用BTLA-Fc转导的细胞中的HVEM结合。图2D显示用CD160-Fc转导的细胞中的HVEM结合。图2E显示LIGHT结合至HVEM突变体蛋白的 $K_d$ 。图2F显示BTLA-Fc结合至HVEM突变体蛋白的 $K_d$ 。图2G显示CD160-Fc结合至HVEM突变体蛋白结合的 $K_d$ 。图2H显示个体DLBCL活检的阵列,每列代表一个DLBCL样品。

[0024] 图3A-3E显示HVEM和UL144结合BTLA的相同表面。图3A显示BTLA的两幅图像。图3B显示注射人HVEM-Fc之后的代表性痕迹。图3C显示注射人CMV UL144-Fc之后的代表性痕迹。图3D显示将用BTLA转导的BJAB细胞与抗BTLA温育,然后用HVEM-Fc染色。图3E显示用BTLA转导、与抗-BTLA温育、然后用人CMV UL144-Fc染色的BJAB细胞。

[0025] 图4A-4C显示CD160限制BTLA的HVEM激活。图4A-4C显示用所指示的HVEM配体转导的并用偶联至具有或不具有Fc蛋白的抗-CD3的微球培养JTA<sub>g</sub>细胞。图4A显示对于磷酸-ERK1/2 (T202/Y204) 染色的细胞。图4B显示对于磷酸-ZAP70/Syk (Y319/Y352) 染色的细胞。图4C显示对于磷酸-酪氨酸染色的细胞。

[0026] 图5A-5B显示选择性BTLA激动剂抑制IL-2信号传导。图5A显示磷酸-JAK1、磷酸-STAT5和肌动蛋白的全细胞提取物的Western印迹。图5B显示标准化至肌动蛋白的条带强度的定量的图。

[0027] 图6A-6C显示从头突变型HVEM抑制ZAP70/Syk激活。图6A-6C显示用HVEM配体转导的、用偶联至具有或不具有Fc蛋白的抗-CD3的微球培养JTA<sub>g</sub>细胞。图6A显示对于磷酸-ERK1/2 (T202/Y204) 的染色。图6B显示对于磷酸-ZAP70/Syk (Y319/Y352) 的染色。图6C显示对于磷酸-SHP2 (Y542) 的染色。

[0028] 图7A-7E显示影响UL144结合至BTLA的突变。图7A显示人HVEM和人CMV UL144的细胞外结构域。图7B显示用野生型或用抗UL144 (2F11) 染色的突变型人CMV UL144转导的293T细胞的直方图。图7C显示用野生型或突变型人CMV UL144或用LIGHT染色的HVEM转导的293T细胞。图7D显示用野生型或突变型人CMV UL144或用BTLA-Fc染色的HVEM转导的293T细胞。图7E显示用野生型或突变型人CMV UL144或用CD160-Fc染色的HVEM转导的293T细胞。

[0029] 图8A-8B显示人淋巴瘤中HVEM-配体结合突变体的鉴定。图8A显示在人FL和DLBCL活检中观察到的TNFRSF14突变(点)的总结。图8B显示用野生型或用抗HVEM染色的突变型人HVEM转导的293T细胞。

[0030] 图9A-9F显示HVEM和UL144结合BTLA的相同表面。图9A显示用抗-BTLA的6F4、J168或MIH26的特异性MFI染色。图9B显示用HVEM-Fc或UL144-Fc的特异性MFI染色。图9C显示用单独的BTLA或者与HVEM或用HVEM-Fc染色的人CMV UL144一起转染的293T细胞。图9D显示用单独的BTLA或者与HVEM或用CMV UL144-Fc染色的人CMV UL144一起转染的293T细胞。图9E显示用以BTLA-Fc染色的HVEM转染的293T细胞。图9F显示用以BTLA-Fc染色的HVEM人CMV

UL144转染的293T细胞。

[0031] 图10A-10B显示CD160限制BTLA的HVEM激活。图10A显示用以抗人BTLA染色(顶部)、抗-人CD160染色(中间)或HVEM-Fc染色然后用物种特异性二级(secondary)染色(底部)的所指示的HVEM配体或对照载体转导的JTA<sub>g</sub>细胞。图10B显示在细胞内染色之前,用偶联至具有或不具有滴定的Fc蛋白的抗-IgM的微球培养的BJAB细胞。

[0032] 图11A-11C显示选择性BTLA激动剂抑制IL-2信号传导。图11A为显示用所指示的Fc蛋白预处理的PBMC中的CD19+B细胞、CD4+和CD8+T细胞,CD3+CD56+细胞、CD56dim和CD56bright NK细胞中CD69表达的百分比的图。图11B显示用滴定的IL-2刺激NK92细胞的Western印迹。图11C显示用滴定的IFN- $\beta$ 刺激的NK92细胞的Western印迹。

[0033] 图12A-12B显示从头突变型HVEM抑制ZAP70/Syk激活。图12A-12B显示用偶联至具有或不具有Fc蛋白的抗-CD3的微球培养用所指示的HVEM配体转导的JTA<sub>g</sub>细胞。图12A显示对于磷酸-NF- $\kappa$ B的染色。图12B显示对于磷酸-酪氨酸的染色。

[0034] 图13A-13G显示多种病原体相关的以及从头生物工程化的HVEM突变蛋白BTLA激动剂抑制T细胞信号传导。将用指示的HVEM配体转导的JTA<sub>g</sub>细胞与偶联至具有或不具有Fc蛋白质的抗-CD3的微球一起培养。图13A-13B显示对于磷酸-ERK1/2 (T202/Y204) 的染色。图13C显示对于磷酸-NF- $\kappa$ B p65 (S529) 的染色。图13D显示对于磷酸-TBK/ITK (Y551/Y511) 的染色。图13E显示对于磷酸-PLC  $\gamma$  1 (Y783) 的染色。图13F显示对于磷酸-ZAP70/Syk (Y319/Y352) 的染色。图13G显示对于磷酸-酪氨酸的染色。

[0035] 图14A-14B显示BTLA激动剂抑制B细胞信号传导。将BJAB细胞与偶联至具有或不具有滴定的Fc蛋白的抗IgM的微球一起培养。图14A显示培养10分钟。图14B显示培养60分钟。

[0036] 图15A-15D显示BTLA激动剂抑制B细胞的干扰素激活。在存在偶联至对照免疫球蛋白或BTLA激动剂融合蛋白的微球的情况下用干扰素- $\beta$ 刺激人B细胞。图15A显示HEM-Fc偶联的微球。图15B显示UL144Fc偶联的微球。图15C显示HVEM<sup>R109w</sup> Fc偶联的微球。图15D显示HVEM<sup>RTWA</sup> Fc偶联的微球。

[0037] 图16A-16B显示选择性BTLA激动剂限制NK细胞中的IL-2信号传导。图16A显示磷酸-JAK1、磷酸-STAT5和肌动蛋白的全细胞提取物的Western印迹。图16B显示标准化至肌动蛋白的条带强度的定量图。

[0038] 图17A-17C显示小鼠HVEM中配体选择性的鉴定。将HVS-Fc突变蛋白质滴定至293T细胞上,所述HVS-Fc突变蛋白质包括阻断结合至LIGHT (BTLA/CD160-sp) 或BTLA和CD160 (LIGHT-sp) 二者的变体。图17A显示用CD160转染的细胞。图17B显示用小鼠BTLA转染的细胞。图17C显示用小鼠LIGHT转染的细胞。

[0039] 图18A-18C显示选择性HVEM-Fc抑制体内皮肤炎症。将小鼠HVEM-Fc突变蛋白腹膜内注射到咪喹莫特(imiquimod)治疗的动物中作为皮肤炎症的模型。图18A显示组织学分析。图18B-18C显示表皮增厚。

[0040] 图19A-19B显示人HVEM的核酸和氨基酸序列。图19A显示人HVEM的核酸序列。图19B显示人HVEM的氨基酸序列。

[0041] 发明详述

[0042] 本发明基于BTLA激动剂融合蛋白调节免疫反应的开创性发现。具体而言,本发明提供结合BTLA增强BTLA信号传导的融合蛋白。本发明进一步提供了用本文所述的BTLA激动



剂融合蛋白治疗癌症以及免疫和炎性疾病和病症的方法。

[0043] 在描述本发明的组合物和方法之前,应理解,本发明不限于所描述的具体组合物、方法和实验条件,因为这样的组合物、方法和条件可变化。还应该理解,这里使用的术语仅仅是为了描述特定实施例的目的,而非意欲为限制性的,因为本发明的范围将仅在所附权利要求中限制。

[0044] 除另有定义外,本文所用的所有技术和科学术语具有与本发明所属技术领域普通技术人员的通常理解的相同含义。尽管与本文所描述的相似或等同的任何方法和材料可用于在本发明的实践或测试中,但现在描述优选的方法和材料。下面给出的定义是为了理解本发明,但决不能认为是取代对本领域普通技术人员所掌握的术语的理解。

[0045] 如在本说明书和所附权利要求中所使用的,除非上下文另有明确说明,否则单数形式“一种”,“一个”和“所述”包括复数指称。因此,例如,对“所述方法”的提及包括本文所描述类型的一个或多个方法和/或步骤,其在阅读本公开等后对于本领域技术人员将变得显而易见。

[0046] 抗体通常是约150,000道尔顿的异四聚体糖蛋白,由两条相同的轻链(L)和两条相同的重链(H)组成。每条轻链通过一个共价二硫键连接至重链,而不同免疫球蛋白亚型的重链之间二硫键的数目不同。每条重链和轻链也具有规则间隔的链内二硫桥。每条重链在一端具有可变结构域( $V_H$ ),随后是多个恒定结构域。每条轻链在一端具有可变结构域( $V_L$ ),另一端具有恒定结构域;所述轻链的恒定结构域与所述重链的第一恒定结构域对齐,并且轻链可变结构域与重链的可变结构域对齐。相信特定的氨基酸残基在轻链和重链可变结构域之间形成界面。每个可变区包括称为互补决定区(CDR)或高变区的三个区段,且可变区的更高度保守的部分称为框架区(FR)。重链和轻链的可变结构域各包括四个FR区,大都采用 $\beta$ -片层构造,由三个CDR连接,其形成环连接,并在一些情况下形成 $\beta$ -片层结构的一部分。每条链中的所述CDR通过FR紧密靠近地保持在一起,并且与来自另一条链的CDR一起促成抗体的抗原结合位点的形成。所述恒定结构域不直接参与抗体与抗原的结合,但展示出多种效应物功能,如抗体参与抗体依赖性细胞的细胞毒性。

[0047] 根据其重链的恒定结构域的氨基酸序列,能够将免疫球蛋白分配到不同的类别。有五种主要类别的免疫球蛋白:IgA、IgD、IgE、IgG和IgM,并且其中一些可进一步分成亚类(亚型),例如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA和IgA2。对应于不同类别的免疫球蛋白的重链恒定结构域分别称为 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 和 $\mu$ 。不同类别的免疫球蛋白的亚基结构和三维构造是已知的。

[0048] 抗体的Fc区是与细胞表面受体和所述补体系统的一些蛋白质相互作用的抗体的尾部区。这个性质允许抗体激活免疫系统。在IgG、IgA和IgD抗体同型中,所述Fc区由两个相同的蛋白质片段组成,其来源于所述抗体的两条重链的第二和第三恒定结构域;IgM和IgE Fc区在每条多肽链中含有三个重链恒定结构域(CH结构域2-4)。IgG的Fc区具有高度保守的N-糖基化位点。所述Fc片段的糖基化对Fc受体介导的活性是必需的。附接于此位点的N-聚糖主要是复合型的核心-岩藻糖基化的二聚体(diantennary)结构。此外,少量的这些N-聚糖还携带二分的GlcNAc和 $\alpha$ -2,6连接的唾液酸残基。

[0049] 如本文中使用的,术语“抗体”是指由至少两个完整抗体以及抗体片段(只要它们显示期望的生物学活性即可)形成的完整单克隆抗体、多克隆抗体、多特异性抗体(如双特异性抗体)。

[0050] “抗体片段”包括完整抗体的一部分,优选所述完整抗体的抗原结合区或可变区。抗体片段的例子包括Fc、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>和Fv片段;双价抗体(diabodies),三价抗体(tribodies)等;线性抗体;单链抗体分子;和由抗体片段形成的多特异性抗体。

[0051] 如本文中使用的,术语“单克隆抗体”是指从基本上同种抗体的群体获得的抗体,即除了可以少量存在的可能天然存在的突变外,包括于该群体的单个抗体是相同的。单克隆抗体是高度特异性的,针对单个抗原位点。此外,每种单克隆抗体针对所述抗原上的单一决定簇。除了它们的特异性之外,所述单克隆抗体的优点在于它们通过杂交瘤培养合成,未被其他免疫球蛋白污染。例如,根据本发明使用的所述单克隆抗体可通过杂交瘤、通过重组DNA方法制成或从噬菌体抗体文库分离。

[0052] 术语“融合分子”和“融合蛋白”可互换使用,并且意指生物活性多肽,如HVEM或其抗体或片段(例如Fc区),具有或不具有其他效应物分子,通常是通过重组、化学的或其他合适方法共价连接(即融合)的蛋白质或肽序列。如果需要,所述融合分子可在一个或几个位点通过肽接头序列融合。或者,可使用所述肽接头来帮助构建融合分子。特别优选的融合分子是融合蛋白。通常融合分子也可包括缀合物分子。

[0053] Fc-融合蛋白(也称为Fc嵌合融合蛋白、Fc-Ig、基于Ig的嵌合融合蛋白和Fc-标签蛋白)由遗传连接至感兴趣的肽或蛋白质的IgG的Fc结构域组成。Fc-融合蛋白已成为有价值的试剂用于体内和体外研究。

[0054] Fc-融合结合伴侣的范围可从单一肽,与细胞表面受体结合后激活的配体,信号传导分子,受体胞外结构域,其在二聚化时被激活或作为用于在蛋白质微阵列中鉴定结合伴侣的诱饵蛋白。

[0055] 所述体内Fc结构域的最有价值的特征之一,是其可显著延长所述感兴趣的蛋白质的血浆半衰期,其用于生物治疗药物,导致改善的治疗功效;已经使Fc-融合蛋白质成为吸引人的生物治疗剂的属性。

[0056] 所述Fc融合蛋白可为包括Fc融合蛋白和药学上可接受的载体赋形剂或载体的药物组合物的一部分。药学上可接受的载体、赋形剂或稳定剂是本领域已知的(Remington's Pharmaceutical Sciences,第16版,Osol, A.编(1980))。可接受的载体、赋形剂或稳定剂在所采用的剂量和浓度下对接受者是无毒性的,并可包括缓冲剂如磷酸(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(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;氯化六甲铵;苯扎氯铵,苄索氯铵;苯酚,丁基或苄基醇;烷基对羟基苯甲酸酯如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;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,如血清白蛋白,明胶或免疫球蛋白;亲水聚合物如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸如甘氨酸,谷氨酰胺,天冬酰胺,组氨酸,精氨酸或赖氨酸;单糖,二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖,甘露糖或糊精;螯合剂如EDTA;糖如蔗糖,甘露糖醇,海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子如钠;金属复合物(例如Zn-蛋白质复合物);和/或非离子表面活性剂如TWEEN™、PLURONICS™或聚乙二醇(PEG)。

[0057] 如本文中使用的,术语“调节免疫响应”是指增强或抑制免疫响应。在一些方面,本发明的所述融合蛋白抑制或降低免疫响应。

[0058] 如本文中使用的,术语“调节BTLA信号传导”是指增加或减少BTLA信号传导。在一些方面,本发明的所述融合蛋白增加BTLA信号传导。

[0059] 如本文中使用的,术语“进行治疗”或“治疗”或“缓和”指治疗性处理,预防疾病的和/或预防的措施,其中目的是预防或减缓(减轻)靶向病理状况或病症。需要治疗的那些包括那些已经患有所述病症的那些,以及容易患有所述病症的人,或其中要预防这种病症的那些。

[0060] 本文使用的术语“治疗剂”包括当向患者或受试者施用能够引起期望的治疗效果的化学化合物或组合物。本发明的治疗剂的一个实例是BTLA激动剂融合蛋白。

[0061] 如本文中使用的,用于治疗疾病的药物的术语“有效量”或“治疗有效量”是这样的量,其可降低疾病的严重程度、降低所述疾病或其治疗有关的一种或多种症状的严重程度、或延迟更严重的症状或更严重的疾病的发作,其在治疗的病况后能够以一些频率发生。关于所述目的,“有效量”可凭经验和常规方式确定。

[0062] 所述治疗剂可通过任何合适的手段施用,包括局部、胃肠外、皮下、腹膜内、肺内、鼻内、静脉内和/或病灶内施用以治疗所述受试者。然而,在示例性实施方案中,配制所述治疗剂用于局部应用,如以液体、乳膏、凝胶、软膏、泡沫喷雾剂等形式。

[0063] 如本文中使用的,术语“BTLA相关病症”或“BTLA相关疾病”是指将受益于用BTLA激动剂融合蛋白的治疗的任何病况。将受益于BTLA激动剂融合蛋白治疗的疾病和病症的例子包括癌症、免疫、自身免疫和炎性疾病和病症。

[0064] 免疫疾病或病症是所述免疫系统的功能障碍。这些疾病可用几种不同的途径表征:通过受影响的免疫系统的组分;通过免疫系统是过度活跃还是不够活跃,以及通过所述病况是先天性的还是后天性的。自身免疫性疾病是由身体对正常存在于体内的物质和组织的异常免疫响应(自身免疫)引起的。对自身免疫疾病的潜在病理生理学的重要理解是全基因组关联扫描(genome wide association scans)的应用,其已经鉴定了自身免疫疾病之间遗传共享的显著程度。

[0065] 自身免疫性疾病包括但不限于,急性播散性脑脊髓炎(ADEM)、艾迪生病(Addison's disease)、无丙种球蛋白血症(Agammaglobulinemia)、斑秃(Alopecia areata)、肌萎缩性侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis)(又称Lou Gehrig病)、强直性脊柱炎(Ankylosing Spondylitis)、抗磷脂综合征(Antiphospholipid syndrome)、抗合成酶综合征(Antisynthetase syndrome)、特应性变态反应(Atopic allergy)、特应性皮炎(Atopic dermatitis)、自身免疫性再生障碍性贫血(Autoimmune aplastic anemia)、自身免疫性心肌病(Autoimmune cardiomyopathy)、自身免疫性肠病(Autoimmune enteropathy)、自身免疫性溶血性贫血(Autoimmune hemolytic anemia)、自身免疫性肝炎(Autoimmune hepatitis)、自身免疫性内耳疾病(Autoimmune inner ear disease)、自身免疫性淋巴组织增生综合征(Autoimmune lymphoproliferative syndrome)、自身免疫性胰腺炎(Autoimmune pancreatitis)、自身免疫性周围神经病(Autoimmune peripheral neuropathy)、自身免疫性多内分泌综合征(Autoimmune polyendocrine syndrome)、自身免疫性黄体酮性皮炎(Autoimmune progesterone dermatitis)、自身免疫性血小板减少性紫癜(Autoimmune thrombocytopenic purpura)、自身免疫性荨麻疹(Autoimmune urticaria)、自身免疫性葡萄膜炎(Autoimmune uveitis)、Balo病/Balo同心硬化症(Balo disease/Balo concentric sclerosis)、Behçet病、Berger病、Bickerstaff脑炎、Blau综合征、大疱性类天疱疮(Bullous pemphigoid)、癌症、Castleman病、乳糜泻(Celiac

disease)、南美锥虫病(Chagas disease)、慢性炎症性脱髓鞘性多发性神经病(Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy)、慢性炎症性脱髓鞘性多神经病、慢性阻塞性肺病(Chronic obstructive pulmonary disease)、慢性复发性多病灶骨髓炎(Chronic recurrent multifocal osteomyelitis)、Churg-Strauss综合征、瘢痕性类天疱疮(Cicatricial pemphigoid)、Cogan综合征、冷凝集素疾病(Cold agglutinin disease)、补体组分2缺陷症、接触性皮炎(Contact dermatitis)、颅骨动脉炎(Cranial arteritis)、CREST综合征、克罗恩氏病(Crohn's disease)、库兴氏综合征(Cushing's Syndrome)、皮肤白细胞碎屑性血管炎(Cutaneous leukocytoclastic angiitis)、德戈氏病(Dego's disease)、Dercum病、疱疹样皮炎(Dermatitis herpetiformis)、皮肌炎(Dermatomyositis)、1型糖尿病(Diabetes mellitus type 1)、弥漫性皮肤系统性硬化症(Diffuse cutaneous systemic sclerosis)、盘状红斑狼疮(Discoid lupus erythematosus)、Dressler's综合征、药物性狼疮(Drug-induced lupus)、湿疹(Eczema)、子宫内膜异位症(Endometriosis)、嗜酸细胞性筋膜炎(Eosinophilic fasciitis)、嗜酸细胞性胃肠炎(Eosinophilic gastroenteritis)、嗜酸细胞性肺炎(Eosinophilic pneumonia)、获得性大疱性表皮松解症(Epidermolysis bullosa acquisita)、结节性红斑(Erythema nodosum)、胎儿红血球母细胞过多症(Erythroblastosis fetalis)、必要的混合冷球蛋白血症(Essential mixed cryoglobulinemia)、Evan综合征、进行性骨性纤维化发育不良(Fibrodysplasia ossificans progressiva)、纤维化肺泡炎(Fibrosing alveolitis)(或特发性肺纤维化(Idiopathic pulmonary fibrosis))、胃炎(Gastritis)、胃肠类天疱疮(Gastrointestinal pemphigoid)、肾小球肾炎(Glomerulonephritis)、古德帕斯丘氏综合征(Goodpasture's syndrome)、移植物抗宿主疾病(graft versus host disease)、格雷夫斯氏病(Graves' disease)、归-伯二氏综合征(Guillain-Barré syndrome)、桥本氏脑炎(Hashimoto's encephalopathy)、桥本氏甲状腺炎(Hashimoto's thyroiditis)、过敏性紫癜(Henoch-Schonlein purpura)、疱疹妊娠又称妊娠类天疱疮(Herpes gestationis aka Gestational Pemphigoid)、化脓性汗腺炎(Hidradenitis suppurativa)、休斯-斯托夫综合征(Hughes-Stovin syndrome)、低丙种球蛋白(Hypogammaglobulinemi)、特发性炎症性脱髓鞘疾病(Idiopathic inflammatory demyelinating diseases)、特发性肺纤维化(Idiopathic pulmonary fibrosis)、特发性血小板减少性紫癜(Idiopathic thrombocytopenic purpura)、IgA肾病(IgA nephropathy)、包涵体肌炎(Inclusion body myositis)、间质性膀胱炎(Interstitial cystitis)、幼年特发性关节炎又称幼年类风湿性关节炎(Juvenile idiopathic arthritis aka Juvenile rheumatoid arthritis)、川崎氏病(Kawasaki's disease)、朗伯-伊顿肌无力症候群(Lambert-Eaton myasthenic syndrome)、白细胞碎屑性血管炎(Leukocytoclastic vasculitis)、扁平苔癣(Lichen planus)、硬化性苔藓(Lichen sclerosus)、线性IgA疾病(Linear IgA disease)、类狼疮肝炎又称是自身免疫性肝炎(Lupoid hepatitis aka Autoimmune hepatitis)、红斑狼疮(Lupus erythematosus)、Majeed综合征、显微镜下结肠炎(Microscopic colitis)、显微镜下多血管炎(Microscopic polyangiitis)、米勒-费希尔综合征(Miller-Fisher syndrome)、混合性结缔组织病(Mixed connective tissue disease)、硬斑病(Morphea)、Mucha-Habermann病又称急性苔

藓痘疮样糠疹 (Pityriasis lichenoides et varioliformis acuta)、多发性硬化症 (Multiple sclerosis)、重症肌无力 (Myasthenia gravis)、肌炎 (Myositis)、梅尼埃病 (Ménière's disease)、嗜睡症 (Narcolepsy)、视神经脊髓炎 (Neuromyelitis optica)、神经性肌强直 (Neuromyotonia)、眼瘢痕性类天疱疮 (Ocular cicatricial pemphigoid)、Opsoclonus myoclonus 综合征、Ord's 甲状腺炎 (Ord's thyroiditis)、复发性风湿病 (Palindromic rheumatism)、PANDAS (与链球菌相关的小儿自身免疫性神经精神疾病 (pediatric autoimmune neuropsychiatric disorders associated with streptococcus))、副肿瘤性小脑变性 (Paraneoplastic cerebellar degeneration)、阵发性睡眠性血红蛋白尿 (PNH) (Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria)、Parry Romberg 综合征、Pars 平滑肌炎 (Pars planitis)、Parsonage-Turner 综合征、寻常型天疱疮 (Pemphigus vulgaris)、周围静脉性脑脊髓炎 (Perivenous encephalomyelitis)、恶性贫血 (Pernicious anaemia)、POEMS 综合征、结节性多动脉炎 (Polyarteritis nodosa)、风湿性多肌痛 (Polymyalgia rheumatica)、多发性肌炎 (Polymyositis)、原发性胆汁性肝硬化 (Primary biliary cirrhosis)、原发性硬化性胆管炎 (Primary sclerosing cholangitis)、进行性炎性神经病 (Progressive inflammatory neuropathy)、牛皮癣 (Psoriasis)、牛皮癣关节炎 (Psoriatic arthritis)、纯红细胞再生障碍 (Pure red cell aplasia)、坏疽性脓皮病 (Pyoderma gangrenosum)、Rasmussen 脑炎 (Rasmussen's encephalitis)、雷诺现象、赖特综合征 (Reiter's syndrome)、复发性多软骨炎 (Relapsing polychondritis)、不宁腿综合征 (Restless leg syndrome)、腹膜后纤维化 (Retroperitoneal fibrosis)、风湿热 (Rheumatic fever)、类风湿性关节炎 (Rheumatoid arthritis)、肉样瘤病 (Sarcoidosis)、精神分裂症 (Schizophrenia)、施密特综合征 (Schmidt syndrome)、Schnitzler 综合征 (Schnitzler syndrome)、巩膜炎 (Scleritis)、硬皮病 (Scleroderma)、血清病 (Serum Sickness)、斯耶格伦氏综合征 (Sjögren's syndrome)、脊柱关节病 (Spondyloarthropathy)、僵人综合征 (stiff person syndrome)、斯提耳氏病 (Still's disease)、亚急性细菌性心内膜炎 (SBE) (Subacute bacterial endocarditis)、苏萨克综合征 (Susac's syndrome)、Sweet's 综合征、Sydenham 舞蹈病 (Sydenham chorea)、交感性眼炎 (Sympathetic ophthalmia)、系统性红斑狼疮 (Systemic lupus erythematosus)、大动脉炎 (Takayasu's arteritis)、颞动脉炎 (Temporal arteritis)、血小板减少症 (Thrombocytopenia)、Tolosa-Hunt 综合征、横贯性脊髓炎 (Transverse myelitis)、溃疡性结肠炎 (Ulcerative colitis)、未分化的脊柱关节病 (Undifferentiated spondyloarthropathy)、荨麻疹脉管炎 (Urticarial vasculitis)、血管炎 (Vasculitis)、白癜风 (Vitiligo)、韦格纳肉芽肿病 (Wegener's granulomatosis)。

[0066] 如本文中使用的,术语“免疫调节剂”是指调节免疫系统的任何治疗剂。免疫调节剂的例子包括类花生酸,细胞因子,前列腺素,白介素,趋化因子,检查点调节因子,TNF超家族成员,TNF受体超家族成员和干扰素。免疫调节剂的具体例子包括PGI<sub>2</sub>、PGE<sub>2</sub>、PGF<sub>2</sub>、CCL14、CCL19、CCL20、CCL21、CCL25、CCL27、CXCL12、CXCL13、CXCL-8、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL11、CXCL10、IL1、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12、IL13、IL15、IL17、IL17、INF- $\alpha$ 、INF- $\beta$ 、INF- $\epsilon$ 、INF- $\gamma$ 、G-CSF、TNF- $\alpha$ 、CTLA、CD20、PD1、PD1L1、PD1L2、ICOS、CD200、CD52、LT $\alpha$ 、LT $\alpha\beta$ 、LIGHT、CD27L、41BBL、FasL、Ox40L、April、TL1A、CD30L、TRAIL、

RANKL、BAFF、TWEAK、CD40L、EDA1、EDA2、APP、NGF、TNFR1、TNFR2、LT $\beta$ R、HVEM、CD27、4-1BB、Fas、Ox40、AITR、DR3、CD30、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、BAFFR、TACI、BCMA、Fn14、CD40、EDAR XEDAR、DR6、DcR3、NGFR-p75和Taj。免疫调节剂的其他例子包括托珠单抗 (Actemra)、CDP870 (Cimzia)、Entercept (Enbrel)、阿达木单抗 (Humira)、Kineret、阿巴西普 (abatcept) (Orencia)、英夫利昔单抗 (infliximab) (类克 (Remicade))、利妥昔单抗 (rituzimab) (美罗华)、戈利木单抗 (golimumab) (欣普尼 (Simponi))、Avonex、利比 (Rebif)、ReciGen、Plegridy、倍泰龙 (Betaseron)、Copaxone (醋酸格拉替雷)、Novatrone、那他珠单抗 (Tysabri)、芬戈莫德 (Gilenya)、特立氟胺 (Aubagio)、BG12、Tecfidera和阿仑单抗 (Campath、Lemtrada)。

[0067] 癌症是涉及具有侵入或传播到身体的其他部位的可能的异常细胞生长的一组疾病。由国家癌症研究所描述的示例性癌症包括：急性淋巴细胞白血病，成人；急性淋巴细胞白血病，儿童期；急性骨髓性白血病，成人；肾上腺皮质癌；肾上腺皮质癌，儿童期；AIDS-有关的淋巴瘤；AIDS-有关的恶性肿瘤；肛门癌；星形细胞瘤，儿童期小脑；星形细胞瘤，儿童期脑；胆管癌，肝外；膀胱癌；膀胱癌，儿童期；骨癌，骨肉瘤/恶性纤维组织细胞瘤；脑干胶质瘤，儿童期；脑肿瘤，成人；脑肿瘤，脑干胶质瘤，儿童期；脑肿瘤，小脑星形细胞瘤，儿童期；脑肿瘤，脑星形细胞瘤/恶性胶质瘤，儿童期；脑肿瘤，室管膜瘤，儿童期；脑肿瘤，成神经管细胞瘤，儿童期；脑肿瘤，幕上原始神经外胚层肿瘤，儿童期；脑肿瘤，视觉通路和下丘脑胶质瘤，儿童期；脑肿瘤，儿童期(其他)；乳腺癌；乳腺癌和怀孕；乳腺癌，儿童期；乳腺癌，男性；支气管性腺瘤/类癌，儿童期；类癌瘤，儿童期；类癌肿瘤，胃肠；癌，肾上腺皮质；癌，胰岛细胞；不明原发性癌；中枢神经系统淋巴瘤，原发 (Primary)；小脑星形细胞瘤，儿童期；脑星形细胞瘤/恶性胶质瘤，儿童期；宫颈癌；儿童期癌症；慢性淋巴细胞性白血病；慢性髓性白血病；慢性骨髓增生性病症；腱鞘的透明细胞肉瘤；结肠癌；结直肠癌，儿童期；皮肤T细胞淋巴瘤；子宫内膜癌；室管膜瘤，儿童期；上皮癌，卵巢；食道癌；食道癌，儿童期；尤因家族的肿瘤；颅外生殖细胞瘤，儿童期；性腺外的生殖细胞肿瘤；肝外胆管癌；眼癌，眼内黑素瘤；眼癌，视网膜母细胞瘤；胆囊癌；胃癌 (Gastric (Stomach) Cancer)；胃癌，儿童期；胃肠类癌肿瘤；生殖细胞肿瘤，颅外，儿童期；生殖细胞肿瘤，性腺外的；生殖细胞肿瘤，卵巢；妊娠滋养细胞肿瘤；神经胶质瘤。儿童期脑干；胶质瘤。儿童期视觉通路和下丘脑；多毛细胞白血病；头颈癌；肝细胞(肝)癌，成人(原发)；肝细胞癌(肝癌)，儿童期(原发)；霍奇金淋巴瘤，成人；霍奇金淋巴瘤，儿童期；霍奇金淋巴瘤在怀孕期间；下咽癌；下丘脑和视神经胶质瘤，儿童期；眼内黑素瘤；胰岛细胞癌(内分泌胰腺)；卡波西肉瘤；肾癌；喉癌；喉癌，儿童期；白血病，急性淋巴细胞白血病，成人；白血病，急性淋巴细胞白血病，儿童期；白血病，急性髓性，成人；白血病，急性髓性，儿童期；白血病，慢性淋巴细胞白血病；白血病，慢性髓性；白血病，多毛细胞；唇和口腔癌；肝癌，成人(原发)；肝癌，儿童期(原发)；肺癌，非小细胞；肺癌，小细胞；性淋巴细胞白血病，成人急性；成性淋巴细胞白血病，儿童期急性；淋巴细胞白血病，慢性；淋巴瘤，AIDS-有关；淋巴瘤，中枢神经系统(原发)；淋巴瘤，皮肤T细胞；淋巴瘤，霍奇金，成人；淋巴瘤，霍奇金；儿童期；淋巴瘤，霍奇金，怀孕期间；淋巴瘤，非霍奇金，成人；淋巴瘤，非霍奇金，儿童期；淋巴瘤，非霍奇金，怀孕期间；淋巴瘤，原发中枢神经系统；巨球蛋白血症，瓦尔登斯特伦；男性乳腺癌；恶性间皮瘤，成人；恶性间皮瘤，儿童期；恶性胸腺瘤；成神经管细胞瘤，儿童期；黑素瘤；黑素瘤，眼内；梅克尔细胞癌；间皮瘤，恶性；转移性鳞状颈癌

有隐匿性原发性;多发性内分泌肿瘤综合征,儿童期;多发性骨髓瘤/浆细胞瘤;蕈样肉芽肿;骨髓增生异常综合征;髓性白血病,慢性;髓性白血病,儿童期急性;骨髓瘤,多发性;骨髓增生性病症,慢性;鼻腔和鼻窦癌;鼻咽癌;鼻咽癌,儿童期;神经母细胞瘤;非霍奇金淋巴瘤,成人;非霍奇金淋巴瘤,儿童期;怀孕期间非霍奇金淋巴瘤;非小细胞肺癌;口腔癌,儿童期;口腔和唇癌;口咽癌;骨肉瘤/骨的恶性纤维组织细胞瘤;卵巢癌,儿童期;卵巢上皮癌;卵巢生殖细胞肿瘤;卵巢低恶性潜在肿瘤;胰腺癌;胰腺癌,儿童期,胰腺癌,胰岛细胞;鼻窦和鼻腔癌;甲状旁腺癌;阴茎癌;嗜铬细胞瘤;松果体和幕上原始神经外胚层肿瘤,儿童期;垂体瘤;浆细胞瘤/多发性骨髓瘤;胸膜肺母细胞瘤;怀孕和乳腺癌;怀孕和霍奇金淋巴瘤;怀孕和非霍奇金淋巴瘤;原发性中枢神经系统淋巴瘤;原发性肝癌,成人;原发性肝癌,儿童期;前列腺癌;直肠癌;肾细胞(肾)癌;肾细胞癌,儿童期;肾盂和输尿管,移行细胞癌;视网膜母细胞瘤;横纹肌肉瘤,儿童期;唾液腺癌;唾液腺癌,儿童期;肉瘤,尤因家族的肿瘤;肉瘤,卡波西;肉瘤(骨肉瘤)/骨的恶性纤维组织细胞瘤;肉瘤,横纹肌肉瘤,儿童期;肉瘤,软组织,成人;肉瘤,软组织,儿童期;塞扎里综合征;皮肤癌(Skin Cancer);皮肤癌,儿童期;皮肤癌(黑素瘤);皮肤癌瘤(Skin Carcinoma),默克尔细胞;小细胞肺癌;小肠癌;软组织肉瘤,成人;软组织肉瘤,儿童期;鳞状颈癌有隐匿性原发性,转移性;胃癌;胃癌,儿童期;幕上原始神经外胚层肿瘤,儿童期;T细胞淋巴瘤,皮肤;睾丸癌;胸腺瘤,儿童期;胸腺瘤,恶性;甲状腺癌;甲状腺癌,儿童期;肾盂和输尿管的移行细胞癌;滋养细胞肿瘤,妊娠;未知原发位点,的癌症、儿童期;儿童期不常见癌症;输尿管和肾盂,移行细胞癌;尿道癌;子宫肉瘤;阴道癌;视觉通路与下丘脑胶质瘤,儿童期;外阴癌;瓦尔登斯特伦的巨球蛋白血症(Waldenstrom's Macro globulinemia);和维尔姆斯瘤。

[0068] 如本文中使用的,术语“化学治疗剂”是指用于治疗癌症的任何治疗剂。化疗剂的例子包括但不限于放线菌素、阿扎胞苷、硫唑嘌呤、博来霉素、硼替佐米、卡铂、卡培他滨、顺铂、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、阿糖胞苷(Cytarabine)、柔红霉素(Daunorubicin)、多西他塞、去氧氟尿苷、多柔比星(Daunorubicin)、表柔比星、埃坡霉素、依托泊苷、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、伊达比星(Idarubicin)、伊马替尼、伊立替康、二氮环己烷、巯嘌呤、甲氨喋呤、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇、培美曲塞、替尼泊苷、硫鸟嘌呤(Tioguanine)、拓扑替康、戊柔比星(Valrubicin)、长春碱(Vinblastine)、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨、panitumumab、爱必妥(西妥昔单抗(cetuximab))、马妥珠单抗(matuzumab)、IMC-IIIF 8、TheraCIM hR3、狄诺塞麦、阿瓦斯汀(贝伐单抗)、修美乐(阿达木单抗)、赫塞汀(Herceptin)(曲妥单抗(trastuzumab))、类克(Remicade)(英夫利昔单抗(infliximab))、利妥昔单抗、Synagis(帕利珠单抗)、吉妥单抗(MyloTarg)(吉姆单抗奥佐米星(gemtuzumab oxogamicin))、瑞体肤(Raptiva)(依法利珠单抗(efalizumab))、Tysabri(那他珠单抗)、赛尼哌(Zenapax)(达昔单抗)、NeutroSpec(锝(99mTc) fanolesomab)、托珠单抗(Actemra)、ProstaScint(铟-111标记的卡罗单抗喷地肽(Indium-111 labeled Capromab Pendetide))、Bexxar(托西莫单抗)、替伊莫单抗Zevalin(缀合至钇90的替伊莫单抗(IDEC-Y2B8)(ibritumomab tiuxetan(IDEC-Y2B8) conjugated to yttrium 90))、Xolair(奥马珠单抗)、美罗华(利妥昔单抗)、ReoPro(阿昔单抗)、MabCampath(阿仑单抗)、Simulect(巴利昔单抗)、LeukoScan(硫索单抗)、CEA-Scan(阿西莫单抗)、Verluma(nofetumomab)、Panorex(依决洛单抗(Edrecolomab))、阿仑单抗、CDP 870和那他珠单抗。

[0069] 例如,本发明的融合蛋白可与免疫调节剂或化学治疗剂组合使用。用本发明的融合蛋白进行的治疗包括在其他治疗(例如免疫调节剂或化学治疗剂)的之前、之后或基本上同时进行。

[0070] 所述免疫系统是生物体内防止疾病的生物结构和过程的一种系统。所述系统是一个相互作用的细胞、细胞产物和细胞形成组织的弥散性复杂网络,该系统保护身体免受病原体和其他外来物质,破坏感染的和恶性的细胞,并去除细胞碎片:所述系统包括胸腺、脾脏、淋巴结和淋巴组织、干细胞、白细胞、抗体和淋巴因子。B细胞或B淋巴细胞是在适应性免疫系统的体液免疫中的一种淋巴细胞,对免疫监视非常重要。T细胞或T淋巴细胞是在细胞介导的免疫中起中心作用的一种淋巴细胞。存在两种主要的T细胞亚型:杀伤T细胞和辅助性T细胞。此外,存在在调节免疫响应中起作用的抑制性T细胞。杀伤T细胞仅识别与I类MHC分子偶联的抗原,而辅助性T细胞仅识别与II类MHC分子偶联的抗原。这两种抗原呈递机制反映了两个类型的T细胞的不同作用。第三个次要亚型是 $\gamma\delta$ T细胞,其识别不与MHC受体结合的完整抗原。相反,所述B细胞抗原特异性受体是B细胞表面上的抗体分子,并识别完整的病原体而不需要抗原加工。B细胞的各谱系表达不同的抗体,因此B细胞抗原受体的完整组代表身体能够制造的所有抗体。

[0071] B和T细胞弱化物(BTLA或CD272)是免疫系统的组成部分。BTLA表达在T细胞激活期间被诱导,并且BTLA保持在Th1细胞而非Th2细胞上表达。像程序性细胞死亡1(PD1)和细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(CTLA4)一样,BTLA激活抑制途径,调节T细胞激活。然而,与PD-1和CTLA-4不同,BTLA通过与肿瘤坏死因子受体(TNF-R)而非B7细胞表面受体家族相互作用而显示T细胞抑制。BTLA是肿瘤坏死因子(受体)超家族的配体,成员14(TNFRSF14),也称为疱疹病毒进入介体(HVEM)。BTLA-HVEM复合物负向调节T细胞免疫响应。

[0072] 肿瘤坏死因子受体超家族成员(TNFRSF)疱疹病毒进入介体(HVEM)(TNFRSF14)结合标准的TNF相关配体、淋巴毒素- $\alpha$ (LT- $\alpha$ )和LIGHT;然而,HVEM的区别特征是免疫球蛋白超家族的成员,B和T淋巴细胞弱化物(BTLA)和CD160的接合。HVEM以不同构造与多个配体相互作用的能力产生功能上多种多样的一组内在和双向信号传导途径。结合这些不同配体的能力存在于HVEM胞外域的两个不同的拓扑区中。这些不同的位点赋予HVEM激活促炎症途径和抑制途径的能力。由于HVEM在几个信号传导途径中的连接处,其在免疫系统中起重要作用并不令人惊讶,如T细胞共刺激、树突状细胞(DC)稳态的调节、自身免疫介导的炎症反应以及宿主防御病原体。HVEM也可在免疫系统之外,在感觉神经元发育和脂肪细胞代谢的调节中起重要作用。所述人HVEM蛋白质具有283个氨基酸(SEQ ID NO:2)。所述细胞外结构域包括164个氨基酸残基,例如氨基酸39-202。本发明的融合蛋白包括HVEM蛋白(SEQ ID NO:2)的至少10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、110、120、130、140、150、160、170、180、190或更多的残基。例如,本发明的融合蛋白可包括HVEM蛋白(SEQ ID NO:2)的氨基酸残基1-283、1-202、1-184、1-161、39-202或39-161。

[0073] 如本文中使用的,术语“非天然存在的HVEM蛋白”是指含有至少一个或多个突变的HVEM蛋白(SEQ ID NO:2,图19B)。本发明的融合蛋白包括至少一个突变,例如S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A或其组合。本发明的融合蛋白包括在所述HVEM蛋白中的至少一个另外的突变,例如S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A或其组合。本发明的融合蛋白可包括HVEM蛋白质中的至少两个、三个、四个或更多个突变,例如



S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A或其组合。本发明的融合蛋白包括HVEM蛋白中的至少一个突变,如S58R;S58K;S58Q;G68T;L70D;L70E;L70N;L70W;L90A;S58R和L90A;S58R、L70D和L90A;S58R、G68T和L90A;S58R、L70W和L90A;S58R、G68T、L70D和L90A;或S58R、G68T、L70W和L90A。

[0074] BTLA使用不同的表面与HVEM相互作用。BTLA/HVEM途径在维持免疫耐受和预防自身免疫性疾病中起着重要的作用。BTLA缺陷小鼠患类风湿性关节炎、淋巴细胞浸润、自身免疫性肝炎(AIH)样疾病和EAE。HVEM缺陷小鼠显示对于MOG肽诱导的EAE增加的易感性和增加的T细胞增殖和细胞因子产生。拮抗性HVEM-Ig加剧DBA1本底小鼠上在胶原诱导的关节炎中的自身免疫性。因此,在激活的T细胞中强制表达BTLA会是用于治疗自身免疫性疾病的有希望的策略。

[0075] 关于肿瘤免疫性,肿瘤抗原特异性CD8<sup>+</sup>T细胞看起来持续表达BTLA。已经报道,CpG免疫接种部分下调肿瘤抗原特异性CD8<sup>+</sup>T细胞中BTLA的表达并阻断BTLA/HVEM介导的抑制信号。尽管阻断BTLA/HVEM途径看起来作为增强效应物T细胞功能的手段而相关,但应当小心注意HVEM相互作用分子的复杂性。一种IgSF抑制性受体CD160也结合HVEM。另外,TNF家族成员LIGHT在与HVEM接合时递送共刺激信号。这些多种途径使我们难以建立对于恶性肿瘤新的治疗干预。

[0076] BTLA/HVEM途径的操纵可成为治疗感染患者的有希望的策略。BTLA在鼠中在伯氏疟原虫ANKA(P.berghei ANKA)感染期间被诱导,并且抗BTLA拮抗性单抗显著降低由原生动物引起的脑型疟疾的发病率。因此,干扰BTLA/HVEM途径的病原体可代表抗BTLA单抗免疫治疗的理想靶标。

[0077] 抑制性受体信号传导的成功激活取决于受体激动剂接合以激活状态的抑制性受体构型(与激活的受体-配体构型相似)的能力。抗体形式的受体激动剂将接合抑制性受体(如B和T淋巴细胞弱化剂(BTLA))的特定表位,所述抑制性受体可促进这种激活构型,导致增强的BTLA信号传导。这些抗体的表位不会与BTLA受体疱疹病毒进入介体(HVEM)的结合位点重叠。这些抗体会通过激活BTLA细胞质结构域的磷酸化,以及招募和磷酸化相关蛋白(包括SHP1和2)、作为激活标记的招募到BTLA的胞质结构域中的其他信号蛋白而起作用以增强信号传导。预测BTLA的抑制性信号传导下游的激活负调节T细胞中T细胞受体和B细胞中B细胞受体下游的正常信号转导途径。另外,BTLA抑制性信号传导负向调节先天细胞如 $\gamma\delta$ T细胞和自然杀伤(NK)细胞中的IL-7和I型干扰素细胞因子信号传导。

[0078]  $\beta$ -疱疹病毒巨细胞病毒(CMV)贡献其大部分基因组以逃避宿主免疫响应,并且这些基因中的许多随着病毒朝建立潜伏感染进展而被施用。CMV表达HVEM模拟物(ORF UL144),其结合BTLA并比HVEM更大程度地抑制T细胞增殖。最近显示UL144不结合HVEM受体CD160,避免NK细胞激活。细胞溶解细胞(cytolytic cells)的激活在对癌症的免疫响应中也是关键的,并且在免疫识别途径中具有突变的肿瘤与更具侵袭性的肿瘤生长和死亡相关。在人滤泡性淋巴瘤(FL)中,最常见的继发性突变发生在TNFRSF14中,而在弥漫性大B细胞淋巴瘤(DLBCL)中,TNFRSF14也经常突变,导致基因缺失或表达损失。然而,在淋巴瘤的一个亚组中,预测几个突变影响HVEM配体结合。目前还不清楚这些突变或改变的配体相互作用可如何影响肿瘤微环境内的淋巴瘤健康。

[0079] 与病毒UL144蛋白相似,几个淋巴瘤HVEM突变体显示针对BTLA而不结合CD160的配

体选择。CD160的表达阻碍野生型HVEM与BTLA的接合和T细胞受体信号传导的抑制。相比之下,由病毒和突变型HVEM触发的BTLA激活不受CD160表达的阻碍。最后,发现激活BTLA在表达CD160的NK细胞中抑制转录(STAT)磷酸化的激活剂和细胞因子诱导的信号转导物,并且所述病毒UL144蛋白比野生型HVEM更有力地抑制细胞因子信号传导。因此,配体竞争阻碍HVEM一致地接合抑制性信号,而配体选择性使得病毒和突变型HVEM能够驱动独特的抑制功能,指示了朝向开发BTLA选择性激动剂的途径。总之,这些数据指示在淋巴瘤中针对CMV中UL144的进化和体细胞TNFRSF14突变的获得的潜在的选择性压力,促进抑制性并限制感染和癌症中的炎症信号传导。

[0080] 在一个实施方案中,本发明提供包括非天然存在的HVEM蛋白和Fc蛋白的融合蛋白,其中所述融合蛋白包括所述HVEM蛋白的胞外结构域和Fc蛋白。在一个方面,所述融合蛋白是BTLA激动剂。在另一个方面,所述融合蛋白包括在所述HVEM蛋白中的至少一个突变。在又一个方面,所述突变是S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A或其组合。在一个方面,所述融合蛋白进一步包括在所述HVEM蛋白中的至少一个突变,例如S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A或其组合。在另一个方面,所述融合蛋白包括在所述HVEM蛋白质中的至少两个、三个、四个或更多个突变,例如S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A或其组合。在某些方面,所述融合蛋白包括在所述HVEM蛋白中的至少一个突变,如S58R;S58K;S58Q;L70D;L70E;L70N;L90A;S58R和L90A;S58R和G68T;S58R和L70W;S58R、L70D和L90A;S58R、G68T和L90A;S58R、L70W和L90A;S58R、G68T、L70D和L90A;或S58R、G68T、L70W和L90A。在一个方面,所述Fc蛋白是IgA、IgG、IgD、IgE或IgM。在另一个方面,所述Fc蛋白是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在一个具体的方面,所述IgG Fc蛋白是人的。

[0081] 在又一个实施方案中,本发明提供包括融合蛋白(如非天然存在的HVEM蛋白和Fc蛋白)以及药学上可接受的载体的药物组合物。在一个方面,所述融合蛋白是BTLA激动剂。在另一个方面,所述融合蛋白包括所述HVEM蛋白的胞外结构域和Fc蛋白。在另一个方面,所述融合蛋白包括在所述HVEM蛋白中的至少一个突变。在另一个方面,所述突变是S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A或其组合。在又一个方面,所述融合蛋白进一步包括在所述HVEM蛋白质中的至少一个突变,例如S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A或其组合。在另一个方面,所述融合蛋白包括在所述HVEM蛋白质中的至少两个、三个、四个或更多个突变,例如S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A或其组合。在某些方面,所述融合蛋白包括在所述HVEM蛋白中的至少一个突变,如S58R;S58K;S58Q;L70D;L70E;L70N;L90A;S58R和L90A;S58R和G68T;S58R和L70W;S58R、L70D和L90A;S58R、G68T和L90A;S58R、L70W和L90A;S58R、G68T、L70D和L90A;或S58R、G68T、L70W和L90A。在一个方面,所述Fc蛋白是IgA、IgG、IgD、IgE或IgM。在另一个方面,所述Fc蛋白是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在一个具体的方面,所述IgG Fc蛋白是人的。

[0082] 在一个实施方案中,本发明提供一种治疗BTLA相关病症的方法,其包括将融合蛋白如非天然存在的HVEM蛋白和Fc蛋白施用于需要其的受试者,由此治疗所述BTLA相关病症。在一个方面,所述BTLA相关病症是癌症或自身免疫性疾病或病症。在又一方面,所述自身免疫性疾病或病症是阿狄森氏病(Addison's disease)、肌萎缩性侧索硬化症(amyotrophic lateral sclerosis)、克罗恩氏病(Crohn's disease)、库兴氏综合征(Cushing's Syndrome)、1型糖尿病、移植物抗宿主病、格雷夫斯氏病(Graves' disease)、归-

伯二氏综合征 (Guillain-Barrésyndrome)、红斑狼疮、多发性硬化症、牛皮癣、牛皮癣关节炎、类风湿性关节炎、肉样瘤病、硬皮病、系统性红斑狼疮、移植排斥或血管炎。在另一个方面,所述癌症是前列腺癌、结肠癌、腹部癌、骨癌、乳腺癌、消化系统癌、肝癌、胰腺癌、腹膜癌、内分泌腺癌(肾上腺癌、甲状旁腺癌、垂体癌、睾丸癌、卵巢癌、胸腺癌、甲状腺癌)、眼癌、头颈癌、神经(中枢神经和周围神经)癌、淋巴系统癌、盆腔癌、皮肤癌、软组织癌、脾癌、胸癌或泌尿生殖道癌。在另一个方面,BTLA信号传导是增加的。在另一个方面,所述融合蛋白是BTLA激动剂。

[0083] 在一个方面,所述融合蛋白包括所述HVEM蛋白的胞外结构域和Fc蛋白。在另一个方面,所述融合蛋白包括SEQ ID NO:2的氨基酸残基39-161和Fc蛋白。在另一个方面,所述Fc蛋白是IgA、IgG、IgD、IgE或IgM。在某些方面,所述Fc蛋白是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在一个具体的方面,所述IgG Fc蛋白是人的。在一个方面,所述融合蛋白包括在所述HVEM蛋白中的至少一个突变。在另一个方面,所述突变是S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A或其组合。在一个方面,所述融合蛋白进一步包括在所述HVEM蛋白中的至少一个突变,例如S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A或其组合。在另一个方面,所述融合蛋白包括在所述HVEM蛋白质中的至少两个、三个、四个或更多个突变,例如S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A或其组合。在某些方面,所述融合蛋白包括在所述HVEM蛋白中的至少一个突变,如S58R;S58K;S58Q;L70D;L70E;L70N;L90A;S58R和L90A;S58R和G68T;S58R和L70W;S58R、L70D和L90A;S58R、G68T和L90A;S58R、L70W和L90A;S58R、G68T、L70D和L90A;或S58R、G68T、L70W和L90A。

[0084] 在一个方面,该方法还包括施用免疫响应调节剂或化学治疗剂。在另一个方面,所述免疫响应调节剂是类花生酸类物质、细胞因子、前列腺素、白细胞介素、趋化因子、检查点调节剂、TNF超家族成员、TNF受体超家族成员和/或干扰素。在又一个方面,免疫响应调节剂是CXCL-8、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL11、CXCL10、IL1、IL2、IL3、IL4、IL5、IL6、IL7、IL8、IL9、IL10、IL11、IL12、IL13、IL15、IL17、IL17、IFN- $\alpha$ 、IFN- $\beta$ 、IFN- $\epsilon$ 、IFN- $\gamma$ 、G-CSF、TNF- $\alpha$ 、CTLA4、CD20、PD1、PD1L1、PD1L2、ICOS、CD200、CD52、LT $\alpha$ 、LT $\alpha\beta$ 、LIGHT、CD27L、41BBL、FasL、Ox40L、April、TL1A、CD30L、TRAIL、RANKL、BAFF、TWEAK、CD40L、EDA1、EDA2、APP、NGF、TNFR1、TNFR2、LT $\beta$ R、HVEM、CD27、4-1BB、Fas、Ox40、AITR、DR3、CD30、TRAIL-R1、TRAIL-R2、TRAIL-R3、TRAIL-R4、RANK、BAFFR、TACI、BCMA、Fn14、CD40、EDAR、XEDAR、DR6、DcR3、NGFR-p75和/或Taj。在某些方面,所述免疫响应调节剂是托珠单抗 (Actemra)、CDP870 (Cimzia)、Entercept (Enbrel)、阿达木单抗 (Humira)、Kineret、阿巴西普 (abatacept) (Orencia)、英夫利昔单抗 (infliximab) (类克 (Remicade))、利妥昔单抗 (美罗华)、戈利木单抗 (golimumab) (Simponi)、Avonex、利比 (Rebif)、ReciGen、Plegridy、倍泰龙 (Betaseron)、Copaxone (醋酸格拉替雷)、Novatrone、那他珠单抗 (Tysabri)、芬戈莫德 (Gilenya)、特立氟胺 (Aubagio)、BG12、Tecfidera和/或阿仑单抗 (Campath、Lemtrada)。

[0085] 另一方面,化学治疗剂是放线菌素、阿扎胞苷、硫唑嘌呤、博来霉素、硼替佐米、卡铂、卡培他滨、顺铂、苯丁酸氮芥、环磷酰胺、阿糖胞苷 (Cytarabine)、柔红霉素 (Daunorubicin)、多西他塞、去氧氟尿苷、多柔比星 (Daunorubicin)、表柔比星、埃坡霉素、依托泊苷、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、伊达比星 (Idarubicin)、伊马替尼、伊立替康、二氮环己烷、硫嘌呤、甲氨喋呤、米托蒽醌、奥沙利铂、紫杉醇、培美曲塞、替尼泊苷、硫鸟嘌呤

(Tioguanine)、拓扑替康、戊柔比星 (Valrubicin)、长春碱 (Vinblastine)、长春新碱、长春地辛、长春瑞滨、帕尼单抗 (panitumumab)、爱必妥 (西妥昔单抗 (cetuximab))、马妥珠单抗 (matuzumab)、IMC-IIIF 8、TheraCIM hr3、狄诺塞麦、阿瓦斯汀 (贝伐单抗)、修美乐 (阿达木单抗)、赫塞汀 (Herceptin) (曲妥单抗 (trastuzumab))、类克 (Remicade) (英夫利昔单抗 (infliximab))、利妥昔单抗、Synagis (帕利珠单抗)、吉妥单抗 (Mylotarg) (吉姆单抗奥佐米星 (gemtuzumab oxogamicin))、瑞体肤 (Raptiva) (依法利珠单抗 (efalizumab))、Tysabri (那他珠单抗)、赛尼哌 (Zenapax) (达昔单抗)、NeutroSpec (锝 (99mTc) 法索单抗 (fanolesomab))、托珠单抗 (Actemra)、ProstaScint (铟-III 标记的卡罗单抗喷地肽 (Indium-III labeled Capromab Pendetide))、Bexxar (托西莫单抗)、Zevalin (缀合至钇 90 的替伊莫单抗 (IDEC-Y2B8) (ibritumomab tiuxetan (IDEC-Y2B8) conjugated to yttrium 90))、Xolair (奥马珠单抗)、美罗华 (利妥昔单抗)、ReoPro (阿昔单抗)、MabCampath (阿仑单抗)、Simulect (巴利昔单抗)、LeukoScan (硫索单抗)、CEA-Scan (阿西莫单抗)、Verluma (诺莫单抗 (nofetumomab))、Panorex (依决洛单抗 (Edrecolomab))、阿仑单抗、CDP 870 和/或那他珠单抗。在一个方面, ERK1/2 和/或 ZAP70/Syk 的磷酸化是减少的。在另一个方面, 总细胞磷酸化和 SHP2 的磷酸化是经诱导的。

[0086] 在进一步的实施方案中, 本发明提供一种调节受试者中免疫响应的方法, 包括将融合蛋白 (如非天然存在的 HVEM 蛋白和 Fc 蛋白) 施用于所述受试者, 由此调节所述免疫响应。在一个方面, 所述融合蛋白是 BTLA 激动剂。在另一个方面, 所述融合蛋白包括所述 HVEM 蛋白的胞外结构域和 Fc 蛋白。在另一个方面, 所述融合蛋白包括在所述 HVEM 蛋白中的至少一个突变。在又一个方面, 所述突变是 S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A 或其组合。在又一个方面, 所述融合蛋白进一步包括在所述 HVEM 蛋白中的至少一个突变, 例如 S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A 或其组合。在另一个方面, 所述融合蛋白包括所述 HVEM 蛋白质中的至少两个、三个、四个或更多个突变, 例如 S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A 或其组合。在某些方面, 所述融合蛋白包括在所述 HVEM 蛋白中的至少一个突变, 如 S58R; S58K; S58Q; L70D; L70E; L70N; L90A; S58R 和 L90A; S58R 和 G68T; S58R 和 L70W; S58R、L70D 和 L90A; S58R、G68T 和 L90A; S58R、L70W 和 L90A; S58R、G68T、L70D 和 L90A; 或 S58R、G68T、L70W 和 L90A。在一个方面, 所述 Fc 蛋白是 IgA、IgG、IgD、IgE 或 IgM。在另一个方面, 所述 Fc 蛋白是 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4。在具体的方面, 所述 IgG Fc 蛋白是人的。在一个方面, BTLA 信号传导是增加的。在另一个方面, ERK1/2 和/或 ZAP70/Syk 的磷酸化是减少的。在又一个方面, 总细胞磷酸化和 SHP2 的磷酸化是经诱导的。在另一个方面, 所述受试者患有 BTLA 相关的疾病或病症。在某些方面, 所述 BTLA 相关疾病是癌症或自身免疫性疾病或病症。

[0087] 在一个实施方案中, 本发明提供一种调节细胞中 BTLA 信号传导的方法, 包括将 BTLA 表达细胞与融合蛋白 (如非天然存在的 HVEM 蛋白和 Fc 蛋白) 接触, 由此调节 BTLA 信号传导。在一方面, BTLA 信号传导是增加的。在另一个方面, 所述融合蛋白包括所述 HVEM 蛋白的胞外结构域和 Fc 蛋白。在另一个方面, 所述融合蛋白包括在所述 HVEM 蛋白中的至少一个突变。在另一个方面, 所述突变是 S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A 或其组合。在又一个方面, 所述融合蛋白进一步包括在所述 HVEM 蛋白中的至少一个突变, 例如 S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A 或其组合。在另一个方面, 所述融合蛋

白中包括所述HVEM蛋白质中的至少两个、三个、四个或更多个突变,例如S58R、S58K、S58Q、G68T、L70D、L70E、L70N、L70W、L90A或其组合。在某些方面,所述融合蛋白包括在所述HVEM蛋白中的至少一个突变,如S58R;S58K;S58Q;L70D;L70E;L70N;L90A;S58R和L90A;S58R和G68T;S58R和L70W;S58R、L70D和L90A;S58R、G68T和L90A;S58R、L70W和L90A;S58R、G68T、L70D和L90A;或S58R、G68T、L70W和L90A。在一个方面,所述Fc蛋白是IgA、IgG、IgD、IgE或IgM。在另一个方面,所述Fc蛋白是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4。在具体的方面,所述IgG Fc蛋白是人的。在一个方面,ERK1/2和/或ZAP70/Syk的磷酸化是减少的。在另一个方面,总细胞磷酸化和SHP2的磷酸化是经诱导的。

[0088] 在以下实施例中进一步说明了本发明的所有方面。然而,这些实施例并不限制本发明的范围,其由所附权利要求限定。

## 实施例

### [0089] 实施例1

[0090] 需要与HVEM同源的UL144残基用于结合至BTLA

[0091] 人CMV编码的UL144选择性结合BTLA而非CD160,并且比HVEM蛋白质更大程度地抑制由T细胞受体信号传导激活的T细胞增殖。为了确定由UL144对BTLA的选择是否由这两种蛋白质的表面之间的独特相互作用引起,UL144的BTLA接触表面的结构是在先前解析的HVEM-BTLA共晶(图1A)上建模的。接着,靶向通过丙氨酸-和同源性扫描诱变从HVEM发散以筛选潜在的BTLA结合表面的UL144表面残基(图1A-1C)。观察到几个UL144残基中的突变破坏或减少BTLA的结合,其定义了以所述CRD1区域的一个面上为中心的表面,所述面与HVEM的BTLA结合表面相似。被验证为表面表达的最关键的突变发生在Gly41和Tyr42,与HVEM中的Gly60和Tyr61同源(图7A-7E)。虽然所述G46K和N61A突变体增强了与BTLA的结合,UL144中的同源性扫描突变无一揭示结合至CD160或至TNFSF配体LIGHT的额外配体(图1B,图1C和图7A-7E)。因此,没有单个突变恢复CD160结合至UL144蛋白,指示CMV可能进化了UL144以通过多种遗传修饰来选择BTLA结合。特异的残基影响BTLA结合:Glu<sup>27</sup>、Gln<sup>33</sup>、Pro<sup>36</sup>、Gly<sup>41</sup>、Tyr<sup>42</sup>、Thr<sup>52</sup>、Leu<sup>68</sup>看起来是必须的;Arg<sup>43</sup>、Thr<sup>45</sup>已经降低了结合;Asn<sup>32</sup>、Gln<sup>47</sup>、Gly<sup>49</sup>、Gln<sup>50</sup>看起来不具有效果;Gly<sup>46</sup>、Asn<sup>61</sup>增加结合。

[0092] 细胞和表面蛋白表达:将EL4和293T细胞维持在具有10%热灭活的FBS、抗生素、L-谷氨酰胺和50μM 2-ME的DMEM中。将NK92细胞维持在含有8%热灭活FBS、8%马血清、抗生素、L-谷氨酰胺和补充有100U/ml IL-2的50μM 2-ME的RPMI中。将BJAB和JurkatTAJ(JTAJ)细胞维持在含有10%热灭活的FBS、抗生素、L-谷氨酰胺和50μM 2-ME的RPMI中。对用含有野生型和突变型人BTLA的逆转录病毒转导的EL4细胞和BJAB细胞(Watanabe等(2003);Nat Immunol 4:670)进行分选用于GFP表达以增加表达BTLA的细胞的频率。如先前所述通过共转染逆转录病毒质粒、pCG VSVg包膜蛋白和Hit60 gag-pol产生假型单一感染逆转录病毒(Sedy等(2005),Nat Immunol 6:90)。通过环球PCR(round-the-world PCR)诱变产生UL144和BTLA突变体。使用以含有突变型或野生型UL144的pND载体通过磷酸钙转染转导的293T细胞用于Fc结合研究。用于PCR扩增和定点诱变的所有寡核苷酸列于表1中。对于在JTAJ中HVEM配体的瞬时表达,使用T820方波电穿孔仪(electroporator)将细胞用10μg所指示的DNA构建体及对照载体在230V电穿孔65ms。

[0093] 抗体和Fc融合蛋白:抗人HVEM来自BD生物科学(BD Biosciences)。抗人BTLA抗体克隆MIH26和J168获自e生物科学(eBioscience)和BD生物科学。如之前所描述(Cheung等(2005), Proc Natl Acad Sci 102:11318; Cheung等(2009a), J Immunol 183:7286)产生抗人BTLA克隆6F4和抗UL144克隆2F11。驴抗人Fc $\gamma$ 和抗Fc $\mu$ F(ab')<sub>2</sub>来自杰克逊免疫研究(Jackson Immunoresearch)。鉴定人PBMC群体的抗体包括CD19 FITC, CD56 PE-Cy7、CD8PE、CD3 PE 610、CD4 eFluor450和CD69 PerCP-Cy5.5。磷酸-特异性抗体包括磷酸-酪氨酸PE, 磷酸-Akt (S473) PE和磷酸-SHP-2 (Y542) Alexa647、磷酸-ERK1/2 (pT202/pY204) PerCP-e710和磷酸-NF- $\kappa$ Bp65 (S529) PE。如下设计和产生Fc融合蛋白:将包括人HVEM的天然信号序列的胞外域(ectodomain) (残基1-184) 在3'末端融合至人IgG Fc序列。对于人BTLA和CMV UL144, 残基26-150和19-132分别在5'末端与人Ig信号序列融合, 且在3'末端与人IgG Fc区融合。所述Fc融合蛋白在CellGro Free无血清培养基中生长的经转染的293T细胞中产生, 并通过蛋白A柱上的亲和层析进行纯化。对照人IgG1蛋白来自Sigma-Aldrich。BTLA选择性HVEM突变体蛋白通过如下三轮诱变从头工程改造:首先, 表面暴露残基的丙氨酸诱变以鉴定配体结合热点;第二, 在热点处的饱和诱变以优化配体结合的靶向;第三, 组合诱变以实现BTLA选择性并增强亲和力。

[0094] 结合测定:如先前所述(Sedy等, 2013)进行流式细胞计数结合测定。简言之, 将细胞与Fc配体在缓冲液(含有2%FBS的PBS)中在冰上温育30分钟, 洗涤两次, 在缓冲液中在冰上与抗Fc次级温育15分钟, 洗涤两次并分析。特定平均荧光强度(MFI)通过从对照细胞MFI中减去实验细胞MFI来计算。

[0095] 表面等离子体共振动力学亲和力测量:使用胺偶联将人BTLA-Fc配体固定到CM5传感器芯片上至150个响应单位。在25℃, 以30 $\mu$ l/分钟的流速收集感应图。通过从配体通道中减去对照来确定特异性结合。将指示浓度的分析物从冷却到7℃的小瓶注入。数据收集包括3分钟的90 $\mu$ l分析物, 然后是15分钟解离。每个循环后的再生是用15 $\mu$ l 10mM甘氨酸pH 2.5的30秒脉冲。使用BIAevaluation软件(版本4.1)动力学分析模块的Langmuir和二价拟合模型对分析物注射和解离后的第一个10秒应用亲和力测量。

[0096] 微球激活细胞的磷流分析(Phosphoflow analysis):将醛/硫酸盐胶乳微球(5 $\mu$ m)共价偶联至100 $\mu$ g/ml单独的抗-Fc $\mu$ F(ab')<sub>2</sub>, 或抗-Fc $\mu$ F(ab')<sub>2</sub>与所指示浓度的如前所述的人IgG1、HVEM-Fc或UL144-Fc一起(Sperling等(1998), J Immunol 161:6459)。简言之, 将微球在PBS中洗涤, 在37℃与所指示蛋白质温育90分钟, 在缓冲液(含有1%BSA和0.1%甘氨酸的PBS)中封闭, 洗涤两次, 重悬于培养基中并计数。将微球用于以3:1的比例刺激JTAg和BJAB细胞。首先将微球加入到96孔平底板中, 然后是在PBS中洗涤细胞并重悬至 $1.5 \times 10^6$ 个细胞/ml的浓度。将板短暂离心并在37℃温育所示时间, 然后用PBS中的2%多聚甲醛固定, 并在37℃再温育10分钟。将细胞在缓冲液(含有2%FBS的PBS)中洗涤并在Perm III缓冲液(BD Bioscience)中在冰上透化30分钟, 洗涤两次, 与磷酸-特异性抗体在冰上温育30分钟, 洗涤两次并分析。

[0097] Western印迹:使用所指示浓度的IL-2或干扰素- $\beta$ 激活IL-2依赖性NK92模型细胞系。在测试IL-2响应的实验中, 将NK92细胞在没有IL-2的情况下培养过夜以重建基础信号传导。在使用融合蛋白和抗体的实验中, NK92细胞在激活之前在冰上用对照人IgG1、HVEM-Fc或UL144-Fc或对照小鼠IgG2a或抗-BTLA涂覆至少15分钟。将NK92细胞等分至每个条件下

100 $\mu$ L中 $2 \times 10^6$ 个细胞,在37 $^{\circ}$ C在激活所示次数,用冰冷的PBS淬灭并在4 $^{\circ}$ C在RIPA缓冲液中裂解20分钟,然后以14,000rpm、4 $^{\circ}$ C离心。将提取物在含有1% $\beta$ -巯基乙醇的SDS上样缓冲液中煮沸5分钟,并在10%Bis-Tris凝胶上通过SDS-PAGE解析。蛋白质使用槽法(trank method)转移至PVDF膜上并用TBS-T缓冲液中的1%卵清蛋白封闭,并用针对磷酸-JAK1、磷酸-STAT5、磷酸-STAT1、磷酸-Akt (S473) 和总肌动蛋白的抗体进行印迹,然后是抗兔HRP或抗小鼠HRP,并且通过增强的化学发光来显现。

[0098] 人PBMC的细胞因子激活:如先前所描述的 (Sedy等,2013),从健康供体收集并制备新鲜人血。简言之,将从Ficoll梯度血沉棕黄层分离的PBMC在冰上与所示Fc蛋白质以 $10^6$ 细胞/ml温育15分钟,然后在流式细胞术分析之前与5 $\mu$ g/ml的抗人Fc  $\gamma$  F (ab')<sub>2</sub>交联6小时。

[0099] 实施例2

[0100] 淋巴瘤靶向配体结合中的体细胞TNFRSF14突变

[0101] 注意到在FL和DLBCL中获得的体细胞TNFRSF14突变具有中断与其配体的保守HVEM相互作用和后续功能(图8A-8B)的潜力。选择淋巴瘤相关突变,预测其不会破坏所述HVEM结构及所评估的突变受体与BTLA、CD160和LIGHT的结合。验证为表面表达的HVEM突变体根据其配体结合的作用可分成三组(图8A-8B)。含有P59S、A102P或R109W的突变破坏了与单独的CD160的相互作用。Y61C和G72D突变消除了与BTLA和CD160的相互作用,但是不会显著影响LIGHT结合。最后,突变型G60D和T82P,或Ser91和Lys92之间的Ile的插入破坏了所有的配体相互作用(图2A-2H)。HVEM Tyr61已被鉴定为对于结合BTLA和CD160两者是关键。总之,这些体细胞突变定义了与CD160和BTLA的相互作用的优先丧失,而且或者不损害或者也同样影响与LIGHT的相互作用的配体结合等级。TNFSF14中的遗传改变进一步在DLBCL额外队列中证实,并鉴定出在BTLA或TNFSF14中具有缺失的其他肿瘤(图2H)。人FL和DLBCL内HVEM网络中多个遗传损伤的存在指示这些途径可显著有助于肿瘤微环境内的细胞选择。特定残基对于配体结合是重要的:不与CD160结合的Pro<sup>59</sup>、Ala<sup>102</sup>、Arg<sup>109</sup>;不与BTLA或CD160结合的Tyr<sup>61</sup>和Gly<sup>72</sup>;不与LIGHT、BTLA或CD160结合的Gly<sup>60</sup>、Thr<sup>82</sup>和ins91I(在Ser91和Lys92处指示)(图2C-2H)。

[0102] 实施例3

[0103] HVEM和UL144结合BTLA的重叠表面

[0104] 为了确定通过病毒UL144或突变型HVEM改变的BTLA活性是否是由于不同表面的接合所致,比较这些激动剂在接触表面中的BTLA残基。发现先前显示具有激动活性的抗-BTLA单抗(克隆MIH26)的结合通过在Glu57或Pro59处的突变破坏,而竞争性抗-BTLA单抗(克隆J168)的结合通过在Arg42处的突变破坏(图3A和图9A)。值得注意地,所述MIH26结合残基Glu57与小鼠BTLA中的Gln63同源,其包含在激动性抗BTLA单抗(克隆6A6)的表位内。相比之下,观察到HVEM-Fc和UL144-Fc两者与Gln37、Arg42、Pro59和His127结合的相似要求,这与在人和小鼠BTLA中的先前研究一致。使用表面等离子体共振证实了BTLA对于HVEM或UL144的类似亲和性(图3B、图3C)。UL144-Fc针对BTLA(295nM)的亲和力(KD,1:1结合模型)略小于HVEM-Fc(177nM)(表2)。尽管在HVEM和UL144之间观察到微妙的亲和力和结合差异,但是总体人CMV UL144紧密模拟了HVEM与BTLA的结合。图9A-9B显示用野生型或突变型人BTLA转导的EL4细胞用抗人BTLA多克隆或单克隆抗体或用HVEM-Fc或人CMV UL144-Fc染色,然后是物种特异性次级。从上到下的图显示6F4、J168或MIH26抗-BTLA(A)的特异性MFI染色,或GFP表

达门控的细胞上 (cells gated on) 的HVEM-Fc或UL144-Fc (B) 染色。

[0105] HVEM和BTLA在淋巴细胞中的共表达导致位于细胞表面处的顺式内在复合物的形成,其竞争性地阻断由反式外来配体的激活。确定与BTLA共表达的UL144是否形成顺式复合物以防止配体反式接进,或BTLA的UL144反式连接是否可规避通过HVEM的BTLA接进的空间位阻。与BTLA共表达的HVEM和UL144两者都阻断与HVEM-Fc和UL144-Fc二者的结合,指示HVEM和UL144与顺式BTLA形成类似的复合物,并且UL144不能在细胞表面处胜过预先形成的BTLA顺式复合物(图9C、图9D)。然而,BTLA R42D突变体的共表达确实阻止了顺式表达的HVEM而非UL144与BTLA-Fc的反式结合,指示单一突变可能不足以破坏所述BTLA-UL144顺式复合物(图9E、图9F)。

[0106] 由单抗J168和MIH26识别的抗体表位与四聚体不对称单位中的HVEM分子所包藏的BTLA的表面重叠,并预测其阻断HVEM结合至BTLA(图3A)。虽然这些抗BTLA克隆的滴定干扰HVEM-Fc和UL144-Fc与BTLA的结合,三级抗-BTLA单抗(克隆6F4)增强了HVEM-Fc与BTLA的结合,但不影响UL144-Fc的结合(图3D、图3E)。使用这些BTLA突变体不鉴定其表位,并且此克隆不显示对HVEM的任何反应性。总之,这些数据指示,尽管BTLA的相同表面看起来被用于结合HVEM和UL144,但是可存在有助于配体结合的另外的结构元件。此外,BTLA抗体的表位定位指示对抗活性 (agonistic activity) 与人BTLA上的Glu57或Pro59 (对于克隆MIH26) 和小鼠BTLA上的Gln63 (对于克隆6A6) 有关。在图3A-3E中,左图特定的残基指示抗体结合的要求:Glu45、Glu57、Pro59是MIH26结合所需要的,Arg42是J168结合所需要的。在图3A-3E中,右图特定的残基指示HVEM/UL144结合表位:Gln37、Arg42、Pro59、His127看起来是HVEM/UL144结合所需要的,Glu45、Glu57、Phe119、Ser121看起来不是HVEM/UL144结合所需要的。

[0107] 实施例4

[0108] CD160通过对HVEM的竞争来限制BTLA介导的抑制

[0109] CD160和LIGHT在不同淋巴细胞亚组中的表达可影响病毒和癌症突变型HVEM从事BTLA抑制性信号转导的能力。为了评估改变HVEM配体的表达是否影响BTLA激动性,将表达异位BTLA或CD160同型的Jurkat T细胞激活(图4A-4C和图10A)。用固定化的抗CD3激活的对照细胞诱导细胞外信号调节的激酶(ERK) 1/2、zeta-链相关蛋白激酶70kD(ZAP70)/Syk和总细胞酪氨酸的磷酸化,而在用共固定化的抗-CD3和HVEM或UL144-Fc激活的细胞中ERK1/2磷酸化减少(~50-70%减少)。异位BTLA表达增强了HVEM和UL144抑制ERK1/2磷酸化至背景水平的能力,其与显著降低的ZAP70/Syk磷酸化(~15-25%)相关(图4A,图4B)。在用HVEM或UL144刺激后酪氨酸磷酸化增加,反映BTLA和相关信号传导蛋白的激活(图4C)。重要的是,在表达异位CD160(糖基磷脂酰肌醇或跨膜同型)的细胞中,HVEM不能抑制ERK1/2磷酸化,除非BTLA额外存在。相比之下,UL144抑制ERK1/2磷酸化而无论CD160同型表达。HVEM和UL144的对抗活性在人非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkins lymphoma)BJAB中证实,BJAB在不存在其他HVEM配体的情况下表达高水平的人BTLA且响应于IgM刺激激活Syk-依赖性ERK和Akt磷酸化(图10B)。具体地,与对照细胞相比,在用共固定化的抗-IgM和滴定的HVEM或UL144-Fc激活的细胞中,观察到ERK、Akt和细胞磷酸酪氨酸的磷酸化约减少50%。总之,这些结果证明HVEM激活BTLA信号传导的能力取决于BTLA与CD160的相对比例,并且通过病毒模拟物的受体选择性导致无阻的BTLA激动作用。

[0110] 实施例5



[0111] BTLA的激动剂激活抑制促炎细胞因子刺激

[0112] 先前已经显示,在用细胞因子或CMV感染的成纤维细胞体外培养的PBMC中,可溶性HVEM-Fc而非UL144-Fc,独特地共刺激表达CD160的NK细胞的激活。在平行研究中,观察到在不同的PBMC亚组中通过HVEM和UL144-Fc对IL-2诱导的CD69表达的抑制,其与BTLA的表达相关(图11A)。进一步检查了在CD160存在下细胞和病毒HVEM抑制IL-2信号传导的能力(图5A-5B)。人NK细胞系NK92通过所述激酶JAK1的磷酸化以可滴定的方式响应于IL-2,导致STAT5、Akt和ERK途径的激活。在用IL-2处理的细胞中,在用UL144-Fc或抗-BTLA单抗(克隆MIH26)而非HVEM-Fc激活BTLA后,观察到JAK1、STAT5和Akt蛋白的磷酸化减少,指示BTLA的UL144靶向通过过量的CD160的存在而不受阻碍(图5A、图5B和图11B)。进一步测试了BTLA是否调节I型干扰素信号传导,因为该途径也受SHP-1抑制的调节。抗BTLA单抗(克隆MIH26)在早期和晚期降低STAT1磷酸化的量级,证明在SHP-1敏感的细胞因子信号传导途径中,BTLA显示广泛的抑制功能(图11C)。另外,CD160限制HVEM而非其病毒模拟物结合和激活BTLA。图11A-11C显示PBMC用所示Fc蛋白预处理并用所示浓度的IL-2刺激6小时,然后在细胞亚组内对CD69表达进行染色。图11A-11C显示在CD19+B细胞、CD4+和CD8+T细胞、CD3+CD56+细胞、CD56dim(CD56暗淡)和CD56bright(CD56明亮)NK细胞中CD69表达的百分比。图11B.-图11C.在用抗-BTLA(MIH26)或对照Ig预处理后的所示时间用滴定的IL-2(图11B.)和IFN- $\beta$ (图11C.)刺激NK92细胞。Western印迹显示磷酸-JAK1、STAT5和Akt(S473)的全细胞提取物以监测IL-2信号传导,或磷酸-STAT1(的全细胞提取物)以监测IFN- $\beta$ 信号传导,以及肌动蛋白以控制总蛋白质水平。

[0113] 实施例6

[0114] 生物工程改造的HVEM选择性激活BTLA信号传导

[0115] UL144的配体结合选择性和淋巴瘤突变表明HVEM的从头工程改造应产生BTLA特异性激动剂。通过丙氨酸扫描、饱和和组合诱变将突变型HVEM-Fc蛋白工程改造。发现在S58R和L90A处含有突变的HVEM突变蛋白(HVEM-RA)赋予针对BTLA的选择性,而在G68T和L70W处的另外的突变使BTLA亲和力增强10倍(HVEM-RTWA)。值得注意地,所述RA和RTWA突变体均比在对照细胞中亲本HVEM-Fc蛋白更大程度地抑制抗CD3诱导的磷酸-ERK1/2,并且在异位表达BTLA的细胞中,所有HVEM-Fc蛋白均使ERK1/2磷酸化降低至背景水平(图6A)。只有所述高亲和力HVEM-RTWA突变体在所有细胞中显著降低ZAP-70/Syk磷酸化至背景水平(图6B)。在表达异位BTLA的细胞中,HVEM-RA和HVEM-RTWA突变体的抑制活性与磷酸-SHP2信号以及总细胞磷酸-酪氨酸的显著诱导相关(图6C和图12B)。因此,所述生物工程改造的HVEM-Fc复制病毒和突变型HVEM的选择性和不受限制的激动作用。

[0116] 实施例7

[0117] 多种病原体相关和从头生物工程改造的HVEM突变蛋白BTLA激动剂抑制T细胞信号传导

[0118] 显示HVEM突变蛋白BTLA激动剂抑制T细胞信号传导。用对照BTLA、CD160-GPI、CD160-TM、BTLA CD160-GPI和BTLA CD160-TM HVEM配体通过电穿孔转导JTA<sub>g</sub>细胞,并在激活前允许静置48小时,或者用表达所示HVEM配体的逆转录病毒稳定转导。为了激活JTA<sub>g</sub>,将细胞硫酸醛(aldehyde sulfate)微球在PBS中与具有或不具有1 $\mu$ M所示HVEM或UL144Fc蛋白质的100 $\mu$ g/ml的抗CD3在37 $^{\circ}$ C偶联90分钟。将微球洗涤两次并与JTA<sub>g</sub>细胞以4:1的微球对细

胞比例温育5分钟。将细胞立即用2%多聚甲醛固定,用90%甲醇透化,并用所示磷酸特异性抗体染色。然后检查细胞的磷酸-ERK1/2 (T202/Y204) (图13A、图13B)、磷酸-NF- $\kappa$ B p65 (S529) (图13C)、磷酸-BTK/ITK (Y551/Y511) (图13D),磷酸-PLC  $\gamma$  1 (Y783) (图13E),磷酸-ZAP70/Syk (Y319/Y352) (图13F) 和磷酸-酪氨酸(图13G)的细胞内染色。图13A显示染色细胞的MFI的图。图13A.-图13G. 显示染色细胞的阳性百分比。(均值 $\pm$ SEM代表三个实验)。\*, $p < 0.05$ ; \*\*, $p < 0.01$ ; \*\*\*, $p < 0.001$ ; \*\*\*\*, $p < 0.0001$ 。

#### [0119] 实施例8

##### [0120] BTLA激动剂抑制B细胞信号传导

[0121] 显示BTLA激动剂抑制B细胞信号传导。为了激活BJAB细胞,将硫酸醛微球在PBS中与具有或不具有1 $\mu$ M所示HVEM或UL144Fc蛋白质的100 $\mu$ g/ml的抗IgM在37 $^{\circ}$ C偶联90分钟。将微球洗涤两次并与BJAB细胞以4:1的微球对细胞比例温育10或60分钟。将细胞立即用2%多聚甲醛固定,用90%甲醇透化,并用所示磷酸特异性抗体染色。然后检测BJAB细胞的磷酸-ERK1/2 (pT202/pY204)、磷酸-Akt (S473) 或磷酸-酪氨酸(图14A-图14B)的细胞内染色。图14A-图14B显示对于磷酸-ERK1/2 (pT202/pY204)、磷酸-Akt (S473) 或磷酸-酪氨酸阳性的细胞的百分比。

[0122] BTLA激动剂抑制B细胞的干扰素激活。为了激活人B细胞,将硫酸醛微球在PBS中与1 $\mu$ M的所示HVEM或UL144Fc蛋白质在37 $^{\circ}$ C偶联90分钟。将微球洗涤两次并与从正常人供体血液PBMC纯化的人B细胞以4:1的微球对细胞比例温育,并在裂解和RNA分离之前用10U/ml干扰素- $\beta$ 刺激6小时。图15A-15D显示与对照相比,当用每种所述BTLA激动剂(HVEM、UL144Fc、HVEM<sup>R109W</sup> Fc和HVEM<sup>RTWA</sup> Fc)处理细胞时,每个所示干扰素刺激的基因的水平倍数降低。(均值 $\pm$ SEM,来自两个实验的汇集数据)。\*, $p < 0.05$ ; \*\*, $p < 0.01$ 。

[0123] 发现BTLA激动剂限制NK细胞中的IL-2信号传导。NK92细胞在没有血清的情况下培养至少4小时,然后在用2 $\mu$ g/ml所示Fc和抗体在冰上预处理15分钟后用20U/ml的人IL-2刺激0、1、5、15、30和60分钟(图16A-图16B)。激活后,将细胞在RIPA缓冲液中裂解,并通过Western印迹分析蛋白质磷酸化。图16A显示磷酸-JAK1、磷酸-STAT5的全细胞提取物以及控制总蛋白水平的肌动蛋白的Western印迹。图16B显示指示标准化至肌动蛋白的条带强度的定量的图。

#### [0124] 实施例9

##### [0125] 鉴定小鼠HVEM中的配体选择性

[0126] 在小鼠HVEM中确定配体的选择性。通过瞬时转染入包括野生型HVEM的293T细胞以及含有基于与人HVEM的同源性经预测以阻断结合至LIGHT (BTLA/CD160-sp) 或BTLA和CD160两者(LIGHT-SP)的单个氨基酸变化的两个变体(图17A-图17C)产生小鼠HVEM-Fc的小组。将HVEM-Fc蛋白质滴定到用小鼠CD160(图17A),小鼠BTLA(图17B)和小鼠LIGHT瞬时转染的293T细胞上,并使用抗人Fc检测结合。在流式细胞术分析中测量特异性结合(图17C)。该图显示HVEM-Fc蛋白质在配体表达细胞上染色的MFI。

#### [0127] 实施例10

##### [0128] 选择性HVEM-Fc在体内抑制皮肤炎症

[0129] 显示HVEM-Fc在体内抑制皮肤炎症。将小鼠HVEM-Fc突变蛋白腹膜内注射到咪喹莫特处理的皮肤炎症动物模型中。在每天的治疗中在每只动物的剃光的背部上以50mg三次施

用咪喹莫特 (Aldara制剂) 后收获皮肤组织,并切片用于组织学分析。在H&E染色的皮肤切片中,在遍及各组织的长度上的10个位点定量表皮厚度。代表性图像显示用HVEM突变蛋白处理的不同动物组中的表皮增厚(图18A)。图18B显示表皮厚度的定量。\*, $p<0.05$ ;\*\*, $p<0.01$ ;\*\*\*, $p<0.001$ ;\*\*\*\*, $p<0.0001$ 。

[0130] 实施例11

[0131] 总结

[0132] 本文呈现的数据显示BTLA选择性激动剂的病毒和癌细胞表达是靶向HVEM信号传导网络的常用策略。避免CD160结合的HVEM中的病毒进化和突变看来为所述病原体 and 癌细胞提供选择性优势。显示与HVEM相比,CMV中的病毒HVEM模拟物的活性在CD160表达细胞中不受阻碍,直接抑制淋巴细胞中抗原受体刺激后ZAP70/Syk和下游ERK1/2途径的激活。另外,在表达CD160的NK细胞中,所述病毒HVEM模拟物对BTLA的激活直接限制了炎症细胞因子信号传导。总之,这些数据证明通过抑制性受体抑制炎症信号传导的潜力如何能够为多种细胞内病原体如病毒和肿瘤提供选择性压力。病毒和肿瘤突变的此知识库促使HVEM的生物工程改造以实现BTLA的选择性和高亲和力,其可显示在改变炎症和增殖过程中的实用性。

[0133] 所述UL144蛋白最初使用HVEM的解析的结构建模,部分由于它们的同源性(图1A)。然而,UL144和HVEM之间存在与如下结合的微妙结合差异:某些BTLA突变体、结合至6F4抗体的BTLA以及顺式BTLA,指示了不同的相互作用(图3A-3E、图4A-4C)。UL144不能通过个别的点突变回复到CD160结合蛋白,其可能反映了病毒-宿主进化过程中出现的多种特异性变化。结果,尽管保留了BTLA跨菌株结合,所述UL144蛋白是高度抗原性的。相反,肿瘤相关的HVEM各自仅含有一个突变,单独的该突变不能消除所有CD160结合。存在与Ig结构域相互作用的TNF受体的其他例子,例如具有Longo1的NGFRp75。值得注意地,HVEM本身最初通过其与单纯疱疹病毒糖蛋白D的Ig结构域的相互作用鉴定。CMV表达另一种蛋白ORF UL141,其结合TNF相关的诱导细胞凋亡的配体受体(TRAIL-R)。这两种蛋白质的共复合物最近被解析,显示UL141折叠为Ig结构域,然而,这些蛋白质之间的接触发生在配体TRAIL接合TRAIL-R的表面上,其不同于HVEM与BTLA或CD160的相互作用。HVEM在采取几种蛋白质物种的配体方面可为独特的,并且TNFR蛋白质的N-末端富半胱氨酸结构域1(CRD1)与Ig结构域之间的复合物看来不是真核生物中蛋白质-蛋白质相互作用的有利类型。有趣的是注意不同病毒对这些非常规相互作用的更频繁地使用,其导致吸引人的暗示,即,调节免疫受体可增强病原体的存活率。

[0134] 发现BTLA抑制人NK细胞中的IL-2和I型干扰素信号传导,并证实了BTLA作为调节T和B细胞受体信号传导的免疫检查点抑制剂的作用。BTLA下游的抑制性信号传导机制被认为包括SHP-1或2的激活,并可能涉及另外的途径。生物工程改造的HVEM-RTWA对ZAP70/Syk磷酸化的抑制作用与先前的研究一致,证明CD3 $\delta$ 和Syk是T和B细胞中BTLA活性的直接靶标。JAK/STAT信号传导通过SHP-1的激活和包括JAK激酶和STAT蛋白的靶蛋白的脱磷酸部分调节。BTLA激动剂可通过SHP-1募集或通过未知的抑制途径的参与直接靶向细胞因子信号传导。

[0135] 与选择性病毒和突变型BTLA激动剂相对,HVEM与激活的T细胞中的BTLA、LIGHT和CD160相互作用,而在NK细胞中,CD160的大量表达隔离HVEM,潜在地激活促炎信号传导。在

淋巴瘤的情况中,突变的TNFRSF14常常与非功能性等位基因配对,导致更差的预后。上述实验预测,远离CD160结合的HVEM突变防止溶细胞性细胞的激活,而BTLA结合的保留激活邻近细胞中的抑制性信号传导。LIGHT和BTLA中DLBCL缺失的鉴定(两者均能激活反式HVEM信号传导)进一步支持了如下假设,即主要的选择性因子是肿瘤浸润性淋巴细胞的激活。另外,肿瘤本身可响应LIGHT和BTLA以激活HVEM下游的存活信号。值得注意地,滤泡T辅助细胞显著表达BTLA和LIGHT,并可有助于维持淋巴瘤内的HVEM功能性。持续的调查被批准以确定HVEM如何通过配体选择在肿瘤微环境中有助于淋巴瘤健康。BTLA、LIGHT和CD160的表达在不同的细胞类型、激活和分化状态之间变化很大。因此HVEM配体的动态调节提供取决于细胞环境控制激活和抑制信号的机制。调节受体和配体表达的因子的确定会允许更好地理解这些蛋白在免疫响应中的作用,以及如何操纵这些途径用于治疗干预。针对BTLA或其他抑制性受体的靶向激动剂的开发可用于增加治疗炎性疾病的所有方案(repertoire)。

[0136] 尽管已经参照上述实例描述了本发明,但会理解的是,修饰和变型涵盖在本发明的精神和范围内。因此,本发明仅由所附的权利要求来限定。

[0137] 表1. 用于克隆和定点诱变的引物

[0138]

基因	引物	序列
	人CMV UL144	
E27A突变体	Fiala UL144 E46 For	AAACCCGAAGCAGTGAATTAGGAAATCAGTG
E27A突变体	Fiala UL144 E46 Rev	TAATTGCACTGCTTCGGGTTTGCATATTTTCAG
V28Y突变体	UL144_V28YTop	ACCCGAAGAATATCAATTAGGAAATCAGTGTGTGC
V28Y突变体	UL144_V28YBot	TTCCTAATTGATATTCTTCGGGTTTGCATATTTTC
Q29P突变体	UL144_Q29PTop	GAAGAAGTGCCATTAGGAAATCAGTGTGTGCCC
Q29P突变体	UL144_Q29PBot	ATTTCCTAATGGCACTTCTTCGGGTTTGCATATTTTC
N32S突变体	UL144_N32STop	GCAATTAGGAAGTCAGTGTGTGCCCCATGTAAAC
N32S突变体	UL144_N32SBot	ACAACACTGACTTCTTAATTGCACTTCTTCGG
Q33A突变体	Fiala UL144 Q52 For	TTAGGAAATGCGTGTGTGCCCCATGTAAACAAG
Q33A突变体	Fiala UL144 Q52 Rev	GGGACAACACGCATTTCTTAATTGCACTTCTTC
P36A突变体	Fiala UL144 P55 For	CAGTGTGTGCCCCATGTAAACAAGGATATCGTG
P36A突变体	Fiala UL144 P55 Rev	TTTACATGGGGCACAACACTGATTTCTTAATTG
P37K突变体	UL144_P37KTop	GTGTTGTCCCAATGTAAACAAGGATATCGTGTAC
P37K突变体	UL144_P37KBot	TTGTTTACATTTGGGACAACACTGATTTCTTAATTG
K39S突变体	K39STop	TCCCCCATGTTACAAGGATATCGTGTACAGG
K39S突变体	K39SBot	ATATCCTTGTGAACATGGGGACAACACTGATTTTC
G41A突变体	Fiala UL144 G60 For	TGTAAACAAGCATATCGTGTACAGGACAATGTAC
G41A突变体	Fiala UL144 G60 Rev	AACACGATATGCTTGTTTACATGGGGACAACACTG
Y42A突变体	UL144F-Y42A-F	CCCCCATGTAAACAAGGAGCTCGTGTACAGGACAATG
Y42A突变体	UL144F-Y42A-R	CATTGTCCTGTAAACAGAGCTCCTTGTTTACATGGGGG
R43A突变体	Fiala UL144 R62A For	CAAGGATATGCTGTACAGGACAATGTACGCAATATAC
R43A突变体	Fiala UL144 R62A Rev	TCCTGTAAACAGCATATCCTTGTTTACATGGGGG
T45A突变体	Fiala UL144 T64 For	TATCGTGTGACAGGACAATGTACGCAATATACG
T45A突变体	Fiala UL144 T64 Rev	ACATTGTCCTGCAACACGATATCCTTGTTTACATGG
G46A突变体	Fiala UL144 G65 For	CGTGTACAGCACAATGTACGCAATATACGAGTAC
G46A突变体	Fiala UL144 G65 Rev	CGTACATTGTGCTGTAACACGATATCCTTGTTTAC
G46K突变体	FUL144-G46K 5'	AAACAAGGATATCGTGTACAAAACAATGTACGCAATATACGAGT
G46K突变体	FUL144-G46K 3'	ACTCGTATATTGCGTACATTGTTTTGTAACACGATATCCTTGTTT
Q47A突变体	UL144_Q47ATop	GTTACAGGAGCATGTACGCAATATACGAGTACAAC
Q47A突变体	UL144_Q47ABot	TGCGTACATGCTCCTGTAAACACGATATCCTTG
T49G突变体	UL144_T49GTop	GGACAATGTGGGCAATATACGAGTACAACATGTAC

[0139]

T49G突变体	UL144_T49GBot	CGTATATTGCCACATTGTCCTGTAACACGATATC
Q50A突变体	Fiala UL144 Q69 For	CAATGTACGGCATATACGAGTACAACATGTACAG
Q50A突变体	Fiala UL144 Q69 Rev	ACTCGTATATGCCGTACATTGTCCTGTAACACGATATC
T52A突变体	Fiala UL144 T71 For	ACGCAATATGCGAGTACAACATGTACACTTTGCCC
T52A突变体	Fiala UL144 T71 Rev	TGTTGTACTIONCGCATATTGCGTACATTGTTCTGTAAC
N61A突变体	UL144_N61ATop	CTTTGCCCTGCCGGTACGTATGTATCAGGGC
N61A突变体	UL144_N61ABot	CGTACCGGCAGGGCAAAGTGATCATGTTGTAC
L68A突变体	Fiala UL144 L86 For	GTATCAGGGGCTTACAATTGTACCAATTGCACTG
L68A突变体	Fiala UL144 L86 Rev	ACAATTGTAAGCCCTGATACATACGTACCGTTAG
E76M突变体	UL144_E76MTop	CAATTGCACTATGTGTAATGACACTGAGGTTAC
E76M突变体	UL144_E76MBot	CAATTGCACTATGTGTAATGACACTGAGGTTAC
P106A突变体	Fiala UL144 P124 For	TTTTCCGTTGCAGGCGTCCAACATCACAAGCAACG
P106A突变体	Fiala UL144 P124 Rev	TTGGACGCCTGCAACGGAAAATGACGTATAATTC
	人HVEM	
P59S突变体	hHVEM_P59STop	CAAGTGCAGTTCAGGTTATCGTGTGAAGGAG
P59S突变体	hHVEM_P59SBot	CGATAACCTGAACTGCACTTGGGGCAGCAC
G60D突变体	HuHVEMG60Dfor	tgcagtcagattatcgtgtgaaggaggcctg
G60D突变体	HuHVEMG60Drev	ACACGATAATCTGGACTGCACTTGGGGC
Y61C突变体	HuHVEMY61Cfor	GTCCAGGTTGTCTGTGAAGGAGGCCTGC
Y61C突变体	HuHVEMY61Crev	CTTCACACGACAACCTGGACTGCACTTGGG
G72D突变体	hHVEM_G72DTop	GCTGACGGACACAGTGTGTGAACCCCTGC
G72D突变体	hHVEM_G72DBot	ACACACTGTGTCCGTCAGCTCCCCGCAG
T82P突变体	hHVEM_T82PTop	TCCAGGCCCTACATTGCCACCTCAATG
T82P突变体	hHVEM_T82PBot	AATGTAGGGCCTGGAGGCAGGGTTC
Ins91I突变体	hHVEM_ins91ITop	CTCAATGGCCTAATAAGCAAGTGTCTGCAGTGC
Ins91I突变体	hHVEM_ins91IBot	CACTTGCTTATTAGGCCATTGAGGTGGGCAATG
A102P突变体	hHVEM_A102PTop	GTGACCCACCCATGGCCTGCGCGCG
A102P突变体	hHVEM_A102PBot	GGCCCATGGGTGGGTACACATTGGCACTG
R109W突变体	HuHVEMR109Wfor	CGCGAGCTGGAAGTCTCCAGGACAGAG
R109W突变体	HuHVEMR109Wrev	GAGCAGTTCAGCTCGCGCAGGCC
	人BTLA	
Q37A突变体	HuBTLAQ37Atop	catgtgatgtAGCGCTTTATATAAAGAGACAATCTGAACACTC
Q37A突变体	HuBTLAQ37Abot	CTTTATATAAAGCGCTACATCACATGATTCTTTCCCATG
L38H突变体	HuBTLAL38Htop	ATGTGATGTACAGCATTATATAAAGAGACAATCTGAACACTCC
L38H突变体	HuBTLAL38Hbot	TTGTCTCTTTATATAATGCTGTACATCACATGATTCTTTCC
R42D突变体	HuBTLAR42Dtop	CTTTATATAAAGGACCAATCTGAACACTCCATCTTAGC

[0140]

R42D突变体	HuBTLAR42Dbot	GTGTTTCAGATTGGTCCTTTATATAAAAGCTGTACATCACATGATTG
E45A突变体	HuBTLAE45Atop	AGAGACAATCTGCACACTCCATCTTAGCAGGAGATCC
E45A突变体	HuBTLAE45Abot	AAGATGGAGTGTGGAGATTGTCTCTTTATATAAAAGCTGTAC
E57A突变体	HuBTLAE57Atop	CTTTGAACTAGCATGCCCTGTGAAATACTGTGCTAAC
E57A突变体	HuBTLAE57Abot	TCACAGGGCATGCTAGTTCAAAGGGATCTCCTGCTAAG
P59A突变体	HuBTLAP59Atop	GAACTAGAATGCGCTGTGAAATACTGTGCTAACAGGC
P59A突变体	HuBTLAP59Abot	GTATTTTCACAGCGCATTCTAGTTCAAAGGGATCTC
K90A突变体	HuBTLAK90Atop	ACAAGTTGGGCGGAAGAGAAGAACATTTTCATTTTTCATTC
K90A突变体	HuBTLAK90Abot	CTTCTCTCCGCCCAACTGTTTGTCTATCTTCAAGTTTTAC
V117A突变体	HuBTLAV117Atop	TGTTCTGCAAATTTTCAGTCTAATCTCATTGAAAGC
V117A突变体	HuBTLAV117Abot	GATTAGACTGAAAATTTGCAGAACAGCGGTATGACCC
N118F突变体	HuBTLAN118Ftop	GCTGTTCTGCATTTTTCAGTCTAATCTCATTGAAAGC
N118F突变体	HuBTLAN118Fbot	TAGACTGAAAAATGCAGAACAGCGGTATGAC
F119A突变体	HuBTLAF119Atop	GTTCTGCAAATGCTCAGTCTAATCTCATTGAAAGCCAC
F119A突变体	HuBTLAF119Abot	GAGATTAGACTGAGCATTGTCAGAACAGCGGTATG
S121H突变体	HuBTLAS121Htop	CAAATTTTCAGCATAATCTCATTGAAAGCCACTCAAC
S121H突变体	HuBTLAS121Hbot	CAATGAGATTATGCTGAAAATTTGCAGAACAGCG
H127D突变体	HuBTLAH127Dtop	CATTGAAAGCGACTCAACAACTCTTTATGTGACAGATG
H127D突变体	HuBTLAH127Dbot	GTTGTTGAGTCGCTTTCAATGAGATTAGACTGAAAATTTG
S128H突变体	HuBTLAS128Htop	TGAAAGCCACCATACAACCTCTTTATGTGACAGATGTAAAAAG
S128H突变体	HuBTLAS128Hbot	AAGAGTTGTATGGTGGCTTCAATGAGATTAGACTG

[0141] 表2.Fc融合蛋白结合的单价和二价动力学速率常数

	分析物	
	HVEM-Fc	HuCMV UL144-Fc
单价分析		
$k_a$ ( $\times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	3.74	1.61
$k_d$ ( $\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ )	6.6	4.76
$K_D$ (nM)	177	295
二价分析		
$k_{a1}$ ( $\times 10^4 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	1.53	0.781
$k_{d1}$ ( $\times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$ )	9.02	5.1
$k_{a2}$ ( $\times 10^{-3} \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ )	57.3	0.0139
$k_{d2}$ ( $\text{s}^{-1}$ )	2.05	0.00289

。

[0142]

## 序列表

&lt;110&gt; 桑福德伯纳姆普利斯医学发现研究所

辉瑞有限公司

&lt;120&gt; BTLA融合蛋白激动剂及其用途

&lt;130&gt; BURN1680-1W0

&lt;150&gt; US 62/187,105

&lt;151&gt; 2015-06-30

&lt;160&gt; 91

&lt;170&gt; PatentIn 3.5版

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 1049

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 人(Homo sapiens)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; 混合特征

&lt;223&gt; HVEM

&lt;400&gt; 1

```
gccgcagcaa tggcgctgag ttcctctgct ggagttcatc ctgctagctg ggttcccagag 60
ctgccggtct gagcctgagg catggagcct cctggagact gggggcctcc tccctggaga 120
tccacccccca gaaccgacgt cttgaggctg gtgctgtatc tcaccttctt gggagccccc 180
tgctacgccc cagctctgcc gtcctgcaag gaggacgagt acccagtggg ctccgagtgc 240
tgccccaagt gcagtccagg ttatcgtgtg aaggaggcct gcggggagct gacgggcaca 300
gtgtgtgaac cctgccctcc aggcacctac attgccacc tcaatggcct aagcaagtgt 360
ctgcagtgcc aaatgtgtga cccagccatg ggccctgcgc cgagccggaa ctgctccagg 420
acagagaacg ccgtgtgtgg ctgcagccca ggccacttct gcatcgtcca ggacggggac 480
cactgcgccc cggtgccgcg ttacgccacc tccagcccgg gccagagggt gcagaaggga 540
ggcaccgaga gtcaggacac cctgtgtcag aactgcccc cggggacctt ctctcccaat 600
gggaccctgg aggaatgtca gcaccagacc aagtgcagct ggctggtgac gaaggccgga 660
gctgggacca gcagctccca ctgggtatgg tggtttctct cagggagcct cgtcatcgtc 720
attgtttgct ccacagttgg cctaatacata tgttgtaaaa gaagaaagcc aaggggtgat 780
gtagtcaagg tgatcgtctc cgtccagcgg aaaagacagg aggcagaagg tgaggccaca 840
gtcattgagg ccctgcaggc ccctccggac gtcaccacgg tggccgtgga ggagacaata 900
ccctcattca cggggaggag cccaaaccac tgaccacag actctgcacc ccgacgccag 960
agatacctgg agcgacggt gctgaaagag gctgtccacc tggcgaaacc accggagccc 1020
ggaggcttgg gggctccgcc ctgggctgg 1049
```

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 283

&lt;212&gt; PRT



<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 2

```

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

```

<210> 3

<211> 32  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 3  
aaacccgaag cagtgcaatt aggaaatcag tg 32  
<210> 4  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 4  
taattgcact gcttcgggtt tgcataatttc ag 32  
<210> 5  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 5  
accgaagaa tatcaattag gaaatcagtg ttgtc 35  
<210> 6  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 6  
ttcctaattg atattcttcg ggtttgcata tttc 34  
<210> 7  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 7  
gaagaagtgc cattaggaaa tcagtgttgt ccc 33  
<210> 8  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 8  
atttccta at ggcacttctt cgggtttgca tatttc 36  
<210> 9  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 9  
gcaattagga agtcagtgtt gtcccccatg taaac 35  
<210> 10  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 10  
acaacactga cttcctaatt gcacttcttc gg 32  
<210> 11  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 11  
ttaggaaatg cgtgttgtcc cccatgtaaa caag 34  
<210> 12  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 12  
gggacaacac gcatttccta attgcacttc ttc 33  
<210> 13  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 13  
cagtgttgtg ccccatgtaa acaaggatat cgtg 34  
<210> 14  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 14  
tttacatggg gcacaacact gatttcctaa ttg 33  
<210> 15  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 15  
gtgttgtccc aaatgtaaac aaggatatcg tgttac 36  
<210> 16

<211> 36  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 16  
ttgtttacat ttgggacaac actgatttcc taattg 36  
<210> 17  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 17  
tcccccatgt tcacaaggat atcgtgttac agg 33  
<210> 18  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 18  
atatccttgt gaacatgggg gacaacactg atttc 35  
<210> 19  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 19  
tgtaaacaag catatcgtgt tacaggacaa tgtac 35  
<210> 20  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 20  
aacacgatat gcttgtttac atgggggaca aactg 36  
<210> 21  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 21  
cccccattgta aacaaggagc tcgtgttaca ggacaatg 38  
<210> 22  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 22  
cattgtcctg taacacgagc tccttgttta catggggg 38  
<210> 23  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 23  
caaggatatg ctgttacagg acaatgtacg caatatac 38  
<210> 24  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 24  
tcctgtaaca gcatatcctt gtttacatgg ggg 33  
<210> 25  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 25  
tatcgtgttg caggacaatg tacgcaatat acg 33  
<210> 26  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 26  
acattgtcct gcaacacgat atccttgttt acatgg 36  
<210> 27  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 27  
cgtgttacag cacaatgtac gcaatatacg agtac 35  
<210> 28  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 28  
cgtacattgt gctgtaacac gatatccttg ttac 35  
<210> 29

<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 29  
aaacaaggat atcgtgttac aaaacaatgt acgcaatata cgagt 45  
<210> 30  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 30  
actcgtatat tgcgtacatt gttttgtaac acgatatacct tgttt 45  
<210> 31  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 31  
gttacaggag catgtacgca atatacgagt acaac 35  
<210> 32  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 32  
tgcgtacatg ctctgtaac acgatatacct tg 32  
<210> 33  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 33  
ggacaatgtg ggcaatatac gagtacaaca tgtac 35  
<210> 34  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 34  
cgtatatattgc ccacattgtc ctgtaacacg atatac 35  
<210> 35  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)

<400> 35  
caatgtacgg catatacgag tacaacatgt acag 34  
<210> 36  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 36  
actcgtatat gccgtacatt gtcctgtaac acgatatc 38  
<210> 37  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 37  
acgcaatatg cgagtacaac atgtacactt tgccc 35  
<210> 38  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 38  
tgttgtactc gcatattgcg tacattgttc tgtaac 36  
<210> 39  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 39  
tgttgtactc gcatattgcg tacattgttc tgtaac 36  
<210> 40  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 40  
cgtaccggca gggcaaagtg tacatgttgt ac 32  
<210> 41  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 41  
gtatcagggg cttacaattg taccaattgc actg 34  
<210> 42

<211> 35  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 42  
acaattgtaa gcccctgata catacgtacc gttag 35  
<210> 43  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 43  
caattgcact atgtgtaatg aactgaggt tac 33  
<210> 44  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 44  
caattgcact atgtgtaatg aactgaggt tac 33  
<210> 45  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 45  
ttttccgttg caggcgtcca acatcacaag caacg 35  
<210> 46  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 46  
ttggacgcct gcaacggaaa atgacgtata attc 34  
<210> 47  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 47  
caagtgcagt tcaggttatc gtgtgaagga g 31  
<210> 48  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)



<400> 48  
cgataacctg aactgcactt ggggcagcac 30  
<210> 49  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 49  
tgcagtccag attatcgtgt gaaggaggcc tg 32  
<210> 50  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 50  
acacgataat ctggactgca cttggggc 28  
<210> 51  
<211> 29  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 51  
gtccaggttg tcgtgtgaag gaggcctgc 29  
<210> 52  
<211> 30  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 52  
cttcacacga caacctggac tgcacttggg 30  
<210> 53  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 53  
gctgacggac acagtgtgtg aaccctgc 28  
<210> 54  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 54  
acacactgtg tccgtcagct ccccgag 28  
<210> 55

<211> 29  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 55  
tccaggcccc tacattgccc acctcaatg 29  
<210> 56  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 56  
aatgtagggg cctggagggc agggttc 27  
<210> 57  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 57  
ctcaatggcc taataagcaa gtgtctgcag tgc 33  
<210> 58  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 58  
cacttgctta ttaggccatt gaggtgggca atg 33  
<210> 59  
<211> 26  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 59  
gtgaccacc catgggcctg cgcgcg 26  
<210> 60  
<211> 31  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 60  
ggcccatggg tgggtcacac atttggcact g 31  
<210> 61  
<211> 28  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 61  
cgcgagctgg aactgctcca ggacagag 28  
<210> 62  
<211> 27  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 62  
gagcagttcc agctcgcgcg caggccc 27  
<210> 63  
<211> 43  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 63  
catgtgatgt agcgctttat ataaagagac aatctgaaca ctc 43  
<210> 64  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 64  
ctttatataa agcgctacat cacatgattc tttcccatg 39  
<210> 65  
<211> 43  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 65  
atgtgatgta cagcattata taaagagaca atctgaacac tcc 43  
<210> 66  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 66  
ttgtctcttt atataatgct gtacatcaca tgattctttc c 41  
<210> 67  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 67  
ctttatataa aggaccaatc tgaacactcc atcttagc 38  
<210> 68

<211> 45  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 68  
gtgttcagat tggtccttta tataaagctg tacatcacat gattc 45  
<210> 69  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 69  
agagacaatc tgcacactcc atcttagcag gagatcc 37  
<210> 70  
<211> 41  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 70  
aagatggagt gtggagattg tctctttata taaagctgta c 41  
<210> 71  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 71  
ctttgaacta gcatgccctg tgaaatactg tgctaac 37  
<210> 72  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 72  
tcacagggca tgctagttca aagggatctc ctgctaag 38  
<210> 73  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 73  
gaactagaat gcgctgtgaa atactgtgct aacaggc 37  
<210> 74  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 74  
gtatttcaca gcgcattcta gttcaaaggg atctc 35  
<210> 75  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 75  
acaagttggg cggaagagaa gaacatttca tttttcattc 40  
<210> 76  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 76  
cttctcttcc gcccaacttg tttgtctatc ttcaagtttt ac 42  
<210> 77  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 77  
tgttctgcaa attttcagtc taatctcatt gaaagc 36  
<210> 78  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 78  
gattagactg aaaatttgca gaacagcggg atgaccc 37  
<210> 79  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 79  
gctgttctgc attttttcag tctaattctca ttgaaagc 38  
<210> 80  
<211> 32  
<212> DNA  
<213> 人(Homo sapiens)  
<400> 80  
tagactgaaa aaatgcagaa cagcggatatg ac 32  
<210> 81

<211> 38  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 81  
gttctgcaaa tgctcagtct aatctcattg aaagccac 38  
<210> 82  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 82  
gagattagac tgagcatttg cagaacagcg gtatg 35  
<210> 83  
<211> 37  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 83  
caaattttca gcataatctc attgaaagcc actcaac 37  
<210> 84  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 84  
caatgagatt atgctgaaaa tttgcagaac agcg 34  
<210> 85  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 85  
cattgaaagc gactcaacaa ctctttatgt gacagatg 38  
<210> 86  
<211> 40  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)  
<400> 86  
gttggtgagt cgctttcaat gagattagac tgaaaatttg 40  
<210> 87  
<211> 42  
<212> DNA  
<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 87

tgaaagccac catacaactc tttatgtgac agatgtaaaa ag 42

<210> 88

<211> 36

<212> DNA

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 88

aagagttgta tgggtggcttt caatgagatt agactg 36

<210> 89

<211> 78

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 89

Cys Lys Glu Asp Glu Tyr Pro Val Gly Ser Glu Cys Cys Pro Lys Cys

1 5 10 15

Ser Pro Gly Tyr Arg Val Lys Glu Ala Cys Gly Glu Leu Thr Gly Thr

20 25 30

Val Cys Glu Pro Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Ile Ala His Leu Asn Gly

35 40 45

Leu Ser Lys Cys Leu Gln Cys Gln Met Cys Ser Pro Ala Met Gly Leu

50 55 60

Arg Ala Ser Arg Asn Cys Ser Arg Thr Glu Asn Ala Val Cys

65 70 75

<210> 90

<211> 71

<212> PRT

<213> 人(Homo sapiens)

<400> 90

Cys Lys Pro Glu Glu Val Gln Gly Asn Cys Cys Pro Pro Cys Lys Gln

1 5 10 15

Gly Tyr Arg Val Thr Gly Gln Cys Thr Gln Tyr Thr Ala Thr Thr Cys

20 25 30

Thr Leu Cys Pro Asn Gly Thr Tyr Val Ser Gly Leu Tyr Asn Cys Thr

35 40 45

Asn Cys Thr Glu Cys Asn Asp Thr Glu Val Thr Ile Arg Asn Cys Thr

50 55 60

Ser Thr Asn Asn Thr Val Cys

65 70

<210> 91

<211> 74

<212> PRT

<213> 人 (Homo sapiens)

<400> 91

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



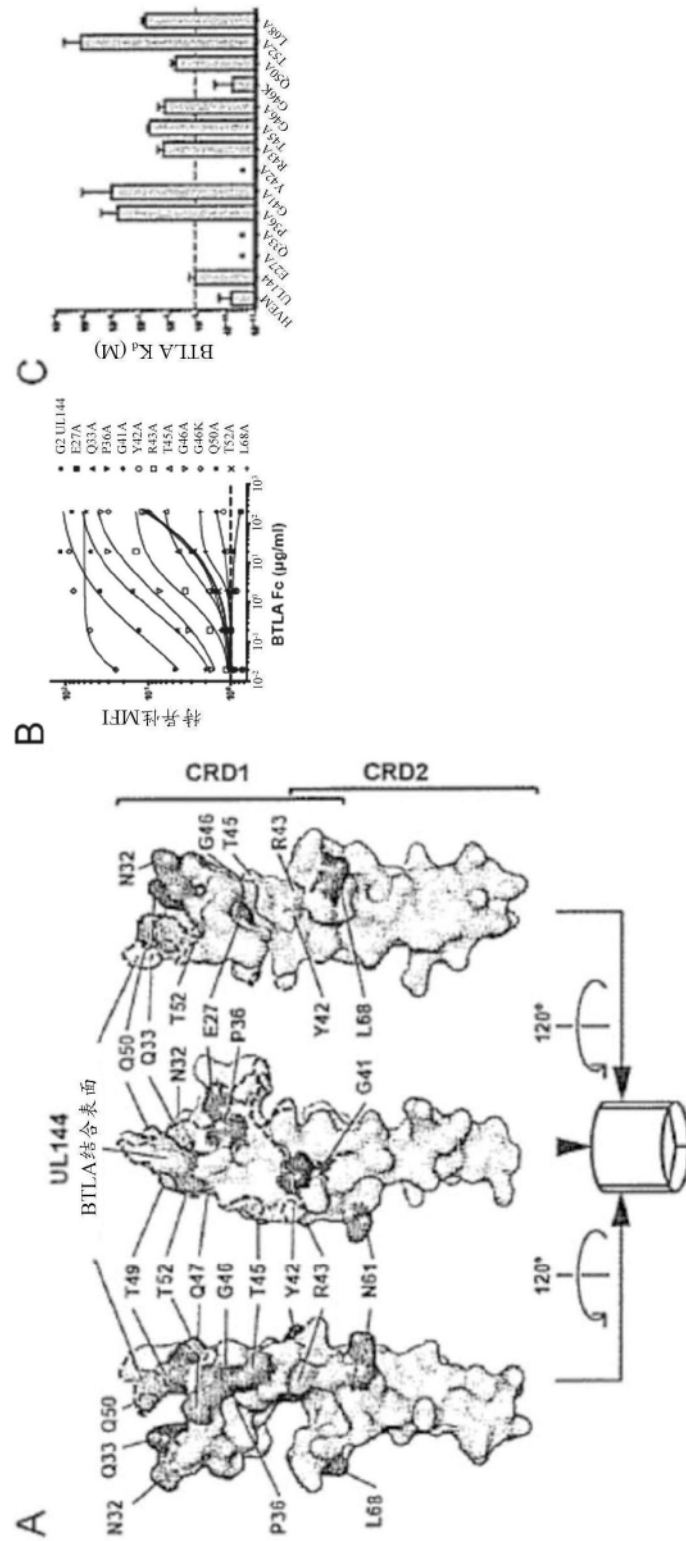
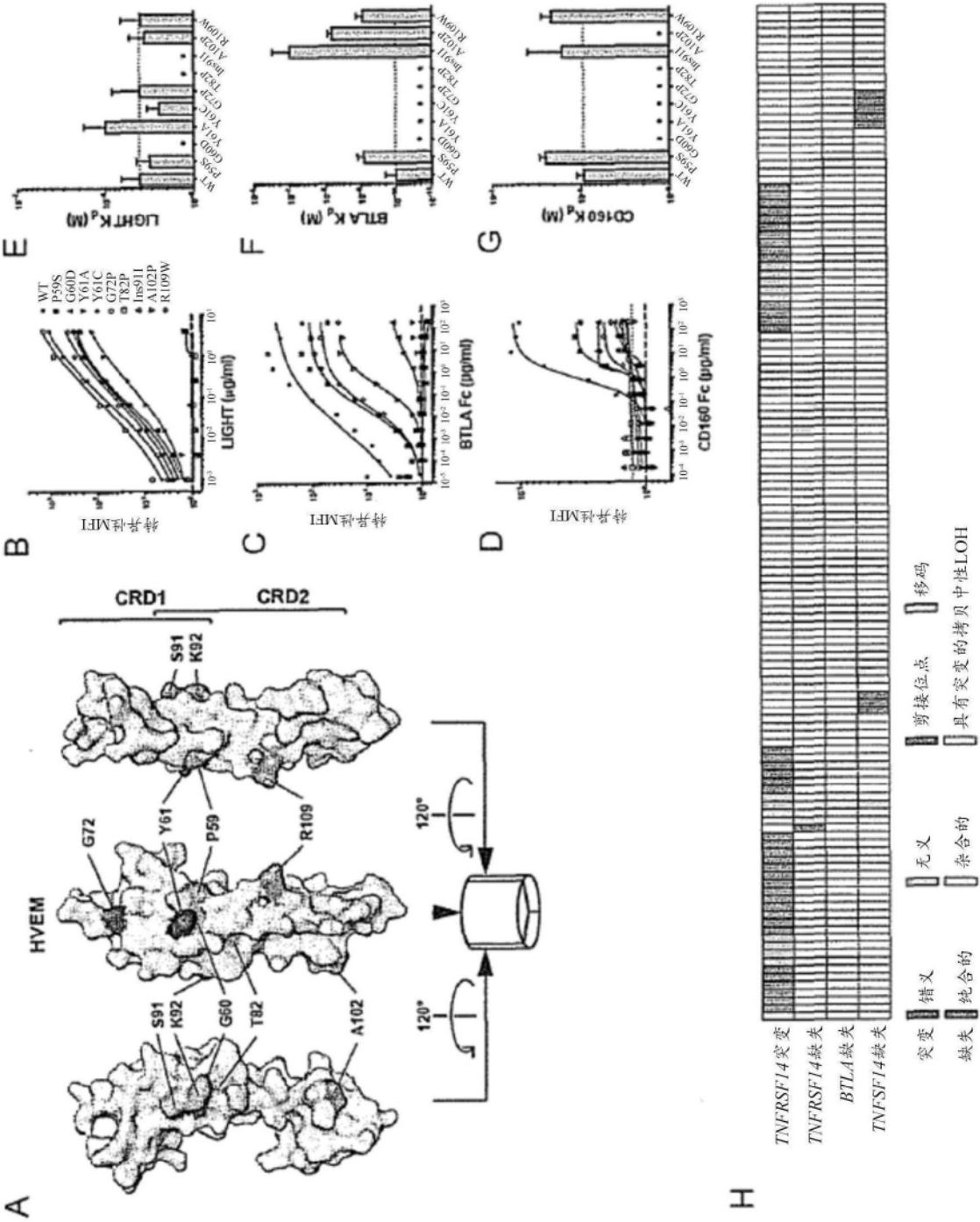


图1A-1C



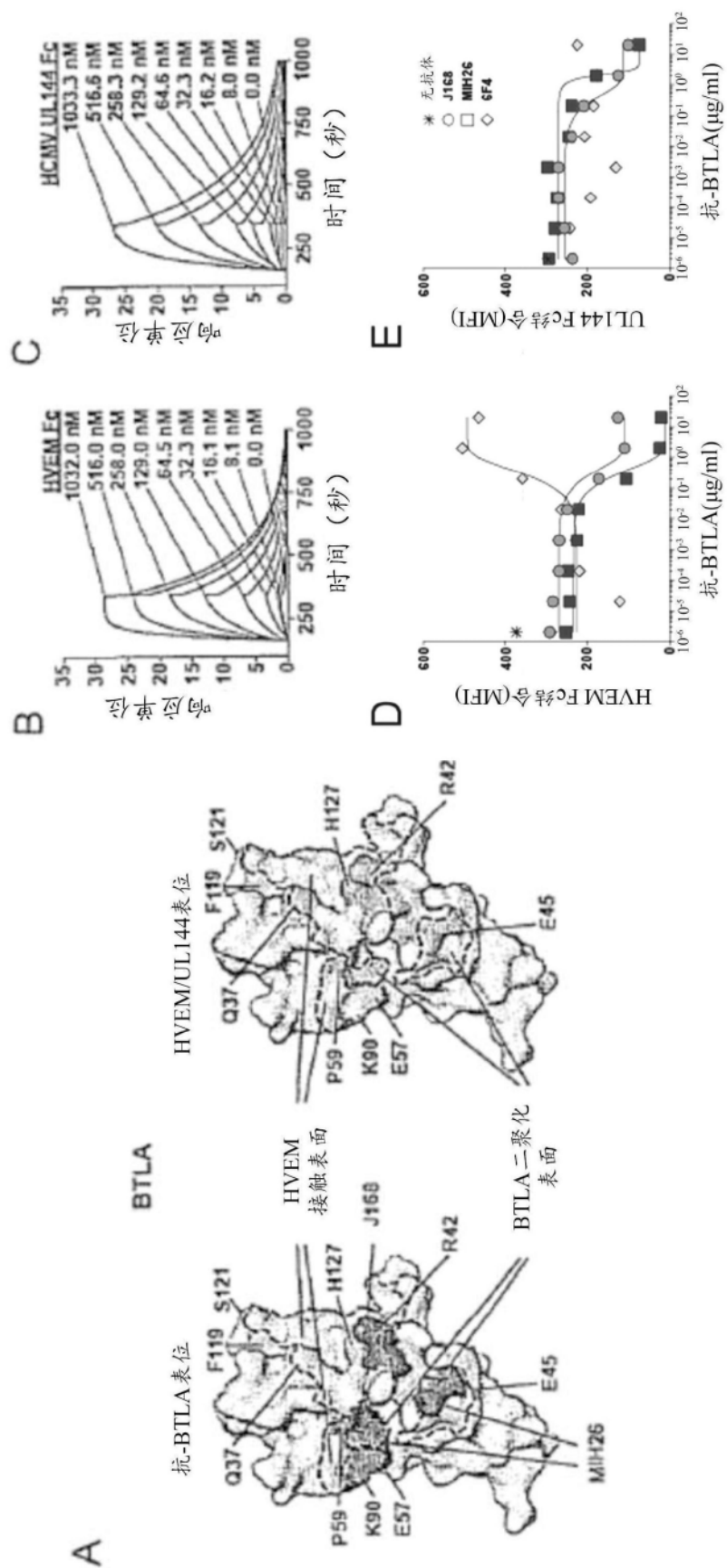


图3A-3E

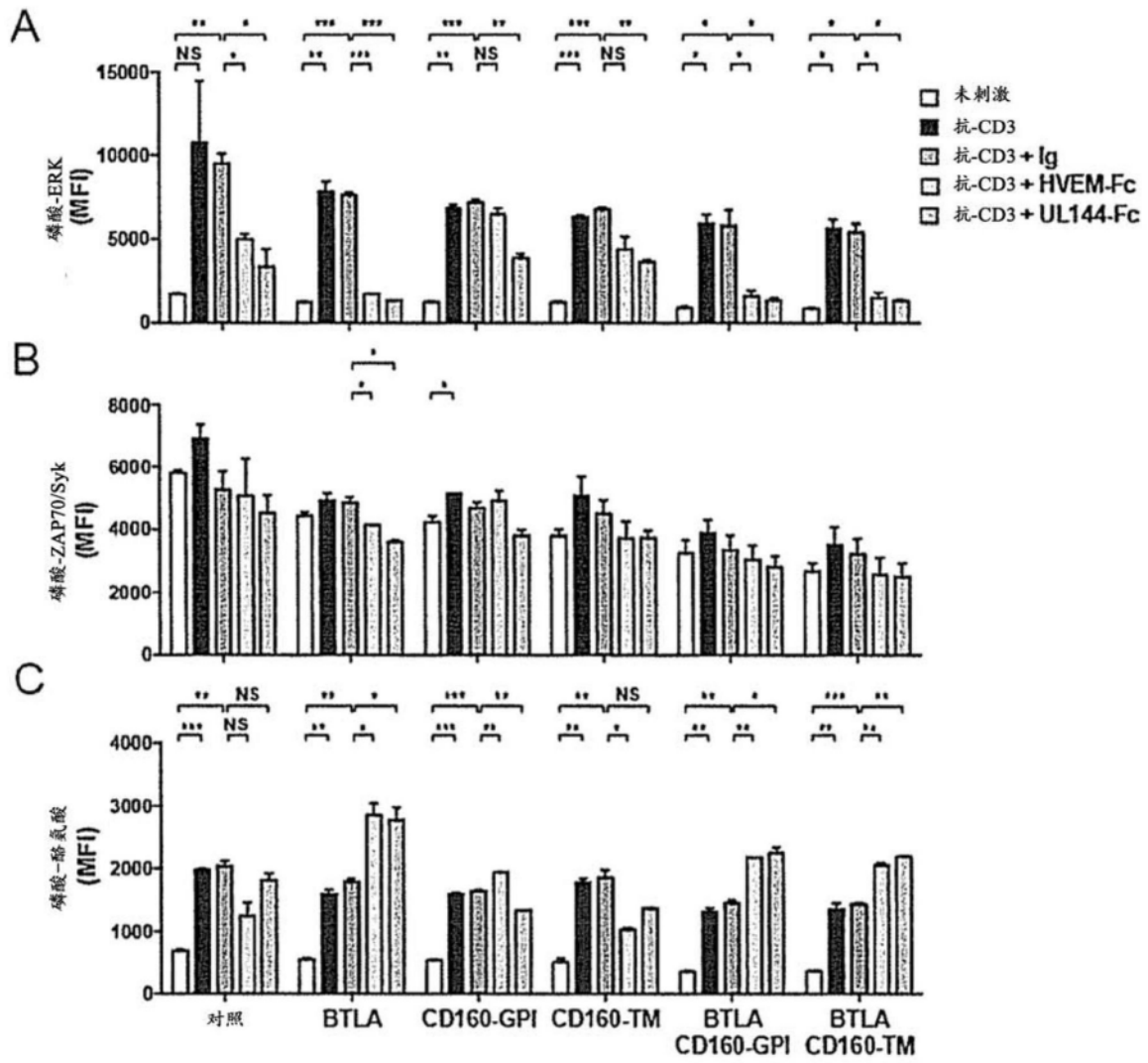


图4A-4C

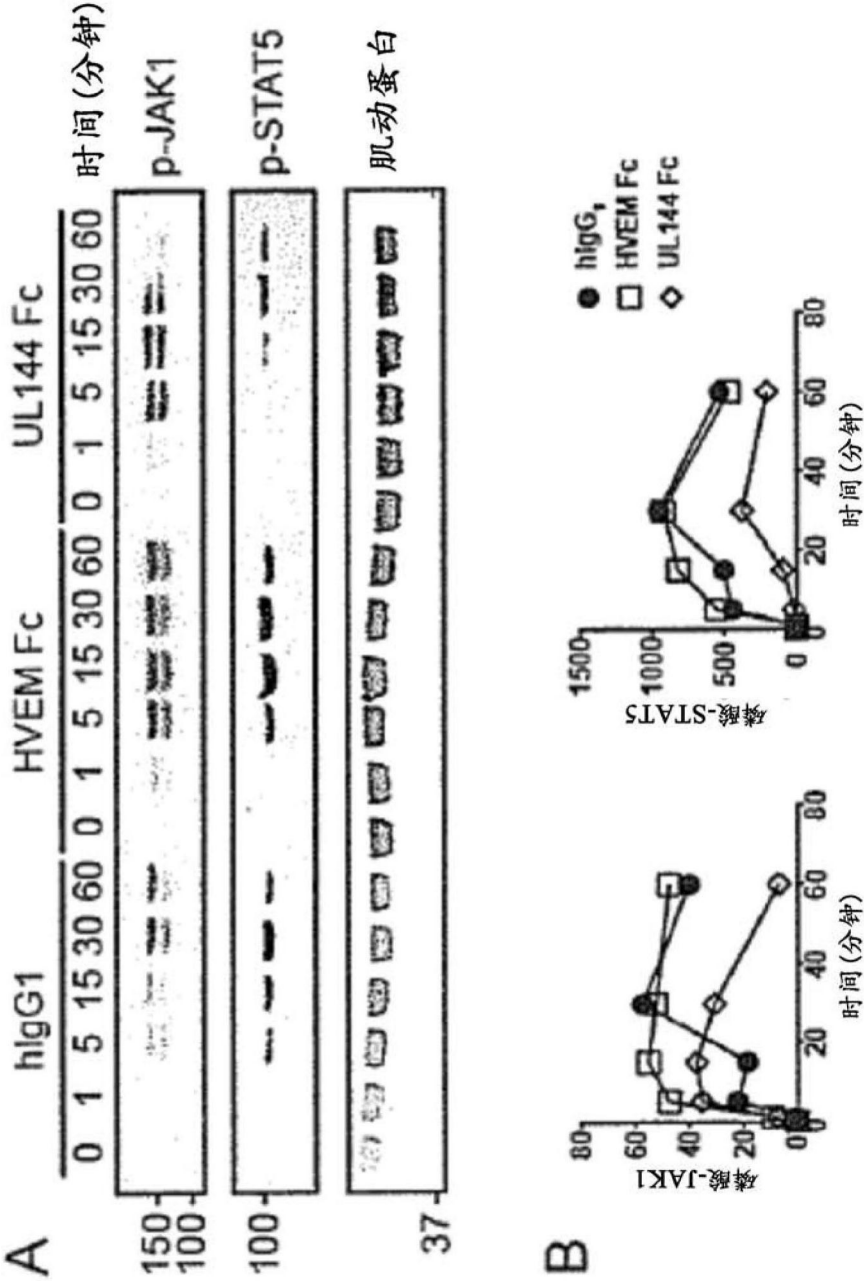


图5A-5B

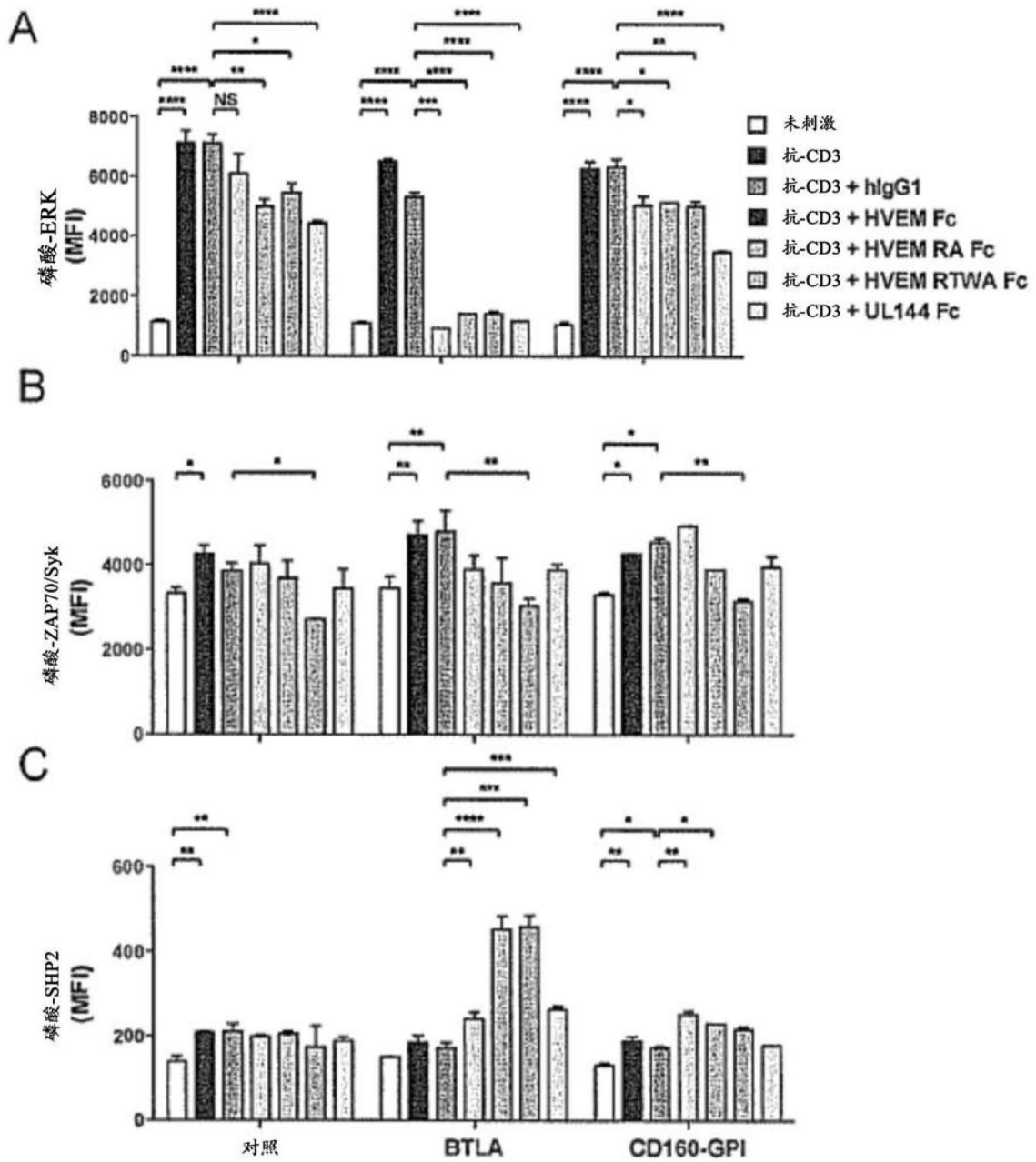


图6A-6C

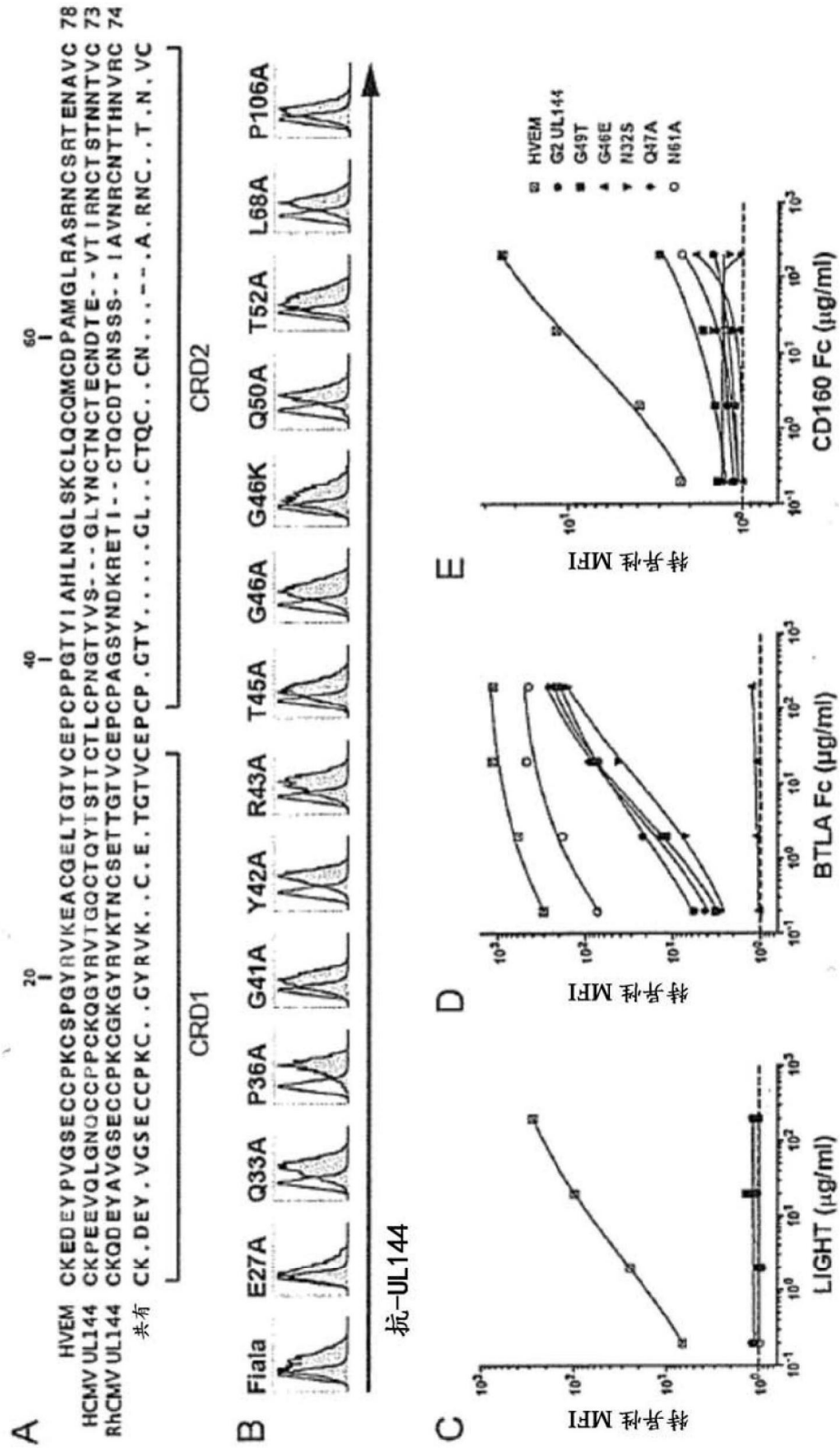


图7A-7E

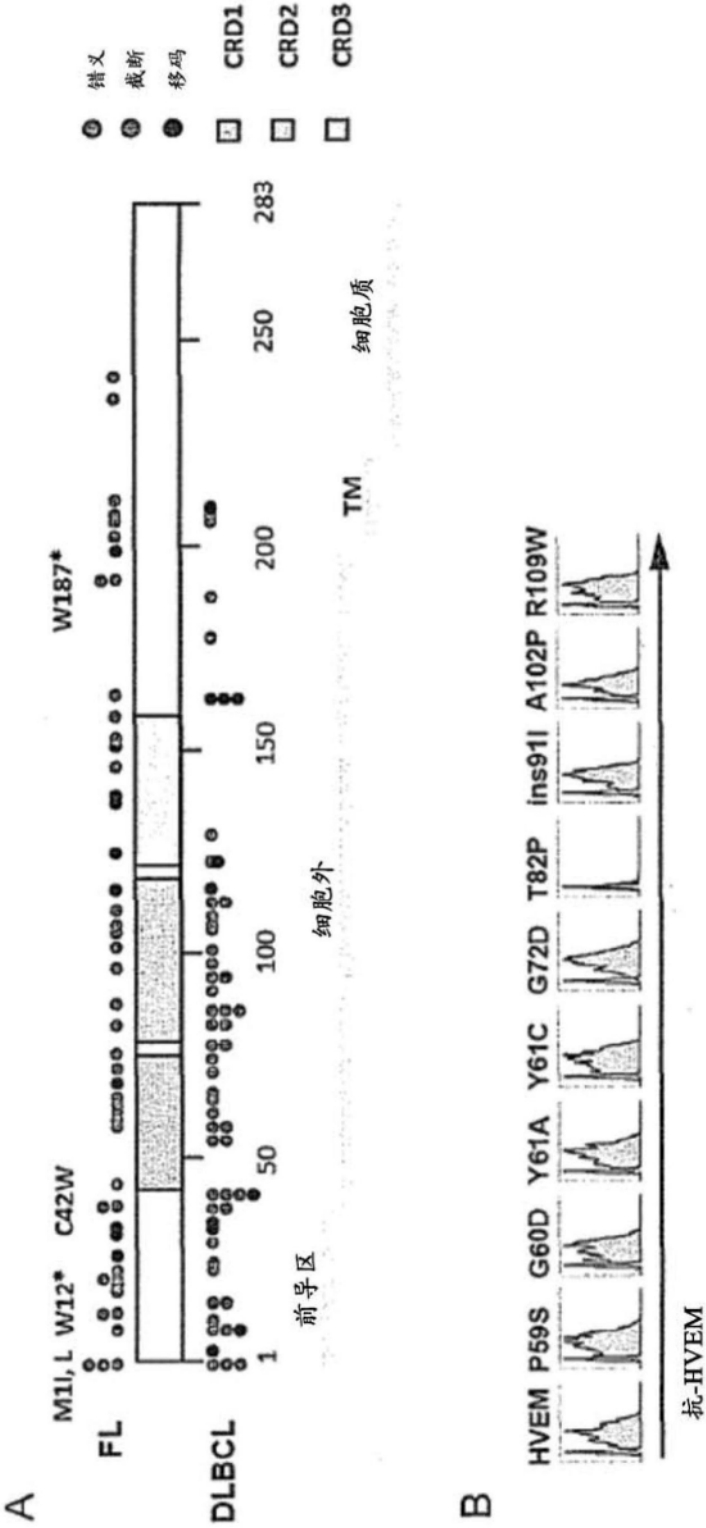


图8A-8B



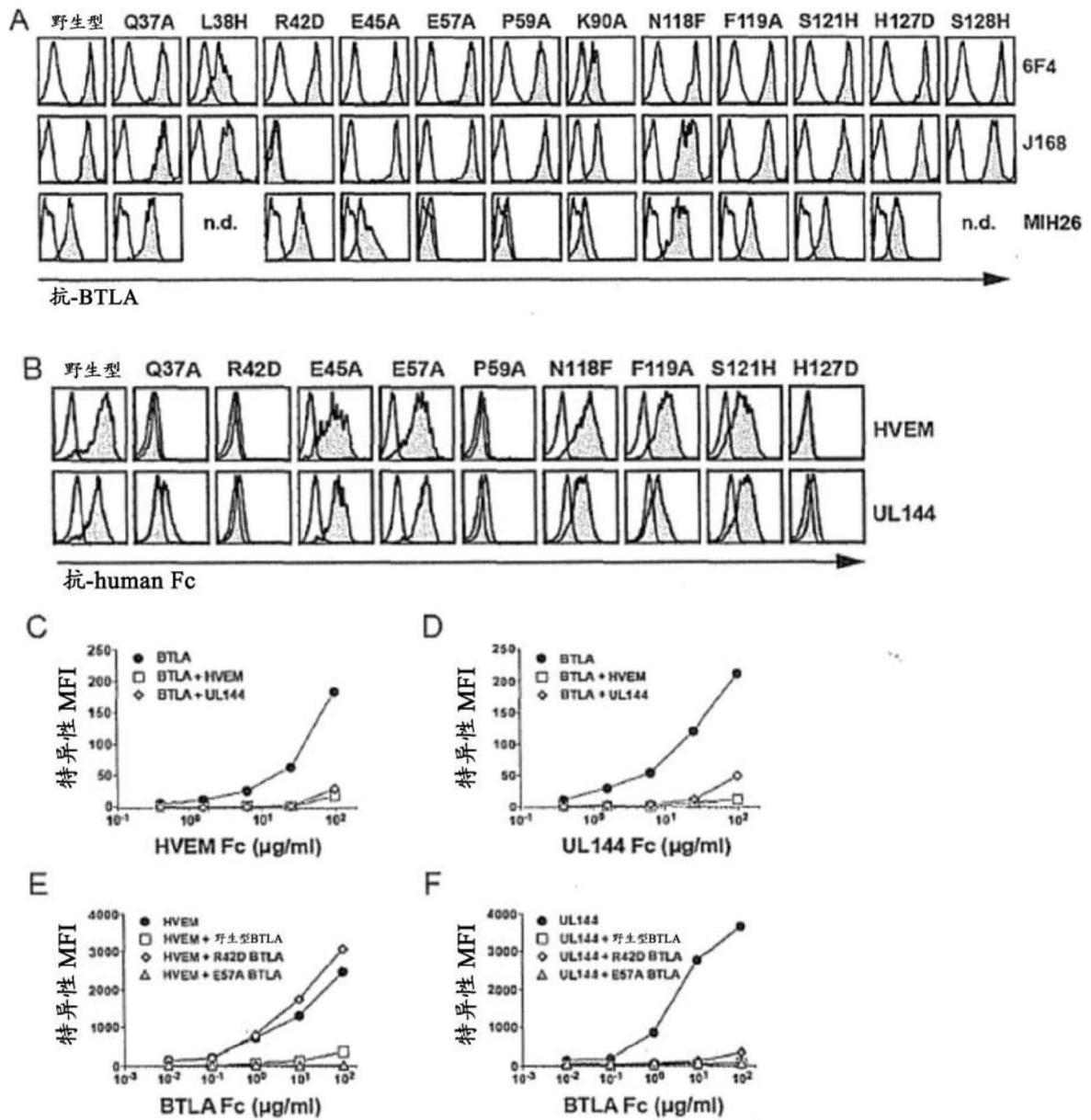


图9A-9F

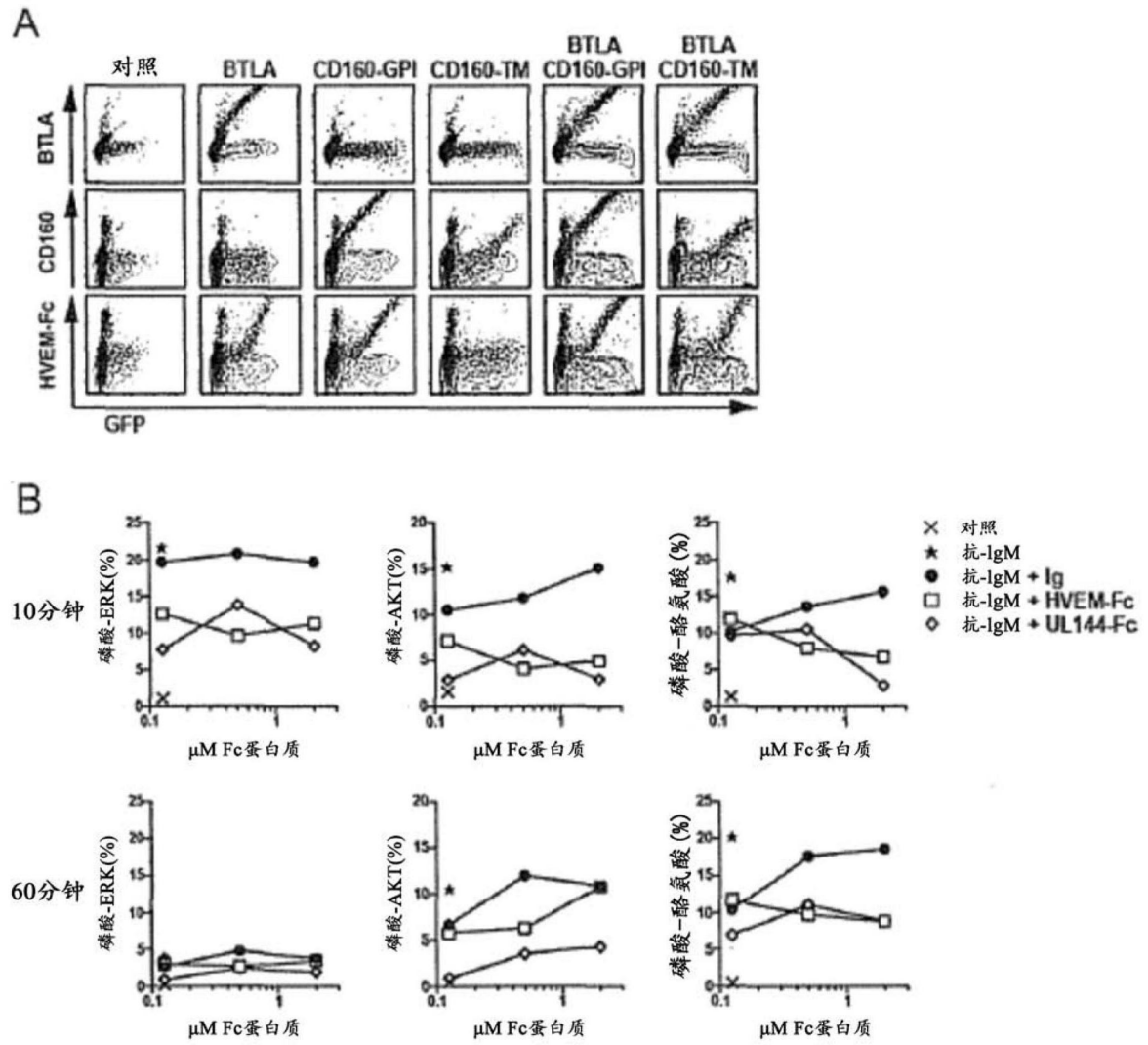


图10A-10B

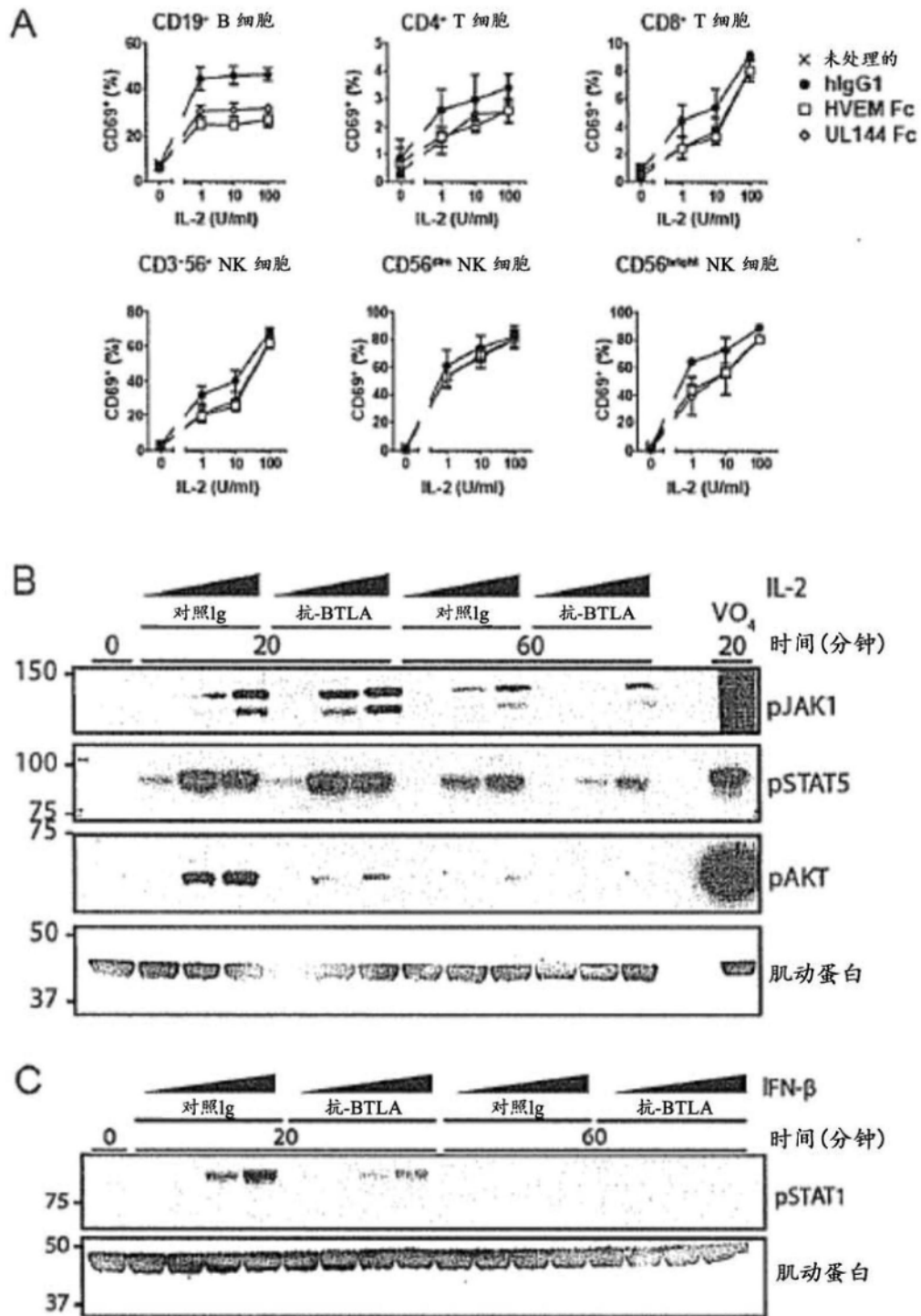


图11A-11C

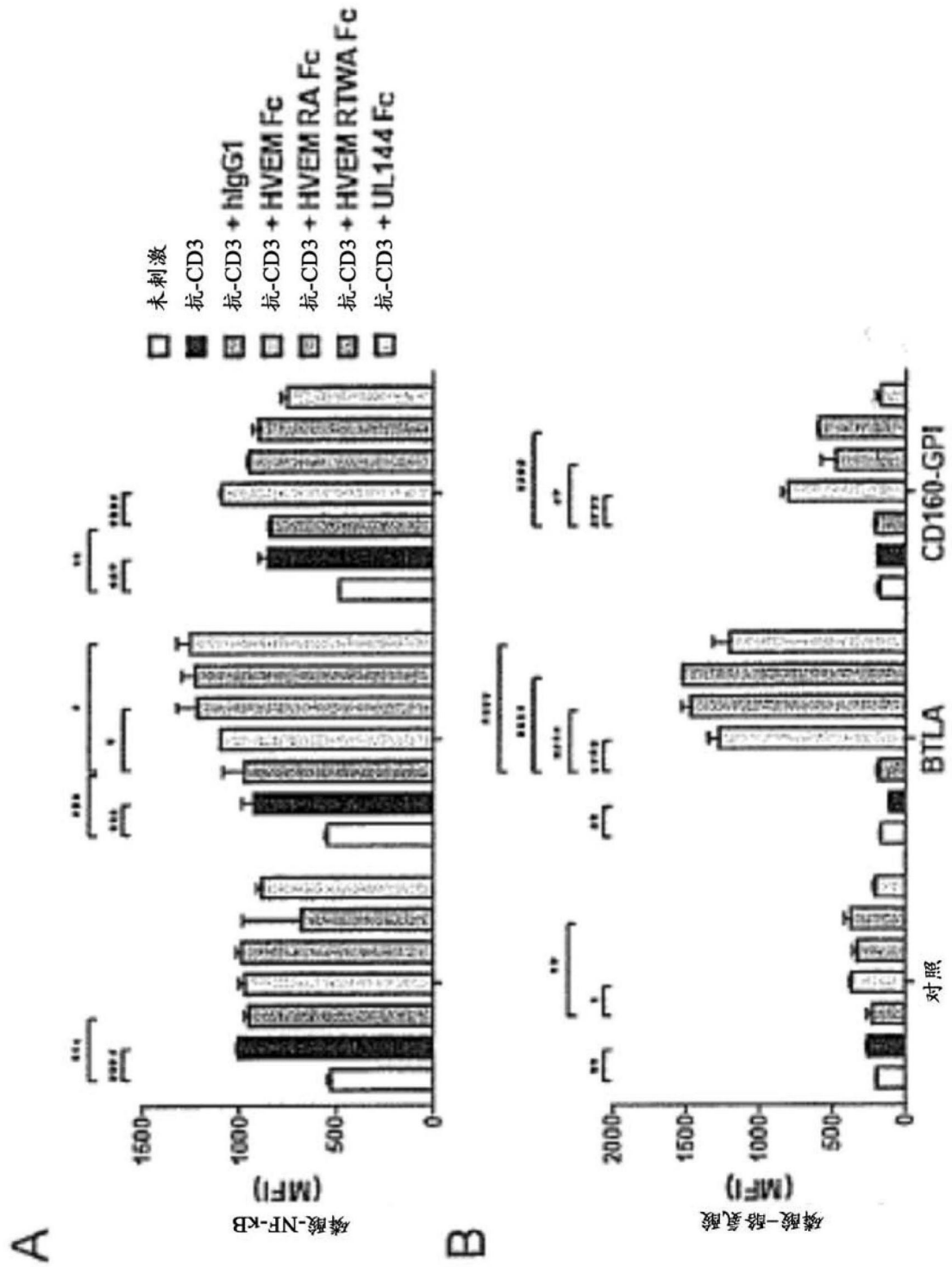


图12A-12B

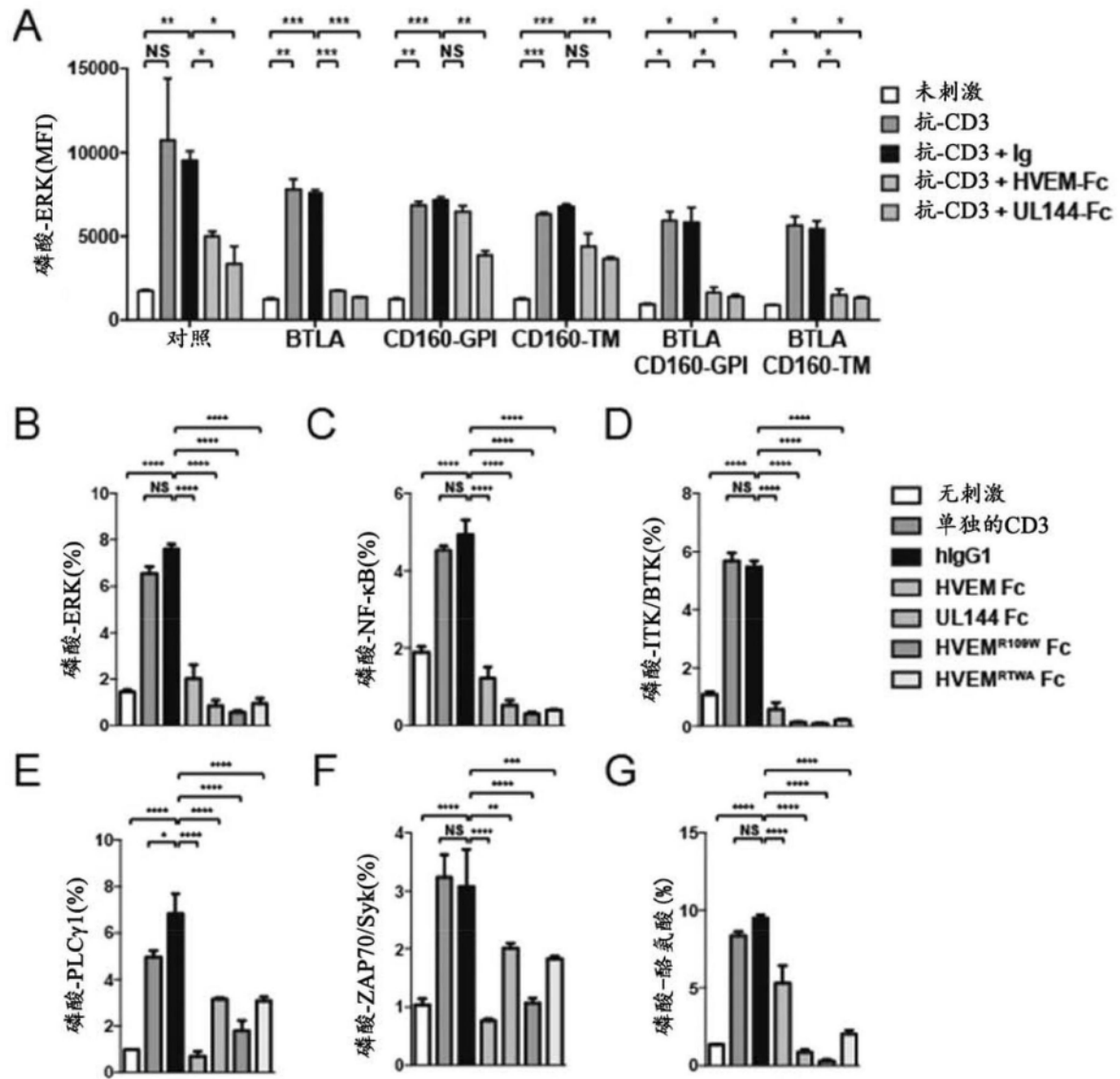


图13A-13G

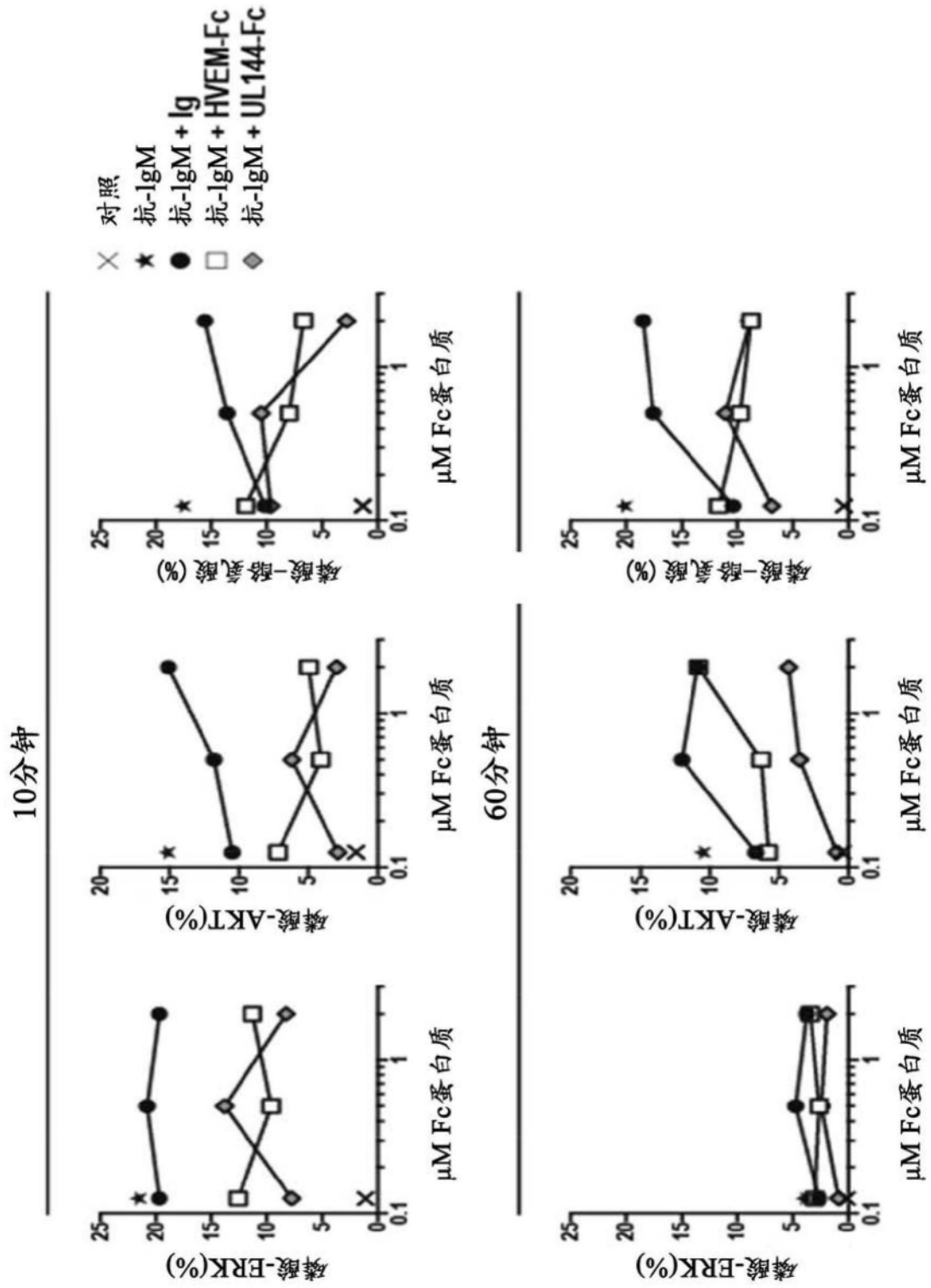


图14A-14B

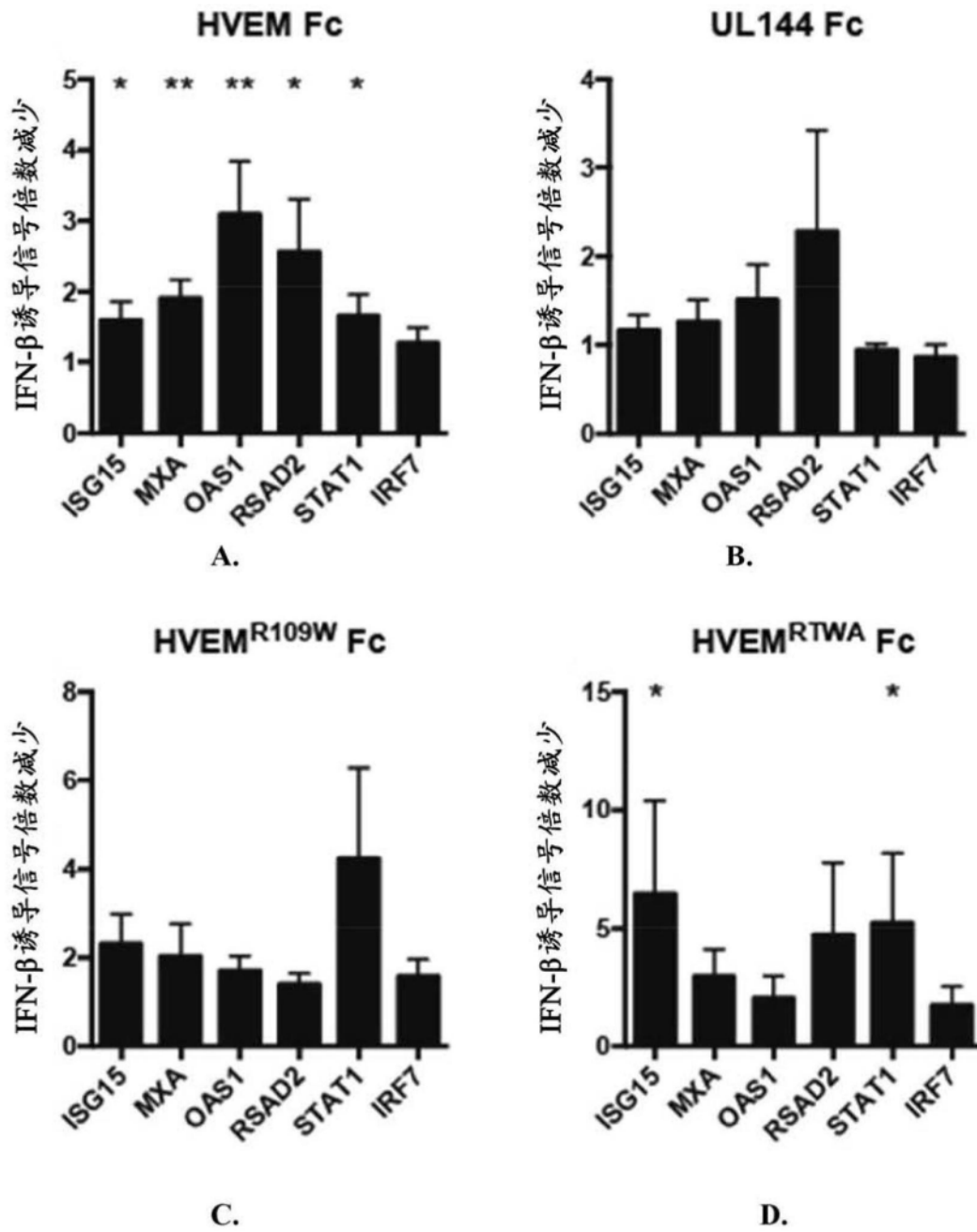


图15A-15D

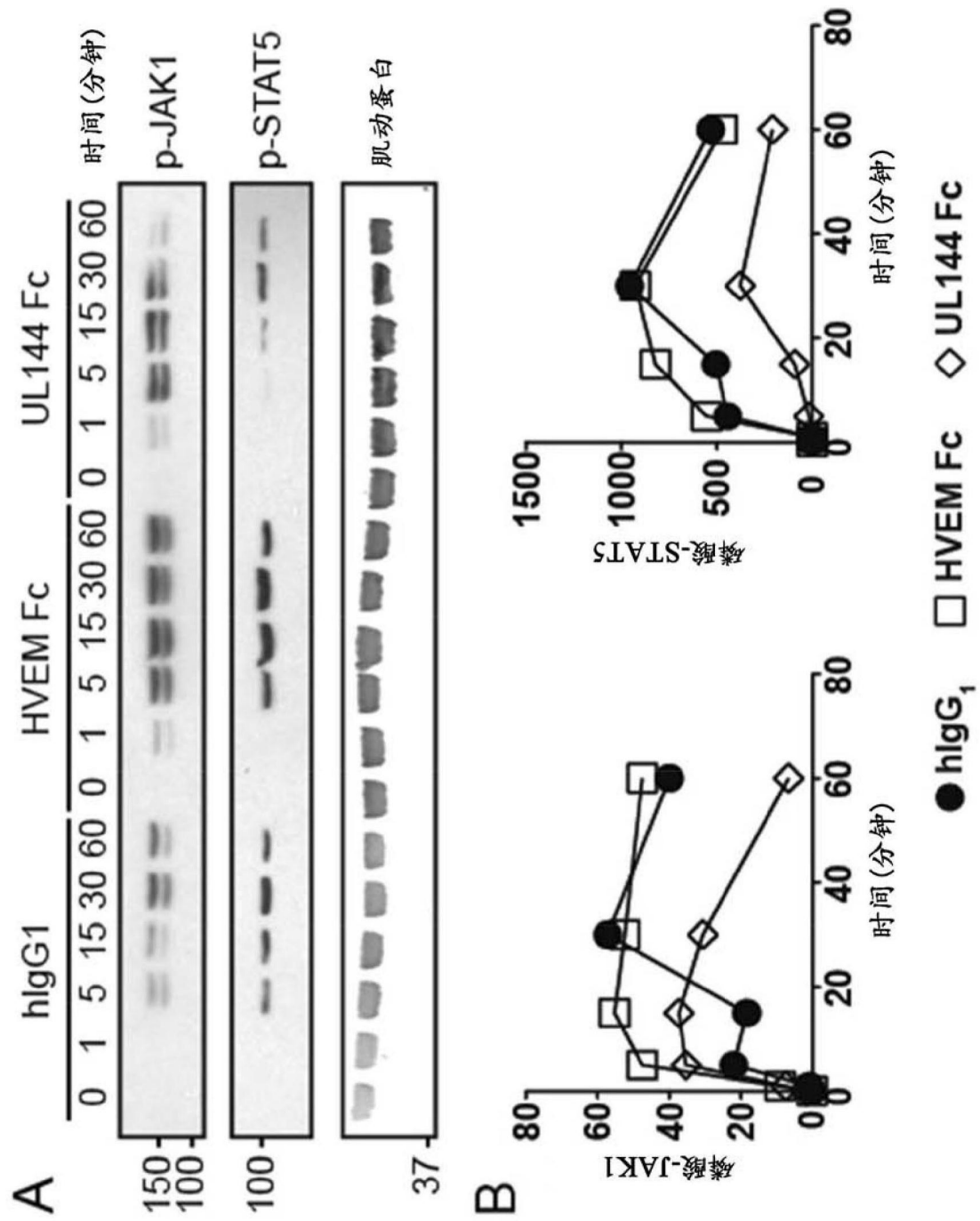


图16A-16B



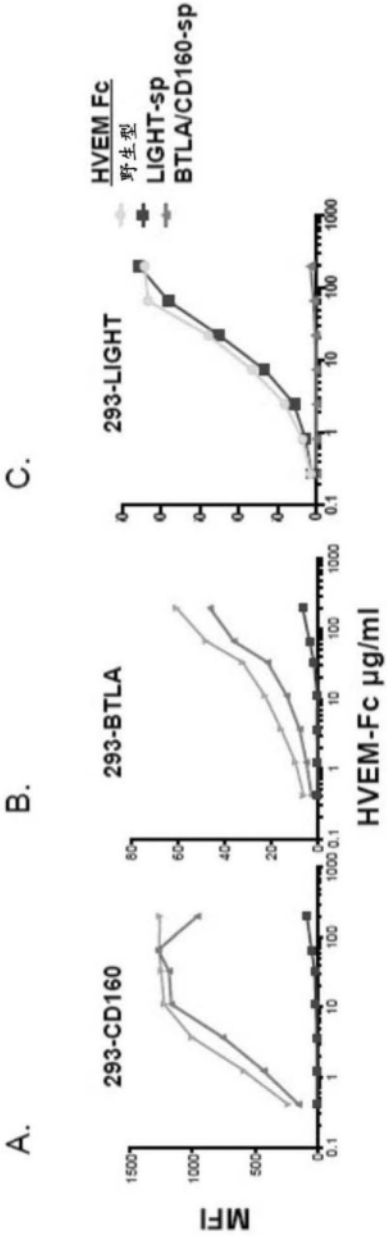


图17A-17C

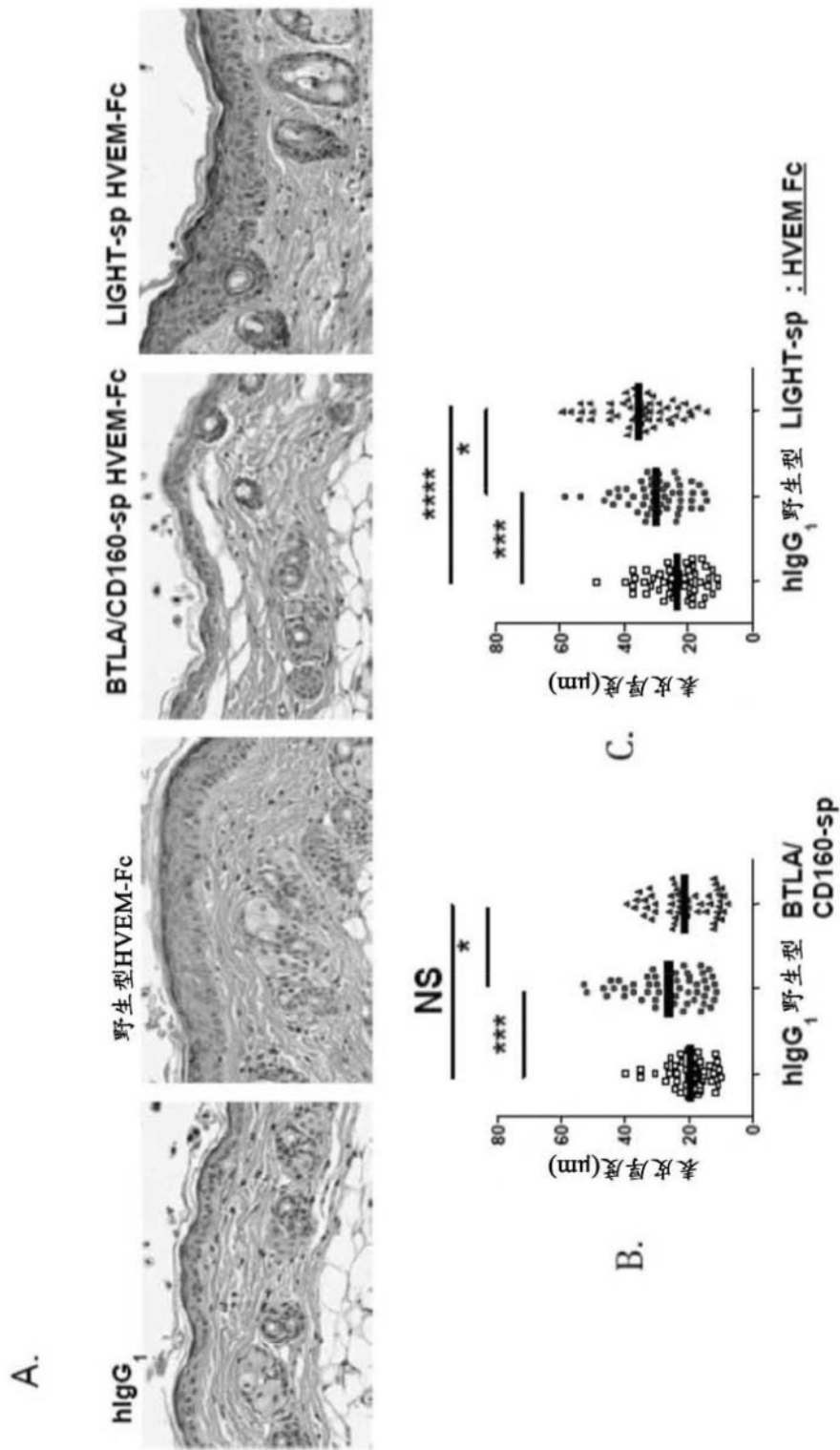


图18A-18C

```

1  gccgcagcaa tggcgctgag ttcctctgct ggagttcatc ctgctagctg ggttcccag
61  ctgccggtct gagcctgagg catggagcct cctggagact gggggcctcc tccctggaga
121 tccaccccc gaaccgacgt cttgaggctg gtgctgtatc tcaccttctt gggagcccc
181 tgctacgccc cagctctgcc gtccctgcaag gaggacgagt acccagtggg ctccgagtgc
241 tgccccaagt gcagtccagg ttatcgtgtg aaggaggcct gcggggagct gacgggcaca
301 gtgtgtgaac cctgccctcc aggcacctac attgcccacc tcaatggcct aagcaagtgt
361 ctgcagtgcc aaatgtgtga cccagccatg ggccctgcgc cgagccggaa ctgctccagg
421 acagagaacg ccgtgtgtgg ctgcagccca ggccacttct gcctcgtcca ggacggggac
481 cactgcgcgc cgtgccgcgc ttacgccacc tccagcccg ggcagagggg gcagaaggga
541 ggcaccgaga gtcaggacac cctgtgtcag aactgcccc cggggacctt ctctcccaat
601 gggaccctgg aggaatgtca gcaccagacc aagtgcagct ggctggtgac gaaggccgga
661 gctgggacca gcagctccca ctgggtatgg tggtttctct caggagacct cgtcatcgtc
721 attgtttgct ccacagttgg cctaatacata tgtgtgaaaa gaagaaagcc aaggggtgat
781 gtagtcaagg tgatcgtctc cgtccagcgc aaaagacagg aggcagaagg tgaggccaca
841 gtcattgagg ccctgcaggc ccctccggac gtcaccacgg tggccgtgga ggagacaata
901 ccctcattca cggggaggag ccaaaccac tgaccacag actctgcacc ccgacgccag
961 agatacctgg agcgacggct gctgaaagag gctgtccacc tggcgaaacc accggagccc
1021 ggaggcttgg gggctccgcc ctgggctgg

```

图19A

```

1  MEPPGDWGPP PWRSTPRTDV LRLVLYLTFL GAPCYAPALP SCKEDEYPVG SECCPKCSPG
61  YRVKEACGEL TGTVCEPCPP GTYIAHLNGL SKCLQCQMCD PAMGLRASRN CSRTENAVCG
121 CSPGHFCIVQ DGDHCAACRA YATSSPGQRV QKGGTESQDT LCQNCPPGTF SPNGTLEECQ
181 HQTKCSWLVT KAGAGTSSSH WVWWFLSGSL VIVIVCSTVG LIICVKRRKP RGDVVKVIVS
241 VQRKRQEAEG EATVIEALQA PPDVTTVAVE ETIPSFTGRS PNH

```

图19B